

Uloge nukleaza DnaQ, ExoT i helikaze UvrD u naivnoj adaptaciji sustava CRISPR-Cas u bakteriji Escherichia coli

Mamić, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:944431>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomislav Mamić

**Uloge nukleaza DnaQ, ExoT i helikaze
UvrD u naivnoj adaptaciji sustava
CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli***

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na prihvaćanju mentorstva te za sve savjete, podršku i pomoć tijekom laboratorijskog rada i pisanja.

Zahvaljujem asistentima mag. ing. biotechn. Karli Košpić i mag. biol. mol. Brunu Komazecu na pomoći za dio laboratorijskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju na ustupanju laboratorijske opreme te ugodnoj radnoj atmosferi.

Nadalje, zahvaljujem kolegici Mirti i kolegi Mariju zbog kojih su laboratorijski sati trajali kraće.

Zahvalan sam svim profesorima i profesoricama koji su na mene prenijeli djelić svog znanja te čiji je uzor služio kao inspiracija.

Hvala kolegama s godine s kojima sam dijelio strahove i nedoumice, radosti i spoznaje tijekom studiranja.

Zahvaljujem svojoj obitelji i svojoj djevojci koji su bili bezuvjetna podrška i oslonac tijekom ovih pet godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloge nukleaza DnaQ, ExoT i helikaze UvrD u naivnoj adaptaciji sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Tomislav Mamić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas prokariotski je sustav adaptivne imunosti. Sastoji se od gena *cas*, koji sudjeluju u svim fazama obrane, te lokusa CRISPR, u kojemu se nalaze ponavljajuće regije isprekidane razmaknicama podrijetlom iz strane DNA. Tijekom faze adaptacije razmaknica se ugrađuje u lokus CRISPR, a predmet ovog istraživanja jest naivna adaptacija koja se zbiva pri prvom susretu stanice sa stranom DNA. Glavnu ulogu u naivnoj adaptaciji imaju proteini Cas1 i Cas2 koji tvore integracijski kompleks, no da bi strana DNA postala supstratom kompleksa, podvrgava se helikaznoj i egzonukleaznoj aktivnosti enzima RecBCD. Odnedavno je poznato da egzonukleazna aktivnost enzima RecBCD nije nužna za odvijanje tog procesa. Ovdje, prvi put je istražena uloga egzonukleaza DnaQ i ExoT u naivnoj adaptaciji u uvjetima *in vivo* u bakteriji *Escherichia coli*. U tu svrhu, metodom *recombineering* konstruirani su mutanti $\Delta dnaQ$ i $\Delta exoT$ te transformirani plazmidom s genima *cas1-cas2*. Ugradnja razmaknice analizirana je metodom PCR. Dobiveni rezultati ukazuju da DnaQ djelomično sudjeluje u procesiranju te da ExoT vjerojatno ne sudjeluje i može biti zamijenjena drugim nukleazama. Jednako, prvi put u kontekstu adaptacije, istražena je uloga helikaze UvrD, na mutantu $\Delta uvrD$, a rezultati upućuju da UvrD potiče naivnu adaptaciju, možebitno uklanjanjem proteina RecA s jednolančanih supstrata.

Ključne riječi: razmaknica, egzonukleaza, procesiranje, Cas1-Cas2, RecBCD, RecA
(60 stranica, 16 slika, 13 tablica, 72 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor:

Prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 7. rujna 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The roles of DnaQ, ExoT nucleases and UvrD helicase in CRISPR-Cas system naive adaptation in *Escherichia coli*

Tomislav Mamić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

CRISPR-Cas system is a prokaryotic adaptive immunity system that consists of *cas* genes, which participate in all phases of defense, and the CRISPR locus with series of repeats interspaced by spacers originating from foreign DNA. During the adaptation phase, a spacer is integrated into the CRISPR locus. The objective of this study is naive adaptation, occurring during the cell's initial contact with foreign DNA. The primary role in naive adaptation is mediated by the Cas1 and Cas2 proteins, which form an integration complex. However, in order for foreign DNA to become an integration complex's substrate, it is subjected to the helicase and exonuclease activities of the RecBCD enzyme. Recently, it has been discovered that the exonuclease activity of the RecBCD enzyme is not essential for this process. Here, for the first time, the role of DnaQ and ExoT exonucleases in naive adaptation was studied *in vivo* in *E. coli*. For that purpose, $\Delta dnaQ$ and $\Delta exoT$ mutants were constructed using recombineering and transformed with a plasmid carrying the *cas1-cas2* genes. Spacer acquisition was analyzed using the PCR method. The obtained results indicate that DnaQ partially participates in processing, and that ExoT likely doesn't participate and can be replaced by other nucleases.. Similarly, for the first time in the context of adaptation, the role of the UvrD helicase was studied using $\Delta uvrD$ mutant. The results suggest that UvrD promotes naive adaptation, possibly by removing the RecA protein from single-stranded substrates.

Keywords: spacer, exonuclease, processing, Cas1-Cas2, RecBCD, RecA
(60 pages, 16 figures, 13 tables, 72 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor:

Prof. Ivana Ivančić Baće, PhD

Reviewers:

Prof. Ivana Ivančić Baće, PhD

Assoc. prof. Tomislav Ivanković, PhD

Assoc. prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Thesis accepted: 7th September 2023

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Građa sustava CRISPR-Cas u bakteriji <i>E. coli</i>	1
1.2. Naivna adaptacija.....	4
1.3. Regulacija sustava CRISPR-Cas u bakteriji <i>E. coli</i>	7
1.4. Procesiranje strane DNA u stvaranju supstrata za kompleks Cas1-Cas2.....	9
2. Cilj istraživanja	12
3. Materijali i metode	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Bakterijski sojevi	13
3.1.2. Plazmidi	14
3.1.3. Početnice.....	14
3.1.4. Hranjive podloge i puferi.....	16
3.2. Metode	17
3.2.1. Uzgoj bakterija	17
3.2.2. Mjerenje optičke gustoće bakterije.....	18
3.2.3. Transformacija bakterijskih stanica plazmidnom DNA	18
3.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija linearnom DNA	19
3.2.5. Konstrukcija bakterijskih sojeva transdukcijom fagom P1.-vir.....	20
3.2.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. <i>polymerase chain reaction</i>)	21
3.2.7. Cijepanje restrikcijским enzimima	24
3.2.8. Elektroforeza u agaroznom gelu	24
3.2.9. Pročišćavanje DNA.....	25
3.2.10. Mjerenje koncentracije DNA	25
3.2.11. Test razmaza (od eng. <i>streak test</i>)	25
3.2.12. Provjera stabilnosti plazmida.....	26
3.2.13. Analiza ukupnih proteina metodom SDS-PAGE	26
4. Rezultati	29
4.1. Insercijski mutanti <i>cas1-cas2</i>	29
4.1.1. Konstrukcija mutanata metodom <i>recombineering</i>	29
4.1.2. Analiza učinkovitosti naivne adaptacije u insercijskim sojevima	34
4.2. Delecijski mutanti.....	38
4.2.1. Konstrukcija mutanata $\Delta dnaQ$ i $\Delta exoT$ metodom <i>recombineering</i>	38
4.2.2. Konstrukcija mutanata transdukcijom	41
4.2.3. Analiza učinkovitosti naivne adaptacije u delecijskim sojevima.....	41

5. Rasprava	44
5.1. Insercijski mutanti.....	44
5.2. Delecijski mutanti.....	45
5.2.1. Egzonukleaze DnaQ i ExoT	47
5.2.2. Uloga helikaze UvrD.....	50
6. Zaključak	52
7. Literatura	53
8. Životopis	60

Popis kratica

bp – bazni par

Cas – engl. *CRISPR-associated protein*

Cascade – engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*

CFU – engl. *colony forming units*

CRISPR – engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

crRNA – CRISPR RNA

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

DSB – engl. *double strand break*, dvolančani lom DNA

dsDNA - engl. *double-stranded DNA*, dvolančana DNA

H-NS – engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein*

HR – homologna rekombinacija

Htp-G – engl. *high-temperature protein G*

IHF – engl. *integration host factor*

kb – kilobaza

LB – Luria-Bertani

LeuO – engl. *transcriptional activator of leuABCD operon*

MMR – engl. *mismatch repair*, popravak krivo sparenih baza

NER – engl. *nucleotide excision repair*, ekscizijski popravak nukleotida

PAM – engl. *protospacer adjacent motif*

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

Rec – engl. *recombinase*

RNA – engl. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

rpm – engl. *revolutions per minute*

ssDNA – engl. *single-stranded DNA*, jednolančana DNA

StpA – engl. *suppressor of td phenotype A*

TAE – Tris-acetat-EDTA

UV – engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto zračenje

wt – engl. *wild type*, divlji tip

1. Uvod

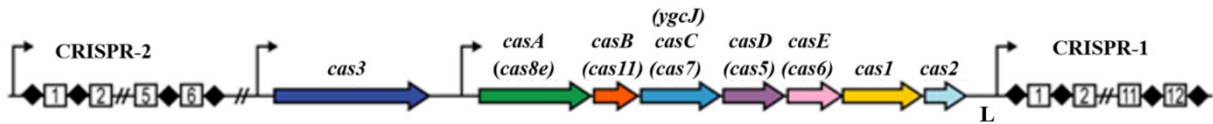
Duga koevolucija prokariotskih organizama i bakteriofaga, kao i brojnost potonjih (više od 10^{30} virusnih čestica) koja ih čini najrasprostranjenijim biološkim entitetom na Zemlji (Mann 2005), rezultirala je razvojem brojnih obrambenih mehanizama kod prokariota. Supresija adsorpcije faga te sustav restriksijskih endonukleaza i abortivne infekcije oblici su prirodene imunosti. No, jedini poznati adaptivni sustav zaštite od faga jest CRISPR-Cas (od eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated*) pronađen u približno 50% bakterija i gotovo 90% arheja (Hille i sur. 2018).

Prvi korak u otkriću i karakterizaciji sustava CRISPR-Cas zbio se u 80-im godinama prošloga stoljeća kada su u blizini gena *iap* u bakteriji *Escherichia coli* uočeni, dotad neokarakterizirani, ponavljajući sljedovi (Ishino i sur. 1987). Tada im nije bila pridana funkcija, a poslužili su za genotipizaciju pojedinih bakterijskih sojeva. Otkriće da se slični ponavljajući sljedovi nalaze u još jednoj domeni živoga svijeta, arhejama (Mojica i sur. 1993), sugeriralo je da nose značajnu ulogu. Tek je početkom 21. stoljeća utvrđeno kako se između tih ponavljajućih sekvenci nalaze jedinstveni sljedovi homologni genomima bakteriofaga, a sojevi u kojima su pronađeni bili su rezistentni na fage čijim genomima su odgovarali ti sljedovi (Mojica i sur. 2005, Bolotin i sur. 2005, Pourcel i sur. 2005). Time je postalo jasno kako je riječ o sustavu obrane protiv bakteriofaga što je kasnije potvrđeno i eksperimentalno (Barrangou i sur. 2007). Nešto ranije tim sljedovima nadjenuto je ime CRISPR, a u istoj publikaciji po prvi put su okarakterizirani geni *cas* (od eng. *CRISPR associated*) koji se nalaze u blizini lokusa CRISPR (Jansen i sur. 2002).

1.1. Građa sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli*

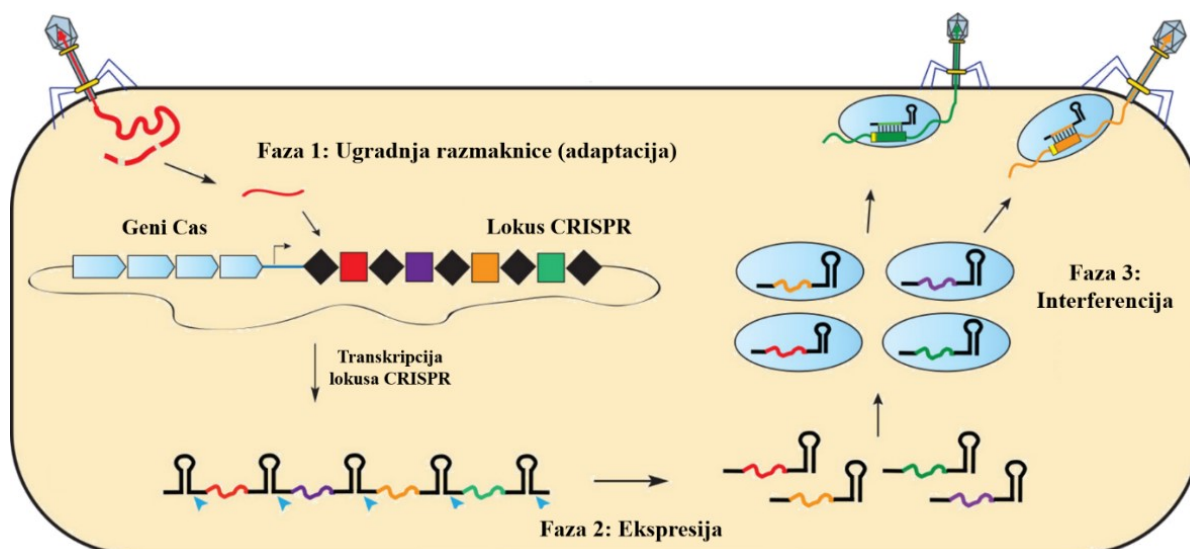
Danas je građa sustava CRISPR-Cas puno jasnija, a značajno se razlikuje između različitih bakterijskih i arhejskih vrsta unatoč zajedničkoj ulozi (Mitić i sur. 2023). Sustav se klasificira na temelju proteina Cas koji sudjeluju u fazi interferencije (objašnjena kasnije u tekstu) u dvije klase, šest tipova i nekoliko podtipova (Sternberg i sur. 2016). U klasi 1 (tipovi I, III i IV) tu funkciju obavlja multiproteinski kompleks dok je u klasi 2 (tipovi II, V i VI) riječ o jednom multifunkcionalnom proteinu. Proteini klase II, ponajviše Cas9, zbog svoje

jednostavnosti, primjenu su pronašli u ciljanom uređivanju i manipulaciji genoma (Jiang i Doudna 2017). U bakteriji *E. coli*, koja je središnji organizam ovog istraživanja, prisutan je podtip I-E klase 1 (Mitić i sur. 2023) (slika 1.1), pa se građa, regulacija i pojedine faze sustava CRISPR-Cas, pomnije objašnjene u tekstu koji slijedi, odnose na taj podtip.



Slika 1.1. Sustav CRISPR-Cas podtipa I-E u bakteriji *Escherichia coli* K-12. Osam je gena *cas*. Geni *cas8e*, *cas11*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* i *cas2* nalaze se u zajedničkom operonu dok je gen *cas3* pod kontrolom vlastitog promotora. Dva su lokusa CRISPR (-1 i -2) s dvanaest, odnosno, šest jedinica (razmaknica-ponavljanje). Slovom L označena je pozicija vodeće regije (od eng. *leader sequence*) u kojoj se nalazi promotor lokusa CRISPR. Preuzeto i prilagođeno iz Xue i Sashital 2019.

Lokus CRISPR sačinjavaju ponavljajuće sekvence razdvojene jedinstvenim razmaknicama porijeklom iz genoma bakteriofaga, plazmida ili pokretnih genetičkih elemenata (Hille i Charpentier 2016). U bakteriji *E. coli* postoje dva lokusa CRISPR (-1 i -2) s dvanaest, odnosno, šest jedinica (razmaknica-ponavljanje) (Pul i sur. 2010). Ponavljajuća regija u obama lokusima dugačka je 29 bp, a duljina razmaknice u 95% slučajeva jest 32 bp iako može varirati (31-34 bp) (Savitskaya i sur. 2013). Lokusi CRISPR-1 i -2 pod kontrolom su promotora *Pcrispr1* i *Pcrispr2* koji se nalaze u vodećoj regiji (od eng. *leader sequence*) bogatoj AT-baznim parovima (Pul i sur. 2010). Druga osnovna komponenta sustava jesu geni *cas* koji se nalaze uzvodno od lokusa CRISPR, a osam ih je u bakteriji *E. coli*: gen *cas3* pod kontrolom je vlastitog promotora *Pcas3*, a preostalih sedam (*cas8e*, *cas11*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* i *cas2*) nalaze se u zajedničkom operonu pod kontrolom promotora *Pcas8e* (Mitić i sur. 2023). Geni *cas* kodiraju za istoimene proteine koji sudjeluju u trima fazama obrane: adaptaciji (a), ekspresiji (b) i interferenciji (c) (slika 1.2).



Slika 1.2. Faze obrane bakterije sustavom CRISPR-Cas. Nakon infekcije bakterije stranom DNA (u ovom primjeru virusnom), dolazi do prepoznavanja, fragmentiranja i ugradnje protorazmaknice u lokus CRISPR tijekom adaptacije (faza 1). Protorazmaknica se nakon ugradnje naziva razmaknicom. Tijekom ekspresije (faza 2) lokus CRISPR prepisuje se u dugu pre-crRNA čijim procesiranjem nastaju zrele crRNA. U posljednjoj fazi (interferencija) dolazi do prepoznavanja, vezanja i cijepanja strane DNA čime se uklanja infekcija. Formira se kompleks koji veže crRNA i sudjeluje u prepoznavanju ciljne strane DNA koja se, u konačnici, degradira. Preuzeto i prilagođeno iz: CRISPR Systems - Doudna Lab. https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/.

a) Adaptacija

Tijekom adaptacije, strana DNA (protorazmaknica) se prepoznaje, procesira i ugrađuje u lokus CRISPR i tada se naziva razmaknicom. Riječ je svojevrsnoj genetičkoj memoriji prethodnih infekcija što ujedno i čini sustav CRISPR-Cas adaptivnim, ali i nasljednim (Hille i sur. 2018). Razlikuju se dva oblika adaptacije: naivna, koja se odvija kada se stanica prvi put susreće sa stranom DNA, te pripremljena, u kojoj u stanicu ulazi DNA za koju već postoji razmaknica u lokusu CRISPR s određenim stupnjem homologije (Killelea i sur. 2023). Pripremljena adaptacija razvijena je kao bakterijski odgovor na pojavu faga koji su mutacijama uspjeli izbjeći prepoznavanje odgovarajućom crRNA. U naivnoj adaptaciji, od proteina Cas sudjeluju samo proteini Cas1 i Cas2 (Yosef i sur. 2012) dok u pripremljenoj adaptaciji su potrebni drugi proteini, kao što je Cas3 i kompleks Cascade (Datsenko i sur. 2012). Naivna adaptacija predmet je ovog istraživanja pa je detaljnije proučena u sljedećem poglavlju.

b) Ekspresija

U fazi ekspresije lokus CRISPR prepisuje se u dugu precrRNA te zatim procesira u kraće crRNA (Brouns i sur. 2008). U procesiranju sudjeluje endoribonukleaza Cas6 koja prepoznaje i cijepa strukturu ukosnice (Hille i sur. 2018). Ukosnicu formiraju palindromske sekvence u ponavljajućim regijama koje okružuju razmaknice. Na taj način nastaje zrela crRNA, duga 61 nukleotid. Protein Cas6 ostaje vezan za crRNA i sudjeluje kao okosnica u slaganju kompleksa Cascade, ključnoga u fazi interferencije.

c) Interferencija

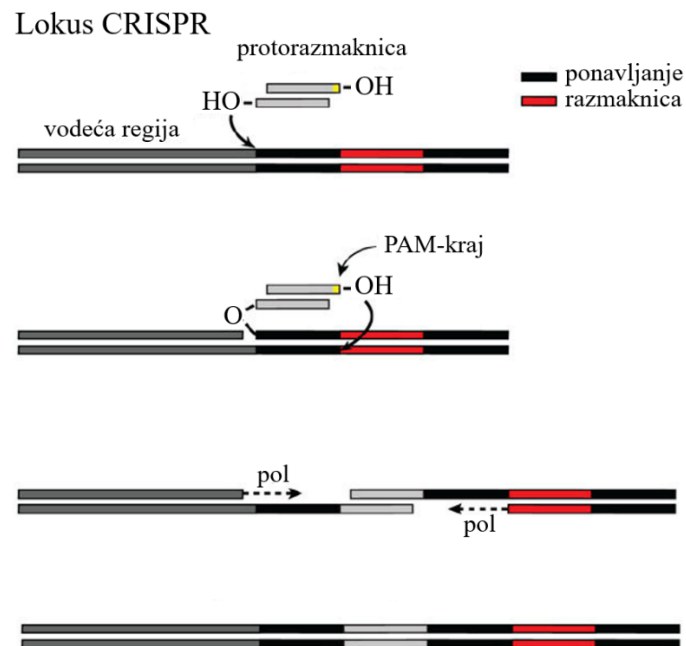
Tijekom interferencije dolazi do prepoznavanja, vezanja i cijepanja strane DNA čime se uklanja infekcija. Formira se kompleks Cascade koji veže crRNA i sudjeluje u prepoznavanju ciljane strane DNA. Kompleks Cascade je heteroundekamer sastavljen od jedne podjedinice proteina Cas5, Cas6 i Cas8e, dviju podjedinica proteina Cas11 te šest podjedinica proteina Cas7 (Jore i sur. 2011). Kako u ovom koraku ne bi došlo do razgradnje vlastite DNA, koja se nalazi u lokusu CRISPR u obliku razmaknice, razvijen je specifičan način distinkcije: pomoću sekvence PAM koja se nalazi u stranoj DNA, ali ne i u lokusu CRISPR (Mitić i sur. 2023). Sekvencu PAM prepoznaje protein Cas8e što ujedno uzrokuje i lokalno odmatanje DNA te vezanje pripadajuće crRNA na temelju komplementarnosti (Hayes i sur. 2016, Hille i sur. 2018). Lanac DNA koji ne sudjeluje u toj interakciji vežu dvije podjedinice proteina Cas11 i na taj način oblikuju i stabiliziraju tzv. R-omču. Formiranje R-omče uzrokuje konformacijske promjene kompleksa Cascade čime nastaje vezno mjesto za protein Cas3 koji svojom nukleaznom i helikaznom aktivnošću degradira stranu DNA u smjeru 3'→5', a moguće je da u tome pomažu i druge domaćinske egzonukleaze.

1.2. Naivna adaptacija

Za naivnu adaptaciju u bakteriji *E. coli*, od proteina Cas, nužni su samo Cas1 i Cas2 (Yosef i sur. 2012). U funkcionalnom obliku proteini Cas1 i Cas2 tvore heteroheksamer u kojem su dva dimera proteina Cas1 povezani dimerom proteina Cas2. Djeluju kao integraza pri čemu Cas1 ima katalitičku, a Cas2 strukturnu ulogu (Nuñez i sur. 2014). Tijekom samog procesa mora doći do stvaranja protorazmaknice fragmentacijom strane DNA (Xue i Sashital

2019). U tom koraku sudjeluju domaćinske egzonukleaze i helikaze o kojima će biti riječ u idućim poglavljima. One stvaraju ssDNA različitih duljina pa, kako bi nastao supstrat za vezanje kompleksom Cas1-Cas2, komplementarni lanci moraju se spojiti u dsDNA. Nedavno je utvrđeno kako sam kompleks Cas1-Cas2 sudjeluje u tom procesu vežući ssDNA te katalizirajući vezanje komplementarne DNA (Kim i sur. 2020). Komplementarna DNA sadrži duge 3' jednolančane krajeve koji se procesiraju aktivnošću domaćinskih 3'→5' egzonukleaza (Kim i sur. 2020). Najbolji supstrat za ugradnju kompleksom Cas1-Cas2 jesu protorazmaknice (33 bp) koje sadrže jednolančane 3' stršeće krajeve duljine pet nukleotida s objiju strana (Wang i sur. 2015). Dvolančani dio protorazmaknice, duljine 23 bp, premošćuje dimer proteina Cas2 što omogućuje lokalizaciju jednolančanih krajeva u aktivno mjesto integracije Cas1. Nadalje, inicijalni supstrat kompleksa Cas1-Cas2 mora na svome kraju sadržavati i sekvencu PAM. S obzirom da tijekom interferencije kompleks Cascade razlikuje stranu DNA od vlastite na temelju sekvence PAM, tijekom odabira također je nužno da protorazmaknica sadrži taj slijed (Xue i Sashital 2019). Kompleks Cas1-Cas2 prepoznaje sekvencu komplementarnu PAM-u u početnom koraku vezanja ssDNA. U bakteriji *E. coli*, protein Cas1 najveći afinitet posjeduje za slijed 5' – CTT – 3' (komplementaran kanonskom slijedu PAM: 5' – AAG – 3') (Amitai i Sorek 2016), ali i neke druge, nekanonske sekvence PAM također mogu biti prepoznate (Xue i Sashital 2019). Jednom kada je kompleks Cas1-Cas2 vezao protorazmaknicu, ona je spremna za ugradnju (slika 1.3). Kompleks prepoznaje sekvencu na granici vodeće regije i prve ponavljajuće sekvence lokusa CRISPR pa se nova razmaknica ugrađuje između tih dviju regija (Chowdhury i sur. 2017, Xue i Sashital 2019). Strana na kojoj se nalazi sekvenca PAM ugrađuje se distalno od vodeće regije što je nužno kako bi nastala cRNA uvijek bila komplementarna odgovarajućem lancu protorazmaknice, Sama sekvenca PAM ne ugrađuje se u lokus CRISPR što je esencijalno za izbjegavanje autoimunosti. Točnije, Cas1 cijepa dva terminalna timina u slijedu 5' – CTT – 3' pri čemu nastaje protorazmaknica duga 33 bp, spremna za inserciju (Wang i sur. 2015). To se zbiva tek prilikom ugradnje jer dimer Cas1 koji veže sekvencu PAM fizički ometa egzonukleazno cijepanje jednolančanog kraja do svoje konačne duljine. Ugradnja se odvija dvjema reakcijama transesterifikacije: Najprije hidroksilna skupina na kraju na kojem se ne nalazi slijed PAM vrši nukleofilni napad na fosfodietersku vezu između vodeće regije i prvog ponavljanja. Strana na kojoj se ne nalazi sekvenca PAM uvijek se ugrađuje prva s obzirom da PAM-kraj u tom trenutku nije procesiran do optimalne duljine. To ujedno i osigurava točnu orijentaciju novougrađene razmaknice (Kim i sur. 2020). Nakon procesiranja na PAM-kraju, 3' hidroksilna skupina citozina negdašnjeg slijeda PAM vrši nukleofilni napad na granici prvog ponavljanja i prve

razmaknice (Nuñez i sur. 2015a). Reakciju ugradnje pomaže i protein IHF (od eng. *integration host factor*) koji savija vodeću regiju čineći bolji supstrat za kompleks Cas1-Cas2 (Nuñez i sur. 2016). Jednolančane praznine koje nastaju popunjava DNA polimeraza I i spaja DNA ligaza (Ivančić-Baće i sur. 2015) što rezultira time da je novougrađena razmaknica okružena ponavljajućim sekvencama.

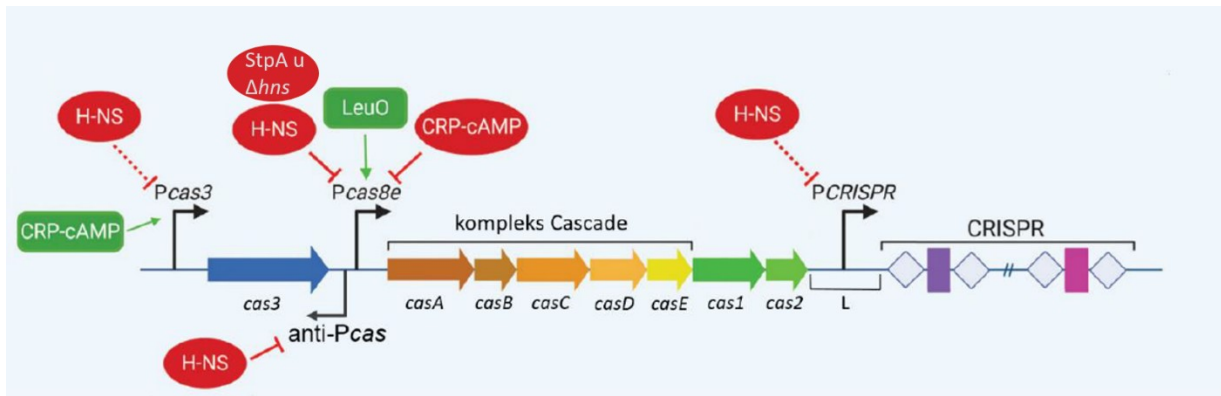


Slika 1.3. Proces ugradnje protorazmaknice u lokus CRISPR. Ugradnja se odvija dvjema reakcijama transesterifikacije. Prvo hidroksilna skupina na kraju na kojem se ne nalazi slijed PAM (svijetlo sivi kraj) vrši nukleofilni napad na fosfodiestersku vezu između vodeće regije i prvog ponavljanja (crno). Zatim, hidroksilna skupina na 3' stršućem kraju protorazmaknice na čijoj strani jest citozin negdašnjeg slijeda PAM (žuti kraj) vrši nukleofilni napad na granici prvog ponavljanja (crno) i prve razmaknice (crveno). Nastale jednolančane praznine popunjava DNA polimeraza I (pol) i spaja DNA ligaza (nije prikazana). Na taj način novonastala razmaknica omeđena je ponavljajućim sljedovima. Preuzeto iz: Xue i Sashital 2019.

S obzirom da se nova razmaknica ugrađuje između vodeće regije i prve razmaknice, lokus CRISPR kronološki je slijed prethodnih infekcija bakterije i njezinih „predaka“, pri čemu razmaknica koja se nalazi najbliže vodećoj regiji vuče podrijetlo od najrecentnije infekcije, i obrnuto (Mitić i sur. 2023). Iako je adaptacija strogo kontroliran proces, ponekad može doći do ugradnje razmaknice iz genomske DNA bakterije što uglavnom rezultira degradacijom DNA i programiranom staničnom smrću (Yosef i sur. 2012). Autoimunost je moguće izbjeći ukoliko je ugrađena razmaknica s nekanonskim slijedom PAM ili u stanici koja je mutant za efektorske gene *cas* (Mitić i sur. 2023).

1.3. Regulacija sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli*

Regulacija sustava CRISPR-Cas vrlo je složena i djeluje na transkripcijskoj (slika 1.4) i posttranslacijskoj razini (Markulin i sur. 2020). U standardnim laboratorijskim uvjetima sustav CRISPR-Cas bakterije *E. coli* nije aktivan, no nije poznato zašto: moguće je da konstitutivna ekspresija gena *cas* šteti bakterijskoj stanici (Pul i sur. 2010). Promotori *Pcas8e* operona i *Pcas3* gena *cas3* pod snažnom su represijom proteina H-NS koji u manjoj mjeri reprimira i promotor *Pcrispr1* lokusa CRISPR-1. Protein H-NS globalni je regulator transkripcije koji sudjeluje u represiji gena uključenih u odgovor na stres (Schröder i Wagner 2002). U odsustvu proteina H-NS, promotor *Pcas8e* negativno je reguliran paralogom represora H-NS - proteinom StpA (Mitić i sur. 2020). Promotor *Pcas8e* reprimiran je i proteinom CRP (od eng. *cAMP receptor protein*), čineći sustav CRISPR-Cas ovisan o glukozi s obzirom da njeno prisustvo inducira proizvodnju cAMP-a (Yang i sur. 2014). S druge strane, prisustvo proteina CRP pozitivno utječe na ekspresiju gena *cas3* s promotora *Pcas3*. Pozitivni regulator promotora *Pcas8e* jest protein LeuO koji s proteinom H-NS kompetira za isto vezno mjesto. No, u standardnim uvjetima ne dolazi do ekspresije operona s obzirom da se protein H-NS konstitutivno eksprimira i negativno utječe na ekspresiju proteina LeuO čija je ekspresija tranzijentna. Pokazano je da se ekspresija proteina LeuO pojačava u stacionarnoj fazi rasta, u odsustvu aminokiselina te prisustvu gvanozin tetrafosfata (Markulin i sur. 2020). Na lancu suprotnom od promotora *Pcas3* nalazi se promotor *PantiCas*, također reprimiran proteinom H-NS. Njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena, no pretpostavka je da sudjeluje u terminaciji transkripcije ili prevenciji translacije mRNA gena *Cas3*.



Slika 1.4. Transkripcijska regulacija sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* K-12. Aktivatori (zeleno) i represori (crveno) ekspresije djeluju na promotore *Pcas3* (kontrola gena *cas3*), *Pcas8e* (kontrola gena kompleksa Cascade, *cas1* i *cas2*), *Pcrispr* (kontrola lokusa CRISPR) i *anti-Pcas*. Pretpostavlja se da promotor *anti-Pcas* sudjeluje u terminaciji transkripcije ili prevenciji translacije mRNA gena *cas3*. Preuzeto iz: Markulin i sur. 2020.

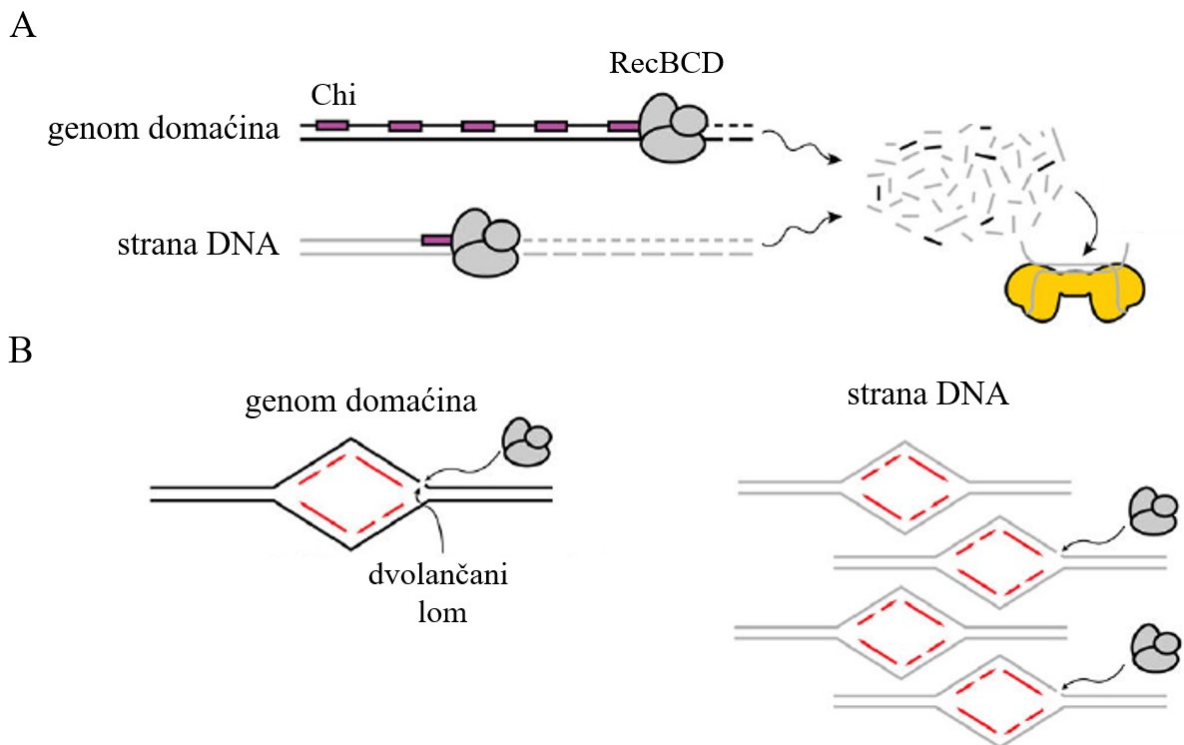
Na posttranslacijskoj razini, u mutantu Δhns uočeno je da je za stabilnost proteina Cas3 pri 37 °C potrebna prisutnost proteina HtpG koji je dijelom porodice molekularnih šaperona Hsp90 (Majsec i sur. 2016, Yosef i sur. 2013). U dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta htpG$ bakterija je osjetljiva na infekciju fagom λ vir. Prekomjernom ekspresijom proteina Cas3 vraća se rezistencija na 30 °C, ali ne i na 37 °C gdje je nadekspresija proteina Cas3 vratila rezistenciju samo u soju *htpG*⁺ Δhns . S obzirom na temperaturnu osjetljivost proteina Cas3, moguće da je temperatura faktor koji određuje aktivnost sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* (Mitić i sur. 2023).

Budući da sustav CRISPR-Cas nije aktivan u standardnim laboratorijskim uvjetima, za proučavanje naivne adaptacije najprije je potrebno aktivirati gene *cas1* i *cas2*. Najčešće se pribjegava ekspresiji gena *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom (Mitić i sur. 2020). Dosad, to se postizalo transformacijom bakterija plazmidom koji nosi gene *cas1* i *cas2*. Stvaranjem soja s navedenim genima pod inducibilnim promotorom na kromosomu, bio bi riješen problem inkompatibilnosti plazmida i rezistencije na antibiotike, a uvelike bi se olakšao i rad s drugim, dodatnim plazmidima.

1.4. Procesiranje strane DNA u stvaranju supstrata za kompleks Cas1-Cas2

Kako bi tijekom naivne adaptacije kompleks Cas1-Cas2 mogao vezati ssDNA i komplementarnu spojiti u dsDNA, potrebna je fragmentacija strane DNA aktivnošću domaćinskih egzonukleaza i helikaza (Xue i Sashital 2019). Osnovni enzim koji sudjeluje u tome jest RecBCD kodiran genima *recB*, *recC* i *recD*. Kompleks RecBCD primarno sudjeluje u popravku DSB pomoću HR (Dixon i Kowalczykowski 1993, Dillingham i Kowalczykowski 2008). Prepoznaje tupe krajeve dsDNA te helikaznom aktivnošću podjedinica RecB i RecD i egzonukleaznom aktivnošću podjedinice RecB degradira dsDNA. Taj proces traje sve dok enzim ne naiđe na 3' kraj asimetrične sekvence Chi (5' – GCTGGTGG – 3') koju prepoznaje podjedinica RecC. Vezanje slijeda Chi dovodi do konformacijskih promjena, pri čemu se smanjuje 3'→5', a pojačava 5'→3' egzonukleazna aktivnost enzima. To rezultira stvaranjem jednolančanih 3' krajeva na koje podjedinica RecB nanosi protein RecA. Jednolančani 3' kraj s vezanim proteinom RecA invazivan je za rekombinaciju s drugom dsDNA. Kako bi enzim RecBCD stvorio fragmente ssDNA koji su komplementarni i na taj način prikladni supstrati za kompleks Cas1-Cas2, mora djelovati na dvolančani lom genomske DNA domaćina koji definira segment DNA bez slijeda Chi ili pak na stranu DNA koja ne sadrži slijed Chi (Mitić i sur. 2023). Sekvenca Chi u genomu bakterije *E. coli* pojavljuje se 1009 puta što je sedam puta češće od onoga što je predviđeno nasumičnošću (Smith 2001). Time bakterija osigurava genomski integritet (Dillingham i Kowalczykowski 2008), no pretpostavlja se da je to i mehanizam kojim se omogućava da se strana, a ne domaćinska DNA, preferentno prepoznaje kao supstrat kompleksa Cas1-Cas2 (slika 1.5A) (Mitić i sur. 2023). Povrh toga, dvolančani lomovi koje prepoznaje holoenzim RecBCD češće se pojavljuju na mjestu zaustavljanja replikacijskih rašlji (George i sur. 2001). Iako razmaknice ugrađene iz kromosomske DNA čine mali udio u ukupnom bazenu razmaknica, analizom njihova podrijetla utvrđeno je da je najčešće riječ o DNA iz područja izvorišta (*ori*) i terminacije (*ter*) replikacije (Levy i sur. 2015). Mjesto *ori* prvo se replicira pa je u kulturi uvijek najzastupljenija ta DNA. S druge strane, iako se mjesta *ter* zadnja repliciraju, na njima neizbježno dolazi do zaustavljanja replikacijskih rašlji s obzirom da brže rašlje, zaustavljene proteinom Tus, čekaju sporije kako bi se replikacija kompletirala. Imajući to na umu, replikacija plazmidne i virusne DNA češća je od replikacije genomske DNA a time i fragmentacija DNA, čime se povećava vjerojatnost

za nastajanjem potencijalnih supstrata za ugradnju razmaknice (Xue i Sashital 2019) (slika 1.5B).



Slika 1.5. Kompleks Cas1-Cas preferentno uzima stranu, a ne domaćinsku DNA kao supstrat za ugradnju razmaknice. (A) Nakon prepoznavanja slijeda Chi, enzim RecBCD prestaje stvarati jednolančane supstrate za kompleks Cas1-Cas2. Sekvenca Chi puno je češća u bakterijskom genomu nego u stranoj DNA pa se u zalihi jednolančanih fragmenata pogodnih za ugradnju većinski nalazi strana DNA. (B) Dvolančani lomovi koje prepoznaje enzim RecBCD češće se pojavljuju na mjestu zaustavljanja replikacijskih rašlji tijekom replikacije DNA. Replikacija plazmidne i virusne DNA češća je od replikacije genomske DNA, a time i stvaranje jednolančanih fragmenata koji će se potencijalno ugraditi tijekom adaptacije. Preuzeto i prilagođeno iz: Xue i Sashital 2019.

Budući da su mutanti *recD* pokazivali smanjenu efikasnost naivne adaptacije, pretpostavljalo se da je nukleazna aktivnost enzima ključna u stvaranju jednolančanih supstrata za kompleks Cas1-Cas2 (Levy i sur. 2015). No, kada su isti eksperimenti provedeni na mutantima *recA recD*, uspješnost adaptacije vratila se na početne razine (Radovčić i sur. 2018). Enzim RecBC nanosi protein RecA neovisno o slijedu Chi (Churchill i sur. 1999). Stoga, u mutantu *recD* ugradnja razmaknice nije bila inhibirana odsutnošću nukleazne aktivnosti, već nespecifičnim vezanjem proteina RecA na jednolančane krajeve DNA (Radovčić i sur. 2018). Time je pokazano kako je helikazna aktivnost enzima RecBCD bitnija u stvaranju supstrata za sustav CRISPR-Cas. U bakterijskoj stanici postoji velik broj

egzonukleaza koje mogu pocijepati lance DNA koje helikaza RecBC razdvoji, no mogućnost alternativnog procesiranja DNA nije najbolje istražena. Nadalje, jednom kada kompleks Cas1-Cas2 veže komplementarne ssDNA, 3' stršeći krajevi znatno su dulji od 5 bp koje su optimalne za ugradnju (Ramachandran i sur. 2020). Stoga, i tu su potrebne domaćinske 3'→5' egzonukleaze. Veliku porodicu 3'→5' egzonukleaza sačinjavaju egzonukleaze DnaQ koje su konzervirane od bakterije *E. coli* do čovjeka (Wang i sur. 2013). Porodica se sastoji od više od 1000 poznatih članova koji sudjeluju u procesiranju ssDNA tijekom replikacije, razgradnje, popravka i rekombinacije, ali i RNA tijekom sazrijevanja, interferencije i obrta (Hsiao i sur. 2014). Egzonukleaze te porodice sadrže domenu DEDDh koja može biti povezana s DNA polimerazom tijekom replikacije DNA što je, primjerice, slučaj u egzonukleaze DnaQ (u ovom slučaju ime proteina, a ne porodice) holoenzima DNA polimeraze III bakterije *E. coli*. Ramachandran i suradnici (2020) pokazali su u uvjetima *in vitro* kako egzonukleaze iz spomenute porodice, DnaQ i ExoT (poznata i kao RNaza T), mogu posredovati ugradnji razmaknice u bakteriji *E. coli*, u pravilnoj orijentaciji, procesiranjem 3' jednolančanih krajeva protorazmaknice. Stoga, u ovom istraživanju ispitao sam ulogu gena *exoT* i *dnaQ* te njihovih proteinskih produkata u uvjetima *in vivo*.

Kao što je već spomenuto, novija istraživanja pokazala su kako je helikazna, a ne nukleazna aktivnost enzima RecBCD nužna u naivnoj adaptaciji (Radovčić i sur. 2018). Potrebno je istražiti sudjeluju li druge helikaze u tome procesu, a jedna od mogućih jest helikaza UvrD. Poznata je još i kao DNA helikaza II, a odmata DNA u 3'→5' smjeru u prisustvu ATP-a (Sharma i Rao 2012). Posjeduje brojne uloge u bakterijskoj stanici od kojih se najviše ističu one u popravku DNA mehanizmima NER i MMR. Iz tog razloga, mutante $\Delta uvrD$ karakterizira mutatorski fenotip, povećana stopa rekombinacije i osjetljivost na UV (Washburn i Kushner 1991). U ovom radu prvi put su istraženi u kontekstu naivne adaptacije sustava CRISPR-Cas.

2. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Konstruirati soj bakterije *Escherichia coli* s kromosomski inducibilnim genima *cas1* i *cas2*.
2. Konstruirani soj potvrditi na genotipskoj i fenotipskoj razini te istražiti eksperimentalne uvjete za naivnu adaptaciju.
3. Konstruirati i potvrditi mutante u genima *dnaQ* i *exoT* te istražiti naivnu adaptaciju u mutantima $\Delta dnaQ$, $\Delta exoT$ i mutantu $\Delta uvrD$.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Bakterijski sojevi

U tablici 3.1 navedeni su sojevi bakterije *E. coli* K-12 koje sam koristio u ovom istraživanju.

Tablica 3.1. Oznaka, relevantni genotip te izvor ili metoda dobivanja sojeva bakterije *Escherichia coli* K-12 korištenih u ovom istraživanju.

Oznaka soja	Relevantni genotip	Izvor
MG1655 (<i>wt</i>)	+ F ⁻ , <i>rec</i> ⁺	Bachmann 1996
IIB253	+ <i>recD1903::mini-Tn10</i>	I. Ivančić Baće
IIB312	+ <i>recA::cam</i>	I. Ivančić Baće
IIB1041	+ Δ <i>uvrD288::Tn5</i>	I. Ivančić Baće
BW25113	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787(::rrnB-3)</i> , λ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	B. L. Wanner (Keio kolekcija sojeva bakterije <i>E. coli</i>)
Oznaka soja dobivenog od BW25113	Razlika u genotipu u odnosu na soj BW25113	Izvor ili metoda dobivanja soja
IIB888	+ Δ <i>cas3::apra</i> Δ <i>casC760::kan</i>	I. Ivančić Baće
IIB1165	+ Δ <i>cas3::apra</i> Δ (<i>casC-cas1</i>):: <i>FRT</i>	I. Ivančić Baće
IIB1438	+ <i>pBad cas1-cas2::spec</i>	Ovaj rad (<i>recombineering</i>)
IIB1439	+ Δ <i>cas3::apra</i> Δ (<i>casC-cas1</i>):: <i>FRT pBad cas1-cas2::spec</i>	Ovaj rad (<i>recombineering</i>)
IIB1440	+ Δ <i>cas3::apra</i> Δ (<i>casC-cas1</i>):: <i>FRT</i> Δ <i>dnaQ744::kan</i>	Ovaj rad (<i>recombineering</i>)
IIB1441	+ Δ <i>rnt-730::kan</i>	Ovaj rad (<i>recombineering</i>)
IIB1444	+ Δ <i>cas3::apra</i> Δ (<i>casC-cas1</i>):: <i>FRT</i> Δ <i>dnaQ744::kan</i> Δ <i>recD1903::mini-Tn10</i>	Ovaj rad (P1. IIB253 × IIB1440)

Tablica 3.1 - nastavak

IIB1447	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta dnaQ744::Kan \Delta recD1903::mini-Tn10$ $\Delta recA::cam$	Ovaj rad (P1. IIB312 × IIB1440)
IIB1451	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta uvrD282::Tn5$	Ovaj rad (P1. IIB1041 × IIB1165)

3.1.2. Plazmidi

U tablici 3.2 navedeni su plazmidi koje sam koristio u ovom istraživanju.

Tablica 3.2. Oznaka, opis te izvor plazmida korištenih u ovom istraživanju.

Oznaka plazmida	Opis	Izvor
pBad-HisA	Negativna kontrola za pEB628; Amp ^r ; izvorište replikacije pBR322	InVitrogen
pKD46	Geni <i>red</i> (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>) faga lambda pod promotorom <i>araBAD</i> ; temperaturno osjetljivo izvorište replikacije <i>oriR101</i> ; Amp ^r	Datsensko i Wanner 2000
pEB628	Geni <i>cas1</i> i <i>cas2</i> uklonirani u plazmid pBad-HisA pod promotor <i>araBAD</i> ; Amp ^r	E. L. Bolt
pMR27	pEB628 + kazeta FRT-Str-FRT nizvodno od gena <i>cas1</i> i <i>cas2</i> ; Amp ^r	M. Radovčić
pRSF-1b	Prazan vektor za kloniranje proteina s 6 x His; izvorište replikacije RSF 1030; Kan ^r	Novagen
pUC19	Prazan vektor za kloniranje; veliki broj kopija; izvorište replikacije pMB1; Amp ^r	New England Biolabs

3.1.3. Početnice

U tablici 3.3 navedene su početnice koje sam koristio u ovom istraživanju.

Tablica 3.3. Oznaka, sekvence te opis početnica korištenih u ovom istraživanju. Plavom bojom označeni su 5' stršeci krajevi homologni genomu *E. coli* K-12 za homolognu rekombinaciju metodom *recombineering*.

Oznaka početnice	Sekvenca (5' → 3')	Opis
araBad_cas1-2_IIB1165-F	5'-GCCAGCAACTTCTGGAAGATTTTG TATTGACCACAAACAAAAATGCGTA AAAGAAACCAATTGTCCATATTG-3'	Priprema soja IIB1439 metodom <i>recombineering</i>
araBad_cas1-2_BW-25113-F	5'-TGGGATGTGGCTTGCTATCTTTGG CTCCACTGTGATTGAGGTGTAATAAA AAGAAACCAATTGTCCATATTG-3'	Priprema soja IIB1438 metodom <i>recombineering</i>
araBad_cas1-2_recomb-R	5'-ACCTTAATGTAACATTCCTTATT ATTAAGATCAGCTAATTCCTTTGTT AAAAGGCCATCCGTCAGG-3'	Priprema sojeva IIB1438 i IIB1439 metodom <i>recombineering</i>
DELdnaQ-F	5'-ACGACAAGTCTGACATAAATGAC CGCTATGATTCCGGGGATCCGTCGAC C-3'	Priprema i provjera genotipa soja IIB1440 metodom <i>recombineering</i>
DELdnaQ-R	5'-CACAGGTATTTATGCTCGCCAGA GGCAACTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC G-3'	Priprema soja IIB1440 metodom <i>recombineering</i>
DELexoT-F	5'-GCAATTTATCCGTATTAAGAGAAT CAGATGATTCCGGGGATCCGTCGAC C-3'	Priprema i provjera genotipa soja IIB1441 metodom <i>recombineering</i>
DELexoT-R	5'-TCGACTCGATTACACCTCTTCGGC GGCAGATGTAGGCTGGAGCTGCTTC G-3'	Priprema soja IIB1441 metodom <i>recombineering</i>
kt-R	5'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'	Provjera genotipa sojeva IIB1440 i IIB1441
CRISPR-Sp4	5'-GCGACCGCTCAGAAATCCAGAC CCGATCCAAA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice, provjera genotipa soja IIB1438 i IIB1439

Tablica 3.3 – nastavak

CRISPR-R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice, provjera genotipa soja IIB1438
CRISPR-NGS-F	5'-TGCTTTAAGAACAAATGTATACTT T-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice
CRISPR-NGS-R	5'-CAACATTATCAATTACAACCGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice
ygcj3-F	5'-GGATGTTGACCTGGTGG-3'	Provjera genotipa soja IIB1438 i IIB1439
casE-F	5'-GCCTCGACAATTTGCTTC-3'	Provjera genotipa soja IIB1438

3.1.4. Hranjive podloge i puferi

1. Hranjivi medij LB

Sastav: 10,0 g/L tripton (BD); 10,0 g/L NaCl; 5,0 g/L kvašćev ekstrakt (BD) u destiliranoj vodi; podesiti pH na 7,0. Otopina se autoklavira (20 min, 120 °C, 1 bar).

Dodatci u medij LB po potrebi: 15,0 g/L ili 6,0 g/L agaroz (BD) (za čvrsti ili meki medij - dodaje se prije autoklavanja); 0,02% (v/v) L-arabinoza; 100 µg/mL ampicilin; 15 µg/mL kloramfenikol; 50 µg/mL streptomycin; 40 µg/mL kanamicin; 10 µg/mL tetraciklin.

2. Pufer MC

Sastav: 5 mM CaCl₂; 100 mM MgSO₄; u sterilnoj destiliranoj vodi.

3. Pufer M/15

Sastav: 5,94 g/L Na₂HPO₄; 4,54 g/L KH₂PO₄; u sterilnoj destiliranoj vodi; podesiti pH na 7,0. Otopina se autoklavira (20 min, 120 °C, 1 bar).

4. 50 × Pufer TAE za elektroforezu u agaroznom gelu

Sastav: 242 g/L tris-baza; 5,71% (w/v) octena kiselina; 50 mmol/L, pH = 8,0 EDTA; u destiliranoj vodi.

5. Pufer za lizu

Sastav: 25 mM, pH = 8,0 Tris-HCl; 300 mM NaCl; 1 mM fenilmetilsulfonyl fluorid; u destiliranoj vodi.

6. Pufer za denaturaciju

Sastav: 25 mM, pH = 6,8 Tris-HCl; 6% (w/v) SDS; 5% (v/v) β -merkaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,1% (w/v) bromfenol plavo; u destiliranoj vodi.

7. 10 × Elektrodni pufer za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu

Sastav: 0,25 M tris; 1,92 M glicin; 10% (w/v) SDS; u destiliranoj vodi; podesiti na pH = 8,3.

8. Otopina za bojanje poliakrilamidnih gelova

Sastav: 0,1% (w/v) *Coomasie Brilliant Blue R-250*, 45% (v/v) etanol; 10% (v/v) ledena octena kiselina; u destiliranoj vodi.

9. Otopina za odbojavanje poliakrilamidnih gelova

Sastav: 10% (v/v) octena kiselina; 20% (v/v) metanol.

10. Bradfordova matična otopina

Sastav: *Coomasie Brilliant Blue G-250* – 350 mg; 96% (v/v) etanol – 30 mL; 88% H₃PO₄ – 200 mL

11. Bradfordova radna otopina

Sastav: Bradfordova matična otopina – 30 mL; 96% (v/v) etanol – 15 mL; 88% H₃PO₄ – 30 mL; destilirana voda – 425 mL

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj bakterija

Svježe prekonoćne kulture pripremao sam ili inokuliranjem pojedinačne bakterijske kolonije sterilnim nastavkom pipete ili razrjeđivanjem starije prekonoćne kulture, u 3 mL

tekućeg medija LB, uz dodatak antibiotika za bakterije transformirane plazmidom. Bakterije su rasle prekončno u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) na 37 °C (300 rpm). Tijekom analize uspješnosti naivne adaptacije ugradnjom razmaknice, bakterije sam uzgajao uz dodatak L-arabinoze - kako bih potaknuo ekspresiju gena *cas1* i *cas2* s promotora *araBAD*. Učinkovitost naivne adaptacije promatrao sam tijekom tri dana pa je prekončna kultura inokulirana s krute podloge označavala prvu pasažu. Razrjeđivanjem prve pasaže (300 puta), pripremio sam drugu, uz iste dodatke i uvjete uzgoja kao u prvoj pasaži. Iz druge pasaže pripremio sam treću na isti način.

Na čvrstoj LB-podlozi (25 mL) bakterije su rasle do pojedinačnih kolonija 24-48 h u inkubatoru na 37 °C, uz dodatak antibiotika, po potrebi.

3.2.2. Mjerenje optičke gustoće bakterije

Optičku gustoću bakterija mjerio sam u svrhu postizanja optimalne faze rasta bakterija za korak transformacije plazmidom te tijekom pripreme lizata faga P1. Mjerenje sam provodio pri valnoj duljini $\lambda = 600$ nm na denzitometru *Ultrospec 10 Cell Density Meter* (GE Healthcare). Kao slijepu probu koristio sam tekući medij LB.

3.2.3. Transformacija bakterijskih stanica plazmidnom DNA

Bakterijske stanice sojeva BW25113 i IIB1165 učinio sam kemijski kompetentnima te ih transformirao plazmidom pKD46 tijekom pripreme insercijskih i delecijjskih sojeva metodom *recombineering*. Također, transformirao sam konstruirane bakterijske sojeve plazmidima pEB628, pRSF1, pUC19 ili pBad kako bih provjerio uspješnost naivne adaptacije.

Stanice (1,5 mL) u eksponencijalnoj fazi rasta ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$) istaložio sam centrifugirajući 2,5 min na 10 000 ref pri sobnoj temperaturi, u uređaju 5415D (Eppendorf). Uklonio sam supernatant, i resuspendirao stanice u 200 μ L kalcijeva klorida (50 mM) ohlađenog u ledu. Kalcijevi ioni neutraliziraju negativno nabijenu bakterijsku staničnu membranu čime se olakšava ulazak plazmidne DNA u stanicu. Potom, ponovio sam korak centrifugiranja i resuspendiranja, ovaj put u 50 μ L kalcijeva klorida. Nakon 15-minutne

inkubacije na ledu, stanicama sam dodao 1 μL plazmida ($\gamma = 50 - 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$) te lagano promiješao. Uslijedila je još jedna inkubacija na ledu, 20 min. Potom, stanice sam podvrgnuo toplinskom šoku ($42 \text{ }^\circ\text{C}$, 90 s) te vratio na led (90 s). Stanicama sam zatim dodao 500 μL tekućeg medija LB te ih inkubirao u tresilici *Novotron AK82* (Infors HT) na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (pKD46) ili *G25* (New Brunswick Scientific Co. Inc.) na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (ostali plazmidi) (30 min, 300 rpm). Plazmid pKD46 suicidalni je vektor koji posjeduje temperaturno osjetljivo izvorište replikacije pa se ne može umnažati na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Zatim, nasadio sam 100 μL stanica na ploče s ampicilinom, kako bih selektirao transformante, te ih inkubirao prekonoćno na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ili $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija linearnom DNA

Postupak sam proveo na bakterijskim stanicama sojeva BW25113 i IIB1165 transformiranima plazmidom pKD46 tijekom pripreme insercijskih i delecijjskih sojeva metodom *recombineering*.

Stanice je najprije potrebno učiniti elektrokompetentnima:

U 20 mL tekućeg medija LB dodao sam 50 μL prekonoćne bakterijske kulture, L-arabinozu konačne koncentracije 0,2% (v/v), kako bi došlo do ekspresije gena *red* faga lambda, te ampicilin ($\gamma = 100 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) i inkubirao ih do optičke gustoće $\text{OD}_{600} = 0,6$ u tresilici *Novotron AK82* (Infors HT) na $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Sljedeće korake izvodio sam na ledu. Sva centrifugiranja provodio sam na 8000 rpm, 5 min, na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, u uređaju *Sigma 3K30* (Sigma Laborzentrifugen GmbH). Stanice sam premjestio u epruvete *falcon* (15 mL) i istaložio centrifugiranjem. Odlio sam supernatant i talog resuspendirao u 1 mL hladnog sterilnog 10%-tnog glicerola te sadržaj premjestio u nove mikroeprevete (2 mL). Korake centrifugiranja i resuspendiranja proveo sam još dvaput uz napomenu da sam nakon drugog centrifugiranja stanice resuspendirao u 100 μL sterilne destilirane vode. Stanice sam podijelio u dva alikvota po 50 μL .

Zatim, uslijedila je elektroporacija:

U stanice (50 μL) dodao sam 100 ng pročišćene linearne DNA te čitav sadržaj jednom resuspendirao i prebacio u kivetu za elektroporaciju koja se nalazi na ledu. Kivetu sam posušio ubrusom, kako voda ne bi stupila u kontakt s električnom strujom, te smjestio u

elektroporator *MicroPulser* (Bio-Rad). Primijenio sam električni puls uz parametre: 1800 V (*E. coli*) i trajanje pulsa 4 – 5 ms. Stanicama sam odmah dodao 400 μ L medija *SOC Outgrowth Medium* (New England Biolabs) i L-arabinozu konačne koncentracije 0,2% (v/v) te sadržaj resuspendirao. Čitav sadržaj prebacio sam u mikroeprevetu te inkubirao preko noći na 34 °C uz trešnju (300 rpm) u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf). Sutradan sam nasadio po 200 μ L stanica na dvije krute LB-podloge sa streptomycinom te ih inkubirao preko noći na 37 °C.

3.2.5. Konstrukcija bakterijskih sojeva transdukcijom fagom P1.-vir

3.2.5.1. Priprema lizata P1 donorskog soja

Uzgojio sam stanice donorskog soja do rane eksponencijalne faze rasta ($OD_{600} \approx 0,4$) u 10 mL tekućeg medija LB. Stanicama sam dodao 50 μ L faga P1.-vir i 50 μ L kalcijeva klorida (1 M), nužnog za adsorpciju faga na bakterijske stanice. Suspenziju bakterija i faga, inkubirao sam u tresilici *G25* (New Brunswick Scientific Co. Inc.) (300 rpm) na 37 °C sve dok nije došlo do primjetne lize bakterijskih stanica. Zatim, lizatu sam dodao 500 μ L kloroforma uz desetominutnu inkubaciju na sobnoj temperaturi i povremeno miješanje, kako bih dodatno pospješio lizu bakterijskih stanica. Nakon toga, stanične ostatke istaložio sam centrifugiranjem (12 000 rpm, 13 min, 4 °C) u uređaju *Sigma 3K30* (Sigma Laborzentrifugen GmbH), a supernatant, u kojem se nalazi lizat, dekantirao sam u novu sterilnu eprevetu i pohranio u hladnjak na 4 °C.

3.2.5.2. Transdukcija fagom P1.-vir

Istaložio sam stanice svježe prekonocne kulture soja recipijenta (1,5 mL) centrifugiranjem (2,5 min, 10 000 rcf) na sobnoj temperaturi u uređaju 5415D (Eppendorf). Uklonio sam supernatant te stanice resuspendirao u 200 μ L pufera MC. Potom, stanicama sam dodao 100 μ L lizata P1 donorskog soja. Smjesu sam inkubirao 30 min na 37 °C kako bi došlo do infekcije (adsorpcije faga). Infekciju sam prekinuo s 200 μ L natrijeva citrata (1 M) kako novi fagi, oslobođeni lizom, ne bi inficirali transducirane bakterijske stanice. Čitav volumen

smjese prebacio sam u 3 mL otopljenog i ohlađenog mekog medija LB te, nakon laganog miješanja, izlio na krute hranjive podloge s odgovarajućim antibiotikom. Nakon što se sloj mekog medija LB stvrdnuo, ploče sam smjestio u inkubator na 37 °C, 1 – 2 dana. Narasle transduktante presadio sam sterilnom ezom na istu selektivnu podlogu kako bih potvrdio rezistenciju na antibiotik te pročistio bakterije od faga.

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*)

Koristio sam dvije DNA polimeraze, ovisno o potrebama eksperimenta: U slučajevima kada je bila nužna visoka točnost, koristio sam DNA polimerazu visoke vjernosti umnažanja *Q5* (New England Biolabs): u koraku umnažanja linearne DNA metodom *recombineering* za pripremu insercijskih i delecijских sojeva, te za njihovu genotipsku provjeru Sangerovim sekvenciranjem. U ostalim slučajevima, upotrebljavao sam DNA polimerazu *Phire Green* (Thermo Fisher Scientific). To uključuje genotipsku provjeru konstruiranih sojeva metodom *colony* PCR i analizu naivne adaptacije. Reakcije sam provodio u uređaju *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad).

3.2.6.1. PCR s DNA polimerazom *Q5*

Kao kalup za umnažanje linearne DNA koristio sam genomsku DNA iz soja IIB888, tijekom stvaranja delecijских mutanata, te plazmid pMR27, za pripremu insercijskih mutanata. Koristio sam različite parove početnica: DELdnaQ-F/-R (za soj $\Delta dnaQ$ (IIB1440)), DELexoT-F/-R (za soj $\Delta exoT$ (IIB1441)), araBad_cas1-2_IIB1165-F/ araBad_cas1-2_recomb-R (za insercijski soj IIB1439), araBad_cas1-2_BW-25113-F/ araBad_cas1-2_recomb-R (za insercijski soj IIB1438).

Kalupe za umnažanje regije insercije sojeva IIB1438 i IIB1439 za analizu Sangerovim sekvenciranjem pripremio sam lizirajući stanice prekonoćnih kultura istraživanih sojeva visokom temperaturom: Dodao sam 10 μ L prekonoćne kulture u 50 μ L destilirane vode uz petominutnu inkubaciju na 98 °C u termocikleru. Koristio sam sljedeće parove početnica: ygcJ3-F/CRISPR-Sp4, za soj IIB1439, i casE-F/CRISPR-Sp4, za soj IIB1438.

Reakcijsku smjesu pripremio sam prema tablici 3.4.

Tablica 3.4. Sastav smjese za reakciju PCR s DNA polimerazom *Q5* (New England Biolabs).

Komponenta	<i>V</i> (μL)
2 × <i>Q5 High-Fidelity 2X Master Mix</i>	25
F-početnica (<i>c</i> = 10 μM)	2,5
R-početnica (<i>c</i> = 10 μM)	2,5
kalup	2
destilirana voda	do 50

Reakciju sam proveo slijedeći uvjete iz tablice 3.5.

Tablica 3.5. Uvjeti za reakciju PCR s DNA polimerazom *Q5* (New England Biolabs).

Korak	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (s)
inicijalna denaturacija	98	30
30 ciklusa	98	10
	*	30
	72	**
finalna ekstenzija	72	120

*Temperatura prijanjanja za umnažanje linearne DNA tijekom pripreme insercijskih sojeva iznosi 57 °C, tijekom pripreme delecijjskih 60 °C i za potrebe Sangerova sekvenciranja 54 °C.

**Vrijeme ekstenzije za umnažanje linearne DNA tijekom pripreme insercijskih sojeva te za potrebe Sangerova sekvenciranja iznosilo je 90 s, a za pripremu delecijjskih sojeva 40 s.

3.2.6.2. PCR s DNA polimerazom *Phire Green*

S ciljem provjere genotipa: izgradnje gena od interesa te ugradnje kanamicinske kazete, za *knock-out* sojeve $\Delta dnaQ$ (IIB1440) i $\Delta exoT$ (IIB1441), te ugradnje gena od interesa pod inducibilnim promotorom i streptomocinske kazete na ciljano mjesto, za *knock-in* sojeve (IIB1438 i IIB1439), proveo sam *colony* PCR. Provjeravao sam kolonije narasle na selektivnim pločama nakon transformacije elektroporacijom. Kao kalup poslužila su 2 μL

bakterijskih stanica iz pojedinačnih kolonija koje sam resuspendirao sterilnom čačkalicom u kapljici destilirane vode (oko 20 μL).

Za analizu uspješnosti naivne adaptacije, koristio sam lizirane stanice prekonocnih kultura istraživanih sojeva, uzgajanih tijekom triju pasaža. Kalupe sam pripremio kako je opisano u poglavlju 3.2.6.1. Koristio sam dva različita para početnica: CRISPR-NGS-F/-R, za insercijske sojeve, te CRISPR-Sp4/CRISPR-R, za ostale sojeve.

Pripremio sam reakcijsku smjesu prema tablici 3.6.

Tablica 3.6. Sastav smjese za reakciju PCR s DNA polimerazom *Phire Green* (Thermo Fisher Scientific).

Komponenta	V (μL)
2 \times <i>Phire Green Hot Start II PCR Master Mix</i>	10
početnica-F ($c = 10 \mu\text{M}$)	1
početnica-R ($c = 10 \mu\text{M}$)	1
kalup	2
destilirana voda	do 20

Reakcije sam proveo uz uvjete priložene u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Uvjeti za reakciju PCR s DNA polimerazom *Phire Green* (Thermo Fisher Scientific).

Korak	T ($^{\circ}\text{C}$)	t (s)
inicijalna denaturacija	98	30
30 ciklusa	98	5
	54	5
	72	*
finalna ekstenzija	72	60

*Za provjeru genotipa insercijskih sojeva metodom *colony* PCR vrijeme ekstenzije iznosilo je 70 s, za insercijske, te 20 s, za delecijске sojeve. Za analizu efikasnosti naivne adaptacije vrijeme ekstenzije iznosilo je 7 s, za insercijske, te 10 s, za delecijске sojeve.

3.2.7. Cijepanje restrikcijskim enzimima

Cijepanje restrikcijskim enzimom *DpnI* proveo sam tijekom stvaranja insercijskih mutanata prije koraka elektroporacije, s ciljem izbjegavanja lažnih pozitiva. Koristio sam enzim proizvođača Thermo Fisher Scientific, a restrikcijsku reakciju pripremio sam prema podacima iz tablice 3.8.

Tablica 3.8. Reakcijska smjesa za cijepanje zaostalog plazmidnog kalupa nakon provedene reakcije PCR enzimom *DpnI* (Thermo Fisher Scientific).

Komponenta	<i>V</i> (μL)
10 × pufer <i>FastDigest</i>	4
pročišćena PCR smjesa	30
<i>DpnI</i>	1
destilirana voda	do 40

Reakcijsku smjesu inkubirao sam na 37 °C, 15 min.

3.2.8. Elektroforeza u agaroznom gelu

Produkte reakcije PCR analizirao sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu u 1× puferu TAE, uz dodatak 1/10 000 volumena interkalirajuće boje 10 000 × *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Izuzetak su bili produkti reakcije PCR za analizu uspješnosti naivne adaptacije koje sam analizirao u 2%-tnom agaroznom gelu.

Produkte reakcije PCR s DNA polimerazom *Q5* bilo je potrebno obojiti pa sam im prije nanošenja na gel dodao šestinu konačnog volumena 6 × *Purple Loading Dye*. Produkte DNA polimeraze *Phire Green 2× Mastermix* direktno sam nanosio na gel. U jažice sam nanosio 3 μL (produkti polimeraze *Q5*) ili 5 μL (produkti polimeraze *Phire Green*) uzorka. Na svaki gel nanosio sam i 2 μL DNA markera *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) ili *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezu sam provodio u sustavu *OneRun Electrophoresis Cell* (EmbiTec) pri naponu 100 V, 15 min, za elektroforezu u 1%-tnom agaroznom gelu, ili pri 50 V, 35 min (PCR s početnicama CRISPR-NGS-F/-R) ili 45 min (PCR s početnicama CRISPR-R/CRISPR-Sp4), za 2%-tni agarozni gel. Gelove sam

vizualizirao u transiluminatoru *Uvitec* i snimio kamerom *EDAS 290* (Kodak). Fotografije sam uredio u programu *IrfanView*.

3.2.9. Pročišćavanje DNA

Bilo je potrebno pročistiti produkte reakcije PCR za korak elektroporacije linearne DNA u bakterijske stanice tijekom provedbe metode *recombineering* te za korak provjere genotipa konstruiranih sojeva Sangerovim sekvenciranjem. Koristio sam komercijalni komplet *GeneJET PCR Purification* (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača:

Smjesama reakcije PCR dodao sam jednak volumen otopine *Binding Buffer*. Zatim, čitav volumen otopine prebacio sam u kolonicu smještenu u epruvetu za skupljanje eluata i centrifugirao. Sva centrifugiranja provodio sam 60 s na 16 000 rcf u uređaju 5415D (Eppendorf). Eluat sam odbacio, a kolonicu isprao sa 700 μ L otopine *Wash Buffer* te ponovno centrifugirao i odbacio supernatant. Potom, proveo sam suho centrifugiranje. Kolonicu sam premjestio u mikroepuvetu (1,5 mL) i eluirao u 30 μ L otopine *Elution Buffer*.

3.2.10. Mjerenje koncentracije DNA

Koncentraciju DNA odredio sam nakon pročišćavanja DNA, spektrofotometrijski ($\lambda = 260$ nm), na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare). Kao slijepu probu koristio sam 2 μ L tekućine kojom je DNA eluirana (*Elution Buffer*), a za mjerenje 2 μ L uzorka.

3.2.11. Test razmaza (od eng. *streak test*)

Svim pripremljenim sojevima provjeravao sam fenotip, određujući rezistenciju na antibiotike i UV, testom razmaza. Gene za antibiotsku rezistenciju uvodio sam tijekom transdukcije i metode *recombineering* kao selektivne markere. Stoga, prisustvo (ili odsustvo) rezistencije indirektni je dokaz uspješnosti samog postupka. UV je izvor oštećenja DNA pa osjetljivost na UV, tj. nemogućnost popravka DNA, može biti informativna kod provjere

delecijskih mutanata određenih gena, posebice onih uključenih u popravak DNA i HR, koji su i bili predmet mog istraživanja.

Male alikvote svježih prekonoćnih kultura ispitivanih bakterijskih sojeva razmazao sam na čvrste LB-podloge koje sadrže različite antibiotike te na dvije podloge bez antibiotika: jedna je poslužila kao kontrola, a drugu sam ozračio UV-om u dozi 60 J/m². Bakterije sam inkubirao preko noći na 37 °C te idući dan provjerio ispravnost sojeva.

3.2.12. Provjera stabilnosti plazmida

Nakon analize naivne adaptacije u sojevima transformiranim plazmidom pEB628, bilo je nužno provjeriti dolazi li do gubitka plazmida tijekom uzgoja bakterija s ciljem izbjegavanja lažnih negativnih rezultata. Za svaki istraživani soj napravio sam razrjeđenja (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶) prekonoćnih kultura triju pasaža u puferu M/15. Po 10 µL svakog razrjeđenja kapao sam na podloge bez antibiotika (kontrola) te na podlogu s ampicilinom. Otpornost na ampicilin indirektno ukazuje na prisustvo plazmida u stanicama. Bakterije sam uzgajao prekonoćno na 37 °C. Broj naraslih kolonija uvrstio sam u izraz: $\frac{CFU}{mL} = N \text{ (kolonija)} \times \text{Razrjeđenje} \times 100$. Gubitak plazmida se prati usporedbom vrijednosti dobivenih za bakterije rasle na podlozi s antibiotikom i bez antibiotika.

3.2.13. Analiza ukupnih proteina metodom SDS-PAGE

Kako bih kod insercijskih mutanata potvrdio da u stanici dolazi do nadekspresije proteina za koje ugrađeni geni kodiraju, analizirao sam ukupne bakterijske proteine metodom SDS-PAGE.

3.2.13.1. Stanična liza i izolacija ukupnih proteina

Svježe prekonoćne kulture (3 mL) istraživanih sojeva uzgajanih u prisustvu ili odsustvu (negativna kontrola) induktora L-arabinoze istaložio sam centrifugiranjem (14 000

rcf, 5 min, 4 °C) u uređaju *Sigma 3K30* (Sigma Laborzentrifugen GmbH). Zatim, odbacio sam supernatant te talog resuspendirao u 600 µL pufera za lizu. Stanice sam potom lizirao soniciranjem u uređaju *High Intensity Ultrasonic Processor 50-Watt Mode* (Bioblock Scientific) u 2 ciklusa po 30 s. Tijekom postupka otpuštaju se velike količine topline pa je, zbog očuvanja proteinske strukture, postupak nužno provoditi na ledu te između ciklusa soniciranja napraviti pauzu (30 s). U daljnjoj analizi koristio sam ukupni stanični lizat.

3.2.13.2. Određivanje masene koncentracije proteina

Uzorcima sam odredio masenu koncentraciju proteina Bradfordovom metodom (Bradford 1976) koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji proteina s bojom *Coomasie Brilliant Blue* u kiselim uvjetima, pri čemu se obojenje otopine mijenja iz smeđega (maksimum apsorbancije pri $\lambda = 465$ nm) u plavo (maksimum apsorbancije pri $\lambda = 610$ nm).

Pripremio sam radnu Bradfordovu otopinu iz matične. U 980 µL radne Bradfordove otopine dodao sam 20 µL proteinskog uzorka ili pufera za lizu (slijepa proba) u duplikatu. Smjesu sam promiješao vorteksiranjem i inkubirao 5 min, u tami. Uzorke sam prebacio u staklene kivete i izmjerio im apsorbanciju ($\lambda = 595$ nm) pomoću spektrofotometra *Specord 50 Plus* (Analytic Jena). Koncentracije uzoraka odredio sam pomoću baždarne krivulje pripremljene iz otopina goveđeg serumskog albumina poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg/mL) u puferu za lizu.

3.2.13.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE, od eng, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Proteinske uzorke (100 µL) denaturirao sam dodavanjem pufera za denaturaciju (25 µL) i inkubacijom u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf) na 95 °C (5 min). SDS-PAGE proveo sam u uređaju *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad). Najprije, bilo je potrebno pripremiti gel. Koristio sam sustav gela za sabijanje (4%-tni akrilamid/ bis-akriamid) i gela za razdvajanje (10%-tni akrilamid/ bis-akriamid) kojim se postiže maksimalna razlučivost.

Gelovi su pripremljeni prema sastavu iz tablice 3.9, pri čemu se APS, inicijator polimerizacije gela, i TEMED, katalizator polimerizacije, dodaju neposredno prije izlivanja kako bi se spriječila preuranjena polimerizacija. Gelovi se izljevaju između prethodno postavljenih stakalaca: najprije gel za razdvajanje, pa nakon 45 min i gel za sabijanje u koji se umeće češalj za oblikovanje jažica. Nakon polimerizacije gela za sabijanje (45 min), uklanja se češalj, a okvir sa stakalcima postavlja se u elektrodni nosač i u prostor između gelova ulijeva se svježi 1 × elektrodni pufer za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu. Nanosio sam 10 µg proteinskih uzoraka te 5 µL markera *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific). Potom, postavio sam elektrodni nosač u kadicu za elektroforezu ispunjenu 1 × elektrodnim puferom za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu. Pokrenuo sam elektroforezu pri naponu 100 V, prvih 15 min, pa zatim 180 V, idućih 45 min. Potom, rasklopio sam aparaturu za elektroforezu, a gelove sam odvojio od stakalaca. Proteine u gelu sam obojio u otopini za bojanje poliakrilamidnih gelova (1h, u tresilici). Boju koja se nespecifično vezala za gel uklonio sam prekonoćnom inkubacijom u otopini za odbojavanje poliakrilamidnih gelova. Gelove sam fotografirao na uređaju *Epson Perfection V700 Photo* (Epson).

Tablica 3.9. Sastav poliakrilamidnog gela za SDS-PAGE.

Otopine	10% Gel za razdvajanje	4% Gel za sabijanje
tris-HCl*	2,5 mL	1,25 mL
30% (w/v) Akrilamid/ bisakrilamid	3,3 mL	665 µL
10% (w/v) SDS	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL
destilirana voda	4,05 mL	3,05 mL

*U gel za sabijanje dodaje se 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8), a u gel za razdvajanje 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,6).

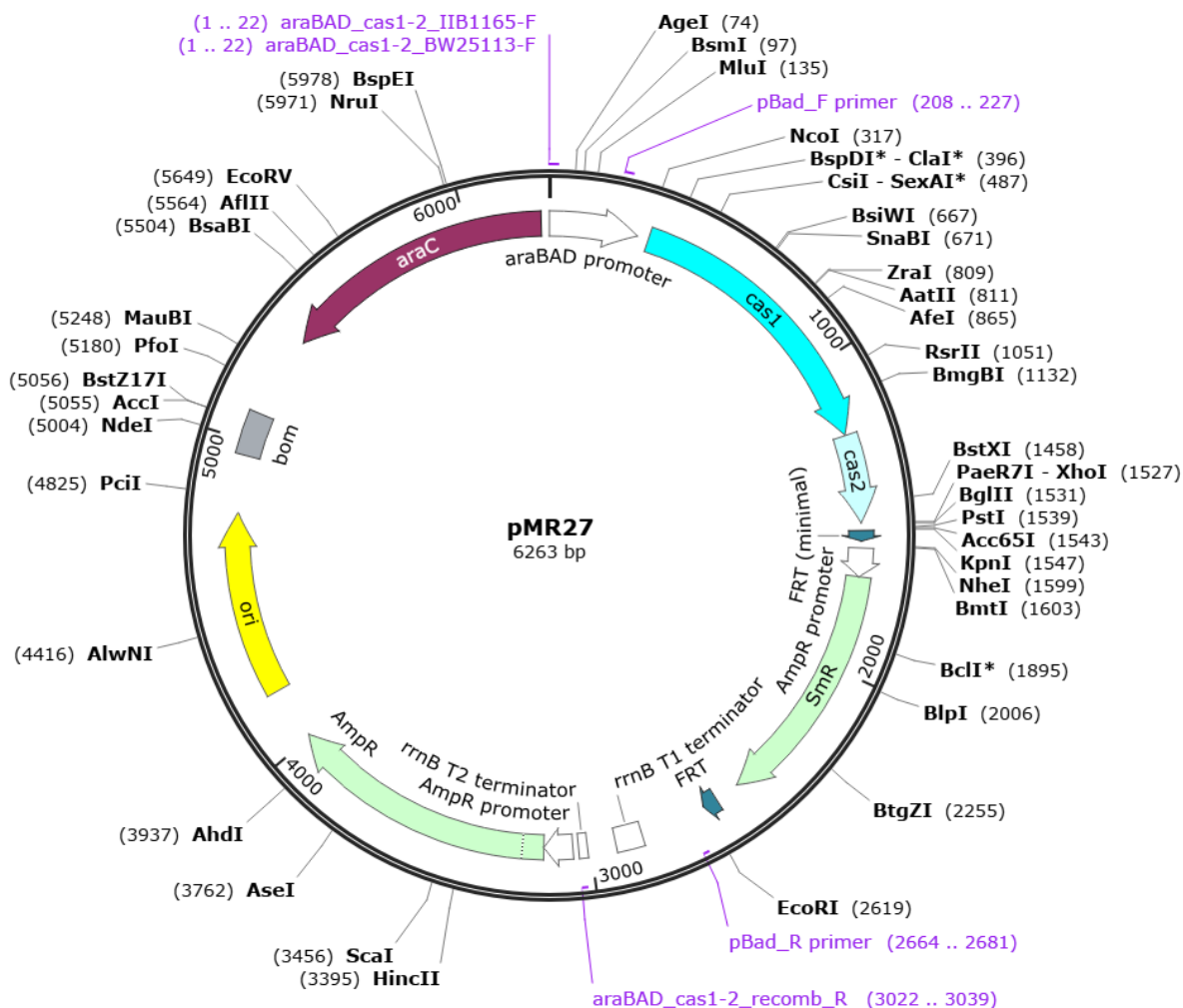
4. Rezultati

4.1. Insercijski mutanti *cas1-cas2*

4.1.1. Konstrukcija mutanata metodom *recombineering*

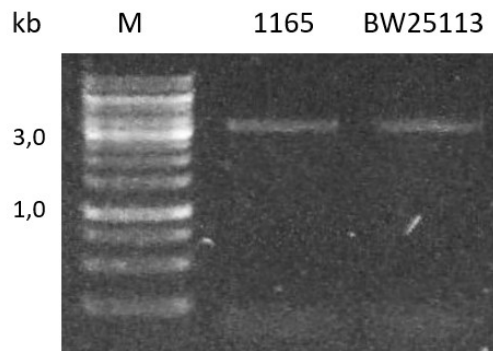
Metoda *recombineering* (Datsenko i Wanner 2000) koristi se za ciljano uvođenje insercija, delecija ili supstitucija u DNA u bakteriji *E. coli* u uvjetima *in vivo* (Sharan i sur. 2009). Strategija se temelji na recipročnoj izmjeni linearne DNA od interesa s regijom bakterijskog genoma čijim je homolognim sekvencama linearna DNA omeđena. Ugradnju kataliziraju geni *red* faga lambda koji zahtijevaju kratke regije homologije (minimalno 35 bp sa svake strane) (Mosberg i sur. 2010).

Prvi cilj ovog rada bio je konstruirati sojeve bakterije *E. coli* K-12 s kromosomskom insercijom gena *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom *araBAD*. Time bi izostala potreba za unošenjem tih dvaju gena na plazmidu tijekom analize uspješnosti naivne adaptacije. U tu svrhu konstruiran je plazmid pMR27 (slika 4.1) u kojem su geni *cas1-cas2* stavljeni pod promotor *araBAD*, a na 3' kraj dodana je spektinomicinska/streptomicinska kazeta kako bi se olakšala selekcija (napravio dr. sc. Marin Radovčić). S ovog plazmida bilo je potrebno umnožiti linearnu DNA od interesa (sa sva tri gena) koja će se koristiti za HR. Parovi početnica koje sam koristio (tablica 3.3) posjeduju na svojim 5' krajevima dodanih 50 nukleotida homolognih regiji u koju je cilj ugraditi linearnu DNA, a izgraditi kromosomsku.



Slika 4.1. Mapa plazmida pMR27 izvezena iz programa *Snappgene*. Plazmid sadrži konstrukt za pripremu soja s inducibilnim genima *cas1-cas2*. Konstrukt se sastoji od gena *cas1* i *cas2* pod kontrolom promotora *araBAD* čiji je induktor L-arabinoza i streptomocinsku/spektinomocinsku kazetu za selekciju uspješnih događaja. Plazmid nosi i gen za rezistenciju na ampicilin. Plazmid je konstruirao dr. sc. Marin Radovčić.

Isti konstrukt bilo je planirano uvesti u dva soja recipijenta: jedan u soj BW25113, koji je divlji tip za sve gene *cas*, a drugi u soj IIB1165, u kojem je gen *cas1* deletiran. U prvome soju trebala se dogoditi zamjena gena *cas1* i *cas2* pod kontrolom nativnog promotora tim istim genima pod kontrolom promotora *araBAD* te streptomocinskom kazetom. U drugome soju trebala se odvit ugradnja istih gena uz izgradnju gena *cas2* pod nativnim promotorom. Geni *cas1* i *cas2* sa streptomocinskom kazetom dugi su oko 3000 bp, pa je to očekivana duljina amplikona. Produkte reakcije PCR analizirao sam agaroznom gel elektroforezom, a prikazani su na slici 4.2. Prinos amplikona nije velik, no dobivena količina bila je dovoljna za daljnje korake metode.



Slika 4.2. Analiza uspješnosti umnažanja linearne DNA s genima *cas1* i *cas2*, pod kontrolom promotora *araBAD*, i streptomocinskom kazetom s regijama homologije za ugradnju u sojeve IIB1165 i BW25113 metodom *recombineering*. Kao marker veličine (M) korišten je *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Uočljivo je kako dobiveni amplikoni odgovaraju očekivanim veličinama te da izostaju nespecifični fragmenti: to ujedno znači da produkt reakcije PCR nije bilo potrebno pročišćavati iz gela, već direktno iz reakcije PCR, što sam učinio. Budući da se u smjesi reakcije PCR, osim amplikona, nalazio i plazmid pMR27 koji je služio kao kalup, a koji također nosi gen za rezistenciju na streptomycin, bilo ga je nužno ukloniti cijepanjem restrikcijским enzimom *DpnI*. Na taj način se izbjegava selekcija lažnih pozitivna. Pocijepani produkt reakcije PCR ponovno sam pročistio. Pročišćenju DNA sam, zatim, izmjerio koncentraciju. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.1.

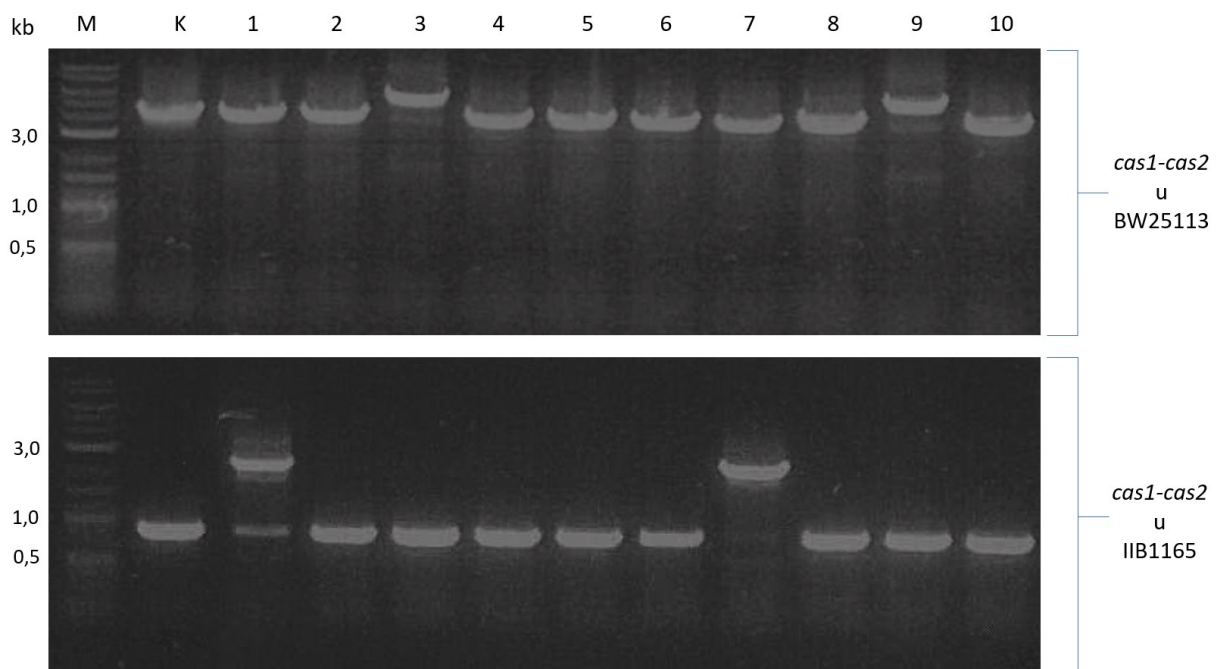
Tablica 4.1. Masene koncentracije (γ) pročišćene linearne DNA s genima *cas1* i *cas2* umnožene metodom PCR za ugradnju tehnikom *recombineering* u sojeve IIB1165 i BW25113.

Linearna DNA	γ / ng μL^{-1}
<i>cas1-cas2</i> u BW25113	17
<i>cas1-cas2</i> u IIB1165	12

Bakterijske stanice recipijentnih sojeva (BW25113 i IIB1165) transformirao sam plazmidom pKD46 koji sadrži gene *red* faga lambda (*gam*, *bet*, *exo*) - nužne za HR linearne DNA s dodanim homolognim regijama i homolognog bakterijskog genoma. Transformirane bakterije učinio sam elektrokompetentnima te ih ovaj put transformirao pročišćenom linearnom DNA (100 ng) tehnikom elektroporacije. Nakon električnog pulsa, stanice sam uzgajao preko noći u tekućem mediju u prisustvu L-arabinoze kako bi se stalno poticala ekspresija gena *red* te kako bi se izgubio plazmid pKD46. Zatim, stanice sam nasadio na

čvrstu podlogu sa streptomycinom i uzgajao ih na 37 °C kako bi se dodatno osigurala selekcija i gubitak plazmida. S obzirom da sadrži temperaturno osjetljivo izorište replikacije, pKD46 se ne može umnažati na 37 °C pa se daljnjim diobama bakterijskih stanica uspješno gubi. Na streptomicinskim podlogama naraslo je desetak kolonija.

Nakon što je elektroporacijom dobiven značajan broj kolonija-kandidata na selektivnoj podlozi, ispravnost ugradnje valjalo je potvrditi na genotipskoj razini. Provjerio sam deset pojedinačnih kolonija metodom *colony* PCR. Koristio sam par početnica *ygcJ3-F/CRISPR-Sp4* koji omeđuje regiju ugradnje linearne DNA, pri čemu se F-početnica veže na samom kraju gena *casB*, a R-početnica unutar lokusa CRISPR. Soj IIB1165, za razliku od soja BW25113, posjeduje deleciju gena *casC*, *casD* i *casE*. Stoga, očekivana duljina amplicona za insercijski soj IIB1439 (nastao od IIB1165), iznosi 4 kb, a za IIB1438 (nastao od BW25113), iznosi 6 kb. Kao negativna kontrola poslužila je DNA iz recipijentnih sojeva s ampliconima očekivanih duljina oko 0,9 kb (IIB1165) te oko 3,5 kb (BW25113). Produkti reakcije PCR analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu i priloženi su na slici 4.3.



Slika 4.3. Provjera uspješnosti stvaranja insercijskih mutanata *cas1-cas2* u sojevima BW25113 i IIB1165 metodom *colony* PCR. Za oba soja ispitano je 10 kolonija (označenih 1-10) naraslih na streptomicinskoj ploči nakon elektroporacije u sklopu metode *recombineering*. Kao marker veličine (M) korišten je *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

U slučaju soja IIB1439, pozitivan ishod uočava se u kolonijama 1 i 7. Kod kolonije 1, osim očekivanog amplicona veličine 4 kb, nalazi se i amplicon koji po veličini odgovara

negativnoj kontroli pa je za daljnje eksperimente izabrana kolonija 7. Kod soja IIB1438 također se uočavaju dvije pozitivne kolonije (3 i 9), a kolonija 3 izabrana je za daljnje eksperimente. Izabrane kolonije dvaju konstruiranih sojeva sterilnom ezom presadio sam na podlogu bez antibiotika.

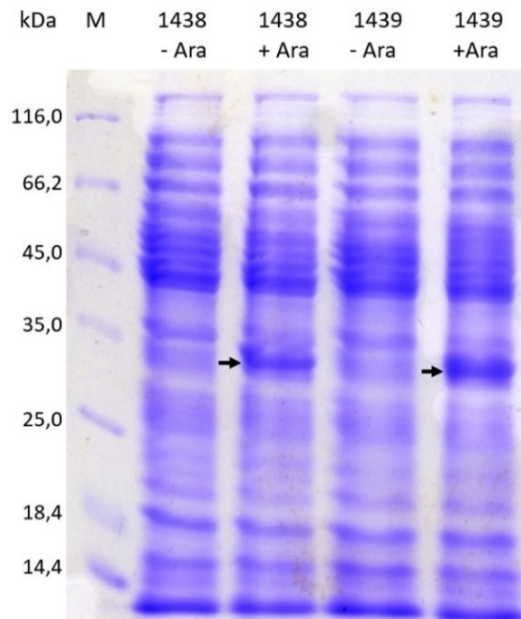
Ispravnost sojeva na fenotipskoj razini provjerio sam testom razmaza. Prisustvo (ili odsustvo) rezistencije na antibiotik ili UV indirektan je dokaz uspješnosti samog postupka stvaranja sojeva. Kao kontrole koristio sam polazne sojeve IIB1165 (rezistentan na apramicin) i BW25113 (susceptibilan na sve antibiotike). U skladu s očekivanjima, ustanovljeno je kako je insercijski soj IIB1439 (nastao od IIB1165) rezistentan na apramicin i streptomycin, a IIB1438 (nastao od BW25113) na streptomycin. Sojevi nisu osjetljivi na UV.

Budući da su u sojevima IIB1438 i IIB1439 uneseni geni *cas1* i *cas2* trebali biti pod kontrolom inducibilnog promotora *araBAD*, bilo je nužno provjeriti dolazi li do nadekspresije proteina Cas1 i Cas2 u prisustvu induktora L-arabinoze. Iz prekonoćnih kultura izolirao sam ukupne proteine sonikacijom u puferu za lizu. Uzorcima sam odredio masenu koncentraciju proteina kako bih u koraku SDS-PAGE elektroforeze mogao u jažice nanijeti jednaku masu proteina svakog uzorka. Na taj način moguće je semi-kvantitativno uspoređivati ekspresiju pojedinog proteina između različitih uzoraka. Dobivene koncentracije priložene su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Masena koncentracija (γ) ukupnih proteina u insercijskim sojevima *cas1-cas2* (IIB1438 i IIB1439) uzgajanima prekonoćno na 37 °C u prisustvu i odsustvu 0,02%-tne (ω/v) L-arabinoze. Proteini su izolirani sonikacijom u puferu za lizu, a koncentracije su određene Bradfordovom metodom.

Uzorak	$\gamma / \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
IIB1438 Ara -	0,58
IIB1438 Ara +	0,54
IIB1439 Ara -	0,45
IIB1439 Ara +	0,44

Uzorke sam zatim denaturirao, na gel sam nanio 10 μg proteina po uzorku i proveo SDS-PAGE. Dobiveni gel priložen je na slici 4.4.



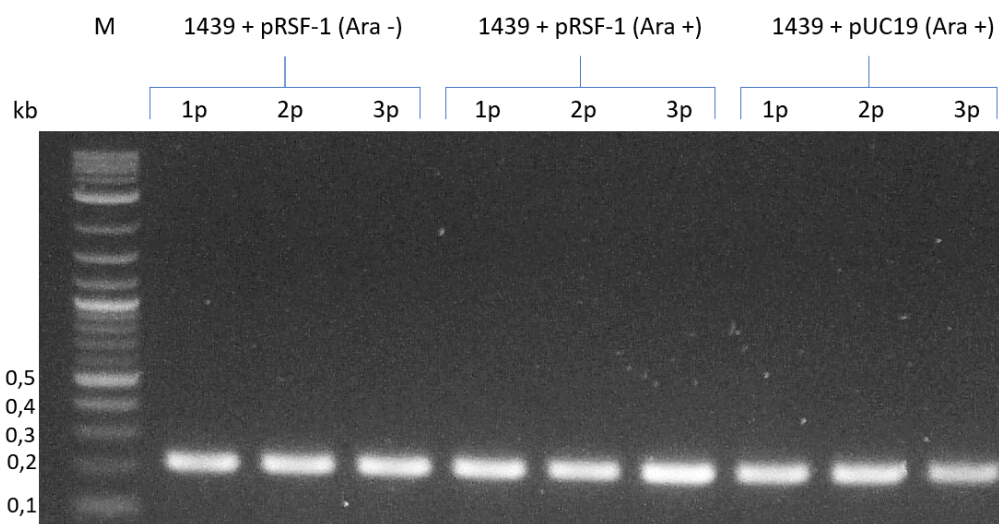
Slika 4.4. Ukupni proteini insercijskih mutanata *casI-cas2* (sojevi IIB1438 i IIB1439) uzgajanih preko noći na 37 °C u prisustvu ili odsustvu 0,02%-tne (*w/v*) L-arabinoze, analizirani metodom SDS-PAGE. Kao marker veličine (M) korišten je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific). Pojačana ekspresija proteina koji veličinom odgovara proteinu Cas1, u prisustvu arabinoze, označena je crnom strelicom.

Protein Cas1 veličine je 33 kDa. Uočljivo je kako se u obama sojevima u prisustvu L-arabinoze pojavljuje vrpca na toj veličini, koje nema u odsustvu L-arabinoze, što je sugeriralo da je riječ o proteinu Cas1 do čije nadekspresije dolazi dodatkom induktora. Protein Cas2 je znatno manji (10 kDa) pa njegovu vrpcu nisam detektirao.

4.1.2. Analiza učinkovitosti naivne adaptacije u insercijskim sojevima

Sve provedene provjere su sugerirale da su u sojeve BW25113 i IIB1165 uspješno uneseni geni *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom *araBAD* čime su nastali sojevi IIB1438 i IIB1439. Stoga sam u konstruiranim sojevima ispitao učinkovitost naivne adaptacije. Za naivnu adaptaciju u bakteriji *E. coli*, od gena *cas*, potrebni su samo geni *cas1* i *cas2*, pa konstrukcijom ovih sojeva naivna adaptacija mogla bi se proučavati bez dodavanja ikakvih gena na plazmidu. Primarni cilj bio je istražiti mogu li kromosomski eksprimirani geni *cas1* i *cas2* jednako, ili barem približno, dobro poticati naivnu adaptaciju kao oni eksprimirani s plazmida, s obzirom da se plazmidna DNA u stanici pojavljuje u znatno većem

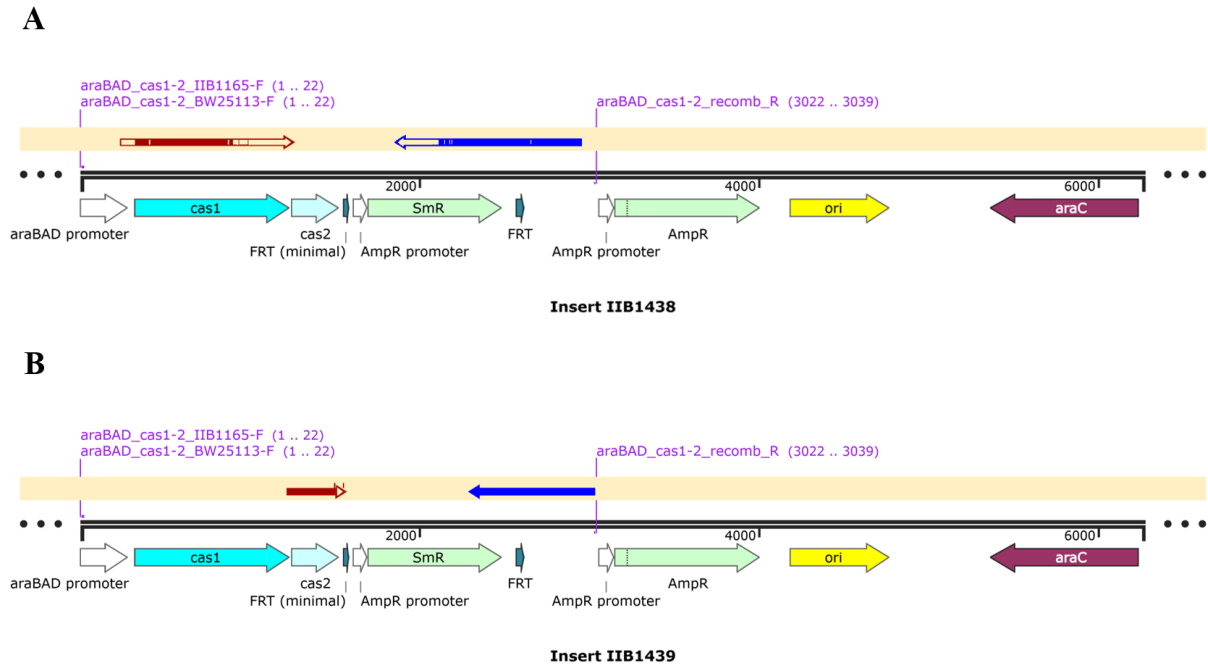
broju kopija. Plazmide je u ovim sojevima nužno dodati samo kao izvor strane DNA. Bakterijske stanice, sam, stoga, transformirao praznim plazmidima pRSF-1b ili pUC19 te ih uzgajao tijekom tri dana u tri pasaže. Od svake od triju pasaža pripremio sam kalup za reakciju PCR lizirajući stanice na visokoj temperaturi. U istraživanju naivne adaptacije standardno se koristi početnica CRISPR-Sp4, koja se veže unutar četvrte razmaknice lokusa CRISPR, i početnica CRISPR-R, koja se veže na 3' kraj gena *casI*. Na taj način, umnaža se dio lokusa CRISPR u kojem dolazi do ugradnje razmaknice. No, zbog insercije streptomycinske kazete koja se zbilja konstrukcijom ovih sojeva u regiji omeđenoj tim parom početnica, dobiveni amplikon bio bi isuviše velik za analizu. Stoga, koristio sam početnicu CRISPR-NGS-F, koja se veže unutar vodeće regije, i CRISPR-NGS-R, koja se veže unutar prve razmaknice. Omeđena regija duljine je 217 bp, a ugradnjom razmaknice 278 bp, što se na agaroznom gelu detektira kao vrpca slabijeg intenziteta koja se nalazi tik iznad osnovne vrpce. Rezultate reakcije PCR prilažem na slici 4.5.



Slika 4.5. Analiza efikasnosti naivne adaptacije u insercijskim mutantima *casI-cas2* (sojevi IIB1438 i IIB1439) u 2%-tnom agaroznom gelu uzgajanima tijekom tri dana u tri pasaže (p) u odsustvu (Ara-, negativna kontrola) ili prisustvu (Ara+) 0,02%-tne (*w/v*) L-arabinoze. Kao izvor strane DNA poslužili su plazmidi pRSF-1 ili pUC19 kojim su bakterijske stanice transformirane. Kao marker veličine (M) korišten je *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Uočljivo je kako nema ugradnje nove razmaknice u prisustvu induktora. S obzirom na rezultate SDS-PAGE-a (poglavlje 4.1.1) koji su sugerirali da se protein Cas1 eksprimira u značajnoj razini, očekivana je uspješna ugradnja razmaknice tijekom pasažiranja. Stoga, umnožena je regija koja okružuje insercije te poslana na Sangerovo sekvenciranje početnicama casE-F, koja se veže unutar gena *casE*, i CRISPR-Sp4, koja se veže unutar

četvrte razmaknice lokusa CRISPR, u slučaju soja IIB1438, te *ygcJ3-F*, koja se veže unutar gena *casC*, i CRISPR-Sp4, u slučaju soja IIB1439. Dobivene sekvence poravnao sam s referentnim insertom (slika 4.6).



Slika 4.6. Provjera uspješnosti stvaranja insercijskih sojeva (*araBAD cas1-cas2*) sekvenciranjem regije koja omeđuje insert. Sekvencirane regije (označene crveno i plavo u žutom pravokutniku) poravnane su na fizičku mapu plazmida pMR27 koji je i poslužio kao kalup za umnažanje linearne DNA inserta. Insercijski soj IIB1438 (**slika A**) sekvenciran je početnicama CasE-F (crveno) i CRISPR-Sp4 (plavo), a insercijski soj IIB1439 (**slika B**) početnicama *ygcJ3-F* (crveno) i CRISPR-Sp4 (plavo). Prilikom poravnanja uklonjeni su dijelovi sekvenci koji nisu bili homologni plazmidu. Slika je dobivena u programu *SnapGene*.

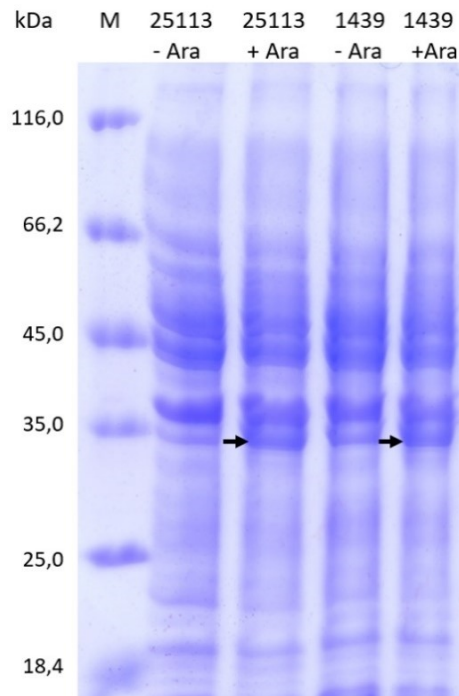
Kod soja IIB1438 uočljivo je kako je došlo do ugradnje streptomicinske kazete, što i objašnjava rast kolonija na streptomicinskoj podlozi nakon elektroporacije. Međutim, bakterije su zadržale gene *cas1* i *cas2* pod kontrolom nativnog promotora, s obzirom da poklapanje između sekvence dobivene početnicom CasE-F i referentne sekvence počinje tek prvim nukleotidom kodirajućeg slijeda gena *cas1*. Slična situacija je i kod soja IIB1439: postoji prirodno prisutni *cas2* (pod kontrolom nativnog promotora) te streptomicinska kazeta koja je ugrađena. No, za razliku od soja IIB1438, ne postoji *cas1* s obzirom da soj IIB1165 (od kojeg je IIB1439 nastao), posjeduje deleciju tog gena. Zaključno, u oba soja ugrađena je samo streptomicinska kazeta.

Zbog navedenih rezultata, nametalo se pitanje zašto je metodom SDS-PAGE, u prisustvu L-arabinoze, uočena povećana ekspresija proteina koji veličinom odgovara proteinu Cas1 (33 kDa)? Iako sojevi BW25113 i IIB1165 (od kojih su nastali IIB1438 i IIB1439) posjeduju deleciju gena *araB*, *araA* i *araD*, oba sadrže intaktan *araC*, čija se ekspresija aktivira u prisustvu L-arabinoze. Toj tezi išla je u prilog i veličina proteina AraC koja također iznosi 33 kDa. Stoga, da bih provjerio postavljenu hipotezu, uzgajao sam sojeve IIB1439 (*araBAD cas1-cas2*) te BW25113 (*wt*) u odsustvu ili prisustvu L-arabinoze. Iz prekonocnih kultura izolirao sam ukupne proteine, izmjerio im koncentraciju, denaturirao ih, te proveo SDS-PAGE. Izmjerene koncentracije priložene su u tablici 4.3. Na gel sam nanosio 10 µg proteina po uzorku.

Tablica 4.3. Masena koncentracija (γ) ukupnih proteina u insercijskom soju *cas1-cas2* (IIB1439) i kontrolnom soju BW25113 (*wt*) uzgajanima prekonocno na 37 °C u prisustvu i odsustvu 0,02%-tne (ω/v) L-arabinoze. Proteini su izolirani sonikacijom u puferu za lizu, a koncentracije su određene Bradfordovom metodom.

Uzorak	$\gamma / \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
BW25113 Ara -	1,66
BW25113 Ara +	1,50
IIB1439 Ara -	1,61
IIB1439 Ara +	1,46

Vizualizirao sam proteine i fotografirao gel. Dobivena fotografija priložena je na slici 4.7.



Slika 4.7. Ukupni proteini insercijskog soja *cas1-cas2* (IIB1439) i kontrolnog soja BW25113 (*wt*) uzgajanih prekončno na 37 °C u prisustvu (+Ara) ili odsustvu (-Ara) 0,02%-tne (*w/v*) L-arabinoze, analizirani metodom SDS-PAGE. Kao marker veličine (M) korišten je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific). Pojačana ekspresija proteina veličine 33 kDa (označen crnom strelicom) u prisustvu arabinoze u obama sojevima sugerira da nije riječ o proteinu Cas1, već proteinu AraC.

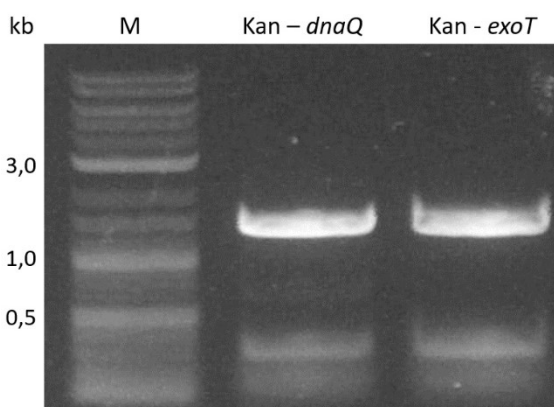
U soju BW25113 uočava se isti obrazac ekspresije kao u „insecijskom“ soju IIB1439: nadekspresija proteina veličine 33 kDa u prisustvu L-arabinoze. Budući da u kontrolnom soju BW25113 ne postoji gen *cas1* čija bi ekspresija bila inducirana dodatkom L-arabinoze, riječ je o proteinu AraC. To je ujedno konačna potvrda da insercijski sojevi nisu uspješno konstruirani.

4.2. Delecijski mutanti

4.2.1. Konstrukcija mutanata $\Delta dnaQ$ i $\Delta exoT$ metodom *recombineering*

Stvaranju delecijških mutanata pristupio sam na sličan način kao stvaranju insercijskih pa su i pojedini koraci detaljnije objašnjeni u tom poglavlju (4.1). Cilj je bio stvaranjem

delecijskih sojeva za gene *dnaQ* i *exoT* istražiti njihov utjecaj na ugradnju razmaknice tijekom naivne adaptacije. Metodom PCR umnožio sam kanamicinsku kazetu početnicama koje na svom 5' kraju sadrže 30 bp homologije s ciljnom regijom genoma. Kanamicinska kazeta duga je 1500 bp pa je to ujedno bila i očekivana duljina amplicona. Produkt reakcije PCR analiziran je elektroforezom u agaroznom gelu, a dobivena fotografija priložena je na slici 4.8.



Slika 4.8. Analiza uspješnosti umnažanja linearne DNA s kanamicinskom kazetom i regijama homologije za izgradnju gena *dnaQ* i *exoT* metodom *recombineering* u sojeve IIB1165 i BW25113, tim redom. Kao marker veličine (M) korišten je *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Primjetno je kako su dobiveni odgovarajući ampliconi. Čitavu smjesu reakcije PCR sam pročitao i izmjerio joj koncentraciju DNA. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.4.

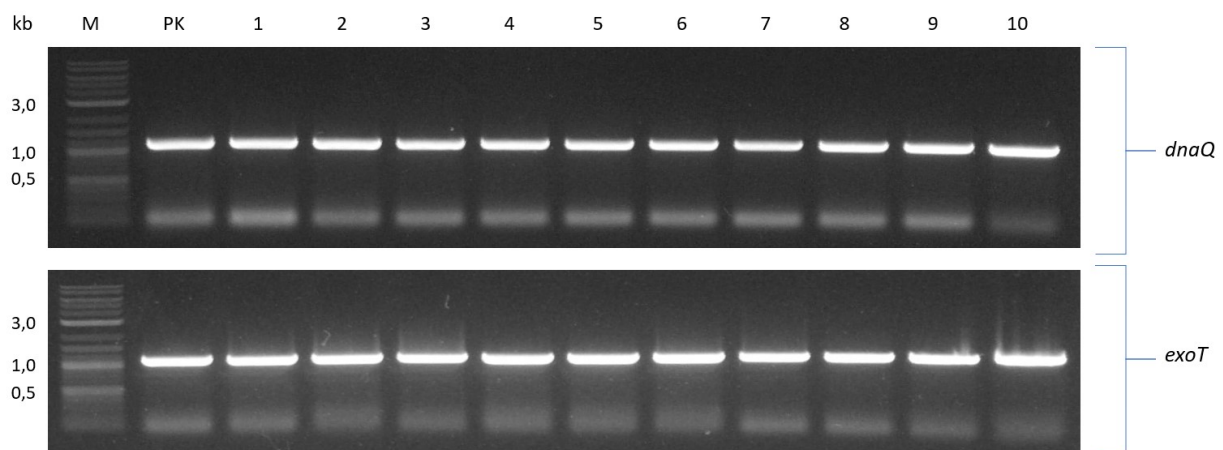
Tablica 4.4. Masene koncentracije (γ) pročišćene linearne DNA s kanamicinskom kazetom umnožene metodom PCR za izgradnju gena *dnaQ* i *exoT* tehnikom *recombineering* u sojeve IIB1165 i BW25113, tim redom.

Linearna DNA	γ / ng μL^{-1}
delecija <i>exoT</i> u BW25113	56
delecija <i>dnaQ</i> u IIB1165	69

Kao i kod stvaranja insercijskih sojeva, stanice recipijentnih sojeva (BW25113 i IIB1165) bilo je nužno transformirati plazmidom pKD46. Bakterije transformirane plazmidom pKD46 transformirao sam pročišćenom linearnom DNA, tehnikom elektroporacije. Elektroporirane stanice uzgajao sam preko noći u tekućem mediju u prisustvu L-arabinoze kako bi došlo do HR. Stanice sam, potom, nasadio na čvrstu podlogu s

kanamicinom i uzgajao ih na 37 °C kako bi se osigurao gubitak plazmida. Naraslo je pregršt kolonija, uz napomenu da je mutantu $\Delta exoT$ trebalo dva dana rasta.

Ispravnost ugradnje potvrđena je metodom *colony* PCR. Koristio sam istu F-početnicu kao za umnažanje linearne DNA, no kao R-početnicu koristio sam kt-R koja se veže unutar kanamicinske kazete. Očekivana duljina amplikona iznosi 1,2 kb. Kao pozitivnu kontrolu koristio sam genomsku DNA iz soja IIB888, koji sadrži kanamicinsku kazetu. Analizirani produkti reakcije PCR priloženi su na slici 4.9.



Slika 4.9. Provjera uspješnosti stvaranja mutanata $\Delta dnaQ$ i $\Delta exoT$ metodom *colony* PCR. Za oba gena ispitano je 10 kolonija (označene 1-10) naraslih na kanamicinskoj ploči nakon elektroporacije u sklopu metode *recombineering*. Kao marker veličine (M) korišten je *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Sve kolonije dale su očekivani amplikon, kao i pozitivna kontrola. Za daljnje eksperimente izabrana je kolonija 8 u obama sojevima. Izabrane kolonije presadio sam na podlogu bez antibiotika.

S ciljem daljnje potvrde ispravnosti konstruiranih sojeva, proveo sam test razmaza. Kao kontrole korišteni su polazni sojevi IIB1165 (rezistentan na apramicin) i BW25113 (susceptibilan na sve antibiotike). Kao što je i očekivano, mutant $\Delta dnaQ$ (soj IIB1440, nastao od IIB1165) rezistentan je na apramicin i kanamicin, a mutant $\Delta exoT$ (soj, IIB1441, nastao od BW25113) na kanamicin. Sojevi nisu osjetljivi na UV. Time je potvrđeno da su sojevi uspješno konstruirani.

4.2.2. Konstrukcija mutanata transdukcijom

Nadalje, htio sam istražiti ulogu domaćinskih 3'→5' egzonukleaza u mutantu u kojem je prisutna i u kojem je uklonjena nukleazna aktivnost kompleksa RecBCD. To sam učinio provevši dvije transdukcije na mutantu $\Delta dnaQ$ (IIB1440): Najprije sam u navedenom mutantu transdukcijom ubacio deletirani gen *recD* i na taj način ukinuo nukleaznu aktivnost enzimskog kompleksa RecBCD. Tom soju dana je oznaka IIB1444. Budući da kompleks RecBCD neovisno o slijedu Chi nanosi protein RecA i na taj način čini jednolančane supstrate strane DNA neupotrebljivima za kompleks Cas1-Cas2, u soju $\Delta dnaQ \Delta recD$ (IIB1444) transdukcijom sam ubacio deletirani gen *recA* i na taj način konstruirao mutanta $\Delta dnaQ \Delta recD \Delta recA$ (IIB1447) na kojem sam proučavao naivnu adaptaciju.

Na sličan sam način pripremio i mutanta za gen *uvrD* (IIB1451). Transdukcijom sam ubacio mutaciju $\Delta uvrD$ u soj IIB1165 kako bih istražio potencijalnu ulogu helikazne aktivnosti proteina UvrD u procesu naivne adaptacije.

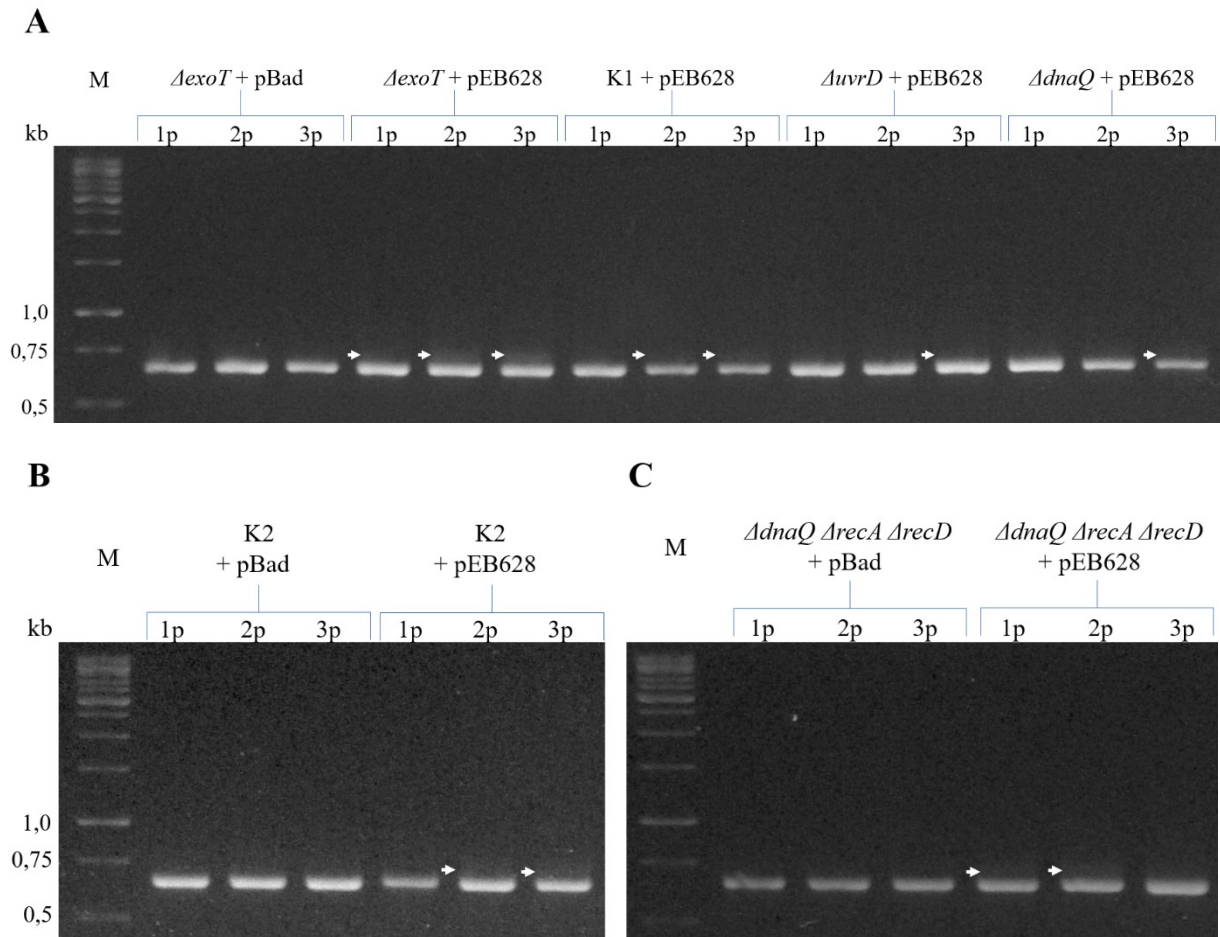
Ispravnost dobivenih sojeva ispitao sam testom razmaza. Soj $\Delta dnaQ \Delta recD \Delta recA$ (IIB1447) rezistentan je na apramicin i kanamicin (iz polaznog soja IIB1440), tetraciklin (transdukcijom s P1.IIB253 ($\Delta recD$)) te kloramfenikol (transdukcijom s P1.IIB312 ($\Delta recA$)). S obzirom da deletirani geni sudjeluju u popravku DSB pomoću HR, IIB1447 je osjetljiv na UV.

Soj IIB1451 rezistentan je na apramicin (iz polaznog soja IIB1165) i kanamicin (transdukcijom s P1.IIB1036 ($\Delta uvrD$)). Kao i IIB1447, soj IIB1451 osjetljiv je na UV s obzirom da deletirani gen *uvrD* sudjeluje u popravku MMR i NER.

4.2.3. Analiza učinkovitosti naivne adaptacije u delecijским sojevima

Sljedeći korak bio je istražiti uspješnost naivne adaptacije. S obzirom da su za naivnu adaptaciju od proteina Cas, potrebni Cas1 i Cas2, bakterijske stanice bilo je nužno transformirati plazmidom pEB628 koji nosi gene *cas1* i *cas2* pod kontrolom promotora *araBAD*. Bakterije sam transformirao i plazmidom pBad, koji je, kao okosnica plazmida pEB628 bez gena *cas*, poslužio kao negativna kontrola. Plazmidi su, također, bili izvorom strane DNA. Transformirane bakterije uzgajao sam tijekom tri dana u „tri pasaže“ u prisustvu

L-arabinoze kao induktora. Od svake od triju pasaža pripremio sam kalup za reakciju PCR lizirajući stanice na visokoj temperaturi. Nije korišten isti par početnica kao za analizu *knock-in* sojeva (CRISPR-NGS-F i -R) (poglavlje 4.1.2) jer u slučaju *knock-out* sojeva ne postoji insercija u regiji koju omeđuju početnice CRISPR-R i CRISPR-Sp4 pa je produkt reakcije PCR prihvatljive veličine (662 bp). Rezultate reakcije PCR prilažem na slici 4.10.

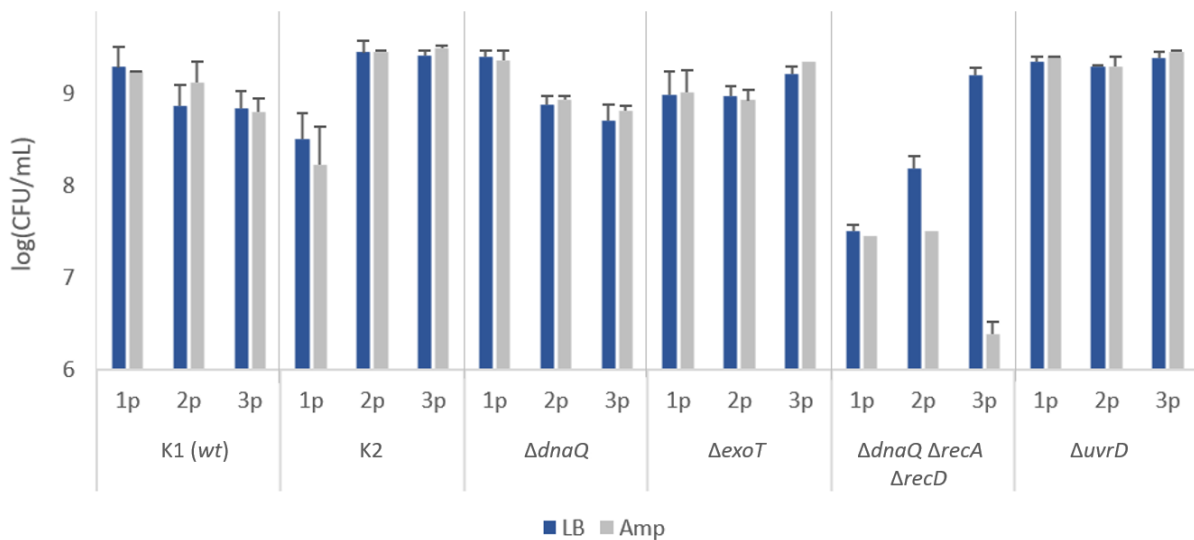


Slika 4.10. Analiza efikasnosti naivne adaptacije u mutantima ΔdnaQ (IIB1440), ΔexoT (IIB1441) i ΔuvrD (IIB1451) (A) i $\Delta\text{dnaQ} \Delta\text{recA} \Delta\text{recD}$ (IIB1447) (C) u 2%-tnom agaroznom gelu. Simbol K1 (*wt* – BW25113) (A) označava kontrolu za mutanta ΔexoT , a K2 (IIB1165) (B) za mutante ΔdnaQ , ΔuvrD i $\Delta\text{dnaQ} \Delta\text{recA} \Delta\text{recD}$. Bakterijske stanice transformirane su plazmidom pBad (negativna kontrola) ili pEB628 (geni *cas1* i *cas2* pod promotorom *araBAD*) te uzgajani u prisustvu induktora L-arabinoze tijekom tri dana u tri pasaže (p). Plazmidi su ujedno poslužili kao izvor strane DNA. Kao marker veličine (M) korišten je *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Novougrađene razmaknice, tamo gdje se pojavljuju, označene su bijelom strelicom. Prikazan je reprezentativan gel od najmanje triju ponavljanja.

Kao kontrola za mutanta ΔexoT (IIB1441) korišten je soj BW25113, dok je za sojeve ΔdnaQ (IIB1440), $\Delta\text{dnaQ} \Delta\text{recA} \Delta\text{recD}$ (IIB1447) i ΔuvrD (IIB1451) korišten soj IIB1165. U

kontrolnim sojevima BW25113 (*wt* za sve gene *cas*) te IIB1165 primjetno je povećanje intenziteta razmaknice od druge prema trećoj pasaži, nešto slabijeg intenziteta od očekivanog, ali u skladu s prethodnim istraživanjima da se ugradnja razmaknica uglavnom uočava od druge pasaže (Radovčić i sur. 2018). Najprimjetnija je ugradnja u mutantu $\Delta xoxT$ (IIB1441). Ponešto slabija ugradnja uočava se u mutantima $\Delta dnaQ$ (IIB1440) i $\Delta uvrD$ (IIB1451), uz pojavu razmaknice slabog intenziteta tek u trećoj pasaži. U višestrukom mutantu $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ (IIB1447) ugradnja se intenzivira od prve prema drugoj pasaži, no izostaje u trećoj.

Kako bih isključio mogućnost da tijekom uzgoja bakterija dolazi do gubitka plazmida, što direktno utječe na efikasnost ugradnje novih razmaknica, pratio sam stabilnost plazmida u trima pasažama. Rezultati su priloženi na slici 4.11. U kontrolama K1 (*wt*) i K2 (IIB1165) i mutantima $\Delta dnaQ$, $\Delta xoxT$ i $\Delta uvrD$ plazmid se ne gubi tijekom pasažiranja jer ne postoji značajna razlika između stanica uzgajanih na kontrolnoj ploči bez antibiotika te stanica uzgajanih na ampicilinskoj ploči. U mutantu $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ došlo je do gubitka plazmida u drugoj pasaži u manjoj mjeri (približno deset puta veći rast u kontroli), te trećoj pasaži u većoj mjeri (približno tisuću puta veći rast u kontroli) što je u skladu s dobivenim rezultatima da se ugradnja razmaknice uočava u prvoj i drugoj pasaži, no ne i u trećoj.



Slika 4.11. Stabilnost plazmida pEB628 u kontrolama K1 (BW25113) i K2 (IIB1165) te mutantima $\Delta dnaQ$ (IIB1440), $\Delta xoxT$ (IIB1441), $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ (IIB1447) i $\Delta uvrD$ (IIB1451) uzgajanima tijekom tri dana u tri pasaže (p) u prisustvu L-arabinoze i odsustvu (kontrola) ili prisustvu ampicilina. Rezultat je srednja vrijednost CFU/mL dviju, triju ili četiriju replika, a izražene su logaritamske vrijednosti i naznačene su standardne devijacije. Gubitak plazmida uočava se u drugoj (u manjoj mjeri) i trećoj (u većoj mjeri) pasaži mutanta $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$.

5. Rasprava

5.1. Insercijski mutanti

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je konstruirati soj s genima *cas1* i *cas2* pod kontrolom inducibilnog promotora *araBAD*. Naime, sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* nije aktivan pri standardnim laboratorijskim uvjetima s obzirom da su promotori gena *cas* i lokusa CRISPR pod represijom proteina H-NS te proteina StpA (u odsustvu proteina H-NS) (Pul i sur. 2010, Mitić i sur. 2020). Stoga, za izučavanje naivne adaptacije najprije je potrebno osigurati aktivnost gena *cas1* i *cas2*. To je moguće postići delecijom gena *hns* i *stpA*, nadekspresijom gena *leuO*, zamjenom nativnih promotora gena *cas1* i *cas2* s inducibilnima ili uvođenjem tih gena pod inducibilnim promotorom na plazmidu (Xue i Sashital 2019).

Ova posljednja ujedno je i najčešća strategija s obzirom da je transformacija bakterijskih stanica rutinski postupak, a plazmidi, koji se u stanici mogu nalaziti u mnogo kopija, osiguravaju snažnu ekspresiju proteina Cas1 i Cas2. Ipak, održavanje plazmida, kao i prisustvo antibiotika nužnog za selekciju stanica s plazmidom, metaboličko je opterećenje za stanicu (Sabri i sur. 2013). Također, fluktuacije u broju kopija plazmida direktno utječu na interpretaciju rezultata, a u određenim sojevima plazmidi su nestabilni i gube se tijekom dioba. Taj fenomen uočen je kod mutanata u genima *recB* i *recC* ili *recD* (Wendel i sur. 2014), a potonji je deletiran i u jednome od sojeva (IIB1447) proučenih u ovom istraživanju. Nadalje, ponekad postoji potreba za dodatnim plazmidima: primjerice, u proučavanju adaptacije u uvjetima nadekspresije određenog gena na plazmidu: kao što je bio slučaj u istraživanju Killelee i suradnika (2023) za gen *dnaK*. Tada različiti plazmidi, s obzirom na način particije i regulaciju replikacije, mogu biti međusobno inkompatibilni (Thomas 2014), a za valjanu selekciju nužno je i da nose rezistenciju na različite antibiotike.

Zamjenom nativnog promotora gena *cas1* i *cas2* inducibilnim, spomenuti problemi bili bi uklonjeni, a istraživanje naivne adaptacije postalo bi značajno jednostavnije i pouzdanije. Za konstrukciju sojeva koristio sam metodu *recombineering*. Dobiveni sojevi (IIB1438 i IIB1439) pokazali su se ispravnima u provjeri metodom *colony* PCR, a u provjeri metodom SDS-PAGE u prisustvu arabinoze nadeksprimirali su protein koji veličinom odgovara proteinu Cas1. Ipak, kod konstruiranih sojeva nije uočena ugradnja razmaknice, a Sangerovim sekvenciranjem utvrđeno je kako je došlo do ugradnje streptomocinske kazete, ali ne i dijela s

genima *cas1* i *cas2* pod kontrolom promotora *araBAD*. Protein koji je detektiran metodom SDS-PAGE, a koji je veličinom odgovarao proteinu Cas1, jest protein AraC, čija se ekspresija također inducira u prisustvu L-arabinoze. Metoda *recombineering* efikasna je za inserte kraće od 1,5 kb, a već za inserte dulje od 2,5 kb ugradnja je znatno otežana (Sabri i sur. 2013). Stoga, šansa za uspješan *knock-in* događaj s insertom *cas1-cas2* (≈ 3 kb) nije bila velika. U idućim istraživanjima bilo bi uputno postupak ponoviti više puta te provesti *screening* većeg broja kolonija kako bi se u bazenu neispravnih rekombinacijskih događaja izdvojio ispravni. Nadalje, budući da soj BW25113 posjeduje oba gena, *cas1* i *cas2*, ali pod nativnim promotorom cijelog operona, čime se ovi geni eksprimiraju u manjim količinama (Westra i sur. 2010), za konstrukciju soja s inducibilnim genima *cas1-cas2*, mogao bi se zamijeniti nativni promotor inducibilnim. Jedan od mogućih pristupa jest modifikacija metode *recombineering* – FRUIT, koju su opisali Stringer i suradnici (2012). U prvom koraku se primjenjuje klasični *recombineering* gdje se ispred gena od interesa ugrađuje produkt reakcije PCR koji sadrži gen za selekciju *thyA*¹ omeđen sa svake strane kopijom inducibilnog promotora od interesa te regijama homologije. Istovremeno se izgrađuje nativni promotor, a uspješni događaji selektiraju se na podlozi bez timina. U idućem koraku, uslijed spontane HR dviju kopija promotora, dolazi do izgradnje kazete s genom *thyA*, a kao „ožiljak“ ostaje jedna kopija promotora koji kontrolira ekspresiju gena od interesa. Spontana izgradnja selektira se na podlozi s trimetoprimom. Ovim pristupom značajno bi se smanjila veličina inserta ($\approx 1,5$ kb). Postupak bi se morao provoditi na mutantima za gen *thyA* i insercijski mutant ne bi sadržavao selektivni marker za prijenos u druge bakterijske sojeve što su dvije manjkavosti ove metode. Druga mogućnost bila bi da se, umjesto na 3' kraj, streptomcinska kazeta stavi na 5' kraj ispred inducibilnog promotora i gena *cas1-cas2*. Moguće je da bi prisustvo selektivnog markera u blizini promotora osiguralo njegovu ugradnju. U tom slučaju morao bi se napraviti novi početni plazmid i nove početnice za metodu *recombineering*.

5.2. Delecijski mutanti

Većinu poznatih faga obilježava dsDNA kao nasljedni materijal (Fokine i Rossmann 2014). Kako bi dsDNA faga postala supstratom kompleksa Cas1-Cas2 potrebna je helikaza koja će komplementarne lance DNA faga razdvojiti te egzonukleaza koja će fragmentirati

¹ Upotreba gena *thyA* kao selektivnog agensa opisana je u Wong i suradnici (2005).

dugu ssDNA (Xue i Sashital 2019). Nadalje, kompleks Cas1-Cas2 prepoznaje fragment ssDNA sa sekvencom komplementarnom sekvenci PAM, a aktivnošću kompleksa komplementarni lanci spajaju se u dsDNA (Kim i sur. 2020). Tako spojena dsDNA sadrži duge jednolančane krajeve koje prepoznaju i procesiraju 3'→5' egzonukleaze i tako stvaraju optimalan supstrat za ugradnju razmaknice. U mutantu $\Delta recD$, u kojem je ukinuta nukleazna aktivnost enzima RecBCD, te u mutantu $\Delta recB$, u kojem su ukinute obje aktivnosti enzima, uočena je smanjena učinkovitost naivne adaptacije (Levy i sur. 2015). No, to ne proizlazi iz nužnosti nukleazne aktivnosti enzima, već iz činjenice da enzim RecBC neovisno o slijedu Chi nanosi protein RecA na jednolančane 3' krajeve (Churchill i sur. 1999), čineći tu DNA nedostupnom za adaptacijsku mašineriju, što je postalo jasno kada je u mutantu $\Delta recA \Delta recD$ adaptacija vraćena na prethodne razine (Radovčić i sur. 2018). Nužna je helikazna aktivnost, a ne nukleazna aktivnost enzima RecBCD s obzirom da, u istom istraživanju, u mutantu $\Delta recA \Delta recB$ nije uočen taj efekt. Time je otvoreno pitanje koje su egzonukleaze esencijalne u tom procesu? U bakteriji *Streptococcus thermophilus* procesiranje dugih jednolančanih krajeva obavlja domena iz porodice egzonukleaza DnaQ koja je prirodno fuzionirana s proteinom Cas2 (Drabavicius i sur. 2018). Ramachandran i suradnici (2020) biokemijskim pristupom pokazali su da dvije egzonukleaze bakterije *E. coli*, DnaQ i ExoT (iz porodice DnaQ), procesiranjem 3' jednolančanih krajeva DNA stvaraju pogodan supstrat za ugradnju u lokus CRISPR. Konkretnije, pokazali su da dolazi do procesiranja dsDNA (23 bp) s 3' jednolančanim krajevima (15 nt s obje strane), te ugradnje procesirane DNA, u prisustvu egzonukleaza DnaQ ili ExoT, integracijskog kompleksa Cas1-Cas2 i proteina IHF (koji pripomaže ugradnju). Ugradnju „razmaknice“ detektirali su koristeći ranije razvijenu metodu *plasmid topology assay* gdje ugradnjom razmaknice u plazmid s lokusom CRISPR topološki oblik plazmida mijenja se iz superzavijenog u relaksirani (Nuñez i sur. 2015b).

Spomenute egzonukleaze prvi put su u ovom istraživanju proučene u kontekstu naivne adaptacije u uvjetima *in vivo*. Metodom *recombineering* konstruirao sam mutante za gene *dnaQ* te *exoT*, a uvođenjem delecija transdukcijom pripremio sam i trostrukog mutanta $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ s obzirom da sam htio ispitati ulogu te egzonukleaze i u mutantu kojem je ukinuta nukleazna aktivnost enzima RecBCD. Utjecaj ovih mutacija na naivnu adaptaciju diskutirat ću u poglavlju 5.2.1.

S druge strane, iako je helikaza holoenzima RecBCD izdvojena kao nužna, htio sam istražiti sudjeluju li druge domaćinske helikaze u tom procesu. Shiriaeva i suradnici (2022) proučili su utjecaj helikaze RecQ, koja je dijelom rekombinacijskog puta RecFOR, na

pripremljenu adaptaciju. Učinkovitost pripremljene adaptacije bila je jednaka divljem tipu u mutantu $\Delta recQ$, ali znatno snižena u dvostrukom mutantu $\Delta recQ \Delta recB$ gdje je ukinuta i helikazna aktivnost enzima RecBCD, u odnosu na *wt* i mutanta $\Delta recB$. Helikaza UvrD pak, koja sudjeluje u putovima popravka NER i MMR, prvi put je u ovom radu istražena u kontekstu adaptacije. Transdukcijom pomoću faga P1 pripremio sam mutanta $\Delta uvrD$. Ulogu helikaze UvrD u u naivnoj adaptaciji bilo je uputno istraživati i u odsustvu osnovne helikaze koja sudjeluje u tom procesu (RecBCD), tj. u mutantu $\Delta recB \Delta uvrD$, ali zbog vremenske ograničenosti pripremio sam samo mutanta $\Delta uvrD$ koji je i sam zahtijevao višestruke pokušaje uvođenja delecije. Pitanje je bi li uopće bilo moguće proučavati naivnu adaptaciju u dvostrukom mutantu $\Delta recB \Delta uvrD$ s obzirom na nisku vijabilnost koja je uočena ranije (Lestini i Michel 2007).

5.2.1. Egzonukleaze DnaQ i ExoT

Kod mutanta $\Delta exoT$ uočen je usporen rast na krutoj LB-podlozi pri 37 °C: za dobivanje pojedinačnih kolonija potrebno je stanice uzgajati 48 h. Egzonukleaza ExoT, poznata i kao RNaza T, sudjeluje i u sazrijevanju tRNA i 5S rRNA (Lovett 2011) pa je moguće da je uklanjanje tih funkcija uzrok usporenog rasta mutanta $\Delta exoT$. Trostruki mutant $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ također raste usporeno, no ipak brže od mutanta $\Delta exoT$. Usporeni rast tog soja svakako ne potječe od delecije gena *dnaQ* s obzirom da jednostrukog mutanta $\Delta dnaQ$ ne karakterizira taj fenotip. Iz literature je poznato kako delecija gena *recD* uzrokuje produljeni rast, a pretpostavlja se da je uzrok defekt u terminaciji replikacije zbog kojeg ti mutanti imaju poteškoće i u održavanju plazmida (Wendel i sur. 2014), što je objašnjeno u idućem odlomku.

U sva tri pripremljena soja uočena je ugradnja razmaknice tijekom trodnevnog uzgoja (od prve, druge ili tek u trećoj pasaži) s izuzetkom trostrukog mutanta $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ u kojem se ugradnja intenzivira od prve prema drugoj pasaži, ali izostaje u trećoj. Izostanak ugradnje u trostrukom mutantu ne čudi s obzirom da je utvrđen gubitak plazmida u trećoj pasaži. To je u skladu s ranije spomenutim istraživanjima u kojima je pokazana nestabilnost plazmida u mutantu $\Delta recD$ te dvostrukom mutantu $\Delta recB \Delta recC$ (Wendel i sur. 2014, Radovčić i sur. 2018). Autori predlažu kako nedostatak enzima RecBCD i njegove nukleazne aktivnosti onemogućuje razdvajanje plazmida tijekom završetka replikacije što rezultira

stvaranjem multimera koji se gube u jednoj stanici kćeri prilikom diobe stanica. U svim ostalim sojevima, intenzitet novougrađene razmaknice u pasaži „n“ veći je od onog u pasaži „n-1“ jer daljnjim rastom i pasažiranjem umnažaju se stanice u kojima se zbila ugradnja, uz samu ugradnju *de novo* koja se i dalje odvija.

Uzevši u obzir i kontrolne i eksperimentalne sojeve, adaptacija je bila najizraženija kod mutanta $\Delta exoT$ gdje se novougrađena razmaknica uočava u sve tri pasaže u snažnijem intenzitetu u odnosu na svoju kontrolu (BW25113 – *wt*). U mutantu $\Delta dnaQ$ novougrađena razmaknica primjetna je tek u trećoj pasaži, nešto slabijim intenzitetom negoli u kontroli (IIB1165). Iz ovih rezultata svakako se može zaključiti kako proučavane egzonukleaze nisu neizostavni dio adaptacijske mašinerije, no na temelju razlike u intenzitetu ugradnje između dvaju mutanata, te njihovih kontrola, može se pretpostaviti da DnaQ ima ulogu u procesiranju protorazmaknica. Shiriaeva i suradnici (2022) također su istražili učinkovitost adaptacije u mutantima $\Delta dnaQ$ i $\Delta exoT$ te dvostrukom mutantu $\Delta dnaQ \Delta exoT$, no predmet njihova istraživanja bila je pripremljena, a ne naivna adaptacija. U usporedbi s divljim tipom, u mutantima nisu uočili promjenu u duljini razmaknice ni u strukturi jednolančanih krajeva. Zabilježili su da je učinkovitost adaptacije u dvostrukom mutantu bila dvostruka manja, u usporedbi s divljim tipom, pa su zaključili da egzonukleaze DnaQ i ExoT zajednički doprinose optimalnoj ugradnji razmaknice tijekom pripremljene adaptacije, no nisu esencijalne. Za egzonukleazu DnaQ, to je i u skladu s našim rezultatima za naivnu adaptaciju. Naime, u bakteriji *E. coli* identificirano je trinaest 3'→5' egzonukleaza (Lovett 2011) pa je moguće da se uklanjanje pojedine egzonukleaze nadomješta aktivnošću druge. U uvjetima *in vitro* utvrđeno je da djelovanjem egzonukleaze DnaQ preferentno nastaju razmaknice duge 32 bp (uzmemo li u obzir da je citozin slijeda PAM dio ponavljanja), a djelovanjem ExoT protorazmaknice duljine 33 ili 34 bp (Ramachandran i sur. 2020). S obzirom da je u bakteriji *E. coli* 95% razmaknica duljine 32 bp (Savitskaya i sur. 2013), moguće je da DnaQ ima značajniju ulogu u naivnoj adaptaciji (Ramachandran i sur. 2020), a to bilo i u skladu s našim rezultatima koji pokazuju da je efikasnost naivne adaptacije veća u mutantu $\Delta exoT$, negoli u $\Delta dnaQ$, u usporedbi s njihovim kontrolama. U spomenutom eksperimentu *in vitro* ugradnja razmaknice nije detektirana u prisustvu treće istražene egzonukleaze (ExoI) što sugerira da ne sudjeluju sve domaćinske 3'→5' egzonukleaze u tom procesu, ili barem ne u istoj mjeri. Treba istaknuti i kako je u istraživanju Ramachandrana i suradnika (2020) korištena samo katalitička domena egzonukleaze DnaQ, a u bakteriji *E. coli* taj se enzim nalazi u sklopu DNA polimeraze III (McHenry 1988). Nije razjašnjeno na koji način bi egzonukleaza djelovala na

procesiranje jednolančanih krajeva DNA koji se ne nalaze u procesu replikacije. Moguće je da postoji povezanost između procesiranja dugih jednolančanih krajeva i duplikacije ponavljajuće regije tijekom ugradnje razmaknice (Kim i sur. 2020). U još jednom eksperimentu pokazano je kako dolazi do procesiranja i ugradnje protorazmaknica s dugim jednolančanim krajevima u prisustvu egzonukleaze DnaQ ili ExoT u uvjetima *in vitro* (Tang i sur. 2023). Fokus tog istraživanja bila je egzonukleaza iz porodice DnaQ u bakteriji *S. thermophilus* koja je prirodno fuzionirana s kompleksom Cas1-Cas2. Autori su predložili mehanizam kojim egzonukleaza DnaQ iz kompleksa, osim standardnog procesiranja jednolančanih krajeva, sudjeluje i u cijepanju slijeda PAM uoči druge transesterifikacijske reakcije ugradnje, a time i pravilnom orijentiranju razmaknice. Prema trenutnim saznanjima u bakteriji *E. coli*, protein Cas1 cijepa slijed PAM prilikom ugradnje (Wang i sur. 2015), no ovo istraživanje u bakteriji *S. thermophilus* još jednom potvrđuje važnost egzonukleaza iz porodice DnaQ u podtipu I-E sustava CRISPR-Cas.

Ostaje pitanje zašto je učinkovitost adaptacije veća u mutantu $\Delta exoT$ u usporedbi s kontrolom? Egzonukleaza T vjerojatno ne utječe na naivnu adaptaciju, a moguće je da je inhibira - kompeticijom za 3' jednolančane krajeve s egzonukleazom DnaQ ili nekom drugom 3'→5' egzonukleazom koja stvara bolji supstrat za ugradnju. Također, moguće je da sporiji rast mutanta $\Delta exoT$, što je vjerojatno posljedica sporije replikacije DNA, omogućava efikasniju ugradnju novih razmaknica.

Što se tiče trostrukog mutanta $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$, intenzitet ugradnje prve i druge pasaže bio je sličan mutantu $\Delta exoT$, no razmaknica se ne uočava u trećoj pasaži zbog gubitka plazmida, što je objašnjeno ranije. U usporedbi s mutantom $\Delta dnaQ$, učinkovitost adaptacije veća je u trostrukom mutantu, a preostaje odgovoriti zašto? Budući da u trostrukom mutantu nema nanošenja proteina RecA na 3' krajeve DNA, možebitno je veći udio onih fragmenata ssDNA koji su potencijalni supstrat adaptacijske mašinerije i egzonukleaza koje nisu DnaQ i RecBCD, a koje te fragmente mogu procesirati do optimalne duljine za ugradnju. Nadalje, helikazna aktivnost enzima RecBC znatno je sporija od helikazne aktivnosti holoenzima RecBCD (Taylor i Smith 2003) pa je moguće da preostaje više vremena da na razdvojene lance djeluju odgovarajuće 3'→5' egzonukleaze. Ipak, u istraživanju Radovčića i suradnika (2018) na drugoj egzonukleazi (ExoVII) nije uočena značajna razlika između učinkovitosti adaptacije u mutantu za gen *xseA* (kodira za podjedinicu XseA te egzonukleaze) te trostrukom mutantu $\Delta xseA \Delta recA \Delta recD$, izuzev treće pasaže u kojoj nema ugradnje u trostrukom mutantu zbog gubitka plazmida. Stoga, moguće je da uočena razlika u našem mutantu nije

značajna. Kod ostalih egzonukleaza u istom istraživanju nije primijećena ugradnja u mutantima s inaktiviranim *recA* i *recD*, no uzrok toga je nestabilnost plazmida u svim pasažama. Za mutanta $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta recD$ nisam proučio naivnu adaptaciju u kontroli ($\Delta recA \Delta recD$), no uspoređujući s već postojećim rezultatima za mutanta $\Delta recA \Delta recD$ (Radovčić i sur. 2018), nema značajne razlike što sugerira da egzonukleaza DnaQ nije esencijalna u naivnoj adaptaciji, a to je bio zaključak i eksperimenta s jednostrukim mutantom $\Delta dnaQ$ iako je tada ugradnja ipak bila snažnija u kontroli. Kombinacijom rezultata iz obaju mutanata može se reći da DnaQ sudjeluje u procesiranju protorazmaknice, no nema esencijalnu ulogu - vjerojatno jer u stanici postoje i druge 3'→5' egzonukleaze. U budućim istraživanjima trebalo bi razjasniti mehanizam koji omogućuje egzonukleazi DnaQ, podjedinici holoenzima DNA polimeraze III, da sudjeluje u procesiranju protorazmaknice. Također, bilo bi zanimljivo napraviti dvostrukog mutanta $\Delta dnaQ \Delta exoT$ te istražiti dolazi li do većeg učinka na ugradnju razmaknica u odsustvu obiju nukleaza.

5.2.2. Uloga helikaze UvrD

U mutantu $\Delta uvrD$ uočena je slaba ugradnja razmaknice samo u trećoj pasaži. Ugradnja je manja negoli u kontroli (IIB1165) u kojoj se razmaknica pojavljuje i u drugoj pasaži, jačim intenzitetom. Mutant $\Delta uvrD$ dosad nije proučavan u kontekstu adaptacije, no jest u procesima rekombinacije, popravka krivo sparenih baza i replikacije. Poznato je kako u uvjetima nadekspresije gena *uvrD* dolazi do smanjenja stope HR dok delecijom gena dolazi do njenog porasta. Dva su modela koja bi mogla objasniti taj fenomen (Centore i Sandler 2007). Prvi se temelji na istraživanju Veautea i suradnika (2005) koji su ustanovili da helikaza UvrD aktivno uklanja protein RecA s nukleofilamenata. Predložili su kako bi ta aktivnost mogla imati značajnu ulogu u progresiji replikacije tijekom kolapsa replikacijskih rašlji s obzirom da ponekad na mjestu kolapsa dolazi do nanošenja proteina RecA pomoću kompleksa RecFOR koje je toksično za stanicu. To je zaključeno na temelju opservacija u mutantu $\Delta rep \Delta uvrD$. Naime, u mutantu Δrep (kodira za helikazu Rep) replikacija je dvostruko sporija u odnosu na *wt*, a dvostruki mutant $\Delta rep \Delta uvrD$ sintetički je letalan. Međutim, letalnost se suprimira mutacijom gena *recF*, *recO* ili *recR*. Nadalje, u drugom istraživanju uočen je porast fokusa proteina RecA u mutantu $\Delta uvrD$ (Centore i Sandler 2007).

Imajući na umu da vezanjem proteina RecA, ssDNA prestaje biti potencijalnim supstratom kompleksa Cas1-Cas2 (Radovčić i sur. 2018), moguće je da je to razlog zašto u odsustvu helikaze UvrD se smanjuje učinkovitost naivne adaptacije. To bi se moglo potvrditi stvaranjem dvostrukog mutanta *recF uvrD* u kojem se očekuje porast ugradnje u odnosu na mutanta *uvrD*. Uklanjanje proteina RecA nije izolirani slučaj u kojem helikaza UvrD uklanja proteine s DNA. Primjerice, u popravku NER helikaza UvrD uklanja protein UvrC zajedno s izrezanom lezijom (Orren i sur. 1992).

Drugi model koji objašnjava povišenu rekombinacijsku stopu u mutantu $\Delta uv rD$ nešto je intuitivniji (Arthur i Lloyd 1980, Centore i Sandler 2007). Budući da protein UvrD sudjeluje u popravku NER, u njegovu odsustvu povećan je broj ureza i praznina u DNA, a time i rekombinacijskih događaja: Nailaskom replikacijskih rašlji na takve strukture može doći do nastanka DSB koji se popravljaju RecBCD-ovisnim putem HR. To možda i objašnjava zašto je dvostruki mutant $\Delta recB \Delta uv rD$ letalan.

Međutim, u tom slučaju enzim RecBCD bi u mutantu $\Delta uv rD$ stvarao više supstrata za adaptacijsku mašineriju svojom helikaznom i nukleaznom aktivnošću, a time bi se povećala i učinkovitost adaptacije što nisam uočio. Dva predložena modela međusobno se ne isključuju pa je povećana rekombinacijska stopa mutanta $\Delta uv rD$ možda rezultat obaju predloženih modela, a budući da se uklanjanje proteina RecA ne odvija u mutantu $\Delta uv rD$, uočena je smanjena ugradnja razmaknice. S obzirom na nisku vijabilnost soja $\Delta recB \Delta uv rD$, teško je istražiti direktnu ulogu helikaze UvrD u stvaranju supstrata za adaptacijsku mašineriju koja bi bila puno jasnija u odsustvu osnovne helikaze u tom procesu – RecBCD, ali kako sam već naveo, može se indirektno pokazati da je vezanje proteina RecA na jednolančane praznine pomoću kompleksa RecFOR, prilikom popravka kolabiranih replikacijskih rašlji, razlog smanjene ugradnje novih razmaknica. Druga opcija bila bi odrediti efikasnost naivne adaptacije kad je protein UvrD u suvišku (nadeksprimiran s plazmida). U tom slučaju očekujem da bi trebalo doći do smanjene rekombinacije i efikasnije naivne adaptacije. Buduća istraživanja su potrebna kako bi se uloga proteina UvrD bolje razjasnila.

6. Zaključak

Iz provedenog istraživanja proizlaze sljedeći zaključci:

- Zbog prezahtjevne duljine inserta nisam uspio konstruirati soj bakterije *E. coli* K-12 s kromosomski inducibilnim genima *cas1* i *cas2*.
- Uspješno sam konstruirao delecijske mutante bakterije *E. coli* K-12 za gene *dnaQ* i *exoT* te njihovu ispravnost potvrdio na genotipskoj i fenotipskoj razini.
- U mutantu $\Delta dnaQ$ uočio sam smanjenu uspješnost naivne adaptacije u usporedbi s kontrolom dok razlika nije uočena u mutantu $\Delta dnaQ \Delta recA \Delta dnaD$ što upućuje da egzonukleaza DnaQ djelomično sudjeluje u naivnoj adaptaciji, vjerojatno procesirajući jednolančane krajeve protorazmaknica.
- U mutantu $\Delta exoT$ zabilježio sam povećanu uspješnost naivne adaptacije u usporedbi s kontrolom što sugerira da egzonukleaza ExoT ili ne utječe na naivnu adaptaciju, ili je inhibira: moguće kompetirajući za jednolančane krajeve s egzonukleazama koje stvaraju bolje supstrate za kompleks Cas1-Cas2.
- U mutantu $\Delta uvrD$ ustanovljena je smanjena učinkovitost naivne adaptacije u usporedbi s kontrolom što ukazuje da helikaza UvrD potiče ugradnju razmaknice naivnom adaptacijom, vjerojatno uklanjajući protein RecA s jednolančane DNA tijekom kolapsa replikacijskih rašlji.

7. Literatura

- Amitai, G., Sorek, R. (2016): CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology** 14: 67–76.
- Arthur, H. M., Lloyd, R. G. (1980): Hyper-recombination in *uvrD* mutants of *Escherichia coli* K-12. **Molecular & General Genetics: MGG** 180(1): 185–191.
- Bachmann, B. J. (1996): Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. U: Neidhardt, F. i sur. (ur.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. ASM Press, str. 2460-2488
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science (New York, N.Y.)** 315(5819): 1709–1712.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S. D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology** 151: 2551–2561.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72(1–2): 248–254.
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuys, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., van der Oost, J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science (New York, N.Y.)** 321(5891): 960–964.
- Centore, R. C., Sandler, S. J. (2007): UvrD limits the number and intensities of RecA-green fluorescent protein structures in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology** 189(7): 2915–2920.
- Chowdhury, S., Carter, J., Rollins, M. F., Golden, S. M., Jackson, R. N., Hoffmann, C., ... Wiedenheft, B. (2017): Structure Reveals Mechanisms of Viral Suppressors that Intercept a CRISPR RNA-Guided Surveillance Complex. **Cell** 169: 47-57.e11.
- Churchill, J. J., Anderson, D. G., Kowalczykowski, S. C. (1999): The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of chi, resulting in constitutive recombination activation. **Genes & Development** 13: 901–911.

CRISPR Systems - Doudna Lab. https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems (pristupljeno 19.7.2023).

Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97(12): 6640–6645.

Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., Semenova, E. (2012): Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. **Nature Communications** 3: 945.

Dillingham, M. S., Kowalczykowski, S. C. (2008): RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 72: 642–671.

Dixon, D., Kowalczykowski, S. C. (1993): The recombination hotspot χ is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. **Cell** 73: 87–96.

Drabavicius, G., Sinkunas, T., Silanskas, A., Gasiunas, G., Venclovas, Č., Siksnys, V. (2018): DnaQ exonuclease-like domain of Cas2 promotes spacer integration in a type I-E CRISPR-Cas system. **EMBO Reports** 19(7).

Fokine, A., Rossmann, M. G. (2014): Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. **Bacteriophage** 4(2): e28281.

George, J. W., Stohr, B. A., Tomso, D. J., Kreuzer, K. N. (2001): The tight linkage between DNA replication and double-strand break repair in bacteriophage T4. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98: 8290–8297.

Hayes, R. P., Xiao, Y., Ding, F., van Erp, P. B. G., Rajashankar, K., Bailey, S., ... Ke, A. (2016): Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I–E Cascade from *E. coli*. **Nature** 530: 499–503.

Hille, F., Charpentier, E. (2016): CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 371: 20150496.

Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., Charpentier, E. (2018): The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell** 172: 1239–1259.

- Hsiao, Y.-Y., Fang, W.-H., Lee, C.-C., Chen, Y.-P., Yuan, H. S. (2014): Structural insights into DNA repair by RNase T--an exonuclease processing 3' end of structured DNA in repair pathways. **PLoS Biology** 12: e1001803.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology** 169: 5429–5433.
- Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J., Bolt, E. L. (2015): Different genome stability proteins underpin primed and naive adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. **Nucleic Acids Research** 43(22): 10821–10830.
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W., Schouls, L. M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology** 43: 1565–1575.
- Jiang, F., Doudna, J. A. (2017): CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. **Annual Review of Biophysics** 46(1): 505–529.
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., ... Brouns, S. J. J. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. **Nature Structural & Molecular Biology** 18: 529–536.
- Killelea, T., Dimude, J. U., He, L., Stewart, A. L., Kemm, F. E., Radovčić, M., Ivančić-Baće, I., Rudolph, C. J., Bolt, E. L. (2023): Cas1–Cas2 physically and functionally interacts with DnaK to modulate CRISPR Adaptation. **Nucleic Acids Research** 51(13): 6914–6926.
- Kim, S., Loeff, L., Colombo, S., Jergic, S., Brouns, S. J. J., Joo, C. (2020): Selective loading and processing of pre-spacers for precise CRISPR adaptation. **Nature** 579: 141–145.
- Lestini, R., Michel, B. (2007): UvrD controls the access of recombination proteins to blocked replication forks. **The EMBO Journal** 26(16): 3804–3814.
- Levy, A., Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., Amitai, G., Edgar, R., Qimron, U., Sorek, R. (2015): CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. **Nature** 520(7548): 505–510.
- Lovett, S. T. (2011): The DNA exonucleases of *Escherichia coli*. **Ecosal Plus** 4(2).
- Majsec, K., Bolt, E. L., Ivančić-Baće, I. (2016): Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. **BMC Microbiology** 16: 28.

- Mann, N. H. (2005): The Third Age of Phage. **PLoS Biology** 3: e182.
- Markulin, D. (2020): CRISPR-Cas in *Escherichia coli*: regulation by H-NS, LeuO and temperature. **Periodicum Biologorum** 121–122(3–4): 155–160.
- McHenry, C. S. (1988): DNA Polymerase III Holoenzyme of *Escherichia coli*. **Annual Review of Biochemistry** 57(1): 519–550.
- Mitić, D., Bolt, E. L., Ivančić-Baće, I. (2023): CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli*. **Bioscience Reports** 43(3).
- Mitić, D., Radovčić, M., Markulin, D., Ivančić-Baće, I. (2020): StpA represses CRISPR-Cas immunity in H-NS deficient *Escherichia coli*. **Biochimie** 174: 136–143.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., Rodriguez-Valera, F. (1993): Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites. **Molecular Microbiology** 9: 613–621.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005): Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Journal of Molecular Evolution** 60: 174–182.
- Mosberg, J. A., Lajoie, M. J., Church, G. M. (2010): Lambda Red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. **Genetics** 186(3): 791–799.
- Nuñez, J. K., Lee, A. S. Y., Engelman, A., Doudna, J. A. (2015a): Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. **Nature** 519(7542): 193–198.
- Nuñez, J. K., Harrington, L. B., Kranzusch, P. J., Engelman, A. N., Doudna, J. A. (2015b): Foreign DNA capture during CRISPR–Cas adaptive immunity. **Nature** 527(7579): 535–538.
- Nuñez, J. K., Bai, L., Harrington, L. B., Hinder, T. L., Doudna, J. A. (2016): CRISPR immunological memory requires a host factor for specificity. **Molecular Cell** 62(6): 824–833.
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., Doudna, J. A. (2014): Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. **Nature Structural & Molecular Biology** 21(6): 528–534.

- Orren, D.K., Selby, C.P., Hearst, J.E., Sancar, A. (1992): Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. **The Journal of biological chemistry** 267(2): 780-788.
- Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G. (2005): CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology** 151: 653–663.
- Pul, Ü., Wurm, R., Arslan, Z., Geißen, R., Hofmann, N., Wagner, R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR- *cas* promoters and their silencing by H-NS. **Molecular Microbiology** 75: 1495–1512.
- Radovčić, M., Killelea, T., Savitskaya, E., Wettstein, L., Bolt, E. L., Ivančić-Baće, I. (2018): CRISPR–Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. **Nucleic Acids Research** 46(19): 10173-10183.
- Ramachandran, A., Summerville, L., Learn, B. A., DeBell, L., Bailey, S. (2020): Processing and integration of functionally oriented prespacers in the *Escherichia coli* CRISPR system depends on bacterial host exonucleases. **Journal of Biological Chemistry** 295: 3403–3414.
- Sabri, S., Steen, J. A., Bongers, M., Nielsen, L. K., Vickers, C. E. (2013): Knock-in/Knock-out (KIKO) vectors for rapid integration of large DNA sequences, including whole metabolic pathways, onto the *Escherichia coli* chromosome at well-characterised loci. **Microbial Cell Factories** 12: 60.
- Savitskaya, E., Semenova, E., Dedkov, V., Metlitskaya, A., Severinov, K. (2013): High-throughput analysis of type I-E CRISPR/Cas spacer acquisition in *E. coli*. **RNA Biology** 10(5): 716–725.
- Schröder, O., Wagner, R. (2002): The bacterial regulatory protein H-NS--A versatile modulator of nucleic acid structures. **Biological Chemistry** 383(6): 945-960.
- Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G., Court, D. L. (2009): Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. **Nature Protocols** 4(2): 206–223.
- Sharma, R., Rao, D. N. (2012): Functional characterization of UvrD helicases from *Haemophilus influenzae* and *Helicobacter pylori*. **FEBS Journal** 279: 2134–2155.

Shiriaeva, A. A., Kuznedelov, K., Fedorov, I., Musharova, O., Khvostikov, T., Tsoy, Y., Kurilovich, E., Smith, G. R., Semenova, E., Severinov, K. (2022): Host nucleases generate prespacers for primed adaptation in the *E. coli* type I-E CRISPR-Cas system. **Science Advances** 8(47).

Smith, G. R. (2001): Chi Sequences. U: Brenner, S., Miller, J. H. (ur.) Encyclopedia of Genetics. Elsevier, str. 325-328.

Sternberg, S. H., Richter, H., Charpentier, E., Qimron, U. (2016): Adaptation in CRISPR-Cas Systems. **Molecular Cell** 61: 797–808.

Stringer, A. M., Singh, N., Yermakova, A., Petrone, B. L., Amarasinghe, J. J., Reyes-Diaz, L., Mantis, N. J., Wade, J. T. (2012): FRUIT, a scar-free system for targeted chromosomal Mutagenesis, Epitope tagging, and promoter replacement in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **PLoS One** 7(9): e44841.

Taylor, A. F., Smith, G. R. (2003): RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. **Nature** 423(6942): 889–893.

Thomas, C. M. (2014): Plasmid Incompatibility. U: Bell, E. (ur.) Molecular Life Sciences. New York, Springer, str. 1-3.

Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Fabre, F., Petit, M.-A. (2005): UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. **The EMBO Journal** 24(1): 180–189.

Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M., Wang, Y. (2015): Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. **Cell** 163: 840–853.

Wang, T., Sun, H.-L., Cheng, F., Zhang, X.-E., Bi, L., Jiang, T. (2013): Recognition and processing of double-stranded DNA by ExoX, a distributive 3'–5' exonuclease. **Nucleic Acids Research** 41: 7556–7565.

Washburn, B. K., Kushner, S. R. (1991): Construction and analysis of deletions in the structural gene (*uvrD*) for DNA helicase II of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 173: 2569–2575.

Wendel, B. M., Courcelle, C. T., Courcelle, J. (2014): Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111(46): 16454–16459.

Westra, E. R., Pul, Ü., Heidrich, N., Jore, M. M., Lundgren, M., Stratmann, T., Wurm, R., Raine, A., Mescher, M., Van Heereveld, L., Mastop, M., Wagner, E. G. H., Schnetz, K., Van Der Oost, J., Wagner, R., Brouns, S. J. J. (2010): H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO: LeuO activates CRISPR-based immunity. **Molecular Microbiology** 77(6): 1380–1393.

Wong, Q. N. Y. (2005): Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research** 33(6): e59.

Xue, C., Sashital, D. G. (2019): Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in Enterobacteriaceae. **EcoSal Plus** 8(2).

Yang, C.-D., Chen, Y.-H., Huang, H.-Y., Huang, H.-D., Tseng, C.-P. (2014): CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication. **Molecular Microbiology** 92: 1072–1091.

Yosef, I., Goren, M. G., Qimron, U. (2012): Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research** 40: 5569–5576.

Yosef, I., Shitrit, D., Goren, M. G., Burstein, D., Pupko, T., Qimron, U. (2013): DNA motifs determining the efficiency of adaptation into the *Escherichia coli* CRISPR array. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 110(35): 14396–14401.

8. Životopis

Tomislav Mamić rođen je 10. svibnja 1999. u Žepču, BiH. Srednjoškolsko obrazovanje stječe u Prvoj sušačkoj hrvatskoj gimnaziji u Rijeci kao učenik generacije. Godine 2021. završava preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu *summa cum laude*. Iste godine upisuje diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija odrađuje dvije laboratorijske stručne prakse na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nenada Malenice. Predaje na javnom seminaru „BioStudoLogije – Velika otkrića u molekularnoj biologiji“ 2021. godine te djeluje kao demonstrator na kolegiju molekularna genetika u akademskoj godini 2022./2023.

Dobitnik je dekanove nagrade za izuzetan uspjeh u preddiplomskom studiju te rektorove nagrade za individualni znanstveni rad s naslovom „Uređivanje gena *VvPDS* vinove loze (*Vitis vinifera* L.) sustavom CRISPR-Cas9 korištenjem vakuumske agroinfiltracije i biolistike“ u akademskoj godini 2022./2023.

Trostruki je dobitnik Državne stipendije u STEM područjima znanosti tijekom preddiplomskog studija, te dvostruki dobitnik Stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu tijekom diplomskog studija.