Mehanizam temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije Escherichia coli

Čulo, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:284826

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anja Čulo

Mehanizam temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće i doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Najprije se želim zahvaliti mentoricama izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće i doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na ukazanom povjerenju za izradu ovog rada te na strpljivosti i podršci.

Zahvaljujem se dr. sc. Mariji Matković i Marinu Macuki na pomoći tijekom izvođenja eksperimenata.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci koju su mi pružali tijekom čitavog trajanja studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Mehanizam temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*

Anja Čulo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas je važan mehanizam obrane prokariota od pokretnih genetičkih elementa. Sastoji se od ponavljajućih sekvenci DNA između kojih se nalaze razmaknice, koje potječu iz plazmida ili faga, te gena *cas*, koji su odgovorni za različite korake obrane. Transkripcijom i procesiranjem lokusa CRISPR nastaju kratke crRNA koje u kompleksu s proteinima Cas prepoznaju stranu DNA na principu komplementarnosti pri čemu nastaje R-omča - hibrid DNA i RNA i istisnutog jednog lanaca DNA. Protein Cas3 sudjeluje u zadnjoj fazi obrane, u vezanju na R-omču odakle započinje cijepati stranu DNA. Aktivnost sustava CRISPR-Cas ovisi o proteinima H-NS, koji je represor gena *cas* i lokusa CRISPR, HtpG, koji je neophodan za održavanje funkcionalne razine proteina Cas3, i temperaturi. Pri višoj temperaturi od 37 °C uočen je gubitak aktivnosti proteina Cas3. U ovom radu istraživan je razlog te neaktivnosti. Određivanjem sekundarne strukture pročišćenog proteina Cas3 na različitim temperaturama, uočeno je da pri temperaturi od 35 °C dolazi do konformacijske promjene u helikoidalnoj regiji proteina Cas3. Zasađivanjem faga λ potvrdili smo da je protein Cas3 izgubio aktivnost na 35 °C *in vivo*. Promijenjeni protein Cas3 na 37 °C potiče povećanu replikaciju plazmida tipa ColE1, neovisno o prisutnosti proteina H-NS i/ili HtpG.

(46 stranica, 13 slika, 11 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, Cas3, temperatura, H-NS, HtpG, ColE1

Voditeljice: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof. i dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.
dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.
dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.
dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.
zamjena: dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

Rad prihvaćen: 16. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

The mechanism of temperature sensitivity of the Cas3 protein in *Escherichia coli*

Anja Čulo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR-Cas system is a significant defense mechanism of prokaryotes against mobile genetic elements. It is composed of DNA repeats, that flank plasmid or phage derived spacer sequences, and *cas* genes, which are responsible for different steps of defense. Short crRNAs are transcribed from the CRISPR array. After processing, they are incorporated into protein complexes, where they guide them to the invading DNA. crRNA interference generates R-loops, RNA-DNA hybrids that contain a displaced ssDNA loop. Cas3 protein is involved in the last phase of defense in which it degrades displaced ssDNA. CRISPR-Cas system activity depends on H-NS protein, which is a repressor of *cas* genes and CRISPR array, HtpG protein, which is essential for maintaining functional levels of Cas3, and temperature. Incubation at 37 °C leads to reduced activity of Cas3 protein. In this work we investigated the causes of this activity reduction. By monitoring secondary structure of purified Cas3 at different temperatures, we observed a conformational change in the helical region at 35 °C. Phage sensitivity assay confirmed Cas3 activity reduction at 35 °C *in vivo*. Cas3 at 37 °C stimulates runaway replication of ColE1 plasmids, which does not depend on the presence of H-NS and/or HtpG.

(46 pages, 13 figures, 11 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: CRISPR-Cas, Cas3, temperature, H-NS, HtpG, ColE1

Supervisors: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof. and Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.
Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.
Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.
Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.
Substitution: Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: February 16, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
   1.1. Sustav CRISPR-Cas ... 1
   1.2. Vrste sustava CRISPR-Cas ... 2
   1.3. Replikacija plazmida ColE1 ... 6
   1.4. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E ... 7
      1.4.1. H-NS ... 7
      1.4.2. LeuO ... 7
      1.4.3. HtpG ... 7
   1.5. Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja ... 8
2. MATERIJALI I METODE ... 10
   2.1. Materijali ... 10
      2.1.1. Sojevi ... 10
      2.1.2. Plazmidi ... 10
   2.2. Metode ... 11
      2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva ... 11
      2.2.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom ... 11
      2.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) ... 12
      2.2.4. Prijenos proteina na membranu (*Western blot*) ... 13
      2.2.5. Spektrometrija masa ... 14
         2.2.5.1. Digestija proteina u gelu ... 14
         2.2.5.2. Ekstrakcija peptida iz gela ... 14
         2.2.5.3. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C_4 ... 15
         2.2.5.4. Analiza peptida spektrometrom masa ... 15
         2.2.5.5. Obrada podataka – identifikacija proteina ... 16
      2.2.6. Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom ... 16
      2.2.7. Diferencijalna pretražna fluorimetrija ... 17
      2.2.8. Diferencijalna pretražna kalorimetrija ... 17
      2.2.9. Cirkularni dikroizam ... 17
      2.2.10. Transformacija bakterija plazmidnom DNA ... 18
      2.2.11. Određivanje zasađivanja faga pri različitim temperaturama inkubacije ... 19
      2.2.12. Izolacija plazmida i test vijabilnosti ... 19
      2.2.13. Statistička analiza ... 19
3. REZULTATI ... 21
   3.1. Pročišćavanje proteina Cas3 ... 21
   3.2. Promjene konformacije pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vitro* ... 27
   3.3. Promjena aktivnosti proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vivo* ... 31
   3.4. Utjecaj proteina H-NS i HtpG na stabilnost proteina Cas3 *in vivo* ... 32
4. RASPRAVA ... 36

5. ZAKLJUČAK 40
6. LITERATURA 41

POPIS KRATICA

CRISPR	od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
Cas	od engl. *CRISPR-associated genes*
PAM	od engl. *protospacer adjacent motif*
crRNA	CRISPR RNA
Cascade	od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*
tracrRNA	od engl. *trans-activating CRISPR RNA*
IGLB	od engl. *intergenic region ygcL-ygcB*
H-NS	od engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein*
HtpG	od engl. *high-temperature protein G*
Hsp83	od engl. *heat shock protein 83*
LB	od engl. *Luria broth*
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
Ni-NTA	nikal-nitrilotrioctena kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
reH_2O	redestilirana voda
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
AA/Bis	akrilamid/bisakrilamid
APS	amonijev persulfat
TEMED	tetrametiletilendiamin
CBB	*Commassie brilliant blue*
TFA	trifluoroctena kiselina
CHCA	α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
TOF	od engl. *time of flight*
NCBI	od engl. *National Center for Biotechnology Information database*
PFU	od engl. *plaque-forming units*
DSF	diferencijalna pretražna fluorimetrija
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
MRE	od engl. *mean residue ellipticity*
SUMO	od engl. *small ubiquitin related modifier*
MBP	od engl. *maltose-binding protein*
CTD	C-terminalna domena

1. UVOD

1.1. Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated genes*) je važan mehanizam obrane kojim se prokarioti brane od virusa, odnosno napada stranom DNA koja se prenosi horizontalnim prijenosom i RNA (Marraffini i Sontheimer 2008; Barrangou i sur. 2007; Brouns i sur. 2008; Hale i sur. 2009). Nalazi se u otprilike 90% arhejskih i 40% bakterijskih genoma (Marraffini i Sontheimer 2010). Sastoji se od lokusa CRISPR i pridruženih gena *cas* koji se nalaze u neposrednoj blizini lokusa. Lokus CRISPR se sastoji od dvije do 250 ponavljajućih palindromskih sekvenci DNA (engl. *repeats*), veličine između 25 i 70 parova baza, između koji se nalaze razmaknice (engl. *spacers*) slične veličine. Razmaknice potječu iz plazmida ili faga (Mojica i sur. 2005; Heidelberg i sur. 2009) i dodavanjem novih razmaknica u postojeći lokus CRISPR stječe se dodatna otpornost na invaziju nekim fagom ili plazmidom (Barrangou i sur. 2007). Ispred niza ponavljajućih sekvenci DNA i razmaknica se obično nalazi vodeća (engl. *leader*) sekvenca, dužine nekoliko stotina parova baza, koja je bogata nukleotidima A i T. Vodeće sekvence različitih vrsta bakterija nisu homologne (Jansen i sur. 2002). Unutar njih se nalaze promotori odgovorni za prepisivanje lokusa CRISPR (Pougach i sur. 2010). Geni *cas* obično se nalaze u blizini lokusa CRISPR. Njihovom ekspresijom dolazi do nastanka proteina Cas, koji su odgovorni za različite korake obrane bakterija. Analizom sekvenci proteina Cas utvrđeno je da oni često sadrže helikazne i nukleazne proteinske domene te domene pomoću kojih vežu molekule DNA ili RNA (Makarova i sur. 2006).

Imunost/obrana posredovana sustavom CRISPR-Cas odvija se u tri različite faze: adaptacije, ekspresije i interferencije. Faza adaptacije uključuje stvaranje nove razmaknice tako što se fragment strane DNA (engl. *protospacer*), koji potječe od plazmida ili faga, procesira i ugrađuje u lokus CRISPR. Kako bi se mogla ugraditi nova razmaknica, i kasnije prepoznati strana DNA, u stranoj DNA se mora nalazit kratka sekvenca PAM (od engl. *protospacer adjacent motif*) koja se ne ugrađuje u lokus CRISPR. Na taj način, prisutnost sekvence PAM omogućuje bakteriji razlikovanje vlastite od strane DNA (Mojica i sur. 2009). Tijekom faze ekspresije dolazi do prepisivanja lokusa CRISPR čime nastaje dugački transkript - pre-crRNA. Cijepanjem duge pre-crRNA nastaju kratke molekule CRISPR RNA (crRNAs). U fazi

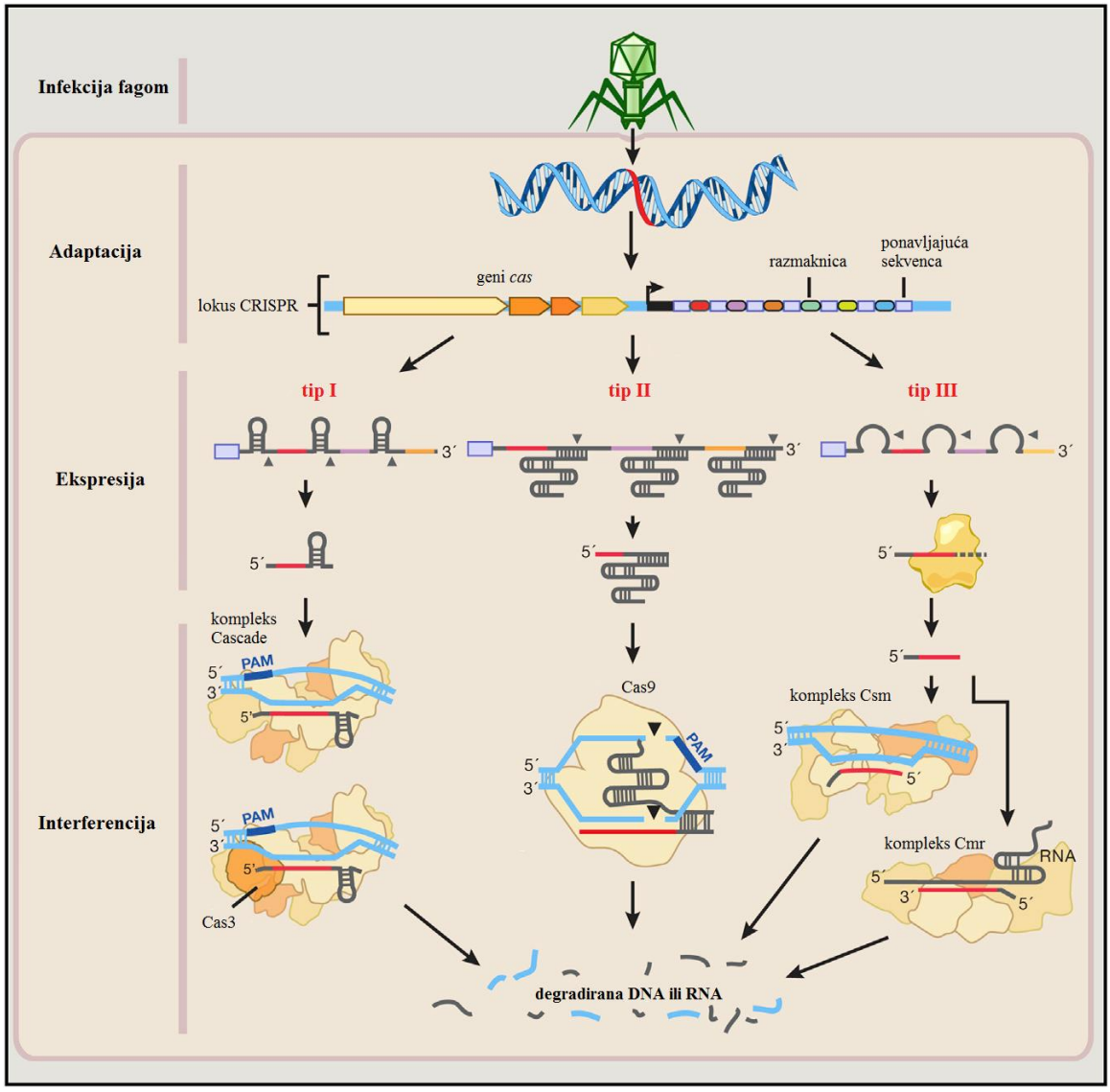
interferencije zrele molekule crRNA prepoznaju strane nukleinske kiseline te na njih usmjeravaju proteine Cas koji ih zatim cijepaju i tako štite stanicu od infekcije (Makarova i sur. 2015).

1.2. Vrste sustava CRISPR-Cas

Između različitih vrsta bakterija uočene su velike razlike u broju ponavljanja, sastavu i dužini lokusa CRISPR, dužini vodeće sekvence te u broju proteina Cas. Proteini Cas su podijeljeni u 45 porodica, koje su svrstane u osam podtipova. Podtipovi su nazvani prema vrstama u kojima se pojavljuju (primjerice, tip E je nazvan po bakteriji *Escherichia coli*) (Haft i sur. 2005). Kako su slični geni *cas* pronađeni kod vrsta koje su evolucijski jako udaljene, to ukazuje na horizontalan prijenos tih gena između različitih vrsta mikroorganizama (Kunin i sur. 2007).

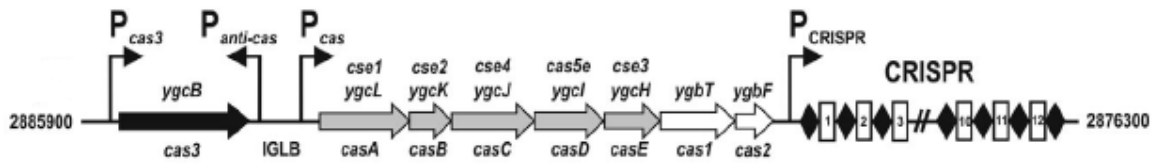
Prema starijoj klasifikaciji, tri su glavna tipa sustava CRISPR-Cas: tipovi I, II i III. U svakom od ta tri tipa je prisutan jedinstven protein Cas: Cas3 u tipu I, Cas9 u tipu II i Cas10 u tipu III (Makarova i sur. 2011). Sustavi CRISPR-Cas tipa I sadrže različit broj gena i različitu organizaciju operona, ali obavezno imaju gen *cas3*. Podijeljeni su u sedam podtipova. Transkript pre-crRNA se cijepa pomoću ribonukleaze CasE, čime nastaju kratke zrele crRNA. Zrela crRNA uz pomoć kompleksa proteina Cascade (od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) prepoznaje i veže stranu DNA na principu komplementarnosti. Protein Cas3 je zahvaljujući svojim helikaznim i endonukleaznim domenama zadužen za cijepanje strane DNA (Hsu i sur. 2014, Makarova i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa II su podijeljeni u tri podtipa. Oni su najjednostavniji što se tiče broja gena. Svi sadrže gene *cas9*, *cas1* i *cas2*, a većina lokusa kodira i tracrRNA (od engl. *trans-activating CRISPR RNA*) koja je djelomično komplementarna ponavljajućim sekvencama koje se nalaze u lokusu CRISPR. tracrRNA se veže na ponavljajuće sekvence u transkriptu pre-crRNA, a zatim ih RNaza III cijepa i obrađuje. Hibrid zrele crRNA i tracrRNA usmjerava protein Cas9 do ciljne DNA. Cas9 je protein koji se sastoji od više domena i koji cijepa stranu DNA, ali također sudjeluje i u fazi adaptacije. On je endonukleaza koju je moguće usmjeriti na bilo koje mjesto u genomu pomoću kratke RNA. Stoga se on danas često koristi u genetičkom inženjerstvu za stvaranje jednolančanih ili dvolančanih lomova DNA te za kontrolu transkripcije, epigenetičku modulaciju, obilježavanje DNA ili praćenje dinamičnih staničnih procesa (Hsu i sur. 2014; Makarova i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa III sadrže gen *cas10*, čiji produkt čini najveću podjedinicu kompleksa crRNA

i efektorskih proteina. Oni su podijeljeni u dva podtipa, ovisno o tome čine li malu podjedinicu proteini Csm ili Cmr. Oba podtipa mogu cijepati stranu DNA ili RNA (Hsu i sur. 2014, Makarova i sur. 2015). Na slici 1 su shematski prikazana sva tri tipa sustava CRISPR-Cas. Makarova i suradnici su 2015. godine sustave CRISPR-Cas podijelili u dva razreda. Razredu 1 pripadaju sustavi koji imaju komplekse crRNA i efektora koji se sastoje od više proteina. Tom razredu pripadaju tipovi I i III. Razredu 2 pripadaju sustavi u kojima jedan protein obavlja sve funkcije efektora. Sustav II, zahvaljujući proteinu Cas9, pripada tom sustavu. Pronađeni su i dokazi o nova dva tipa sustava CRISPR-Cas: tip IV, koji pripada razredu 1, i tip V, koji pripada razredu 2 (Makarova i sur. 2015).



Slika 1. Tipovi sustava CRISPR-Cas (preuzeto i prilagođeno prema: Hsu i sur. 2014). Tri su glavna tipa sustava CRISPR-Cas: tipovi I, II i III. Razlikuju se prema načinu stvaranja crRNA i efektorskim proteinima. U svakom od ta tri tipa je prisutan jedinstven protein Cas: Cas3 u tipu I, Cas9 u tipu II i Cas10 u tipu III. Sustav CRISPR-Cas tipa III može cijepati DNA i RNA.

Bakterija *Escherichia coli* K12 sadrži sustav CRISPR-Cas tipa I-E koji se sastoji od osam gena *cas*: *cas1*, *cas2*, *cas3* i *casABCDE* i lokusa CRISPR I koji se sastoji od 13 ponavljajućih sekvenci i 12 razmaknica. Regija između *cas3* i *casA* naziva se IGLB (od engl. *intergenic region ygcL-ygcB).* Građa lokusa CRISPR-Cas je prikazana na slici 2. U genomu se nalaze još dva dodatna lokusa CRISPR, CRISPR II i CRISPR III (Brouns i sur. 2008; Diez-Villaseñor i sur. 2010).

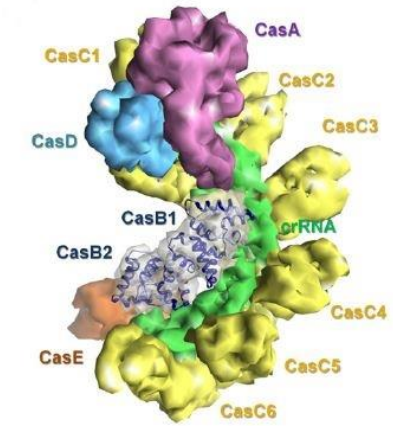


Slika 2. Građa lokusa CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* K12 (preuzeto i prilagođeno prema: Brouns i sur. 2008).

Brouns i suradnici su 2008. godine u odvojenim eksperimentima obilježili svaki protein Cas na N- ili C-kraju te su ih pročistili afinitetnom kromatografijom, što je dovelo do otkrivanja kompleksa Cascade koji se sastoji od pet proteina: CasA, CasB, CasC, CasD i CasE. On je važan za sazrijevanje molekula crRNA iz pre-crRNA (Brouns i sur. 2008). Sastoji se od ukupno 11 podjedinica: po jedna od CasA, CasD i CasE, dvije od CasB, i šest od CasC. Veličina kompleksa Cascade je 405 kDa. Podjedinice CasC tvore trup kompleksa. Za njihovo stabilno slaganje potrebna je prisutnost proteina CasD i CasE te crRNA (Jore i sur. 2011). Na slici 3 je prikazana građa kompleksa Cascade. Protein CasE je endoribonukleaza koja cijepa pre-crRNA, za što joj nisu potrebne druge komponente kompleksa Cascade. U soju Δ*casE* nisu pronađene kratke molekule crRNA, nego samo dugačke molekule pre-crRNA. Kako bi se smanjila osjetljivost bakterija na infekciju fagom λ, nužna je prisutnost kompleksa Cascade i proteina Cas3, ali ne i proteina Cas1 i Cas2 (Brouns i sur. 2008).

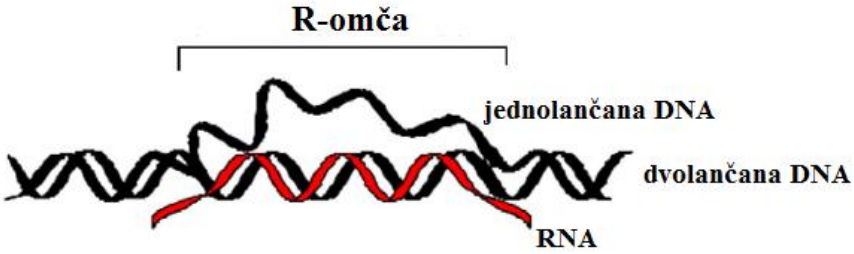
Kompleks Cascade, uz pomoću crRNA, prepoznaje i veže ciljnu DNA, a zatim dovodi Cas3 koji ju cijepa (faza interferencije). crRNA usmjerava kompleks Cascade prema ciljnoj dvolančanoj DNA tako što se sparuje s komplementarnim lancem DNA i istiskuje nekomplementarni lanac čime nastaje struktura koja se naziva R-omča. R-omča se sastoji od hibrida DNA i RNA i istisnutog jednog lanaca DNA (Jore i sur. 2011), kao što je prikazano na slici 4. Prilikom prepoznavanja strane DNA ne dolazi do potrošnje ATP-a, nego je energija za taj proces pohranjena unutar superzavijene DNA. Kompleks Cascade učinkovito pronalazi

ciljnu sekvencu unutar negativno superzavijene DNA, ali samo ako je prisutna sekvenca PAM. Nakon pronalaska ciljne sekvence, kompleks Cascade dovodi protein Cas3, vjerojatno putem fizičke interakcije, koji zatim cijepa stranu DNA (Westra i sur. 2012). Protein CasA iz kompleksa Cascade pomaže proteinu Cas3 prilikom prepoznavanja mjesta cijepanja na ciljnoj DNA te usmjerava Cas3 uz sekvencu PAM kako bi osigurao cijepanje (Hochstrasser i sur. 2014). Cas3 na N-kraju sadrži nukleaznu domenu HD (histidin-aspartat), a na C-kraju helikaznu domenu (*superfamily 2*) (Makarova i sur. 2006). Nukleazna domena HD je zaslužna za cijepanje jednolančane DNA, a helikazna domena za ATP-ovisno odmatanje dvolančane DNA i dupleksa DNA-RNA (Sinkunas i sur. 2011). Cas3 ne prepoznaje specifične sekvence DNA ili RNA te mu za nukleaznu i helikaznu aktivnost nije potreban kompleks Cascade. Howard i suradnici su dokazali da pročišćeni Cas3 iz bakterije *E. coli* i arheje *Methanothermobacter thermautotrophicus* stvara i procesira R-omče *in vitro*, djelujući pritom kao ATP-ovisna helikaza i ATP-neovisna anilaza (Howard i sur. 2011).



Slika 3. Građa kompleksa Cascade (preuzeto i prilagođeno prema: Nam i sur. 2012). CasA je obilježen ljubičastom, CasC žutom, CasD plavom, a CasE narančastom bojom. Podjedinice CasB su obilježene sivom bojom te su prikazane α-zavojnice. crRNA je obilježena zelenom bojom.

Proteini Cas1 i Cas2 su nukleaze koje pokazuju najveću evolucijsku očuvanost između različitih vrsta (Makarova i sur. 2006). Njihova prisutnost je nužna za fazu adaptacije. Cas1 cijepa dvolančanu i jednolančanu DNA te RNA (Babu i sur. 2011). Cas1 i Cas2 tvore kompleks *in vivo* koji je važan za ugradnju novih razmaknica. Cas2 vjerojatno funkcionira kao protein adaptor, jer se mutacijom njegovog aktivnog mjesta ne gubi sposobnost ugradnje nove razmaknice (Nuñez i sur. 2014).



Slika 4. Građa R-omče (preuzeto i prilagođeno prema: Ivančić-Baće i sur. 2012). R-omča se sastoji od hibrida DNA i RNA i istisnutog jednog lanaca DNA.

1.3. Replikacija plazmida ColE1

R-omče također nastaju prilikom nekoliko bioloških procesa, poput transkripcije i replikacije DNA. Pojavljuju se i prilikom replikacije plazmida tipa ColE1. Transkript RNAII, koji se prepisuje s plazmida i služi kao početnica za sintezu vodećeg lanca DNA tijekom replikacije, stvara R-omču unutar ishodišta replikacije. Enzim RNazaHI procesira RNAII unutar R-omče i tako osigurava preciznu inicijaciju replikacije (Itoh i Tomizawa 1980). Replikacija plazmida tipa ColE1 odvija se i u stanicama kojima nedostaje RNazaHI tako što se RNAII veže s drugim dijelovima plazmida, a ne samo s ishodištem replikacije (Dasgupta i sur. 1987). U takvim stanicama dolazi i do nastanka konkatemera plazmida (Subia i Kogoma 1986). Kontrola replikacije plazmida ColE1 se odvija na nekoliko načina. Transkript RNAI, koji se također prepisuje s plazmida, je komplementaran 5'-kraju RNAII. On sprječava stvaranje R-omče i na taj način smanjuje broj kopija plazmida. Protein Rop stabilizira dupleks koji stvaraju RNAI i RNAII (Cesareni i sur. 1982). U komercijalnim plazmidima tipa ColE1 (poput pUC) uklonjen je gen *rom*, koji kodira protein Rop, kako bi se povećao broj kopija. Helikaza RecG smanjuje broj kopija plazmida u stanicama *E. coli* tako što razmata R-omče (Vincent i sur. 1996). Ivančić-Baće i suradnici su 2013. pokazali da protein Cas3 potiče replikaciju plazmida tipa ColE1 (pUC19). Naime, izmjerena koncentracija izoliranih plazmida s genom *cas3* je četiri puta veća nego praznog vektora, što je neočekivano budući da Cas3 cijepa R-omče *in vitro* i prinos plazmida bi trebao biti manji. Za ovaj efekt potrebna je ATPazna/helikazna aktivnost proteina Cas3, dok nukleazna aktivnost nije. Interesantno, ovaj učinak proteina Cas3 ne ovisi o prisutnosti kompleksa Cascade. Smatra se da Cas3 zahvaljujući svojoj helikaznoj aktivnosti, oslobađa RNAII od RNAI te na taj način potiče replikaciju plazmida (Ivančić-Baće i sur. 2013).

1.4. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E

Na aktivnost sustava CRISPR-Cas tipa I-E utječe i nekoliko proteina domaćina: H-NS (od engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein*), LeuO i HtpG (od engl. *high-temperature protein G*).

1.4.1. H-NS

Protein H-NS sudjeluje u organizaciji kromosomske DNA i ponaša se kao represor u utišavanju gena. Postoji u obliku dimera, ali može stvarati i oligomere višeg reda. Djeluje na dva načina: učvršćivanjem DNA (engl. *DNA stiffening*) ili stvaranjem mostova DNA-protein-DNA (Liu i sur. 2010). Protein H-NS sprječava transkripciju mnogih gena u Gram-negativnim bakterijama tako što se veže se na sekvence DNA bogate nukleotidima A i T, poput sekvence IGLB koja se nalazi između gena *cas3* i *casA* i unutar koje se nalazi promotor P*cas* (Pul i sur. 2010). Na taj način je H-NS negativan regulator transkripcije lokusa CRISPR i svih gena *cas* (Majsec i sur. 2016). Stoga stanice divljeg tipa *E. coli* K12 koje sadrže razmaknicu u lokusu CRISPR komplementarnu dijelu genoma faga λ nisu otporne na infekciju fagom λ, ali iste stanice bez gena *hns* (Δ*hns*) otpornije su na infekciju (Westra i sur. 2010; Majsec i sur. 2016).

1.4.2. LeuO

Za djelovanje sustava CRISPR-Cas potrebno je poništiti represiju gena *cas* uzrokovanu proteinom H-NS. Više proteina utječe na protein H-NS. Jedan od njih je LeuO, koji pripada porodici transkripcijskih faktora LysR. On djeluje kao antagonist proteina H-NS (Stoebel i sur. 2008) uzrokujući povećanje transkripcije gena *casABCDE*, *cas1* i *cas2*. Delecija gena *hns* i povećana ekspresija gena *leuO* uzrokuju akumulaciju zrelih crRNA. I LeuO i H-NS se vežu na sekvencu IGLB. Vezani LeuO sprječava kooperativno vezanje proteina H-NS, dok se vezani H-NS djelomično uklanja s DNA nakon dodatka LeuO. Prisutnost proteina LeuO smanjuje osjetljivost stanica *E. coli*, koje sadrže razmaknicu u lokusu CRISPR komplementarnu dijelu genoma faga λ, na infekciju fagom λ (Westra i sur. 2010).

1.4.3. HtpG

Protein HtpG iz *E. coli* homologan je proteinu Hsp83 (od engl. *heat shock protein 83*) izoliranom iz vrste *Drosophila melanogaster* i spada u skupinu šaperona Hsp90. Sinteza tih proteina se pojačava prilikom povišenja temperature, ali i tijekom infekcije virusom ili u

prisustvu toksične tvari (Bardwell i Craig 1987). Oni pomažu drugim proteinima prilikom zauzimanja pravilne konformacije. Yosef i suradnici su 2011. pokazali da u bakteriji *E. coli* sustav CRISPR-Cas ovisi o produktu gena *htpG* koji je nužan za održavanje funkcionalne razine proteina Cas3. Drugim riječima, nedostatak proteina HtpG dovodi do nedostatka aktivnog proteina Cas3 koji se može nadomjestiti povećanom količinom proteina Cas3 (ekspresijom s plazmida). Za protein HtpG se smatra da je vjerojatno uključen u pravilno smatanje i/ili sprječavanje agregacije proteina Cas3 (Yosef i sur. 2011).

1.5. Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja

Nedostatkom gena *hns* sustav CRISPR-Cas postaje aktivan te može štiti bakterije od infekcije fagom λ ako se u lokusu CRISPR nalazi razmaknica anti-lambda λT3, koja je komplementarna dijelu genoma faga λ (Westra i sur. 2010). Zanimljivo, soj Δ*hns* koji sadrži razmaknicu λT3 je 100000 puta otporniji na infekciju od soja Δ*hns* koji nema tu razmaknicu ako se stanice uzgaja na 30 °C. Majsec i suradnici su 2016. primijetili da isti soj na 37 °C postaje osjetljiv na infekciju poput soja koji nema razmaknicu, dok su sojevi s aktivnim genom *hns* (*hns*$^+$) osjetljivi na infekciju, neovisno o prisutnosti razmaknice λT3 ili temperaturi uzgoja. Ovi rezultati pokazuju da je uzgoj bakterija na 30°C nužan za otpornost na infekciju. Analizom količine transkripata gena *cas3* u stanicama Δ*hns* i *hns*$^+$ uzgojenih do logaritamske ili stacionarne faze, pokazano je da su količine transkripata slične u stanicama u log fazi rasta na 30 °C ili 37 °C, dok su veće u Δ*hns* stacionarnim stanicama na obje temperature u odnosu na *hns*$^+$. To upućuje da na količinu transkripata gena *cas3* ne utječe temperatura, nego faza rasta. Osjetljivost soja Δ*hns* na infekciju fagom λ na 37 °C vjerojatno nije posljedica nedostataka transkripata gena *cas3*, nego smanjene količine ili nestabilnosti proteina Cas3. Nadalje, povećana ekspresija proteina Cas3 s plazmida, ali ne i proteina HtpG, uspostavila je otpornost stanica na infekciju na 37 °C. Ovi rezultati pokazuju da je količina proteina Cas3 odlučujući faktor za otpornost na infekciju fagom λ u sojevima Δ*hns*, i da ona ovisi o fazi rasta i o temperaturi (Majsec i sur. 2016).

Kako bismo razumjeli razloge temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 ciljevi istraživanja ovog diplomskog rada su:

1) Istražiti dolazi li do promjena u konformaciji pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vitro*.

2) Istražiti hoće li temperatura uzgoja utjecati na replikaciju plazmida tipa ColE1, za koju je pokazano da ovisi o proteinu Cas3, u stanicama u kojima nedostaju proteini H-NS i/ili HtpG, kako bi se razjasnila moguća uloga ovih proteina u nestabilnosti proteina Cas3 *in vivo*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

U tablicama 1 i 2 su prikazani sojevi bakterija i plazmidi korišteni u ovom istraživanju.

2.1.1. Sojevi

Tablica 1. Sojevi bakterije *E. coli* korišteni u ovom istraživanju

Soj	Genotip	Referenca
MG1655	F$^-$ λ$^-$ *ilvG*$^-$ *rfb*-50 *rph*-1	Blattner i sur. 1997
IIB928	MG1655 Δ*hns::kan*	ovaj rad
IIB1150	MG1655 Δ*htpG::kan*	ovaj rad
IIB1152	MG1655 Δ*htpG::kan* Δ*hns::cat*	ovaj rad
BW25113	Δ(*araBAD*)*567* Δ(*rhaBAD*)*568 rph-1* λ$^-$ Δ*lacZ4748* (::*rrnB-3*) *hsdR514*	Datsenko i sur. 2000
IIB1040	BW25113 λc λT3 *Δcas1::kan* Δ*hns::cat*	Majsec i sur. 2016
BL21	*E. coli* B F$^-$ *ompT gal dcm lon hsdS*$_B$($r_B^- m_B^-$) [*malB*$^+$]$_{K\text{-}12}$(λ^S)	Studier i Moffat 1986
IIB1166	BL21 pBAD*His6x-cas3::kan*	ovaj rad

2.1.2. Plazmidi

Tablica 2. Plazmidi korišteni u ovom istraživanju

Plazmid	Opis	Referenca
pUC19	prazan vektor	Viera i Messing 1982
pEB526/pCas3	*cas3* u pUC19	Ivančić-Baće i sur. 2013

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva

Za uzgoj bakterijskih sojeva korištene su krute podloge LB (*Luria broth*) (10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar) ili tekući medij LB (10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl). Optička gustoća stanica je mjerena pri 600 nm (OD_{600}).

2.2.2. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom

U 500 ml tekućeg medija LB koji sadrži antibiotik kanamicin (40 μg/ml) je dodano 10 ml prekonoćne kulture bakterija. Bakterije su inkubirane na 37 °C. Kad su bakterije dosegnule OD_{600} = 0,4 dodana im je L-arabinoza (finalna koncentracija: 0,2%) da bi se potaknula indukcija obilježenog gena *His6x-cas3*, te su inkubirane dva sata na 30 °C. Stanice su sakupljene centrifugiranjem (5000 g, 4 °C, 15 minuta) u centrifugi 5430R (Eppendorf) te su pohranjene na -80 °C.

Sljedećeg dana pripravljeni su puferi: pufer za lizu (50 mM Na-fosfat pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, koktel inhibitor proteaza bez EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)), pufer za ispiranje (50 mM Na-fosfat pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) i puferi za eluciju s različitim koncentracijama imidazola (50 mM Na-fosfat pH 8,0, 300 mM NaCl, 50, 125 ili 250 mM imidazol). Svi puferi su napravljeni u redestiliranoj vodi. Stanice sakupljene prethodnog dana su odmrznute i resuspendirane na ledu u 15 ml pufera za lizu, a zatim su lizirane pomoću sonikatora *High Intensity Ultrasonic Processor* (Bioblock Scientific) 6 puta po 15 sekundi uz pauzu od 10 sekundi između svakog soniciranja pri +4 °C. Nakon sonikacije, uzorak je centrifugiran (6000 g, 30 minuta, 4 °C) u centrifugi 5417R (Eppendorf) te je sakupljen supernatant u kojem se nalaze topivi proteini, kao i protein Cas3 koji je obilježen histidinskim privjeskom ($(His)_6$-Cas3). Supernatant je dalje pročišćen afinitetnom kromatografijom.

Kolona za pročišćavanje proteina His-Cas3 je pripravljena pomoću 1,5 ml zrnaca Ni-NTA (nikal-nitrilotrioctena kiselina) te je stavljena u hladnjak (+4 °C). Kolona je kondicionirana tri puta s po 5 ml pufera za lizu te je takva spremna za nanošenje topivih proteina (supernatanta). Proteini su nanošeni brzinom od 0,25 ml/min na Ni-NTA kolonu kroz 1 sat pri +4 °C. Kolona

je isprana četiri puta s po 5 ml pufera za ispiranje kako bi se isprali svi proteini koji su se nespecifično vezali na kolonu. Protein His-Cas3 je eluiran s kolone u tri koraka pomoću pufera za eluciju s rastućim koncentracijama imidazola. Protein je prvo eluiran s 10 ml pufera za eluciju (50 mM Na-fosfat pH 8,0, 300 mM NaCl) i 50 mM imidazolom. Nakon toga je uslijedila elucija proteina s 10 ml pufera za eluciju i 125 mM imidazola i na kraju s 10 ml pufera za eluciju i 250 mM imidazola. U svakom koraku je skupljeno po šest frakcija, a u sva tri koraka proteini su eluirani jednolikom brzinom od 0,25 ml/min. Na taj način je polako i postepeno eluiran protein His-Cas3 te su dobivene obogaćene frakcije čistog proteina, a smanjena je elucija i obogaćivanje frakcija s nespecifično vezanim proteinima.

20 µl svake frakcije pomiješano je sa puferom za denaturaciju (125 mM Tris pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) µ-merkaptoetanol, 32% (v/v) glicerol, kap bromfenola plavog) (*Laemmli sample buffer*, Laemmli 1970) u omjeru 4:1. Proteini su denaturirani u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf) 5 minuta pri 95 °C.

2.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Za elektroforezu je korišten sustav *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad). Najprije je pripremljen 10%-tni gel za razdvajanje proteina (tablica 3). Otopina gela izlivena je u sendvič sastavljen od dviju staklenih ploča odvojenih razmaknicom. Gelovi su nadsvođeni vodom te ostavljeni da polimeriziraju oko 45 minuta. Nakon polimerizacije voda je uklonjena, pripremljen je 4%-tni gel za koncentriranje proteina (tablica 3) te je otopina izlivena na gel za razdvajanje u koji je umetnut „češljić“ koji služi za stvaranje jažica.

Tablica 3. Sastav gela za razdvajanje (10%-tni) i koncentriranje (4%-tni).

Gel za razdvajanje (10 ml)		**Gel za koncentriranje (5 ml)**	
reH_20	4.0 ml	reH_20	3.050 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,250 ml
30% AA/Bis	3,35 ml	30% AA/Bis	0,665 ml
10% SDS	100 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl	10% APS	35 µl
TEMED	5 µl	TEMED	8 µl

U svaku jažicu naneseno je 20 µl denaturiranih proteina iz svake frakcije dobivene afinitetnom kromatografijom. Gelovi s nanesenim uzorcima su stavljeni u kadicu s elektrodnim puferom (25 mM Tris, 192 mM glicin, 1% (*w/v*) SDS, pH 8,3). Proteini su razdvojeni elektroforezom. Elektoforeza je tekla prvih 15 min pri 100 V, kako bi proteini ušli u gel za razdvajanje, a zatim pri 200 V do njenog završetka. Gelovi su obojeni bojom *Commassie brilliant blue* (CBB) R-250 (0,1% (*w/v*) CBB R-250, 45% (*v/v*) metanol, 10% (*v/v*) ledena octena kiselina) u trajanju 60 minuta, a zatim su odbojeni u otopini za odbojavanje (10% octena kiselina, 10% etanol). Pohranjeni su u 10%-tnoj octenoj kiselini na +4 °C.

2.2.4. Prijenos proteina na membranu (*Western blot*)

Denaturirani proteini su razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata prema prethodno opisanom postupku, a zatim su preneseni na nitroceluloznu membranu *Whatman Protran* BA 83 (GE Healthcare) u puferu za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (*v/v*) metanol, pH 8,3) metodom mokrog prijenosa (*Western blot*). Prijenos je trajao 60 minuta pri 60V. Nakon prijenosa, membrana je kratko obojena bojom *Rouge Ponceau S* te isprana vodom kako bi provjerili uspješnost prijenosa i olovkom označili vrpce molekulskih masa. Nadalje, membrana je kratko isprana s puferom TBS (20 mM Tris, 73 mM NaCl, pH 7,5) koji ispire boju *Rouge Ponceau S* te je inkubirana 60 minuta na tresilici u 30 ml pufera za blokiranje, koji se sastoji od 1,5 g mlijeka u prahu otopljenog u 30 ml PBS-a (10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Membrana je potom isprana tri puta po 5 minuta sa po 25 ml otopine za ispiranje (12,5 µl detergenta Tween 20 otopljenog u 25 ml PBS-a). Nakon ispiranja, membrana je inkubirana 90 minuta na tresilici u 20 ml otopine s protutijelom anti-His (10 µl *stock* otopine protutijela (1 mg/ml) razrijeđeno u 20 ml otopine za ispiranje). Nakon inkubacije membrana je isprana tri puta po 5 minuta sa po 25 ml otopine za ispiranje. Proteini na membrani na koje su vezana protutijela anti-His koja su obilježena peroksidazom iz hrena (*horseradish peroxidase*) su detektirani kemiluminiscentno pomoću reagensa za detekciju *ECL Western Blotting Substrate* (Promega). 1 ml otopine luminol pojačivača pomiješano je s 1 ml otopine peroksida i inkubirano je 5 minuta u mraku. Signal je detektiran pomoću uređaja *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR, Biosciences).

2.2.5. Spektrometrija masa

2.2.5.1. Digestija proteina u gelu

Iz proteinskih vrpci na gelovima, koji su dobiveni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata, izrezana su po 2 komadića gela iz iste vrpce pomoću plastičnog nastavka za pipetu. Stavljeni su u 1 ml otopine za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina, 40% (v/v) metanol)) te su inkubirani na tresilici preko noći (700 rpm, sobna temperatura). Sutradan je uklonjena otopina za odbojavanje, a na komadiće gela je dodano 500 µl pufera 50 mM amonijevog hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3) pH 7,8 te su inkubirani na tresilici 5 minuta (700 rpm, sobna temperatura), nakon čega je pufer uklonjen. Postupak je ponovljen još dva puta, s time da je po zadnjem dodatku pufera, komadić gelića inkubiran 30 minuta. Nakon inkubacije otopina je uklonjena, a svakome geliću dodano je 500 µL otopine 50 mM NH_4HCO_3 i acetonitrila volumnih omjera 1:1 te su inkubirani 30 min na tresilici (400 rpm, sobna temperatura). Nakon inkubacije, otopina je uklonjena, a na komadiće gela je dodano 100 µl acetonitrila te su inkubirani na tresilici 5 minuta (700 rpm, sobna temperatura). Nakon inkubacije u čistom acetonitrilu gel se skupio i pobijelio jer acetonitril na sebe veže vodu iz gela čime kasnije u postupku omogućuje potpuno prodiranje otopine tripsina u gel bez neželjenog razrjeđivanja. Acetonitril je uklonjen, a gel je osušen u uređaju *SpeedVac Concentrator* 5301 (Eppendorf) 15 minuta na 30 °C. Na komadiće gela je dodano 10 µl tripsina koncentracije 10 µg/ml u 25 mM NH_4HCO_3 (pH = 7,8) koja je pripremljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg/ml u 25 mM NH_4HCO_3 (pH = 7,8) te su inkubirani 18 sati na tresilici (600 rpm, 37 °C).

2.2.5.2. Ekstrakcija peptida iz gela

Sutradan nakon digestije proteina tripsinom, tripsinski pufer je odvojen u nove epruvete te je stavljen u *SpeedVac* na 30 °C kako bi se osušio, a na komadiće gela je dodano 10 µl otopine koja sadrži 5%-tnu trifluoroctenu kiselinu (TFA) i acetonitril u omjeru 1:1 te su inkubirani 30 minuta u sonikacijskoj kupelji *Ultrasonic Cell Disruptor XL* (Misonix Inc.). Zatim je otopina s komadićima gela inkubirana 15 minuta na tresilici (500 rpm, sobna temperatura), nakon čega je otopina prebačena u epruvete s posušenim tripsinskim puferom. Epruvete su stavljene u *SpeedVac* na 30 °C kako bi se otopina osušila, a zatim su smrznute na -80 °C.

2.2.5.3. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C_4

Sljedećeg dana su smrznuti uzorci otopljeni u 0,1%-tnoj TFA. Kolona za pročišćavanje peptida (ZipTip) je tri puta isprana sa po 10 µl otopine koja sadrži acetonitril i 0,1%-tnu TFA u omjeru 4:1. Zatim je isprana tri puta sa po 10 µl otopine koja sadrži acetonitril i 0,1%-tnu TFA u omjeru 1:1, a potom tri puta sa po 10 µl 0,1%-tne TFA. 10 µl uzorka je provučeno kroz kolonu 10 puta. Kolona je isprana pet puta sa po 10 µl 0,1%-tne TFA. Uzorak je eluiran s kolone pomoću 10 µl otopine koja sadrži acetonitril i 0,1%-tnu TFA u omjeru 4:1 koja je prethodno provučena 10 puta kroz kolonu. Pročišćeni uzorak je osušen u uređaju *SpeedVac* na 30 °C kroz 60 minuta.

2.2.5.4. Analiza peptida spektrometrom masa

Osušeni pročišćeni peptidi su resuspendirani pipetom u 4 µl matrice, tj. otopine α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA), koncentracije 5 mg/ml, u smjesi acetonitrila i 0,1% TFA u omjeru 1:1. Matrica u tehnici matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) djeluje kao nosač peptida koji se, nakon zagrijavanja i fotoionizacije laserom, raspršuje u vakuumu spektrometra masa zajedno s peptidima što tehniku ionizacije uzoraka MALDI čini pogodnom za prevođenje velikih nehlapljivih molekula, kao što su peptidi, iz čvrste u plinovitu fazu (Karas i Hillenkamp, 1988). Uzorci (po 1 µl) su nakon otapanja naneseni na pločicu MALDI na kojoj je, istodobno s matricom, kokristalizirao i analit i na taj se način uklopio u kristale matrice. Pločica je nakon sušenja na zraku stavljena u spektrometar masa *4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer* (Applied Biosystems). Na analit uklopljen u kristale matrice usmjerava se kratki laserski puls jakog intenziteta zračenja (UV ili IR). Molekule matrice desorbiraju zrake te uslijed oslobađanja velike količine topline dolazi do sublimacije površinskog sloja kristala matrice i oslobađanja intaktnog analita iz nje. Analizatori masa u uređaju mjere vrijeme leta (od engl. *Time Of Flight*, TOF), tj. ono vrijeme koje je potrebno čestici da prođe kroz uređaj te prema brzini čestice, koja ovisi o njezinoj masi, određuju njenu veličinu ispisivanjem spektra MS, a prema potrebi mogu cijepati i odabrane čestice propuštene kroz prvi uređaj TOF u kolizijskim ćelijama i određivati im masu propuštanjem kroz drugi uređaj TOF ispisivanjem spektra MS/MS. Za internu kalibraciju korišteni su pikovi autolize tripsina. Parametri korišteni tijekom analize prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Parametri analize MALDI-TOF/TOF

Tip analize	MS	MS/MS
Detekcija iona	pozitivna	pozitivna
Zrcalo	reflektron	reflektron
Broj snimaka/spektara	80	120
Raspon masa/Da	900-4000	900-4000
Brzina snimanja/Hz	200	200
Kolizijski plin	isključen	uključen

2.2.5.5. Obrada podataka – identifikacija proteina

Za analizu MS/MS izabrano je 10 najintenzivnijih pikova svakog spektra MS. Dobiveni spektri masa MS/MS korišteni su za daljnju pretragu baze podataka *National Center for Biotechnology Information database* (NCBInr) prema organizmu *Escherichia coli* pomoću računalnog programa *ProteinPilot*. Sva pretraživanja su evaluirana prema signifikantnoj vrijednosti (*score*) dobivenoj u *Macot Matrix science*. Protein je smatran identificiranim ako je *score* proteina bio veći od 75 te je uzet kao značajna vrijednost ($p < 0.05$).

2.2.6. Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom

Nakon što su proteinske frakcije dobivene afinitetnom kromatografijom provjerene pomoću elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata, mokrim prijenosom (*Western blot*) i spektrometrijom masa, izabrane su one frakcije s najvećom ekspresijom proteina His-Cas3 te su ukoncentrirane pomoću centrifugalnog filter uređaja *Amicon Ultra -0.5* (Merck, Milipore) s celuloznom membranom koja propušta proteine molekularne mase manje od 3 000 Da, a na membrani zadržavana sve proteine već od 3 000 Da (*cut off* 10 000 MW). Proteini su ukoncentrirani centrifugiranjem na 14000 g pri 10 °C. Nakon ukoncentriravanja zamijenjen je pufer za lizu, koji je sadržavao 125 mM imidazola, za 50 mM Na-fosfat pH 8,0 pomoću istog centrifugalnog filter uređaja. Zamjena pufera bila je nužna kako bi se mogla provesti mjerenja diferencijalne pretražne flurimetrije, kalorimetrije te cirkularnog dikroizma. Koncentracija pročišćenog proteina je izmjerena spektrofotometrijski pomoću

spektrofotometra UV/VIS (Unicam) pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija protein odredila se metodom prema Bradfordu (1976).

2.2.7. Diferencijalna pretražna fluorimetrija

Napravljena su 5x serijska razrjeđenja pročišćenog proteina u puferu 50 mM Na-fosfat pH 8,0 te su iz njih uzeti alikvoti pomoću staklenih kapilara *nanoDSF* (NanoTemper Technologies). Kapilare s uzorcima su stavljene u uređaj *Prometheus NT.48* (NanoTemper Technologies) te su zagrijavane brzinom od 1 °C po minuti, od 20 °C do 95 °C. Dva puta u minuti je mjerena emisijska fluorescencija triptofana pri 330 i 350 nm. Točka taljenja proteina Tm je izračunata iz prve derivacije omjera intenziteta emisije triptofana pri 330 i 350 nm.

2.2.8. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija provedena je na uređaju *NanoDSC* (TA Instruments). Prije mjerenja uzorci pročišćenog proteina Cas3 su degazirani (23 °C, 120 rpm, 0,4 atm, 10 minuta). Pročišćeni protein zagrijavan je brzinom 1 °C po minuti od 25 do 105 °C pri tlaku 3 atm te je promatrana njegova termička stabilnost.

2.2.9. Cirkularni dikroizam

Mjerenja su napravljena na uređaju *J-815 CD Spectrometer* (Jasco). Prilikom ručnog podešavanja temperature spektri su snimljeni u termičkoj kiveti (L = 1 mm) svakih 1 °C u rasponu temperatura od 30 do 41 °C te na 45 i 55 °C. Parametri korišteni tijekom mjerenja bili su: *band width* = 1 nm, *response* = 1 sec, *sensitivity standard*, *measurement range* = 260-190 nm, *data pitch* = 0.2 nm, *scanning speed* = 50 nm/min, *accumulation* = 3, *starting temperature* = 25 ^{o}C.

Prilikom automatskog podešavanja temperature (programirano grijanje) spektri su snimljeni u termičkoj kiveti (L = 1 mm) s parametrima: *band width* = 1 nm, *response* = 1 sec, *sensitivity standard*, *measurement range* = 260-190 nm, *data pitch* = 0.2nm, *scanning speed* = 50 nm/min, *accumulation* = 2. Protein je zagrijavan od 20 do 55 °C, brzinom 1 °C po minuti.

Zatim je ohlađen na 20 °C te je ostavljen 30 minuta. Protein je potom zagrijavan do 90 °C, brzinom 1 °C po minuti, a spektri su snimani svakih 5 °C. Protein je ohlađen na 20 °C, a zatim zagrijavan do 55 °C, a spektri su snimani svakih 5 °C.

Rezultati dobiveni cirkularnim dikroizmom izraženi su pomoću stupnjeva eliptičnosti [Θ/mdeg]. Dobiveni podaci su normalizirani s obzirom na veličinu i koncentraciju proteina, čime se dobiva *mean residue ellipticity* (MRE). *Mean residue ellipticity* izračunata je prema formuli: $[\Theta]_\lambda = \Theta_\lambda / (10 \times N \times d \times c)$, pri čemu je λ valna duljina pri kojoj se vrši mjerenje, Θ_λ je eliptičnost izmjerena pri valnoj duljini λ, N je broj aminokiselina u proteinu, d je duljina optičkog puta (cm), a c je molarna koncentracija proteina. Prema Boltzmannovom modelu (funkciji) kroz izmjerene točke (MRE/temperatura) provučena je sigmoidalna krivulja s ciljem pronalaženja točke infleksije. Boltzmannova funkcija glasi: $y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$, pri čemu je A1 početna vrijednost, A2 je finalna vrijednost, a x_0 je točka infleksije.

2.2.10. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Za uspješnu transformaciju bakterija potrebno je načiniti bakterijske stanice polupropusne za plazmidnu DNA. Takve stanice se dobivaju tretiranjem s kalcijevim kloridom i nazivamo ih kompetentnim stanicama. Bakterije uzgojene preko noći razrijeđene su u svježem tekućem mediju LB (40 µl u 3 ml) i inkubirane su u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) na 37 °C do logaritamske faze rasta (dok optička gustoća bakterija nije iznosila OD_{600} = 0,5-0,6). Zatim su bakterije istaložene (3 minute, 5900 g) u centrifugi 5415D (Eppendorf), a talog je resuspendiran u 200 µl hladnog 50 mM $CaCl_2$. Bakterije su ponovo istaložene i talog je resupendiran u 50 µl hladnog 50 mM $CaCl_2$. Bakterije su inkubirane na ledu 15 minuta. Tako pripremljenim stanicama dodano je oko 50 ng odgovarajućeg plazmida, smjesa je lagano promiješana i ponovo inkubirana na ledu 15 minuta. Zatim su stanice izložene temperaturnom šoku stavljanjem epruveta u termoblok *Thermomixer comfort* (Eppendorf) između 60 i 90 sekundi na 42 °C i isto toliko na ledu. Transformirane bakterije su kratko oporavljene dodatkom 100 µl tekućeg medija LB (ovaj korak se može preskočiti) i inkubiranjem pola sata na sobnoj temperaturi, a zatim su nasađene na krute podloge s antibiotikom ampicilinom. Podloge su inkubirane preko noći na 37 °C.

2.2.11. Određivanje zasađivanja faga pri različitim temperaturama inkubacije

Bakterije su uzgojene preko noći na 37 °C u tekućem mediju LB uz dodatak maltoze koja stimulira ekspresiju receptora za fag λ (finalna koncentracija: 0,2%). Na krute podloge je nanesen sloj od 3,5 ml 6%-tnog mekog agara (10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 6 g/L agar) u koji je dodano 200 µl prekonoćnih stanica (bakterijska livada). Nakon što se meki agar skrutnuo, na njega su naneseni alikvoti (10 µl) faga λ serijski decimalno (od 10^{-2} do 10^{-6}) razrijeđenih u otopini 10 mM $MgSO_4$. Nakon što su se alikvoti upili u agar, ploče su inkubirane preko noći na različitim temperaturama. Osjetljivost bakterija na infekciju fagom λ se izražava pomoću PFU (od engl. *plaque-forming units*), broja plakova koji nastaju na mjestu inficiranih liziranih bakterija. PFU se izražava kao broj plakova po mililitru, a određuje se množenjem broja plakova, volumena dodanog alikvota i stupnja decimalnog razrjeđenja.

2.2.12. Izolacija plazmida i test vijabilnosti

Plazmidna DNA izolirana je iz 1,5 ml prekonoćnih kultura uzgojenih na 30 °C ili 37 °C pomoću *kit*-a *Wizard plus SV mini-prep* (Promega) prema uputama proizvođača. Koncentracije izoliranih plazmida su izmjerene na spektrofotometru *Nanovue* (GE Healthcare). Prekonoćnim kulturama izmjeren je OD_{600} i određena vijabilnost stanica – broj živih stanica, odnosno kolonija koje nastaju nakon rasta preko noći. Da bi se mogao odrediti broj bakterija, potrebno je decimalno razrijediti bakterijsku suspenziju u fosfatnom puferu koncentracije 67 mM (pH 7,0) do 10^{-6}. Po 100 µl tako razrijeđene bakterijske kulture, nasađeno je na krute podloge sa ili bez antibiotika ampicilina (100 µg/ml). Podloge su inkubirane preko noći na 37 °C. Bakterijske kolonije na podlogama sa ili bez ampicilina su izbrojene te je iz omjera broja bakterija naraslih na podlozi sa i bez antibiotika izračunat udio stanica koje ne sadrže plazmid.

2.2.13. Statistička analiza

Statistička analiza podataka provedena je u program R (verzija 3.2.2.). Srednje vrijednosti dvaju uzoraka su uspoređene pomoću Welchovog testa (kod: t.test(x, y, alternative = "two.sided", var.equal = F, paired = F, conf.level = 0.95), pri čemu x i y označavaju različite uzorke), koji je prikladan za uspoređivanje normalno distribuiranih uzoraka s različitim

varijancama. Razlike srednjih vrijednosti dvaju uzoraka su smatrane značajnima ako je p-vrijednost bila manja od 0,05.

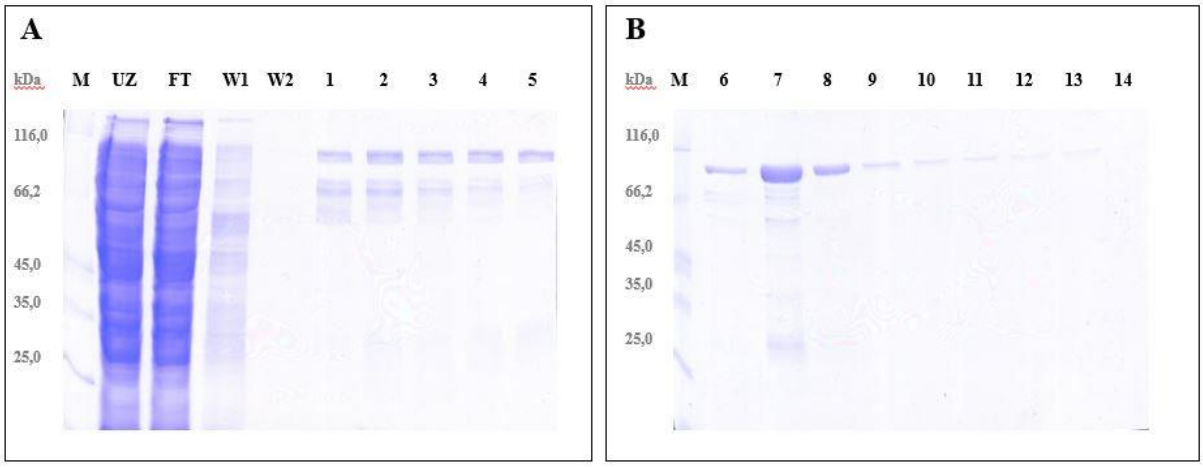
3. REZULTATI

3.1. Pročišćavanje proteina Cas3

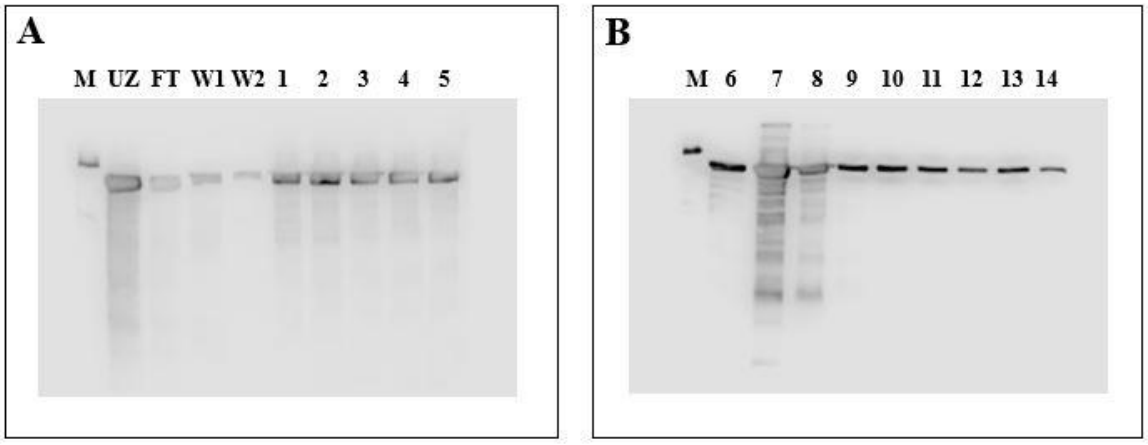
Kako bismo pročistili protein Cas3 od ostalih proteina, ispred gena *cas3* dodali smo na 5'-kraju biljeg od šest aminokiselina histidina (His_6) (soj IIB1166) koji omogućuje selektivno vezanje tako obilježenog proteina Cas3 na kolonu Ni-NTA (nikal-nitrilotrioctena kiselina). His-Cas3 je pročišćen i eluiran s kolone u više frakcija pomoću pufera koji sadrži različite koncentracije imidazola. Imidazol istiskuje vezani His-Cas3 s kolone i tako ga oslobađa u pufer.

Frakcije pročišćenog proteina Cas3 dobivene afinitetnom kromatografijom prvo su analizirane elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE). Gelovi su obojeni bojom *Commassie brilliant blue*. Rezultati prikazani na slici 5 pokazuju: topive bakterijske proteine iz soja IIB1166 (jažica UZ), bakterijske proteine koji se nisu vezali na kolonu nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FT), i proteine koji su se slabo vezali za kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje uz dodatak 20 mM imidazola (jažice W1 i W2) te protein Cas3 kao i još neke druge bakterijske proteine koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažice od 1-6), 125 mM imidazola (jažice 7-12) i 250 mM imidazola (jažice 13 i 14). Protein Cas3, čija masa iznosi 100,5 kDa, nalazi se u svim frakcijama s imidazolom, a najviše ga je u frakciji 7, odnosno najveću količinu proteina Cas3 smo eluirali s 125 mM imidazola. Frakcije 1-8 sadrže uz proteinske vrpce koje pripadaju proteinu Cas3, i druge proteinske vrpce na gelu što ukazuje ili na raspad proteina Cas3 ili na prisutnost drugih proteina koji su se vezali nespecifično na kolonu ili su u interkaciji sa samim Cas3 proteinom. Frakcije 9-14 sadrže protein Cas3 u niskim koncentracijama.

Metoda *Western blot* korištena je za potvrdu prisutnosti pročišćenog proteina Cas3 u svim frakcijama pomoću protutijela anti-His. Iz rezultata prikazanih na slici 6 potvrđena je prisutnost proteina Cas3 u svim frakcijama, no i dalje su uočljive dodatne vrpce koje ukazuju ili na raspad proteina Cas3 ili druge proteine koji su se vezali nespecifično na kolonu ili su u interakciji sa samim proteinom Cas3. Kako se u frakcijama 1-8 nalaze velike količine proteina, moguće je da je došlo i do nespecifičnog vezanja protutijela anti-His, odnosno do nedovoljno efikasnog blokiranja membrane u puferu za blokiranje.

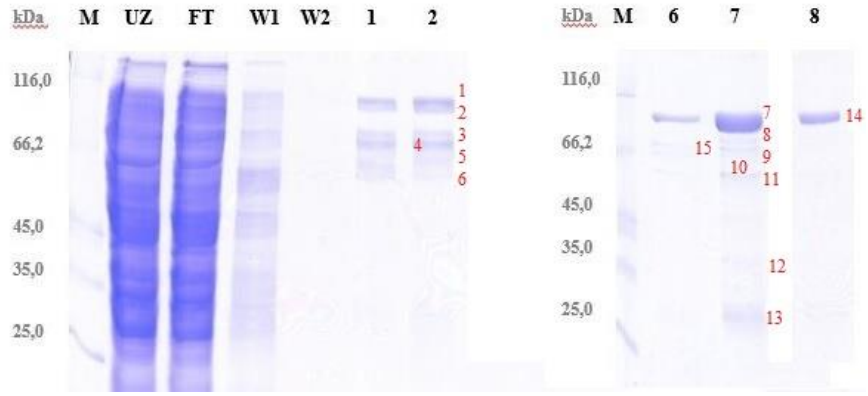


Slika 5. Analiza frakcija pročišćenog proteina Cas3 dobivenih afinitetnom kromatografijom metodom SDS-PAGE. **A)** marker (jažica M), topivi proteini iz soja IIB1166 (jažica UZ), bakterijski proteini koji se nisu vezali na kolonu nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FT), proteini koji su se slabo vezali za kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje uz dodatak 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3 i drugi bakterijski proteini koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažice 1-5). **B)** protein Cas3 i drugi bakterijski proteini koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažica 6), 125 mM imidazola (jažice 7-12) i 250 mM imidazola (jažice 13 i 14).



Slika 6. Analiza frakcija pročišćenog proteina Cas3 dobivenih afinitetnom kromatografijom metodom Western blot. **A)** marker (jažica M), topivi proteini iz soja IIB1166 (jažica UZ), bakterijski proteini koji se nisu vezali na kolonu nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FT), proteini koji su se slabo vezali za kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje uz dodatak 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3 i drugi bakterijski proteini koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažice 1-5). **B)** protein Cas3 i drugi bakterijski proteini koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažica 6), 125 mM imidazola (jažice 7-12) i 250 mM imidazola (jažice 13 i 14).

Kako bismo doznali koji se proteini nalaze u pojedinim proteinskim vrpcama, koristili smo spektrometriju masa. Uzorci su uzeti iz poliakrilamidnog gela (slika 5), iz vrpci koje su se nalazile u frakcijama 2, 6, 7 i 8. Analizirani uzorci označeni su brojevima te su prikazani na slici 7, a identificirani proteini iz uzoraka su navedeni u tablici 5.



Slika 7. Frakcije pročišćenog proteina Cas3 koje su analizirane spektrometrijom masa. Analizirane vrpce iz frakcija 2, 6, 7 i 8 su označene crvenim brojevima. Marker (jažica M), topivi proteini soja IIB1166 (jažica UZ), bakterijski proteini koji se nisu vezali na kolonu nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FT), proteini koji su se slabo vezali za kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje uz dodatak 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3 i drugi bakterijski proteini koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju uz dodatak 50 mM imidazola (jažice 1, 2 i 6) i 125 mM imidazola (jažice 7 i 8).

U skladu s očekivanjima, Cas3 se nalazi u vrpcama 1, 7 i 14 što odgovara masi od 100 kDa, no, pronađen je i u vrpcama 2 i 8, što ukazuje na njegovo vjerojatno djelomično raspadanje (veličina oko 90 kDa). Ova veličina odgovara proteinu od otprilike 794 aminokiseline, što bi mogao biti protein Cas3 bez C-terminalne domene (Gong i sur. 2014). U ostalim vrpcama u uzorcima 2, 6 i 7 se nalaze i drugi bakterijski proteini. U vrpcama 3 (frakcija 2) i 9 (frakcija 7) identificirani su isti proteini: bifunkcionalni protein rezistencije na polimiksin ARNA i bifunkcionalna UDP-glukuronska kiselina dekarboksilaza/UDP-4-amino-4-deoksi-L-arabinoza formiltransferaza, kao i u vrpcama 4 (frakcija 2), 10 (frakcija 7) i 15 (frakcija 6): Lanac A, glutamin-fruktoza-6-fosfat transaminaza i glukozamin-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza. Spektrometrijom masa je potvrđen rezultat koji je dobiven metodom *Western blot*, odnosno da je protein Cas3 uspješno pročišćen. Nadalje, spektrometrijom masa dobiveni su i još neki dodatni potencijalno zanimljivi rezultati. Naime, rezultati pokazuju da se uz Cas3 protein eluiraju i drugi specifični proteini koji su možda u interakciji sa samim Cas3 proteinom. Ovaj rezultat nas upućuje da u istraživanju mogućih potencijalnih partnera Cas3 proteina, prvo

možemo istražiti ove proteine dobivene spektrometrijom masa te vidjeti da li su uistinu potencijalni interakcijski partneri.

Za potrebe daljnje strukturne analize bilo je potrebno dobiti što čišći protein Cas3 u što većoj koncentraciji u odgovarajućem puferu. Frakcije 6, 7 i 8 sadržavale su najveću količinu proteina Cas3, uz druge proteine, no kako je njihova koncentracija u tim frakcijama znatno manja smatrali smo da neće imati veliki utjecaj na daljnja mjerenja cirkularnim dikroizmom. Frakcija 7 koja ima najveću količinu proteina Cas3 je ukoncentrirana membranskom ultrafiltracijom (uzorak 7). Također, frakcije 6 i 8 te frakcije 10-14 su zbog sličnog proteinskog uzorka spojene i ukoncentrirane membranskom ultrafiltracijom u uzorak 68 odnosno u uzorak 1014. Nadalje, svim ukoncentriranim frakcijama je zamijenjen pufer u onaj pogodan za mjerenje stukturne konformacije, te je izmjerena koncentracija proteina. Izmjerene koncentracije proteina su prikazane u tablici 6.

Tablica 6. Izmjerene koncentracije proteina Cas3 u ukoncentriranim uzorcima

uzorak	**koncentracija proteina (mg/ml)**
68	1,120
7	1,340
1014	0,273

Ovi eksperimenti su ponovljeni još tri puta (biološke replike) te su dobiveni slični rezultati (nije prikazano).

Tablica 5. Analiza proteinskih vrpci prikazanih na slici 7 spektrometrijom masa.

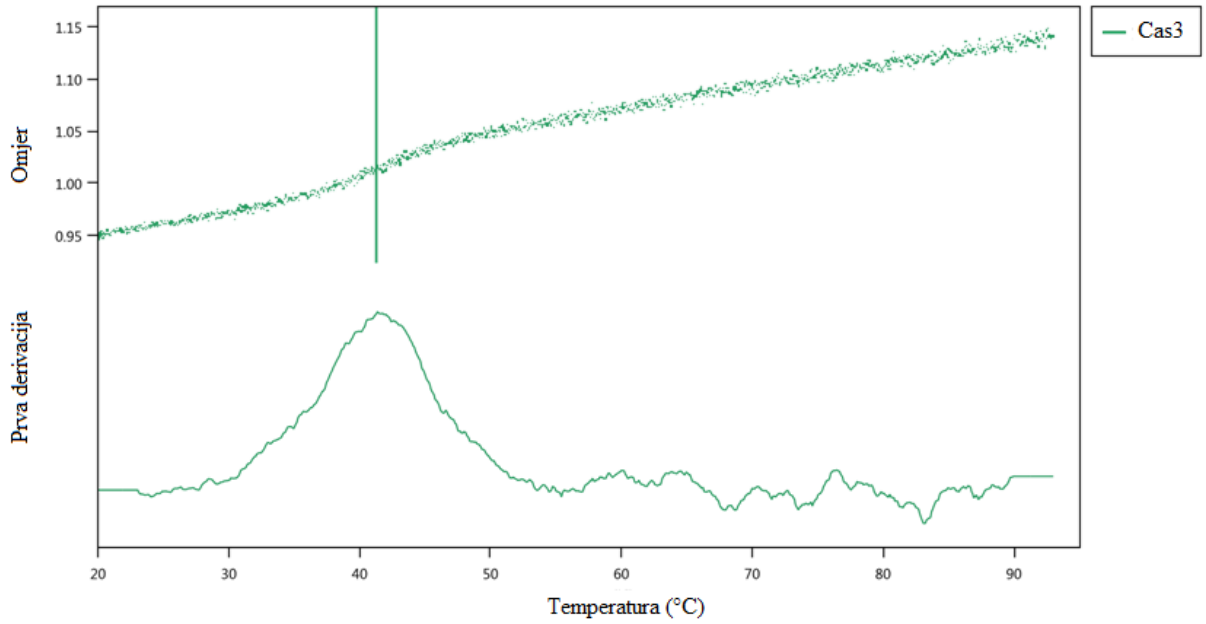
Broj vrpce na gelu	Naziv proteina	Identifikacijski broj	*Score*	Masa proteina (Da)
1	helikaza Cas3	gi|585316991	585	93860
	helikaza Cas3 povezana s CRISPR-om, protein	gi|487495179	579	100531
2	helikaza Cas3 povezana s CRISPR-om, protein	gi|487495179	570	100531
3	bifunkcionalni protein rezistencije na polimiksin ARNA	gi|486275155	230	74256
	bifunckcionalna UDP-glukuronska kiselina dekarboksilaza/UDP-4-amino-4-deoksi-L-arabinoza formiltransferaza	gi|446783019	229	74270
	fuzionirana UDP-L-Ara4N formiltransferaza	gi|485780764	229	74270
	porodica NAD-ovisnih epimeraza/dehidrataza	gi|486066583	159	41381
4	Lanac A, glukozamin 6-fosfat sintaza sa glukoza 6-fosfatom	gi|17942686	319	66694
	glutamin-fruktoza-6-fosfat transaminaza	gi|487515249	319	66845
	glukozamin-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza	gi|446256243	318	66823
5	Lanac A, C7 simetrizirana struktura nevezanog Groel pri rezoluciji 4,7 Å dobivena pomoću CryoEM	gi|197725074	688	55366
	šaperonin GroL	gi|486058810	678	57556
6	protein GroEL	gi|37624678	73	40072
	šaperonin 60 kDa	gi|168830656	73	19378
	Lanac A, D7 simetrizirana struktura nevezanog Groel pri rezoluciji 4,2 Å dobivena pomoću CryoEM	gi|197725074	73	55235
7	helikaza Cas3 povezana s CRISPR-om, protein	gi|487495179	780	100531

8	helikaza Cas3 povezana s CRISPR-om, protein	gi|487495179	539	100531
9	bifunckcionalna UDP-glukuronska kiselina dekarboksilaza/UDP-4-amino-4-deoksi-L-arabinoza formiltransferaza bifunkcionalni protein rezistencije na polimiksin ARNA	gi|446423979 gi|486275155	566 565	73051 74256
10	Lanac A, glukozamin 6-fosfat sintaza sa glukoza 6-fosfatom glutamin-fruktoza-6-fosfat transaminaza glukozamin-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza	gi|17942686 gi|486241028 gi|446256243	122 121 119	66694 66849 66823
11	nije detektirano (premali *score*)			
12	fosfoporin vanjske membrane protein E	gi|485716245	233	36032
13	peptidil-prolil izomeraza tipa FKBP peptidil-prolil cis-trans izomeraza	gi|110643589 gi|5190801332	118 114	20854 20600
14	helikaza Cas3 povezana s CRISPR-om, protein	gi|487495179	728	100531
15	Lanac A, glukozamin 6-fosfat sintaza sa glukoza 6-fosfatom glutamin-fruktoza-6-fosfat transaminaza glukozamin-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza	gi|17942686 gi|485956401 gi|446256243	237 235 232	66694 66862 66823

3.2. Promjene konformacije pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vitro*

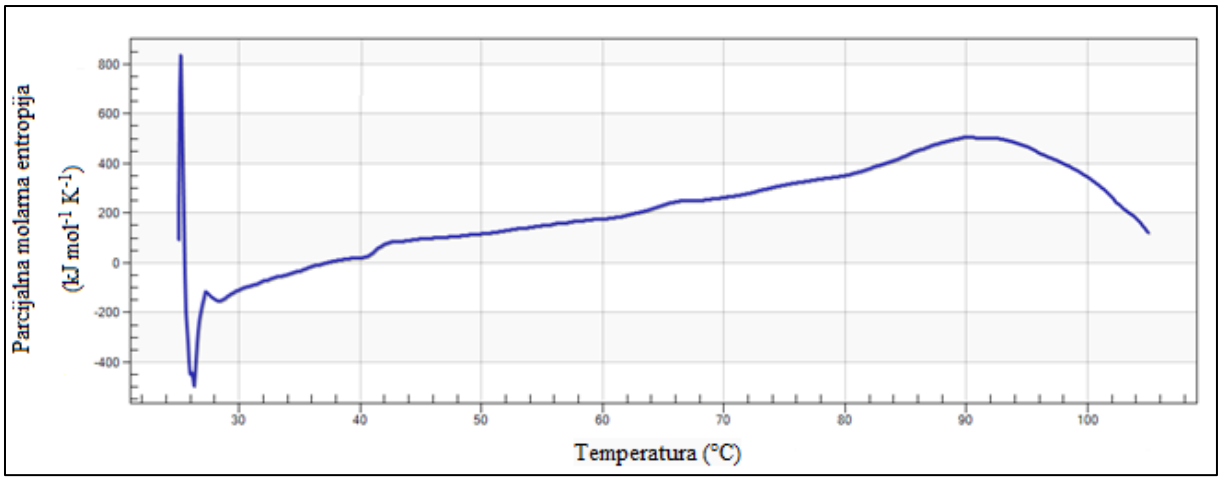
Za mjerenje promjena konformacije pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi korišteni su uzorci 68 i 7, jer je koncentracija proteina u uzorku 1014 bila nedovoljna.

Prvo je određena točka taljenja (Tm) proteina Cas3 pri kojoj je 50% proteina denaturirano. Metodom diferencijalna pretražna fluorimetrija (DSF – od engl. *differential scanning flourimetry*) mjerena je promjena fluorescencije aromatskih aminokiselina prilikom termičke denaturacije proteina te je izmjerena točka taljenja od 41,3 °C. Termogram je prikazan na slici 8.



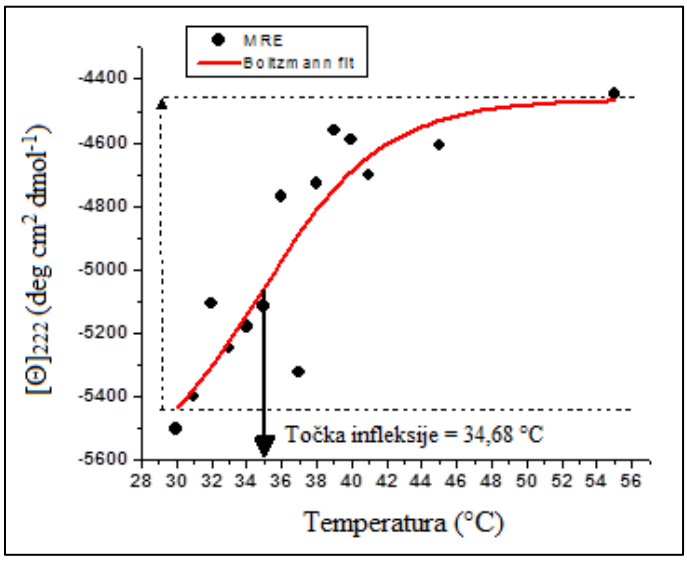
Slika 8. Termogram proteina Cas3 dobiven diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom. Na gornjem dijelu slike je prikazana ovisnost omjera emisijske fluorescencije triptofana pri 330 i 350 nm o temperaturi. Na donjem dijelu slike nalazi se prva derivacija gornje krivulje.

Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC – od engl. *differential scanning calorimetry*) bilježe se entalpijske i entropijske promjene prilikom zagrijavanja uzorka koje mogu upućivati na strukturne promjene. Mjerenje je izvršeno na pročišćenom proteinu Cas3 koncentracije 0,153 mg/mL (1,5217 x 10^{-6} M). Iz termograma prikazanog na slici 9 vidljiva je lokalna promjena pri 42 °C, te na 90 °C globalna promjena u strukturi proteina, koja vjerojatno označava potpunu denaturaciju proteina. Dakle, oba pristupa dala su sličan rezultat, djelomičnu promjenu strukture proteina Cas3 između 41 i 42 °C.

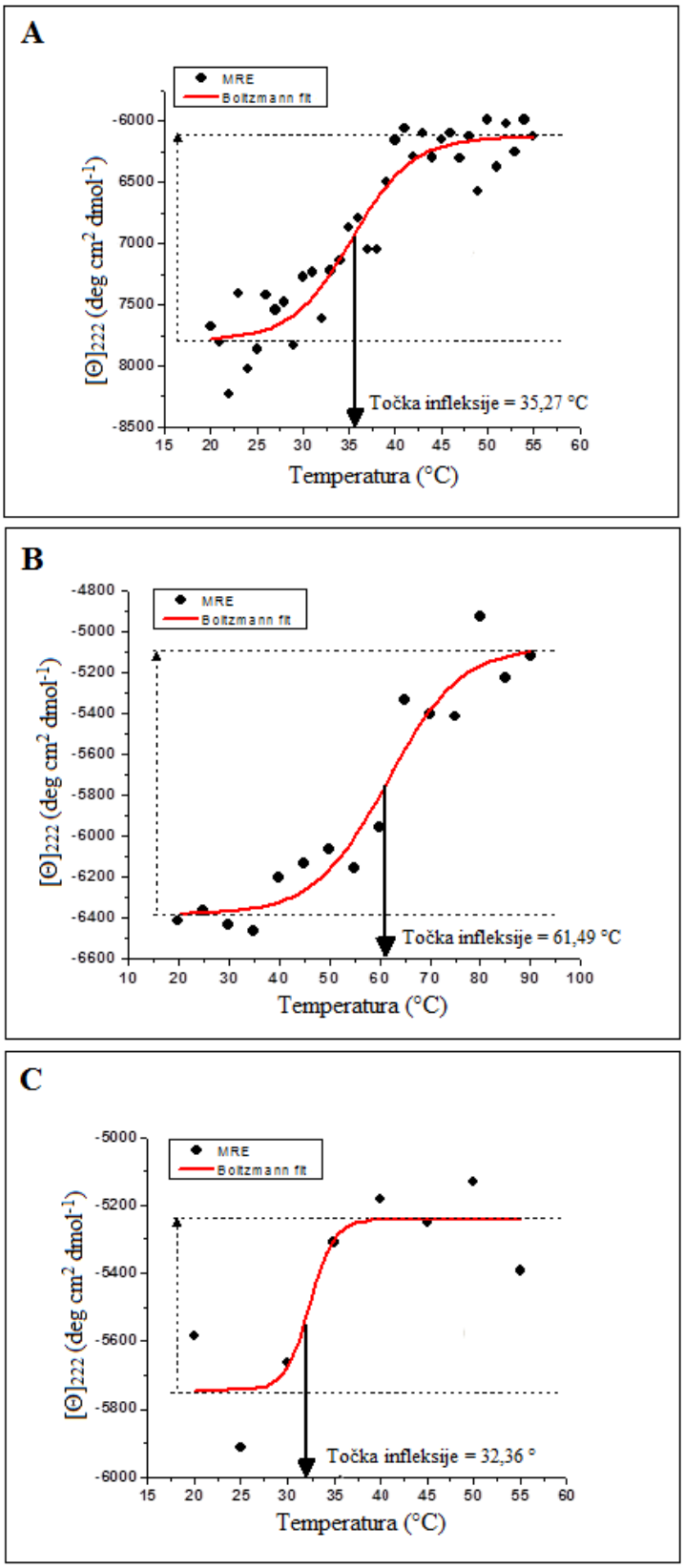


Slika 9. Termogram proteina Cas3 dobiven diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom. Prikazan je jedan od dva rezultata mjerenja.

Zatim smo promjenu strukture proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi odredili mjerenjem promjene eliptičnosti metodom cirkularni dikroizam – spektroskopskom metodom koja se može koristiti za praćenje strukturnih promjena koje prate zamatanje i odmatanje proteina. Uzorak smo zagrijavali na dva načina: ručnim (slika 10) i automatskim podešavanjem temperature (slika 11).



Slika 10. Praćenje promjena u strukturi proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi (ručno podešavanje temperature) pomoću cirkularnog dikroizma na 222 nm. Crnim točkama je označena *mean residue ellipticity*, a crvenom linijom je označena sigmoidalna krivulja dobivena pomoću Boltzmannove funkcije.



Slika 11. Praćenje promjena u strukturi proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi (automatsko podešavanje temperature) pomoću cirkularnog dikroizma na 222 nm tijekom: **A)** zagrijavanja do 55 °C, **B)** zagrijavanja do 90 °C i **C)** ponovnog zagrijavanja do 55 °C. Crnim točkama je označena *mean residue ellipticity*, a crvenom linijom je označena sigmoidalna krivulja dobivena pomoću Boltzmannove funkcije.

Koncentracija pročišćenog proteina Cas3 korištenog za analizu cirkularnim dikroizmom s ručno podešenom temperaturom iznosila je 1,1139 x 10^{-6} M i rezultati su prikazani na slici 10. Smanjenje eliptičnosti (Θ/mdeg) u ovisnosti o temperaturi praćeno je pri valnoj duljini od 222 nm. Ova valna duljina (λ = 222 nm) je karakteristična valna duljina pri kojoj se prate promjene strukture α-zavojnica. Točka infleksije zabilježena je na x_0 = 34,68 °C (Slika 10), a razlika sigmoidalnih parametara A2 – A1, kao mjera intenziteta promjene, iznosi 1238,89.

Mjerenje s automatskim podešavanjem temperature provedeno je na proteinu Cas3 koncentracije 1,2153 x 10^{-6} M. Protein je zagrijavan tri puta. Na slici 11A prikazano je smanjenje eliptičnosti u ovisnosti o temperaturi pri valnoj duljini od 222 nm kada je protein prvi puta zagrijavan do 55 °C. Točka infleksije je zabilježena na x0 = 35,27 °C, te razlika sigmoidalnih parametara A2 – A1 iznosi 1663,97 što je u skladu s rezultatima dobivenim ručnim podešavanjem. Protein je zatim ohlađen na 20 °C, ostavljen 30 minuta, a potom zagrijavan do 90 °C. Točka infleksije zabilježena je na x0 = 61,49 °C (slika 11B), a razlika sigmoidalnih parametara A2 – A1 iznosi 1311,53. Protein je još jednom ohlađen na 20 °C, a zatim je ponovo zagrijavan do 55 °C. Točka infleksije zabilježena je na x0 = 32,36 °C (slika 11C). Ponovnim hlađenjem i zagrijavanjem proteina željeli smo utvrditi je li promjena pri 35 °C reverzibilna. Nakon zagrijavanja do 90 °C, točka infleksije je na 61,49 °C, to vjerojatno upućuje na daljnje narušavanje helikoidalne strukture, koja nije bila potpuno narušena na nižim temperaturama. Pri ponovnom zagrijavanju proteina nije se ponovila točka infleksije na 35 °C što upućuje da je strukturna promjena nakon zagrijavanja ireverzibilna.

Iz ovih mjerenja može se zaključiti da na 35 °C vjerojatno dolazi do blage promjene u strukturi proteina Cas3 koja značajno utječe na njegovu aktivnost, što bi moglo objasniti prethodno primijećenu neaktivnost proteina Cas3 pri 37 °C (Majsec i sur. 2016). Rezultati diferencijalne pretražne fluorimetrije i kalorimetrije ukazuju da se značajnije strukturne promjene događaju pri nešto višim temperaturama (41,3 °C i 42 °C). Stoga se može pretpostaviti da je za gubitak aktivnosti proteina odgovorna suptilna promjena, vjerojatno u helikoidalnoj regiji proteina, koja se događa na 35 °C.

Termogrami dobiveni diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom (slika 8) i kalorimetrijom (slika 9) te promjena eliptičnosti u ovisnosti o valnoj duljini izmjerena cirkularnim dikroizmom (nije prikazano) pokazuju da pročišćeni Cas3 nije denaturiran te da se vjerojatno nalazi u aktivnom obliku.

3.3. Promjena aktivnosti proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vivo*

Genetičkom analizom pokazano je da je protein Cas3 limitirajući čimbenik u obrani Δ*hns* stanica *E. coli* od infekcije fagom λ pomoću sustava CRISPR-Cas, ako su stanice rasle preko noći na 37°C (Majsec et al. 2016). Aktivan protein Cas3 zaštitit će stanice *E. coli* od infekcije fagom λ što se može uočiti lošim zasađivanje faga λ na bakterijskoj livadi. Ukoliko je pak protein Cas3 nefunkcionalan, tada će doći do nastanka plakova prilikom infekcije stanica *E. coli* fagom λ. Kako bismo potvrdili da je za aktivnost proteina Cas3 važna konformacijska promjena proteina Cas3 na 35 °C, aktivnost sustava CRISPR-Cas (tj. proteina Cas3) je praćena određivanjem broja nastalih plakova po mililitru (PFUs/ml). Korišten je soj *E. coli* koji ima dvije razmaknice protiv faga λ i u kojem je sustav CRISPR-Cas aktivan zbog mutacije u genu regulatoru *hns* (soj IIB1040). Serijska decimalna razrjeđenja faga λ (od 10^{-2} do 10^{-6}) su nanesena na bakterijske livade koje su zatim inkubirane preko noći na različitim temperaturama: 30, 33, 34, 35, 36 i 37°C . Rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Ovisnost broja nastalih plakova (PFUs/ml) na bakterijskoj livadi soja IIB1040 o temperaturi inkubacije

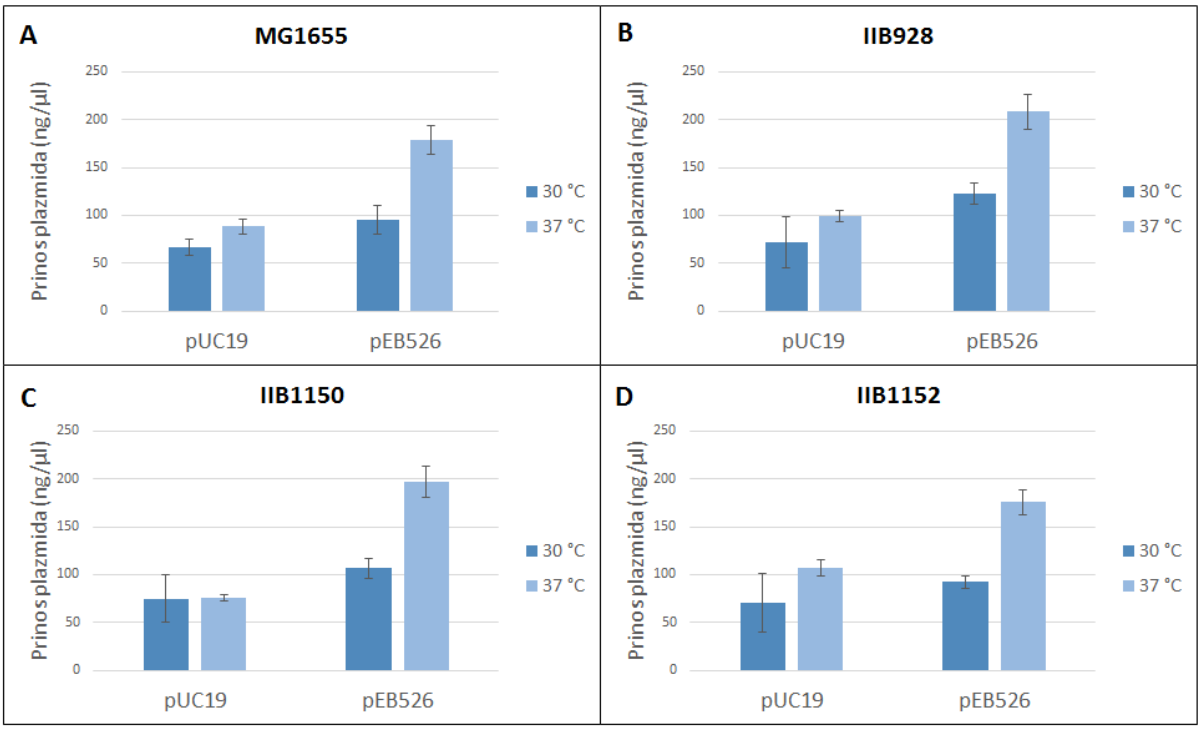
Temperatura (°C)	**PFUs/ml**
30	n.d.
33	n.d.
34	n.d.
35	$3{,}87 \times 10^9 \pm 1{,}34 \times 10^9$
36	$1{,}20 \times 10^{10} \pm 2{,}35 \times 10^9$
37	$1{,}09 \times 10^{10} \pm 8{,}73 \times 10^8$

n.d. (nije detektirano) – nisu se pojavili plakovi

Na temperaturama 30, 33 i 34 °C nisu se pojavili plakovi pri korištenim razrjeđenjima faga, što znači da je protein Cas3 aktivan na tim temperaturama. Plakovi su se pojavili na 35 °C, ali u nešto manjem broju nego na 37 °C ($3{,}87 \times 10^9 \pm 1{,}34 \times 10^9$ prema $1{,}09 \times 10^{10} \pm 8{,}73 \times 10^8$). Broj plakova se ustalio nakon 36 °C. Dakle, rezultati *in vivo* u skladu su s rezultatima dobivenim cirkularnim dikroizmom i pokazuju da konformacijska promjena proteina Cas3 na 35 °C utječe na aktivnost obrane sustavom CRISPR-Cas.

3.4. Utjecaj proteina H-NS i HtpG na stabilnost proteina Cas3 *in vivo*

Kako bi istražili utječu li na aktivnost proteina Cas3 *in vivo* i neki drugi čimbenici osim temperature, mjeren je prinos plazmida u sojevima MG1655 (divlji tip), IIB928 (Δ*hns*), IIB1150 (Δ*htpG*) i IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*) transformiranih s plazmidima pUC19 (prazan vektor) i pEB526 (*cas3* u pUC19) uzgajanih na 30 i 37 °C. Naime, pokazano je da replikacija plazmida tipa ColE1 (u koje spada pUC19) ovisi o proteinu Cas3 (Ivančić-Baće i sur. 2013), ali nije istraženo ovisi li replikacija plazmida o temperaturi i o proteinima H-NS i naročito HtpG, koji je potreban za aktivni oblik proteina Cas3 (Yosef i sur. 2013). Rezultati su prikazani na slici 12 i u tablici 8. Iz vijabilnosti stanica i udjela stanica s plazmidom, prikazanih u tablici 8, vidljivo je da uglavnom ne dolazi niti do gubitka vijabilnosti stanica niti do gubitka udjela stanica sa plazmidom (osim u sojevima 1150 + pUC19 i 1152 + pEB526 uzgojenima na 37 °C), što znači da promjene u prinosima plazmida nisu posljedica smanjene vijabilnosti stanica.



Slika 12. Utjecaj temperature na replikaciju plazmida pUC19 i pEB526 u sojevima: **A)** MG1655 (divlji tip), **B)** IIB928 (Δ*hns*), **C)** IIB1150 (Δ*htpG*) i **D)** IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*). Omeđenim crnim linijama su označene standardne devijacije. Za mjerenje prinosa plazmida korištene su barem dvije biološke replike.

Iz tablice 8 vidljivo je da je prinos plazmida znatno veći (oko dva puta) u svim sojevima transformiranima s plazmidom pEB526 uzgajanima na 37 °C u odnosu na 30 °C, dok se prinosi plazmida pUC19 ili ne razlikuju na 30 i na 37 °C ili je razlika manja. Za mjerenje prinosa plazmida su korištene barem dvije biološke replike.

Tablica 8. Prinosi i stabilnost plazmida u različitim sojevima

Soj *E.coli*	**Plazmid**	**Temperatura (°C)**	**Koncentracija plazmidne DNA (ng/µl)**	**OD_{600}**	**Vijabilnost stanica po mililitru (x 10^7)**	**Udio stanica otpornih na ampicilin (%)**
MG1655 (divlji tip)	pUC19	30	67,0 ± 8,66	2,00	594,3 ± 103	100
		37	88,5 ± 7,78	2,00	328,5 ± 43	100
	pEB526	30	95,2 ± 14,97	2,00	486,3 ± 108	89
		37	178,5 ± 14,85	2,00	376 ± 54	98
IIB928 (Δ*hns*)	pUC19	30	71,5 ± 26,42	2,00	276,7 ± 13	99
		37	99,2 ± 6,40	2,00	330,6 ± 7	83,5
	pEB526	30	122,5 ± 10,6	2,00	262,0 ± 27	94
		37	208,0 ± 18,4	2,00	267,0 ± 26	97,5
IIB1150 (Δ*htpG*)	pUC19	30	75,0 ± 24,4	2,00	438,7 ± 141	100
		37	75,5 ± 3,5	2,00	292,0 ± 4	75
	pEB526	30	106,8 ± 10,6	2,00	607,3 ± 28	91
		37	197,5 ± 16,3	2,00	269,0 ± 47	100
IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*)	pUC19	30	70,3 ± 30,5	2,00	304,0 ± 45	100
		37	107,0 ± 8,5	2,00	289,0 ± 1	100
	pEB526	30	92,5 ± 6,4	2,00	163,0 ± 31	94
		37	175,8 ± 13,1	2,00	278,5 ± 33	47

Kako bi se utvrdilo jesu li te razlike statistički značajne, napravljen je Welchov test. Rezultati su prikazani u tablicama 9, 10 i 11.

Tablica 9. Usporedba prinosa plazmida pUC19 na 30 i 37 °C u sojevima MG1655 (divlji tip), IIB928 (Δ*hns*), IIB1150 (Δ*htpG*) i IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*) pomoću Welchovog testa

Soj	**p-vrijednost**
MG1655 + pUC19	0,07873
IIB928 + pUC19	0,2079
IIB1150 + pUC19	0,9751
IIB1152 + pUC19	0,09313

Tablica 10. Usporedba prinosa plazmida pEB526 na 30 i 37 °C u sojevima MG1655 (divlji tip), IIB928 (Δ*hns*), IIB1150 (Δ*htpG*) i IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*) pomoću Welchovog testa

Soj	**p-vrijednost**
MG1655 + pEB526	0,01832
IIB928 + pEB526	0,04763
IIB1150 + pEB526	0,03589
IIB1152 + pEB526	0,03525

Tablica 11. Usporedba prinosa plazmida pUC19 i pEB526 na 30 °C u sojevima MG1655 (divlji tip), IIB928 (Δ*hns*), IIB1150 (Δ*htpG*) i IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*) pomoću Welchovog testa

Soj	**p-vrijednost**
MG1655	0,06178
IIB928	0,06407
IIB1150	0,1388
IIB1152	0,2444

Razlika u prinosu plazmida pUC19 na 30 i 37 °C nije statistički značajna, jer su sve p-vrijednosti veće od 0,05 (tablica 9), dok su razlike u prinosima plazmida pEB526 na 30 i 37 °C značajne u svim sojevima (p-vrijednost < 0,05), kao što je prikazano u tablici 10. Uspoređeni su i prinosi plazmida pUC19 i pEB526 na 30 °C u svim istraživanim sojevima (tablica 11). Razlike nisu statistički značajne u svim sojevima (p-vrijednost > 0,05), što upućuje da je replikacija plazmida s genom *cas3* na 30 °C slična replikaciji praznog plazmida. Nadalje, nije uočena razlika u prinosu plazmida u ovisnosti o genotipu istraživanih sojeva MG1655 (divlji

tip), IIB928 (Δ*hns*), IIB1150 (Δ*htpG*) i IIB1152 (Δ*hns* Δ*htpG*) što znači da proteini H-NS i HtpG nemaju utjecaja na ovaj proces, već samo temperatura inkubiranja.

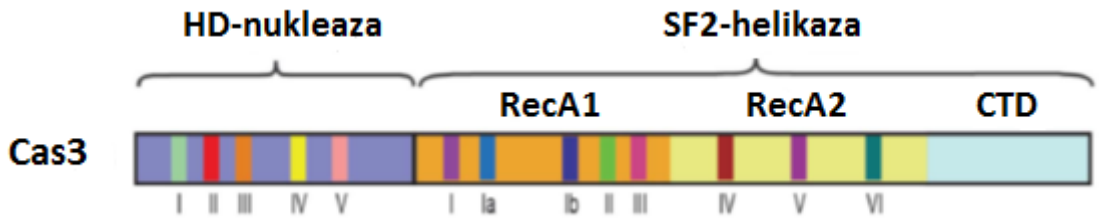
4. RASPRAVA

Majsec i suradnici su 2016. pokazali da je količina aktivnog proteina Cas3 odlučujući faktor za otpornost na infekciju fagom λ u sojevima Δ*hns*, i da ona ovisi o fazi rasta i o temperaturi inkubiranja. Sojevi Δ*hns* s ugrađenom razmaknicom λT3, koja je komplementarna dijelu genoma faga λ, otporni su na infekciju na 30 °C, ali ne i na 37 °C. Osjetljivost na infekciju nije posljedica nedostataka transkripata gena *cas3*, nego vjerojatno smanjene količine ili nestabilnosti proteina Cas3 (Majsec i sur. 2016). Ovim radom smo željeli istražiti razloge temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 te je li smanjenje aktivnosti rezultat konformacijske promjene tog proteina.

Za ispitivanje konformacijskih promjena potreban je pročišćeni protein Cas3. Cas3 je obilježen histidinskim privjeskom na N-kraju što je omogućilo njegovo pročišćavanje na koloni Ni-NTA. Prilikom pročišćavanja koristili smo kromosomski konstrukt umjesto plazmidnog zbog mogućeg nepovoljnog utjecaja proteina Cas3 na replikaciju plazmida (Ivančić-Baće i sur. 2013) i preveliku sintezu netopivog proteina, a uzgoj stanica nakon indukcije je bio na nižoj temperaturi. Upotrebom kolone Ni-NTA dobiven je pročišćeni protein Cas3 u dovoljnim koncentracijama za praćenje strukturnih promjena, no sadržavao je i druge proteine koji su identificirani spektrometrijom masa. Spektrometrijom masa identificirali smo protein Cas3 u dvije neposredno bliske vrpce (oko 100 i 90 kDa). Time smo zaključili da je Cas3 nestabilan protein te da dolazi do njegovog djelomičnog raspada. Zanimljivo, iz veličine fragmenta zaključili smo da krnjem proteinu Cas3 vrlo vjerojatno nedostaje C-terminalna domena (CTD; slika 13). C-terminalna domena proteina Cas3 služi za njegovo povezivanje s kompleksom Cascade (Gong i sur. 2014; Huo i sur. 2014), a smatra se da bi mogla biti važna za aktivnost i stabilnost proteina Cas3. Ova pretpostavka se temelji na opažanjima da domena CTD proteina TteCas3 (iz bakterije *Thermobaculum terreneum*) ima sličnu homologiju smatanja sa 60 aminokiselina ubikvitinu sličnom proteinu SMT3 koji je uključen u interakcije proteina s proteinom (Gong i sur. 2014), ali može utjecati i na stabilnost proteina (Weger i sur. 2004). Bit će stoga zanimljivo istražiti stabilnost i aktivnost krnjeg proteina Cas3 *in vitro* i *in vivo*.

Uz Cas3 često se eluiraju i drugi proteini koji su navedeni u tablici 5. Neki od tih proteina funkcioniraju kao šaperoni (primjerice GroEL i izomeraze), i stoga bi bilo zanimljivo istražiti stupaju li oni u interakciju s proteinom Cas3 ili su samo kontaminacije zbog nespecifičnog vezanja. Prisutnost drugih proteina u frakcijama obogaćenim proteinom Cas3 nam nije smetala

za daljnja mjerenja promjene konformacije proteina jer je količina tih proteina bila znatno manja od količine proteina Cas3. Mjerenja dobivena diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom, diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i cirkularnim dikroizmom ne ukazuju na denaturaciju proteina Cas3 prilikom pročišćavanja na koloni Ni-NTA što znači da se on nalazi u aktivnom obliku. Bilo bi dobro ponoviti pročišćavanje proteina Cas3 korištenjem drugog privjeska. Druga vrsta privjeska bi možda dovela do smanjenog udjela drugih proteina u frakcijama ili bi smanjila raspadanje proteina Cas3. Nadalje, histidinski privjesak može utjecati na konformaciju proteina (Carson i sur. 2007). Stoga, bilo bi dobro pokušati pročistiti protein Cas3 s privjeskom kojeg je moguće odcijepiti, primjerice SUMO (od engl. *small ubiquitin related modifier*) ili MBP (od engl. *maltose-binding protein*). Rad Coste i suradnika iz 2014. godine nudi pregled različitih strategija pročišćavanja proteina i privjesaka koji se koriste. Međutim, kako su rezultati *in vivo* s neobilježenim genom *cas3* potvrdili rezultate s pročišćenim obilježenim proteinom *in vitro* (vidjeti kasnije), može se zaključiti kako histidinski privjesak ipak ne smeta u analizi sekundarne strukture. Privjesak MBP se pokazao kao loš izbor jer se nije mogao odcijepiti i činio je protein Cas3 još nestabilnijim (Howard i sur. 2011).



Slika 13. Shema gena *cas3* iz bakterije *E. coli* s prikazanim konzerviranim domenama i motivima (preuzeto i prilagođeno prema: van der Oost i sur. 2014). CTD označava C-terminalnu domenu.

Dva mjerenja cirkularnim dikroizmom su pokazala da se prilikom zagrijavanja proteina Cas3 pojavljuje točka infleksije na 35 °C, koja označava središnju točku termalne promjene. Na 35 °C dolazi do promjene u helikoidalnoj strukturi proteina Cas3 koja vjerojatno utječe na njegovu aktivnost. Iako rezultati diferencijalne pretražne fluorimetrije i kalorimetrije ukazuju na veće strukturne promjene pri višim temperaturama (41,3 °C i 42 °C), zapravo je manja konformacijska promjena u helikoidalnoj strukturi koja se događa na 35 °C odgovorna za gubitak aktivnosti proteina Cas3. U ovom radu željeli smo provjeriti je li ta promjena reverzibilna, po uzoru na slične radove (Grimshaw i sur. 2001; Grimshaw i sur. 2003). Protein smo prvo zagrijali do 55 °C, zatim ohladili na 20 °C i ponovo zagrijali do 90 °C. S obzirom na

to da se točka infleksije na 35 °C nije pojavila u ponovnim mjerenjima, zaključili smo da je promjena ireverzibilna. No, kako su diferencijalna pretražna fluorimetrija i kalorimetrija pokazale da do velike strukturne promjene dolazi već na otprilike 42 °C, to upućuje da je 55 °C previsoka temperatura i da je protein tada vjerojatno znatno denaturiran. Bilo bi zanimljivo ponoviti mjerenja cirkularnim dikroizmom, ali tako da se protein u prvom ciklusu zagrijava do 42 °C kako bi se vidjelo je li konformacijska promjena reverzibilna.

Rezultati dobiveni cirkularnim dikroizmom su potvrđeni *in vivo*, određivanjem zasađivanja faga λ (pojave plakova) na bakterijskim livadama soja IIB1040. Taj soj ima dvije anti-lambda razmaknice i deletiran gen *hns*. Pojava plakova praćena je pri različitim temperaturama inkubacije. Plakovi se nisu pojavili tijekom inkubacije na 30, 33 i 34 °C, a pojavili su se na 35 °C i višim temperaturama (36 i 37 °C). To potvrđuje da je tada došlo do gubitka aktivnosti proteina Cas3 koja je vjerojatno uzrokovana konformacijskom promjenom. Prema našim saznanjima, ovo je prvi eksperimentalni nalaz da u proteinu Cas3 dolazi do konformacijske promjene uslijed koje protein Cas3 gubi svoju aktivnost, odnosno da je aktivnost proteina Cas3 izravno regulirana temperaturom. Zanimljivo, nedavno je uočeno da je sustav CRISPR/dCas9 iz *Streptococcus pyogenes* izgubio aktivnost na povišenoj temperaturi od 42 °C (Wiktor i sur. 2016). Autori nisu istraživali razloge temperaturne osjetljivosti, ali moguće je da je i aktivnost proteina Cas9, koji je nukleaza poput Cas3, regulirana promjenom temperature.

Ivančić-Baće i suradnici su 2013. pokazali da protein Cas3 stimulira replikaciju plazmida ColE1 u soju MG1655 uzgajanom na 37 °C koja ovisi o ATPaznoj/helikaznoj aktivnosti proteina Cas3. Kako bi istražili utjecaj temperature i drugih proteina (H-NS i HtpG) na ovaj efekt, prinos plazmida praćen na stanicama uzgojenim preko noći na 30 ili 37 °C i u mutantima Δ*hns*, Δ*htpG* i Δ*hns ΔhtpG*. Povećan prinos plazmida u soju MG1655 na 37 °C uzrokovan ekspresijom Cas3 potvrđen je i u ovom radu (slika 12A, tablica 8 i 10), ali nije uočen na 30 °C. Štoviše, prinos plazmida s genom *cas3* (pEB526) na 30 °C bio je sličan prinosu samog vektora (pUC19; slika 12 i tablica 8) što je potvrđeno i statističkom analizom (tablica 11). Sam vektor nije pokazao razliku u prinosu ovisnu o temperaturi inkubiranja (tablica 8 i 9). To ukazuje da na nižoj temperaturi protein Cas3 ne utječe na replikaciju plazmida. Nadalje, prinos plazmida nije ovisio o genotipu stanica, i u svim mutantima je uočen 2 puta veći prinos plazmida pEB526 na 37 °C u odnosu na 30 °C kao i u stanicama divljeg tipa (slika 12, tablica 8) i razlika je statistički značajna (tablica 10). Svi navedeni rezultati ukazuju da promjena u replikaciji plazmida ovisi isključivo o proteinu Cas3 i temperaturi uzgoja, a ne o drugim proteinima. Ovaj

rezultat je dijelom neočekivan budući da se za protein HtpG smatra da je neophodan za stabilnost proteina Cas3 i bez njega je Cas3 mogao postati još nestabilniji (Yosef i sur. 2011). Međutim, povećan prinos plazmida posredovan proteinom Cas3 je također neočekivan, jer Cas3 inače razgrađuje R-omče (Westra i sur. 2010). S druge strane, prinos plazmida je povećan na temperaturi kada je protein Cas3 promijenio konformaciju i nije aktivan u obrani bakterija. Moguće je da HtpG ne može utjecati na ovu promjenu konformacije, jer se ona ne događa na povišenoj temperaturi na kojoj inače djeluju šaperoni (42 °C), već na fiziološkoj. Ovaj rezultat stoga može objasniti zašto povećana količina proteina HtpG nije mogla spasiti neaktivnost proteina Cas3 u obrani baterija na 37 °C (Majsec i sur. 2016). S druge strane, moguće je da konformacijskom promjenom protein Cas3 stekao novu funkciju (*gain of function*) pomoću koje potiče replikaciju plazmida tipa ColE1 neovisno o sustavu CRISPR-Cas. U prilog ovoj pretpostavci govori podatak da u svojem aktivnom obliku protein Cas3 ne utječe na replikaciju plazmida već se tada ponaša kao dio sustava CRISPR-Cas. Ostaje nepoznato da li uz promjenu konformacije dolazi i do proteolitičkog gubitka dijela proteina, što možda sugerira uočena krnja frakcija proteina. Bit će potrebna dodatna istraživanja kako bi se bolje razjasnila regulacija aktivnosti proteina Cas3 i uloga eventualnih proteaza u tom procesu. Za početak, kako bi se utvrdilo u kojem dijelu proteina se događa konformacijska promjena, potrebno je analizirati spektre dobivene cirkularnim dikroizmom pomoću nekog od algoritama koje su naveli Kelly i suradnici 2005. ili modeliranjem proteina *in silico* koristeći kao matricu dostupne strukture proteina Cas3 iz bakterija *Thermobaculum terrenum* (Gong i sur. 2014) i *Thermobifida fusca* (Huo i sur. 2014). Nakon toga bi trebalo uvesti mutacije u taj dio proteina i zatim ga analizirati *in vitro* i *in vivo*, kako bi se potvrdili ovi rezultati.

Neobično svojstvo proteina Cas3 moglo bi se upotrijebiti za povećanje prinosa plazmida tipa ColE1.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti:

1) Protein Cas3 obilježen histidinskim privjeskom na N-kraju uspješno je pročišćen afinitetnom kromatografijom pomoću kolone Ni-NTA.

2) Spektrometrijom masa identificiran je i krnji protein Cas3, što ukazuje na moguću nestabilnost proteina Cas3, ali i drugi bakterijski proteini, koji bi mogli biti potencijalni interakcijski partneri.

3) Mjerenja dobivena diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom, diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i cirkularnim dikroizmom pokazuju da je protein Cas3 pročišćen u aktivnom obliku.

4) Protein Cas3 pokazuje promjenu u eliptičnosti na 222 nm i pri temperaturi od 35 °C (točka infleksije) što ukazuje na konformacijske promjene ovog proteina u helikoidalnoj regiji.

5) Inkubacijom bakterija na 35°C dolazi do boljeg zasađivanja faga λ, odnosno dolazi do gubitka aktivnosti proteina Cas3 *in vivo*.

6) Replikacija plazmida tipa ColE1 s kloniranim genom *cas3* nije povećana na 30 °C i ne ovisi o proteinima H-NS i HtpG.

6. LITERATURA

Babu M., Beloglazova N., Flick R., Graham C., Skarina T., Nocek B., Gagarinova A., Pogoutse O., Brown G., Binkowski A., Phanse S., Joachimiak A., Koonin E.V., Savchenko A., Emili A., Greenblatt J., Edwards A.M., Yakunin A.F. (2011): A dual function of the CRISPR–Cas system in bacterial antivirus immunity and DNA repair. Mol Microbiol **79**: 484-502.

Bardwell J.C.A., Craig E.A. (1987): Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **84**: 5177-5181.

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 **315**:1709-1712.

Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science **277**: 1453–1462.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-254.

Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science **321**: 960-964.

Carson M., Johnson D.H., McDonald H., Brouillette C., Delucas L.J. (2007): His-tag impact on structure. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **63**: 295-301.

Cesareni G., Muesing M.A., Polisky B. (1982): Control of ColEl DNA replication: The *rop* gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. Proc Natl Acad Sci U S A **79**: 6313-6317.

Costa S., Almeida A., Castro A., Domingues L. (2014): Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. Front Microbiol **5**: 63.

Dasgupta S., Masukata H., Tomizawa J. (1987): Multiple mechanisms for initiation of ColE1 DNA replication: DNA synthesis in the presence and absence of ribonuclease H. Cell **51**: 1113-1122.

Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 6640-6645.

Díez-Villaseńor C., Almendros C., García-Martínez J., Mojica F.J. (2010): Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. Microbiology **156**: 1351-1361.

Gong B., Shin M., Sun J., Jung C.H., Bolt E.L., van der Oost J., Kim J.S. (2014): Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. Proc Natl Acad Sci U S A **111**: 16359-16364.

Grimshaw J.P.A., Jelesarov I., Schönfeld H.J., Christen P. (2001): Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system. J Biol Chem **276**: 6098-6104.

Grimshaw J.P.A., Jelesarov I., Siegenthaler R.K., Christen P. (2003): Thermosensor action of GrpE. J Biol Chem **278**: 19048-19053.

Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E. (2005): A guild of 45 CRISPR associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Comput Biol **1**: 474-483.

Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Terns R.M., Terns M.P. (2009): RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. Cell **139**, 945–956.

Heidelberg J.F., Nelson W.C., Schoenfeld T., Bhaya D. (2009): Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. PLoS One **4**: e4169.

Hochstrasser M.L., Taylor D.W., Bhat P., Guegler C.K., Sternberg S.H., Nogales E., Doudna J.A. (2014): CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. Proc Natl Acad Sci U S A **111**: 6618-6623.

Howard J.L., Delmas S., Ivančić-Baće I., Bolt E.L. (2011): Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. Biochem J **439**: 85-95.

Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell **157**: 1262-1278.

Huo Y., Nam K.H., Ding F., Lee H., Wu L., Xiao Y., Farchione D., Zhou S., Rajashankar K., Kurinov I., Zhang R., Ke A. (2014): Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. Nat Struct Mol Biol **21**: 771-777.

Itoh T., Tomizawa J. (1980): Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. Proc Natl Acad Sci U S A **77**: 2450-2454.

Ivančić-Baće I., Howard J.L., Bolt E.L. (2012): Tuning in to interference: R-Loops and Cascade complexes in CRISPR immunity. J Mol Biol **422**: 607-616.

Ivančić-Baće I., Radovčić M., Bočkor L., Howard J.L., Bolt E.L. (2013): Cas3 stimulates runaway replication of a ColE1 plasmid in *Escherichia coli* and antagonizes RNaseHI. RNA Biol **10**: 770-778.

Jansen R., van Embden J.D.A., Gaastra W., Schouls L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol **43**: 1565-1575.

Jore M.M., Lundgren M., van Duijn E., Bultema J.B., Westra E.R., Waghmares S.P., Wiedenheft B., Pul Ü., Wurm R., Wagner R., Beijer M.R., Barendregt A., Zhou K., Snijders A.P.L., Dickman M.J., Doudna J.A., Boekema E.J., Heck A.J.R., van der Oost J., Brouns S.J.J. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. Nat Struct Mol Biol **18**: 529-537.

Karas M., Hillencamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem **60**: 2299-2301.

Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. (2005): How to study proteins by circular dicroism. Biochim Biophys Acta **1751**: 119-139.

Kunin V., Sorek R., Hugenholtz P. (2007): Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. Genome Biol **8**: R61.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

Liu Y., Chen H., Kenney L.J., Yan J. (2010): A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. Genes Dev **24**:339–344.

Majsec K., Bolt E.L., Ivančić-Baće I. (2016): Cas-3 is a limitating factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. BMC Microbiol **16**: 28-36.

Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. (2006): A putative RNA interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct **1**:7.

Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., van der Oost J., Koonin E.V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol **9**: 467–477.

Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nat Rev Microbiol **13**: 722-736

Marraffini L.A., Sontheimer E.J. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in Staphylococci by targeting DNA. Science **322**: 1843-1845.

Marraffini L.A., Sontheimer E.J. (2010): CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet **11**: 181–190.

Mojica F.J.M., Díez-Villaseńor C., García-Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol **60**: 174-182.

Mojica F.J.M., Díez-Villaseńor C., García-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology **155**: 733-740.

Nam K.H., Huang Q., Ke A. (2012): Nucleic acid binding surface and dimer interface revealed by CRISPR-associated CasB protein structures. FEBS Lett **586**: 3956-3961.

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. Nat Struct Mol Biol **21**: 528–534.

Pougach K., Semenova E., Bogdanova E., Datsenko K.A., Djordjevic M., Wanner B.L., Severinov K. (2010): Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **77**: 1367-1379.

Pul U., Wurm R., Arslan Z., Geiβen R., Hofmann N., Wagner R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-*cas* promoters and their silencing by H-NS. Mol Microbiol **75**: 1495-1512.

Sinkunas T., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2011): Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. EMBO J **30**: 1335-1342.

Stoebel D.M., Free A., Dorman C.J. (2008): Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. Microbiology **154**: 2533-2545.

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol **189**:113–130.

Subia N.L., Kogoma T. (1986): Concatemer formation of ColE1-type plasmids in mutants of *Escherichia coli* lacking RNase H activity. J Mol Biol **189**: 389-399.

van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. (2014): Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol **12**: 479-492.

Vieira J., Messing J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-268.

Vincent S.D., Mahdi A.A., Lloyd R.G. (1996): The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. J Mol Biol **264**: 713-721.

Weger S., Hammer E., Heilbronn R. (2004): SUMO-1 modification regulates the protein stability of the large regulatory protein Rep78 of adeno associated virus type 2 (AAV-2). Virology **330**: 284-294.

Westra E.R., Pul Ü, Heidrich N., Jore M.M., Lundgern M., Stratman 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. Mol Microbiol **77**: 1380-1393.

Westra E.R., van Erp P.B.G., Künne T., Wong S.P., Staals R.H.J., Seegers C.L.C., Bollen S., Jore M.M., Semenova E., Severinov K., de Vos W.M., Dame R.T., de Vries R., Brouns S.J.J., van der Oost J. (2012): CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. Mol Cell **46**: 595-605.

Wiktor J., Lesterlin C., Sherratt D.J., Dekker C. (2016): CRISPR-mediated control of the bacterial initiaton of replication. Nucleic Acids Res **44**: 3801-3810.

Yosef I., Goren M.G., Kiro R., Edgar R., Qimron U. (2011): High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 20136-20141.

ŽIVOTOPIS

Ime	**Anja Čulo**
Datum rođenja	**20. studenog 1992.**
Adresa	**Vidikovac 43a, 43 000 Bjelovar, Hrvatska**
E-Mail	**anja.culo@gmail.com**
Broj mobitela	**+ 385 98 9682 646**

OBRAZOVANJE

2014. – 2017. **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

2011. – 2014. **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

ISKUSTVO

travanj 2016. – studeni 2016. **Izrada diplomskog rada**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju
Tema: Mehanizam temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*
Mentorice: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće i doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

listopad 2015. – travanj 2016. **Modul Računalna biologija**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju

lipanj 2014. – svibanj 2015. **Laboratorijska praksa**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju
Tema: Proučavanje potencijalnog fitoremedijatora *Nicotiana glauca*
Mentorica: dr. sc. Kristina Majsec

svibanj 2015. **Demonstratorica (kolegij Molekularna genetika)**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju

srpanj 2013. **Terenska nastava iz botanike i zoologije**
Petrinja