

Utjecaj točkastih mutacija na aktivnosti i sekundarnu strukturu proteina Cas3 iz bakterije Escherichia coli

Pandžić, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:259964>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marta Pandžić

Utjecaj točkastih mutacija na aktivnost i sekundarnu strukturu proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće i poslijedoktorantici dr. sc. Dori Markulin na ukazanom povjerenju, a ponajviše na strpljivosti i optimizmu prilikom izrade ovog rada.

Ujedno se zahvaljujem i asistentu mag. biol. mol. Marinu Radovčiću na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimenata i održavanju uvijek pozitivne i opuštene atmosfere.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom čitavog studija i cimerici Nori na mudrim savjetima i motivaciji u ključnim trenucima.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2016-06-8861 „Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*“.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ TOČKASTIH MUTACIJA NA AKTIVNOST I SEKUNDARNU STRUKTURU PROTEINA CAS3 IZ BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

Marta Pandžić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas predstavlja važan mehanizam obrane prokariota od stranih molekula DNA i RNA. Sastoji se od lokusa CRISPR, kojeg čine ponavljajuće sekvence DNA između kojih se nalaze razmaknice porijeklom iz plazmida ili bakteriofaga, i geni *cas*. Transkripcijom lokusa CRISPR nastaje pre-crRNA iz koje procesiranjem nastaju crRNA komplementarne stranog DNA ili RNA. Udruživanjem s proteinskim kompleksom proteina Cas, crRNA služe kao smjernica za prepoznavanje stranih nukleinskih kiselina. Kompleks Cascade dovodi protein Cas3 koji potom degradira ciljnu DNA. Cas3 sadrži nukleaznu i helikaznu domenu čijom aktivnošću štiti bakteriju od invazije stranom DNA. Aktivnost Cas3 ovisna je o temperaturi i primijećeno je da pri temperaturi od 35 °C dolazi do suptilne promjene u helikoidalnoj regiji pročišćenog proteina Cas3 te gubitka zaštitne aktivnosti sustava CRISPR-Cas *in vivo*. U ovom radu cilj je bio uvođenjem točkastih mutacija u tri različite α -zavojnice proteina Cas3 pronaći onu koja mijenja položaj i time utječe na aktivnost proteina. Praćenjem promjene sekundarne strukture proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vitro* utvrđeno je da dvije α -zavojnice nisu odgovorne za gubitak aktivnosti. Iz preživljenja faga λ rezultati ukazuju na mogućnost da bi α -zavojnica smještena najbliže nukleaznom centru mogla biti odgovorna za promjenu aktivnosti proteina Cas3, a uočena je samo u proteinu Cas3 bakterije *Escherichia coli*.

(50 stranica, 15 slika, 14 tablica, 48 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, Cas3, temperatura

Voditeljica: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

dr. sc. Ana Previšić, doc.

Zamjena: dr.sc. Biljana Balen, red. prof.

Rad prihvaćen: 13. veljače 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

THE EFFECT OF POINT MUTATIONS ON THE ACTIVITY AND SECONDARY STRUCTURE OF CAS3 PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*

Marta Pandžić

Rooseveltovo trg 6, 1000 Zagreb, Croatia

The CRISPR-Cas system represents an important defense mechanism of prokaryotes against mobile genetic elements. It is composed of an array of short DNA repeats separated by spacer sequences derived from plasmids or bacteriophages, and *cas* genes. Pre-crRNA is transcribed from the CRISPR array and is processed into short crRNAs. Incorporated into protein complex, crRNA serves as a guide for foreign nucleic acid recognition. Protein complex then recruits Cas3 protein that degrades the target DNA. Cas3 consists of nuclease and helicase domain whose activities protect bacteria from invading DNA. Cas3 protein activity is temperature dependent, and it was observed that at 35 °C subtle changes occurred in the helical region of the purified Cas3 and protection by the CRISPR-Cas activity was lost *in vivo*. The aim of this work was to introduce point mutations into three different α -helices of the Cas3 protein and identify the one responsible for altering position and thus affecting the protein activity. By measuring the changes in secondary structure of the Cas3 protein at different temperatures *in vitro*, it was found that two α -helices are not responsible for the loss of the Cas3 activity. *In vivo* results suggest that α -helix situated near the nuclease centre may be responsible for the change in Cas3 activity, and it is observed only in Cas3 in *Escherichia coli*.

(50 pages, 15 figures, 14 tables, 48 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: CRISPR-Cas, Cas3, temperature

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Dr. Ana Previšić, Asst. Prof.

Substitution: Dr. Biljana Balen, Prof.

Thesis accepted: February 13, 2019

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Sustav CRISPR-Cas.....	1
1.2.	Mehanizam obrane posredovan sustavom CRISPR-Cas	2
1.3.	Klasifikacija sustava CRISPR-Cas	3
1.4.	Sustav CRISPR-Cas tipa I-E.....	6
1.5.	Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja	10
2.	MATERIJALI I METODE	12
2.1.	Materijali.....	12
2.1.1.	Sojevi.....	12
2.1.2.	Plazmidi	12
2.1.3.	Hranidbene podloge	13
2.1.4.	Komercijalni kompleti („kitovi“).	13
2.1.5.	DNA i proteinski standardi (markeri)	14
2.1.6.	Boje	14
2.1.7.	Protutijela	14
2.1.8.	Otopine	15
2.2.	Metode.....	17
2.2.1.	Uzgoj bakterijskih sojeva	17
2.2.2.	Uvođenje ciljanih točkastih mutacija u plazmidne konstrukte	17
2.2.3.	Agarozna gel elektroforeza i određivanje koncentracije DNA	18
2.2.4.	Priprema kemijski kompetentnih bakterija i transformacija bakterija plazmidnom DNA.....	18
2.2.5.	Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije	19
2.2.6.	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE).....	21
2.2.7.	Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (metoda <i>Western blot</i>).....	22
2.2.8.	Masena spektrometrija	23
2.2.8.1.	Izrezivanje i digestija proteina u gelu	23
2.2.8.2.	Ekstrakcija peptida iz gela.....	23
2.2.8.3.	Pročišćavanje peptida metodom ZipTip C ₄	23
2.2.8.4.	Analiza peptida MALDI-TOF/TOF analizatorom masa.....	24
2.2.8.5.	Obrada podataka – identifikacija proteina iz gela	25
2.2.9.	Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom	25

2.2.10. Intrinzična fluorescencija triptofana	26
2.2.11. Cirkularni dikroizam	26
2.2.12. Određivanje formiranja čistina faga λ pri različitim temperaturama inkubacije	27
3. REZULTATI.....	28
3.1. Pročišćavanje proteina Cas3	28
3.2. Konformacijske promjene pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi <i>in vitro</i>	34
3.3. Promjena aktivnosti proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi <i>in vivo</i>	38
4. RASPRAVA	40
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA.....	46
ŽIVOTOPIS	51

POPIS KRATICA

CRISPR	od eng. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cas	od eng. <i>CRISPR-associated genes</i>
crRNA	CRISPR RNA
PAM	od eng. <i>protospacer adjacent motif</i>
Cascade	od eng. <i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>
tracrRNA	od eng. <i>trans-activating CRISPR RNA</i>
HEPN	od eng. <i>higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain</i>
ATP	adenozin trifosfat
SF2	od eng. <i>Superfamily 2</i>
CTD	C-terminalna domena
LB	od eng. <i>Luria broth</i>
PCR	od eng. <i>polymerase chain reaction</i>
Ni-NTA	nikal-nitrilotriocetna kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
dH ₂ O	destilirana voda
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
AA/Bis	akrilamid/bisakrilamid
APS	amonijev persulfat
TEMED	tetrametiletilendiamin
CBB	<i>Commassie brilliant blue</i>
TFA	trifluorocetna kiselina
CHCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
MALDI	laserska desorpcijska ionizacija uz pomoć matrice
TOF	od eng. <i>time of flight</i>
NCBI	od eng. <i>National Center for Biotechnology Information database</i>
MRE	od eng. <i>mean residue ellipticity</i>

PFU od eng. *plaque-forming units*

Trp triptofan

1. UVOD

1.1. Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated genes*) predstavlja važan mehanizam obrane prokariota od stranih molekula DNA i RNA, kao što su plazmidi i virusni genomi. Ovaj sustav obrane primjer je stečene imunosti, a sastoji se od lokusa CRISPR i pripadajućih gena *cas* (od eng. *CRISPR-associated genes*), skupine konzerviranih gena koji se nalaze u blizini lokusa (Faure i sur. 2018). Sustav je prvo zamijetio Ishino zajedno sa svojim suradnicima 1987. godine kada su, sekvencirajući gen *iap*, nizvodno od njega primijetili palindromska ponavljanja od 29 nukleotida međusobno odvojenih nepovezanim, neponavljajućim kratkim nukleotidnim sljedovima (razmaknice, eng. *spacers*) (Ishino i sur. 1987). Takvu strukturu Jansen 2002. godine naziva imenom CRISPR, a pripadajuće gene *cas* (Jansen i sur. 2002). Pretpostavka da prokariotski organizmi imaju nekakvu vrstu imunološkog odgovora potvrdila se 2007. godine kada je u bakteriji *Streptococcus thermophiles* zamijećena ugradnja nove razmaknice u lokusu nakon invazije virusom te otpornost na faga (Barrangou i sur. 2007; Deveau i sur. 2008; Horvath i sur. 2008).

Sustav CRISPR-Cas nalazi se u otprilike 50% bakterijskih i 87% arhejskih genoma (Makarova i sur. 2013). Moguće objašnjenje nedostatka lokusa CRISPR u više od polovice sekvenciranih bakterijskih genoma pristranost je sekvencioniranju bakterijskih laboratorijskih sojeva koji su zbog nedostatka izlaganja bakteriofagima možda izgubili lokus CRISPR. Lokus CRISPR sastoji se od dvije do nekoliko stotina ponavljajućih palindromskih sekvenci DNA (najveći broj palindromskih ponavljanja od 374 sadrži genom termofilne bakterije *Chloroflexus* sp.), veličine između 25 i 50 parova baza, između kojih se nalaze razmaknice veličine između 17 i 84 parova baza porijeklom iz plazmida ili bakteriofaga (Marraffini i Sontheimer 2010). Ugradnjom novih razmaknica na početku postojećeg lokusa CRISPR bakterija stječe dodatnu otpornost na invaziju nekim fagom ili plazmidom (Barrangou i sur. 2007). U skladu s tim, sadržaj lokusa CRISPR daje informaciju svih prethodnih plazmida ili faga na koje je domaćin naišao predstavljajući zaštitu od novih, povratnih i uvijek prisutnih invadirajućih DNA molekula (Marraffini i Sontheimer 2010). Uzvodno od lokusa CRISPR nalazi se „vodeća“ sekvenca, regija koja sadrži promotor odgovoran za prepisivanje lokusa, dužine nekoliko stotina parova baza te

regija bogata nukleotidima adeninom i timinom (Pougach i sur. 2010). Geni *cas* nalaze se uzvodno ili nizvodno od lokusa CRISPR te njihovom ekspresijom dolazi do nastanka proteina Cas odgovornih za različite korake u obrani bakterija (Marraffini i Sontheimer 2010). Transkripcijom lokusa CRISPR nastaje prekursorska CRISPR RNA (pre-crRNA) iz koje procesiranjem nastaju kratke CRISPR RNA (crRNA) komplementarne stranoj DNA ili RNA. Udruživanjem s proteinskim kompleksom proteina Cas, crRNA služe kao smjernica za prepoznavanje stranih nukleinskih kiselina (Faure i sur. 2018).

1.2. Mehanizam obrane posredovan sustavom CRISPR-Cas

Mehanizam obrane posredovan sustavom CRISPR-Cas odvija se u tri različite faze:

- 1) Faza adaptacije koja je posredovana kompleksom proteina Cas koji u gotovo svim slučajevima uključuje Cas1 i Cas2 i često dodatne proteine Cas, kao što je Cas4. Adaptacijski kompleks veže stranu DNA i, u većini slučajeva, prepoznaje kratku sekvencu PAM (od eng. *protospacer adjacent motif*) veličine 2 do 6 parova baza. Nakon prepoznavanja sekvence PAM, izrezuje se dio strane DNA, tzv. protorazmaknica (eng- *protospacer*) porijeklom od plazmida ili bakteriofaga, procesira se i ugrađuje u lokus CRISPR kao razmaknica (Jackson i sur. 2017; Sternberg i sur. 2016). Sekvenca PAM smještena je uz protorazmaknicu u stranoj DNA, a odsutna iz lokusa CRISPR, što omogućuje stanici da razlikuje vlastiti od stranog genoma (Marraffini i Sontheimer 2008).
- 2) Faza ekspresije i sazrijevanja crRNA u kojoj dolazi do prepisivanja lokusa CRISPR u dugu prekursoru pre-crRNA koja se zatim procesira u male, zrele crRNA sa strukturom ukosnice na 3' kraju. Za prepisivanje lokusa CRISPR odgovorna je vodeća sekvenca unutar koje se nalazi promotor kojeg prepoznaje σ -70 RNA polimeraza (Pul i sur. 2010). Svaka zrela crRNA sadrži sekvencu razmaknice i fragmente susjednih ponavljanja. Ovisno o vrsti sustava CRISPR-Cas, procesiranje crRNA posredovano je posebnim kompleksom proteina Cas, zasebnim velikim proteinom Cas ili je za procesiranje odgovorna RNaza, poput Rnaze III (Charpentier i sur. 2015).
- 3) Faza interferencije gdje crRNA služi kao smjernica za prepoznavanje sekvenci komplementarnih (ili djelomično komplementarnih) sekvenci protorazmaknice u

genomu plazmida ili virusa, nakon čega slijedi cijepanje i inaktivacija stranog genoma nukleazama Cas (Plagens i sur. 2015).

1.3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas

Ubrzana evolucija većine gena *cas* i izuzetna varijabilnost u sastavu i dužini lokusa CRISPR predstavlja veliki izazov prilikom klasifikacije sustava CRISPR-Cas. Proteini Cas svrstani su u 45 porodica (Haft i sur. 2005), a lokusi CRISPR u 18 porodica, prema strukturi, i u 24 porodice prema vrsti sekvence (Makarova i sur. 2015). 6 porodica gena *cas* (*cas1-cas6*) pronađeno je u širokom rasponu tipova sustava CRISPR-Cas te se smatraju „jezgrenim“ genima. Od njih, geni *cas1* i *cas2* prisutni su u gotovo svim sustavima CRISPR-Cas (u nekim sustavima CRISPR-Cas *Cas2* kodiran je kao fuzionirana domena proteina *Cas3*) (Haft i sur. 2005). Gen *cas1* kodira za protein *Cas1*, metal-ovisnu DNazu koja posreduje integraciju DNA razmaknice u lokus CRISPR, a protein *Cas2* je metal-ovisna endoribonukleaza čija je uloga u mehanizmu sustava CRISPR-Cas još nepoznata (Makarova i sur. 2011b). *Cas1* i *Cas2* zajedno tvore kompleks koji je potreban u fazi adaptacije (Makarova i sur. 2015).

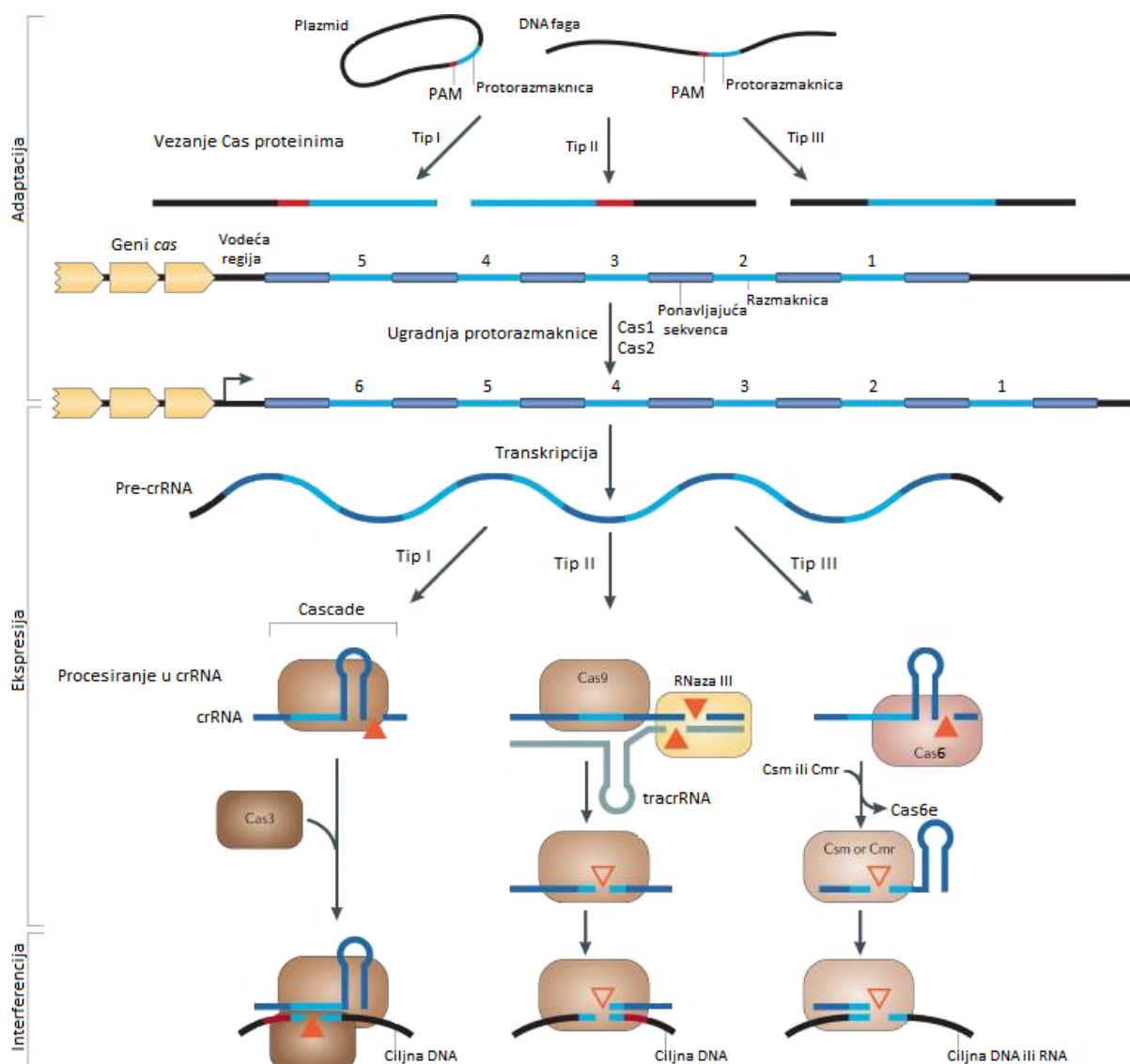
Idealno, klasifikacija bi trebala predstavljati evolucijske odnose između različitih sustava CRISPR-Cas, no brojni rearanžmani lokusa te horizontalni prijenos pojedinih ili čak svih gena *cas* rezultirali su složenom mrežom evolucijskih odnosa koji se ne mogu lako podijeliti na mali broj različitih skupina. Stoga su Makarova i njeni suradnici pristupili klasifikaciji na način da su najprije identificirali sve gene *cas* u svakom od lokusa CRISPR-Cas, a zatim odredili jedinstvene gene i genske strukture za pojedine lokuse koji bi omogućili podjelu po tipovima i podtipovima. Podijelili su sustave CRISPR-Cas na dva razreda, koji se razlikuju s obzirom na sastav i strukturu efektorskih kompleksa odgovornih za interferenciju i fazu procesiranja, te na pet tipa. U sustavima razreda 1 (tipovi I, III i IV) efektorski kompleks sastoji se od više proteina Cas čineći heteromerni kompleks koji obavlja usko koordiniran niz reakcija, od pre-crRNA procesiranja do cijepanja strane DNA. U sustavima razreda 2 (tipovi II, V), funkcije efektorskog kompleksa sadržane su u jednom proteinu, primjerice proteinu *Cas9* (tip II), endonukleaze koja se danas najčešće koristi u svrhe genetičkog inženjerstva (Makarova i sur. 2015).

Daljnjom analizom sustava CRISPR-Cas identificirani su novi podtipovi sustava CRISPR-Cas tipa V, te novi tip VI, s dodatna 3 podtipa, koji je pridružen razredu 2 (Koonin i sur. 2017; Yan i sur. 2019).

Razredu 1 pripada najčešći tip I, tip III koji je zastupljeniji u arhealnim genomima te rijetko zastupljen tip IV. Sustavi CRISPR-Cas tipa I podijeljeni su u sedam podtipova, od I-A do I-F i I-U te se razlikuju po broju gena i organizaciji operona, ali svi sadrže gen *cas3* (ili njegovu varijantu *cas3'*) koji kodira za protein Cas3, ATP-ovisnu helikazu i nukleazu (Makarova i sur. 2015). Prepisivanjem lokusa CRISPR dobiva se pre-crRNA koja se zatim procesira u kratke, zrele crRNA pomoću ribonukleaze Cas6 (Cse3 ili CasE). Dolazi do formiranja kompleksa proteina Cascade (od eng. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) koji zajedno sa zreloom crRNA prepoznaje i veže stranu DNA na temelju komplementarnosti. U zadnjem koraku mehanizma obrane, cijepanju i inaktivaciji strane DNA, glavnu ulogu ima protein Cas3 zahvaljujući svojim helikaznim i endonukleaznim domenama (Plagens i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa III sadrže gen *cas10* koji čini najveću podjedinicu kompleksa crRNA i efektorskih proteina te je često fuzioniran za HD nukleaznu domenu (koja se razlikuje od nukleazne domene sustava CRISPR-Cas tipa I). Podijeljeni su u četiri podtipa, III-A do III-D, ovisno o tome čini li malu podjedinicu protein Csm2 (u slučaju III-A i III-D) ili Cmr5 (u slučaju III-B i III-C). Podtip III-A obično sadrži gene *cas1*, *cas2* i *cas6*, dok ih većina lokusa III-B nema (Makarova i sur. 2015). Pokazalo se da podtipovi ovog sustava mogu cijepati stranu DNA i RNA (Samai i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa IV kodiraju za kompleks crRNA i efektorskih proteina koji se sastoji od djelomično degradirane velike podjedinice Csf1, Cas5 i Cas7 te, u nekim slučajevima, i male podjedinice. Slično većini lokusa podtipa III-B, ovom sustavu nedostaju geni *cas1* i *cas2*, a gen *csf1* (gen *cas8-like*) se uzima kao jedinstveni gen za ovaj tip sustava CRISPR-Cas (Makarova i sur. 2011a).

Razredu 2 pripadaju tipovi II, V i VI. Sustavi CRISPR-Cas tipa II najjednostavniji su što se tiče broja gena. Podijeljeni su u tri podtipa (II-A, II-B i II-C), svi sadrže gene *cas9*, *cas1* i *cas2*, a većina lokusa kodira i tracrRNA (od eng. *trans-activating CRISPR RNA*) koja je djelomično komplementarna s ponavljajućim sekvencama lokusa CRISPR (Makarova i sur. 2015). Prilikom procesiranja pre-crRNA, tracrRNA se veže na ponavljajuće sekvence pre-crRNA, stvarajući hibrid kojeg stabilizira Cas9, a zatim ih Rnaza III cijepa i obrađuje. Hibrid tracrRNA i crRNA potom usmjeruje protein Cas9 do strane DNA gdje Cas9 stvara dvolančane lomove zahvaljujući svojim domenama HNH i

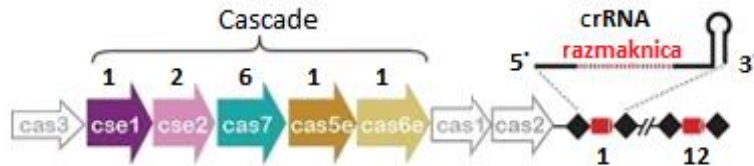
RuvC. Domena HNH Cas9 cijepa lanac DNA koji je komplementaran sekvenci razmaknice u crRNA, a domena nalik RuvC (eng. *RuvC-like domain*) cijepa lanac nasuprot komplementarnog lanca (Deltcheva i sur. 2011). Razvojem strukture koja povezuje tracrRNA i crRNA u jednu molekulu, tzv. single-guide RNA koja je sposobna raditi komplekse s Cas9 za uspješno cijepanje ciljane DNA, razvila se i mogućnost korištenja sustava tipa II u svrhe genetičkog inženjerstva (Jinek i sur. 2012). U sustavima CRISPR-Cas tipa V ulogu efektorskog proteina ima veliki protein Cpf1, odnosno Cas12, koji sadrži domenu nalik nukleazi RuvC koja je homologna domeni proteina Cas9. Međutim, proteinu Cas12 nedostaje HNH nukleazna domena koja je prisutna u svim Cas9 proteinima (Makarova i Koonin 2015), a pokazalo se i da mu nije potrebna dodatna tracrRNA za cijepanje stranog genoma (Zetsche i sur. 2015). Prethodnoj podjeli sustava tipa V nedavno su dodana još 4 podtipa (Yan i sur. 2019). Sustavi CRISPR-Cas tipa VI podijeljeni su u tri podtipa, VI-A, VI-C i dvije varijante VI-B te sadrže gen *cas13* kojemu su jedine prepoznatljive značajke dvije HEPN (od eng. *higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain*) domene. Porodica domena HEPN sastoji se od izrazito divergentnih ribonukleaza, uglavnom uključenih u različite obrambene funkcije prokariota i eukariota (Anantharaman i sur. 2013). Sustavi tipa VI vjerojatno ciljaju DNA viruse cijepanjem virusnih transkripata, a zatim induciraju mirovanje stanice ili programiranu staničnu smrt kao odgovor na intenzivnu ekspresiju virusnih gena (Koonin i Zhang 2017). Na Slici 1 prikazani su najpoznatiji tipovi sustava CRISPR-Cas, tipa I, tipa II i tipa III.



Slika 1. Tri tipa sustava CRISPR-Cas, tip I, tip II i tip III (preuzeto i prilagođeno prema: Makarova i sur. 2011b). Razlikuju se prema načinu procesiranja crRNA i jedinstvenim proteinima: Cas3 u tipu I, Cas9 u tipu II i Cas10 u tipu III.

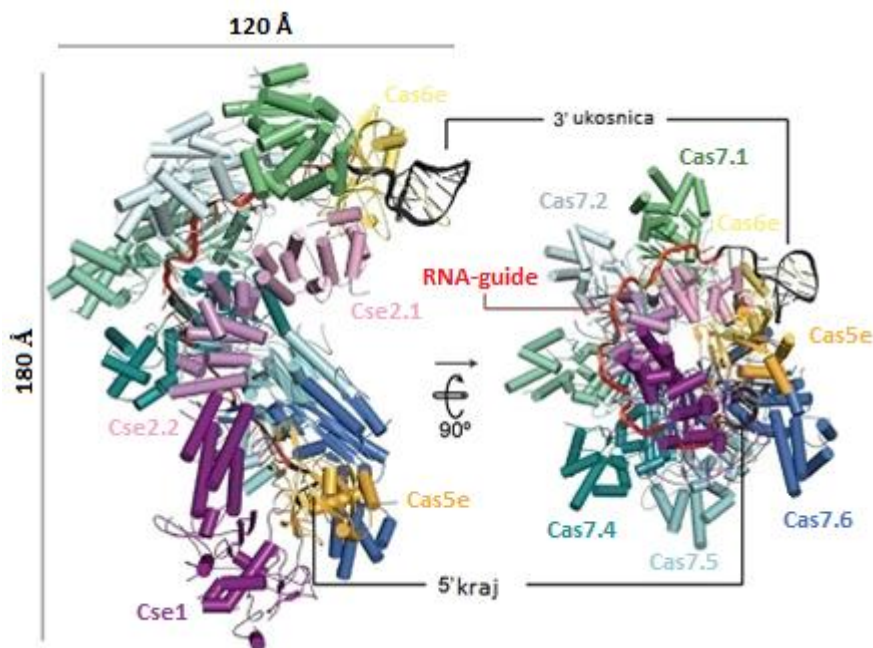
1.4. Sustav CRISPR-Cas tipa I-E

Bakterija *Escherichia coli* K12 sadrži tip I-E sustava CRISPR-Cas koji se sastoji od osam gena *cas*; *cas1*, *cas2*, *cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas5*, *cas7* i *cas6e*, i lokusa CRISPR I koji sadrži 29 ponavljajućih sekvenci i 32 razmaknice. U genomu *E. coli* prisutni su i lokusi CRISPR II i CRISPR III (Jackson i sur. 2014). Građa lokusa CRISPR-Cas prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Građa lokusa CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* K12 (preuzeto i prilagođeno prema: Jackson i sur. 2014).

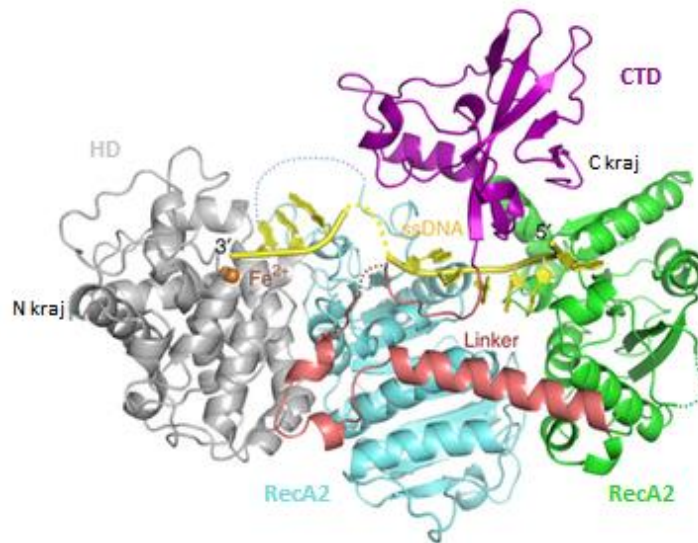
Pet proteina, Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 i Cas6e, zajedno s crRNA dugačkom 61 nukleotid čine ribonukleoproteinski kompleks Cascade odgovoran za sazrijevanje pre-crRNA u kratke, zrele crRNA i inaktivaciju stranog genoma. Kompleks Cascade, veličine 405 kDa, sastavljen je od 11 proteinskih podjedinica (Cse1)₁-(Cse2)₂-(Cas5)₁-(Cas7)₆-(Cas6e)₁ dajući strukturu koja nalikuje obliku morskog konjica (Jore i sur. 2011). Nakon prepisivanja lokusa CRISPR, endoribonukleaza Cas6e cijepa pre-crRNA u zrele 61 nukleotida dugačke crRNA od kojih svaka sadrži sekvencu razmaknice duljine 32 nukleotida omeđenu s djelomičnim sekvencama ponavljanja. Protein Cas6e ostaje vezan za 3' kraj zrele crRNA te dolazi do formiranja kompleksa Cascade vezanjem Cas5 na 5' kraj crRNA i 6 podjedinica proteina Cas7 na sekvencu razmaknice. Protein Cse1 smješten uz 5' kraj crRNA i dimer Cse2 smješten uz sekvencu razmaknice predstavljaju veliku i malu podjedinicu kompleksa Cascade koje su uključene u vezanje kompleksa na stranu DNA, a velika podjedinica ima funkciju i u odabiru ciljne DNA (Cooper i Stringer 2018). Građa kompleksa Cascade prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Građa kompleksa Cascade (preuzeto i prilagođeno prema: Jackson i sur. 2014).

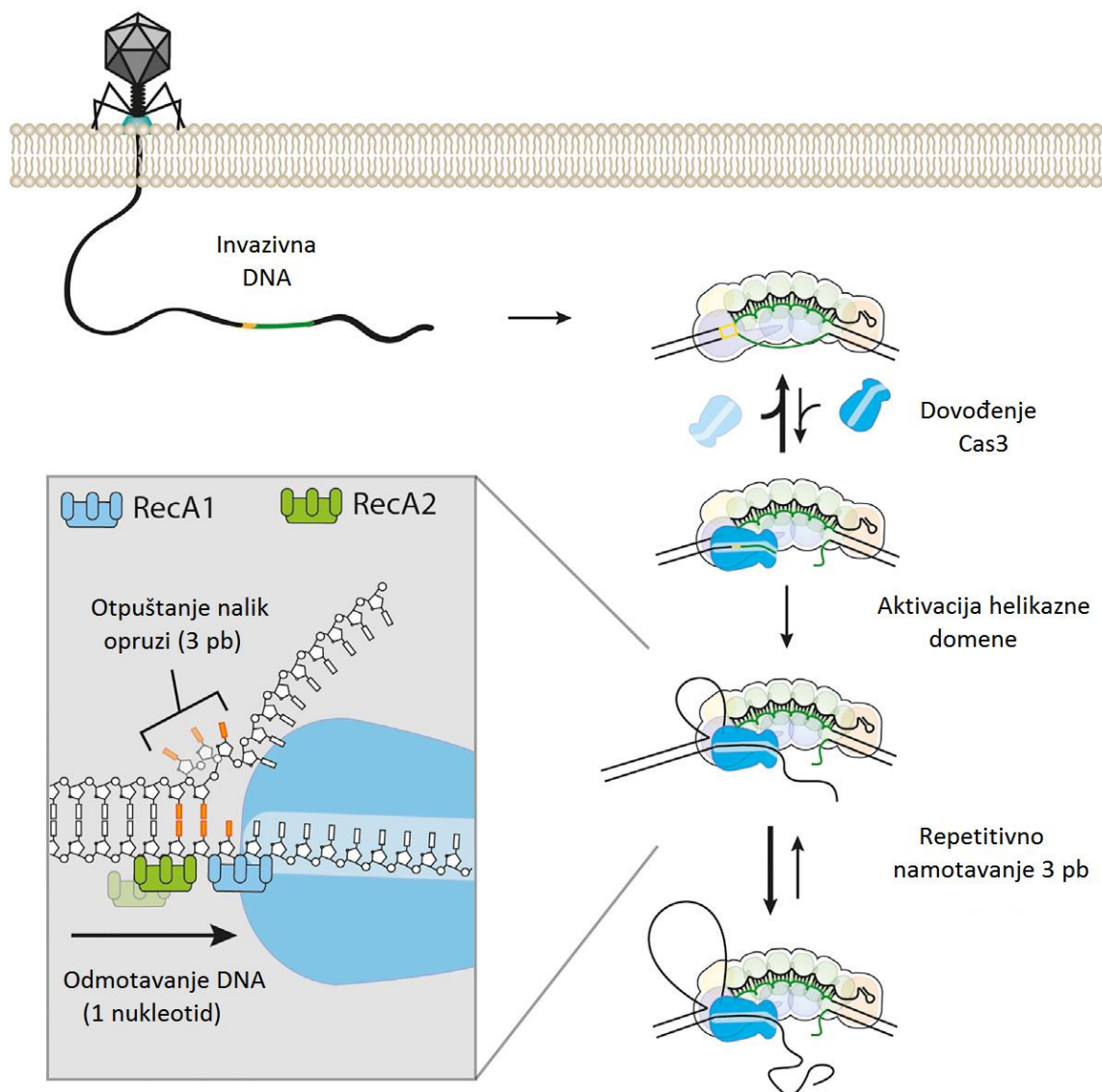
crRNA usmjerava kompleks Cascade prema ciljnoj dvolančanoj DNA tako što se sparuje s protorazmaknicom, odnosno komplementarnim lancem DNA. Primijećeno je da je samo 5 parova baza crRNA i DNA dostatno za uspješno povezivanje Cascade i DNA, ali ne i za funkcionalnu interferenciju koja zahtjeva sparivanje 18 do 25 parova baza (Cooper i Stringer 2018). Sparivanjem crRNA i komplementarne DNA istiskuje se nekomplementarni lanac čime nastaje struktura koja se naziva R-omča. R-omču čine hibrid DNA i RNA i istisnuti lanac DNA (Jore i sur. 2011). Učinkovito stvaranje R-omče zahtijeva potpunu komplementarnost tzv. *seed* regije crRNA i protorazmaknice. *Seed* regiju čine pozicije 1-5 i 7-8 na 5' kraju crRNA (Semenova i sur. 2011). Kompleks Cascade učinkovito pronalazi sekvencu protorazmaknice samo uz prisutnost sekvence PAM koja se nalazi neposredno uz razmaknicu, a za njezinu identifikaciju odgovoran je protein Cse1. Prepoznavanje sekvence PAM destabilizira dvolančanu DNA i omogućuje molekuli crRNA pristup komplementarnom lancu DNA. Stvaranje R-omče uzrokuje konformacijsku promjenu proteina Cse1 što rezultira aktivacijom proteina Cas3, nakon čega slijedi cijepanje posredovano Cas3 i progresivna adenozin trifosfat (ATP)-ovisna degradacija ciljne DNA u 3'→5' smjeru (Xiao i sur. 2017).

Protein Cas3 je molekulske veličine ~100 kDa te sadrži N-terminalnu HD-nukleaznu domenu i C-terminalnu Superfamily 2 (SF2) helikaznu domenu čijom aktivnošću štiti bakteriju od invazije stranom DNA. (Westra i sur. 2012). HD-nukleazna domena definirana je kao metal-ovisna ssDNaza (endonukleaza koja cijepa jednolančanu DNA) s dva konstitutivno vezana katalitička željezna kofaktora koordiniranih skupom visoko očuvanih histidinskih i/ili aspartatskih ostataka aktivnog mjesta (Huo i sur. 2014). Ima ulogu u cijepanju ciljne DNA te jačanju veze između Cas3 i kompleksa Cascade zbog jakog afiniteta vezanja jednolančane DNA na aktivno mjesto (Westra i sur. 2012). SF2 helikazna domena je ATP-ovisna domena koja sadrži dvije domene RecA (RecA1 i RecA2) postavljene jedna uz drugu nakon čega slijedi spiralna poveznica te C-terminalna domena (CTD). RecA1 i RecA2 u helikaznoj jezgri razdvojeni su rascjepom gdje dolazi do konformacijskih promjena prilikom vezanja i hidrolize ATP-a. To uzrokuje odmatanje dvolančane ciljne DNA, ali i usmjeravanje prema aktivnom mjestu HD nukleazne domene (Huo i sur. 2014). Kristalna stuktura proteina Cas3 bakterije *Thermobifida fusca* prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Kristalna struktura proteina Cas3 bakterije *Thermobifida fusca* (preuzeto i prilagođeno prema: Huo i sur. 2014). HD nukleazna domena obilježena je sivom bojom, RecA1 svjetloplavom, RecA2 zelenom, spiralna poveznica rozom, a C-terminalna domena ljubičastom bojom. Žutom bojom obilježena je jednolančana DNA.

Protein Cas3 veže se na podjedinicu Cse1 kompleksa Cascade pomoću svoje domene CTD i cijepa istisnuti lanac DNA 11 nukleotida od početka R-omče. To omogućuje vezanje helikazne domene koja stabilizira vezu između kompleksa Cascade i Cas3. Potaknut hidrolizom ATP-a, Cas3 zatim putuje i odmotava istisnuti lanac u 3'→5' smjeru katalizirajući kobalt-ovisnu DNA degradaciju (Sinkunas i sur. 2013). ATP katalizira pomicanje Cas3 po DNA tako da se veže na domenu RecA1, dovodi do rotacije i zatvaranja prema domeni RecA2 izlažući ključne aminokiselinske ostatke ATP hidrolizi. Nakon ATP hidrolize i disocijacije, domene RecA vraćaju se u početni položaj (Huo i sur. 2014). Cas3 odmotava dvolančanu DNA 1 po 1 par baza uzastopnim kretanjem RecA domena. Nakon što odmotava 3 para baza, helikazna domena se pomiče naprijed te se proces ponavlja (Loeff i sur. 2018). Mehanizam odmatanja prikazan je na Slici 5. Ovakav način odmatanja DNA vjerojatno omogućuje proteinu Cas3 neku vrstu kompenzacije za rijetku, odnosno nedovoljnu aktivnost nukleazne domene, a ujedno omogućuje i pretragu za sekvencama bogatim timinom koje su preferirana mjesta cijepanja nukleazne domene. Cas3 cijepa DNA na 30 do 150 nukleotida dugačke fragmente koji su se pokazali pogodnim supstratima za integraciju u lokus CRISPR posredovanu kompleksom Cas1-Cas2 (Künne i sur. 2016).



Slika 5. Mehanizam odmatanja i cijepanja dvolančane DNA posredovano proteinom Cas3 (preuzeto i prilagođeno prema: Loeff i sur. 2018).

1.5. Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je zaštita bakterija od napada fagom ovisna o temperaturi, a genetičkom analizom pokazano je da je odgovorni protein Cas3. Majsec i suradnici ispitivali su otpornost na infekciju fagom λ soja *E. coli* K12 s ugrađenom razmaknicom λ T3 kojemu nedostaje gen *hns* (Δhns), negativni regulator transkripcije lokusa CRISPR i gena *cas*. Sojevi Δhns pokazali su otpornost na infekciju na 30 °C, ali ne i na 37 °C, što se uočava pojavom plakova na hranidbenim podlogama. Time su zaključili da je osjetljivost na infekciju vjerojatno posljedica smanjene količine ili nestabilnosti proteina

Cas3 (Majsec i sur. 2016). Daljnjim istraživanjem sekundarne strukture proteina Cas3 htjeli su se ispitati razlozi temperaturne osjetljivosti te je li smanjenje aktivnosti rezultat konformacijske promjene u strukturi Cas3. Rezultatima mjerenja *in vitro* metodom cirkularnog dikroizma ustanovljena je pojava točke infleksije ukazujući na manju konformacijsku promjenu na 35 °C u helikoidalnoj regiji proteina Cas3 koja je odgovorna za gubitak aktivnosti Cas3. Ta pretpostavka potvrđena je *in vivo*, određivanjem zasađivanja faga λ (pojave plakova) na bakterijskim livadama, gdje su se plakovi pojavili na 35, 36 i 37 °C, a nedostajali su pri nižim temperaturama (diplomski rad, Čulo 2017). Međutim, odgovorna regija ostala je nepoznata.

Potaknuti dosadašnjim rezultatima o temperaturnoj osjetljivosti proteina Cas3, ciljevi istraživanja ovog diplomskog su:

- 1) Istražiti dolazi li do promjene sekundarne strukture pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i u arhejama, točnije u arheji *Methanothermobacter thermoautotrophicus*
- 2) Ponoviti istraživanje temperaturno-ovisne promjene sekundarne strukture pročišćenog proteina Cas3 iz bakterije *E. coli* mjerenjem intrinzične fluorescencije triptofana
- 3) Istražiti koja je helikoidalna regija Cas3 odgovorna za aktivnost proteina uvođenjem točkastih mutacija u kodonu za triptofan (Trp u Ala) u 3 regije/alfa heliksa proteina Cas3
- 4) Provjeriti utjecaj točkastih mutacija na aktivnost proteina Cas3 u uvjetima *in vivo* i *in vitro*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

U tablicama 1 i 2 prikazani su sojevi bakterije *E. coli* i plazmidi korišteni u ovom istraživanju.

2.1.1. Sojevi

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

Soj	Genotip	Referenca ili izvor
BL21 (AI)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) <i>araB::T7RNAP-tetA</i></i>	(Grodberg i Dunn 1988), (Studier i Moffatt 1986)
IIB1266	BL21 (AI) λc λT3 Δ <i>cas1::kan cas3⁺cse1-cas6⁺</i>	I. Ivančić Baće

2.1.2. Plazmidi

Tablica 2: Vrste plazmida korištenih u istraživanju.

Plazmid	Opis	Referenca ili izvor
pAH4	pBAD- <i>His6x-Cas3(wt)</i>	Ed Bolt
pIIB34	pBAD- <i>His6x-MthCas3(wt)</i>	ovaj rad
pIIB37	pBAD- <i>His6x-Cas3(W230A)</i>	ovaj rad
pIIB39	pBAD- <i>His6x-Cas3(W406A)</i>	ovaj rad
pIIB41	pBAD- <i>His6x-Cas3(W149/152A)</i>	ovaj rad
pEB549	pACYC-Duet Cascade ⁺	Ed Bolt

2.1.3. Hranidbene podloge

U tablicama 3 i 4 navedene su hranidbene podloge i antibiotici korišteni prilikom uzgoja bakterijskih sojeva.

Tablica 3: Sastav hranidbenih podloga.

HRANIDBENA PODLOGA	SASTAV
LB kruta hranidbena podloga (<i>Luria broth</i>)	10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar
LB tekuća hranidbena podloga	10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl
Meki agar (6%)	10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 6 g/L agar

Tablica 4: Antibiotici dodani u hranidbene podloge.

ANTIBIOTIK	FINALNA KONCENTRACIJA
Ampicilin	100 µg/ml
Kloramfenikol	34 µg/ml

2.1.4. Komercijalni kompleti („kitovi“)

U tablici 5 navedeni su komercijalni kompleti korišteni prilikom uvođenja ciljanih točkastih mutacija u plazmidne konstrukte te reagensi za detekciju konjugata peroksidaze hrena na imunoblotima.

Tablica 5: Komercijalni kompleti („kitovi“).

KOMERCIJALNI KOMPLETI	PROIZVOĐAČ
<i>Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	New England BioLabs Inc
<i>AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit</i>	Bioneer
<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Promega

2.1.5. DNA i proteinski standardi (markeri)

Tablica 6: DNA i proteinski standardi korišteni u istraživanju.

DNA I PROTEINSKI STANDARDI	PROIZVOĐAČ
<i>Gene Ruler 1kb, DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Pierce Unstained Protein MW Marker</i>	Thermo Fisher Scientific

2.1.6. Boje

Tablica 7: Boje korištene u izvedbi ovog istraživanja.

BOJA	SASTAV
<i>Sybr Safe DNA Gel Stain</i>	10 000x koncentrat u dimetil sulfoksidu (DMSO); Life Sciences
<i>5x Green GoTag Flexi Buffer</i>	Promega
<i>Coomassie brilliant blue (CBB) R-250</i>	0,1% (w/v) CBB R-250 (Thermo Scientific), 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina
<i>Bromfenol plava</i>	Otopina bromfenol plave u 20%-tnom etanolu
<i>Rouge Ponceau S</i>	0.5% <i>Rouge Ponceau S</i> u 1% octenoj kiselini
<i>Amido black</i>	1% amido black u 10% octenoj kiselini

2.1.7. Protutijela

Protutijela korištena prilikom detekcije proteina His₆-Cas3 (vezanjem na histidinski privjesak) pomoću metode prijenosa proteina na membranu (*Western blot*) prikazana su u tablici 8.

Tablica 8: Protutijela korištena u metodi *Western blot*.

PROTUTIJELA	SASTAV
Protutijela anti-His	10 μ l koncentrirane (<i>stock</i>) otopine protutijela α -His obilježena peroksidazom iz hrena (1 mg/ml) razrijeđeno u 20 ml pufera za ispiranje (<i>Western blot</i>)

2.1.8. Otopine

Otopine korištene u ovom istraživanju i njihov način pripreme prikazane su u tablici 9.

Tablica 9: Otopine.

OTOPINA	SASTAV
20%-tna otopina L-arabinoze	Otopina L-arabinoze u Milli-Q vodi
Pufer za lizu	50 mM Na-fosfat, pH=8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH=8.0
Pufer za ispiranje (SDS-PAGE)	50 mM Na-fosfat, pH=8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH=8.0
Puferi za eluciju s različitim koncentracijama imidazola	50 mM Na-fosfat, pH=8.0, 300 mM NaCl, 50 mM, pH=8.0 50 mM Na-fosfat, pH=8.0, 300 mM NaCl, 125 mM imidazol, pH=8.0
Pufer za denaturaciju	125 mM Tris pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -merkaptoetanol, 32% (v/v) glicerol, kap bromfenola plavog (<i>Laemmli sample buffer</i>)
0.5 M natrijev hidroksid (NaOH)	Otopina NaOH u MilliQ vodi
30%-tni etanol	96%-tni etanol razrijeđen MilliQ vodom
Elektrodni pufer	25 mM Tris, 192 mM glicin, 1% (w/v) SDS, pH= 8,3
Otopina za odbojavanje (SDS-PAGE)	10% (v/v) octena kiselina, 10% (v/v) etanol
Pufer za prijenos	28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol, pH= 8,3

TBS	20 mM Tris, 73 mM NaCl, pH=7,5
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ , 0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,4
Pufer za blokiranje	3 g mlijeka u prahu u 60 ml PBS-a
Pufer za ispiranje (<i>Western blot</i>)	150 µl detergenta Tween 20 otopljenog u 300 ml PBS-a
Otopina za odbojavanje (masena spektrometrija)	10% ledena octena kiselina, 40% metanol, 50% voda
Otopina amonijevog hidrogenkarbonata i acetonitrila	50% 50 mM NH ₄ HCO ₃ , pH=7.8, 50% acetonitrila
Otopina za razgradnju tripsinom	20 µg/ml tripsina razrijeđen u 25 mM NH ₄ HCO ₃ , pH = 7,8
Otopina za ekstrakciju	50% acetonitril, 45% voda, 5% trifluoroctena kiselina (TFA)
Otopina acetonitrila za pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip	80% acetonitril, 20% voda, 0.1% TFA 50% acetonitril, 50% voda, 0,1% TFA
Otopina TFA za pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip	0,1% TFA
Otopina matrice CHCA	5 mg cm ⁻³ CHCA; 50% MeCN, 49,95% voda, 0,05% TFA
10 mM magnezijev sulfat (MgSO₄)	Otopina MgSO ₄ u MilliQ vodi

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi uzgajani su na krutim podlogama LB (*Luria broth*) ili u tekućim medijima LB. Po potrebi u medij je dodan antibiotik ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 µg/ml i kloramfenikol u 34 µg/ml.

Soj BL21 (AI) (Tablica 1) koji se koristio za indukciju sinteze proteina, nasađen je iz smrznutog glicerolskog uzorka čuvanog na -80 °C na krutu LB podlogu i inkubiran na 37 °C u inkubatoru preko noći. Iz pojedinačnih naraslih kolonija bakterija pripremljene su tekuće kulture soja BL21 (AI) u 3 ml tekućeg LB medija te inkubirane 15-16 sati na 37 °C u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) koje su naposljetku korištene u postupku transformacije bakterija plazmidnom DNA.

2.2.2. Uvođenje ciljanih točkastih mutacija u plazmidne konstrukte

Za uvođenje točkastih mutacija korišten je komplet za mjesno-specifičnu mutagenezu *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England BioLabs Inc.). Kao početni plazmid korišten je postojeći konstrukt pAH4 (Tablica 2) gdje je u vektoru pBad kloniran gen *cas3* i dodan nukleotidni slijed za histidinski privjesak od 6 histidina na 5'-kraju gena. Uvedene su supstitucije nukleotidnih baza koje dovode do promjene aminokiseline triptofana (W) u alanin (A) na četiri različita mjesta u proteinu, W230A, W406A, W149A i W152A. Dobiveni plazmidi pIIB37, pIIB39 i pIIB41 navedeni su u tablici 2, a protokol je detaljno objašnjen na internetskoj stranici New England BioLabs Inc. (<https://international.neb.com/protocols/2013/01/26/q5-site-directed-mutagenesis-kit-protocol-e0554>). Prvi korak u uvođenju točkastih mutacija u DNA je eksponencijalna amplifikacija plazmidne DNA upotrebom mutagenih početnica i *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* master mix-a. Mutagene početnice su specifično dizajnirane pomoću programa NEBaseChanger i ne trebaju se preklapati. *Forward* početnica koja sadrži mutaciju mora sadržavati barem 10 komplementarnih nukleotida na 3' strani od mutacije, a *reverse* početnica nema mutaciju i mora biti dizajnirana tako da se 5' krajevi *forward* i *reverse* početnice združe jedna uz drugu (engl. „back to back“). Nakon lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) uspješnost reakcije se

provjerava elektroforezom na agaroznom gelu. Ako je reakcija uspješna, sljedeći korak uključuje inkubaciju PCR produkta s enzimskom smjesom kinaze, ligaze i restrikcijske endonukleaze DpnI (dobivena u kompletu od proizvođača) koja omogućava učinkovitu cirkularizaciju PCR produkta i uklanjanje DNA kalupa iz smjese. Dobiveni cirkularizirani PCR produkt, odnosno dobiveni mutirani plazmidi koji sadrže točkaste mutacije u genu *cas3*, prvo se transformiraju u kompetentne bakterijske stanice (opisano u poglavlju 2.2.4.), a zatim se iz transformanata pročiste mutirani plazmidi prema protokolu *AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit* (Bioneer) koji je detaljno opisan na internetskoj stranici Bioneer (<http://eng.bioneer.com/products/DNARNAPrep/PlasmidMiniExtraction-literature.aspx>).

2.2.3. Agarozna gel elektroforeza i određivanje koncentracije DNA

Čistoća plazmidne DNA provjerena je horizontalnom gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu, a kao marker korišten je *Gene Ruler 1kb, DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Pripremljen je 1% agarozni gel u 1x TAE puferu, s dodatkom 1.6 µl boje *Sybr Safe* (Life Sciences), potom je izliven u kalup i ostavljen na 15 minuta u tami (prekriven aluminijskom folijom) da polimerizira. U jažicu je nanoseno 2-5 µL DNA markera, a u 2 µl uzorka je prije nanošenja dodano 0.5 µL boje *5x Green GoTag Flexi Buffer* (Promega) te je nanoseno u jažice. Elektroforeza je provedena u tami na 100 V u 1x TAE puferu u trajanju 15 minuta.

Čistoća i koncentracija dobivene plazmidne DNA je provjerena spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra *NanoVue Plus* (GE Healthcare). Konačna potvrda uspješne konstrukcije točkastih mutanata provjerena je sekvenciranjem nukleotidnih sljedova u servisu Macrogen i potom sravnjavanjem sljedova u programu EMBOSS Needle instituta EMBL-EBI.

2.2.4. Priprema kemijski kompetentnih bakterija i transformacija bakterija plazmidnom DNA

Kako bi se bakterije uspješno transformirale plazmidnom DNA, potrebno ih je učiniti „kompetentnima“ za ulazak plazmidne DNA u stanicu bakterije. To je učinjeno na sljedeći

način: 40 µl prekonoćne bakterijske kulture soja BL21 (AI) dodano je u 3 ml tekućeg LB medija te je kultura uzgajana na 37 °C u tresilici G25 do logaritamske faze rasta, odnosno do optičke gustoće bakterija $OD_{600}=0.6$. Optička gustoća mjerena je pomoću spektrofotometra *Ultrospec 10* (Amersham Biosciences). Nakon što je kultura bakterija dosegla logaritamsku fazu rasta, bakterije su istaložene u centrifugi *SIGMA KY30* (8400 rpm, 3 minute, 4 °C) te je talog resuspendiran u 200 µl hladnog 50 mM kalcijevog klorida ($CaCl_2$). Bakterije su ponovno istaložene (8400 rpm, 3 minute, 4 °C), a talog je resuspendiran u 50 µl hladnog 50 mM $CaCl_2$. Bakterije su inkubirane na ledu 30 minuta, a zatim im je dodano 50 ng odgovarajućeg plazmida, nježno je resuspendirano i inkubirano na ledu još 40 minuta. Nakon inkubacije, stanice su izložene temperaturnom šoku u trajanju 60 sekundi na 42 °C u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf) i odmah stavljene na led na 60 sekundi. Transformiranim bakterijama dodano je 100 µl tekućeg LB medija te su inkubirane u tresilici G25 u trajanju 30 minuta na 37 °C kako bi se oporavile od temperaturnog šoka. Transformirane bakterije nasađene su na krutu LB podlogu s dodanim antibiotikom ampicilinom te su inkubirane 15-16 sati na 37 °C u inkubatoru. Radi jednostavnosti, transformirani sojevi nazvani su po korištenim plazmidima te su dobiveni sojevi BL21-AI + pAH4, BL21-AI + pIIB37, BL21-AI + pIIB39, BL21-AI + pIIB41 i BL21-AI + pIIB34.

2.2.5. Pročišćavanje proteina metodom afinitetne kromatografije

Pripremljene su prekonoćne kulture od transformiranih bakterija s plazmidima. Pojedinačna kolonija bakterija sterilnom ezom prenesena je u 4 ml tekućeg LB medija u kojem je prethodno dodan antibiotik ampicilin te su ostavljene rasti 15-16 sati na 37 °C. Sljedećeg je dana u 500 ml tekućeg LB medija s ampicilinom dodana prekonoćna kultura bakterija te je inkubirana na 37 °C. Kada su stanice doseglye optičku gustoću $OD_{600}=0.4$, dodana im je 20%-tna otopina L-arabinoze (finalne koncentracije 0.2%) kako bi se potaknula indukcija ekspresije divljeg ili mutantnog tipa gena *His6x-Cas3* s inducibilnog promotora pBAD, te su inkubirane dva sata na 30 °C. Stanice bakterija su potom istaložene centrifugiranjem (4025 g, 15 minuta, 4 °C) u centrifugi *SIGMA KY30*, a talog stanica pohranjen na -80 °C.

Sljedećeg dana pripremljeni su puferi potrebni za pročišćavanje proteina: pufer za lizu, pufer za ispiranje i puferi za eluciju s različitim koncentracijama imidazola. Puferi su pripremljeni s MilliQ vodom. Talog stanica pohranjen na -80 °C odmrznut je na ledu i resuspendiran u 15 ml pufera za lizu. Stanice su zatim lizirane pomoću sonikatora *High Intensity Ultrasonic Processor* (Bioblock Scientific) 10 puta po 15 sekundi uz pauzu od 15 sekundi između svakog soniciranja. Stanice su za to vrijeme bile na ledu. Lizat stanica je centrifugiran (12000 g, 30 minuta, 4 °C) u centrifugi *5804R* (Eppendorf) nakon čega je sakupljen supernatant koji bi trebao sadržavati protein Cas3 sa ostalim topivim proteinima. 80 µl uzorka lizata sačuvano je za daljnju analizu, a ostatak supernatanta pročišćeno je afinitetnom kromatografijom.

Korištena je kolona za pročišćavanje *Protino Columns 14 ml* (Macherey-Nagel). Kolona je isprana s MilliQ vodom, a zatim je pripremljena pomoću 1 ml Ni-NTA (nikal-nitriлотrictena kiselina) agaroznih kuglica (Protino) te je stavljena u hladnjak na 4 °C. Svi daljnji koraci izvođeni su u hladnjaku na 4 °C. Kolona je kondicionirana sa 15 ml pufera za lizu brzinom protjecanja od 0.5-1 ml/min te je takva spremna za nanošenje supernatanta. Proteini su nanošeni brzinom od 0.5-1 ml/min na Ni-NTA kolonu u trajanju od 35 minuta te je cjelokupna frakcija (frakcija FTH) ponovno nanosena na Ni-NTA kolonu kako bi osigurali veće vezanje topivih proteina, a među njima i proteina Cas3 obilježenog histidinskim privjeskom (His₆-Cas3), na kolonu. Kolona je zatim isprana dva puta sa po 12 ml pufera za ispiranje (frakcije W1 i W2) kako bi se sa kolone isprali nespecifično vezani proteini (brzina protjecanja 0.5-1 ml/min). Nakon ispiranja, uslijedila je elucija proteina His₆-Cas3 sa kolone pomoću pufera za eluciju s rastućim koncentracijama imidazola kako bi osigurali dobivanje frakcija sa što većom koncentracijom čistog proteina Cas3 i što manjom koncentracijom nespecifično vezanih proteina. Prvo je protein eluiran sa 9 ml pufera za eluciju i 50 mM imidazola te sakupljen u frakcije (frakcije 1-6), a potom sa 7.5 ml pufera za eluciju i 125 mM imidazola i sakupljen u frakcije (frakcije 7-11) (brzina protjecanja 0.5-1 ml/min). Kolona za pročišćavanje isprana je sa 15 ml 0.5 M NaOH u trajanju 30 minuta i sa 10 ml 30%-tnog etanola te se može ostaviti u 30%-tnom etanolu na 4 °C do sljedećeg korištenja.

200 µl frakcija FTH, W1 i W2, 100 µl frakcija 1-11 i 80 µl frakcije lizata pomiješano je sa puferom za denaturaciju (*Laemmli sample buffer*) u omjeru 4:1. Proteini su denaturirani u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf) u trajanju 5 minuta pri 95 °C. Denaturirani proteini mogu se pohraniti u hladnjak na 4 °C.

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

Prije samog pripravljanja gela za razdvajanje i gela za sabijanje slaže se „kasetu“ od dvaju staklenih ploča odvojenih razmaknicama prethodno očišćenih 96%-tnim etanolom. Pripremljen je 10%-tni gel za razdvajanje (Tablica 10) koji je potom izliven u „kasetu“. Gel je nadsvođen otopinom boje bromfenol plave u 20%-tnom etanolu kako bi se izbjegao doticaj gela sa kisikom, kako bi se omogućila polimerizacija akrilamida, i ostavljen da polimerizira oko 45 minuta. Nakon polimerizacije otopina bromfenol plave je uklonjena, pripremljen je 4%-tni gel za sabijanje (Tablica 10) te izliven u „kasetu“ iznad gela za razdvajanje. U izliven gel za sabijanje umetnut je „češljčić“ za stvaranje jažica i tako ostavljen da polimerizira 15 minuta.

Tablica 10: Sastav gela za razdvajanje (10%) i gela za sabijanje (4%)*.

Gel za razdvajanje (donji gel, 10%)		Gel za sabijanje (gornji gel, 4%)	
*dH ₂ O	4.05 mL	*dH ₂ O	3.05 mL
1,5 M Tris-HCl, pH = 8.8	2.5 mL	0,5 M Tris-HCl, pH = 6.8	1.25 mL
*AA/Bis (30%)	3.3 mL	*AA/Bis (30%)	665 µL
10% SDS	100 µL	10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL	10% APS	35 µL
TEMED	5 µL	TEMED	8 µL
Ukupno	10 mL	ukupno	5 mL

*sastav za 2 gela

U jažice je nanoseno po 25 µl denaturiranih proteina iz svake frakcije dobivene afinitetnom kromatografijom, a u jednu od jažica 5 µl markera *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific).

Elektroforeza je provedena u sustavu *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad). Gelovi s nanesenim uzorcima umetnuti su u kadicu s elektrodnim puferom te je pokrenuta elektroforeza. Prvih 15 minuta tekla je pri 100 V kako bi se omogućila migracija proteina u gel za razdvajanje, a zatim pri 200 V do njenog završetka. Gelovi s razdvojenim proteinima oprezno su izvađeni iz „kasete“ i obojeni bojom *Coomassie brilliant blue* (CBB) R-250 na tresilici 60 minuta, a potom odbojeni otopinom za odbojavanje. Pohranjeni su u otopini za odbojavanje pri 4 °C.

2.2.7. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (metoda *Western blot*)

Za daljnju analizu i potvrdu prisutnosti proteina Cas3 korištena je metoda *Western blot*, točnije, metoda mokrog prijenosa prikladna za velike proteine te se izvodi u uspravnoj kadici ispunjenoj puferom.

Denaturirani proteini razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata preneseni su na nitroceluloznu membranu *Whatman Protran BA 83* (GE Healthcare) u puferu za prijenos. Složen je „sendvič“ od spužvica, filter papira, membrane i poliakrilamidnog gela prethodno namočenih u pufer za prijenos te je stavljen u kadicu pritom pazeći na ispravnu orijentaciju membrane koja mora biti okrenuta prema anodi. Prijenos je trajao 60 minuta pri 60 V. Nakon prijenosa, membrane su inkubirane 2 minute u boji *Rouge Ponceau S*, potom isprane destiliranom vodom, a olovkom su označene vrpce molekulskih masa. Membrane su kratko inkubirane u TBS-u kako bi se dodatno isprala boja *Rouge Ponceau S* i naposljetku inkubirane u 30 ml pufera za blokiranje na tresilici u trajanju 60 minuta. Nakon inkubacije u puferu za blokiranje, membrane su isprane tri puta po 5 minuta sa po 25 ml pufera za ispiranje na tresilici. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane na tresilici 120 minuta u 20 ml otopine protutijela anti-His, a potom isprane tri puta po 5 minuta sa po 25 ml pufera za ispiranje. Proteini na membrani na koje su vezana protutijela anti-His detektirana su kemiluminiscentno pomoću reagensa za detekciju *ECL Western Blotting Substrate* (Promega). Po 1 ml svake otopine, luminol pojačivača i otopine peroksida pomiješano je, nekoliko puta izliveno po membrani i inkubirano 5 minuta u mraku. Signal je detektiran pomoću uređaja *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR, Biosciences) u programu *Image Studio*.

Kao dodatnu provjeru uspješnog prijenosa proteina, membrane su inkubirane u boji *amido black* 5 minuta na tresilici, a potom isprane destiliranom vodom do željene vizualizacije.

2.2.8. Masena spektrometrija

2.2.8.1. Izrezivanje i digestija proteina u gelu

Iz proteinskih vrpca dobivenih na poliakrilamidnom gelu izrezani su komadići gela, dodan im je 1 ml otopine za odbojavanje te su u njoj inkubirani 3 sata na 40 °C. Nakon inkubacije otopina za odbojavanje je uklonjena, a komadićima gela dodano je 500 µl 50 mM otopine amonijevog hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3 , pH=7.8) te su inkubirani na tresilici 5 minuta (700 rpm, sobna temperatura) nakon čega je pufer uklonjen. Taj postupak ponovljen je još dva puta. Potom je otopina ponovno promijenjena te su uzorci inkubirani na tresilici u jednakim uvjetima 30 minuta. Nakon što je otopina uklonjena, dodano je 500 µl otopine amonijevog hidrogenkarbonata i acetonitrila u volumnom omjeru 1:1 na komadiće gela te su u otopini inkubirani 30 minuta na tresilici (700 rpm, sobna temperatura). Nakon inkubacije, otopina je uklonjena te je dodano 100 µl acetonitrila na komadiće gela kako bi u potpunosti eliminirali vodu iz gelova njezinim vezanjem na acetonitril i tako omogućili što bolje prodiranje tripsina u komadiće gela. Inkubirani su 5 minuta na tresilici (700 rpm, sobna temperatura) nakon čega je acetonitril uklonjen. Komadići gela su stavljeni na sušenje pri 30 °C u uređaj *SpeedVac Concentrator* 5301 (Eppendorf). Na osušeni komadić gela dodano je 10 µl otopine za razgradnju tripsinom te je inkubiran preko noći na tresilici (650 rpm, 37 °C).

2.2.8.2. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije, otopina tripsina s dobivenim peptidima premještena je u nove epruvete te su stavljene na sušenje pri 30 °C u *SpeedVac*, a na komadiće gela dodano je 10 µl otopine za ekstrakciju i inkubirani su 30 minuta u ultrazvučnoj kupelji *Ultrasonic Cell Disruptor XL* (Misonix Inc.). Komadići gela dodatno su inkubirani 15 minuta na tresilici (250 rpm, sobna temperatura) te je otopina za ekstrakciju prebačena u prethodno osušenu otopinu tripsina s peptidima i ponovno vraćena u *SpeedVac* na sušenje pri 30 °C, a komadići gela su bačeni.

2.2.8.3. Pročišćavanje peptida metodom ZipTip C₄

Pripremljene su 80%-tne i 50%-tne otopine acetonitrila, te 0.1% otopina trifluoroctene kiseline (TFA). Osušenim peptidima dodano je 10 µl 0.1%-tne otopine TFA te su kao takvi spremni za pročišćavanje pomoću ZipTip nastavka. Sljedeći korak podrazumijevao

je kondicioniranje kolone za pročišćavanje (ZipTip): prvo je isprana tri puta sa po 10 μ l 80%-tne otopine acetonitrila, zatim tri puta sa po 10 μ l 50%-tnog acetonitrila i, naposljetku, tri puta sa po 10 μ l 0.1%-tne otopine TFA. Uslijedila je adsorpcija uzorka na kolonu kontinuiranim usisavanjem i izbacivanjem uzorka (10 puta), pazeći pri tome da u kolonu ne uđe zrak. Uzorak je ispran pet puta sa po 10 μ l 0.1%-tne otopine TFA te je eluiran s kolone sa 10 μ l 80%-tne otopine acetonitrila koja je prethodno provučena 10 puta kroz kolonu. Pročišćeni uzorak osušen je u *SpeedVac*-u pri 30 °C.

2.2.8.4. Analiza peptida MALDI-TOF/TOF analizatorom masa

Pročišćeni peptidi resuspendirani su u 5 μ l otopine α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA matrica) te je 1 μ l uzorka nanesen na MALDI pločicu. Pločica je kratko ostavljena na zraku kako bi analit kokristalizirao te se uklopio u kristale matrice. Peptidi dobiveni tripsinolizom proteina iz gela analizirani su pomoću analizatora masa *4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer* (Applied Biosystems) u pozitivnom načinu rada. MALDI ili laserska desorpcijska ionizacija uz pomoć matrice je tehnika ionizacije koja proizvodi kvazimolekularne ione velikih organskih molekula, a u kombinaciji s masenom spektrometrijom s vremenskim odmakom (eng. *Time of Flight*, TOF) omogućava detekciju i karakterizaciju bipolimera kao što su peptidi, proteini, oligosaharidi i nukleotidi (Kaufmann 1995). Matrica u MALDI-u služi kao nosač peptida koji se, zajedno s peptidima, raspršuje u vakuumu spektrometra masa nakon fotoionizacije laserom te ih na taj način prevodi iz čvrste u plinovitu fazu. MALDI pločica je nakon sušenja stavljena u analizator masa *4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer* te je u analit, uklopljen u kristale matrice, usmjeren kratki laserski puls jakog intenziteta zračenja. Dolazi do oslobađanja velike količine topline i, naposljetku, oslobađanja analita iz površinskih slojeva kristala matrice. Identifikacija peptida temelji se na određivanju njegove mase mjerenjem vremena, odnosno brzine potrebne čestici da prođe kroz uređaj (TOF) unutar analizatora mase. Vrijeme i brzina ovise o njezinoj masi, a analizatori masa određuju njenu veličinu ispisivanjem spektra MS (diplomski rad, Čulo 2017). Snimljeni su MS spektri svih nanešenih uzoraka te su potom odabrani prekursori za snimanje MS/MS spektara. Za kalibraciju samog uređaja korišteni su pikovi autolize tripsina.

2.2.8.5. Obrada podataka – identifikacija proteina iz gela

Kako bi se identificirali proteini iz gela, spektri MS i MS/MS uneseni su u računalni program *ProteinPilot*. Pomoću programa pretražena je baza podataka *National Center for Biotechnology Information database* (NCBIInr) koristeći naziv organizma *E. coli* kao parametar pretrage. Sva su pretraživanja zatim analizirana računalnim programom *Mascot Matrix science* koji svakom proteinu pridružuje signifikantnost (eng. *score*) i ako taj *score* prelazi vrijednost od 75, protein se smatra identificiranim. Za analizu MS/MS bilo je potrebno izabrati 10 najintenzivnijih pikova svakog spektra MS.

2.2.9. Ukoncentriravanje proteina membranskom ultrafiltracijom

Nakon pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom, dobivene su proteinske frakcije koje su analizirane elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata, *Western blot*-om i masenom spektrometrijom. Na temelju toga odabrane su frakcije sa što većom koncentracijom čistog proteina Cas3 za daljnje ukoncentriravanje. Odabrane proteinske frakcije ukoncentrirane su centrifugalnim filter uređajima *Amicon Ultra -0.5 ml* (Merck, Millipore) s celuloznom membranom koja propušta proteine molekularne mase manje od 50 000 Da, a zadržava proteine s molekularnom masom većom od 50 000 Da. Proteinske frakcije ukoncentrirane su centrifugiranjem na 14 000 g u trajanju 10 minuta pri +20 °C u centrifugi *5804 R* (Eppendorf). Nakon ukoncentriravanja, bilo je potrebno ukloniti pufer za eluciju (sa 125 mM imidazolom) u kojem su bili otopljeni proteini kako bi se mogla provesti metoda intrinzične fluorescencije triptofana i cirkularni dikroizam. Zamijenjen je za 50 mM Na-fosfatni pufer, pH 8,0 centrifugiranjem 3 puta na 14 000 g, 10 minuta pri 20 °C u istom centrifugalnom filter uređaju. Nakon zamjene pufera, uslijedila je elucija proteina okretanjem kolone centrifugalnog filter uređaja naopako u čistu epruvetu i centrifugiranjem na 1000 g, 2 minute pri 20 °C. Koncentracija pročišćenog ukoncentriranog proteina određena je spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra *UV/VIS* (Unicam) pri valnoj duljini 595 nm koristeći metodu prema Bradfordu (Bradford 1976).

2.2.10. Intrinzična fluorescencija triptofana

Kao dominantan izvor intrinzične fluorescencije proteina, triptofan (Trp) se kroz promjenu svojih svojstava fluorescencije povezuje sa konformacijskim promjenama proteina na koje može utjecati promjena temperature (Ghisaidoobe i Chung 2014). Za mjerenje fluorescencije korišten je spektrofluorimetar *LS 55* (Perkin Elmer) kojim se upravlja uz pomoć računalnog programa *FL WinLab*. Sva mjerenja izvedena su u kvarcnoj kiveti. Za potrebe mjerenja namještene su vrijednosti pobudnog zračenja na valnu duljinu 280 nm, emitirajuće zračenje na valnu duljinu 340 nm, širina pobudnog i emitirajućeg otvora na 5.0 nm i brzina snimanja spektra 500 nm/min. Emisija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 450 nm, a broj akumulacijskih *scan*-ova namješten je na 5. Mjerenja su provedena u 50 mM Na-fosfatnom puferu, pH 8,0, vrijednosti intenziteta fluorescencije samog pufera izmjerene su na temperaturi od 25 °C, a intenziteti fluorescencije nativnog proteina izmjerene su na 5 različitih temperatura (25 °C, 30 °C, 34 °C, 36 °C i 42 °C). Zabilježene su po tri vrijednosti intenziteta fluorescencije za svaku od temperatura te su podaci analizirani u računalnom programu *Origin Pro 8.0*. Kroz izmjerene točke provučena je sigmoidalna krivulja prema Boltzmannovom modelu (funkciji) s ciljem pronalaska točke infleksije. Boltzmannova funkcija glasi: $y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{(1 + \exp((x - x0) / dx))}$, pri čemu je A1 početna vrijednost, A2 konačna vrijednost, a x0 je točka infleksije.

2.2.11. Cirkularni dikroizam

Snimanje CD-spektara provedeno je na uređaju *J-815 UV-CD Instrument* (Jasco) na Institutu Ruđer Bošković. Spektri su snimljeni u termičkoj kiveti optičkog puta 1 mm svakih 1 °C u rasponu temperatura od 30 do 90 °C te valnih duljina u rasponu od 260 do 190 nm sa sljedećim parametrima: *band with* = 1 nm, *response* = 1 sec, *sensitivity standard*, *data pitch* = 0.2 nm, *scanning speed* = 50 nm/min i *number of accumulation* = 2. Nadalje, mjerenja dobivena cirkularnim dikroizmom izražavaju se u stupnjevima eliptičnosti [Θ/mdeg] te je ujedno praćena i ovisnost CD/mdeg o temperaturi pri valnoj duljini od 222 nm. Mjerenja su snimljena u termičkoj kiveti optičkog puta 1 nm, u rasponu temperatura od 30 do 90 °C, brzinom 1 °C/min s ostalim parametrima: *band with* = 1 nm,

response = 1 sec, *sensitivity standard*, *data pitch* = 1 °C, *data points* = 61. Spektri su snimani svakih 5 °C.

Podaci dobiveni snimanjem CD-spektara izražavaju se pomoću *mean residue ellipticity* (MRE) normaliziranjem rezultata prema veličini i koncentraciji proteina, a računa se prema formuli $[\Theta]_{\lambda} = \frac{\Theta_{\lambda}}{10 \times N \times d \times c}$. U ovoj formuli Θ_{λ} predstavlja eliptičnost izmjerenu pri valnoj duljini λ , N je broj aminokiselina u proteinu, d duljina optičkog puta (cm), a c je molarna koncentracija proteina. Kroz izmjerene točke (MRE/temperatura) provučena je sigmoidalna krivulja prema Boltzmannovom modelu (funkciji) i određena točka infleksije prema formuli navedenoj u poglavlju 2.2.10.

2.2.12. Određivanje formiranja čistina faga λ pri različitim temperaturama inkubacije

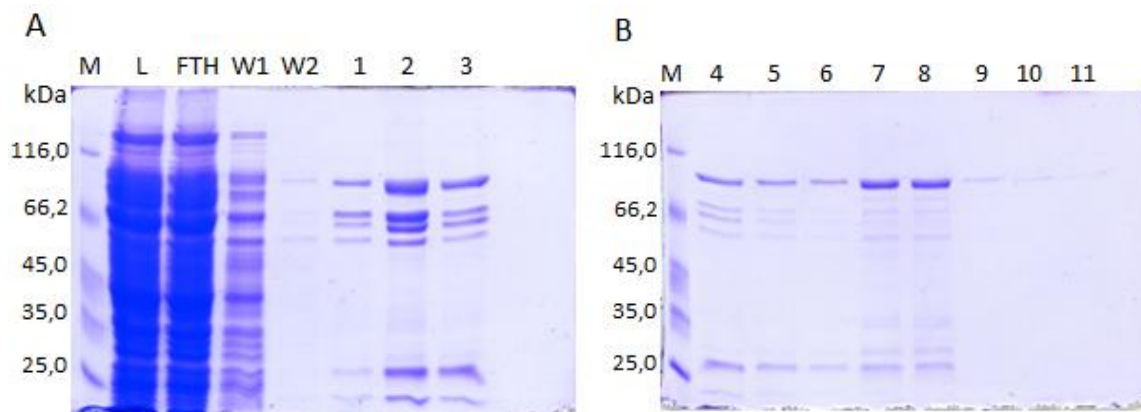
Kako bi se odredila uloga točkastih mutacija u proteinu Cas3 na zaštitnu ulogu sustava CRISPR-Cas protiv infekcije fagom λ , mjerena je učinkovitost formiranja čistina/plakova faga λ pri različitim temperaturama inkubacije. Korištene su prekonoćne kulture bakterija soja IIB1266 koji sadrži dodane anti-lambda razmaknice te kompleks Cascade na plazmidu (pEB549) i plazmide s i bez gena *cas3* (prazan vektor, pAH4, pIIB37, pIIB39 i pIIB41). Na krute LB podloge koje sadrže kloramfenikol, ampicilin i L-arabinozu izliven je sloj od 3.0 ml 6%-tnog mekog agara kojem je dodano 30 μ l 20% L-arabinoze i 200 μ l prekonoćnih stanica te je ostavljen da se skrutne. U međuvremenu napravljena su decimalna razrjeđenja faga λ (od 10^{-2} do 10^{-6}) razrijeđena u otopini 10 mM magnezijeva sulfata ($MgSO_4$) te je svako od razrjeđenja nanoseno u dva alikvota od 10 μ l na svaku od podloga (jedna kombinacija plazmida na jednu podlogu). Nakon što su se alikvoti faga upili u meki agar, podloge su inkubirane preko noći na različitim temperaturama (30 °C i 37 °C). Sljedećeg dana na podlogama su se prebrojili plakovi koji nastaju na mjestu inficiranih liziranih bakterija, a predstavljaju osjetljivost bakterija na infekciju fagom λ . Izražava se u jedinici formiranja plakova (eng. *plaque forming unit*, PFU), odnosno broju plakova po ml ($PFU/ml = \frac{\# \text{ plakova}}{\text{stupanj dec. razrjeđenja} * V \text{ alikvota}}$).

3. REZULTATI

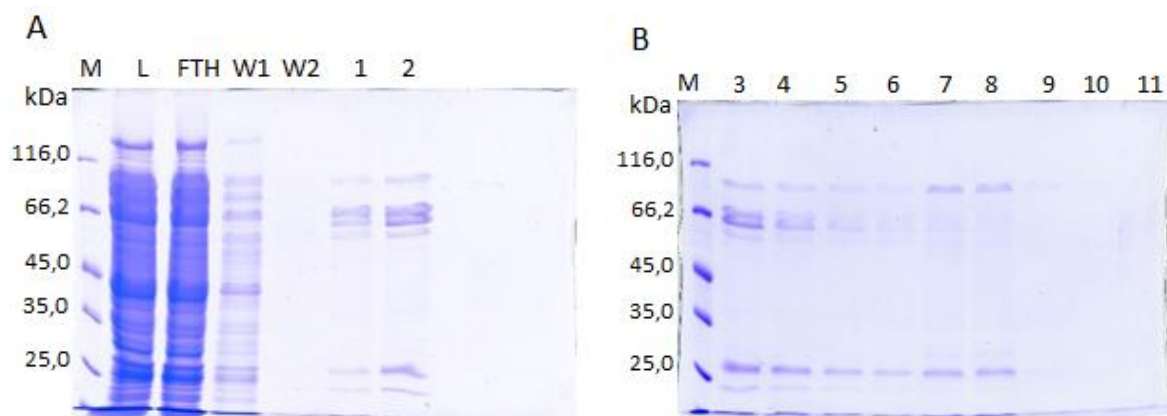
3.1. Pročišćavanje proteina Cas3

Pročišćavanje 5 različitih proteina Cas3 (jedan arhealni i četiri iz bakterije *E. coli* od kojih tri s točkastim mutacijama) od ostalih proteina temelji se na dodatku biljega od šest aminokiselina histidina (His₆) na 5' kraju gena. Ovaj biljeg omogućuje selektivno vezanje proteina na kolonu Ni-NTA (nikal-nitrilotriocetna kiselina). Protein His₆-Cas3 je u svim navedenim sojevima pročišćen i eluiran s kolone u frakcijama pomoću pufera za eluciju s rastućim koncentracijama imidazola. Imidazol se veže na ista vezna mjesta na kolonu Ni-NTA kao i His₆-Cas3 te ga na taj način istiskuje s kolone. Nakon pročišćavanja proteina metodom afinitetne kromatografije, frakcije pročišćenog Cas3 prvo su analizirane elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE). Gelovi su obojeni bojom *Commassie brilliant blue*. Na Slici 6 prikazani su rezultati pročišćavanja proteina Cas3 na primjeru Cas3W230A te pokazuju: ukupne topive bakterijske proteine (jažica L), bakterijske proteine koji se nisu vezali na kolonu uslijed nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FTH), proteine koji su se nespecifično vezali na kolonu te su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje koji sadrži 20 mM imidazol (jažice W1 i W2) te protein Cas3 uz prisutnost drugih bakterijskih proteina koji su se ispirali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice od 1-6) i 125 mM imidazola (jažice 7-11). Protein Cas3, molekularne mase 100,5 kDa, nalazi se u svim frakcijama s imidazolom. Frakcije 1-8 sadrže uz proteinske vrpce koje pripadaju proteinu Cas3, i druge proteinske vrpce što ukazuje ili na raspad proteina Cas3 ili na prisutnost proteina koji su se nespecifično vezali na kolonu ili su u interakciji sa samim proteinom Cas3. Najviše bakterijskih proteina eluiralo se u frakciji 2 uz prisustvo 50 mM imidazola, nakon toga količina opada do frakcije 6. Frakcije 7 i 8 eluirane su sa 125 mM imidazolom te sadrže protein Cas3W230A u najčišćem obliku, odnosno frakcije 7 i 8 sadrže najmanje ostalih bakterijskih proteina. Frakcije 9-11 sadrže Cas3 u niskim frakcijama.

Ovi eksperimenti ponovljeni su još tri puta (biološke replike) za svaki uzorak Cas3 te su dobiveni slični rezultati, a konkretno na Slici 6 prikazani su rezultati pročišćavanja 3. replike. Izuzetak je mutant Cas3W149/152A (Slika 7) gdje je vidljivo da su proteinske vrpce slabijeg intenziteta, odnosno da je protein Cas3W149/152A prisutan u znatno nižoj koncentraciji nego Cas3W230A (Slika 6).

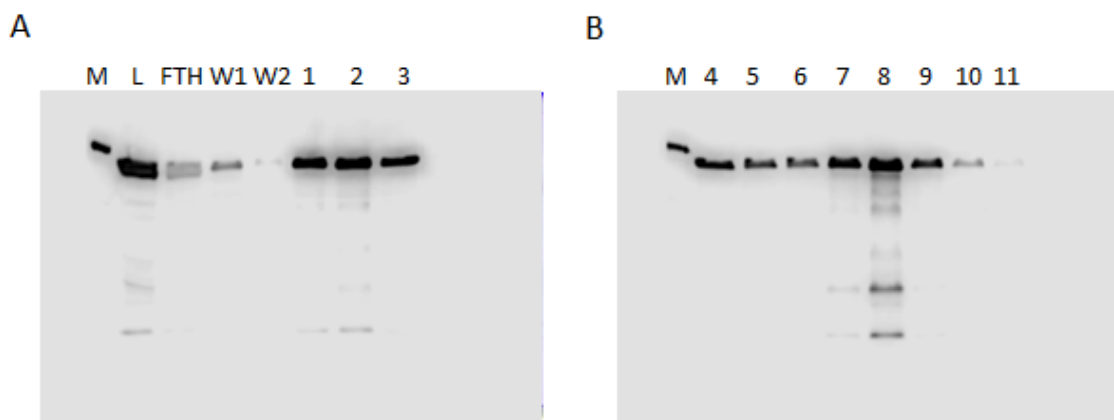


Slika 6. Analiza frakcija pročišćenog proteina Cas3W230A dobivenih afinitetnom kromatografijom metodom SDS-PAGE. **A)** marker (jažica M), ukupni topivi proteini (jažica L), bakterijski proteini koji se nisu vezali nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FTH), nespecifično vezani proteini koji su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje s 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3W230A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice 1-3). **B)** protein Cas3W230A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice 4-6) i 125 mM imidazola (jažice 7-11).



Slika 7. Analiza frakcija pročišćenog proteina Cas3W149/152A dobivenih afinitetnom kromatografijom metodom SDS-PAGE. **A)** marker (jažica M), ukupni topivi proteini (jažica L), bakterijski proteini koji se nisu vezali nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FTH), nespecifično vezani proteini koji su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje s 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3W149/152A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice 1-2). **B)** protein Cas3W149/152A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice 3-6) i 125 mM imidazola (jažice 7-11).

Metodom *Western blot* potvrđena je prisutnost pročišćenog proteina Cas3W230A u svim frakcijama kao što je vidljivo iz rezultata prikazanih na Slici 8 A i B. Prisutnost proteina His₆-Cas3W230A dokazala se pomoću protutijela anti-His, no i dalje su uočljive dodatne vrpce koje ukazuju ili na raspad proteina Cas3, interakciju s proteinom Cas3 ili na nespecifično vezanje proteina na kolonu. Dodatne proteinske vrpce također mogu biti i rezultat nespecifičnog vezanja protutijela anti-His, odnosno rezultat nedovoljno efikasnog blokiranja membrane u puferu za blokiranje, a prisutne su u frakcijama L, 1, 2 (Slika 8A), 7 i 8 (Slika 8B).

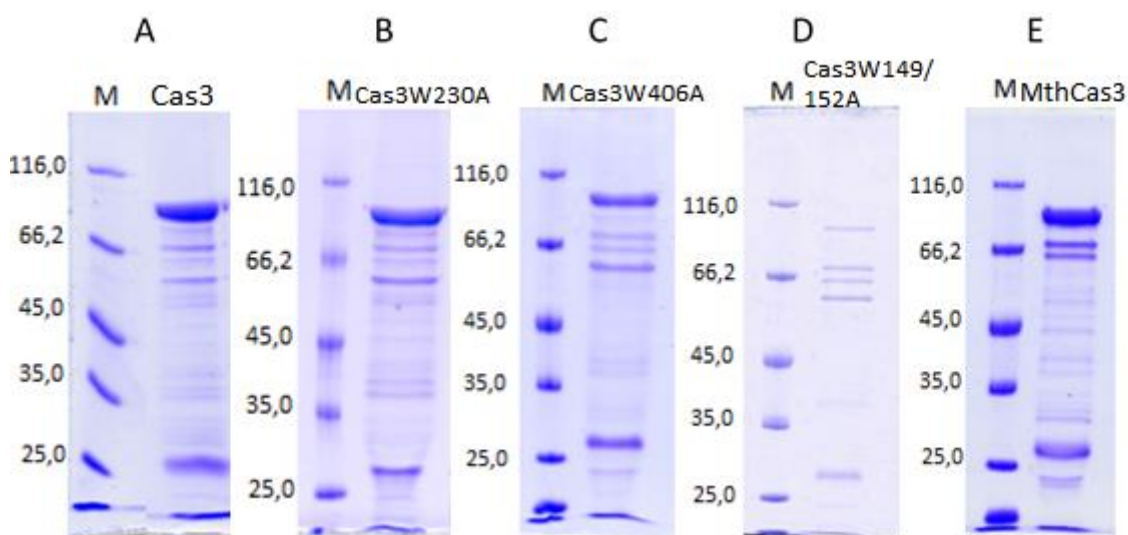


Slika 8. Analiza frakcija pročišćenog proteina Cas3W230A dobivenih afinitetnom kromatografijom metodom *Western blot*. **A)** marker (jažica M), ukupni topivi proteini (jažica L), bakterijski proteini koji se nisu vezali na kolonu nakon nanošenja bakterijskog ekstrakta na kolonu (jažica FTH), nespecifično vezani proteini koji su isprani s kolone dva puta u puferu za ispiranje s 20 mM imidazola (jažice W1 i W2), protein Cas3W230A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažice 1-3). **B)** protein Cas3W230A i drugi bakterijski proteini koji su se isprali s kolone u puferu za eluciju s 50 mM imidazola (jažica 4-6) i 125 mM imidazola (jažice 7-11).

Za potrebe daljnjih analiza strukture proteina, bilo je potrebno dobiti što čišći protein Cas3 u što većoj koncentraciji u odgovarajućem puferu. Frakcije 7 i 8 sadržavale su najveću količinu čistog proteina Cas3W230A, no ipak u nedovoljnoj mjeri te su zbog toga spojene zajedno sa frakcijama 9-11 i ukoncentrirane membranskom ultrafiltracijom. Frakcije su uz protein Cas3W230A sadržavale i ostale proteine koji su bili prisutni u znatno manjoj koncentraciji te sam zbog toga zaključila da ne bi trebali imati veliki utjecaj na daljnje analize proteina Cas3. Svim ukoncentriranim frakcijama zamijenjen je pufer s puferom pogodnim za mjerenja strukturne

konformacije, odnosno mjerenja intrinzične fluorescencije triptofana i cirkularnog dikroizma te im je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija koristeći metodu po Bradfordu.

Ukoncentrirani pročišćeni proteini Cas3 također su analizirani metodom SDS-PAGE za sve replike proteina Cas3 divljeg tipa, Cas3W230A, Cas3W406A, Cas3W148/152 i MthCas3. Rezultati su prikazani na Slici 9, a izmjerene koncentracije proteina u Tablici 11. Uspoređujući intenzitet proteinskih vrpca oko 100 kDa, koje predstavljaju protein Cas3, najveći se opažava na Slici 9E (2. replika MthCas3), nešto manji intenzitet se opažava na 9A (3. replika Cas3), potom na 9B (2. replika Cas3W230A) te na 9C (1. replika Cas3W406A), a najmanji intenzitet navedene proteinske vrpce primjećuje se na Slici 9D (2. replika Cas3W149/152A). Intenziteti proteinskih vrpca podudaraju se s izmjerenim koncentracijama (Tablica 11) uz iznimku 1. replike Cas3W406A. Uzorci proteina Cas3W149/152A zbog male koncentracije bili su neupotrebljivi za daljnja biofizikalna mjerenja intrinzične fluorescencije triptofana te sam odustala od daljnjeg istraživanja s ovim mutantom. Protein MthCas3, iz termofilne arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, pročišćen je u četiri replike radi potrebe mjerenja cirkularnog dikroizma u dovoljnim količinama kao i svi ostali ukoncentrirani uzorci proteina Cas3 za potrebe mjerenja intrinzične fluorescencije triptofana.

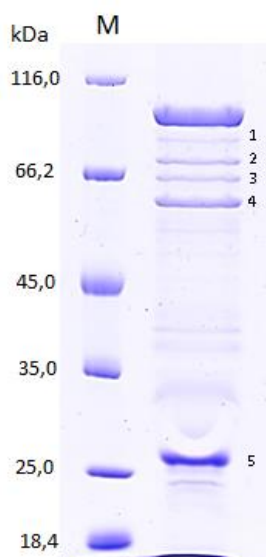


Slika 9. Pročišćeni uzorci proteina Cas3 ukoncentrirani membranskom ultrafiltracijom i analizirani metodom SDS-PAGE A) Cas3 divljeg tipa, B) Cas3W230A, C) Cas3W406A, D) Cas3W149/152A i E) MthCas3. Marker (jažica M). Proteinska vrpca oko 100 kDa predstavlja ukoncentrirani pročišćeni protein Cas3.

Tablica 11. Izmjerene koncentracije proteina Cas3 u ukoncentriranim uzorcima.

PROTEIN	IZMJERENE KONCENTRACIJE ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			
	1. REPLIKA	2. REPLIKA	3. REPLIKA	4. REPLIKA
Cas3	0.792	0.513	0.525	/
Cas3W230A	0.650	0.467	0.414	/
Cas3W406A	1.444	0.575	0.495	/
Cas3W149/152A	0.266	0.073	/	/
MthCas3	0.935	0.681	0.265	0.974

Utvrđivanjem prisutnosti proteina Cas3 u proteinskoj vrpici oko 100 kDa u svim frakcijama metodom *Western blot* ostalo mi je doznati koji se proteini nalaze u ostalim proteinskim vrpicama koristeći masenu spektrometriju. Uzorci su uzeti iz frakcije ukoncentriranih pročišćenih proteina (konkretnije, iz 2. replike proteina Cas3W230A). Analizirani uzorci označeni su brojevima i prikazani na Slici 10, a identificirani proteini iz uzoraka navedeni su u Tablici 12. U vrpici označenoj brojem 1 identificiran je protein Cas3 što odgovara masi od 90 kDa. U vrpici 2 identificiran je protein bifunkcionalna UDP-glukuronska kiselina dekarboksilaza/UDP-4-amino-4-deoksi-L-arabinoza formiltransferaza, dok je u vrpici 3 identificirana L-glutamin: D-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza. Vrpca 4 identificirana je kao lanac A, dio kompleksa šaperona GroEL-GroES, a prisutnost peptidil-prolil izomeraze tipa FKBP identificirana je u vrpici označenoj brojem 5. Iste proteinske vrpce pojavljuju se u pročišćenim frakcijama svih ostalih proteina te su ovi rezultati primjenjivi i u tim slučajevima. Rezultati masene spektrometrije pokazuju djelomično raspadanje proteina Cas3 te da se uz protein Cas3 eluiraju i gore navedeni proteini što upućuje na njihovu interakciju s proteinom Cas3 ili nespecifično vezanje na kolonu.



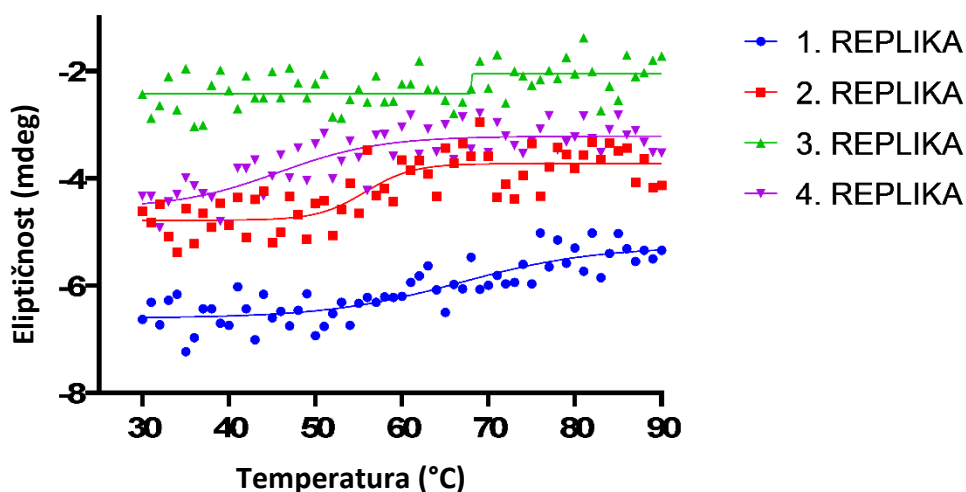
Slika 10. Uzorak ukoncentriranog pročišćenog proteina Cas3W230A koji je analiziran masenom spektrometrijom. Marker (jažica M). Analizirane vrpce označene su brojevima (1-5) te navedene u Tablici 12.

Tablica 12. Analiza proteinskih vrpce prikazanih na slici 10 masenom spektrometrijom.

Broj vrpce na gelu	Naziv proteina	Identifikacijski broj	Signifikantnost (eng. score)	Molekularna masa proteina (Da)
1	Helikaza Cas3 povezana sa CRISPR-om, protein	gi 510921513	54	100799
2	Bifunkcionalna UDP-glukuronska kiselina dekarboksilaza / UDP-4-amino-4-deoksi-L-arabinoza formiltransferaza	gi 91211549	229	74271
3	L-glutamin: D-fruktoza-6-fosfat aminotransferaza	gi 16131597	258	66853
4	Lanac A, kristalna struktura GroEL-GroES	gi 38492781	355	55124
5	Peptidil-prolil izomeraza tipa FKBP	gi 110643589	141	20854

3.2. Konformacijske promjene pročišćenog proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vitro*

Promjena sekundarne strukture proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi određena je za arhealni protein MthCas3 mjerenjem promjene eliptičnosti metodom cirkularnog dikroizma. Smanjenje eliptičnosti (Θ /mdeg) u ovisnosti o temperaturi praćeno je pri valnoj duljini od 222 nm, karakterističnoj valnoj duljini pri kojoj se prate promjene strukture α -zavojnica. Uzorci su zagrijavani u 4 navrata (4 biološke replike) automatskim podešavanjem temperature od 30 °C do 90 °C (Slika 11), a koncentracija pročišćenog proteina Cas3 korištena za analizu cirkularnim dikroizmom iznosila je $8,465 \cdot 10^{-7}$ M. U Tablici 13 i na Slici 11 prikazane su izračunate točke infleksije, odnosno temperature pri kojoj dolazi do promjene nagiba krivulje i pri kojoj ujedno dolazi do blage promjene u helikoidalnoj regiji proteina Cas3. Ujedno su dobivene i standardne devijacije prilikom izračuna točke infleksije za svaku od replika pomoću Boltzmannove funkcije. Vidljivo je da je temperatura infleksije različita za svako mjerenje što znači da takav rezultat nije pouzdan. Ovim eksperimentom htjelo se istražiti hoće li se detektirati točka infleksije koja je za protein Cas3 iz bakterije *E. coli* utvrđena na 35 °C (diplomski rad, Čulo 2017). Kako se točka infleksije nije mogla izmjeriti, mogu pretpostaviti da je promjena u helikoidalnoj regiji karakteristična za protein Cas3 iz bakterije *E. coli*, ali ne i za protein Cas3 iz arheobakterije *M. thermoautotrophicus*.



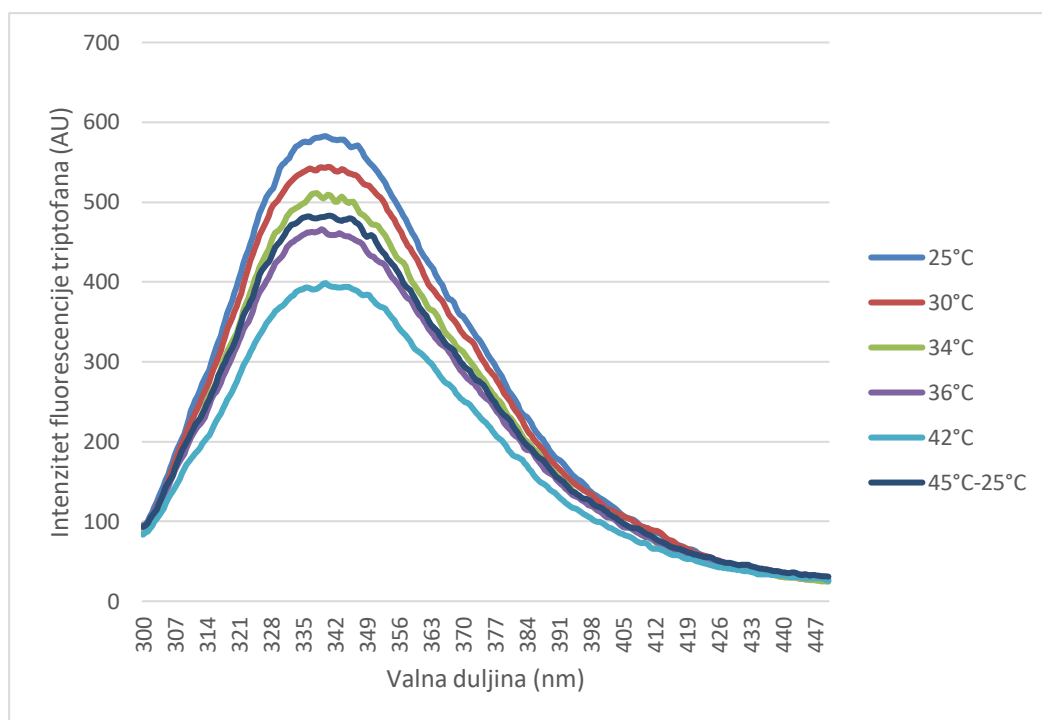
Slika 11. Praćenje promjena sekundarne strukture proteina MthCas3 u ovisnosti o temperaturi pomoću cirkularnog dikroizma na 222 nm. Točkama je označena eliptičnost (eng. *mean residue ellipticity*), a linijama je označena sigmoidalna krivulja dobivena pomoću Boltzmannove funkcije.

Tablica 13. Izmjerene točke infleksije i pripadajuće standardne devijacije prilikom mjerenja promjene sekundarne strukture proteina MthCas3 u ovisnosti o temperaturi pomoću cirkularnog dikroizma na 222 nm pomoću Boltzmanove funkcije.

UZORAK ARHEALNOG MthCas3	TOČKA INFLEKSIJE
1. replika	66,71 °C ± 3,14 °C
2. replika	55,72 °C ± 1,66 °C
3. replika	68,05 °C ± ∞
4. replika	45,74 °C ± 3,39 °C

Ostalim pročišćenim proteinima Cas3, promjena sekundarne strukture u ovisnosti o temperaturi određena je praćenjem promjene intrinzične fluorescencije triptofana (IFT). Dominantni fluorofor u proteinima je indolni prsten aminokiseline triptofan (Trp, W). Maksimum apsorpcije Trp je na 280 nm, dok je maksimum emisije na 308-355 nm te ovisi o aminokiselinskom okruženju u kojem se Trp nalazi. Na intenzitet emisijskog spektra Trp također utječu konformacijske promjene, prisustvo supstrata i denaturacija proteina. Smanjenje intenziteta fluorescencije naziva se gašenje fluorescencije (eng. *quenching*).

Prilikom mjerenja intrinzične fluorescencije Trp praćena je ovisnost intenziteta fluorescencije Trp o valnoj duljini na 5 različitih temperatura (Slika 12). Denaturacijom proteina triptofani postaju izloženiji otapalu pa dolazi do pomaka emisijskog maksimuma prema višim valnim duljinama (Pan i sur. 2011). Kao što je i vidljivo iz slike 12, do emisijskog maksimuma dolazi na najvišoj vrijednosti emisije Trp, točnije pri valnoj duljini od oko 340 nm. Povišenjem temperature dolazi do postepenog smanjenja fluorescencije, što upućuje na promjenu u konformaciji proteina, i naposljetku, denaturaciju proteina.



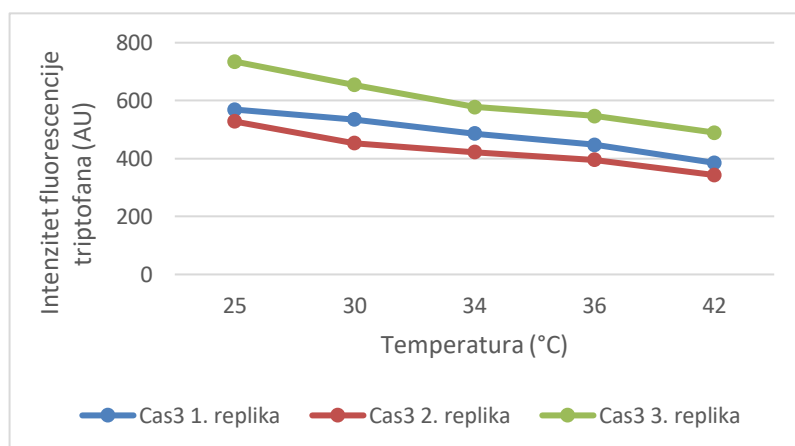
Slika 12. Ovisnost intenziteta fluorescencije triptofana proteina Cas3 o valnoj duljini pri različitim temperaturama inkubacije izmjerena metodom intrinzične fluorescencije triptofana.

Zabilježene su vrijednosti intenziteta fluorescencije Trp na emisijskom maksimumu za svaku od temperatura za svaki protein Cas3, a rezultati su prikazani na Slici 13 A, B i C. Iz prikaza ovisnosti intenziteta fluorescencije Trp proteina Cas3 o temperaturi, može se primjetiti da svi uzorci pokazuju sličan blagi nelinearan pad intenziteta s povišenjem temperature što je uočljivije na temperaturama od 34 do 42 °C. Uspoređujući replike za protein Cas3 na slici 13A može se primjetiti da pročišćeni protein Cas3 ima sličan pad intenziteta fluorescencije Trp u svim replikama. Točke infleksije su iznosile za 1. repliku $x_0 = 34,65 \text{ °C} \pm 0,47 \text{ °C}$, za 2. $x_0 = -65,81 \text{ °C} \pm 9898,45 \text{ °C}$, a za 3. repliku $x_0 = 31,16 \text{ °C} \pm 0,13 \text{ °C}$. U slučaju proteina Cas3W230A (Slika 13B) vidljivo je odstupanje 2. replike gdje su zabilježeni intenziteti fluorescencije Trp bitno manji od 1. i 3. replike, te odstupanje u intenzitetu fluorescencije izmjereno na 30 °C u slučaju 3. replike. Kako je ostatak krivulje sličan obliku krivulja ostalih replika, mogu zaključiti da je ovo odstupanje iznimka te je vjerojatno rezultat osjetljivosti metode. Unatoč tome, zabilježena je točka infleksije od $x_0 = 33,56 \text{ °C} \pm 4,2 \text{ °C}$, kao i u slučaju 2. replike gdje je iznosila $x_0 = 29,77 \text{ °C} \pm 2,23 \text{ °C}$, dok se za 1. repliku pokazalo da točka infleksije ne postoji ($x_0 = 201,68 \text{ °C} \pm 132388,74 \text{ °C}$). Intenzitet fluorescencije Trp za 1. repliku proteina Cas3W406A (Slika 13C) znatno je niži od intenziteta u ostale dvije replike. Moguće je da je došlo do greške prilikom mjerenja koncentracije

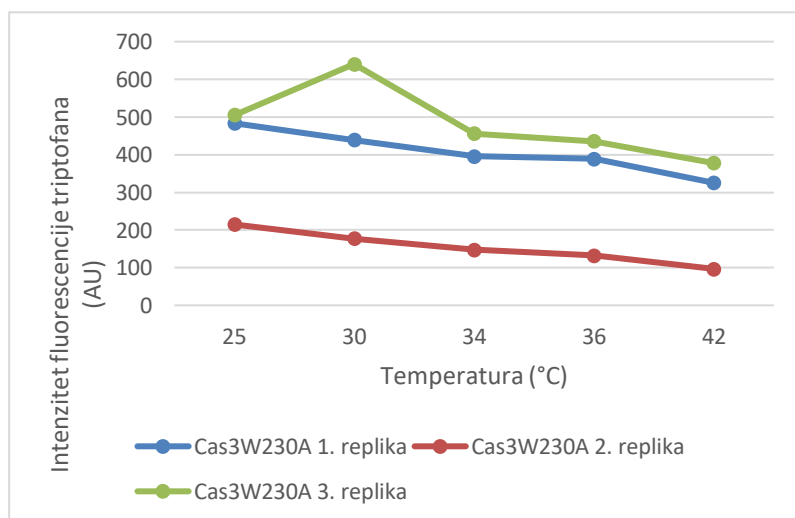
proteina Cas3 koje je rezultiralo nižom koncentracijom proteina nego što je bila potrebna, a samim time i manjom koncentracijom triptofana koji bi doprinijeli većem intenzitetu fluorescencije u uzorku. Za ovu repliku zabilježena je točka infleksije od $x_0 = 32,26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,55 \text{ }^\circ\text{C}$, kao i za 3. repliku ($x_0 = 33,36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,29 \text{ }^\circ\text{C}$), ali nije prisutna u 2. replici, odnosno iznosila je $x_0 = 112,96 \text{ }^\circ\text{C} \pm 6750,05 \text{ }^\circ\text{C}$. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da nema razlike između divljeg tipa proteina Cas3 i proteina Cas3W230A i Cas3W406A. To može značiti da ove mutacije ne utječu na promjenu aktivnosti proteina Cas3.

Mjerenja dobivena cirkularnim dikroizmom (Slika 11) i intrinzičnom fluorescencijom triptofana (Slika 12 i 13) pokazuju da pročišćeni Cas3 nije denaturiran te da se vjerojatno nalazi u aktivnom obliku.

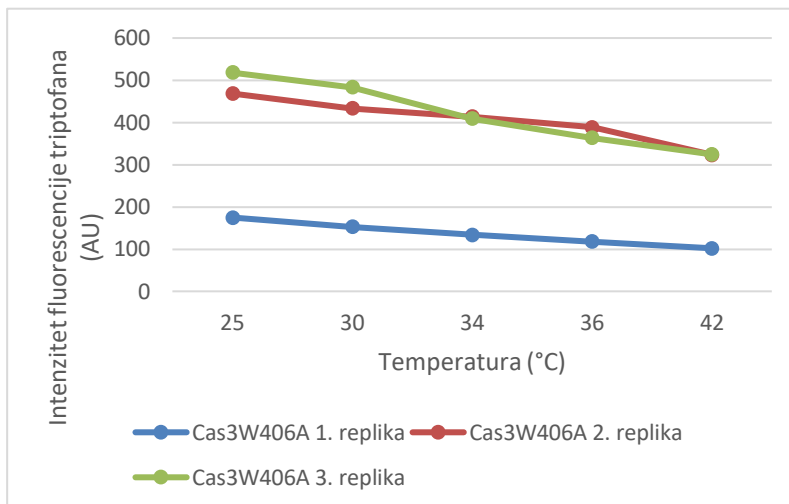
A



B



C



Slika 13. Ovisnost intenziteta fluorescencije triptofana o temperaturi inkubiranja za pročišćene proteine Cas3, Cas3W230A i Cas3W406A.

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

Prethodnim istraživanjima utvrđena je otpornost bakterije *E. coli* s anti-lambda razmaknicom i aktivnim genima *cas* na infekciju fagom λ na 30 °C, ali ne i na 37 °C, što se uočava pojavom plakova na hranidbenim podlogama (Majsec i sur. 2016). Također, koristeći isti pristup, potvrđeno je *in vivo* da se aktivnost proteina Cas3 promijenila na 35 °C i time potvrdila istraživanja o promjeni konformacije *in vitro* (diplomski rad, Čulo 2017). Kako bi se to isto napravilo i s ovim istraživanjem, praćena je aktivnost sustava CRISPR-Cas, odnosno proteina Cas3, određivanjem broja nastalih plakova po mililitru (PFU/ml). Korišten je soj IIB1266 (Tablica 1) koji sadrži dvije anti-lambda razmaknice (λc i $\lambda T3$) u koji je dodan kompleks Cascade na plazmidu (soj IIB1266 je transformiran s plazmidom pEB549), a zatim su dodani plazmidi s i bez gena *cas3* (prazan vektor, pAH4, pIIB37, pIIB39 i pIIB41). Serijska decimalna razrjeđenja faga λ (od 10^{-2} do 10^{-6}) su nanosena na bakterijske livade u dvije replike koje su zatim inkubirane preko noći na 30 °C i na 37 °C. Rezultati su prikazani u Tablici 14. Plakovi su se, u većini slučajeva, pojavili pri decimalnom razrjeđenju od 10^{-6} . Prema očekivanjima, na bakterijskim livadama soja IIB1266 s divljim tipom Cas3 (pAH4) na 30 °C nije došlo do pojave plakova. Plakovi su se pojavili na 37 °C. Soj bez gena *cas3* (IIB1266 + pCascade + pBAD) služio je kao negativna kontrola te je došlo do pojave plakova na obje temperature, a u većem broju na 37 °C. Broj plakova na bakterijskim livadama soja s

plazmidima pIIB37 i pIIB39 je smanjen u odnosu na negativnu kontrolu i plakovi su jako mutni na 30 °C dok su na 37 °C slični broju plakova soja koji sadrži divlji tip Cas3 (IIB1266 + pCascade + pAH4). Ono što odstupa je soj IIB1266 + pCascade + pIIB41 koji na 30 °C ima bistre plakove i sličan broj plakova kao i negativna kontrola koja ne sadrži gen *cas3*, dok je na 37 °C broj plakova sličniji broju sojeva s plazmidima pIIB37 i pIIB39. Također, inkubiranjem ovih stanica na 25 °C broj plakova se smanjio što je slično ponašanju aktivnog proteina Cas3, odnosno mijenjanjem temperature inkubiranja mijenjala se aktivnost. Ovi rezultati ukazuju da mutant Cas3W149/152A sadrži promijenjenu α -zavoju zbog koje je protein Cas3 izgubio aktivnost na 30 °C, dok drugi mutanti nisu što je u skladu s rezultatima na pročišćenim proteinima.

Tablica 14. Ovisnost broja nastalih plakova (PFUs/ml) o temperaturi inkubacije i prisutnosti različitih mutacija gena *cas3*. Za plakove narasle pri decimalnim razrjeđenjima od 10^{-5} i 10^{-6} izračunata je srednja vrijednost.

SOJ	PFU/ml OVISNO O TEMPERATURI INKUBACIJE	
	30 °C	37 °C
IIB1266+pCascade+pBAD (negativna kontrola, prazan vektor)	1,25*10 ⁹	4,1*10 ⁹
IIB1266+pCascade +pAH4 (pozitivna kontrola; Cas3)	Nema plakova	0,305*10 ⁹
IIB1266+pCascade+p37 (Cas3W230A)	0,115*10 ⁹	Srednja vrijednost 1,11*10 ⁹
IIB1266+pCascade+p39 (Cas3W406A)	0,103*10 ⁹	1,25*10 ⁹
IIB1266+pCascade+p41 (Cas3W149/152A)	Srednja vrijednost 1,1*10 ⁹	2,4*10 ⁹

4. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je mehanizam obrane bakterije sustavom CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* od stranih molekula DNA i RNA ovisan o temperaturi. Majsec je zajedno sa svojim suradnicima genetičkom analizom utvrdila da je za to odgovoran protein Cas3 i pretpostavila da je to posljedica promjene njegove količine ili stabilnosti aktivnog proteina Cas3 (Majsec i sur. 2016). Kasnija istraživanja su pokazala da protein Cas3 mijenja konformaciju na 35 °C u nepoznatoj α -zavojnici što dovodi do inaktivacije proteina Cas3 (diplomski rad, Čulo 2017). U ovom radu htjela se otkriti nepoznata α -zavojnicu te potvrditi istraživanje temperaturno-ovisne promjene sekundarne strukture proteina Cas3 mjerenjem intrinzične fluorescencije triptofana. Također se htjelo utvrditi da li je ova promjena sekundarne strukture sačuvana i u arhealnom tipu proteina Cas3 iz bakterije *Methanothermobacter thermoautotrophicus*.

Kako bi se moglo ponoviti istraživanje temperaturne ovisnosti sekundarne strukture proteina Cas3 trebalo je dobiti protein u pročišćenom obliku. Zbog toga je kao početni plazmidni konstrukt korišten već postojeći plazmid pAH4 (Tablica 2) gdje je u vektoru pBAD kloniran gen *cas3* i dodan nukleotidni slijed za histidinski privjesak od 6 histidina na 5'-kraju gena koji je omogućio pročišćavanje proteina Cas3 afinitetnom kromatografijom. Pročišćavanjem su dobivene manje koncentracije proteina nego ranije (diplomski rad, Čulo 2017). Mogući razlog je da su u ovom radu korišteni plazmidni konstrukti gdje je Cas3 mogao nepovoljno utjecati na replikaciju plazmida i sintezu netopivog proteina (Ivančić-Baće i sur. 2013), te su u tom slučaju kromosomski konstrukti bolja opcija (diplomski rad, Čulo 2017). Međutim, zbog jednostavnijeg uvođenja točkastih mutacija, izabran je pristup s plazmidima. Nadalje, korištene su veće kolone za pročišćavanje proteina (14 ml) koje su po uputama proizvođača namijenjene za pročišćavanje s Ni-TED ili Ni-IDA prahom te možda nisu prikladne za pročišćavanje Ni-NTA agaroznim kuglicama. Stoga, s ciljem dobivanja veće koncentracije pročišćenog proteina trebalo bi koristiti kolone namijenjene upravo za Ni-NTA ili staviti gen pod neki drugi promotor.

Pročišćavanje proteina Cas3W149/152A je bilo najproblematičnije, gdje su dobivene jako male količine proteina što ukazuje da ovaj protein ima jako promijenjenu konformaciju i lako stvara netopive agregate ili da je protein nestabilan i lako se raspada. Za buduća istraživanja trebalo bi isprobati inducirane stanice inkubirati duže na nižim

temperaturama prilikom pročišćavanja (cijelu noć na 16 °C) što bi moglo pomoći da protein zauzme pravilnu konformaciju i olakšati pročišćavanje. Ostali proteini Cas3 su se pročistili s dobrom efikasnošću, i iz analize ukoncentriranih pročišćenih proteina Cas3 metodom SDS-PAGE intenziteti proteinskih vrpce Cas3 podudarali su se s izmjerenim koncentracijama (Tablica 11) uz iznimku 1. replike Cas3W406A, gdje je vjerojatno došlo do greške pri mjerenju koncentracije proteina.

Uz protein Cas3 eluirali su se i drugi proteini koji su identificirani masenom spektrometrijom (Tablica 14). Upotrebom ultracentrifugalnih filter kolonica s celuloznom membranom koja propušta proteine molekularne mase manje od 50 kDa, a zadržava proteine s molekularnom masom većom od 50 kDa, pokušalo se riješiti nekih od kontaminacija. Međutim, čak i nakon njihove upotrebe pokazana je prisutnost proteina manjih od 50 kDa (kao što je peptidil-prolil izomeraza tipa FKBP) što dodatno potvrđuje moguću interakciju tog proteina i Cas3 te su kao takvi preveliki da bi prošli kroz pore filtera na kolonici. Analizom proteina na poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima vidimo primarnu strukturu proteina, te zbog toga bi jedan od razloga također mogao biti da ti proteini stvaraju multimerne u nativnom obliku, samim time bi im i masa bila dvostruko veća te kao takvi ne bi mogli proći kroz pore filtera na kolonici. Uistinu, pretragom baze podataka za proteinske strukture *CATH: Protein Structure Classification Database* utvrdilo se da su dva identificirana proteina dimeri, jedan je heksamer, a jedan je sastavljen od 14 podjedinica. Identificiranjem proteina Cas3 u dvije zasebne proteinske vrpce, može se zaključiti da je došlo do djelomičnog raspada proteina. Ovi rezultati podudaraju se s rezultatima prethodne analize pročišćene frakcije proteina Cas3 metodom masene spektrometrije (diplomski rad, Čulo 2017). Pri identifikaciji potencijalnih interakcijskih partnera proteina Cas3 bilo bi zanimljivo prvo proučiti funkciju i strukturu ovih proteina identificiranih masenom spektrometrijom te istražiti doprinose li stabilnosti ili nestabilnosti proteina Cas3. Interakcije određenih proteina s proteinom Cas3 mogu se analizirati jednom od predloženih metoda protein-protein interakcija u radu Rao i suradnika (Rao i sur. 2014).

Uvođenjem točkastih mutacija u triptofanima (Trp u Ala) u 3 regije/ α -zavojnice proteina Cas3 htjelo se istražiti koja je helikoidalna regija Cas3 odgovorna za temperaturno-ovisnu aktivnost proteina. Točkaste mutacije koje dovode do promjene aminokiseline triptofana (W) u alanin (A) uspješno su uvedene na četiri različita mjesta u proteinu, W230A (pIIB37), W406A (pIIB39), W149A i W152A (pIIB41). Mjerenja

intrinzične fluorescencije triptofana na različitim temperaturama u uzorcima pročišćenog proteina Cas3 potvrdila su da dolazi do konformacijske promjene u strukturi proteina Cas3, no ne može se sa sigurnošću reći pri kojoj temperaturi ona nastupa. Nadalje, nisu se primjetile značajne razlike između divljeg i mutantnog tipa Cas3 (Cas3W230A i Cas3W406A) u stupnju promjene intenziteta fluorescencije triptofana, što upućuje da ove α -zavojnice nisu odgovorne za aktivnost proteina Cas3. Metoda intrinzične fluorescencije triptofana se nije pokazala pouzdanom kao cirkularni dikroizam, vjerojatno zbog načina zagrijavanja uzorka. Naime, prilikom mjerenja promjene eliptičnosti cirkularnim dikroizmom jedan alikvot pročišćenog proteina Cas3 se inkubira na svim temperaturama, za razliku od intrinzične fluorescencije triptofana koja zahtjeva svaki put novi alikvot za svaku od mjerenih temperatura. Kako je napravljena zamjena triptofana u alanin, ova supstitucija je bila pogodnija za analizu intrinzičnom fluorescencijom triptofana, a ne cirkularnim dikroizmom. Također, uređaj za mjerenje bio je lakše dostupan jer se nalazi na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, a cirkularni dikroizam se mjeri na Institutu Ruđer Bošković.

Unatoč nedostacima ove metode i odstupanjima u mjerenju, ovi rezultati *in vitro* potvrđeni su *in vivo* određivanjem broja plakova faga λ . Na bakterijskim livadama soja IIB1266 koji sadrži anti-lambda razmaknice i kompleks Cacsade uz dodani divlji tip Cas3 na 30 °C nema plakova zbog prisutne aktivnosti proteina Cas3. Plakovi su se pojavili na 37 °C što ukazuje na gubitak aktivnosti proteina Cas3. Ovi rezultati podudaraju se s rezultatima temperaturne osjetljivosti divljeg tipa Cas3 u prethodnim istraživanjima (diplomski rad, Čulo 2017; Majsec i sur. 2016). Broj plakova na bakterijskim livadama sojeva s Cas3W230A i Cas3W406A međusobno su slični na obje temperature te se ponašaju nalik divljem tipu Cas3. Smatram da je u tim sojevima protein Cas3 aktivan i pruža dostatnu zaštitu bakterijama na 30 °C te je izgubio aktivnost inkubacijom na 37 °C. Kao najzanimljiviji mutant pokazao se Cas3W149/152A. Analiza *in vivo* na 30 °C pokazuje neaktivnost ovog mutiranog proteina Cas3 što se očitovalo pojavom plakova. Zahvaćena α -zavojnica blizu je nukleaznog centra proteina Cas3 na N-kraju proteina (Slika 14) te je potencijalna helikoidalna regija u kojoj na 35 °C dolazi do suptilne konformacijske promjene uzrokujući gubitak aktivnosti proteina Cas3. Da bi se moglo sa sigurnošću tvrditi da je ovo odgovorna α -zavojnica potrebno je pročistiti ovaj mutantni protein, izmjeriti mu točku infleksije cirkularnim dikroizmom (pokazati da se izgubila) i

pokazati da pri različitim temperaturama inkubacije pročišćeni protein Cas3 mijenja nukleaznu aktivnost.



Slika 14. Organizacija domena proteina Cas3 bakterije *Thermobifida fusca* (preuzeto i prilagođeno prema: Huo i sur. 2014). HD nukleazna domena obilježena je sivom bojom, RecA1 svjetloplavom, RecA2 zelenom, spiralna poveznica rozom, a C-terminalna domena ljubičastom bojom. Žutom bojom obilježena je jednolančana DNA.

Mjerenjima cirkularnim dikroizmom izvedena na uzorku pročišćenog proteina Cas3 iz arheje *Methanothermobacter thermoautotrophicus* htjelo se utvrditi je li promjena u sekundarnoj strukturi proteina Cas3 ovisna o temperaturi univerzalna. Mjerenja su rađena na istom principu kao i mjerenja cirkularnim dikroizmom divljeg tipa pročišćenog proteina Cas3 iz *E. coli* gdje se primjetila promjena u helikoidalnoj regiji proteina na 35 °C (diplomski rad, Čulo 2017). Dobiveni rezultati za arhealni MthCas3 nisu ukazali na konformacijsku promjenu, a očekivano je da bi bila na oko 60 °C jer je arheja termofilna. U razumijevanju ovih rezultata pomogla mi je usporedba aminokiselinskih slijedova arheja/bakterija koju su napravili Gong i suradnici (Slika 15) (Gong i sur. 2014). Naime, α -zavojnica koja je identificirana kao važna regija za aktivnost proteina Cas3 prisutna je, po trenutnim saznanjima, samo u strukturi proteina Cas3 iz bakterije *E. coli*. Dio te α -zavojnice obuhvaća dio aminokiselinskog slijeda koji, (prikazano na Slici 15, regija označena crvenim pravokutnikom, od 143P do 152V) kako izgleda, nije nađen u proteinu Cas3 drugih bakterija ili arheja te je sačuvan kao dio proteina Cas3 bakterije *E. coli*. Za sad se ne zna na koji način dolazi do konformacijske promjene u proteinu Cas3, koliko je konzervirano i koja je uloga/razlog ove post-translacijske regulacije aktivnosti proteina Cas3. Protein Cas3 je negativno reguliran proteinom H-NS (Majsec i sur. 2016), veže se na DNA tek nakon što kompleks Cascade stvori R-omču (Xiao i sur. 2017) tako da ne bi trebao biti toksičan za stanicu. Razlog možda leži u tome da ovaj tip zaštite bakteriji od strane DNA treba u određenim okolišnim uvjetima. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje razumio ovaj neobičan način regulacije aktivnosti proteina Cas3, a time i sustava CRISPR-Cas I-E.



Slika 15. Aminokiselinski sljedovi proteina Cas3 u arhejama i bakterijama. Konzervirani sljedovi označeni su crvenom bojom, a cilindri označuju α -zavojnice proteina Cas3 iz *T. terrestris* (preuzeto i prilagođeno iz Gong i sur. 2014).

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

- 1) Proteini Cas3 obilježeni histinskim privjeskom uspješno su pročišćeni metodom afinitetne kromatografije pomoću Ni-NTA kolone.
- 2) Masenom spektrometrijom identificirani su potencijalni interakcijski partneri proteina Cas3.
- 3) Biofizikalna mjerenja metodama cirkularnog dikroizma i intrinzične fluorescencije triptofana ukazuju da je protein Cas3 pročišćen u aktivnom obliku.
- 4) Proteini Cas3W230A i Cas3W406A sa α -zavojnicom koja sadrži supstituciju triptofana u alanin na položaju 230 ili 406 aminokiselinskog slijeda pokazuju temperaturno-ovisnu promjenu konformacije proteina kakva je prisutna u divljem tipu proteina Cas3.
- 5) Inkubacijom bakterija koje sadrže divlji tip proteina Cas3, Cas3W230A ili Cas3W406A na 37 °C dolazi do boljeg zasađivanja faga λ , odnosno do gubitka aktivnosti proteina Cas3 *in vivo*, dok je aktivnost očuvana na 30 °C.
- 6) Inkubacijom bakterija koje sadrže mutantni protein Cas3W149/152A na 30 °C i na 37 °C dolazi do pojave plakova u oba slučaja što ukazuje da protein Cas3 sa α -zavojnicom koja sadrži supstituciju triptofana u alanin na položajima 149 i 152 aminokiselinskog slijeda gubi aktivnost na 30 °C. Ako su bakterije inkubirane na 25 °C, plakovi se nisu pojavili, što ukazuje na mogući gubitak aktivnosti proteina u ovisnosti o temperaturi.
- 7) α -zavojnica navedena u zaključku 6 nalazi se blizu nukleaznog centra proteina Cas3 i potencijalno je odgovorna za aktivnost proteina Cas3.
- 8) U arhealnom tipu Cas3 nije jednoznačno utvrđena promjena u helikoidalnoj strukturi proteina kao u divljem tipu proteina Cas3 iz bakterije *E. coli*.

6. LITERATURA

- Anantharaman V., Makarova K.S., Burroughs A.M., Koonin E. V, Aravind L. (2013): Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biol. Direct* **8**: 15.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.
- 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.
- Charpentier E., Richter H., Oost J. van der, White M.F. (2015): Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 428–441.
- Cooper L.A., Stringer A.M. (2018): Determining the specificity of cascade binding, interference and primed adaptation *in vivo* in the *Escherichia* type I-E CRISPR-Cas system. *MBio* **9**: 1–18.
- Čulo A. (2017): Mehanizam temperaturene osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirezada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**: 602–607.
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P., Moineau S. (2008): Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**: 1390–1400.
- Faure G., Makarova K.S., Koonin E. V. (2018): CRISPR–Cas: Complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2018.08.030.
- Ghisaidoobe A.B.T., Chung S.J. (2014): Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 22518–22538.
- Gong B., Shin M., Sun J., Jung C.-H., Bolt E.L., Oost J. van der, Kim J.-S. (2014): Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 16359–16364.

- Grodberg J., Dunn J.J. (1988): *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245–1253.
- 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.
- Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. (2008): Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**: 1401–1412.
- Huo Y., Nam K.H., Ding F., Lee H., Wu L., Xiao Y., Farchione M.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.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakamura A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**: 5429–5433.
- 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 antagonises RNaseHI. *RNA Biol.* **10**: 770–778.
- Jackson R.N., Golden S.M., Erp P.B.G. van, Carter J., Westra E.R., Brouns S.J.J., Oost J. van der, Terwilliger T.C., Read R.J., Wiedenheft B. (2014): Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science* **345**: 1473–1479.
- Jackson S.A., McKenzie R.E., Fagerlund R.D., Kieper S.N., Fineran P.C., Brouns S.J.J. (2017): CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* **356**: 6333.
- Jansen R., Embden J.D.A. Van, Gaastra W., Schouls L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1565–1575.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Jore M.M., Lundgren M., Duijn E. van, Bultema J.B., Westra E.R., Waghmare 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., Oost J. van der, Brouns S.J.J. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 529–536.
- Kaufmann R. (1995): Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass

- spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J. Biotechnol.* **41**: 155–175.
- Koonin E. V., Zhang F. (2017): Coupling immunity and programmed cell suicide in prokaryotes: Life-or-death choices. *BioEssays* **39**: 1-9.
- Koonin E. V., Makarova K.S., Zhang F. (2017): Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**: 67–78.
- Künne T., Kieper S.N., Bannenberg J.W., Vogel A.I.M., Miellet W.R., Klein M., Depken M., Suarez-Diez M., Brouns S.J.J. (2016): Cas3-derived target DNA degradation fragments fuel primed CRISPR adaptation. *Mol. Cell* **63**: 852–864.
- Loeff L., Brouns S.J.J., Joo C. (2018): Repetitive DNA reeling by the Cascade-Cas3 complex in nucleotide unwinding steps. *Mol. Cell* **70**: 385–394.e3.
- Majsec K., Bolt E.L., Ivančić-Baće I. (2016): Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. *BMC Microbiol.* **16**: 28–36.
- Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Koonin E. V (2011a): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct* **6**: 38.
- 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., Oost J. van der, Koonin E. V. (2011b): Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 467–477.
- Makarova K.S., Koonin E. V (2015): Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods Mol. Biol.* **1311**: 47–75.
- 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., Oost J. van der, Backofen R., Koonin E. V (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 722–736.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E. V. (2013): Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4360–4377.
- 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.
- Pan C.-P., Muiño P.L., Barkley M.D., Callis P.R. (2011): Correlation of tryptophan

- fluorescence spectral shifts and lifetimes arising directly from heterogeneous environment. *J. Phys. Chem. B* **115**: 3245–3253.
- Plagens A., Richter H., Charpentier E., Randau L. (2015): DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 442–463.
- 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 Ü., Wurm R., Arslan Z., Geißen R., Hofmann N., Wagner R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* **75**: 1495–1512.
- Rao V.S., Srinivas K., Sujini G.N., Kumar G.N.S. (2014): Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int. J. Proteomics* **2014**: 1-12.
- Samai P., Pyenson N., Jiang W., Goldberg G.W., Hatoum-Aslan A., Marraffini L.A. (2015): Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity. *Cell* **161**: 1164–1174.
- Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., Oost J. van der, Brouns S.J.J., Severinov K. (2011): Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 10098-10103.
- Sinkunas T., Gasiunas G., Waghmare S.P., Dickman M.J., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2013): *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO J.* **32**: 385–394.
- Sternberg S.H., Richter H., Charpentier E., Qimron U. (2016): Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* **61**: 797–808.
- 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.
- 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.
- Xiao Y., Luo M., Hayes R.P., Kim J., Ng S., Ding F., Liao M., Ke A. (2017): Structure basis for directional R-loop formation and substrate handover mechanisms in type I CRISPR-

Cas system. *Cell* **170**: 48–60.

Yan W.X., Hunnewell P., Alfonse L.E., Carte J.M., Keston-Smith E., Sothiselvam S., Garrity A.J., Chong S., Makarova K.S., Koonin E. V, Cheng D.R., Scott D.A. (2019):

Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science* **363**: 88–91.

Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S.,

Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., Oost J. van der, Regev A., Koonin E. V, Zhang F.

(2015): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system.

Cell **163**: 759–771.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime **Marta Pandžić**
Datum rođenja **13.10.1994.**

OBRAZOVANJE

- 2016 - 2019 Diplomski studij molekularne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Hrvatska)
- 2013 – 2016 Preddiplomski studij eksperimentalne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Hrvatska)

ISKUSTVO

- 2018 – 2019 Izrada diplomskog rada
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić-Baće
Neposredna voditeljica: dr. sc. Dora Markulin
Zavod za molekularnu biologiju
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2016 Terenska nastava iz kolegija Kralježnjaci i Sistematska botanika
Ježević (Vrlika)
- 2015 Terenska nastava iz kolegija Beskralježnjaci i Protozoa
Pula – Rovinj
- 2014 Studentski posao u farmaceutskoj tvrtki
Medika d.o.o., Zagreb (Hrvatska)

DODATNE INFORMACIJE

- 2016 Završni rad
Tema: Utjecaj prehrane na razvoj tumora
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Inga Marijanović
- 2014 Noć biologije