

Uloga enzima RecBCD i drugih nukleaza u CRISPR-Cas naivnoj adaptaciji u bakteriji Escherichia coli

Radovčić, Marin

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:909855>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marin Radovčić

**ULOGA ENZIMA RecBCD I DRUGIH
NUKLEAZA U CRISPR-Cas NAIVNOJ
ADAPTACIJI U BAKTERIJI
*Escherichia coli***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marin Radovčić

**ULOGA ENZIMA RecBCD I DRUGIH
NUKLEAZA U CRISPR-Cas NAIVNOJ
ADAPTACIJI U BAKTERIJI
*Escherichia coli***

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marin Radovčić

**THE ROLE OF RecBCD ENZYME AND
OTHER NUCLEASES IN *Escherichia coli*
CRISPR-Cas NAÏVE ADAPTATION**

DOCTORAL THESIS

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

Zagreb, 2021

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivane Ivančić Baće, izv. prof., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće diplomirala je 1997. godine Molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku studija zapošljava se na Zavodu za Molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu kao asistent-znanstveni novak. Magistrirala je 2000., potom se usavršavala 9 mjeseci u Institutu za genetiku Sveučilišta u Nottinghamu, Ujedinjeno Kraljevstvo, te je doktorirala 2004. Docent je postala 2008. iz područja prirodnih znanosti, polje biologija, znanstvena grana molekularna biologija i biokemija.

Fokus njenih istraživanja su mehanizmi homologne rekombinacije i popravka DNA te obrane bakterija od napada virusima (sustav CRISPR-Cas). Bila je voditeljica 2 potpore Zaklade HAZU, 3 potpore SUZ, jednog bilateralnog projekta od British Councila, a trenutno je voditeljica HRZZ projekta "Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*" (2017-2021).

Objavila je 26 znanstvenih radova i jedno poglavlje u knjizi. Dobitnica je nagrade "Željko Trgovčević" za 2003. godinu Hrvatskog genetičkog društva i Državne nagrade za znanost za znanstveno otkriće za 2018. Voditeljica je preddiplomskog i diplomskog studija Molekularna biologija od 2012., a od 2018. članica je povjerenstva za provedbu upisa na diplomatske sveučilišne studije na Biološkom odsjeku PMF-a. Članica je panela ZZ1 (znanosti o životu) pri HRZZ od 2019., članica je uredništva časopisa Priroda od 2013., a od 2019. predsjednica je Hrvatske udruge genetičkih inženjera (HUGI).

Zahvaljujem se dr. sc. Ivani Ivančić Baće, izv. prof., što mi je pružila priliku da pod njenim vodstvom izradim doktorsku disertaciju. Zahvalan sam na svom strpljenju i pomoći, te konstruktivnim kritikama i raspravama prilikom višegodišnjeg istraživanja teme koja mi je izuzetno zanimljiva. Posebno bih istaknuo optimizam i vedar duh koji su pomagali u izazovnijim trenucima doktorata!

Hvala kolegi dr. sc. Edwardu L. Boltu što me je primio u svoj laboratorij u Nottinghamu i omogućio mi bavljenje biokemijskim pokusima. Zahvaljujem se i njegovom post-doktorandu, kolegi dr. sc. Tomu Killeleai koji me je vodio kroz laboratorij dr. Bolta. Obojici se ujedno zahvaljujem na vrijednim raspravama i razmjenama ideja, te gostoprimstvu.

Prerano preminuloj kolegici dr. sc. Ekaterini Savitskaya zahvaljujem na suradnji i bioinformatičkim analizama kojima je dala dodatnu dimenziju cjelokupnom istraživanju i ovoj doktorskoj disertaciji.

Hvala kolegama Zavoda za molekularnu biologiju za ugodnu radnu atmosferu i brojne zanimljive rasprave, a naročito hvala kolegama Damjanu Mitiću i Dori Markulin, mojim suradnicima na projektima profesorice Ivančić Baće. Želim se zahvaliti i svim studentima kojima sam držao vježbe i vodio ih kroz stručnu laboratorijsku praksu i diplomske radove. I od njih sam mnogo naučio!

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci!

**Uloga enzima RecBCD i drugih nukleaza u CRISPR-Cas
naivnoj adaptaciji u bakteriji *Escherichia coli***

MARIN RADOVČIĆ

Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta,
Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

Sustav CRISPR-Cas je obrambeni mehanizam bakterija od stranih genetičkih elemenata. Za pružanje zaštite je neophodna ugradnja fragmenta strane molekule DNA (razmaknice) u lokus CRISPR. Ugradnja nove razmaknice se naziva naivnom adaptacijom, a za ugradnju je neophodan proteinski kompleks Cas1-Cas2. Nije poznato kako nastaju fragmenti za ugradnju, no smatra se da bitnu ulogu ima nukleazna aktivnost enzima RecBCD. U ovom radu je detaljnije istražena uloga enzima RecBCD i drugih egzonukleaza u naivnoj adaptaciji. Praćenjem učinkovitosti adaptacije *in vivo* u sojevima *E. coli* mutiranim za istraživane gene je pokazano da nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije neophodna, već samo helikazna, te da nastajanje 5'-stršecih krajeva DNA pomoću egzonukleaza pomaže adaptaciju. Utvrđeno je *in vitro* da kompleks Cas1-Cas2 može cijepati DNA s 5'-stršecim krajevima, a sekvenciranjem je utvrđeno da većina ugrađenih razmaknica potječe s kromosoma. Rezultati potvrđuju ulogu enzima RecBCD u stvaranju fragmenata DNA, a sam proces adaptacije ne utječe na vijabilnost.

(109 stranica / 26 slika / 23 tablice / 164 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *E. coli*, CRISPR-Cas, naivna adaptacija, Cas1-Cas2, RecBCD, rekombinacija

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

Ocjenjivači: dr. sc. Dijana Škorić, prof.

dr. sc. Davor Zahradka, viši znanstveni suradnik

dr. sc. Dušica Vujaklija, znanstvena savjetnica

**The role of RecBCD enzyme and other nucleases
in *Escherichia coli* CRISPR-Cas naïve adaptation**

MARIN RADOVČIĆ

Division of Molecular Biology, Faculty of Science,
Horvatovac 102 a, 10 000 Zagreb

CRISPR-Cas system is a bacterial defence mechanism against foreign genetic elements based on insertion of foreign DNA fragments (spacers) into the CRISPR array. Acquisition of new spacers is called naïve adaptation and is catalysed by Cas1-Cas2 protein complex. It is unknown how fragments for insertion are generated, but it is believed that the nuclease activity of RecBCD enzyme plays an important role. The aim of this research was to further elucidate the role of RecBCD and other exonucleases in naïve adaptation in *E. coli*. *In vivo* adaptation efficiency measurements showed that the helicase activity of RecBCD is essential and that generation of 5' overhangs by host exonucleases promotes adaptation. Cas1-Cas2 complex cleaved DNA with 5' overhangs *in vitro* and sequencing analysis showed that the majority of new spacers were of chromosomal origin. Overall, results confirm RecBCD's involvement in naïve adaptation with no detrimental effects on host viability.

(109 pages / 26 figures / 23 tables / 164 references / original in Croatian)

Keywords: *E. coli*, CRISPR-Cas, naïve adaptation, Cas1-Cas2, RecBCD, recombination

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor

Reviewers: Dr. Dijana Škorić, Professor

Dr. Davor Zahradka, Senior Research Associate

Dr. Dušica Vujaklija, Senior Scientist

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Sustav CRISPR-Cas: kratki pregled kroz povijest	5
2.2. Mehanizam djelovanja, klasifikacija i primjena sustava CRISPR-Cas.....	7
2.3. Sustav CRISPR-Cas bakterije <i>Escherichia coli</i> K-12: struktura, mehanizam djelovanja i regulacija	10
2.4. Detaljnije o naivnoj adaptaciji u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	13
2.5. Uloga enzima RecBCD u naivnoj adaptaciji u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	16
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi.....	21
3.2. Početnice za PCR i oligonukleotidni supstrati molekula DNA.....	25
3.3. Hranjivi mediji, puferi, gelovi i ostali materijal	27
3.4. Izrada mutanata bakterije <i>E. coli</i>	33
3.5. Provjera genotipa mutanata <i>E. coli</i>	35
3.6. Istraživanje naivne adaptacije s genima <i>cas1</i> i <i>cas2</i> eksprimiranim s plazmida.....	36
3.7. Istraživanje naivne adaptacije s genima <i>cas1</i> i <i>cas2</i> eksprimiranim s kromosoma.....	39
3.8. Analiza sekvenci novougrađenih razmaknica u lokus CRISPR.....	39
3.9. Analiza utjecaja ugradnje razmaknica na preživljenje stanica	39
3.10. Priprema oligonukleotidnih supstrata molekula DNA za biokemijske analize.....	41
3.11. Analiza vezanja proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za oligonukleotidne supstrate molekule DNA <i>in vitro</i>	43
3.12. Analiza nukleazne aktivnosti proteina Cas1-Cas2 i Cas1 u reakciji s oligonukleotidnim supstratima molekule DNA <i>in vitro</i>	45
3.13. Analiza nukleazne aktivnosti proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u prisustvu proteina SSB ili RecA	46
4. REZULTATI.....	49
4.1. Utjecaj nukleazne i helikazne funkcije enzima RecBCD na naivnu adaptaciju.....	49
4.2. Utjecaj 3'- i 5'-jednolančanih DNA-nukleaza na naivnu adaptaciju	54

4.3. Utjecaj gena nepoznate funkcije, <i>yayD</i> i <i>ycfH</i> , na naivnu adaptaciju	60
4.4. Naivna adaptacija s ekspresijom gena <i>cas1</i> i <i>cas2</i> s kromosoma.....	63
4.5. Porijeklo novougrađenih razmaknica u lokusu CRISPR	64
4.6. Utjecaj ugradnje novih razmaknica na preživljenje stanica	67
4.7. Vežanje proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za oligonukleotidne supstrate molekula DNA <i>in vitro</i>	71
4.8. Cijepanje oligonukleotidnih supstrata molekule DNA proteinskim kompleksom Cas1- Cas2.....	73
4.9. Nukleazna aktivnost proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u prisustvu proteina RecA ili SSB.....	76
5. RASPRAVA	77
6. ZAKLJUČCI.....	89
7. LITERATURA	90
8. PRILOZI	105
9. ŽIVOTOPIS.....	109

1. UVOD

Sustav CRISPR-Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; *CRISPR-associated*) je adaptivni imunski sustav prokariota, prisutan u bakterija i većini arheja, uključen u obranu od stranih genetičkih elemenata¹⁻⁴. Do sada je otkriveno više tipova sustava CRISPR-Cas, ali svi su građeni od niza kratkih ponavljajućih sljedova nukleotida (engl. *repeats*) između kojih se nalaze jedinstveni sljedovi zvani razmaknice (engl. *spacers*), te gena *cas* u neposrednoj blizini⁵. U bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*), koja je modelni organizam ove doktorske disertacije, geni *cas* su smješteni uzvodno od lokusa CRISPR. Između gena i lokusa se još nalazi i vodeća regija (engl. *leader*), unutar koje je promotor s kojeg započinje prepisivanje lokusa CRISPR^{6,7}. Imunost se stječe uzimanjem fragmenta strane molekule DNA, protorazmaknice, te njegovom mjesno-specifičnom ugradnjom u lokus CRISPR. Proces uzimanja fragmenta DNA i ugradnje zove se adaptacija. Dva su načina adaptacije, naivna i pripremljena^{8,9}. Naivna adaptacija, koja je predmet istraživanja ove doktorske disertacije, je prva faza imunskog odgovora i podrazumijeva ugradnju nove razmaknice iz strane molekule DNA u lokus domaćina CRISPR. U drugoj fazi dolazi do prepisivanja lokusa CRISPR, prvo u dugu nezrelu molekulu CRISPR RNA (pre-crRNA) koju proteini Cas zatim procesiraju u kratke zrele molekule CRISPR RNA (crRNA) od kojih svaka sadrži jednu razmaknicu. Molekulu crRNA vežu proteini Cas i koriste ju za pronalazak strane molekule DNA, iz koje je razmaknica potekla, na temelju komplementarnosti baza. Komplementarnim sparivanjem baza između crRNA i strane DNA dolazi do interferencije, zadnje faze imunskog odgovora sustava CRISPR-Cas, koja rezultira razgradnjom strane DNA^{4,10}. U obrambenom mehanizmu je bitan motiv PAM (engl. *protospacer adjacent motif*), kratki slijed nukleotida prisutan samo uz protorazmaknicu u stranjoj DNA, koji omogućuje razlikovanje strane od vlastite DNA u lokusu CRISPR s ciljem izbjegavanja autoimunosti^{11,12}.

Sam proces naivne adaptacije se odvija u tri koraka: razgradnja velike strane DNA na manje fragmente i njeno "hvatanje", prijenos fragmenta DNA (protorazmaknice) do lokusa CRISPR, te ugradnja u lokus CRISPR. Kompleks Cas1-Cas2 katalizira većinu ovih koraka, a ostali proteini domaćina sudjeluju u razgradnji strane DNA i navođenju kompleksa do lokusa CRISPR, te u sintezi DNA i ligaciji krajeva DNA domaćina prilikom ugradnje^{8,13,14}. Za razliku od same ugradnje razmaknice u lokus CRISPR koja je relativno poznata, puno manje se zna o procesima koji prethode, tj. kako se strana molekula DNA razgrađuje da bi ju kompleks Cas1-Cas2 vezao i ugradio. Pokazano je da većina razmaknica potječe iz područja

ishodišta replikacije (*oriC*), terminusa (*ter*), lokusa CRISPR, lokusa ribosomskih DNA (rDNA) i R-omči, odnosno regija u kojima češće dolazi do zastoja replikacijskih rašlji i lomova u molekuli DNA¹⁵. Smatra se da u bakteriji *E. coli* u naivnoj adaptaciji pomaže enzim RecBCD prilikom popravka dvolančanih lomova koji mogu nastati uslijed kolabiranih replikacijskih rašlji. Djelovanjem helikazne i nukleazne domene enzima RecBCD nastaju jednolančani fragmenti molekule DNA prije nego enzim naiđe na oktamerni slijed *chi* koji modulira aktivnost enzima RecBCD^{16,17}. U skladu s tim, naivna adaptacija je značajno smanjena u mutantima *recB*, *recC* i *recD* u kojima nedostaje helikazna i/ili nukleazna aktivnost. Nastali jednolančani fragmenti bi se onda mogli spojiti u dvolančane fragmente na koje bi se vezao kompleks Cas1-Cas2. Nije poznato je li spajanje spontano ili potpomognuto aktivnošću Cas1-Cas2 ili nekim dugim faktorom domaćina. Prilikom naivne adaptacije dolazi i do ugradnje fragmenata vlastite molekule DNA, ali rjeđe nego iz strane, plazmidne ili virusne molekule DNA. Međutim, ugradnja vlastitih fragmenata molekule DNA je oko 10 x veća u mutantima *recB*, *recC* i *recD*, što sugerira da enzim RecBCD također pomaže u razlikovanju vlastite od strane molekule DNA (strana DNA ima manje mjesta *chi*) ili da su fragmenti molekule DNA nastali u ovim mutantima pogodni supstrati za vezanje kompleksom Cas1-Cas2¹⁵.

Cilj ovog rada bio je detaljnije istražiti ulogu enzima RecBCD (posljedično i ulogu homologne rekombinacije i proteina RecA) u pripremi fragmenata DNA za naivnu adaptaciju u bakteriji *E. coli*, te ulogu nekoliko jednolančanih DNA-nukleaza čija bi aktivnost također mogla imati utjecaj na adaptaciju. Hipoteza je bila da nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije neophodna za nastanak fragmenata DNA, već da kompleks Cas1-Cas2 može samostalno izrezati fragmente iz odgovarajućih supstrata DNA koji nastaju djelovanjem helikazne aktivnosti enzima RecBCD i jednolančanih nukleaza u *E. coli*.

Za ova istraživanja sam koristio tri pristupa: genetički, biokemijski i bioinformatički. U prvom dijelu istraživanja genetičkom analizom različitih mutanata bakterije *E. coli* istražio sam utjecaj helikazne i nukleazne aktivnosti enzima RecBCD na naivnu adaptaciju *in vivo*. Također, istražio sam ulogu proteina RecA kako bi se isključila povezanost s enzimom RecBCD u popravku DNA gdje je protein RecA neophodan, te istražio uloge jednolančanih DNA-egzonukleaza koje cijepaju molekulu DNA u smjeru 3'→5' (*sbcB*, *sbcD*, *exoX*, *xseA*) ili 5'→3' (*recJ*, *xseA*). Za ova istraživanja koristio sam bakterijske sojeve *E. coli* s deletiranim genima *cas*, transformirane plazmidom pEB628 koji eksprimira kompleks Cas1-Cas2 ili praznim plazmidom (pBad-HisA) kao negativnom kontrolom. Plazmidi pEB628 i pBad-HisA

ujedno su služili kao strana DNA, odnosno izvor (proto)razmaknica. Za navedena istraživanja, napravio sam nove bakterijske sojeve transdukcijom pomoću bakteriofaga P1. Ugradnju razmaknica (mjera efikasnosti naivne adaptacije) pratio sam kroz tri dana uzastopnim presađivanjem (pasažiranjem) prekonoćnih kultura transformiranih sojeva *E. coli* s plazmidima pEB628 i pBad-HisA. Prekonoćne kulture sam lizirao te u njima lokus CRISPR analizirao metodom PCR i elektroforezom u agaroznom gelu. Usporedbom intenziteta signala umnoženog lokusa CRISPR sa i bez ugrađene razmaknice iz elektroforeze na agaroznom gelu kvantificirao sam uspješnost adaptacije u različitim mutantima *E. coli*. Paralelno sam pratio gubitak plazmida iz stanica (što bi moglo utjecati na efikasnost adaptacije) zasađivanjem i kvantifikacijom decimalnih razrjeđenja prekonoćnih kultura transformanata na hranjive podloge bez i sa selektivnim agansom. Istim pokusima sam istražio uloge dva gena nepoznate funkcije (*yajD* i *ycfH*) na naivnu adaptaciju.

U svrhu istraživanja mogućeg utjecaja enzima RecBCD na preživljenje stanica domaćina nakon adaptacije, analizirao sam vijabilnost nekoliko zanimljivih mutanata *E. coli*. Ovim postupkom sam analizirao pojedinačne kolonije narasle zasađivanjem prekonoćnih kultura na čvrste hranjive podloge. Metodom PCR na pojedinačnim kolonijama analizirao sam lokus CRISPR i odredio postotak živih stanica koje imaju ugrađenu razmaknicu. Bioinformatičkom analizom sekvenciranih lokusa CRISPR odredio sam porijeklo razmaknica, a dodavanjem gena *cas* za interferenciju na plazmidima odredio utjecaj razmaknica na interferenciju.

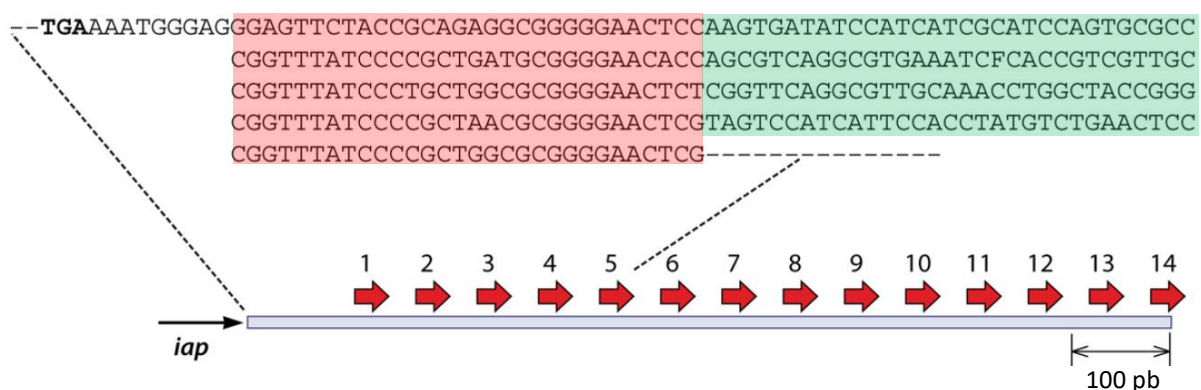
Kako bih utvrdio najbolji supstrat DNA za vezanje i eventualno cijepanje od strane kompleksa Cas1-Cas2 *in vitro*, te potvrdio rezultate *in vivo*, pripremio sam dvolančane supstrate DNA različitih 3'- i 5'-stršećih krajeva, obilježenih fluorescentnom bojom Cy5 na 5'-kraju. Supstrate sam inkubirao s različitim koncentracijama pročišćenog enzimskog kompleksa Cas1-Cas2 te analizirao metodom EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*) u poliakrilamidnom gelu. Također sam istražio utjecaj slijeda nukleotida korištenjem supstrata DNA sa i bez motiva PAM.

Za analizu porijekla ugrađenih razmaknica, što je bilo važno za interpretaciju genetičkih rezultata, odabrao sam tri mutanta *E. coli*. Nakon provedene elektroforeze u agaroznom gelu produkata PCR na lokusu CRISPR, iz gela sam izrezao i pročistio dulje fragmente (s ugrađenom razmaknicom). Ovako pročišćeni fragmenti DNA sekvencirani su tehnologijom visokoprotočnog sekvenciranja (engl. *high throughput sequencing*; HTS) te mapirani i analizirani bioinformatički.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sustav CRISPR-Cas: kratki pregled kroz povijest

Sustav CRISPR-Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR*) je dvokomponentni sustav kojeg čini skup kratkih ponavljajućih sljedova nukleotida (engl. *repeats*) međusobno odvojenih jedinstvenim sljedovima zvanim razmaknice (engl. *spacers*), te geni *cas* (engl. *CRISPR-associated*) smješteni u neposrednoj blizini. Prvo otkriće ponavljajućeg dijela sustava dogodilo se u drugoj polovici osamdesetih godina 20. stoljeća kad je japanski znanstvenik Yoshizumi Ishino otkrio ponavljajuće sljedove¹⁸. On je prilikom proučavanja funkcije gena *iap* (engl. *isozyme of alkaline phosphatase*) u bakteriji *Escherichia coli* K-12 sekvencirao regiju oko gena i nizvodno od njega otkrio ponavljajuće sljedove koji su bili različiti od svih do tada poznatih ponavljajućih sljedova (Slika 1). Nedugo nakon njega, krajem osamdesetih i početkom devedesetih godina 20. stoljeća, isti ili slični ponavljajući sljedovi otkriveni su u drugim sojevima bakterije *E. coli* i u drugim bakterijama^{19–21}. Godine 1993. je lokus CRISPR prvi put otkriven u arhejama²², te u narednim godinama u sve većem broju bakterija i arheja s razvojem naprednijih metoda sekvenciranja genoma. Ruud Jansen i suradnici su osmislili naziv CRISPR za ovaj lokus 2002.²³, a daljnjim sekvenciranjem organizama lokusi su do danas pronađeni u gotovo svim arhejama i u otprilike 50 % bakterija, dok u eukariota još nisu pronađeni²⁴.



Slika 1. Sekvence prvih pet ponavljajućih sljedova duljine 29 pb (u crvenom okviru), isprekidane jedinstvenim sljedovima duljine 32 pb (u zelenom okviru), koje je znanstvenik Yoshizumi Ishino otkrio proučavanjem rezultata sekvenciranja prilikom istraživanja funkcije gena *iap* koji se nalazi uzvodno na kromosomu bakterije *E. coli* (deblje otisnutim slovima je prikazan stop kodon gena *iap*, 5'-TGA-3'). Shema ispod sekvence prikazuje udaljenost lokusa CRISPR od 3'-kraja gena *iap* (crvenim strelicama su označeni ponavljajući sljedovi). Preuzeto i doručeno iz²⁴.

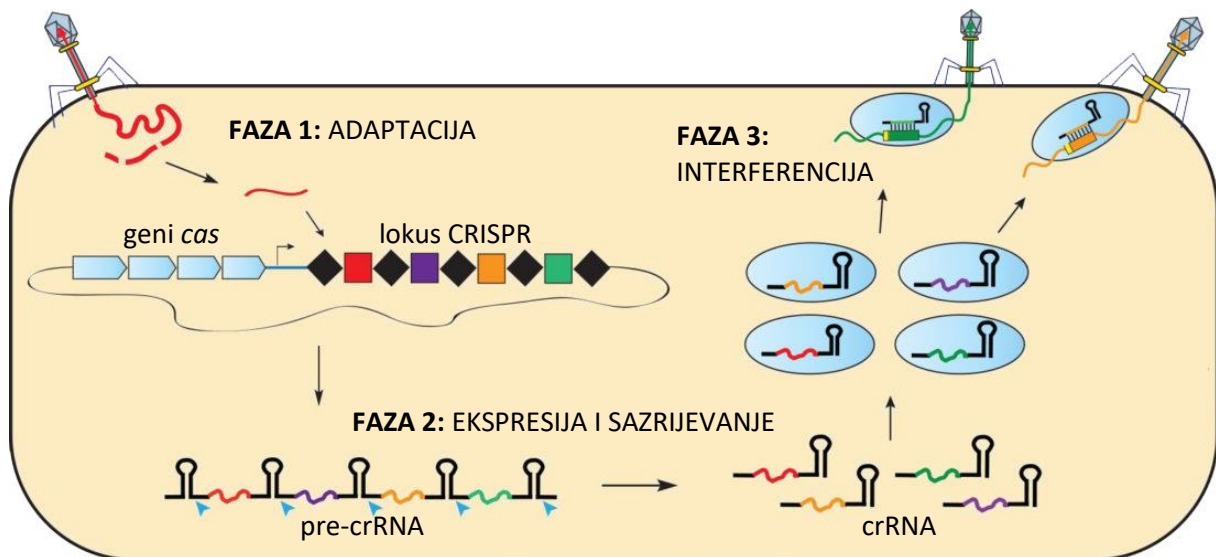
Prva značajnija otkrića vezana za moguću ulogu lokusa CRISPR dogodila su se na početku 21. stoljeća. Tada su dvije neovisne skupine istraživača, na čelu kojih su bili Francisco Mojica i Christine Pourcel, otkrile da su jedinstvene sekvence koje se nalaze između ponavljajućih sljedova u lokusu CRISPR homologne sekvencama iz profaga, bakteriofaga (skraćeno *faga*) i plazmida^{25,26}. Pretragom literature su uočili da fagi i plazmidi ne inficiraju sojeve domaćina koji imaju njima homologne sekvence u lokusu CRISPR, te su obje grupe neovisno predložile da lokus CRISPR pruža zaštitu od stranih genetičkih elemenata nalik RNA interferenciji (RNAi) u eukariota.

Razvojem metoda sekvenciranja, te paralelno s otkrićem sve većeg broja lokusa CRISPR, počelo se sve više informacija dobivati i o neposrednoj okolini genoma pokraj lokusa. Osim što su skovali naziv CRISPR, Jansen i suradnici su 2002. otkrili i 4 konzervirana gena (*cas1 - cas4*) redovito prisutna u neposrednoj blizini lokusa²³. Značajan doprinos u razumijevanju moguće funkcije gena *cas* dala je znanstvenica Kira Makarova koja je detaljnim analizama sekvenci proteina Cas predvidjela da ovi proteini sustava CRISPR imaju obrambenu ulogu¹. Eksperimentalni dokaz da sustav CRISPR-Cas funkcionira kao imunosni sustav u obrani domaćina od stranih genetičkih elemenata dobiven je 2007. godine u bakteriji *Streptococcus thermophilus*². Tada su Rodolphe Barrangou i suradnici pokazali da *S. thermophilus* postaje otporna na infekciju fagom kad se iz tog istog faga ubaci kratka sekvenca u lokus CRISPR. Godinu dana kasnije, Luciano Marraffini i Erik Sontheimer su pokazali da sustav CRISPR-Cas spriječava transformaciju bakterije *Staphylococcus epidermidis* plazmidima koji imaju sekvence identične onima prisutnim u lokusu CRISPR bakterije³. Konačno, 2008. godine, istraživačka grupa Johna van der Oosta je rekonstituirala imunosni sustav koristeći elemente iz bakterije *E. coli* prilikom čega su pokazali da je za funkcioniranje sustava neophodno prepisivanje i procesiranje molekula RNA nastalih iz lokusa CRISPR (crRNA), te da su za procesiranje molekula RNA kao i za spriječavanje (interferenciju) proliferacije strane DNA neophodni proteini Cas⁴.

2.2. Mehanizam djelovanja, klasifikacija i primjena sustava CRISPR-Cas

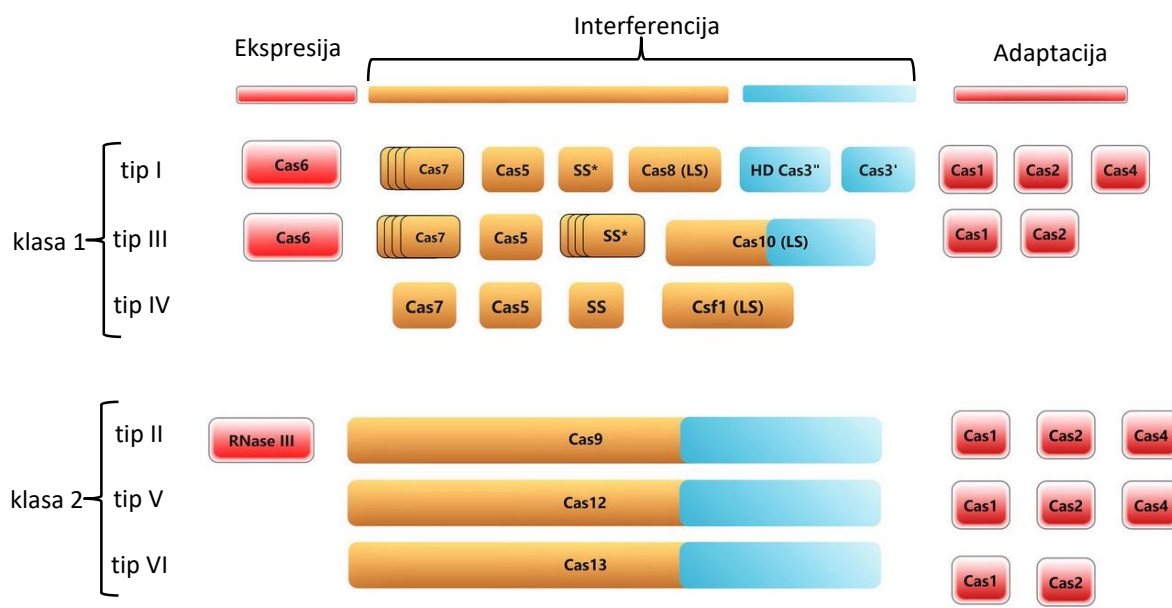
Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas u obrani od stranih genetičkih elemenata se može podijeliti u tri faze (Slika 2), a ovisno o kojem se organizmu radi, tj. koji sustav je prisutan, različiti proteini Cas sudjeluju u pojedinim fazama²⁷⁻³⁰. U prvoj fazi, zvanoj adaptacija, sudjeluju proteini Cas1 i Cas2 koji su i najočuvaniji proteini Cas. Ova dva proteina čine kompleks koji omogućuje ugradnju kratkih fragmenata strane molekule DNA (protorazmaknica) u lokus domaćina CRISPR. Protorazmaknica ugrađena u lokus CRISPR se naziva razmaknica. U drugoj fazi dolazi do ekspresije sustava CRISPR-Cas na način da prepisivanjem cijelog lokusa prvo nastaje jedna dugačka nezrela molekula CRISPR RNA (pre-crRNA), koju zatim proteini Cas ili druge ribonukleaze stanice pocijepaju na kratke zrele molekule CRISPR RNA (crRNA). Svaka molekula crRNA sadrži jednu razmaknicu i dijelove ponavljajućih sljedova sa svake strane. U završnoj fazi, zvanoj interferencija, molekule crRNA vezane na proteine Cas pronalaze ciljnu DNA po principu komplementarnog sparivanja baza te proteini Cas svojom nukleaznom aktivnošću cijepaju stranu molekulu DNA. Za razliku od prve faze (adaptacije) u kojoj uvijek sudjeluju proteini Cas1 i Cas2, u drugoj (ekspresija i sazrijevanje) i trećoj fazi (interferencija) sudjeluju različiti proteini Cas, ovisno o kojem se sustavu radi.

Osim lokusa CRISPR i proteina Cas, za pravilno funkcioniranje sustava važni su i tzv. vodeća regija (engl. *leader*) te motiv PAM (engl. *protospacer adjacent motif*). Vodeća regija je smještena neposredno uzvodno od prvog ponavljajućeg slijeda, te pomaže pravilno orijentiranje nove razmaknice prilikom ugradnje u lokus CRISPR i potiče njegovo prepisivanje^{6,8}. Motiv PAM je kratki slijed nukleotida prisutan samo u ciljnoj DNA, odmah uz protorazmaknicu, čime se omogućuje razlikovanje ciljne DNA od razmaknice ugrađene u lokus CRISPR koja uz sebe nema motiv PAM. Na ovaj način stanice izbjegavaju autoimunost, a osim što motiv PAM proteini Cas prepoznaju prilikom intereferencije, prepoznaju ga i prilikom adaptacije^{31,32}.



Slika 2. Tri faze obrambenog mehanizma sustava CRISPR-Cas. Peterokutima orijentiranim s lijeva na desno su prikazani geni *cas*, a lokus CRISPR je prikazan u obliku crnih rombova (ponavljajući sljedovi) i različito obojanih kvadrata (jedinствeni sljedovi, tj. razmaknice). Prelomljena strelica između gena *cas* i lokusa označava promotor CRISPR smješten unutar vodeće regije (engl. *leader*). U fazi adaptacije (faza 1) se fragmenti strane molekule DNA ugrađuju u lokus CRISPR kao razmaknice. Lokus se potom prvo prepisuje u dugačku nezrelu CRISPR RNA (pre-crRNA) koja cijepanjem sazrijeva do kratkih zrelih molekula crRNA (faza 2) od kojih svaka sadrži slijed jedne razmaknice. Molekule crRNA vežu proteini Cas za interferenciju (faza 3) koji nakon pronalaska protorazmaknice komplementarne molekuli crRNA cijepaju stranu DNA. U fazi interferencije je uz protorazmaknicu u stranoj DNA žutom bojom označen motiv PAM (engl. *protospacer adjacent motif*). Preuzeto i doručeno iz³³.

Brojni sustavi CRISPR-Cas danas su klasificirani u dvije klase (Slika 3), a podjela se zasniva na proteinima Cas uključenim u fazu interferencije^{5,34,35}. U klasu 1 spadaju sustavi koji imaju više različitih proteina Cas koji sudjeluju u fazi intereferencije. Ova klasa je mahom prisutna i u bakterijama i u arhejama, te čini oko 90 % svih identificiranih sustava CRISPR-Cas. Klasu 2 čine sustavi u kojima jedan protein Cas obavlja sve funkcije potrebne za interferenciju, te su ovi sustavi gotovo isključivo prisutni u bakterijama. Unutar svake klase, sustavi se dalje dijele u tipove (tipovi I, III i IV u klasi 1 i II, V i VI u klasi 2) i podtipove (npr. I-A, I-B, I-C, itd.) prema svojim prepoznatljivim proteinima Cas.



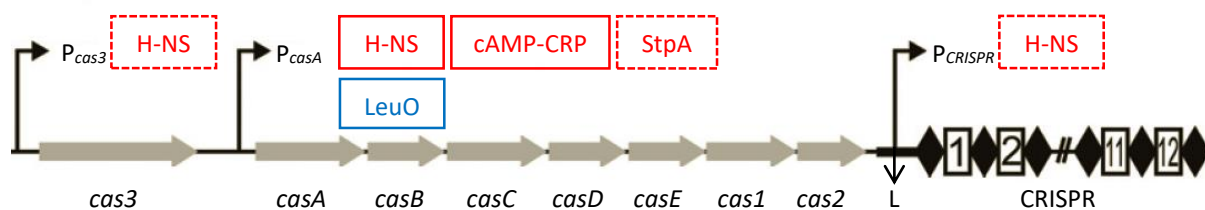
Slika 3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas prema proteinima Cas uključenim u fazu interferencije. Klasu 1 čine sustavi u kojima pronalazak strane DNA (žuto) i cijepanje (plavo) čini više različitih proteina, dok u klasi 2 to sve čini jedan protein. U nekim podtipovima sustava tipa I su HD-nukleazna i helikazna domena proteina Cas3 kodirane posebnim genima (*cas3''* i *cas3'*)^{36,37}. U sustavu tipa II, enzim RNaza III sudjeluje u sazrijevanju molekula crRNA³⁴. Posebnost sustava tipa IV je da nema u neposrednoj blizini očuvanih gena *cas1* i *cas2*^{5,24}. SS/LS = mala/velika podjedinica (engl. *small/large subunit*). Preuzeto i doručeno iz³⁸.

Većina sustava CRISPR-Cas prilikom interferencije cilja molekulu DNA, no tipovi III-A i III-B uz DNA ciljaju i molekulu RNA³⁹. Zbog svoje jednostavnije građe, tj. činjenice da samo jedan multifunkcionalni protein Cas sudjeluje u interferenciji, sustavi klase 2 su postali popularni kao alati za uređivanje i manipulaciju genoma^{38,40}. Najpoznatiji i najbolje proučeni primjer je korištenje multifunkcionalnog proteina Cas9 iz sustava tipa II. Cas9 ima dvije neovisne nukleazne domene, od kojih jedna cijepa lanac ciljane DNA sparni na molekulu crRNA, a druga domena cijepa istisnuti lanac u ciljnoj molekuli DNA⁴¹. Osim uvođenja ciljanih lomova, česta je i upotreba proteina dCas9 čija je nukleazna aktivnost inaktivirana. Ovako inaktiviran protein se često koristi sam ili fuzioniran s drugim proteinima kao alat za regulaciju ekspresije gena ili označavanje ciljnih molekula DNA⁴²⁻⁴⁵. Za metodu uređivanja genoma baziranu na sustavu CRISPR-Cas9, znanstvenice Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna su 2020. godine dobile Nobelovu nagradu za kemiju.

Osim za uređivanje genoma, sustavi CRISPR-Cas se koriste prilikom genotipizacije mikroorganizama u dijagnostičke i epidemiološke svrhe⁴⁶⁻⁵⁰, a sve više se istražuje i njihova uloga kao moguće alternative u liječenju infekcija izazvanih mikroorganizmima otpornim na antibiotike^{51,52}. Unatoč dobrom razumijevanju i učinkovitosti metode, nekoliko izazova pri korištenju tehnologije CRISPR-Cas i dalje postoji. Glavni problemi su osiguravanje dopreme sastavnica sustava CRISPR-Cas do ciljnog tkiva i učinkovitog (dugotrajnog) terapijskog učinka, te nastojanje da se u što većoj mjeri spriječe nespecifične promjene u genomu (engl. *off-target effects*). Uz to, zbog potentnosti metode, sve više se raspravlja o moralnim i etičkim problemima vezanim uz primjenu metode³⁸.

2.3. Sustav CRISPR-Cas bakterije *Escherichia coli* K-12: struktura, mehanizam djelovanja i regulacija

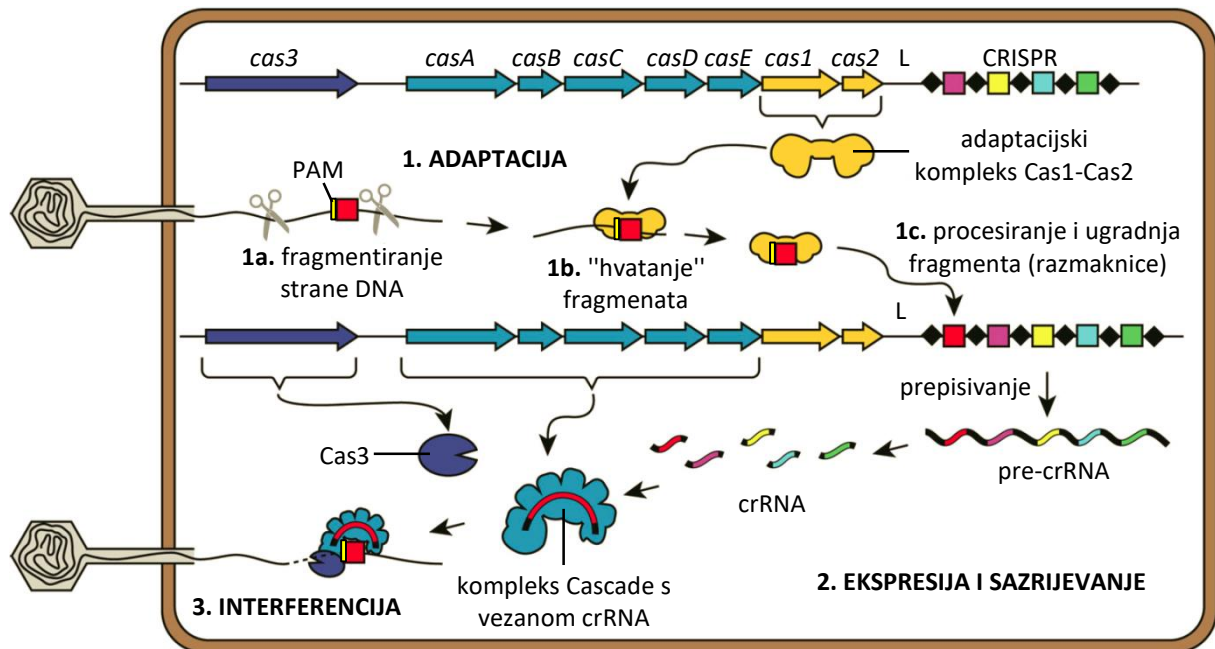
Bakterija *E. coli* K-12 ima sustav CRISPR-Cas tipa I-E (Slika 4), koji se sastoji od 8 gena *cas* smještenih nizvodno od lokusa CRISPR gledajući cijeli bakterijski kromosom, no s obzirom da se svi geni *cas* kao i sam lokus prepisuju obrnuto od smjera kazaljke na satu, može se reći da su unutar samog sustava geni *cas* ispred, tj. uzvodno od lokusa CRISPR^{6,7}. Najudaljeniji od lokusa CRISPR je gen *cas3*, a pomičući se prema lokusu CRISPR slijedi kratka intergenska regija, pa geni *casABCDE12* organizirani u operon nakon kojeg slijedi vodeća regija i sam lokus CRISPR. Produkti gena *cas1* i *cas2* formiraju proteinski kompleks Cas1-Cas2 za adaptaciju, produkti gena *casABCDE* formiraju proteinski kompleks Cascade (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) bitan za sazrijevanje molekula crRNA, te koji zajedno s proteinom Cas3 sudjeluje u interferenciji^{4,10,24}. Osim ovog lokusa CRISPR, u bakteriji *E. coli* K-12 su prisutna još dva lokusa CRISPR, no oba nemaju gene *cas*, a jedan nema niti vodeću regiju. Također, organizacija sustava CRISPR-Cas se razlikuje i između različitih sojeva bakterije *E. coli*⁷. S obzirom da je modelni organizam ove doktorske disertacije bakterija *E. coli* K-12, daljni opis sustava CRISPR-Cas u tekstu se odnosi na sustav iz ovog soja, osim ako nije drugačije navedeno.



Slika 4. Sustav CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E. coli* K-12. Sivim strelicama su prikazani geni *cas*, a crnim prelomljenim promotori. Crni rombovi predstavljaju ponavljajuće sljedove, a bijeli pravokutnici razmaknice. Slovom L je označena vodeća regija (engl. *leader*). S desne strane promotora su u crvenim pravokutnicima označeni negativni regulatori ekspresije sustava CRISPR-Cas, a plavom pozitivni (isprekidana crta označava djelomičnu regulaciju). Preuzeto i doradeno iz⁵³.

Kao i u ostalim sustavima CRISPR-Cas, tako i u bakteriji *E. coli* sustav funkcionira kroz tri faze djelovanja: adaptacija, ekspresija/sazrijevanje i interferencija (Slika 5). Za bakteriju *E. coli* i ostale organizme koji imaju tip I sustava CRISPR-Cas karakteristična su dva oblika adaptacije: naivna (engl. *naïve*) i pripremljena (engl. *primed*)^{8,54,55}. Naivna adaptacija je proces ugradnje prve razmaknice u lokus CRISPR iz strane molekule DNA s kojom se stanica domaćina nije prethodno susrela, a u bakteriji *E. coli* su za taj proces od produkata gena *cas* potrebni jedino proteini Cas1 i Cas2^{8,56}. Pripremljena adaptacija se događa kad u stanici već postoji razmaknica u lokusu CRISPR protiv strane molekule DNA i ta razmaknica stimulira ugradnju dodatnih razmaknica iz iste molekule DNA. Za ovaj oblik adaptacije, u bakteriji *E. coli* su osim proteina Cas1 i Cas2, potrebni i proteinski produkti ostalih gena *cas* uključenih u interferenciju^{9,54,55}. U fazi ekspresije nastaje dugački transkript nezrele molekule CRISPR RNA (pre-crRNA) koju u bakteriji *E. coli* podjedinica CasE iz proteinskog kompleksa Cascade pocijepa na zrele molekule crRNA od kojih svaka sadrži sekvencu jedne razmaknice⁴. Formirani nukleoproteinski kompleks crRNA-Cascade zatim pretražuje DNA sadržaj stanice prilikom čega podjedinica CasA pomaže u razlikovanju ciljne DNA od identične iz lokusa CRISPR po prisustvu motiva PAM samo u ciljnoj molekuli DNA^{11,12}. Nakon što prepozna motiv PAM, kompleks Cascade započinje odmotavanje lanaca ciljne DNA, prilikom čega se jedan lanac ciljne molekule DNA komplementarno sparuje s molekulom crRNA, a drugi lanac ciljne molekule biva potisnut te se formira struktura R-omče⁵⁷⁻⁵⁹. Potpuna komplementarnost između ciljne DNA i crRNA stvara stabilnu R-omču koja uzrokuje konformacijsku promjenu kompleksa Cascade što rezultira dovođenjem proteina Cas3 na ciljnu DNA⁵⁹⁻⁶¹. Konačno, protein Cas3 svojom helikaznom aktivnošću

odmata ciljnu molekulu DNA, a svojom nukleaznom aktivnošću je cijepa čime završava faza interferencije⁶²⁻⁶⁴.



Slika 5. Tri faze obrambenog mehanizma sustava CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E. coli* K-12. Strelicama orijentiranim s lijeva na desno su prikazani geni *cas*, a vodeća regija (engl. *leader*) je označena slovom L. Lokus CRISPR je prikazan u obliku crnih rombova (ponavljajući sljedovi) i različito obojanih kvadrata (jedinostveni sljedovi, tj. razmaknice). Crveni kvadrat predstavlja protorazmaknicu u stranoj (virusnoj) DNA koju nukleaze (prikazane kao škare) cijepaju na fragmente koje zatim "hvata" adaptacijski kompleks i ugrađuje u lokus CRISPR. Protorazmaknica uz sebe ima motiv PAM (žuti pravokutnik na slici). Lokus se prvo prepisuje u dugačku nezrelu CRISPR RNA (pre-crRNA) koja se pocijepa do kratkih zrelih molekula crRNA. Molekule crRNA veže kompleks Cascade koji pretražuje DNA sadržaj u stanici, a pronalaskom protorazmaknice iz koje je nastala razmaknica kompleksu se pridružuje nukleaza Cas3 koja cijepa stranu DNA. Preuzeto i doradeno iz¹⁰.

Jedna od najvećih zagonetki sustava CRISPR-Cas bakterije *E. coli* je njegova regulacija (Slika 4). U uobičajenim laboratorijskim uvjetima uzgoja, sustav je snažno utišan proteinom H-NS (engl. *histone-like nucleoid-structuring*) koji je globalni transkripcijski represor^{6,65-67}. Osim proteina H-NS, negativni regulatori ekspresije sustava su i kompleks cAMP-CRP (engl. *cAMP receptor protein*) te protein StpA (engl. *suppressor of td phenotype A*), a pozitivni regulator ekspresije je protein LeuO (engl. *transcriptional activator of*

leuABCD operon)^{66,68,69}. Eksperimentalno je pokazano da su prirodne razine ekspresije sustava nedovoljne za učinkovitu obranu bakterije od infekcije fagom ili za sprječavanje transformacije plazmidom^{6,66}. Za *in vivo* istraživanja funkcioniranja sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* se uglavnom koriste prekomjerna ekspresija gena *cas* s plazmida^{4,8,70,71}, inaktiviranje gena *hns*^{6,53,54,66,71-74} ili korištenje inducibilnih umjesto nativnih promotora gena *cas*^{9,55,75-78}. S obzirom na raznolik sadržaj razmaknica u analiziranim sojevima bakterije *E. coli*^{6,7} smatra se da sustav ipak jest aktivan, ali kako je mali broj razmaknica homologan sekvencama iz poznatih faga koji inficiraju bakteriju *E. coli*, moguće je da još uvijek nije otkrivena većina faga koja inficira bakteriju *E. coli*. Također, pretpostavlja se da je obrambena sposobnost sustava tek alternativa drugim obrambenim sustavima domaćina ili da sustav ima regulatornu ulogu u fiziologiji stanice domaćina⁷⁹.

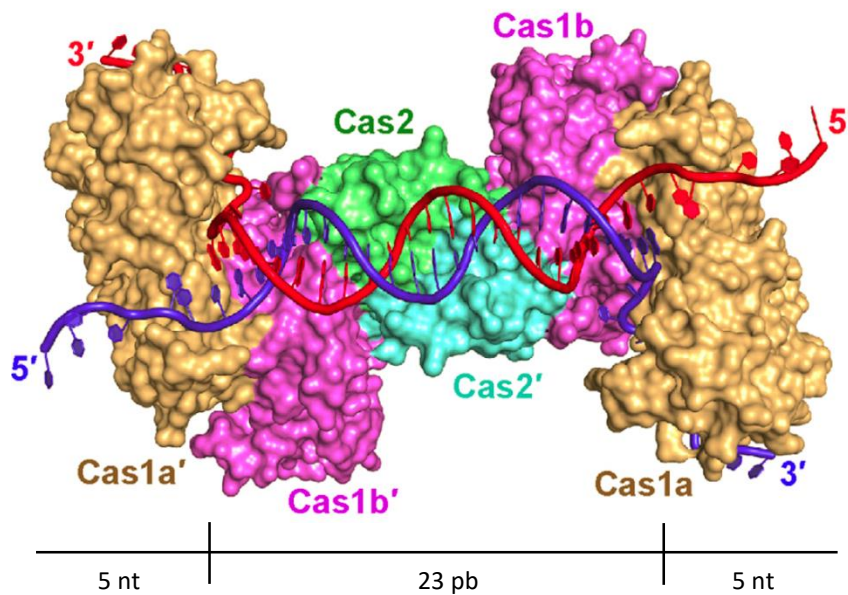
2.4. Detaljnije o naivnoj adaptaciji u bakteriji *Escherichia coli*

Iako predstavlja prvu fazu, faza adaptacije je najmanje razjašnjena faza od tri faze u obrambenom procesu sustava CRISPR-Cas. Bez obzira radi li se o naivnoj ili pripremljenoj adaptaciji, mehanistički procesi koji čine ovu fazu se i sami mogu podijeliti u tri koraka: stvaranje fragmenata molekule DNA koji čine prekursore razmaknica (I), "hvatanje" prekursora adaptacijskim kompleksom Cas1-Cas2 (II) te obrada prekursora do zrelih razmaknica i njihova ugradnja u lokus CRISPR (III)^{10,80}.

Tijekom prvog koraka adaptacije nastaju kratki fragmenti molekule DNA. Poželjno je da su fragmenti porijeklom iz strane molekule DNA jer u protivnom može doći do smrti stanice zbog autoimunosti⁷¹. Smatra se da u nastajanju fragmenata molekule DNA za naivnu adaptaciju, kao i u razlikovanju vlastite od strane DNA važnu ulogu igra enzim RecBCD¹⁵. Više o ulozi enzima RecBCD u naivnoj adaptaciji u sljedećem poglavlju.

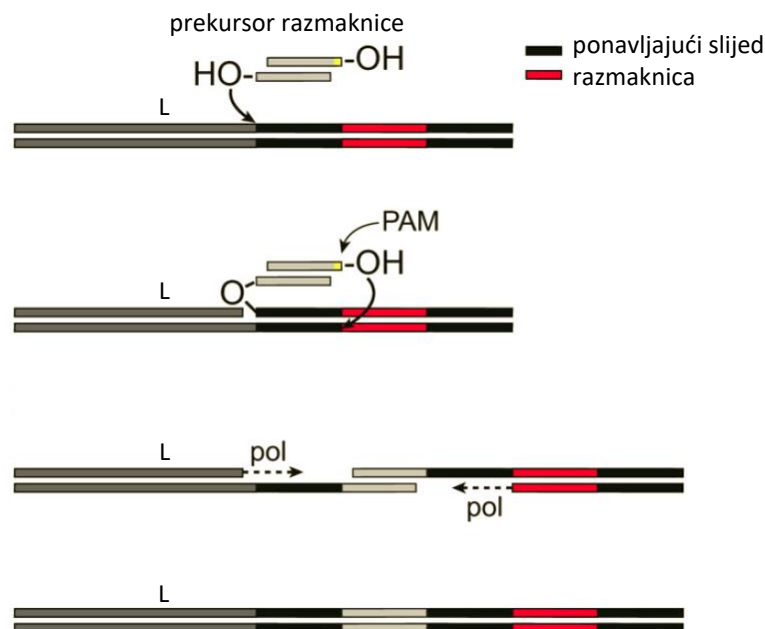
U drugom koraku adaptacije nastale fragmente molekula DNA "hvata" proteinski kompleks Cas1-Cas2. Kompleks je građen od dvije podjedinice proteina Cas2 koje su s dvije suprotne strane omeđene sa po dvjema podjedinicama proteina Cas1 (Slika 6). Važna karakteristika proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 je prepoznavanje motiva PAM. Podjedinica Cas1 prepoznaje motiv PAM¹⁴, a najveći afinitet ima za motiv PAM sekvence 5'-AAG-3' no s manjim afinitetom može vezati i fragmente molekule DNA koji sadrže motiv PAM drugačijeg slijeda nukleotida, tzv. nepravilne PAM-ove^{15,81,82}. Pokazano je da je optimalan supstrat za

kompleks Cas1-Cas2 fragment molekule DNA dugačak 33 parova baza (pb) kojeg čini centralni dvolančani dio dugačak 23 pb i jednolančani stršeci krajevi od 5 nukleotida (5 nt) sa svake strane^{14,80}. Smatra se da se jednolančani fragmenti molekule DNA (ssDNA) nastali nukleaznom aktivnošću enzima RecBCD spajaju u dvolančane da bi formirali supstrat za adaptacijski kompleks Cas1-Cas2, no ne zna se je li spajanje fragmenata spontano ili potpomognuto proteinima^{14,15,83}. Kako su fragmenti molekule DNA nastali nukleaznim cijepanjem enzima RecBCD u pravilu duži od finalnog supstrata kojeg Cas1-Cas2 ugrađuje u kromosom, mora doći do njihovog procesiranja (sazrijevanja). S obzirom da u drugim sustavima CRISPR-Cas tipa I postoji posebni protein Cas (Cas4) koji cijepa prekursore razmaknica⁸⁴⁻⁸⁷, te da se 3'-stršeci krajevi u kompleksu Cas1-Cas2 nalaze unutar nukleaznog centra svake od podjedinica Cas1^{14,80}, moguće je da sam kompleks Cas1-Cas2 sudjeluje u procesiranju i sazrijevanju prekursora razmaknica ili u tome sudjeluju neke druge nukleaze domaćina.



Slika 6. Adaptacijski kompleks Cas1-Cas2 bakterije *E. coli* K-12 vezan za prekursor razmaknice. Kompleks je građen od dvije podjedinice proteina Cas2 u središtu koje su svojom površinom u interakciji s dvolančanom regijom (23 pb) molekule DNA. Podjedinice Cas2 su s dvije suprotne strane vezane s dvije podjedinice Cas1. 3'-stršeci krajevi molekule DNA (5 nt) se nalaze u aktivnom mjestu podjedinica Cas1a i Cas1a', dok su 5'-stršeci krajevi izloženi prema okolini. Preuzeto i doradeno iz¹⁴.

U završnom koraku adaptacije, proteinski kompleks Cas1-Cas2 s vezanom zreom razmaknicom prepoznaje lokus CRISPR i katalizira ugradnju razmaknice u lokus. Za ugradnju je neophodno formiranje kompleksa Cas1-Cas2 i funkcionalna nukleazna aktivnost podjedinice Cas1^{14,80}. Nove razmaknice se redovito ugrađuju na granici između vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda^{8,81}. To je posljedica prepoznavanja vodeće regije od strane kompleksa Cas1-Cas2, a prepoznavanje i interakciju dodatno pomaže protein IHF (engl. *integration host factor*) koji se veže uzvodno od vodeće regije⁸⁸⁻⁹¹. Kompleks Cas1-Cas2 dovodi krajnje 3'-OH skupine razmaknice na rubne dijelove (5'-kraj) prvog ponavljajućeg slijeda uslijed čega dolazi do nukleofilnog napada i dvije transesterifikacijske reakcije^{14,56,80,92}. Produkt reakcija je novougrađena razmaknica s čije se obje strane nalazi jedan istisnuti lanac prvog ponavljajućeg slijeda (Slika 7). Smatra se da nastale jednolančane praznine (engl. *gaps*) poprave DNA-polimeraza I i DNA-ligaza domaćina i tako obнове intaktnu strukturu lokusa CRISPR⁹. I prilikom ugradnje razmaknice u lokus CRISPR važnu ulogu ima motiv PAM. S obzirom da je motiv prisutan samo uzvodno od protorazmaknice, pomaže u osiguravanju pravilne orijentacije prilikom ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR^{88,93}. Motiv PAM se izrezuje iz razmaknice prije ugradnje u lokus CRISPR^{54,55,94} što je bitno da u fazi interferencije sam lokus CRISPR ne bude pocijepan nukleazom Cas3.

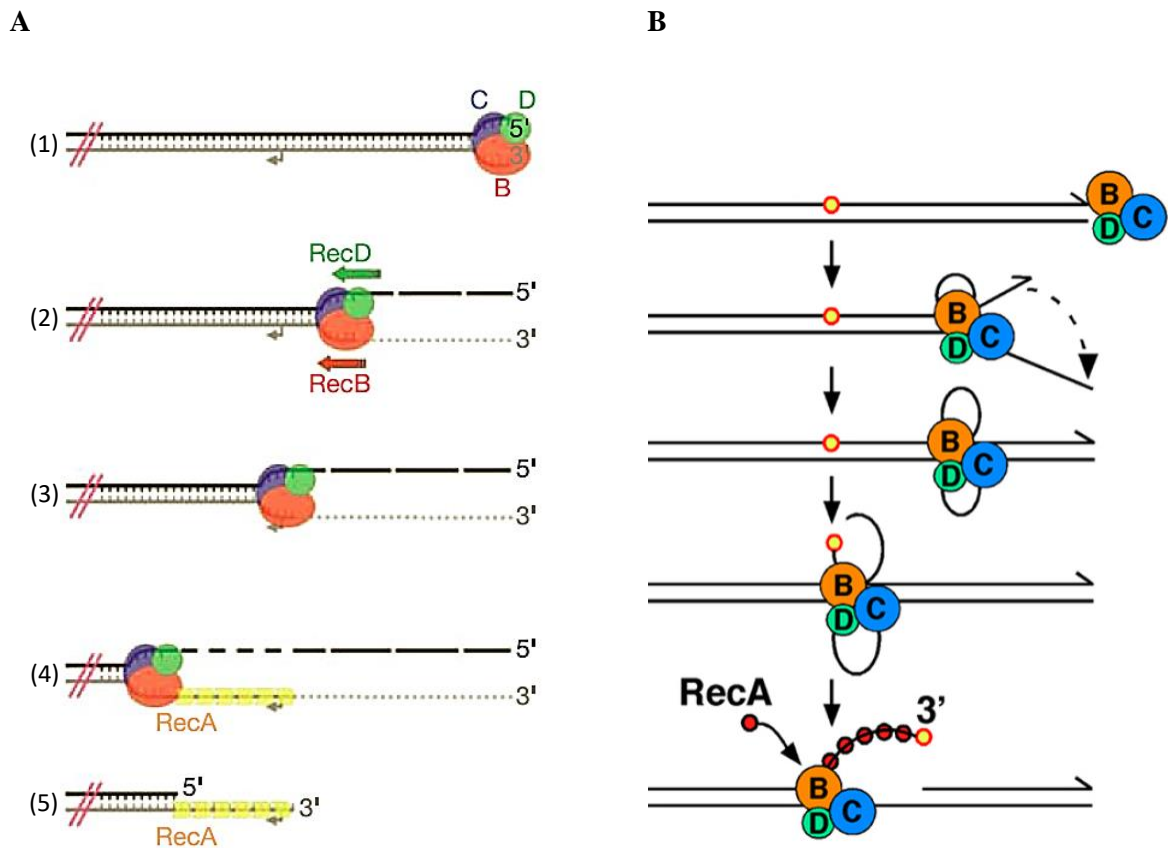


Slika 7. Ugradnja nove razmaknice u lokus CRISPR. U dvije transesterifikacijske reakcije OH skupine na 3'-stršećim krajevima prekursora razmaknice nukleofilno napadaju 5'-kraj prvog ponavljajućeg slijeda uz vodeću regiju (L), a zatim 5'-kraj prvog ponavljajućeg slijeda uz prvu

razmaknicu u lokusu CRISPR. Enzim DNA-polimeraza I (pol) domaćina popuni jednolančane praznine nastale u kromosomu zbog potiskivanja dvaju lanaca prvog ponavljajućeg slijeda na suprotne strane novougrađene razmaknice. Žutom bojom je označen motiv PAM koji je prisutan u prekursoru razmaknice, a nije u zreloj, ugrađenoj razmaknici. Preuzeto i doručeno iz¹⁰.

2.5. Uloga enzima RecBCD u naivnoj adaptaciji u bakteriji *Escherichia coli*

Enzim RecBCD ima važnu ulogu u popravku dvolančanih lomova molekule DNA u bakteriji *E. coli*^{17,95,96}. Enzim se veže za tupe dvolančane krajeve molekule DNA te svojom helikaznom (podjedinice RecB i RecD) i nukleaznom (podjedinica RecB) aktivnošću procesira molekulu DNA (Slika 8). Rad enzima je dobro opisan *in vitro* i uvažena su dva modela rada, ovisno o omjeru koncentracija magnezijevih iona i ATP-a^{16,96-98}. Pri suvišku magnezijevih iona, enzim cijepa oba lanca molekule DNA do nailaska na sekvencu *chi* (engl. *crossover hotspot instigator*; 5'-GCTGGTGG-3'), nakon čega cijepanje 3'-kraja molekule DNA slabi i enzim na njega započinje nanositi protein RecA. Pri suvišku ATP-a enzim se ponaša kao helikaza do nailaska na sekvencu *chi* kad napravi urez u jednom lancu i započinje nanositi protein RecA na 3'-kraj molekule DNA. Bez obzira o kojem modelu se radi, na djelovanje enzima utječe oktamera sekvenca *chi*. Nakon nailaska na sekvencu, enzim RecBCD stvara nukleoproteinski filament od 3'-kraja molekule DNA i vezanog proteina RecA. Ovaj nukleoproteinski filament zatim započinje tražiti homologne regije u molekuli DNA⁹⁹ te se daljnjim koracima u procesu homologne rekombinacije popravljaju oštećenje nastalo u molekuli DNA.

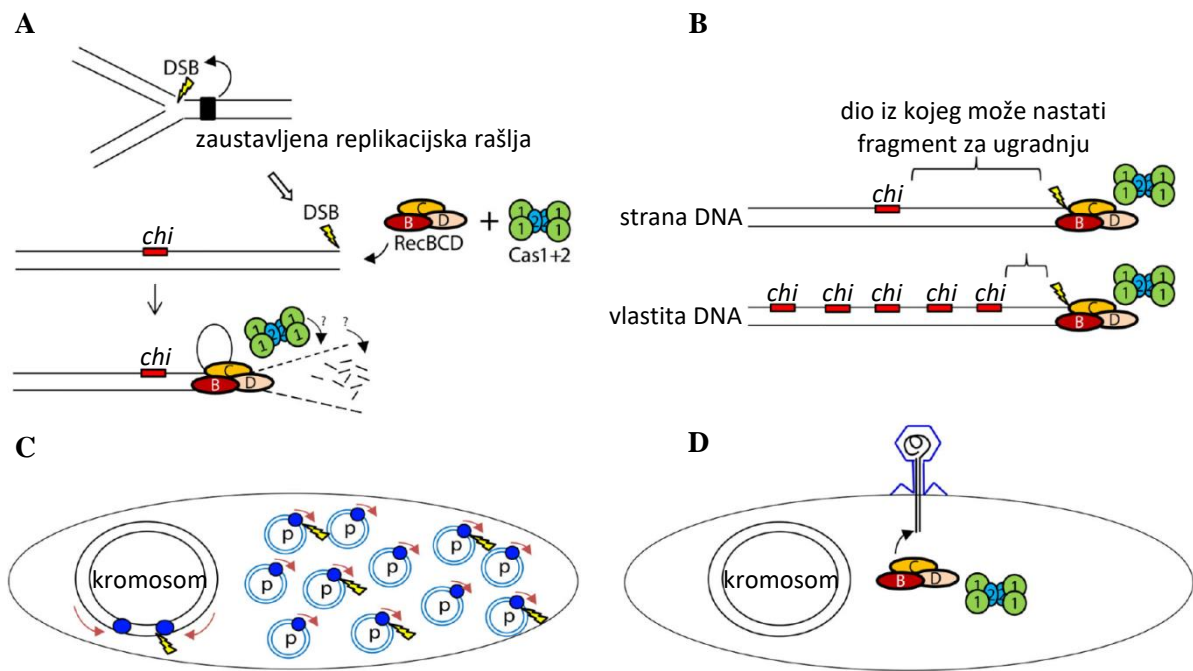


Slika 8. Procesiranje tupog dvolančanog kraja molekule DNA od strane enzima RecBCD. **A.** U uvjetima suviška magnezijevih iona, enzim se veže na tupi dvolančani kraj molekule DNA (1), te se helikaznim podjedinicama RecB i RecD odmiče od kraja, a nukleaznom podjedinicom RecB cijepa oba lanca (2) dok ne naiđe na sekvencu *chi* (siva prelomljena strelica (3)). Nakon nailaska na sekvencu *chi*, cijepanje 5'-kraja se nastavlja, a cijepanje 3'-kraja prestaje (4), te enzim započinje stvarati nukleoproteinski filament nanošenjem proteina RecA na 3'-kraj (5). Preuzeto i doručeno iz⁹⁷. **B.** Pri suvišku ATP-a, enzim se nakon vezanja na tupi dvolančani kraj ponaša isključivo kao helikaza dok ne naiđe na sekvencu *chi* (žuti krug s crvenim rubom) nakon čega uvodi jednolančani urez, te na 3'-kraj započinje nanositi protein RecA. Preuzeto i doručeno iz⁹⁶.

U ranim istraživanjima naivne adaptacije u bakteriji *E. coli* uočeno je da većina novougrađenih razmaknica u lokusu CRISPR potječe iz strane DNA, a manji dio iz vlastitog kromosoma⁸. Veliki napredak u razumijevanju ovog preferencijalnog ugrađivanja razmaknica iz strane DNA i povezanost s enzimom RecBCD doprinjelo je istraživanje Asafa Levya i suradnika¹⁵. I u njihovom istraživanju većina novougrađenih razmaknica je bila porijeklom iz strane DNA (plazmida), no do važnih otkrića su došli analiziranjem razmaknica koje su bile porijeklom iz vlastitog kromosoma bakterije *E. coli*. Analizirajući ove razmaknice, otkrili su

da na kromosomu postoje tzv. vruća mjesta (engl. *hotspots*) iz kojih se češće ugrađuju nove razmaknice nego iz drugih regija kromosoma. Ta mjesta su bila izvorište replikacije (*oriC*), lokus CRISPR i terminus replikacije (*Ter*), mjesta u kojima je učestalija prisutnost replikacijskih rašlji i njihov zastoj. Nadalje su otkrili da se korištenjem inhibitora replikacije DNA značajno smanjuje učestalost ugradnje novih razmaknica, te da su vruća mjesta izvorišta novih razmaknica ograničena prisutnošću sekvenci *chi*. Također su eksperimentalno dokazali da uvođenje mjesno-specifičnog dvolančanog loma u molekulu DNA rezultira nastajanjem novog vrućeg mjesta izvorišta razmaknica i da je ono također ograničeno sekvencama *chi*. S obzirom da su sekvence *chi* učestalije na kromosomu *E. coli* nego što bi bile očekivane po zakonu vjerojatnosti¹⁷, konstruirali su plazmid s umjetno ubačenim sekvencama *chi* i dokazali da se u tom slučaju smanjuje udio razmaknica plazmidnog porijekla, a povećava udio razmaknica porijeklom s kromosoma. Konačno, analizom ugradnje razmaknica u pojedinačnim mutantima bakterije *E. coli* s uklonjenim genima *recB*, *recC* ili *recD* su pokazali da općenito opada učinkovitost ugradnje razmaknica te da je udio razmaknica porijeklom s kromosoma otprilike 10 x veći nego u divljem tipu. S obzirom da je u mutantu *recD* prisutan enzim RecBC čija je nukleazna aktivnost eliminirana, a helikazna sačuvana^{17,100}, zaključili su da je nukleazna aktivnost enzima RecBCD bitna za nastanak i ugradnju razmaknica.

Na temelju svojih rezultata i imunoprecipitacijskih rezultata koji su pokazali da Cas1 stvara interakciju s podjedinicama RecB i RecC¹⁰¹, Levy i suradnici su predložili model prema kojem fragmenti nastali nukleaznom aktivnošću enzima RecBCD služe kao supstrati kompleksu Cas1-Cas2 za adaptaciju. Kako većina dvolančanih lomova u molekuli DNA nastaje prilikom replikacije i kolabiranja replikacijskih rašlji^{17,102-104}, prema modelu plazmida prisutni u većem broju kopija u stanici bi predstavljali dominantni izvor novih razmaknica zbog većeg broja prisutnih replikacijskih rašlji. Učestalija pojava sekvenci *chi* na kromosomu bakterije smanjila bi količinu fragmenata DNA nastalih iz vlastitog kromosoma i potaknula nastajanje fragmenata iz strane DNA koji bi mogli poslužiti kao prekursori razmaknica. Također, ubacivanje genoma faga u stanicu domaćina u formi linearne dvolančane molekule DNA¹⁰⁵ te pojačana replikacija genoma faga u kasnijim fazama infekcije preusmjeravala bi aktivnost enzima RecBCD na stranu DNA (Slika 9).



Slika 9. Model Levya i suradnika kojim objašnjavaju povezanost enzima RecBCD s učestalijom ugradnjom razmaknica iz strane DNA. **A.** Enzim RecBCD se veže na tupe dvolančane krajeve na mjestima dvolančanih lomova (engl. *double-strand break*; DSB) poput onih u zaustavljenim replikacijskim rašljama. Obradom krajeva stvara fragmente molekule DNA dok ne naiđe na sekvencu *chi*. Nastale fragmente "hvata" adaptacijski kompleks Cas1-Cas2. **B.** Učestalija pojavnost sekvenci *chi* na kromosomu bakterije ograničava nukleazno procesiranje vlastite DNA i preusmjerava nukleaznu aktivnost enzima RecBCD prema stranoj DNA. **C.** Plazmidi (p) su u stanici prisutni u većem broju kopija, pa je pojavnost replikacijskih rašlji i dvolančanih lomova na njima učestalija nego na kromosomu stanice koji je prisutan u jednoj kopiji. **D.** Većina faga ubacuje svoj genom u stanicu u obliku dvolančane molekule DNA koju će enzim RecBCD pocijepati ako nema zaštićene krajeve. Preuzeto i doradeno iz¹⁵.

Vodeći se modelom koji su predložili Levy i suradnici, u ovoj sam disertaciji detaljnije istražio utjecaj nukleazne, ali i helikazne funkcije aktivnosti enzima RecBCD na naivnu adaptaciju te njegovog svojstva da na molekulu DNA nanosi protein RecA. Kako enzim RecBCD nije jedina nukleaza u bakteriji *E. coli*, odlučio sam istražiti utjecaj još nekoliko jednolančanih DNA-nukleaza koje procesiraju krajeve molekula DNA, te su uključene u procese popravka i/ili rekombinacije DNA i očuvanje stabilnosti genoma^{106,107}. Popis i kratak opis egzonukleaza koje sam istražio:

- SbcB (drugi naziv: ExoI; kodirana genom *sbcB* (drugi naziv gena: *xonA*)) je jednolančana 3'→5'-egzonukleaza jake specifičnosti za jednolančanu DNA koju cijepa

na mononukleotide, a disocira s nje kad naiđe na dvolančanu regiju¹⁰⁸. Mutanti u genu *sbcB* su otkriveni zbog sposobnosti da suprimiraju osjetljivost na UV-zračenje i rekombinacijsku deficijentnost mutanata *recBC*^{109,110}.

- SbcCD (građena od dvije podjedinice kodirane genima *sbcC* i *sbcD*) je u uvjetima *in vitro* i ATP-neovisna endonukleaza i ATP-ovisna 3'→5'-egzonukleaza koja ima preferenciju za supstrate u obliku ukosnica¹¹¹⁻¹¹³. *In vivo*, enzim cijepa sekundarne strukture nastale zbog prisustva obrnutih ponavljajućih sljedova (engl. *inverted repeats*) i palindromske sekvence stvarajući dvolančane lomove¹¹⁴. SbcB i SbcCD sudjeluju u stvaranju tupih krajeva dvolančane molekule DNA što pomaže vezanje enzima RecBCD¹¹⁵.
- ExoX (kodirana genom *exoX*) je 3'→5'-egzonukleaza čiji su supstrati i jednolančana i dvolančana molekula DNA, ali ima veći afinitet za jednolančane supstrate¹¹⁶. Sam gubitak funkcije proteina ExoX nema izražen fenotip, ali u kombinaciji s gubitkom funkcije egzonukleaze SbcB (ExoI) u mutantima *recD* bakterije *E. coli* uzrokuje otprilike 100 x smanjenu rekombinaciju prilikom konjugacije što upućuje na moguću ulogu u rekombinaciji kad nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije aktivna¹¹⁷.
- XseAB (drugi naziv: ExoVII; građena od dvije podjedinice kodirane genima *xseA* i *xseB*) je egzonukleaza jakog afiniteta za jednolančanu molekulu DNA dvostruke polarnosti: 3'→5' i 5'→3'^{118,119}. Mutanti u genima za egzonukleazu XseAB imaju hiperrekombinacijski fenotip i umjereno su osjetljivi na UV-zračenje¹²⁰.
- RecJ (kodirana genom *recJ*) egzonukleaza cijepa jednolančanu molekulu DNA u smjeru 5'→3'¹²¹. Enzim obično cijepa do nailaska na dvolančanu regiju kada u većini slučajeva prestaje cijepati molekulu DNA¹²². Egzonukleaza RecJ je potrebna za rekombinacijske puteve RecFOR i RecE koji funkcioniraju neovisno o enzimu RecBCD¹²³⁻¹²⁵, no može poticati i rekombinaciju putem RecBCD stvarajući tupe krajeve molekule DNA^{126,127}.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi

Tablica 1. Popis sojeva bakterije *Escherichia coli* K-12 korištenih u radu.

Oznaka soja	Relevantni genotip	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
MG1655	+ F ⁻ <i>rec</i> ⁺	ref. ¹²⁸
SLM1023	+ <i>xseA::dhfr</i>	C. Rudolph
IIB1151	+ <i>recD1903::mini-Tn10</i>	Laboratorijska kolekcija
TH446	+ Δ <i>recA::cam</i>	Laboratorijska kolekcija
IIB360	+ <i>recB1080 argA::Tn10</i>	ref. ¹²⁹
LMM1032	+ <i>recJ2052::Tn10kan</i>	D. Zahradka
LMM1247	+ <i>sbcD::kan</i>	D. Zahradka
N3071	+ <i>recB268::Tn10</i>	R. G. Lloyd
N5288	+ <i>exoX1::npt</i>	C. Rudolph
KD27	+ F' (<i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>ZΔM15::Tn10</i>) + CRISPR-I <i>g8</i> spacer + <i>cat::araBp8-cas1</i>	E. Savitskaya
BW25113	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	B. L. Wanner (Keio kolekcija sojeva bakterije <i>E. coli</i>)
Oznaka soja dobivenog od BW25113	Razlika u genotipu u odnosu na soj BW25113	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
IIB892	+ Δ <i>cas3::apra ΔcasC760::FRT</i>	ref. ⁹
BW39183	+ Δ <i>cas1::kan</i>	E. Semenova
IIB1156	+ Δ <i>cas1::kan Δcas3::apra ΔcasC760::FRT</i>	P1. IIB892 x BW39183
IIB1157	+ Δ <i>cas1::kan Δcas3::apra ΔcasC760::FRT recD1903::mini-Tn10</i>	P1. IIB1151 x IIB1156
JW0400-1	+ Δ <i>yajD772::kan</i>	Coli Genetic Stock Center
JW1086-1	+ Δ <i>ycfH762::kan</i>	Coli Genetic Stock Center
JW1993-1	+ <i>sbcB780::kan</i>	D. Zahradka

Tablica 1 - nastavak

IIB1165	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$	Uklanjanje kazete za otpornost na kanamicin plazmidom pCP20 iz soja IIB1156
IIB1192	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10</i>	P1. IIB1151 x IIB1165
IIB1195	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 recJ2052::Tn10kan</i>	P1. LMM1032 x IIB1192
IIB1199	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recJ2052::Tn10kan</i>	P1. LMM1032 x IIB1165
IIB1207	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 sbcD::kan</i>	P1. LMM1247 x IIB1192
IIB1208	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recB268::Tn10</i>	P1. N3071 x IIB1165
IIB1211	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 xseA::dhfr</i>	P1. SLM1023 x IIB1192
IIB1213	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 sbcD::kan \Delta recA::cam</i>	P1. TH446 x IIB1207
IIB1214	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recB1080 argA::Tn10</i>	P1. IIB360 x IIB1165
IIB1215	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 exoX1::npt</i>	P1. N5288 x IIB1192
IIB1218	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 xseA::dhfr \Delta recA::cam</i>	P1. TH446 x IIB1211
IIB1221	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recB1080 argA::Tn10 \Delta recA::cam</i>	P1. TH446 x IIB1214
IIB1222	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 exoX1::npt \Delta recA::cam</i>	P1. TH446 x IIB1215
IIB1226	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>xseA::dhfr</i>	P1. SLM1023 x IIB1165
IIB1227	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 xseA::dhfr</i> <i>recJ2052::Tn10kan</i>	P1. LMM1032 x IIB1211
IIB1228	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>sbcD::kan</i>	P1. LMM1247 x IIB1165
IIB1229	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>exoX1::npt</i>	P1. N5288 x IIB1165
IIB1235	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>xseA::dhfr</i> <i>recJ2052::Tn10kan</i>	P1. LMM1032 x IIB1227, gubitak <i>recD1903</i> iz IIB1227

Tablica 1 - nastavak

IIB1236	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 xseA::dhfr</i> <i>recJ2052::Tn10kan $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1227
IIB1239	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>sbcB780::kan</i>	P1. JW1993-1 x IIB1165
IIB1240	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 sbcB780::kan</i>	P1. JW1993-1 x IIB1192
IIB1242	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 sbcB780::kan</i> <i>$\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1240
IIB1244	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recB268::Tn10 $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1208
IIB1245	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1192
IIB1248	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>xseA::dhfr</i> <i>recJ2052::Tn10kan $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1235
IIB1252	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>$\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1165
IIB1253	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>xseA::dhfr</i> <i>$\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1226
IIB1254	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>exoXI::npt</i> <i>$\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1229
IIB1255	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>sbcB780::kan $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1239
IIB1258	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>sbcD::kan</i> <i>$\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1228
IIB1259	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>recJ2052::Tn10kan $\Delta recA::cam$</i>	P1. TH446 x IIB1199
IIB1209	+ $\Delta cas3::apra \Delta(cas3-casI)::FRT$ <i>recD1903::mini-Tn10 recJ2052::Tn10kan</i> <i>recA::cam</i>	P1. TH446 x IIB1195
IIB1316	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>$\Delta yajD772::kan$</i>	P1. JW0400-1 x IIB1165
IIB1319	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-casI)::FRT$ <i>$\Delta ycfH762::kan$</i>	P1. JW1086-1 x IIB1165

Tablica 1 - nastavak

IIB1334	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta yajD772::kan recD1903::mini-Tn10$	P1. JW0400-1 x IIB1192
IIB1335	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta ycfH762::kan recD1903::mini-Tn10$	P1. JW1086-1 x IIB1192
IIB1336	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta yajD772::kan recA::cam$	P1. TH446 x IIB1316
IIB1337	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta ycfH762::kan recA::cam$	P1. TH446 x IIB1319
IIB1338	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta yajD772::kan recD1903::mini-Tn10$ $recA::cam$	P1. TH446 x IIB1334
IIB1339	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $\Delta ycfH762::kan recD1903::mini-Tn10$ $recA::cam$	P1. TH446 x IIB1335
MR12	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $araB::T7RNAP-tetA$ + CRISPR-I <i>xhdD</i> spacer	P1. BL21-AI x IIB1165(kol. 1)
MR13	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $araB::T7RNAP-tetA$ + CRISPR-I <i>abgA</i> spacer	P1. BL21-AI x IIB1165(kol. 6)
MR14	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $araB::T7RNAP-tetA$ + CRISPR-I <i>rhsA/B/C</i> spacer	P1. BL21-AI x IIB1165(kol. 7)
MR15	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$ $araB::T7RNAP-tetA$ + CRISPR-I <i>puuR</i> spacer	P1. BL21-AI x IIB1165(kol. 8)

Tablica 2. Popis plazmida korištenih u radu.

Plazmid	Svrha	Izvor ili referenca
pCP20	Uklanjanje kazete za otpornost na antibiotik kanamicin iz kromosoma bakterije <i>E. coli</i>	ref. ¹³⁰
pEB628	Ekspresija proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	E. L. Bolt
pBad-HisA	Vektor bez gena <i>cas1</i> i <i>cas2</i> , negativna kontrola za pEB628; Amp ^r	Invitrogen
pDM1	Ekspresija proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>T7lac</i> u vektorskoj okosnici pRSF-1b; Kan ^r	Laboratorijska kolekcija

Tablica 2 - nastavak

pRSF-1b	Vektor bez gena <i>cas3</i> , negativna kontrola za pDM1; Kan ^r	Novagen
pEB549	Ekspresija proteinskog kompleksa Cascade pod kontrolom promotora T7 <i>lac</i> u vektorskoj okosnici pACYC-Duet; ChI ^r	E. L. Bolt

3.2. Početnice za PCR i oligonukleotidni supstrati molekula DNA

Tablica 3. Popis početnica za lančanu reakciju polimerazom (PCR) i analizu sekvenciranjem.

Oznaka početnice	Sekvenca	Svrha
ygcJ-3	5'-GGATGTTGACCTGGTGG-3'	Provjera genotipa sojeva
ygcJ-4	5'-GCACACTCTCTGATAACG-3'	Provjera genotipa sojeva
cas1del-F	5'-CAGCTAAATCGATGGGATGTG-3'	Provjera genotipa sojeva
cas1del-R	5'-GATGGCTAATCTGCCTCGTAAG-3'	Provjera genotipa sojeva
apra-1-R	5'-CCAGAATGTGTGTCAGAGACAAC-3'	Provjera genotipa sojeva
upcas3-F	5'-CGATATTTATGAGCAGCATC-3'	Provjera genotipa sojeva
CRISPR-R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR
CRISPR-Sp4	5'-GCGACCGCTCAGAAATCCAGACCCGATCCAAA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR
CRISPR-NGS-F	5'-TGCTTTAAGAACAAATGTATACTTT-3'	Umnažanje razmaknice ugrađene u lokus CRISPR za analizu sekvenciranjem
CRISPR-NGS-R	5'-CAACATTATCAATTACAACCGA-3'	Umnažanje razmaknice ugrađene u lokus CRISPR za analizu sekvenciranjem

Oligonukleotidni supstrati molekula DNA za biokemijske analize:

IIB1* (100 μM):

5' -Cy5-AATCA**AAGTGGACCCA**ACTCGAAATCAACCGTAAC**AAGCAAC****AAGCAGGC**-3'

IIB2 (100 μM):

5' -GCCTGCTTGT-3'

IIB3* (100 μM):

5' -Cy5-TGCTTGTTACGGTTGATTT**CGAGTTGG**-3'

IIB4* (100 μM):

5' -Cy5-GTCACGCCTG**CTT**GTTG**CTT**GTTACGGTTGATTT**CGAGTTGGGTCCACTT**-3'

IIB5 (100 μM):

5' -ACAAGCAGGCGTGAC-3'

IIB6* (100 μM):

5' -Cy5-GCCTGCTTGTGCTTGT**TACGGTTGATTT**CGAGTTGGGTCCACTT-3'

IIB7* (spareni supstrati IIB1 i IIB6):

5' -Cy5-AATCA**AAGTGGACCCA**ACTCGAAATCAACCGTAAC**AAGCAAC****AAGCAGGC**-3'
TTCACCTGGGTTGAGCTTTAGTTGGCATTGTT**CGTTGTT**CGTCCG-Cy5-5'

IIB8* (spareni supstrati IIB1 i IIB3):

5' -Cy5-AATCA**AAGTGGACCCA**ACTCGAAATCAACCGTAAC**AAGCAAC****AAGCAGGC**-3'
3' -GGTTGAGCTTTAGTTGGCATTGTT**CGT**-Cy5-5'

IIB9* (spareni supstrati IIB1 i IIB2):

5' -Cy5-AATCA**AAGTGGACCCA**ACTCGAAATCAACCGTAAC**AAGCAAC****AAGCAGGC**-3'
3' -TGTT**CGTCCG**-5'

IIB10* (spareni supstrati IIB4 i IIB5):

5' -Cy5-GTCACGCCTG**CTT**GTTG**CTT**GTTACGGTTGATTT**CGAGTTGGGTCCACTT**-3'
3' -CAGTGCGGACGAACA-5'

* Cy5 je fluorescirajuća boja za detekciju supstrata u gelu. Podebljanim slovima su označene protorazmaknice, crvenim motivi pridruženi protorazmaknicama (engl. protospacer-adjacent

motif; PAM) smješteni uzvodno od protorazmaknice, a plavim PAM-ovi unutar protorazmaknice.

3.3. Hranjivi mediji, puferi, gelovi i ostali materijal

LB-medij za uzgoj bakterijskih stanica:

BD Bacto Tryptone (10 g/L)

BD Bacto Yeast Extract (5 g/L)

NaCl (10 g/L)

Otopiti u dH₂O, podesiti pH na 7,0 i autoklavirati.

Dodaci po potrebi:

BD Bacto Agar (15 g/L za čvrsti, odnosno 6 g/L za meki medij)

L-arabinoza (0,2 % v/v)

Antibiotici za selekciju:

Ampicilin (100 µg/mL)

Apramicin (30 µg/mL)

Kanamycin (40 µg/mL)

Kloramfenikol (15 µg/mL)

Mitomycin C (0,25-0,5 µg/mL)

Tetraciklin (10 µg/mL)

Trimetoprim (100 µg/mL)

Fosfatni pufer za decimalna razrjeđenja bakterija:

Na₂HPO₄ x 2H₂O (5,94 g/L)

KH₂PO₄ (4,54 g/L)

Otopiti u dH₂O, podesiti pH na 7,0 i autoklavirati.

MC-pufer za transdukciju:

MgSO₄ (100 mM)

CaCl₂ (5 mM)

Pripremiti u sterilnoj dH₂O.

10 x pufer za sparivanje oligonukleotidnih supstrata:

Tris-HCl, pH 7,5 (100 mM)

NaCl (500 mM)

EDTA (10 mM)

Pripremiti u dH₂O.

Pufer za eluiranje oligonukleotidnih supstrata iz poliakrilamidnog gela:

Tris-HCl, pH 8,0 (4 mM)

NaCl (10 mM)

Pripremiti u dH₂O.

50 x TAE-pufer za elektroforezu u agaroznom gelu:

Tris-baza (242 g/L)

Octena kiselina (5,71 %)

EDTA, pH 8,0 (50 mM)

Pripremiti u dH₂O.

10 x TBE-pufer za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu:

Tris-baza (108 g/L)

Borna kiselina (55 g/L)

EDTA, pH 8,0 (20 mM)

Pripremiti u dH₂O.

5 x Cas1-pufer za analizu metodom EMSA (engl. *electro-mobility shift assay*):

Tris-HCl, pH 8,5 (35 mM)

NaCl (250 mM)

BSA (0,5 mg/mL)

EDTA (25 mM)

Primpremiti u dH₂O. Isti pufer se može koristiti za sve varijante proteina Cas1 (divlji tip, mutant, kompleks Cas1-Cas2...).

5 x Cas1-pufer za analizu nukleazne aktivnosti:

Tris-HCl, pH 8,5 (35 mM)

NaCl (250 mM)

BSA (0,5 mg/mL)

MgCl₂ (50 mM)

Primpremiti u dH₂O. Isti pufer se može koristiti za sve varijante proteina Cas1 (divlji tip, mutant, kompleks Cas1-Cas2...).

Pufer za razrjeđivanje proteina Cas1:

Tris-HCl, pH 8,5 (20 mM)

NaCl (100 mM)

DTT (1mM)

Primpreniti u dH₂O. Isti pufer se može koristiti za sve varijante proteina Cas1 (divlji tip, mutant, kompleks Cas1-Cas2...).

Pufer za razrjeđivanje proteina RecA i SSB:

Tris-HCl, pH 7,5 (50 mM)

NaCl (100 mM)

EDTA (1 mM)

Glicerol (20 % v/v)

BSA (0,5 mg/mL)

β-merkaptoetanol (10 mM)

Primpreniti u dH₂O.

Stop-pufer s proteinazom K:

Proteinaza K (0,5 mg/mL)

SDS (2 %)

EDTA (50 mM)

Primpreniti u dH₂O.

10 % poliakrilamidni gel za elektroforezu u TBE-puferu u nativnim uvjetima (12 mL):

30 % akrilamid (29:1)	4,0 mL
dH ₂ O	5,6 mL
5 x TBE-pufer	2,4 mL
10 % APS	200 µL
TEMED	10 µL

APS dodati predzadnjeg, pomiješati, te na kraju dodati TEMED, pomiješati i izliti gel.

10 % poliakrilamidni gel za elektroforezu u TBE-puferu u nativnim uvjetima (40 mL):

30 % akrilamid (37,5:1)	13,3 mL
dH ₂ O	18,7 mL
5 x TBE-pufer	8,0 mL
10 % APS	200 µL
TEMED	10 µL

APS dodati predzadnjeg, pomiješati, te na kraju dodati TEMED, pomiješati i izliti gel.

7 % poliakrilamidni gel za elektroforezu u TBE-puferu u nativnim uvjetima (40 mL):

30 % akrilamid (37,5:1)	9,3 mL
dH ₂ O	22,7 mL
5 x TBE-pufer	8,0 mL
10 % APS	200 µL
TEMED	50 µL

APS dodati predzadnjeg, pomiješati, te na kraju dodati TEMED, pomiješati i izliti gel.

5 % poliakrilamidni gel za elektroforezu u TBE-puferu u nativnim uvjetima (40 mL):

30 % akrilamid (37,5:1)	6,7 mL
dH ₂ O	25,3 mL
5 x TBE-pufer	8,0 mL
10 % APS	200 µL
TEMED	50 µL

APS dodati predzadnjeg, pomiješati, te na kraju dodati TEMED, pomiješati i izliti gel.

15 % poliakrilamidni gel za elektroforezu u TBE-puferu u denaturirajućim uvjetima (40 mL):

40 % akrilamid (19:1)	15,0 mL
dH ₂ O	4,5 mL
10 x TBE-pufer	4,0 mL
7 M urea	16,8 g
Formamid	2,0 mL
10 % APS	200 µL
TEMED	50 µL

Prvo otopiti ureu na magnetskoj miješalici uz blago zagrijavanje sa svim sastavnicama osim APS-a i TEMED-a. APS dodati predzadnjeg, pomiješati, te na kraju dodati TEMED, pomiješati i izliti gel.

Boja na bazi formamida za nanošenje uzoraka pri poliakrilamidnoj elektroforezi u denaturirajućim uvjetima*:

Formamid (79 %)
Glicerol (20 %)
EDTA (20 mM)

*U otopinu dodati proporcionalnu količinu praha Orange G i promiješati (npr. za 1 mL boje u otopinu dodati prah vrškom špatulice). * Za elektroforezu u nativnim uvjetima je dovoljno pomiješati 80 % v/v glicerol i prah Orange G.*

Ostali materijal:

1 M Na-citrat

50 mM CaCl₂

10 mM MgSO₄

Kloroform

Glicerol

Bakteriofag λ_{PAL} (izvor: D. Zahradka)

Agaroz (Sigma-Aldrich)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara Bio Inc.)

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Pročišćeni proteini (izvor: E. L. Bolt i T. Killelea):

Cas1 (8 μM uzorak)

Cas1-Cas2 (2 μM uzorak)

RecA (1 μM uzorak)

SSB (740 μM uzorak)

3.4. Izrada mutanata bakterije *E. coli*

Sve pokuse *in vivo* koje sam radio u svrhu istraživanja procesa naivne adaptacije radio sam u sojevima bakterije *Escherichia coli* K-12 BW25113 (Keio kolekcija sojeva *E. coli*). Ovaj soj mi je bio polazišni divlji tip u kojeg sam metodom transdukcije bakteriofagom P1_{vir} prenosio željene mutacije obilježene nekim od transpozona za otpornost na antibiotik iz mutanata *E. coli* (donorskih sojeva). Za pripremu lizata P1_{vir}, prvo sam iz pojedinačne kolonije donorskog soja napravio prekonoćnu kulturu u 3 mL tekućeg LB-medija. Sutradan sam 200 μL svježe prekonoćne kulture razrijedio u 10 mL tekućeg LB-medija i inkubirao u tresilici na 37 °C uz brzinu okretaja 300 rpm do OD₆₀₀ ≈ 0,3. Dodao sam 60 μL 1 M CaCl₂ i 50 μL bakteriofaga P1_{vir}, te uzorak inkubirao dok se ne primijeti da su bakteriofagi počeli lizirati bakterijske stanice. Zatim sam dodao 500 μL kloroforma i lagano promiješao 5 min da

se u potpunosti liziraju stanice donorskog soja. Sve sam zatim centrifugirao 12 min na maksimalnoj brzini ($> 12\ 000$ rcf) uz hlađenje ($+4\ ^\circ\text{C}$). Nakon centrifugiranja virusne čestice prisutne u supernatantu sam odvojio od liziranih bakterijskih stanica zaostalih u talogu dekantiranjem u sterilnu epruvetu. Ovakvom pripravku bakteriofaga P1vir sam dodao kloroform u količini koja odgovara 1/100 ukupnog volumena i pohranio ga na $+4\ ^\circ\text{C}$.

Da bih mutaciju ciljnog gena prebacio u recipijentni soj, uzgajao sam svježu prekonocnu kulturu recipijentnog soja u 3 mL tekućeg LB-medija. Po 1,5 mL prekonocne kulture sam istaložio (2,5 min; 10 000 rcf), supernatant bacio, a talog stanica resuspendirao u 200 μL sterilnog MC-pufera. Resuspendirane stanice sam zatim inficirao alikvotom bakteriofaga P1vir umnoženog na donorskom soju u različitim koncentracijama (obično 50 μL i 200 μL P1vir na 1,5 mL stanica), te inkubirao pola sata na $37\ ^\circ\text{C}$, bez protresanja. Nakon inkubacije, dodao sam 200 μL sterilnog 1 M Na-citrata u svrhu zaustavljanja daljnje infekcije i lize recipijentnog soja, te cijeli uzorak prebacio u 3 mL mekog LB-agara koji sam izlio na površinu Petrijeve ploče sa čvrstom LB-hranjivom podlogom s dodatkom odgovarajućeg antibiotika. Nakon što se meki LB-agar stisnuo na površini čvrste hranjive podloge, ploče sam stavio inkubirati preko noći (ili po potrebi duže) u inkubator na $37\ ^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije i pojave kolonija transduktanata, pojedinačne kolonije sam razvukao na čistu ploču sa čvrstom LB-hranjivom podlogom i odgovarajućim antibiotikom da pročistim bakterijske stanice od bakteriofaga.

Osim transdukcije, za pripremu nekih mutanata sam koristio i kemijsku transformaciju sojeva plazmidom pCP20 koji eksplicira enzim Flp-rekombinazu¹³⁰. Ova metoda mi je bila potrebna za izbacivanje transpozona za otpornost na antibiotik kanamicin omeđenog mjestima FRT (engl. *flippase recognition target*) koje prepoznaje enzim, da bih mogao ubaciti drugu mutaciju obilježenu otpornošću na kanamicin u istog recipijenta. Iz pojedinačne kolonije mutanta iz kojeg sam želio izbaciti transpozona za otpornost na kanamicin sam uzgajao prekonocnu kulturu u tekućem LB-mediju i istaložio 1,5 mL (2,5 min; 10 000 rcf). Talog stanica sam resuspendirao u 200 μL sterilnog, ohlađenog 50 mM CaCl_2 , ponovno istaložio, te stanice resuspendirao u 50 μL hladnog CaCl_2 . Resuspendirane stanice sam zatim inkubirao 20 min na ledu, dodao plazmid pCP20 (20-50 ng) i inkubirao dodatnih pola sata. Potom sam stanice izložio temperaturnom šoku na način da sam mikroeprove 1 min stavio u termoblok zagrijan na $42\ ^\circ\text{C}$. Stanice sam resuspendirao u tekućem LB-mediju (200-500 μL), ostavio da se oporave jedan do dva sata u termobloku na $30\ ^\circ\text{C}$ uz protresanje (450 rpm) te zasadio na čvrstu LB-podlogu s dodatkom antibiotika ampicilina u svrhu selekcije transformanata.

Nakon inkubacije preko noći (po potrebi i duže) na 30 °C, nekoliko pojedinačnih transformanata sam uzgojio u tekućem LB-mediju bez antibiotika na 37 °C uz protresanje. Plazmid pCP20 nosi gen za otpornost na ampicilin, ima temperaturno osjetljivo izvorište replikacije (*ori*) i ne može se replicirati na 37 °C, pa sam na ovaj način želio ukloniti plazmid iz stanica. Gubitak plazmida i transpozona za otpornost na kanamicin sam potvrdio tako što sam 10-20 pojedinačnih kolonija dobivenih iz prekonodne kulture zasadio na dvije nove čvrste podloge, jednu s dodatkom ampicilina i jednu s dodatkom kanamicina. Onu koloniju koja se pokazala osjetljivom na oba antibiotika sam sačuvao kao novog mutanta.

3.5. Provjera genotipa mutanata *E. coli*

Nakon što bih konstruirao nove mutante *E. coli* i pročistio ih od bakteriofaga P1*vir*, provjeravao sam im genotip testom razmaza (engl. *streak test*). Svježju prekonodnu kulturu pojedinog mutanta dobivenu iz pojedinačne kolonije sam nerazrjeđenu nakapao i razmazao na čvrstu LB-podlogu (kontrola) i niz podloga od kojih bi svaka sadržavala po jedan antibiotik. Na ovaj način sam preko fenotipa (otpornosti na antibiotik) provjerio genotip mutanata, tj. zamjenu divljeg tipa gena kazetom za otpornost na neki od antibiotika. Kako sam u radu koristio puno mutanata u genima uključenim u popravak oštećenja u molekuli DNA, dodatno sam za provjeru genotipa testom razmaza koristio i podloge s dodatkom mitomicina C, te podloge bez antibiotika koje bih ozračio ultraljubičastim (UV) svjetlom (obično u dozama od 30 i 60 J). Mitomicin C i ultraljubičasto zračenje uzrokuju oštećenja u molekuli DNA, pa je ovo dobra dodatna kontrola za provjeru mutanata u genima uključenim u procese popravka DNA i homologne rekombinacije.

Metodu lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) sam također koristio za provjeru genotipa mutanata u slučaju kad bih iz soja izbacio transpozona za otpornost na kanamicin Flp-rekombinazom, a zatim uveo neku novu mutaciju u neposrednu blizinu mjesta gdje je bio prvi transpozona. S obzirom da bakteriofag P1*vir* u svoju česticu upakira približno 100 kb molekule DNA domaćina¹³¹, moguće je da se s unosom nove mutacije u recipijenta prenese i divlji tip gena kojeg sam u recipijentu već zamijenio transpozonom za otpornost na kanamicin i kojeg sam naknadno izbacio Flp-rekombinazom. Kako testom razmaza nisam mogao razlikovati jednu od dvije varijante, metodom PCR s početnicama koje se vežu uzvodno i nizvodno od mjesta gena utvrdio sam ima li soj divlji tip gena ili ožiljak ostao nakon izbacivanja transpozona za otpornost na kanamicin.

Osim testa razmaza i metode PCR, još sam dvije metode koristio za provjeru genotipa. Jedna je provjera osjetljivosti na UV-zračenje. Kulture bakterijskih stanica uzgojenih do logaritamske faze rasta ($OD_{600} \approx 0,5$) sam decimalno razrijedio u fosfatnom puferu (do reda veličine 10^5) i po 10 μ L svakog razrjeđenja nakapavao na čvrste LB-podloge. Nakon što su se 10 μ L kapljice upile u podlogu, otvorene Petrijeve ploče sam izlagao UV-zračenju u rasponu doza od 0-60 J. Ozračene ploče sam preko noći inkubirao na 37 °C, a sutradan prebrojao pojedinačne kolonije i izračunao broj preživjelih stanica po mililitru uzorka koristeći formulu:

$$\text{CFU (engl. colony-forming units)/mL} = \text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 100$$

Mutante u genu *sbcD* sam dodatno provjerio nakapavanjem decimalnih razrjeđenja faga λ_{PAL} koje sam pripremio u 10 mM MgSO_4 puferu. Bakteriofag λ_{PAL} sadrži palindromske sekvence u svojoj molekuli DNA i ne može se propagirati u divljem tipu *E. coli*, ali može u mutantu *sbcD*¹³². Iz pojedinačne kolonije mutanta *sbcD* i divljeg tipa (kontrola) sam u 3 mL tekućeg LB-medija napravio prekonoćne kulture. Po 200 μ L prekonoćne kulture pomiješao sam s 3 mL mekog LB-agara i smjesu izlio po površini ploče s čvrstom LB-podlogom te ostavio dvije do tri minute da se meki agar stisne. Zatim sam po 10 μ L decimalnih razrjeđenja (do reda veličine 10^7) faga nakapao na površinu, pustio da se kapljice upiju u hranjivu podlogu i inkubirao preko noći na 37 °C. Sutradan sam provjerio ima li čistina (plakova) nastalih lizom bakterijskih stanica na livadi narasloj u mekom LB-agaru (mutant *sbcD* ih treba imati, a divlji tip *E. coli* ne).

Od svježih prekonoćnih kultura svih dobivenih mutanata koji su zadovoljili provjeru genotipa sam napravio uzorke bakterijskih kultura za pohranu na način da sam 300 μ L sterilnog 50 % glicerola pomiješao sa 700 μ L prekonoćne kulture. Ovako pripremljene uzorke sam zatim pohranio na -80 °C i za svaki pokus sam iz smrznutog uzorka razvlačenjem sterilnom ezom po čvrstoj LB-podlozi dobivao pojedinačne kolonije za pokuse.

3.6. Istraživanje naivne adaptacije s genima *cas1* i *cas2* eksprimiranim s plazmida

Kako su za naivnu adaptaciju u bakteriji *E. coli* od gena *cas* potrebni samo *cas1* i *cas2*⁸, konstruirao sam mutante s delecijama kromosomskih gena *cas*, a gene *cas1* i *cas2* eksprimirao s plazmida. Na ovaj način sam mogao istraživati proces naivne adaptacije neovisno o procesima pripremljene adaptacije i interferencije, za koje su potrebni ostali geni *cas*. Početni soj (IIB1165) je derivat divljeg tipa BW25113, kojeg sam u svim pokusima ove

vrste uzeo za referentni soj, tj. „divlji tip“, jer su iz njega izvedeni ostali sojevi za istraživanje naivne adaptacije. Osim što su mi plazmidi poslužili za ekspresiju gena *cas*, oni su mi ujedno poslužili i kao izvor strane molekule DNA za ugradnju novih razmaknica u lokus CRISPR.

Da bih eksprimirao gene *cas1* i *cas2*, sve sojeve sam kemijski transformirao plazmidom pEB628 koji ima gene *cas1* i *cas2* uklonirane pod promotor *araBAD* s kojega se ekspresija potiče dodavanjem L-arabinoze u medij (finalna koncentracija 0,2 % v/v). Za negativnu kontrolu, sojeve sam transformirao s praznim vektorom pBad-HisA, koji je okosnica plazmida pEB628. Kemijsku transformaciju sam odradio po istoj proceduri kao kod kemijske transformacije plazmidom pCP20 (poglavlje 3.4.), uz iznimku što sam u ovom slučaju sojeve oporavljao na 37 °C i nakon zasađivanja na čvrste podloge inkubirao na 37 °C.

Naivnu adaptaciju sam pratio tijekom 3 uzastopna presađivanja - pasaže. Pojedinačne kolonije transformanata sam inokulirao u 3 mL tekućeg LB-medija bez antibiotika, ali uz dodatak L-arabinoze te inkubirao preko noći na 37 °C uz protresanje (300 rpm). Ova prekonoćna kultura predstavljala je prvu pasažu iz koje sam pripremio drugu pasažu razrijeđivanjem 300 x, dodao L-arabinozu i opet inkubirao preko noći u istim uvjetima. Na isti način sam iz druge pasaže pripremio treću.

Ugradnju novih razmaknica sam provjeravao metodom PCR i elektroforezom u agaroznom gelu. Kalup molekule DNA za PCR dobio sam lizom stanica izdvojenih iz svake pasaže (10 µL alikvota u 50 µL sterilne dH₂O) te kuhanjem 3 min na 98 °C. Za umnažanje sam koristio par početnica CRISPR-Sp4/CRISPR-R koje se vežu unutar četvrte razmaknice lokusa CRISPR i na 3'-kraj gena *cas1*, pa se njima umnaža dio lokusa CRISPR u kojeg se ugrađuju nove razmaknice. Za PCR sam koristio enzim EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara Bio Inc.). Radnu reakcijsku smjesu enzima, početnica i vode sam napravio po uputama proizvođača, od kojeg sam zatim pipetirao alikvote od 9 µL i njima dodao po 1 µL kalupa. Koristio sam sljedeći PCR program:

98 °C	2 min	} 30 ciklusa
98 °C	10 s	
53 °C	30 s	
72 °C	50 s	
72 °C	7 min	
4 °C	+∞	

Rezultate reakcije PCR od sve tri pasaže sam zatim analizirao elektroforezom u 2 % agaroznom gelu s dodatkom SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) interkalirajuće boje (1,4 μ L boje na 30 mL gela). Gel sam pripremio u 1 x TAE-puferu kojeg sam koristio i kao pufer za elektroforezu. U jažice sam nanosio 2 μ L GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) markera za provjeru veličine umnoženih molekula DNA i po 4 μ L svakog PCR uzorka. Elektroforezu sam radio u Embi Tec sustavu za elektroforezu, pri naponu 50 V u trajanju od otprilike 45 min (tj. dok žuta boja iz PCR reakcijske smjese ne bi došla do kraja gela). Po završetku elektroforeze, gelove sam snimio na transiluminatoru i analizirao programom Kodak 1D Image Analysis Software v. 3.6.0. Sojevi, tj. pasaže u kojima je došlo do ugradnje razmaknice su uz početnu vrpce CRISPR (662 pb) imali i dodatnu vrpce iznad (produljenu za 60-63 pb). Da bih odredio relativni intenzitet ugradnje razmaknica, programom sam označio sve vrpce. Program je automatski pronašao početne vrpce jer su jakog intenziteta, a vrpce s novougrađenim razmaknicama kao i prazni prostor iznad početnih vrpce u uzorcima negativnih kontrola (pBad-HisA) sam ručno označio. To sam napravio da mogu oduzeti šum jer vrpce nisu imale oštre visokorazlučive rubove. Jednom kad sam označio sve vrpce i odgovarajuća prazna polja u negativnim kontrolama, program je automatski određivao vrijednosti relativnih intenziteta za sva označena mjesta na gelu. Konačnu vrijednost relativnog intenziteta novougrađene razmaknice sam dobio tako da sam od vrijednosti pripadajućeg relativnog intenziteta oduzeo srednju vrijednost šuma svih negativnih kontrola.

Kako sam gene *cas1* i *cas2* neophodne za naivnu adaptaciju eksprimirao s plazmida, kroz sve tri pasaže sam ujedno pratio i gubitak plazmida iz stanica. Svaku pasažu sam razrijedio u fosfatnom puferu u niz decimalnih razrjeđenja (10^2 , 10^4 , 10^6) te sam po 10 μ L uzorka zasađivao na čvrste podloge bez i sa ampicilinom. Usporedbom broja kolonija naraslih na podlogama sa i bez antibiotika sam mogao pratiti gubitak plazmida, koristeći se formulom:

$$\text{CFU/mL} = \text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 100$$

3.7. Istraživanje naivne adaptacije s genima *cas1* i *cas2* eksprimiranim s kromosoma

Istraživanje procesa naivne adaptacije bez korištenja plazmida za ekspresiju gena *cas1* i *cas2*, isprobao sam koristeći soj KD27. Ovaj soj ima gene *cas1* i *cas2* na kromosomu, pod inducibilnim promotorom *araBp8*, stoga sam za indukciju ekspresije u medij dodavao arabinozu u finalnoj koncentraciji 0,2 %. Soj sam kemijski transformirao s plazmidima pBad-HisA i pEB628 (pCas1-2). Oba plazmida su mi poslužila kao izvor novih razmaknica, a plazmid pEB628 i kao pozitivna kontrola. Svi postupci pasaže i analize napravljeni su na isti način kao u prethodnom poglavlju.

3.8. Analiza sekvenci novougrađenih razmaknica u lokus CRISPR

U svrhu detaljnije analize sekvenci novougrađenih razmaknica tijekom naivne adaptacije, DNA izoliranu iz dodatne vrpce u gelu sam poslao na analizu tehnologijom visokoprotočnog sekvenciranja (engl. *high throughput sequencing*; HTS). DNA sam pripremio na isti način kao ranije, ali sam za umnažanje koristio par početnica CRISPR-NGS-F i CRISPR-NGS-R u reakcijskoj smjesi od 50 μ L. Cijeli volumen PCR smjese sam zatim nanio u jažice 2 % agaroznog gela te elektroforezom u trajanju od otprilike sat vremena pri 50 V razdvojio vrpce umnoženih lokusa CRISPR (vrpca bez novougrađene razmaknice je veličine 217 pb, a vrpca s ugrađenom razmaknicom 277-280 pb). Veću vrpca sam zatim izrezao iz gela te pročistio kitom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), prema uputama proizvođača. DNA od pročišćenih razmaknica sam zatim poslao kolegici Ekaterini Savitskaya u Skolkovo institut znanosti i tehnologije (Moskva, Rusija). Ona je pripremila biblioteku DNA, tehnologijom HTS ju sekvencirala te analizirala i mapirala pojedinačne razmaknice programskim paketom R prema protokolu koji je sama napisala¹³³.

3.9. Analiza utjecaja ugradnje razmaknica na preživljenje stanica

Utjecaj ugradnje razmaknica na preživljenje pratio sam na pojedinačnim kolonijama koje sam dobio zasađivanjem prekonocne kulture (pasaže) soja na čvrste LB-podloge. Od pojedinačnih kolonija pripremao sam kalupe molekula DNA za PCR na način da sam sterilnom čačalicom resuspendirao dio kolonije u 50 μ L sterilne vode te uzorak skuha u uređaju za PCR (3 min na 98 °C). Potom sam DNA umnožio na način kao za pasaže (program

je isti kao u poglavlju 3.6.), ali u ukupnom volumenu reakcije 20 μL , te 2 μL PCR produkta analizirao elektroforezom kako bih provjerio ima li pojedina kolonija ugrađenu razmaknicu u lokusu CRISPR. U slučaju pozitivnog rezultata, ostatak PCR smjese (18 μL) sam pročistio kitom Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), prema uputama proizvođača. Pročišćene uzorke DNA sam poslao na sekvenciranje po Sangeru u servis MacroGen zajedno s početnicom CRISPR NGS-F. Dobivene sekvence sam analizirao koristeći alat NCBI Blast (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) kako bih utvrdio potječe li nova razmaknica s kromosoma bakterije *E. coli* ili s plazmida pEB628. Pojedinačne kolonije sam pretraživao na ovaj način dok nisam prikupio 10 novougrađenih razmaknica za određeni soj, a dijeljenjem s ukupnim brojem pretraženih kolonija dobio sam informaciju o postotku živih stanica s ugrađenom razmaknicom u prekončnoj kulturi.

Kako bih dodatno istražio utjecaj ugradnje razmaknica na preživljenje, u stanice koje su ugradile razmaknicu porijeklom iz kromosoma sam na plazmidima dodao ostale komponente sustava CRISPR-Cas da istražim hoće li doći do interferencije protiv vlastitog kromosoma, tj. autoimunosti. Stanice sam prvo kemijski transformirao plazmidom pEB549 na kojem se nalaze geni za ekspresiju proteinskog kompleksa Cascade. Od transformanata sam priredio elektrokompetentne stanice na način da sam 20 mL logaritamskih stanica (uzgojenih do $\text{OD}_{600} \approx 0.6$, uz dodatak 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kloramfenikola i 1 mM IPTG-a) istaložio 6 min na 6000 rcf pri temperaturi 4 $^{\circ}\text{C}$, supernatant bacio, a talog stanica resuspendirao u 15 mL sterilnog, hladnog 10 % glicerola. Postupak ispiranja sam još ponovio u 7 mL i 3 mL hladnog 10 % glicerola. Nakon zadnjeg taloženja, stanice sam resuspendirao u 1 mL hladnog glicerola i alikvotirao u uzorke po 50 μL . Stanice sam zatim elektrotransformirao s 20 ng plazmida pDM1 (za ekspresiju proteina Cas3) ili pRSF-1b (negativna kontrola). Nakon elektroporacije, stanice su se oporavljale 1 sat u 435 μL LB-medija s dodatkom 5 μL arabinoze (finalna koncentracija 0,2 %) i 10 μL IPTG-a (finalna koncentracija 2 mM) na 37 $^{\circ}\text{C}$ uz protresanje 300 rpm. Nakon toga, pripremio sam seriju decimalnih razrjeđenja u fosfatnom puferu i po 10 μL stanica nakapavao na čiste LB-podloge i LB-podloge s dodatkom kloramfenikola (finalna koncentracija 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (finalna koncentracija 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), arabinoze (finalna koncentracija 0,2 %) i IPTG-a (finalna koncentracija 2 mM), te inkubirao preko noći na 30 $^{\circ}\text{C}$ i 37 $^{\circ}\text{C}$. Usporedbom broja stanica naraslih na selektivnim i LB-podlogama bez antibiotika sam odredio ima li ugrađena razmaknica u prisustvu svih komponenti sustava CRISPR-Cas utjecaj na učinkovitost transformacije i preživljenje sojeva.

3.10. Priprema oligonukleotidnih supstrata molekula DNA za biokemijske analize

Jednolančane oligonukleotidne supstrate molekula DNA (popisani u poglavlju 3.2.) sam naručio iz tvrtke Macrogen. Supstrati su bili različitih duljina tako da sam ih mogao međusobno sparivati u različitim kombinacijama u svrhu dobivanja dvolančanih molekula DNA različitih 5'- ili 3'-stršćih krajeva. Četiri od šest supstrata su na 5'-kraju bili obilježeni fluorescirajućom bojom Cy5 za detekciju u poliakrilamidnim gelovima. Supstrate sam u svrhu zaštite boje cijelo vrijeme čuvao u tamnim mikroepruvetama i prilikom rada ih izbjegavao izlagati jakom svjetlu. Jednolančane supstrate sam međusobno pomiješao (Tablica 4). Supstrati IIB2, IIB3, IIB4 i IIB5 su mi služili isključivo za dobivanje dvolančanih supstrata, dok sam supstrate IIB1 i IIB6 koristio i kao jednolančane uzorke u analizama.

Tablica 4. Reakcijske smjese (100 μL) za dobivanje dvolančanih supstrata molekula DNA.

Cy5 označeni + označeni oligonukleotid (IIB1+IIB6 / IIB1+IIB3) (IIB1+IIB1 / IIB6+IIB6)*	V (μL)	Cy5 označeni + neoznačeni oligonukleotid (IIB1+IIB2 / IIB4+IIB5)	V (μL)
100 μM oligo. A (fin. 5 μM)	5	100 μM označeni oligo. (fin. 5 μM)	5
100 μM oligo. B (fin. 5 μM)	5	100 μM neoznačeni oligo. (fin. 6 μM)	6
10 x pufer za sparivanje (fin. 1 x)	10	10 x pufer za sparivanje (fin. 1 x)	10
dH ₂ O	80	dH ₂ O	79

* Ovi oligonukleotidi se međusobno ne sparuju, ali su mi poslužili kao jednolančani supstrati molekula DNA u biokemijskim analizama, pa sam ih na isti način obradio.

Uzorke sam zagrijao u termobloku 10 min na 95 °C da se denaturiraju sekundarne strukture i da se spare u dvolančane molekule DNA postupnim hlađenjem preko noći na 37°C. Sutradan sam ih još ostavio na sobnoj temperaturi dok sam pripremao 12 mL 10 % poliakrilamidni gel u 1 x TBE-puferu za elektroforezu u nativnim uvjetima. Nakon što se gel polimerizirao, uzorke sam kratkim centrifugiranjem skupio na dno mikroepruvete, te alikvot od 25 μL svakog uzorka pomiješao s 5 μL 50 % glicerola i cijeli volumen nanio u jažice gela. Uzorke sam nanosio u svaku drugu jažicu radi lakšeg naknadnog izrezivanja, a nije ih bilo

potrebno miješati s bojom jer su plavičaste boje, pa se vide u tankom gelu. Elektroforezu sam pustio otprilike 1 h na 100 V, tj. dok uzorci nisu dovoljno migrirali da ih se može lako izrezati iz gela.

Izrezane komadiće gela sam uronio u 250 μL pufera za eluiranje oligonukleotida iz poliakrilamidnog gela i ostavio na $+4\text{ }^\circ\text{C}$ (minimalno 48 h). Potom sam pipetom izvukao tekući sadržaj i prebacio u čistu mikroeprijetu i koncentrirao (Savant DNA SpeedVac Model DNA120, Thermo Electron Corporation) do volumena od približno 50 μL (pri ovom volumenu pufer sadrži 20 mM Tris i 50 mM NaCl). Koncentraciju uzoraka DNA sam izračunao koristeći se Beer-Lambert formulom:

$$A_{260} = \varepsilon \times c \times l, \text{ tj. } c = \frac{A_{260}}{\varepsilon \times l}$$

Vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini 260 nm sam izmjerio na spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) na kojem je put duljine zrake svjetlosti (vrijednost l) normaliziran na 1 cm. Vrijednost ε (koeficijent ekstinkcije) za svaki pojedinačni jednolančani oligonukleotid sam izračunao koristeći program OligoAnalyzer Tool v.3.1 (Integrated DNA Technologies; IDT) dostupan na internetu, a za dvolančane supstrate sam zbrojio vrijednosti odgovarajućih jednolančanih supstrata. U izračunu za obilježene oligonukleotide sam dodao modifikaciju Cy5 na 5'-kraju. Dobivene vrijednosti apsorbancije, koeficijenta ekstinkcije i izračunate koncentracije su prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Apsorbancija pri valnoj duljini 260 nm (A_{260}), koeficijenti ekstinkcije (ε) i izračunate koncentracije (c) oligonukleotidnih supstrata. Za supstrate IIB1-IIB6 je koncentracija unaprijed poznata jer su naručeni iz tvrtke Macrogen.

Oligonukleotidni supstrat	A_{260}	ε ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	c (μM)
IIB1	/	517 200	/
IIB2	/	83 700	/
IIB3	/	261 700	/
IIB4	/	459 800	/
IIB5	/	151 200	/
IIB6	/	413 600	/

Tablica 5 - nastavak

IIB7 (IIB1 + IIB6)	1,078	930 800	1,16
IIB8 (IIB1 + IIB3)	0,716	778 900	0,92
IIB9 (IIB1 + IIB2)	0,957	600 900	1,59
IIB10 (IIB4 + IIB5)	0,856	611 000	1,40
IIB1 + IIB1	1,022	517 200	1,98
IIB6 + IIB6	1,444	413 600	3,49

Konačno, ispravnost dvolančanih supstrata provjerio sam elektroforezom u 7 % poliakrilamidnom gelu (40 mL) u 1 x TBE-puferu u nativnim uvjetima. Supstrate sam razrijedio do koncentracije 20 nM. 10 µL supstrata sam pomiješao s 5 µL boje koju sam pripremio miješanjem 1 mL 80 % glicerola sa sitnom količinom praha Orange G. Kao negativnu kontrolu, iste dvolančane susprate zagrijao sam 10 min u termobloku na 95° C neposredno prije elektroforeze koja je trajala približno 2 sata pri 120 V. Na gelu sam dobio potvrdu uspješnog sparivanja supstrata (nedenaturirani dvolančani supstrati su sporije migrirali u gelu, a u slučaju denaturiranog dvolančanog supstrata IIB8 su se jasno vidjeli odvojeni lanci na gelu).

3.11. Analiza vezanja proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za oligonukleotidne supstrate molekule DNA *in vitro*

Istraživanje vezanja proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za pripremljene jednolančane i dvolančane supstrate sam proveo metodom EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*). Pripremio sam uzorke oligonukleotidnih supstrata u koncentraciji 200 nM (10 x) i proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (4 x; Tablica 6).

Tablica 6. Priprema koncentriranih uzoraka proteina Cas1-Cas2 (4 x) za reakciju EMSA iz 2 μ M početnog uzorka.

4 x Cas1-Cas2	V (μL) 2 μM uzorka Cas1-Cas2	V (μL) pufera za razrjeđivanje proteina Cas1
125 nM	2,5	37,5
250 nM	5	35
500 nM	10	30
1 μ M	20	20
2 μ M	2,5 μ L nerazrjeđenog uzorka dodao u reakciju	

Pripremio sam reakcijske smjese od 10 μ L u kojima sam oligonukleotidne supstrate finalne koncentracije 20 nM inkubirao s različitim koncentracijama proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM i 500 nM). Reakcijska smjesa je prikazana u Tablici 7, a kao negativne kontrole su mi služili uzorci u koje nisam dodao proteinski kompleks Cas1-Cas2, već pufer za razrjeđivanje proteina Cas1. Uzorke sam inkubirao 30 min na 37 °C, zatim ih kratko centrifugirao i sav volumen (13 μ L) nanio u jažice 5 % poliakrilamidnog gela (40 mL). Elektroforeza u nativnim uvjetima provedena je u 1 x TBE-puferu, 90 min pri naponu 120 V.

Tablica 7. EMSA reakcijska smjesa (10 μ L).

Sastavnica	Finalna koncentracija	V (μL)
200 nM DNA	20 nM	1
5 x Cas1 EMSA-pufer	1x	2
4 x Cas1-2	varijabilno (31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM ili 500 nM)	2,5
H ₂ O	/	4,5

3.12. Analiza nukleazne aktivnosti proteina Cas1-Cas2 i Cas1 u reakciji s oligonukleotidnim supstratima molekule DNA *in vitro*

Da bih istražio cijepa li proteinski kompleks Cas1-Cas2 oligonukleotidne supstrate molekula DNA, inkubirao sam ih u puferu za analizu nukleazne aktivnosti. Supstrate i proteinski kompleks Cas1-Cas2 sam razrijedio na isti način kao u prethodnom poglavlju, ali sam u analizi nukleazne aktivnosti još ispitivao cijepa li i protein Cas1 samostalno supstrate DNA. Protein Cas1 sam razrijedio u puferu za razrjeđivanje proteina Cas1 do 4 x finalne koncentracije u reakciji (Tablica 8).

Tablica 8. Priprema koncentriranog uzorka proteina Cas1 (4 x) za analizu nukleazne aktivnosti iz 8 μM početnog uzorka.

4 x Cas1	V (μL) 8 μM uzorka Cas1	V (μL) pufera za razrjeđivanje proteina Cas1
125 nM	1	63
250 nM	2,5	77,5
500 nM	2,5	37,5
1 μM	5	35
2 μM	10	30

U reakcijskim smjesama od 20 μL sam inkubirao oligonukleotidne supstrate finalne koncentracije 20 nM s nizom koncentracija proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 ili proteina Cas1 samostalno (31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM i 500 nM). Reakcijska smjesa je prikazana u Tablici 9, a kao negativne kontrole su mi služili uzorci u koje nisam dodao proteine, već pufer za razrjeđivanje proteina Cas1. Uzorke sam inkubirao 30 min na 37 °C, dodao 2 μL stop-pufera s proteinazom K, pomiješao i inkubirao još 30 min na 37 °C. Potom sam uzorke kratko centrifugirao i pola volumena svake reakcijske smjese prebacio u čiste mikroeprevete. To sam učinio iz razloga što sam uzorke analizirao elektroforezom u nativnim i denaturirajućim uvjetima.

Tablica 9. Reakcijska smjesa (20 μ L) za analizu nukleazne aktivnosti proteina Cas1-Cas2 i Cas1.

Sastavnica	Finalna koncentracija	V (μ L)
200 nM DNA	20 nM	2
5 x Cas1-pufer za analizu nukleazne aktivnosti	1 x	4
4 x Cas1-2 ili 4x Cas1	varijabilno (31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM ili 500 nM)	5
H ₂ O	/	9

Za elektroforezu u nativnim uvjetima, koristio sam 10 % poliakrilamidni gel (40 mL) u TBE-puferu u trajanju 2,5 h pri naponu 120 V. Za elektroforezu u denaturirajućim uvjetima, prvo sam uzorcima dodao 3 μ L boje na bazi formamida, te smjesu inkubirao 10 min na 95 °C. Potom sam cijelu smjesu nanio u jažice 15 % poliakrilamidnog gela u TBE-puferu s dodanim formamidom i ureom. Gel sam prethodno zagrijao u trajanju otprilike 30 min prije nanošenja uzoraka, a elektroforeza se odvijala pri konstantnoj snazi od 7 W po gelu dok žuta boja iz uzoraka nije došla do kraja gela.

3.13. Analiza nukleazne aktivnosti proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u prisustvu proteina SSB ili RecA

Iz preliminarnih rezultata nukleazne aktivnosti proteina Cas1 i kompleksa Cas1-Cas2 jedini oligonukleotidni supstrat podložan cijepanju bio je supstrat IIB9 koji je građen u obliku kratke dvolančane molekule DNA s dugačkim 5'-stršećim krajem. Nukleaznu aktivnost kompleksa Cas1-Cas2 provjerio sam u prisustvu proteina SSB i RecA, koji se vežu na jednolančanu DNA¹³⁴. Oligonukleotidni supstrat IIB9 sam koristio u finalnoj koncentraciji 20 nM, kompleks Cas1-Cas2 u finalnoj koncentraciji 125 nM (najniža koncentracija pri kojoj sam uočio cijepanje supstrata IIB9), a proteine SSB i RecA u rasponu koncentracija od 1 nM – 1 μ M za SSB, tj. 1 nM – 550 nM za RecA (najviša moguća koncentracija u reakciji, ograničena koncentracijom početnog uzorka proteina RecA). Serija razrjeđenja proteina SSB je prikazana u Tablici 10, a reakcijska smjesa u Tablici 11:

Tablica 10. Serija razrjeđenja proteina SSB za inkubaciju sa supstratom IIB9 i ispitivanje nukleazne aktivnosti kompleksa Cas1-Cas2.

Koncentrirani uzorci proteina SSB (10 x) za pripremu reakcijske smjese	Finalna koncentracija proteina SSB u nukleaznoj reakciji
10 μ M	1 μ M
7,5 μ M	750 nM
5 μ M	500 nM
4 μ M	400 nM
3 μ M	300 nM
2 μ M	200 nM
1 μ M	100 nM
750 nM	75 nM
500 nM	50 nM
250 nM	25 nM
100 nM	10 nM
10 nM	1 nM

Tablica 11. Sastav nukleazne reakcije s predinkubacijom supstrata IIB9 s proteinom SSB.

Sastavnica	Finalna koncentracija	V (μ L)
200 nM DNA	20 nM	1
10 x Cas1-pufer za analizu nukleazne aktivnosti	1 x	1
10 x SSB	varijabilno (1 nM – 1 μ M)	1
500 nM Cas1-2	125 nM	2,5
H ₂ O	/	4,5

Uzorke DNA (IIB9) i proteina SSB sam inkubirao 30 min na 37 °C, kratko centrifugirao, dodao 2,5 μ L kompleksa Cas1-Cas2 te ponovo inkubirao 30 min na 37 °C. Zatim sam dodao 1 μ L stop-pufera s proteinazom K te još jednom inkubirao 30 min na 37 °C. Rezultat nukleazne reakcije sam provjerio elektroforezom u denaturirajućim uvjetima na isti način kao i u slučaju bez inkubacije supstrata IIB9 s proteinom SSB (prethodno poglavlje).

U slučaju inkubacije supstrata IIB9 s proteinom RecA, zbog male koncentracije početnog uzorka proteina RecA (1 μ M), morao sam smanjivati volumen vode u reakcijskoj smjesi da bih uspio ispitati učinak proteina RecA u što većem rasponu koncentracija (do maksimalne finalne koncentracije u reakciji 550 nM). Serija finalnih koncentracija proteina RecA u reakciji i način na koji sam ih pripremio prikazani su u Tablici 12, a Tablica 13 prikazuje sastav nukleazne reakcije.

Tablica 12. Serija razrjeđenja proteina RecA za inkubaciju sa supstratom IIB9 i ispitivanje nukleazne aktivnosti kompleksa Cas1-Cas2.

Finalna koncentracija proteina RecA u nukleaznoj reakciji	Volumeni proteina RecA i vode dodani u nukleaznu reakciju
550 nM	5,5 μ L RecA (1 μ M) + 0,0 μ L H ₂ O
500 nM	5,0 μ L RecA (1 μ M) + 0,5 μ L H ₂ O
400 nM	4,0 μ L RecA (1 μ M) + 1,5 μ L H ₂ O
300 nM	3,0 μ L RecA (1 μ M) + 2,5 μ L H ₂ O
200 nM	2,0 μ L RecA (1 μ M) + 3,5 μ L H ₂ O
100 nM	1,0 μ L RecA (1 μ M) + 4,5 μ L H ₂ O
75 nM	1,0 μ L RecA (750 nM) + 4,5 μ L H ₂ O
50 nM	1,0 μ L RecA (500 nM) + 4,5 μ L H ₂ O
25 nM	1,0 μ L RecA (250 nM) + 4,5 μ L H ₂ O
10 nM	1,0 μ L RecA (100 nM) + 4,5 μ L H ₂ O
1 nM	1,0 μ L RecA (10 nM) + 4,5 μ L H ₂ O

Tablica 13. Sastav nukleazne reakcije s predinkubacijom supstrata IIB9 s proteinom RecA.

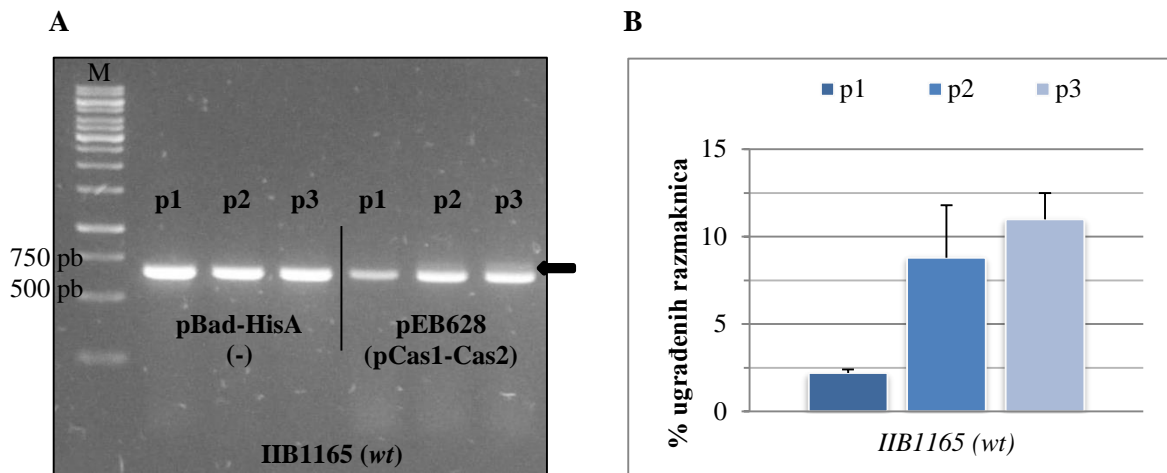
Sastavnica	Finalna koncentracija	V (μL)
200 nM DNA	20 nM	1
10 x Cas1-pufer za analizu nukleazne aktivnosti	1 x	1
RecA	varijabilno (1 nM – 550 nM)	po Tablici 12
500 nM Cas1-2	125 nM	2,5
H ₂ O	/	po Tablici 12

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj nukleazne i helikazne funkcije enzima RecBCD na naivnu adaptaciju

Za ugradnju novih razmaknica procesom naivne adaptacije neophodna je samo aktivnost kompleksa Cas1-Cas2, dok ostali geni *cas* nisu potrebni⁸. Kako bih istražio samo proces naivne adaptacije, utjecaj pripremljene adaptacije i interferencije (proces koji se dogode ako su aktivni proteini Cas3 i kompleks Cascade) sam spriječio na način da sam koristio mutante soja *E. coli* K-12 BW25113 s uklonjenim genima *cas* (genotip $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$; Tablica 1 u poglavlju Materijali i metode). Sojeve sam transformirao plazmidom pEB628 koji omogućava ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u suvišku, ili odgovarajućom negativnom kontrolom, praznim vektorom pBad-HisA. Soj s uklonjenim genima *cas*, IIB1165, napravio sam u nekoliko koraka transdukcijom s bakteriofagom P1vir, te potom uklanjanjem kazeta za otpornost na kanamicin pomoću rekombinaze Flp. Ciljane genomske promjene soja sam potvrdio testom razmaza i metodom PCR (rezultati nisu prikazani; vidjeti poglavlje Materijal i metode), a dobiveni soj je služio kao divlji tip (*wt*).

Proces naivne adaptacije pratio sam kroz tri uzastopna prekonočna presađivanja (pasaže) bakterija transformiranih s plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) ili pEB628 (pCas1-Cas2). Lizirane prekonočne stanice sam koristio za izvor kalupa molekule DNA za umnažanje proksimalnog kraja lokusa CRISPR metodom PCR početnicama koje okružuju mjesto ugradnje. Slika 10 A prikazuje rezultat reakcija PCR u stanicama IIB1165 (*wt*) nakon tri pasaže. Vidljivo je da se u stanicama s plazmidom pCas1-Cas2, uz početnu vrpca od 662 pb, pojavila još jedna vrpca (dulja za približno 60 pb) što predstavlja ugradnju nove razmaknice koja se ne uočava u soju s kontrolnim vektorom pBad-HisA (prisutnost nove razmaknice je potvrđena dodatnim pokusima; vidjeti poglavlja 4.5. i 4.6.). Intenzitet ugradnje nove razmaknice se pojačava s brojem pasaža i najveća je u trećoj pasaži kad iznosi $11 \pm 1,5$ % (Slika 10 B i Tablica P1 u poglavlju Prilozi).

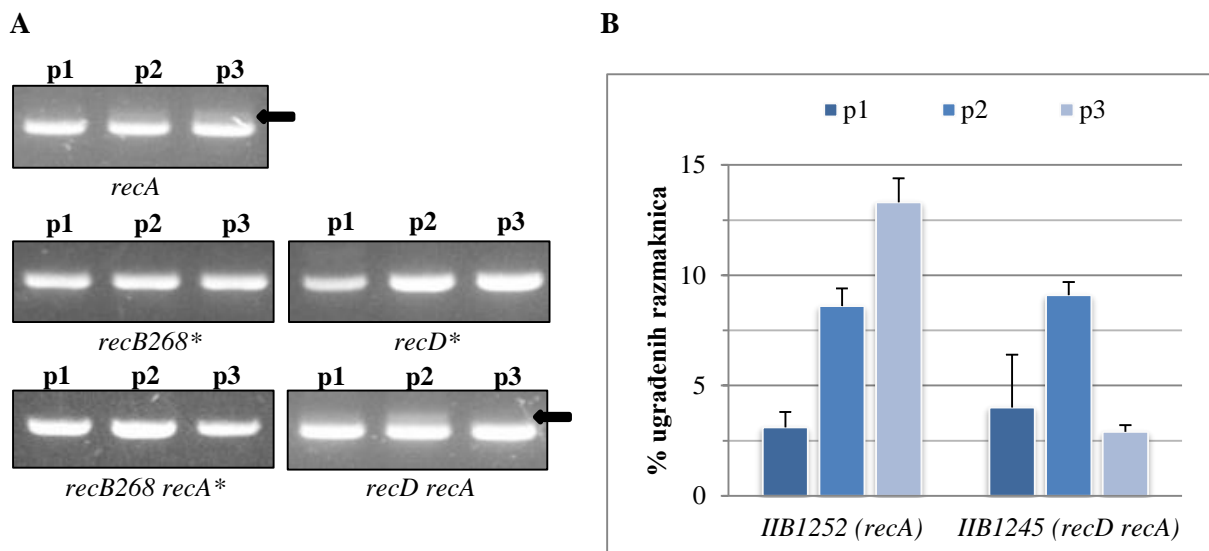


Slika 10. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) soja IIB1165 (*wt*) transformiranog plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. U prvoj jažici je marker veličina DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (M). Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u soju IIB1165 (*wt*) transformiranog plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike.

Enzim RecBCD je po biokemijskim svojstvima snažna nukleaza i bipolarna helikaza^{17,95,96} uključena u proces homologne rekombinacije i popravka DNA u bakteriji *E. coli*. Obje aktivnosti su neophodne za procesiranje tupih dvolančanih krajeva DNA nastalih oštećenjem DNA da bi se dobio rekombinacijski međuprodukt – 3'-jednolančana DNA na koju je vezan protein RecA. Zanimljivo, prethodna istraživanja su pokazala da je nukleazna aktivnost enzima RecBCD bitna za naivnu adaptaciju, tj. da u nukleazno deficijentnim pojedinačnim mutantima *recB*, *recC* i *recD* ne dolazi do ugradnje novih razmaknica^{9,15}. Za enzim RecBCD se predložilo da sudjeluje u pripremi manjih fragmenata od velike strane DNA njenom degradacijom ili degradacijom vlastite DNA na mjestima zaustavljene i kolabirane replikacijske rašlje. Nastale manje fragmente potom kompleks Cas1-Cas2 dalje procesira i ugrađuje u lokus CRISPR¹⁵. Za RecBCD je također prodloženo da omogućava razlikovanje vlastite od strane DNA, dok uloga proteina RecA i procesa homologne rekombinacije nije istraživana. Kako je nanošenje proteina RecA na jednolančanu molekulu DNA jedna od glavnih uloga enzima RecBCD prilikom popravka oštećenja u molekuli DNA¹³⁵, prvo sam želio detaljnije istražiti naivnu adaptaciju u mutantima *recA*, *recB* i *recD* i njihov međuodnos. Sama mutacija u genu *recA*, u skladu s literaturom, nema utjecaj na naivnu adaptaciju kad je enzim RecBCD aktivan⁹ (Slika 11). Očekivano, naivna adaptacija

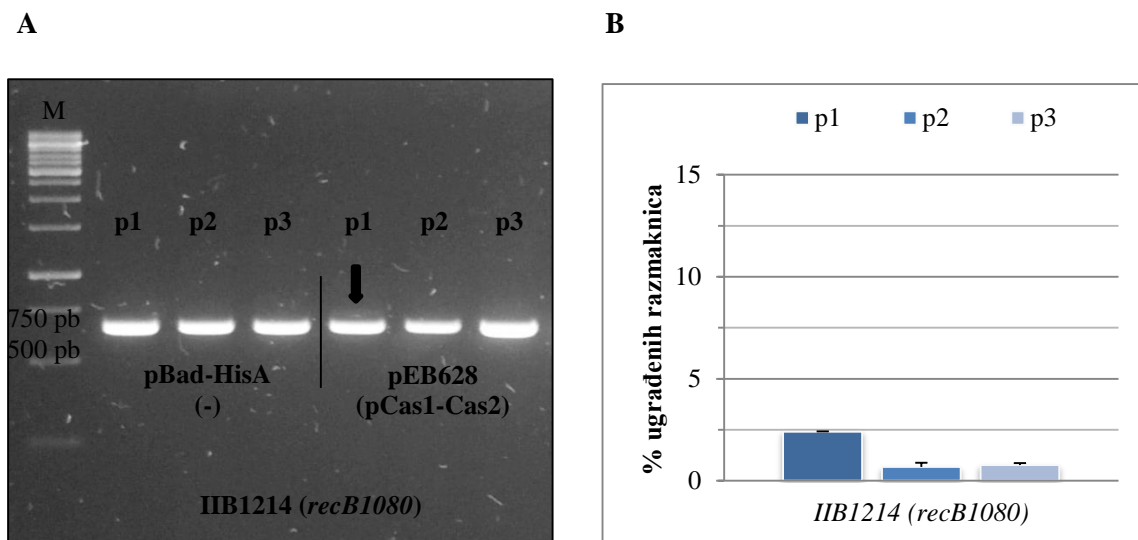
ovisi o enzimu RecBCD i nije došlo do ugradnje novih razmaknica u mutantima *recB268* i *recD1903* (dalje u tekstu: *recD*; Slika 11).

Mutanti u genu *recB* ili *recC* su *null*-mutanti, odnosno nemaju niti jednu enzimatsku aktivnost¹⁷, dok mutant *recD* nema nukleaznu, ali ima helikaznu aktivnost i može stvarati rekombinogeni filament RecA uz pomoć drugih nukleaza. Nadalje, enzim RecBCD počinje nanositi protein RecA samo nakon interakcije sa sekvencom *chi*, dok enzim RecBC (u mutantu *recD*) protein RecA nanosi konstitutivno i neovisno o sekvenci *chi*¹⁰⁰. Stoga sam želio istražiti hoće li se uklanjanjem proteina RecA u mutantima *recB* ili *recD* uspostaviti naivna adaptacija. Kombiniranjem mutacije *recA* s mutacijom *recB268* nisam očekivao utjecaj na naivnu adaptaciju jer u tom mutantu nema ni enzima RecBCD niti proteina RecA. Međutim, kombinacija mutacija *recA* i *recD* osigurava stanicama samo helikazu RecBC koja više ne može konstitutivno nanositi protein RecA. Nanošenje proteina RecA je važno u homolognoj rekombinaciji i popravku DNA, ali sam pretpostavio da nije u stvaranju fragmenata DNA gdje bi zapravo moglo smetati (Slika 11.).



Slika 11. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) sojeva IIB1252 (*recA*), IIB1208 (*recB268*), IIB1192 (*recD*), IIB1244 (*recB268 recA*) i IIB1245 (*recD recA*) transformiranih plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u sojevima IIB1252 (*recA*) i IIB1245 (*recD recA*) transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. *U mutantima *recB268*, *recD* i *recB268 recA* nema ugradnje novih razmaknica.

Izostanak ugradnje razmaknica u dvostrukom mutantu *recB268 recA* je očekivan, dok mi je pojava razmaknica u dvostrukom mutantu *recD recA* ukazala da RecA negativno utječe na nastanak fragmenata DNA te da vjerojatno nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije neophodna za naivnu adaptaciju, već je dovoljna samo helikazna. Da bih provjerio ovisi li ugradnja razmaknica o nukleaznoj aktivnosti enzima RecBCD, ugradnju razmaknica sam istražio u mutantu *recB1080* (Slika 12.). Ovaj točkasti mutant stvara enzimski kompleks RecB^{D1080A}CD koji je nukleazno inaktivan jer je mutiran nukleazni centar u podjedinici RecB. Ovaj mutirani enzim ne nanosi protein RecA na molekulu DNA (umjesto enzima RecB^{D1080A}CD to radi enzimski kompleks RecFOR), ali mu je helikazna aktivnost očuvana^{129,135}. U ovom mutantu se ugradnja razmaknica u prvoj pasaži pojavljuje otprilike jednakom učestalošću kao u prvoj pasaži divljeg tipa ($2,4 \pm 0,02$ % u mutantu *recB1080*, tj. $2,2 \pm 0,2$ % u divljem tipu, Slika 10 i Tablica P1 u poglavlju Prilozi).



Slika 12. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) soja IIB1214 (*recB1080*) transformiranog plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. U prvoj jažici je marker veličina DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (M). Strelica pokazuje na produljenu vrpcu umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u soju IIB1214 (*recB1080*) transformiranog plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike.

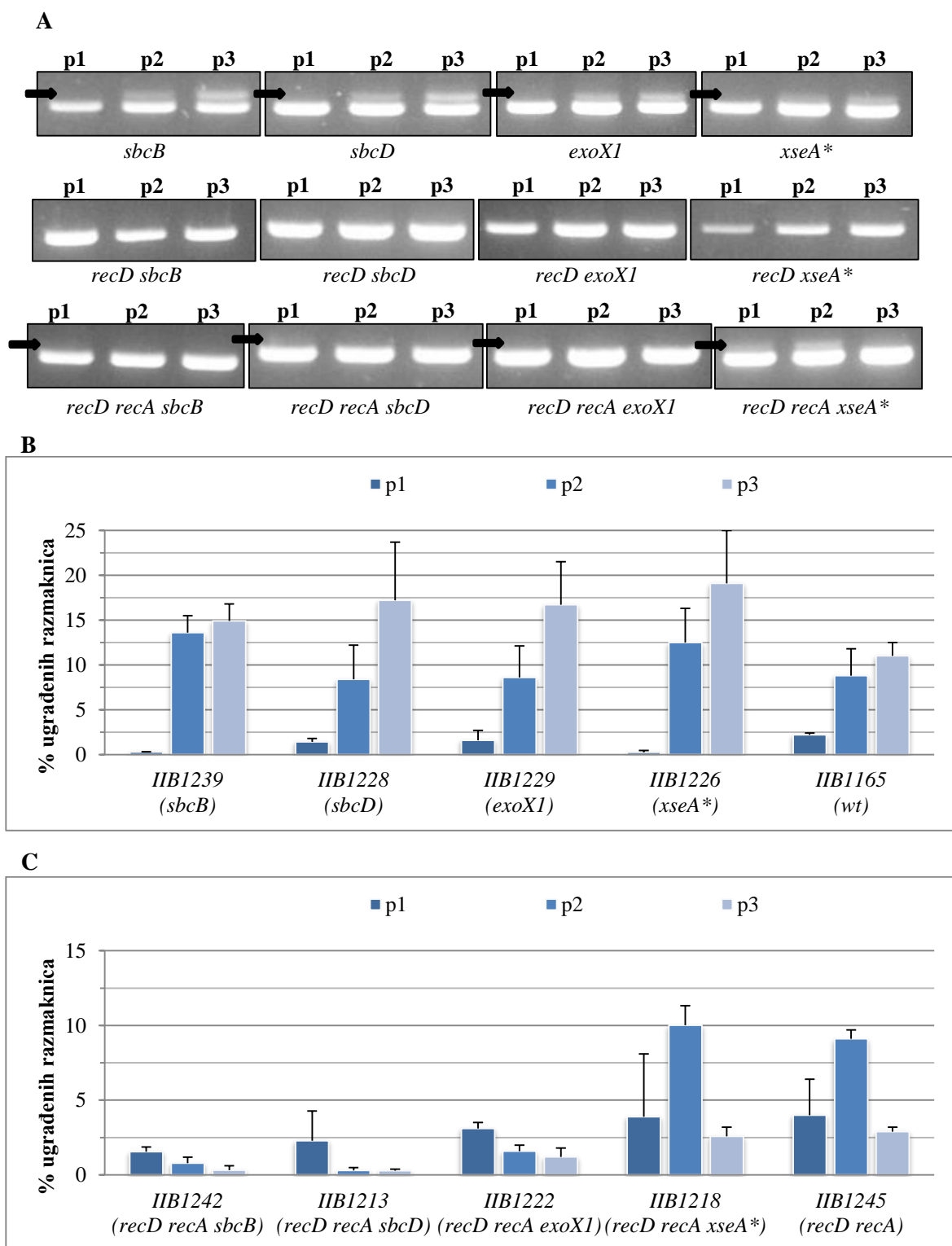
Međutim, učinkovitost ugradnje razmaknica se potom mijenja ovisno o genotipu i istraživanoj pasaži. U divljem tipu (soj IIB1165) učestalost ugradnje razmaknica raste sa svakom narednom pasažom (Slika 10), dok u mutantima *recD recA* i *recB1080* to nije slučaj (Slika 11 i Slika 12). Dvostruki mutant *recD recA* (soj IIB1245) najučinkovitije ugrađuje u drugoj, a mutant *recB1080* (soj IIB1214) u prvoj pasaži. Kako je proteinski kompleks Cas1-Cas2 za adaptaciju eksprimiran s plazmida, a plazmidi se teže repliciraju u mutantima *recB* i *recD* jer stvaraju multimerne i mogu se izgubiti prilikom diobe stanica¹³⁶, provjeravao sam dolazi li i do gubitka plazmida u sojevima tijekom pasažiranja. Iz rezultata (Tablica 14) se vidi da u divljem tipu ne dolazi do gubitka plazmida kroz pasaže, dok se u mutantima plazmid gubi. Uočljiv je veliki gubitak plazmida pCas1-Cas2 u trećoj pasaži u mutantu *recD recA*, te u drugoj i trećoj pasaži u mutantu *recB1080* gdje je samo 10^3 stanica sačuvalo plazmid u odnosu na 10^9 stanica divljeg tipa. S obzirom da je dvostruki mutant *recD recA*, u kojem je došlo do ugradnje razmaknica, više gubio plazmid od mutantu *recD*, u kojem nije bilo ugradnje razmaknica, izostanak ugradnje razmaknica u mutantu *recD* ne može biti posljedica gubitka plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2.

Tablica 14. Gubitak plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (pEB628) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u divljem tipu (soj IIB1165), mutantu *recD*, dvostrukom mutantu *recD recA* (soj IIB1245) i mutantu *recB1080* (soj IIB1214). Rezultat je srednja vrijednost barem dvije replike.

Soj transformiran plazmidom pEB628 (Amp ^r) za ekspresiju Cas1-Cas2	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
IIB1165 (<i>wt</i>)	2,32 x 10⁹ (1,28 x 10 ⁹)	3,10 x 10⁹ (2,30 x 10 ⁹)	1,93 x 10⁹ (1,06 x 10 ⁸)
IIB1192 (<i>recD</i>)	3,00 x 10⁸ (2,18 x 10 ⁸)	3,54 x 10⁷ (3,47 x 10 ⁷)	4,12 x 10⁶ (2,92 x 10 ⁶)
IIB1245 (<i>recD recA</i>)	4,21 x 10⁷ (2,03 x 10 ⁷)	6,75 x 10⁶ (4,60 x 10 ⁶)	6,80 x 10⁵ (4,53 x 10 ⁵)
IIB1214 (<i>recB1080</i>)	2,05 x 10⁷ (1,61 x 10 ⁷)	7,95 x 10⁵ (7,63 x 10 ⁵)	3,33 x 10³ (2,89 x 10 ³)

4.2. Utjecaj 3'- i 5'-jednolančanih DNA-nukleaza na naivnu adaptaciju

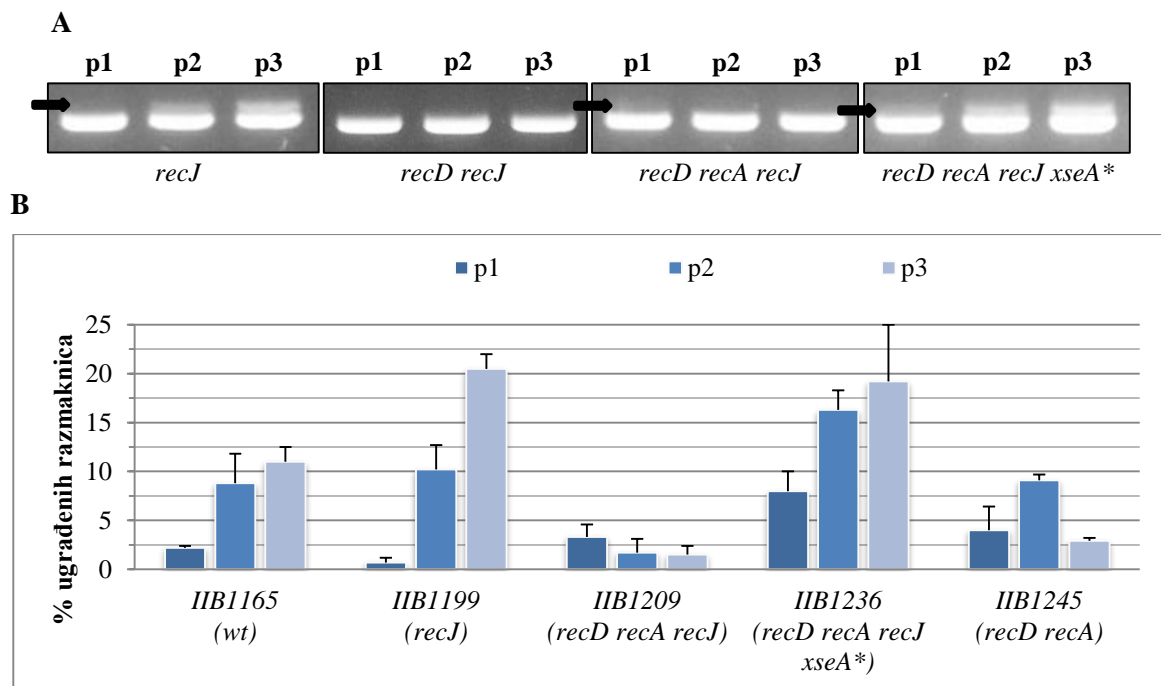
Kako su prethodni rezultati pokazali da je naivna adaptacija moguća i kad enzim RecBCD nema nukleaznu aktivnost (i nema proteina RecA), to je upućivalo na mogućnost da druge nukleaze mogu zamijeniti enzim RecBCD u cijepanju DNA što sam želio istražiti. Postoje 3'- i 5'-jednolančane DNA-egzonukleaze koje su važne za stabilnost genoma i sudjeluju u popravku DNA direktno ili pomažu u procesiranju krajeva DNA za vezanje enzima RecBCD^{106,107}. Prvo sam istražio uloge 3'-jednolančanih egzonukleaza uvođenjem mutacija u gene *sbcB* (kodira egzonukleazu SbcB), *sbcD* (kodira podjedinicu egzonukleaze SbcCD), *exoXI* (kodira egzonukleazu ExoX), te u gen *xseA* koji kodira podjedinicu XseA bipolarne egzonukleaze XseAB. Mutacije u egzonukleazama sam prvo uveo u divlji tip, soj IIB1165 (*wt*), zatim u mutanta *recD* i dobio dvostruke mutante, te u mutanta *recD recA* čime sam dobio trostruke mutante (Tablica 1 u poglavlju Materijali i metode). Na ovaj način sam pratio uloge 3'-jednolančanih egzonukleaza kad je aktivan enzim RecBCD (pojedinačni mutanti egzonukleaza), kad je enzim RecBC helikaza koja konstitutivno nanosi protein RecA (mutanti egzonukleaza u *recD* pozadini) i kad je enzim RecBC samo helikaza i nema proteina RecA (mutanti egzonukleaza u *recD recA* pozadini). Mutacije u genima za 3'-jednolančane egzonukleaze pokazuju blago pozitivan utjecaj (najizraženiji u trećoj pasaži: 15 – 19 % u mutantima naspram 11 % u divljem tipu; Slika 13) na ugradnju razmaknica kad je enzim RecBCD funkcionalan. Rezultat u pojedinačnim mutantima je sličan rezultatu u soju IIB1165 (*wt*) u smislu da se uočava niska razina ugradnje razmaknica u prvoj pasaži, a znatno bolja u drugoj i trećoj pasaži (Slika 13 B i Tablica P1 u poglavlju Prilozi). U pozadini *recD*, kad je u stanicama prisutan enzim RecBC, nedostatak egzonukleaza nema učinak jer nema ugradnje razmaknica što je vjerojatno posljedica nanošenja proteina RecA. U pozadini *recD recA*, kad je u stanicama prisutan enzim RecBC bez nanošenja proteina RecA, uočljiva je niska ugradnja razmaknice u prvoj pasaži (u rasponu od 1,5 % do 3,9 %; Slika 13 C, te Tablica P1 u poglavlju Prilozi) koja poslije gotovo prestaje osim u slučaju nedostatka bipolarne nukleaze XseAB gdje se trostruki mutant *recD recA xseA* ponaša poput dvostrukog mutanta *recD recA*.



Slika 13. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) mutanata u genima koji kodiraju 3'-jednolančane DNA-egzonukleaze (*sbcB*, *sbcD*, *exoX1*, *xseA*), te njima pripadajućih dvostrukih (+ *recD*) i trostrukih (+ *recD recA*) mutanata transformiranih plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u mutantima za gene koji kodiraju 3'-jednolančane DNA-egzonukleaze IIB1239 (*sbcB*), IIB1228 (*sbcD*), IIB1229 (*exoX1*) i

IIB1226 (*xseA*) transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. Radi lakše usporedbe, ponovo je prikazan i rezultat u divljem tipu (*wt*). C. Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u trostrukim mutantima IIB1242 (*recD recA sbcB*), IIB1213 (*recD recA sbcD*), IIB1222 (*recD recA exoXI*) i IIB1218 (*recD recA xseA*) transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. Radi lakše usporedbe, ponovo je prikazan i rezultat dvostrukog mutanta *recD recA*. *Gen *xseA* kodira za bipolarnu 3'→5'/5'→3'-jedinolčanu DNA-egzonukleazu.

Na isti način kao za 3'-jedinolčane DNA-egzonukleaze istražio sam i utjecaj 5'-jedinolčanih DNA-egzonukleaza na ugradnju razmaknica u naivnoj adaptaciji. Uz već spomenutu bipolarnu egzonukleazu XseAB, istražio sam ulogu egzonukleaze RecJ. Uvođenje mutacije *recJ* u divljem tipu ne ometa ugradnju razmaknica (Slika 14), štoviše, učestalost ugradnje u trećoj pasaži je otprilike dvostruko pojačana i iznosi $20,5 \pm 1,5$ % naspram $11 \pm 1,5$ % u divljem tipu. U mutantu *recD recJ* očekivano nema ugradnje razmaknica, a u trostrukom mutantu *recD recA recJ* ponovno se uočava pad učestalosti ugradnje razmaknica kroz tri pasaže. Međutim, vidi se da u četverostrukom mutantu *recD recA recJ xseA*, u kojem su uklonjene obje 5'-jedinolčane DNA-egzonukleaze, dolazi do znatno pojačane ugradnje razmaknica u odnosu na dvostruki mutant *recD recA* kroz sve tri pasaže, a naročito u trećoj.



Slika 14. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) mutanta u genu *recJ* koji kodira 5'-jedinolčanu DNA-egzonukleazu, te njemu pripadajućih dvostrukih (+ *recD*), trostrukih

(+ *recD recA*) i četverostrukih (+ *recD recA xseA*) mutanata transformiranih plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u mutantima s uklonjenom 5'-jednolančanom DNA-egzonukleazom RecJ transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. Radi lakše usporedbe, ponovo su prikazani rezultati divljeg tipa (*wt*) i dvostrukog mutanta *recD recA*. *Gen *xseA* kodira za bipolarnu 3'→5'/5'→3'-jeddolančanu DNA-egzonukleazu.

Smanjena učestalost ugradnje razmaknica u drugoj i trećoj pasaži trostrukih mutanata *recD recA sbcB/sbcD/exoXI/recJ* u odnosu na dvostrukog mutanta *recD recA* mogla je biti posljedica gubitka plazmida pEB628 (pCas1-Cas2) iz stanica, što sam provjerio. U trostrukim mutantima je gubitak plazmida već od prve pasaže puno veći (za oko dva reda veličine) nego u dvostrukom mutantu *recD recA* (Tablica 15). Jedina iznimka je trostruki mutant *recD recA xseA* koji se i u pogledu učestalosti ugradnje razmaknica i u pogledu gubitka plazmida ponaša isto kao dvostruki mutant *recD recA*. Četverostruki mutant *recD recA xseA recJ* znatno manje gubi plazmid od trostrukog mutanta *recD recA recJ* što je u skladu sa znatno učinkovitijom ugradnjom razmaknica.

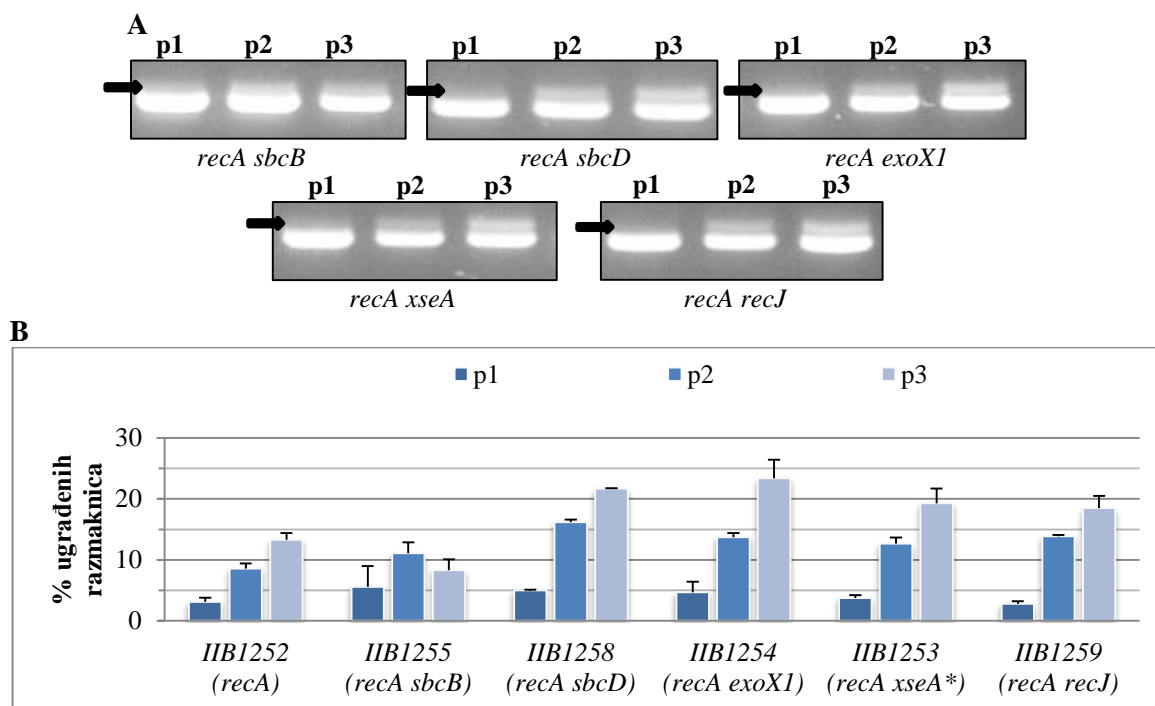
Tablica 15. Gubitak plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (pEB628) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u dvostrukom mutantu *recD recA*, trostrukim mutantima *recD recA sbcB/sbcD/exoXI/xseA/recJ* i četverostrukom mutantu *recD recA recJ xseA*. Polarnost jednolančanih DNA-egzonukleaza je zabilježena u obliku eksponenta uz oznaku pripadajućeg gena. Rezultat je srednja vrijednost barem dvije replike.

Soj transformiran plazmidom pEB628 (Amp ^r) za ekspresiju Cas1-Cas2	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
IIB1245 (<i>recD recA</i>)	4,21 x 10⁷ (2,03 x 10 ⁷)	6,75 x 10⁶ (4,60 x 10 ⁶)	6,80 x 10⁵ (4,53 x 10 ⁵)
IIB1242 (<i>recD recA sbcB^{3'}</i>)	8,80 x 10⁵ (1,40 x 10 ⁵)	1,25 x 10⁴ (1,66 x 10 ⁴)	1,38 x 10⁴ (1,89 x 10 ⁴)
IIB1213 (<i>recD recA sbcD^{3'}</i>)	6,98 x 10⁵ (2,63 x 10 ⁵)	3,75 x 10³ (4,79 x 10 ³)	3,33 x 10³ (5,77 x 10 ³)
IIB1222 (<i>recD recA exoXI^{3'}</i>)	6,11 x 10⁵ (3,71 x 10 ⁵)	1,59 x 10⁵ (2,44 x 10 ⁵)	1,14 x 10⁵ (8,75 x 10 ⁴)
IIB1218 (<i>recD recA xseA^{3'/5'}</i>)	4,21 x 10⁷ (3,72 x 10 ⁷)	4,38 x 10⁶ (3,09 x 10 ⁶)	5,13 x 10⁵ (3,56 x 10 ⁵)

Tablica 15 - nastavak

IIB1209 (<i>recD recA recJ</i> ^{5'})	8,07 x 10⁵ (3,01 x 10 ⁵)	5,00 x 10³ (8,66 x 10 ³)	0 (0)
IIB1236 (<i>recD recA recJ</i> ^{5'} <i>xseA</i> ^{3'/5'})	1,20 x 10⁷ (9,84 x 10 ⁶)	1,28 x 10⁷ (5,01 x 10 ⁶)	9,50 x 10⁶ (2,12 x 10 ⁶)

Kako su kombinacije mutacija *recD recA sbcB/sbcD/exoXI/recJ* pokazivale veliki pad u ugradnji razmaknica i veliku nestabilnost plazmida, doprinos jednonančanih egzonukleaza provjerio sam i kad je uz egzonukleaze bio uklonjen samo gen *recA*. Dvostruki mutanti *recA sbcB/sbcD/exoXI/recJ* nisu pokazivali smanjenu ugradnju razmaknica, već naprotiv, veću nego stanice divljeg tipa ili pojedinačni mutant *recA*. Učestalija ugradnja razmaknica u dvostrukim mutantima je naročito bila izražena u trećoj pasaži gdje je učinkovitost ugradnje bila oko 20 %, dok je u divljem tipu iznosila 11 ± 1,5 %, a u mutantu *recA* 13,3 ± 1,1 % (Slika 15, Tablica P1 u poglavlju Prilozi). Jedina iznimka je treća pasaža dvostrukog mutanta *recA sbcB* koja je bila sličnija divljem tipu i mutantu *recA*, no ovaj dvostruki mutant u trećoj pasaži ima red veličine manje plazmida pEB628 nego ostali dvostruki mutanti i mutant *recA* (Tablica 16). Niti jedna kombinacija dvostrukih mutanata *recA sbcB/sbcD/exoXI/recJ* nije gubila plazmid pCas1-Cas2 kao trostruki mutanti *recA recD sbcB/sbcD/exoXI/recJ* (Tablica 15), što je u skladu s efikasnijom ugradnjom razmaknica u dvostrukim mutantima.



Slika 15. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) mutanata u genima za 3'→5'- (*sbcB*, *sbcD*, *exoXI*, *xseA*) i 5'→3'- (*xseA*, *recJ*) jednonančane DNA-egzonukleaze u

pozadini *recA* transformiranih plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u mutantima s uklonjenim 3'→5'- i 5'→3'- jednolančanim DNA-egzonukleazama u pozadini *recA* transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. Radi lakše usporedbe, ponovo je prikazan rezultat mutanta *recA*. *Gen *xseA* kodira za bipolarnu 3'→5'/5'→3'-jednolančanu DNA-egzonukleazu.

Tablica 16. Gubitak plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (pEB628) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u mutantu *recA*, te dvostrukim mutantima *recA sbcB/sbcD/exoXI/xseA/recJ*. Polarnost jednolančanih DNA-egzonukleaza je zabilježena u obliku eksponenta uz oznaku pripadajućeg gena. Rezultat je srednja vrijednost barem dvije replike.

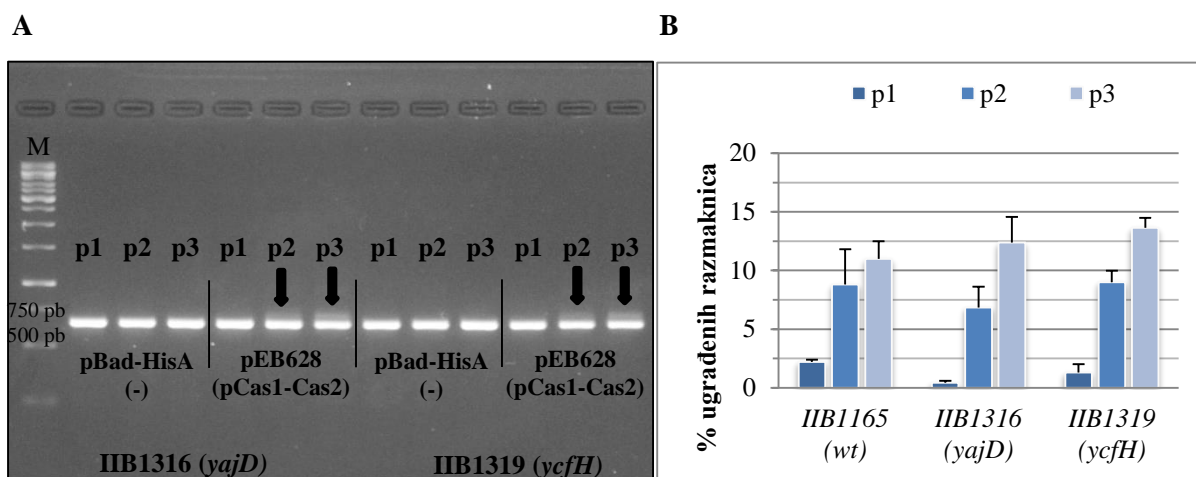
Soj transformiran plazmidom pEB628 (Amp ^r) za ekspresiju Cas1-Cas2	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
IIB1252 (<i>recA</i>)	1,85 x 10⁸ (9,25 x 10 ⁷)	1,34 x 10⁸ (5,48 x 10 ⁶)	9,39 x 10⁷ (2,53 x 10 ⁷)
IIB1255 (<i>recA sbcB</i> ^{3'})	1,58 x 10⁷ (3,54 x 10 ⁵)	3,75 x 10⁶ (1,77 x 10 ⁶)	6,50 x 10⁶ (4,24 x 10 ⁶)
IIB1258 (<i>recA sbcD</i> ^{3'})	1,31 x 10⁸ (5,41 x 10 ⁷)	5,34 x 10⁷ (1,69 x 10 ⁷)	7,11 x 10⁷ (4,87 x 10 ⁷)
IIB1254 (<i>recA exoXI</i> ^{3'})	9,96 x 10⁷ (1,22 x 10 ⁷)	6,99 x 10⁷ (2,39 x 10 ⁷)	9,05 x 10⁷ (2,55 x 10 ⁷)
IIB1253 (<i>recA xseA</i> ^{3'/5'})	7,28 x 10⁷ (4,74 x 10 ⁷)	5,71 x 10⁷ (1,08 x 10 ⁷)	6,63 x 10⁷ (5,48 x 10 ⁷)
IIB1259 (<i>recA recJ</i> ^{5'})	9,64 x 10⁷ (3,47 x 10 ⁷)	1,25 x 10⁸ (1,91 x 10 ⁷)	9,15 x 10⁷ (5,72 x 10 ⁷)

Sumarno, uklanjanjem jednolančanih 3'→5'- i 5'→3'- DNA-egzonukleaza u mutantu *recA*, količina plazmida pEB628 u stanicama ostaje stalna, no učinkovitost ugradnje razmaknica se povećava, naročito u drugoj (1,3 – 1,9 x) i trećoj pasaži (1,4 – 1,8 x). Ugradnja razmaknica, prema rezultatima elektroforeze u agaroznom gelu, je posve inhibirana u mutantu *recD* i tada na ugradnju ne utječu jednolančane egzonukleaze. Dodavanjem mutacije *recA* mutantu *recD* ugradnja razmaknica se ponovo uspostavlja i tada se može pratiti doprinos pojedinih jednolančanih egzonukleaza. Međutim, mutacija *recD* nepovoljno utječe na stabilnost plazmida s kojeg se ekprimira kompleks Cas1-Cas2 (ne pomaže niti mutacija *recA*),

pa je učinkovitost ugradnje razmaknica u drugoj i trećoj pasaži u mutantima *recD recA* bez 3'→5'-egzonukleaza jako smanjena. Zanimljivo, uklanjanje obje 5'→3'-DNA-egzonukleaze iz dvostrukog mutanta *recD recA* neznatno je utjecalo na stabilnost plazmida pCas1-Cas2 (za otprilike pola reda veličine u drugoj i red veličine u trećoj pasaži), ali je dovelo do izrazito učinkovitije ugradnje razmaknica (otprilike dva puta u prvoj i drugoj, te čak 6,6 x u trećoj pasaži). Učinkovitija ugradnja razmaknica u odnosu na divlji tip (otprilike 1,5 – 2 x) se vidi i u trećoj pasaži mutanata u kojima je uklonjena samo jedna 3'→5'- ili 5'→3'-DNA-egzonukleaza i u kojima nema gubitka plazmida (Tablica P1 i Tablica P2 u poglavlju Prilozi). Iz svega navedenog se može zaključiti da uklanjanje jednolančanih DNA-egzonukleaza ima pozitivan učinak na ugradnju razmaknica u naivnoj adaptaciji, a naročito uklanjanje obje 5'→3'-jednolančane DNA-egzonukleaze u dvostrukom mutantu *recD recA*.

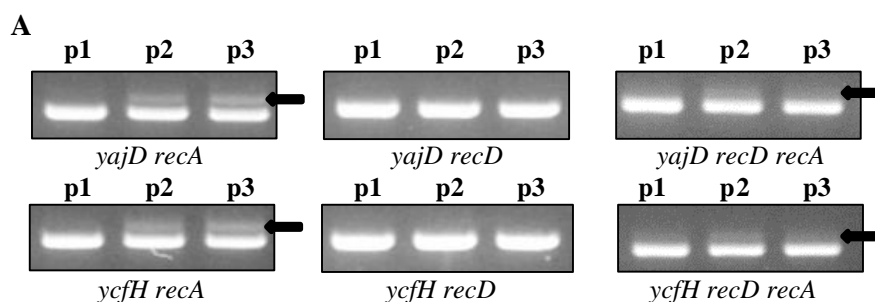
4.3. Utjecaj gena nepoznate funkcije, *yayD* i *yefH*, na naivnu adaptaciju

Na isti način kao u prethodna dva poglavlja istražio sam utječu li geni *yayD* i *yefH* na naivnu adaptaciju. Ove gene je predložio suradnik dr. Tom Killelea jer je prilikom afinitetnog pročišćavanja proteina metodom "*pull-down*" otkrio da proteinski produkti ovih gena stvaraju interakciju s proteinskim kompleksom Cas1-Cas2. Funkcija ovih gena nije poznata, no iz bioinformatičkih analiza se predviđa da je protein YcfH DNaza¹³⁷, a YayD nukleaza tipa HNH¹³⁸ poput proteina Cas9 iz klase 2 sustava CRISPR-Cas¹³⁹. Iz rezultata (Slika 16) se vidi da uklanjanje gena *yayD* (soj IIB1316) i *yefH* (soj IIB1319) iz divljeg tipa (soj IIB1165) nema utjecaj na naivnu adaptaciju. U oba mutanta se na gelu u drugoj i trećoj pasaži uočavaju dodatne vrpce DNA od ugrađenih razmaknica u lokusu CRISPR, a postotak ugradnje je sličan divljem tipu.

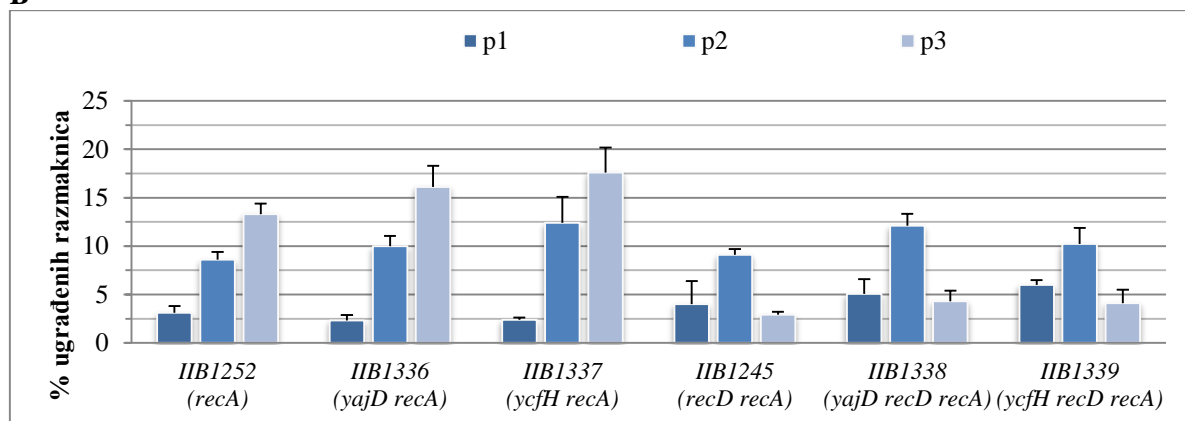


Slika 16. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) sojeva IIB1316 (*yajD*) i IIB1319 (*ycfH*) transformiranih plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. U prvoj jažici je marker veličina DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (M). Strelice pokazuju na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u sojevima IIB1316 (*yajD*) i IIB1319 (*ycfH*) transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike. Radi lakše usporedbe, ponovo je prikazan rezultat divljeg tipa (soj IIB1165).

Osim u divljem tipu, utjecaj delecije gena *yajD* i *ycfH* sam još istražio i u pojedinačnim mutantima *recA* i *recD*, te u dvostrukom mutantu *recD recA*. U svim slučajevima, uvođenje dodatne mutacije *yajD*, odnosno *ycfH*, nije imalo utjecaj na ugradnju razmaknica (Slika 17). U mutantima *yajD recD* i *ycfH recD* nema ugradnje razmaknica, kao ni u pojedinačnom mutantu *recD*. Učinkovitost ugradnje razmaknica u mutantima *yajD recA* i *ycfH recA* je slična kao u pojedinačnom mutantu *recA*, a u mutantima *yajD recD recA* i *ycfH recD recA* kao u dvostrukom mutantu *recD recA*. Dodatne mutacije u genima *yajD* i *ycfH* nemaju niti utjecaj na stabilnost plazmida u *recD*, *recA* i *recD recA* pozadinama (Tablica 17).



B



Slika 17. A. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) mutanata *recA*, *recD* i *recD recA* s dodatnim mutacijama u genima nepoznate funkcije (*yajD* i *ycfH*) transformiranih plazmidom pEB628 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **B.** Relativni intenzitet naivne adaptacije kroz sve tri pasaže u mutantima *recA* i *recD recA* s uklonjenim genima *yajD* i *ycfH* transformiranih plazmidom pEB628. Rezultat je srednja vrijednost minimalno tri replike.

Tablica 17. Gubitak plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (pEB628) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u mutantima *recD*, *recA* i *recD recA* s dodatnim mutacijama u genima *yajD* i *ycfH*. Rezultat je srednja vrijednost barem dvije replike.

Soj transformiran plazmidom pEB628 (Amp^r) za ekspresiju Cas1-Cas2	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
IIB1192 (<i>recD</i>)	$3,00 \times 10^8$ ($2,18 \times 10^8$)	$3,54 \times 10^7$ ($3,47 \times 10^7$)	$4,12 \times 10^6$ ($2,92 \times 10^6$)
IIB1334 (<i>yajD recD</i>)	$1,71 \times 10^8$ ($7,10 \times 10^7$)	$2,83 \times 10^7$ ($2,15 \times 10^7$)	$1,02 \times 10^6$ ($6,79 \times 10^5$)
IIB1235 (<i>ycfH recD</i>)	$1,68 \times 10^8$ ($1,55 \times 10^7$)	$2,89 \times 10^7$ ($2,13 \times 10^7$)	$1,22 \times 10^6$ ($4,89 \times 10^5$)
IIB1252 (<i>recA</i>)	$1,85 \times 10^8$ ($9,25 \times 10^7$)	$1,34 \times 10^8$ ($5,48 \times 10^6$)	$9,39 \times 10^7$ ($2,53 \times 10^7$)
IIB1336 (<i>yajD recA</i>)	$1,54 \times 10^8$ ($4,21 \times 10^7$)	$9,71 \times 10^7$ ($3,31 \times 10^7$)	$1,39 \times 10^8$ ($2,16 \times 10^7$)

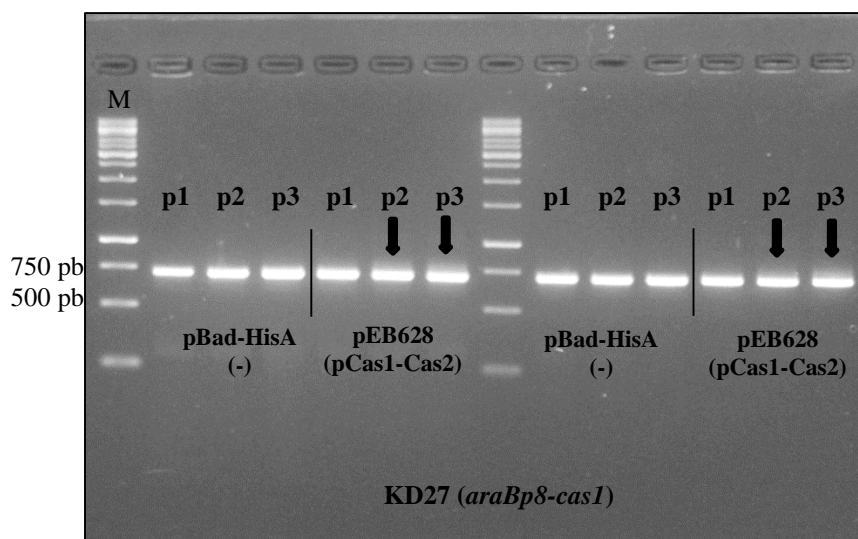
Tablica 17 - nastavak

IIB1237 (<i>ycfH recA</i>)	8,58 x 10⁷ (1,02 x 10 ⁷)	1,67 x 10⁸ (2,37 x 10 ⁷)	1,59 x 10⁸ (4,18 x 10 ⁷)
IIB1245 (<i>recD recA</i>)	4,21 x 10⁷ (2,03 x 10 ⁷)	6,75 x 10⁶ (4,60 x 10 ⁶)	6,80 x 10⁵ (4,53 x 10 ⁵)
IIB1338 (<i>yajD recD recA</i>)	5,29 x 10⁷ (2,51 x 10 ⁷)	2,18 x 10⁷ (4,19 x 10 ⁶)	3,75 x 10⁶ (1,77 x 10 ⁶)
IIB1339 (<i>ycfH recD recA</i>)	2,75 x 10⁷ (5,29 x 10 ⁶)	1,27 x 10⁷ (1,42 x 10 ⁷)	3,04 x 10⁶ (5,17 x 10 ⁶)

Prikaz postotka ugradnje novih razmaknica (Tablica P1) i gubitka plazmida (Tablica P2) u svim korištenim sojevima u kojima su geni *cas1* i *cas2* bili eksprimirani s plazmida pEB628 priloženi su na kraju disertacije u poglavlju Prilozi.

4.4. Naivna adaptacija s ekspresijom gena *cas1* i *cas2* s kromosoma

Da bih zaobišao problem gubitka plazmida s kojeg sam eksprimirao gene *cas1* i *cas2*, pokušao sam istražiti učinkovitost ugradnje razmaknica kad se geni *cas1* i *cas2* eksprimiraju s kromosoma. Na ovaj bih način ujedno mogao koristiti različite plazmide i bakteriofage kao model strane molekule DNA, tj. potencijalnog izvorišta novih razmaknica. Za ovaj pokus sam koristio soj KD27 koji ima kromosomske gene *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom, tj. za ekspresiju je potrebno dodavati arabinozu u medij. Soj sam također transformirao plazmidima pBad-His-A (prazan vektor) i pEB628 (geni *cas1-cas2* uklonirani u pBad-HisA), no ovdje sam zbog kromosomske ekspresije gena *cas1* i *cas2* očekivao ugradnju razmaknica i u stanicama transformiranim praznim vektorom, a stanice transformirane plazmidom pEB628 su mi služile kao pozitivna kontrola naivne adaptacije. Do ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR je opet došlo samo u stanicama transformiranim plazmidom pEB628 na kojem su geni *cas1* i *cas2* (Slika 18). Količina plazmida pBad-HisA je kroz pasaže bila jednaka pozitivnoj kontroli (pEB628; Tablica 18) pa je izostanak ugradnje razmaknica u stanicama transformiranim plazmidom pBad-HisA vjerojatno posljedica nedovoljne količine proteinskog kompleksa Cas1-Cas2.



Slika 18. Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu tri pasaže (p1, p2, p3) soja KD27 (kromosomski geni *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom) transformiranog plazmidom pBad-HisA (prazan vektor) i pEB628 (*cas1* i *cas2* u vektoru pBad-HisA; pozitivna kontrola). Na slici su prikazane dvije replike. U prvoj i osmoj jažici je marker veličina DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (M). Strelice pokazuju na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR.

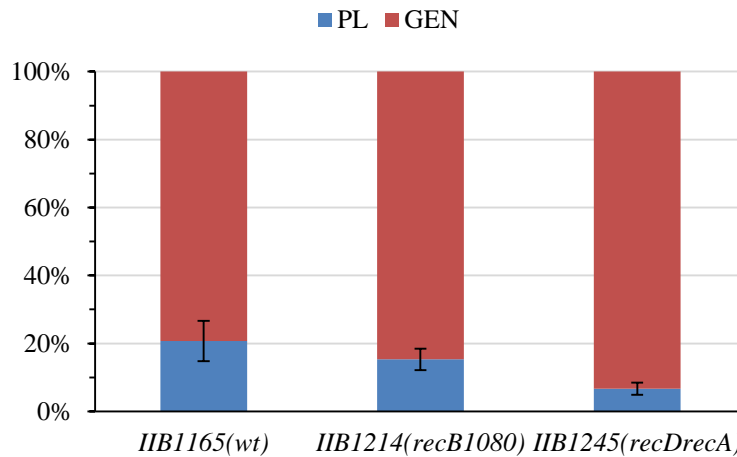
Tablica 18. Gubitak plazmida pBad-HisA (prazan vektor) i pEB628 (za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2; pozitivna kontrola) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u soju KD27 koji na kromosomu ima gene *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom. Rezultat je srednja vrijednost tri replike.

Soj KD27 transformiran plazmidom:	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
pBad-HisA (-)	1,47 x 10⁹ (6,53 x 10 ⁸)	1,02 x 10⁹ (8,22 x 10 ⁸)	8,67 x 10⁸ (6,90 x 10 ⁸)
pEB628 (<i>cas1-cas2</i> u pBad-HisA; + kontrola)	1,28 x 10⁹ (4,07 x 10 ⁸)	1,07 x 10⁹ (1,61 x 10 ⁸)	8,33 x 10⁸ (2,75 x 10 ⁸)

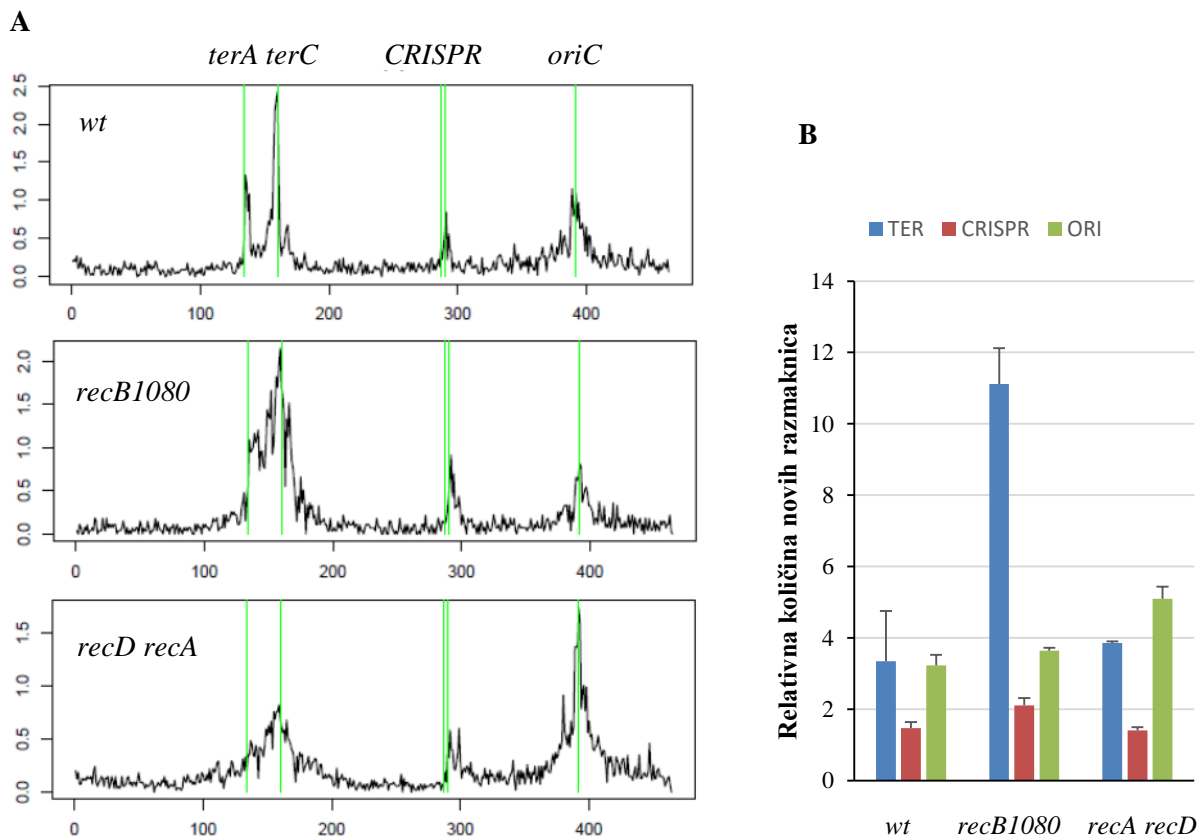
4.5. Porijeklo novougrađenih razmaknica u lokusu CRISPR

Kako je već navedeno, jedna od karakteristika enzima RecBCD je njegovo prepoznavanje oktamerne sekvence *chi* (5'-GCTGGTGG-3') nakon kojeg se aktivnost enzima mijenja iz nukleaze u rekombinazu^{17,135}. Ove sekvence su učestalije u kromosomu bakterije *E. coli* nego u stranim genetičkim elementima (plazmidima, bakteriofagima), pa se smatra da

enzim RecBCD pomaže u razlikovanju strane od vlastite DNA što je eksperimentalno pokazano¹⁵. Naime, mutanti *recB*, *recC* i *recD* imali su veći udio novih razmaknica sa kromosomske DNA nego divlji tip. Također, vidjela se korelacija u učestalijem uzimanju razmaknica iz regija DNA prije u odnosu na regije DNA nakon sekvence *chi*, te je većina kromosomskih razmaknica imala porijeklo s termina replikacije gdje se replikacijske rašlje zaustavljaju¹⁵. Stoga je bilo zanimljivo istražiti porijeklo razmaknica u mutantima enzima RecBCD koji nemaju interakciju sa sekvencom *chi* i ne mogu nanijeti protein RecA, dakle mutantima *recD recA* (soj IIB1245) i *recB1080* (soj IIB1214) u odnosu na stanice divljeg tipa (soj IIB1165). Iz navedenih sojeva sam izolirao DNA novougrađenih razmaknica iz agaroznog gela te poslao kolegici dr. Ekaterini Savitskaya u Skolkovo institut znanosti i tehnologije (Moskva, Rusija). Ona je pripremila biblioteku i tehnologijom HTS sekvencirala te potom bioinformatički analizirala uzorke na način da je iz dobivenih sekvenci izdvojila sekvence novih pojedinačnih razmaknica, te njihove odgovarajuće sekvence PAM (detaljan opis postupka je dostupan u ref.¹³³). Analizom sekvenci razmaknica je zatim odredila njihov položaj na genomu bakterije *E. coli* za sva tri istraživana soja. Budući da se gen *cas2* nalazio i na plazmidu i na kromosomu, za sve sekvence *cas1* i *cas2* je računala da potječu iz plazmida. To isto vrijedi i za gen *araC*. Kako se banke gena međusobno razlikuju u kvaliteti ista sekvenca se može naći više puta u jednom uzorku i tako napraviti greške u analizi. Iz tog razloga je odlučeno da se sojevi uspoređuju po broju jedinstvenih razmaknica, a ne ukupnom broju razmaknica. Analizom je utvrđeno da je većina jedinstvenih novougrađenih razmaknica porijeklom s kromosoma bakterije (Slika 19), a ne s plazmida što je u suprotnosti s rezultatima u literaturi¹⁵. Postotak kromosomskih razmaknica je najveći u soju IIB1245 (*recD recA*) i to preko 95 %, a najmanji u divljem tipu i iznosi oko 80 %. Za detaljniju analizu položaja razmaknica, razmaknice porijeklom iz kromosoma je podijelila u tri regije: izvorište replikacije (*oriC*), regiju CRISPR i terminus replikacije (*terA-terC*). Broj sekvenci iz navedenih regija je podijelila s brojem sekvenci u regijama slične duljine na drugim dijelovima kromosoma i dobila relativnu količinu razmaknica. Po toj analizi, u sva tri soja je više razmaknica porijeklom iz izvorišta i termina replikacije nego iz lokusa CRISPR. Međutim, u divljem tipu je podjednako razmaknica porijeklom iz izvorišta i termina replikacije, dok u mutantu *recD recA* razmaknice potječu nešto većim udjelom iz izvorišta replikacije (*oriC*), a u mutantu *recB1080* dominatno iz termina što je u skladu s pretpostavkom da se u tim regijama češće događaju zaustavljanja i lomovi replikacijskih rašlji koji se ne mogu popraviti i zato služe kao izvor razmaknica (Slika 20).



Slika 19. Porijeklo (PL- plazmid; GEN- genom) novougrađenih razmaknica u lokusu CRISPR u sojevima IIB1165 (*wt*), IIB1214 (*recB1080*) i IIB1245 (*recD recA*).



Slika 20. Distribucija novougrađenih razmaknica kromosomskog porijekla u sojevima IIB1165 (*wt*), IIB1245 (*recD recA*) i IIB1214 (*recB1080*). **A.** Mapiranje razmaknica uzduž kromosoma bakterije *E. coli*. Na osi X je prikazana pozicija na kromosomu (0-460 x 10⁴ pb) bakterije s koje potječu razmaknice, na osi Y relativni broj broja očitavanja naspram referentne regije genoma (0-670 kpb), a zelenim vertikalnim linijama su naznačene pozicije regija termina (od *terA* do *terC*), regije CRISPR

i izvorišta replikacije (*oriC*). **B.** Relativna količina novih razmaknica iz područja kromosoma duljine 670 kpb koje obuhvaća jednu od regija (*ter*, CRISPR, *oriC*) normalizirana naspram referentne regije genoma (0-670 kpb).

4.6. Utjecaj ugradnje novih razmaknica na preživljenje stanica

U istraživanjima naivne adaptacije u pokusima opisanim u poglavljima 4.1. – 4.4. kalup DNA za analizu razmaknica dobiven je iz alikvota liziranih stanica iz prekonoćne kulture, no nisam mogao znati jesu li stanice u kojima je došlo do ugradnje razmaknica žive ili mrtve. Da bih to doznao, umjesto liziranja, stanice sam razrijedio i zasadio na čvrste hranjive podloge te analizirao lokus CRISPR u pojedinačnim kolonijama. Za istraživanje udjela živih stanica s ugrađenim razmaknicama izabrao sam one sojeve u kojima je uočen pad broja novih razmaknica u trećoj pasaži što bi moglo ukazivati da se u tim stanicama oštećenje DNA nije moglo popraviti prilikom uzimanja razmaknice i/ili tijekom ugradnje u lokus CRISPR, dakle mutante *recD recA* i *recB1080* (pojedinačni mutanti *recB268* i *recD*, te dvostruki mutant *recB268 recA* nisu ugrađivali razmaknice). Za svaki soj sam pretraživao onoliko kolonija dok ih nisam prikupio barem 10 s ugrađenom razmaknicom. Taj broj sam podijelio s ukupnim brojem pretraženih kolonija i dobio postotak živih stanica s ugrađenom razmaknicom. Analizom sam utvrdio da je postotak živih stanica s ugrađenom razmaknicom veći ili jednak učestalosti ugradnje razmaknica u odgovarajućoj prekonoćnoj kulturi (pasaži), odnosno da ugradnja razmaknica te divlji tip i mutanti enzima RecBCD nemaju negativan učinak na preživljenje stanica (Tablica 19).

Tablica 19. Usporedba udjela živih stanica s ugrađenom razmaknicom i učestalosti ugradnje razmaknica u odgovarajućoj pasaži (p1, p2) prekonoćne kulture istog soja (*wt*, *recD recA* ili *recB1080*).

Soj (genotip) i pasaža prekonoćne kulture	Udio živih stanica s razmaknicom	Učinkovitost ugradnje razmaknica u prekonoćnoj kulturi iste pasaže
IIB1165 (<i>wt</i>) p2	16,9% (10/59)	8,8%
IIB1245 (<i>recD recA</i>) p2	9,1% (11/121)	9,1%
IIB1214 (<i>recB1080</i>) p1	5,6% (14/250)	2,4%

Za svaku novougrađenu razmaknicu odredio sam sekvencu, porijeklo (kromosom ili plazmid) te motiv PAM (Tablica 20). Sve razmaknice u stanicama divljeg tipa porijeklom su s kromosoma, dok udio razmaknica s plazmida u mutantu *recD recA* iznosi 20 - 40 % (2 do 4 od 10; dvije razmaknice su porijeklom iz gena *araC* koji se nalazi i na kromosomu i na plazmidu), a u mutantu *recB1080* 27,3 % (3 od 11). U mutantu *recB1080* sam ukupno analizirao 11 razmaknica jer je kolonija 2 ugradila dvije nove razmaknice (Slika P1 u poglavlju Prilozi).

Što se tiče motiva PAM, u divljem tipu je 80 % kolonija (8 od 10) imalo pravilni i najčešći motiv PAM (AAG)¹⁴⁰, dok su preostale dvije kolonije imale nepravilni motiv PAM (CAG u koloniji 1 i CCA u koloniji 2). U mutantu *recD recA* je također 80 % (8 od 10) kolonija imalo pravilni motiv PAM (AAG), jedna kolonija je imala nepravilni motiv PAM (GCG u koloniji 5), a jedna umjereno učinkovit motiv PAM¹⁴⁰ (AAT u koloniji 9). U mutantu *recB1080* 91 % (10 od 11) kolonija je imalo pravilni motiv PAM (AAG), a jedna nepravilni (CGG u koloniji 3). Nepravilni motiv PAM može spriječiti interferenciju i autoimunost, što je važno ako je razmaknica porijeklom s kromosoma, ali ne ako je iz strane DNA.

Konačno, 27 od 31 razmaknice (87 %) je duljine 32 pb, a preostale četiri su duljine 33 pb. S obzirom da se u tri od četiri razmaknice duljine 33 pb nalazi insercija timina u odnosu na sekvencu protorazmaknice i da je ta insercija prisutna u repetitivnim dijelovima razmaknice, moguće je da se radi o artefaktu sekvenciranja. Prema podacima iz literature, 95 % razmaknica u *E. coli* je duljine 32 pb, a duljina razmaknice može varirati od 31 do 34 pb¹⁴¹, što je u skladu s mojim rezultatima.

Tablica 20. Mapiranje ugrađenih razmaknica iz živih stanica. Svjetloplavom bojom su istaknute pravilne sekvence PAM (engl. *protospacer adjacent motif*), tamnoplavom umjereno učinkovita sekvenca PAM nukleotidnog slijeda AAT, a crnom bojom su ispisane sekvence koje nisu pravilni/učinkoviti PAM-ovi. Crvenom bojom su označene insercije (nukleotidi prisutni u razmaknici u lokusu CRISPR, a odsutni u protorazmaknici). MCS = "multiple cloning site" u vektoru pBad-HisA.

Soj (genotip) i broj kolonije	PAM	Sekvenca razmaknice (5'-3')	Porijeklo razmaknice (K- kromosom, P- plazmid)
IIB1165 (wt)			
kolonija 1	CAG	TTGAACATCTGCCACTGGCTCACCCAACATTT	K (gen <i>xdhD</i>)
kolonija 2	CCA	CGATATTCGATGTAATCTTCGTCTGCGAAACT	K (gen <i>evgS</i>)
kolonija 3	AAG	TTTTACCAAGAGCTCAGCCTCAAGATAAAAT	K (gen <i>ypjB</i>)
kolonija 4	AAG	TGAAGGTCATCAGCCAGCCGTCGCGTTTTTTG	K (gen <i>rodZ</i>)
kolonija 5	AAG	CGTTATTTAGTACTCTCGGTAGCAACGGCAGC	K (gen <i>hiuH</i>)
kolonija 6	AAG	CCCAATGGCGGTATGTCCATCATGACCACAGGC	K (gen <i>abgA</i>) *
kolonija 7	AAG	CCTGCCGGGTTTAGCTGTTCTGTCAACCGCCC	K (geni <i>rhsA/B/C</i>)
kolonija 8	AAG	ATAAAACGTGGTGGGCGTATGGGCGCTGATA	K (gen <i>puuR</i>)
kolonija 9	AAG	TATGCCGGACGTCATATCCGGCATTTTTACAG	K (intergenska regija <i>rluB-btuR</i>)
kolonija 10	AAG	TACGTATGGCCGCCATTAATGGCAGCCATCGA	K (gen <i>atpF</i>)
IIB1245 (recD recA)			
kolonija 1	AAG	TCAGATGACCAGCTTTCGAGCCTTTACCCAGA	K (gen <i>glmU</i>)
kolonija 2	AAG	AAATAGGGCTTCCACCTGGGAAGCCCTTCTT	K (gen <i>pspH</i>)
kolonija 3	AAG	GTTATATTCTCAATCTCACCATTCGCGGTCAG	K/P (gen <i>araC</i>) **
kolonija 4	AAG	TCGATCAGGAATACGAAGGTATTGTTTCGTCAA	K (gen <i>phoU</i>)
kolonija 5	GCG	ACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCAGTAAC	K/P (gen <i>araC</i>) **
kolonija 6	AAG	CTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTT	P (regija MCS)
kolonija 7	AAG	AATGTGCCACTTAATACTAACGTAGCGCCAAT	K (gen <i>ubiB</i>)
kolonija 8	AAG	TATCGATAAAAACTTTATTGTTTTAAGGAGAT	K (intergenska regija <i>ydeO-safA</i>)
kolonija 9	AAT	TGATCTGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGAC	P (regija između <i>ori</i> i <i>araC</i>)
kolonija 10	AAG	TACATCATGTAATTCCCCTGTCTTCAGGTGGT	K (gen <i>mcrA</i>) *
IIB1214 (recB1080)			
kolonija 1	AAG	ATATTACTATACCTTTGATAAATTCATTACTAT	K (geni <i>ybcV</i> i <i>ydfO</i>)
kolonija 2	AAG	AAGGATTCTTCACCCAGTTAGCCACCGATGAG	K (gen <i>sufB</i>)
	AAG	GTTTTATTATCGCTCAGGATTATGGTCACCGC	K (gen <i>curA</i>)
kolonija 3	CGG	TGATTGGTGCCGGGATTATTCGCTATGATCAG	K (gen <i>bioP</i>)
kolonija 4	AAG	TGTGTTTATTTTTTCGGCATTAAATTTATTAA	K (intergenska regija <i>yfaZ-nudI</i>) *
kolonija 5	AAG	ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAA	P (gen <i>bla</i>)
kolonija 6	AAG	TAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTA	P (gen <i>bla</i>)
kolonija 7	AAG	TGTGTTTATTTTTTTCGGCATTAAATTTAA	K (intergenska regija <i>yfaZ-nudI</i>) *
kolonija 8	AAG	ATGTTGCCCGCCTGGCGGGGCTTCTACCTCA	K (gen <i>rbsR</i>)
kolonija 9	AAG	CTGCTCTATCAGGCAAACTTGCTCTGGATGA	P (gen <i>casI</i>) ***
kolonija 10	AAG	CAGGTGATGAGTTTGCATTCCAGTATCGTCTG	K (gen <i>opgD</i>)

* Razmaknice duljine 33 pb, sve ostale su duljine 32 pb.

** *Gen araC* je prisutan i na kromosomu i na plazmidu pEB628 (vektorska osnovica pBad-HisA).

*** Razmaknica koja odgovara genu *cas1* je s plazmida jer soj IIB1214 ima deleciju gena *cas1*.

Za kromosomske razmaknice sam još istražio hoće li doći do autoimunosti, tj. razgradnje kromosoma kad u stanicu ubacim ostale sastavnice sustava CRISPR-Cas potrebne za interferenciju. Izabrao sam četiri kolonije divljeg tipa IIB1165, od kojih jedna ima nepravilni PAM (kolonija 1), a preostale tri pravilni (kolonije 6, 7 i 8). Stanice sam transformirao plazmidima pEB549 (za ekspresiju proteinskog kompleksa Cascade), te pDM1 (za ekspresiju enzima Cas3) ili pRSF-1b (negativna kontrola za pDM1). Kako je iz literature poznato da je interferencija sustavom CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* temperaturno ovisna¹⁴², transformante sam zasadio na 30 °C i 37 °C. Usporedbom broja naraslih transformanata na selektivnim i neselektivnim podlogama mogao sam zaključiti ima li neka od razmaknica negativan učinak na preživljenje stanica (Tablica 21). Svi sojevi su otprilike jednako vijabilni, tj. na neselektivnim podlogama rastu do reda veličine 10⁹ stanica po mL uzorka. Broj stanica transformiranih praznim vektorom pRSF-1b je na selektivnim pločama za sve sojeve na obje temperature za red veličine manji (10⁸ stanica) što daje učinkovitost transformacije oko 10 %. Na 37°C, temperaturi pri kojoj CRISPR-Cas interferencija u *E. coli* nije aktivna, svi sojevi transformirani plazmidom pDM1 (pCas3) imaju oko 1-5 x 10⁷ transformanata što daje učinkovitost transformacije od 1 - 5 %. Red veličine manji broj transformanata u usporedbi s praznim vektorom je vjerojatno posljedica toga što je plazmid s genom *cas3* gotovo dvostruko veći od praznog vektora pa je potrebno više vremena da se replicira. Iznimka je soj MR14 koji pokazuje smanjenu učinkovitost transformacije (vidjeti poglavlje Rasprava za mogući uzrok). Na 30 °C, temperaturi pri kojoj je CRISPR-Cas interferencija u *E. coli* aktivna, samo u soju MR12 (koji nema pravilan motiv PAM) nije došlo do pada broja transformanata kad se u stanice ubaci pCas3. Naprotiv, u sojevima koji imaju pravilan motiv PAM (MR13, MR14 i MR15) došlo je do dodatnog pada broja transformanata za dva do tri reda veličine u odnosu na 37 °C. Ovi rezultati su u skladu s literaturom, tj. dokazuju važnost motiva PAM i temperaturnu ovisnost sustava CRISPR-Cas za interferenciju u *E. coli*, te pokazuju autoimuni potencijal sustava CRISPR-Cas.

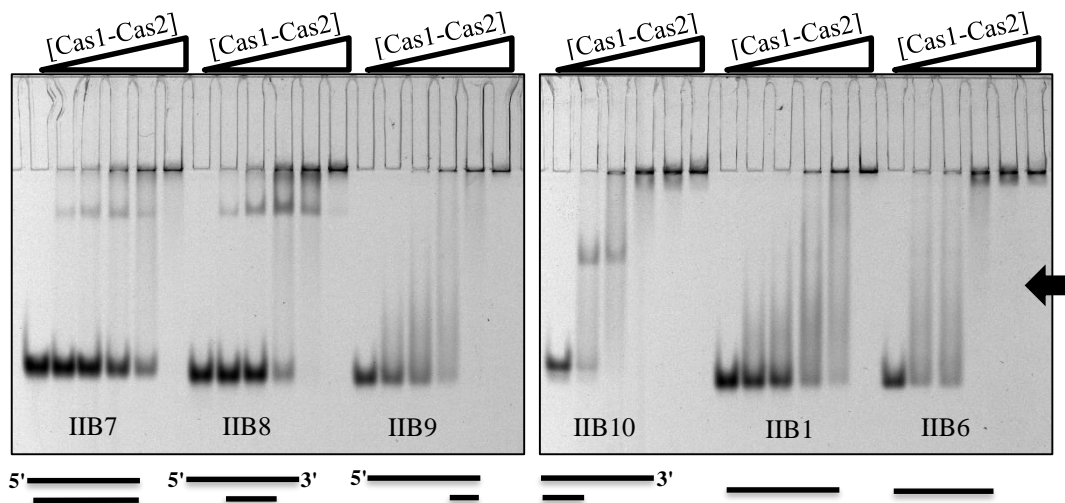
Tablica 21. Učinkovitost transformacije sojeva s ugrađenim kromosomskim razmaknicama sastavnicama sustava CRISPR-Cas neophodnim za interferenciju (Cascade, Cas3). Sojevi MR12-15 su derivati izvedeni iz kolonija soja IIB1165 (*wt*) s novougrađenim razmaknicama u lokusu CRISPR (gen koji je izvoriste razmaknice je naveden u zagradama) i naznačenim pripadajućim motivima PAM: pravilni (AAG; svijetloplava boja) i nepravilni (CAG; crna boja). CFU/mL = broj živih stanica po mL uzorka; LB+C+K+A+I = hranjiva podloga LB s dodatkom antibiotika kloramfenikola (C) i kanamicina (K) za selekciju transformanata, te induktora arabinoze (A) za ekspresiju T7 polimeraze s kromosoma i IPTG-a (I) za ekspresiju enzima Cascade i Cas3 s promotora *T7lac* na plazmidima. Rezultati su srednja vrijednost tri replike.

Soj (razmaknica) motiv PAM	Cascade	Cas3	30°C		37°C	
			CFU/mL (st. dev.)	CFU/mL (st. dev.)	CFU/mL (st. dev.)	CFU/mL (st. dev.)
MR12 (<i>xdhD</i>) PAM: CAG	+	-	1,18 x 10⁸ (3,90 x 10 ⁷)	8,78 x 10⁸ (1,25 x 10 ⁸)	1,16 x 10⁸ (5,46 x 10 ⁷)	1,03 x 10⁹ (1,53 x 10 ⁸)
	+	+	4,09 x 10⁷ (5,65 x 10 ⁶)	1,08 x 10⁹ (1,81 x 10 ⁸)	3,54 x 10⁷ (8,91 x 10 ⁶)	1,42 x 10⁹ (3,78 x 10 ⁸)
MR13 (<i>abgA</i>) PAM: AAG	+	-	1,25 x 10⁸ (2,81 x 10 ⁷)	1,01 x 10⁹ (1,24 x 10 ⁸)	1,31 x 10⁸ (3,59 x 10 ⁷)	1,12 x 10⁹ (1,22 x 10 ⁸)
	+	+	1,01 x 10⁴ (3,78 x 10 ³)	1,23 x 10⁹ (4,67 x 10 ⁸)	1,90 x 10⁷ (1,15 x 10 ⁷)	1,31 x 10⁹ (3,76 x 10 ⁸)
MR14 (<i>rhsA/B/C</i>) PAM: AAG	+	-	1,13 x 10⁸ (5,74 x 10 ⁷)	8,58 x 10⁸ (4,02 x 10 ⁸)	1,03 x 10⁸ (4,92 x 10 ⁷)	9,04 x 10⁸ (4,10 x 10 ⁸)
	+	+	6,50 x 10³ (2,35 x 10 ³)	1,19 x 10⁹ (4,15 x 10 ⁸)	3,33 x 10⁵ (2,32 x 10 ⁵)	1,15 x 10⁹ (3,08 x 10 ⁸)
MR15 (<i>puuR</i>) PAM: AAG	+	-	1,69 x 10⁸ (8,05 x 10 ⁷)	8,88 x 10⁸ (2,29 x 10 ⁸)	1,58 x 10⁸ (7,77 x 10 ⁷)	9,63 x 10⁸ (3,97 x 10 ⁸)
	+	+	3,71 x 10⁴ (3,39 x 10 ⁴)	1,13 x 10⁹ (3,58 x 10 ⁸)	2,51 x 10⁷ (9,87 x 10 ⁶)	1,19 x 10⁹ (1,18 x 10 ⁸)
			LB+C+K+A+I	LB	LB+C+K+A+I	LB

4.7. Vežanje proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za oligonukleotidne supstrate molekula DNA *in vitro*

S obzirom na dobivene rezultate *in vivo* koji su ukazivali da dvolančana DNA s 5'- i 3'-stršćim krajevima potiče naivnu adaptaciju, odlučio sam istražiti na koji način će se proteinski kompleks Cas1-Cas2 vezati i procesirati molekule DNA različitih struktura (jednolančane i dvolančane sa različitim krajevima) što bi dodatno objasnilo moguće događaje prilikom "hvatanja" fragmenata DNA za ugradnju u lokus CRISPR. Prvo sam provjerio

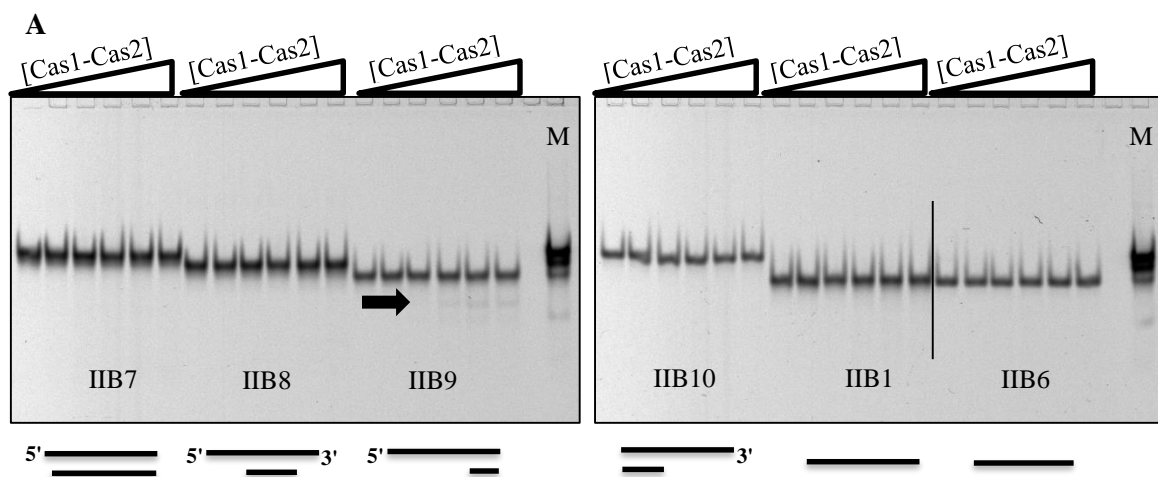
vezanje kompleksa Cas1-Cas2 na supstrate DNA metodom EMSA, pri kojoj se vezanje proteina za označenu molekulu DNA vidi u obliku pomaka molekule DNA u gelu, tj. njene sporije migracije prilikom elektroforeze. Koristio sam dvolanačnu DNA od 45 pb s kratkim 5'-stršećim krajem od 5 nt (supstrat IIB7), te dvolanačnu DNA od 10 pb s dugačkim 5'- i 3'-stršećim krajevima od 40 nt (supstrati IIB9 i IIB10), jednolančanu DNA sa i bez motiva PAM (supstrati IIB1 i IIB6) te dvolanačnu DNA s 3'- i 5'-stršećim krajevima (supstrat IIB8). Proteinski kompleks Cas1-Cas2 stvara agregate koji zaostaju u jažicama pri većim koncentracijama kompleksa (Slika 21). Ipak, može se uočiti da nastaju i stabilni kompleksi protein-DNA te da se Cas1-Cas2 najbolje veže na kratke dvolanačane molekule DNA dugačkog 5'-stršećeg kraja (supstrat IIB9) i 3'-stršećeg kraja (supstrat IIB10), te jednolančane molekule DNA s motivom PAM (supstrat IIB1) i bez (supstrat IIB6), što se vidi po brzem gubitku nevezane DNA s dna gela u odnosu na preostala dva supstrata (IIB7 i IIB8).



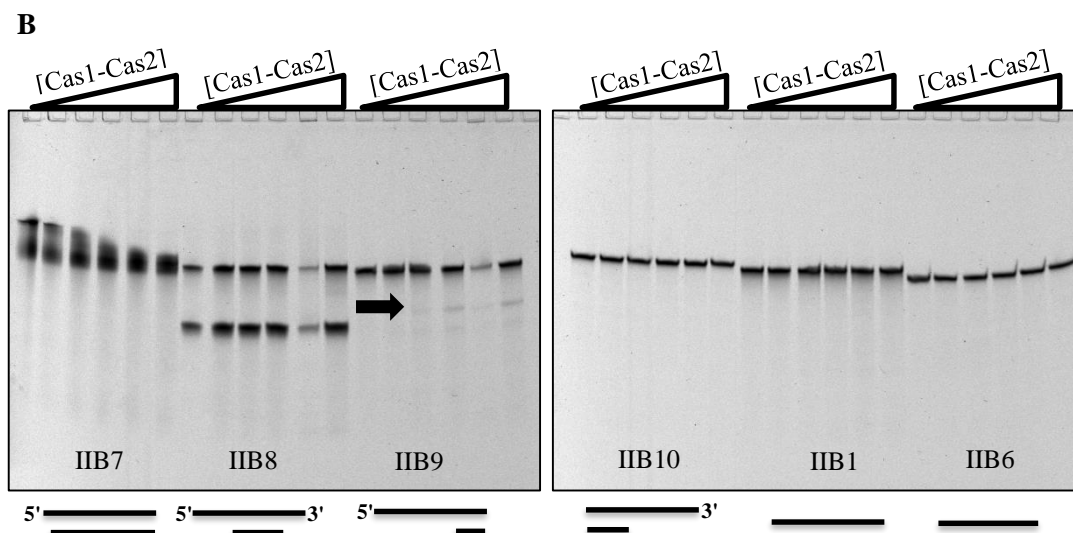
Slika 21. Vezanje proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 za fluorescentno obilježene oligonukleotidne supstrate molekula DNA različitih struktura u 1 x TBE-puferu. Trokuti iznad jažica gela pokazuju rastuću koncentraciju kompleksa Cas1-Cas2 (0, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM i 500 nM). Ispod oznake supstrata DNA su shematski prikazi struktura pojedinih supstrata s naznačenim stršećim krajevima. Supstrat IIB7 je model dsDNA duljine 45 pb s 5'-stršećim krajem od 5 nt, supstrat IIB8 je dsDNA duljine 27 pb s 5'-stršećim krajem duljine 13 nt i 3'-stršećim krajem duljine 10 nt. Supstrat IIB9 je kratka dsDNA duljine 10 pb s dugačkim 5'-stršećim krajem duljine 40 nt, a supstrat IIB 10 je kratka dsDNA duljine 15 pb s dugačkim 3'-stršećim krajem duljine 35 nt. Supstrati IIB1 i IIB6 su modeli jednolančanih DNA s motivom PAM (IIB1; 50 nt) i bez motiva PAM (IIB6; 45 nt). Crna strelica desno pokazuje na područje gela gdje je zbog vezanja proteina i DNA došlo do pomaka (razmaza) DNA u gelu.

4.8. Cijepanje oligonukleotidnih supstrata molekule DNA proteinskim kompleksom Cas1-Cas2

Nakon što sam ustanovio da proteinski kompleks Cas1-Cas2 veže supstrate molekula DNA različitih struktura, istražio sam može li i cijepati iste. To sam također istražio metodom EMSA, ali inkubirajući proteinski kompleks Cas1-Cas2 s molekulama DNA u puferu za nukleaznu analizu koji sadrži magnezijeve ione potrebne kompleksu za cijepanje¹⁰¹. Nukleaznu aktivnost sam provjerio u nativnim i u denaturirajućim uvjetima u kojima se uklanjanju sekundarne strukture molekula DNA koje potencijalno mogu nastati, što olakšava razdvajanje i identifikaciju fragmenata nastalih cijepanjem. U oba ispitivana uvjeta uočio sam slabo vidljive dodatne fragmente samo na supstratu dvolančane molekule DNA s dugim 5'-stršećim krajem (supstrat IIB9) što upućuje na mogućnost da ih je kompleks Cas1-Cas2 pocijepao (Slika 22). U denaturirajućim uvjetima (Slika 22 B) se u odnosu na native (Slika 22 A) kod supstrata IIB8 pojavio par vrpca jednakog intenziteta u svakoj jažici što je vjerojatno posljedica razdvajanja dvaju lanaca različitih duljina koji čine supstrat IIB8.

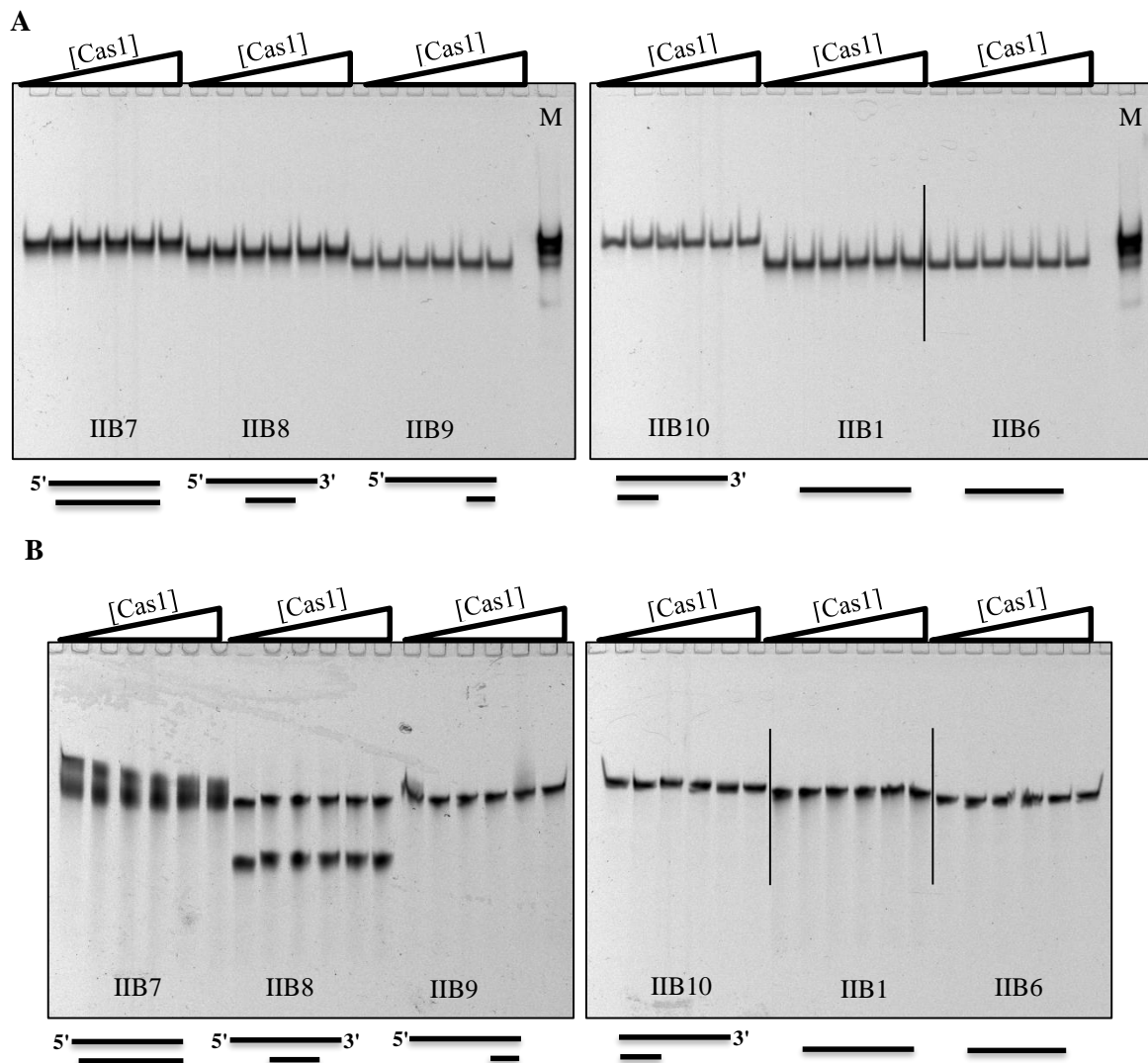


Slika 22. A. Cijepanje fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih supstrata molekula DNA različitih struktura od strane proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u nativnim uvjetima. **B.** Ista analiza, ali u denaturirajućim uvjetima. Na obje slike trokuti iznad jažica gela pokazuju rastuću koncentraciju kompleksa Cas1-Cas2 (0, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM i 500 nM). Ispod oznake supstrata DNA su shematski prikazi struktura pojedinih supstrata s naznačenim stršećim krajevima. Supstrat IIB7 je model dsDNA duljine 45 pb s 5'-stršećim krajem od 5 nt, supstrat IIB8 je dsDNA duljine 27 pb s 5'-stršećim krajem duljine 13 nt i 3'-stršećim krajem duljine 10 nt. Supstrat IIB9 je kratka dsDNA duljine 10 pb s dugačkim 5'-stršećim krajem duljine 40 nt, a supstrat IIB 10 je kratka dsDNA duljine 15 pb s dugačkim 3'-stršećim krajem duljine 35 nt. Supstrati IIB1 i IIB6 su modeli jednolančanih DNA s motivom PAM (IIB1; 50 nt) i bez motiva PAM (IIB6; 45 nt). Crna strelica pokazuje na pojavu dodatnih vrpca DNA (produkata cijepanja) u gelu. M = marker (mješavina svih susprata DNA).



Slika 22 - nastavak

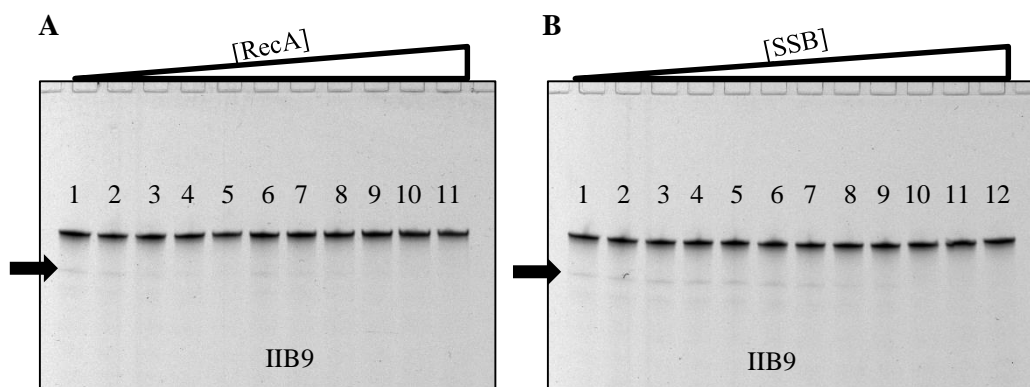
Da bih dodatno potvrdio rezultate cijepanja DNA kompleksom Cas1-Cas2, umjesto kompleksa Cas1-Cas2 inkubirao sam samo protein Cas1, bez proteina Cas2, s istim supstratima DNA u nativnim i denaturirajućim uvjetima. Iz literature je bilo poznato da mutacije u aktivnom mjestu Cas1 rezultiraju gubitkom adaptacije, dok mutacije u aktivnom mjestu Cas2 ne rezultiraju gubitkom adaptacije¹³. Analizom sam utvrdio da protein Cas1 samostalno ne cijepa niti jedan od ispitivanih supstrata DNA, niti susprtat IIB9 jer se više ne uočavaju dodatni fragmenti na gelu niti u nativnim niti u denaturirajućim uvjetima (Slika 23). Mutanta samo u protinu Cas1, koji bi bio inaktiviran u nukleaznoj domeni i inkubiran zajedno s Cas2 kao još jedna kontrola, nismo mogli napraviti jer se protein nije mogao pročistiti.



Slika 23. A. Cijepanje fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih supstrata molekula DNA različitih struktura od strane proteina Cas1 u nativnim uvjetima. **B.** Ista analiza, ali u denaturirajućim uvjetima. Na obje slike trokuti iznad jažica gela pokazuju rastuću koncentraciju proteina Cas1 (0, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM i 500 nM). Ispod oznake supstrata DNA su shematski prikazi struktura pojedinih supstrata s naznačenim stršecim krajevima. Supstrat IIB7 je model dsDNA duljine 45 pb s 5'-stršecim krajem od 5 nt, supstrat IIB8 je dsDNA duljine 27 pb s 5'-stršecim krajem duljine 13 nt i 3'-stršecim krajem duljine 10 nt. Supstrat IIB9 je kratka dsDNA duljine 10 pb s dugačkim 5'-stršecim krajem duljine 40 nt, a supstrat IIB10 je kratka dsDNA duljine 15 pb s dugačkim 3'-stršecim krajem duljine 35 nt. Supstrati IIB1 i IIB6 su modeli jednolančanih DNA s motivom PAM (IIB1; 50 nt) i bez motiva PAM (IIB6; 45 nt). M = marker (mješavina svih susprata DNA).

4.9. Nukleazna aktivnost proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u prisustvu proteina RecA ili SSB

Kako sam u rezultatima *in vivo* pokazao da se uklanjanjem gena *recA* u mutantu *recD* ponovo uspostavila naivna adaptacija, istražio sam hoće li prisustvo proteina RecA ili SSB smetati vezanju kompleksa Cas1-Cas2 na supstrat DNA i procesiranju (cijepanju). Za ovaj pokus sam odabrao samo supstrat IIB9 (kratka dvolančana DNA s dugim 5'-stršećim krajem) koji je pokazao najzanimljiviji rezultat u prethodnim pokusima. Uočio sam da se fragmenti DNA nastali kao produkt cijepanja od strane proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 s povećanjem koncentracije proteina RecA i SSB gube (Slika 24). Čini se da protein SSB manje ometa nukleaznu aktivnost kompleksa Cas1-Cas2 nego protein RecA, jer ga je potrebno dodati u većoj koncentraciji da bi se izgubili dodatni fragmenti supstrata IIB9. U oba slučaja je deveta jažica gela (gledajući s lijeva na desno) prva u kojoj se fragmenti nastali cijepanjem ne uočavaju, što odgovara koncentraciji proteina RecA od 300 nM, odnosno koncentraciji proteina SSB od 3 μ M. Rezultati nisu sasvim pouzdani, naročito u slučaju inkubacije s proteinom RecA gdje pojava pocijepanih fragmenata supstrata IIB9 nije u skladu s koncentracijom proteina RecA. Ovaj pokus sam napravio samo jednom, dok sam gostovao u laboratoriju dr. Eda Bolta, i nisam imao vremena napraviti dodatne replike da rezultat bude pouzdaniji.



Slika 24. Cijepanje fluorescentno obilježenog oligonukleotidnog supstrata molekule DNA s dugačkim 5'-krajem (IIB9) od strane proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. **A.** Reakcija u prisustvu proteina RecA. **B.** Reakcija u prisustvu proteina SSB. Na obje slike trokuti iznad jažica gela pokazuju rastuću koncentraciju proteina RecA (0, 1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 550 nM), tj. SSB (0, 10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M). Crna strelica pokazuje na gubitak dodatnih vrpca DNA (produkata cijepanja) u gelu s porastom koncentracije proteina RecA, tj. SSB. Oba gela su napravljena u denaturirajućim uvjetima.

5. RASPRAVA

Za uspješnu obranu bakterija sustavom CRISPR-Cas protiv strane, invadirajuće DNA, neophodno je napraviti fragmente te iste strane molekule DNA koji će se ugraditi u obliku razmaknice u lokus CRISPR. U bakteriji *E. coli*, razmaknica se u lokus CRISPR može ugraditi na dva načina: naivnom i pripremljenom adaptacijom⁸⁻¹⁰. Za naivnu adaptaciju, koja je tema ove doktorske disertacije, od gena *cas* neophodni su jedino geni *cas1* i *cas2* koji čine proteinski kompleks Cas1-Cas2. Kompleks Cas1-Cas2 "hvata" fragmente strane DNA i poput integreze ih ugrađuje u lokus CRISPR^{14,56,92}, no manje je poznato kako nastaju fragmenti koje kompleks "hvata" i ugrađuje kao nove razmaknice. Levy i suradnici¹⁵ su proveli opsežno istraživanje i predložili model u kojem je nukleazna aktivnost enzima RecBCD važna u pripremi fragmenata DNA jer je naivna adaptacija smanjena u mutantima *recB*, *recC* i *recD* u kojima enzim RecBCD nema nukleaznu aktivnost. Pokazali su da je za naivnu adaptaciju potrebna replikacija DNA, da većina razmaknica potječe iz područja genoma gdje češće nastaju lomovi DNA (izvorište replikacije, terminus, lokus CRISPR ili ribosomske DNA) i da postoji asimetrija ugradnje razmaknica u odnosu na sekvencu *chi* koja modulira aktivnost enzima RecBCD. Na temelju ovih opažanja su predložili da prilikom zaustavljanja replikacije može doći do kolapsa replikacijskih rašlji i nastanka dvolančanog loma. Popravkom kolabiranih replikacijskih rašlji enzim RecBCD razgrađuje stranu ili vlastitu DNA čime nastaju manji jednolančani fragmenti DNA koji se spajaju u dvolančane spontano, djelovanjem nepoznatih faktora domaćina ili aktivnošću kompleksa Cas1-Cas2. Dvolančane fragmente potom kompleks Cas1-Cas2 dalje procesira i ugrađuje u lokus CRISPR. Za enzim RecBCD su još pokazali da pomaže u razlikovanju strane od vlastite molekule DNA na temelju prepoznavanja oktamernih sekvenci *chi* koje su učestalije na kromosomu *E. coli* nego u stranoj DNA¹⁷. Ovaj model mi je poslužio kao polazišna točka u doktorskoj disertaciji kroz koju sam detaljnije istražio utjecaj enzima RecBCD te posljedično ulogu homologne rekombinacije, proteina RecA i jednolančanih DNA-egzonukleaza na naivnu adaptaciju, uključujući i mogućnost raspoznavanja strane od vlastite DNA. Moja istraživanja propitaju predloženi model i daju nove spoznaje o ovom zanimljivom procesu.

Za razliku od rezultata Levya i suradnika koji su pokazali smanjenu adaptaciju u mutantima *recB*, *recC* i *recD*, ja u mutantima *recB268* i *recD1903* (dalje u tekstu *recB* i *recD*) nisam uočio ugradnju novih razmaknica (Slika11). Razlog bi mogao biti u načinu detekcije ugradnje razmaknica gdje sam ja mjerio intenzitet nove vrpce u gelu dok su Levy i suradnici koristili tehnologiju visokoprotočnog sekvenciranja DNA izolirane iz gela što je osjetljivija

metoda. Zanimljivo, naivna adaptacija se vratila na razinu sličnu divljem tipu kad sam inaktivirao gen *recA* istovremeno s genom *recD*, odnosno u dvostrukom mutantu *recD recA* (Slika 10 B i Slika 11 B). Mutacijom u genu *recD* sintetizira se enzim RecBC koji je helikaza koja konstitutivno nanosi protein RecA, a nema nukleaznu aktivnost^{17,100}. Kako se taj efekt nije dogodio u dvostrukom mutantu *recB recA* (Slika 11 A), gdje se mutacijom *recB* posve inaktivira enzim RecBCD, zaključio sam da za naivnu adaptaciju nije potrebna nukleazna, već je dovoljna samo helikazna aktivnost enzima RecBCD. Također sam zaključio da homologna rekombinacija, tj. protein RecA vezan na 3'-jednolančanu DNA (rekombinogeni filament), inhibira adaptaciju. Inaktivacija samo gena *recA* (Slika 11) nije utjecala na adaptaciju što je u skladu s prethodnim istraživanjima⁹ jer je u tim stanicama enzim RecBCD aktivan i ne dolazi do konstitutivnog nanošenja proteina RecA na molekulu DNA. Dakle soj *recD recA* se može smatrati kao „početni soj“ u daljnjoj genetičkoj analizi efikasnosti naivne adaptacije u uvjetima kada nema nukleazne aktivnosti enzima RecBCD i homologne rekombinacije. Ulogu proteina RecA u ometanju kompleksa Cas1-Cas2 sam pokušao dokazati i pokusima *in vitro*, inkubirajući pročišćeni kompleks Cas1-Cas2 s rastućom koncentracijom proteina RecA (ili proteina SSB, za usporedbu). Nažalost, pokus sam imao priliku napraviti samo jednom, ali sam uočio da je porast koncentracije proteina RecA ometao nukleaznu aktivnost kompleksa Cas1-Cas2 pri 10 x manjim koncentracijama nego protein SSB (Slika 24). Konačno, ulogu nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj adaptaciji sam provjerio i u točkastom mutantu *recB1080* koji ima mutaciju u nukleaznom centru. Enzim RecB^{D1080A}CD nema nukleaznu, ali ima snažnu helikaznu aktivnost i ne može samostalno nanositi protein RecA^{129,135}. U tom mutantu sam očekivao rezultat sličan mutantu *recD recA* što se djelomice dogodilo, ali samo u prvoj pasaži. Daljnjim pasažiranjem se nije uočio porast u količini ugrađenih razmaknica već je došlo do pada (Slika 12). Razlog bi mogla biti nestabilnost plazmida s kojeg sam eksprimirao kompleks Cas1-Cas2 koji se jako gubio u ovom soju (Tablica 14), a povezana je s mutacijom u genima *recB* i *recD* za koje je poznato da uzrokuju nastanak multimera koji se neravnomjerno nasljeđuju u potomstvu i s vremenom izgube¹³⁶. Također, moguće je da se zbog uzimanja razmaknica s plazmida, plazmid dodatno destabilizirao u nekim sojevima. Međutim, mutant *recD*, u kojem nema ugradnje razmaknica, je kroz sve tri pasaže imao otprilike red veličine više stanica s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) nego dvostruki mutant *recD recA* u kojem dolazi do ugradnje razmaknica (Tablica 14). Dodatno, u mutantu *recA* je kroz sve tri pasaže bilo otprilike red veličine manje stanica s plazmidom pEB628 nego u divljem tipu (Tablica P2 u poglavlju Prilozi), a učestalost

ugradnje razmaknica je bila otprilike jednaka. Zbog toga, izostanak ugradnje razmaknica u mutantu *recD* ne može biti isključivo posljedica gubitka plazmida.

S obzirom da u nastanku rekombinogenog filameta u mutantu *recD* pomažu jednolančane nukleaze, provjerio sam utjecaj i drugih egzonukleaza prisutnih u *E. coli* na naivnu adaptaciju. Istražio sam utjecaj jednolančanih DNA-egzonukleaza 3'→5'- i 5'→3'- polarnosti, koje su inače važne za stabilnost genoma i sudjeluju u popravku DNA direktno ili pomažu u procesiranju krajeva DNA za vezanje enzima RecBCD^{106,107}. Inaktivacijom samo 3'→5'-jednolančanih DNA-egzonukleaza *sbcB*, *sbcD* i *exoXI* uočio sam malo učinkovitiju ugradnju razmaknica u odnosu na divlji tip (Slika 13 B), dok su dvostruki mutanti *recA sbcB/sbcD/exoXI* pokazivali učinkovitiju ugradnju razmaknica u odnosu na pojedinačni mutant *recA* (Slika 15 B). Kako je ugradnja u dvostrukim mutantima *recA sbcB/sbcD/exoXI* bila učinkovitija i od pojedinačnih mutanata *sbcB*, *sbcD* i *exoXI* (Tablica P1 u poglavlju Prilozi), opet sam uočio pozitivan učinak uklanjanja proteina RecA na naivnu adaptaciju. Kad sam te iste mutacije za 3'-jednolančane DNA-egzonukleaze (*sbcB*, *sbcD* i *exoXI*) uveo u mutantu *recD recA*, u prvoj pasaži sam dobio usporedive razine naivne adaptacije, no u drugoj i trećoj pasaži je razina naivne adaptacije značajno opala naspram dvostrukog mutantu *recD recA* (Slika 13 C). Razlog slabe učinkovitosti u adaptaciji trostrukih mutanata je vrlo vjerojatno snažan gubitak plazmida jer je transformanata trostrukih mutanata već u prvoj pasaži bilo za gotovo dva reda veličine manje nego dvostrukog mutantu *recD recA*, a u drugoj i trećoj pasaži je broj transformanata dodatno opao (Tablica 15). U kombinacijama *recD sbcB/sbcD/exoXI* nije došlo do ugradnje razmaknica vjerojatno zbog inhibitornog učinka proteina RecA u mutantu *recD* (Slika 13 A).

Uvođenjem mutacije u gen *xseA* koji kodira podjedinicu XseA bipolarne (3'→5' i 5'→3') jednolančane egzonukleaze XseAB dobio sam slične rezultate. Pojedinačni mutant *xseA* imao je povećanu razinu naivne adaptacije u drugoj i trećoj pasaži u odnosu na divlji tip (Slika 13 B), a dvostruki mutant *recA xseA* u drugoj i trećoj pasaži u odnosu na pojedinačnog mutantu *recA* (Slika 15 B). Uvođenje mutacije *xseA* nije imalo učinak na stabilnost plazmida u ova dva soja (divlji tip i mutant *recA*). Zanimljivo, za razliku od trostrukih mutanata *recD recA sbcB/sbcD/exoXI* koji su u drugoj i trećoj pasaži imali znatno nižu razinu adaptacije i veći gubitak plazmida u odnosu na dvostrukog mutantu *recD recA*, trostruki mutant *recD recA xseA* se i u pogledu učinkovitosti ugradnje razmaknica i u pogledu stabilnosti plazmida ponašao jednako kao dvostruki mutant *recD recA* (Slika 13 C i Tablica 15). Vjerojatni razlog tomu je bipolarna aktivnost enzima XseAB.

Konačno, na isti način sam istražio utjecaj jednolančane DNA-egzonukleaze 5'→3'-polarnosti, RecJ. Uvođenjem mutacije *recJ* u divlji tip, dobio sam razinu naivne adaptacije otprilike jednaku kao u divljem tipu u prve dvije pasaže, te dvostruko veću u trećoj pasaži (Slika 14 B). Dvostruki mutant *recA recJ* imao je jednaku razinu naivne adaptacije kao pojedinačni mutant *recA* u prvoj, te nešto učinkovitiju ugradnju razmaknica u drugoj i trećoj pasaži (Slika 15 B). Trostruki mutant *recD recA recJ* je u prvoj pasaži imao razinu naivne adaptacije sličnu kao dvostruki mutant *recD recA* (Slika 14 B), koja se jako smanjila u drugoj i trećoj pasaži, vjerojatno zbog izrazito jakog gubitka plazmida u ovom mutantu (Tablica 15). Zanimljivo, kad sam iz mutanta *recD recA* uklonio i RecJ i XseAB (dvije jednolančane DNA-egzonukleaze koje imaju 5'→3'-aktivnost), došlo je do izrazitog povećanja učestalosti ugradnje razmaknica kroz sve tri pasaže i prestanka gubitka plazmida (Slika 14 B i Tablica 15). Stoga sam zaključio da u soju u kojem nema proteina RecA, a enzim RecBC(D) funkcionira samo kao helikaza, nastajanje 5'-stršćih krajeva molekule DNA pogoduje naivnoj adaptaciji u *E. coli*. S druge strane, uklanjanje dvije egzonukleaze (RecJ i XseA) u stanicama divljeg tipa nije pokazalo značajni učinak na naivnu adaptaciju (Tablica P1 u poglavlju Prilozi).

Na isti način kao za jednolančane DNA-egzonukleaze istražio sam i utjecaj dva gena nepoznate uloge, *yajD* i *ycfH*. Suradnik dr. Tom Killelea je prilikom afinitetnog pročišćavanja proteina metodom "pull-down" otkrio da proteinski produkti ovih gena stvaraju interakciju s kompleksom Cas1-Cas2, a kako bioinformatičke analize predviđaju da je protein YcfH DNaza¹³⁷, a YayD nukleaza tipa HNH¹³⁸ poput proteina Cas9 iz klase 2 sustava CRISPR-Cas¹³⁹, postojala je mogućnost da utječu na naivnu adaptaciju. Međutim, iz dobivenih rezultata mogu zaključiti da ove nukleaze nisu potrebne za naivnu adaptaciju, niti utječu na njenu učinkovitost. Naime, pojedinačni mutanti *yajD* i *ycfH* se ponašaju isto kao divlji tip (razmaknice se ugrađuju u lokus CRISPR, a učinkovitost raste sa svakom sljedećom pasažom, dok je plazmid za ekspresiju gena *cas1* i *cas2* stabilan kroz sve pasaže; Slika 16 B i Tablica P2 u poglavlju Prilozi). Jednako tako, dvostruki mutanti *yajD recA* i *ycfH recA* su pokazali slične rezultate (Slika 17 B) kao jednostruki mutant *recA*, a dvostruki mutanti *yajD recD* i *ycfH recD* iste kao jednostruki mutant *recD* (izostanak ugradnje razmaknica; Slika 17 A). Konačno, trostruki mutanti *yajD recD recA* i *ycfH recD recA* su kao i dvostruki mutant *recD recA* imali najučinkovitiju ugradnju razmaknica u drugoj pasaži (Slika 17 B). Uvođenje dodatnih mutacija u gene *yajD* i *ycfH* nije imalo dodatni učinak na stabilnost plazmida pEB628 u niti jednom od ovih mutanata (*recA*, *recD* i *recA recD*; Tablica 17).

S obzirom da je učinkovitost naivne adaptacije ovisila o stabilnosti plazmida pEB628 s kojeg sam eksprimirao gene *cas1* i *cas2*, pokušao sam istražiti naivnu adaptaciju u soju KD27 gdje su kromosomski geni *cas1* i *cas2* pod inducibilnim promotorom. Međutim, u bakteriji *E. coli* geni *cas1* i *cas2* su pod zajedničkim operonom s genima *casA*, *casB*, *casC*, *casD* i *casE* koji čine proteinski kompleks Cascade (Slika 4) i zato se prepisuju u manjoj količini nego uzvodni geni⁶⁶. Stoga je bilo nepoznato hoće li biti dovoljno proteina Cas1-Cas2 da stanice transformirane praznim vektorom, plazmidom pBad-HisA, ugrade razmaknice u lokus CRISPR. Do ugradnje razmaknica ipak nije došlo, osim kad sam stanice transformirao plazmidom pEB628 (Slika 18). Razlog za izostanak ugradnje razmaknica u lokus CRISPR nije gubitak plazmida, tj. strane DNA kao potencijalnog izvora novih razmaknica, jer je plazmid pBad-HisA bio prisutan u sve tri pasaže (Tablica 18). Vjerojatni uzrok izostanka naivne adaptacije je nedovoljna ekspresija gena *cas1* i *cas2* s inducibilnog promotora na kromosomu, te samo jedna kopija ovih gena po genomu. Moguće je i da naš sustav detekcije razmaknica nije dovoljno osjetljiv. Možda je u prirodnim uvjetima dovoljna mala količina proteina Cas1-Cas2 za "hvatanje" i ugradnju razmaknica. U bakteriji *E. coli* nisu poznati uvjeti kad se sustav CRISPR-Cas spontano aktivira i ugrađuje razmaknice. Svi poznati eksperimentalni sojevi koji su se godinama koristili u istraživanjima nemaju nove razmaknice za razliku od npr. bakterije *Streptococcus thermophilus*¹⁴³. U literaturi postoje podaci da se u *E. coli* ispred gena *cas1* i *cas2* nalaze dva moguća σ^{32} -ovisna promotora što bi mogao biti način njihove neovisne indukcije¹⁴⁴. U svakom slučaju, bilo bi zanimljivo konstruirati soj u kojem je naivna adaptacija učinkovita bez potrebe uvođenja gena *cas1* i *cas2* na plazmidima jer bi se u tom slučaju različiti bakteriofagi i plazmidi (s više ili manje kopija u stanici) mogli koristiti kao model strane DNA. Jedan od načina bi mogao biti naivnu adaptaciju s genima *cas1* i *cas2* prisutnim na kromosomu pratiti u dvostrukom mutantu *hns stpA*. Naime, protein H-NS je globalni represor u bakteriji *E. coli*, među ostalim i represor sustava CRISPR-Cas^{6,65}. Protein StpA je također globalni represor i analog proteina H-NS, koji se ponaša kao rezervni (engl. *back-up*) represor u slučaju nedostatka proteina H-NS^{145,146}. U literaturi postoje podaci da je ekspresija gena *casA* u mutantu *hns* 50 x veća nego u divljem tipu, a u dvostrukom mutantu *hns stpA* čak 250 x veća nego u divljem tipu⁶⁹, stoga bi bilo zanimljivo istražiti može li doći do naivne adaptacije u ovom dvostrukom mutantu koji je također derivat *E. coli* soja BW25113 kao i sojevi u ovoj disertaciji. Drugi način je uvesti inducibilni promotor direktno ispred gena *cas1* i *cas2*.

Analiza porijekla novougrađenih razmaknica u lokusu CRISPR pokazala je da enzim RecBCD pomaže u razlikovanju strane od vlastite DNA, jer su mutanti u kojima su geni *recB*, *recC* i *recD* uklonjeni, 10 puta učestalije ugrađivali razmaknice s vlastitog kromosoma u odnosu na divlji tip¹⁵. Rezultati analize porijekla razmaknica u sklopu mog istraživanja (analizu je napravila dr. Savitskaya) u suprotnosti su s rezultatima Levya i suradnika. Naime, u sva tri analizirana soja (divlji tip, te mutanti *recB1080* i *recD recA*) većina razmaknica je bila porijeklom s kromosoma (Slika 19): najmanje u divljem tipu (oko 80 %), a najviše u mutantu *recD recA* (oko 95 %). Zanimljivo je da su se u istraživanjima Levya i suradnika analizirali pokusi kad nije inducirana ekspresija gena *cas1-cas2* s plazmida i ugradnja razmaknica je bila oko 15 x manja u odnosu na stanice s induciranim genima *cas*, no udio razmaknica s kromosoma iznosio je samo oko 2 % u neinduciranim stanicama naspram 23 % kod induciranih. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da količina proteina Cas1-Cas2 možda može utjecati na izbor razmaknica. U mojem istraživanju je ekspresija gena *cas1* i *cas2* bila stalno inducirana i bilo bi zanimljivo istražiti bi li udio kromosomskih razmaknica opao bez indukcije ekspresije gena *cas1* i *cas2*. Također, Levy i suradnici su prvo umnožili ugrađene razmaknice metodom PCR (zbog slabog signala) pa ih tek potom sekvencirali metodom HiSeq. Na taj način su možda dodatno povećali razliku između kromosomskih i plazmidnih razmaknica. Osim toga, ja sam u svom istraživanju koristio *E. coli* soj K-12 (BW25113), dok su Levy i suradnici koristili *E. coli* soj B (BL21-AI). Ova dva soja nisu izogena, a razlikuju se i u samom sustavu CRISPR-Cas s obzirom da *E. coli* soj B uopće nema gene *cas* na kromosomu⁷. Dominatna ugradnja novih razmaknica iz vlastitog kromosoma prilikom proučavanja naivne adaptacije uočena je i u arheji *Pyrococcus furiosus* u kojoj je čak 96 – 99 % novougrađenih razmaknica bilo kromosomskog porijekla¹⁴⁷, a u bakteriji *Streptococcus thermophilus* je udio kromosomskih razmaknica porastao sa 32 % na 96 % nakon uklanjanja nukleazne aktivnosti enzima Cas9 odgovornog za interferenciju¹⁴⁸. Ono što jest u skladu s rezultatima Levya i suradnika je to što su mutacije u genima *recB* i *recD* rezultirale povećanjem udjela kromosomskih razmaknica (Slika 19), te što je većina razmaknica bila porijeklom iz izvorišta replikacije (*ori*), lokusa CRISPR i regije terminusa (*ter*) replikacije (Slika 20), takozvanih "hotspot" mjesta u kojima češće dolazi do lomova u molekuli DNA. U mutantu *recB1080* sam također uočio izrazito dominantnu ugradnju razmaknica iz regije terminusa replikacije. Enzim RecBCD se smatra važnim za očuvanje terminusa i pravilnu segregaciju bakterijskog kromosoma prilikom replikacije^{149,150}, pa je moguće da u ovom mutantu dolazi do pojačanog nakupljanja aberantnih struktura u regiji terminusa koje pogoduju nastajanju prekursora (fragmenata) za naivnu adaptaciju.

S obzirom na veliku učestalost ugradnje razmaknica iz vlastitog kromosoma, odlučio sam istražiti ima li ugradnja razmaknica u lokus CRISPR utjecaj na preživljenje pojedinačnih stanica. Uz divlji tip, analizirao sam mutante *recB1080* i *recD recA* u kojima sam uočio pad ugradnje razmaknica u trećoj pasaži što bi moglo ukazivati da se oštećenje DNA nije moglo popraviti prilikom uzimanja razmaknice i/ili tijekom ugradnje u lokus CRISPR. Iako je analiziran mali broj kolonija, učestalost ugrađenih razmaknica u pojedinačnim kolonijama je usporediva s rezultatima iz prekonoćnih kultura (Tablica 19). Kako su i u ovoj analizi razmaknice većinski bile porijeklom s kromosoma (Tablica 20), mogu zaključiti da proces ugradnje razmaknica nije imao štetan učinak na preživljenje stanica. Druga opasnost, autoimunost, se nije mogla dogoditi s obzirom da su ovi sojevi imali uklonjene gene koji kodiraju enzim Cas3 i proteinski kompleks Cascade koji su neophodni za CRISPR-Cas interferenciju. Sve kromosomske razmaknice iz pojedinačnih kolonija bile su porijeklom iz neesencijalnih gena ili iz intergenskih regija, a dodavanjem plazmida s genima za kompleks Cascade i enzim Cas3 došlo je do smanjenja efikasnosti transformacije, odnosno interferencije (Tablica 21). Drugim riječima, došlo je do autoimunosti, ali pod određenim uvjetima – nižoj temperaturi inkubacije (30 °C) i u prisustvu pravilnog motiva PAM (5'-AAG-3')¹⁴⁰. Sojevi koji uz protorazmaknicu imaju pravilan motiv PAM (MR13-15) puno su se slabije transformirali plazmidom s kojeg sam eksprimirao protein Cas3, ali samo na 30 °C. Isto se nije dogodilo u soju MR12 koji ima nepravilan motiv PAM (5'-CAG-3') pa se jednako dobro transformirao na obje temperature. Ovaj rezultat je potvrdio važnost motiva PAM^{31,32,140} i temperature za učinkovitu interferenciju u *E. coli*¹⁴². Posebno je zanimljiv rezultat u soju MR14 kod kojeg je manja učinkovitost transformacije ipak uočena i na 37 °C. Ovaj soj ima razmaknicu koja se ponaša kao tri razmaknice jer cilja tri gena (*rhsA*, *rhsB* i *rhsC*) koji kodiraju proteine s homolognim sekvencama na N-terminusu, a različitim C-terminusima^{151,152}. To sam zaključio jer sam mapiranjem razmaknice kao rezultat dobio sva tri gena, pa razmaknica očito potječe iz dijela sekvence koji im je identičan. S obzirom da na 37 °C vjerojatno nije moglo doći do CRISPR-Cas interferencije i cijepanja DNA, zbog enzima Cas3 koji postaje neaktivan na 37°C, razlog manjeg broja transformanata bi moglo biti ometanje replikacije kromosoma stvaranjem većeg broja R-omči. Kompleks Cascade s molekulom crRNA stvara R-omče na molekuli DNA koja odgovara protorazmaknici, a na nastalu R-omču se zatim veže i protein Cas3^{59,153}. Moguće je da istovremeno nastajanje većeg broja R-omči s vezanim velikim nukleoproteinskim kompleksima (Cascade i Cas3) ometa stanični replisom prilikom replikacije kromosoma što je moglo prouzročiti pad vijabilnosti, a time i broja transformanata. Iz literature je poznat sličan fenomen, da protein Cas3 neovisno o

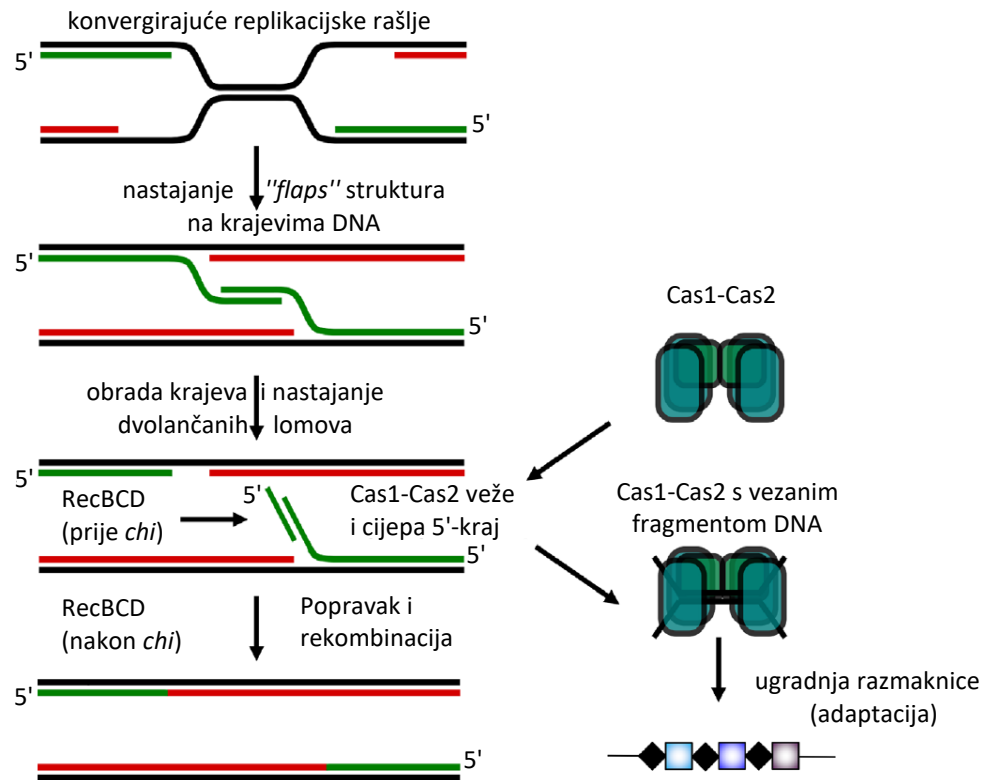
kompleksu Cascade povećava prinos plazmida tipa ColE1 i nastajanje multimera, tj. sporije migrirajućih oblika plazmida prilikom gel-elektroforeze^{154,155}. Ovo je zanimljivo jer kod plazmida tipa ColE1 prilikom početka replikacije također nastaje struktura R-omče¹⁵⁶. R-omča u kromosomu bi imala negativan učinak na replikaciju što je pokazano *in vitro*¹⁵⁷, a da bih to istražio *in vivo*, ponovio bih pokus s praznim vektorom (bez kompleksa Cascade). Na ovaj način bih iz stanica uklonio proteinski kompleks Cascade s kojim je udružena molekula crRNA i koji stvara R-omču. U drugom pokusu bih u stanice pod inducibilnim promotorom uklonirao gen *rnhA* koji kodira enzim RNazu HI koji uklanja R-omče¹⁵⁸. Indukcijom ekspresije enzima RNaze HI bi R-omče trebale biti uklonjene pa bih očekivao povećanje broja transformanata u soju MR14 na 37 °C. Naravno, postoji mogućnost da RNaza HI ne bi mogla pristupiti R-omči zbog kratke crRNA i velikog kompleksa Cascade pa je prvi pokus pouzdaniji. Mogućnost sustava CRISPR-Cas da uzrokuje oblik interferencije koji ne uključuje degradaciju ciljne DNA je zanimljiva u kontekstu regulacije ekspresije gena. U literaturi već postoje radovi koji opisuju korištenje sustava CRISPR-Cas *E. coli* za regulaciju ekspresije gena^{159,160}. Moguće da je u sojevima MR13 i MR15, koji također imaju pravilni PAM i kod kojih je na 30 °C došlo do pada broja transformanata, i na 37 °C došlo do interferencije u obliku ometanja transkripcije gena zbog nastanka R-omči, ali kako se radi o nesencijalnim genima, nije došlo do fenotipske promjene.

Zanimljiv potencijalni alat za istraživanje predstavljaju kolonije u koje se ugradila razmaknica iz plazmida pEB628 (Tablica 20). U koloniji 6 soja IIB1245 (*recD recA*) se ugradila razmaknica s pravilnim motivom PAM koja cilja regiju za kloniranje (engl. *multiple cloning site*) vektorske osnovice pBad-HisA, dok su se u kolonije 5 i 6 soja IIB1214 (*recB1080*) ugradile razmaknice s pravilnim motivom PAM koje ciljaju gen *bla* za otpornost na antibiotik ampicilin. Ovi lokusi CRISPR, odnosno razmaknice, mogli bi se koristiti kao alat za istraživanje interferencije na plazmide čiju okosnicu čini vektor pBad-HisA (razmaknica iz kolonije 6 soja IIB1245) ili istraživanje interferencije na bilo koji vektor koji sadrži gen za otpornost na ampicilin (razmaknice iz kolonija 5 i 6 soja IIB1214). Prvo bi trebalo optimizirati način prijenosa tih razmaknica ili lokusa CRISPR u druge sojeve što bi jako pomoglo genetičkim istraživanjima kad se recimo želi ukloniti plazmid koji nam više ne treba, a nema drugog načina (poput temperaturno-ovisne replikacije plazmida).

Rezultati *in vivo* istraživanja su pokazali da nastanak molekula DNA sa 3'- i 5'-stršećim krajevima pozitivno utječe na učinkovitost ugradnje razmaknica u lokus CRISPR, stoga sam odlučio istražiti vezanje kompleksa Cas1-Cas2 i procesiranje različitih supstrata

DNA *in vitro*. Od istraživanih supstrata, preliminarna analiza je pokazala da je kompleks Cas1-Cas2 najbolje vezao supstrate IIB9 (kratka dvolančana molekula DNA dugačkog 5'-stršećeg kraja), IIB10 (kratka dvolančana molekula DNA dugačkog 3'-stršećeg kraja), IIB1 i IIB6 (jednolančane molekule DNA sa i bez motiva PAM), dok je vezanje supstrata IIB7 (dvolančana molekula DNA kratkog 5'-stršećeg kraja) i IIB8 (kratka dvolančana DNA sa 5'- i 3'-stršećim krajem) bilo slabije (Slika 21). Ovi rezultati su u skladu s literaturom^{80,101,161}. Neočekivano, proteinski kompleks Cas1-Cas2 mogao je nukleolitički procesirati supstrat IIB9 (Slika 22), odnosno pocijepao je dugački 5'-stršeći kraj (40 nt). Cas1 samostalno nije pocijepao niti jedan supstrat (Slika 23) što je u skladu s rezultatima da je za adaptaciju neophodan kompleks Cas1-Cas2^{14,80}. Dodatne analize vezanja i cijepanja različitih supstrata je proveo dr. Killelea¹³³ i pokazao da je vezanje i cijepanje supstrata s dugačkim 5'-stršećim krajem najučinkovitije kad je dvolančana regija molekule DNA dugačka 14 pb. Također, poziciju na kojoj kompleks Cas1-Cas2 cijepa supstrat je mapirao na 1 nukleotid nizvodno od sekvence AAC prisutne u 5'-stršećem kraju. Sekvenca AAC je jedan od motiva PAM u *E. coli*¹⁴⁰, no zamjena ove sekvence sekvencom TTT (koja nije PAM) nije pokazala negativan učinak na cijepanje od strane proteinskog kompleksa Cas1-Cas2. Ovi rezultati pokazuju da je za cijepanje supstrata DNA od strane proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 važnija struktura molekule (prisustvo dvolančane regije s dugačkim 5'-stršećim krajem) nego sekvenca, tj. prisustvo motiva PAM.

Na temelju dobivenih *in vivo* i *in vitro* rezultata, zajedno s kolegama sam predložio model (Slika 25) kojim predlažemo jedan od načina na koji u terminusu kromosoma prilikom završetka replikacije može doći do nastajanja struktura koje bi bile supstrat za kompleks Cas1-Cas2. Prilikom konvergiranja replikacijskih rašlji i završnih faza replikacije lanaca molekule DNA, u terminusu nastaju dvolančani lomovi koje prepoznaje enzim RecBCD. Enzim svojom (helikaznom) aktivnošću prije nailaska na sekvencu *chi* stvara 5'-stršeće krajeve iz dvolančane molekule DNA čime stvara supstrat nalik supstratu IIB9, dvolančanu DNA s 5'-stršećim krajem, kojeg kompleks Cas1-Cas2 može pocijepati i stvoriti prekursora razmaknica. Nakon nailaska na sekvencu *chi*, aktivnost enzima RecBCD se mijenja u smjeru nastajanja 3'-stršećih krajeva s nanešenim proteinom RecA što pogoduje rekombinaciji i popravku DNA, a negativno utječe na adaptaciju jer se gubi supstrat kojeg kompleks Cas1-Cas2 može vezati i pocijepati.



Slika 25. Shema nastajanja dvolančanih lomova u terminusu kromosoma prilikom konvergiranja replikacijskih rašlji u završnim fazama replikacije. Nastale dvolančane lomove prepoznaje enzim RecBCD koji svojom aktivnošću stvara 5'-stršeće jednolančane krajeve prije nailaska na sekvencu *chi*. Nastali intermedijer (dvolančana DNA s 5'-stršećim krajem) je supstrat za vezanje i cijepanje kompleksom Cas1-Cas2. Nakon nailaska na sekvencu *chi*, enzim RecBCD stvara 3'-stršeće krajeve i potiče homolognu rekombinaciju i popravak DNA, a istovremeno se gubi supstrat kojeg adaptacijski kompleks Cas1-Cas2 može pocijepati što se negativno odražava na adaptaciju. Preuzeto i doručeno iz¹³³.

Pozitivan učinak 5'-stršećih krajeva na naivnu adaptaciju koje sam uočio u *in vivo* istraživanjima je neočekivan s obzirom da se u literaturi uglavnom naglašava važnost 3'-stršećih krajeva, prvenstveno jer se u konačnom prekursoru razmaknice vezanom u kompleksu s Cas1-Cas2 3'-stršeći krajevi nalaze u aktivnim mjestima podjedinica Cas1^{14,56,101,161}. Zanimljivo da je dvolančanu DNA sa 3'-stršećim krajem u mojim istraživanjima kompleks Cas1-Cas2 vezao, ali ne i cijepao. U nekim drugim sustavima tipa I, za obradu prekursora razmaknice u konačnu zrelu razmaknicu potreban je poseban protein, Cas4, koji skraćuje 3'-krajeve iz prekursora razmaknica^{84,88}. Što se tiče *E. coli*, nedavno *in vitro* istraživanje¹⁶² je pokazalo da 3'-krajeve prekursorske DNA cijepa egz nukleaza DnaQ (a

ne kompleks Cas1-Cas2) i tako pomaže nastanak konačne zrele razmaknice. S obzirom na ovo, moguće je da su 3'-jednolančane DNA-egzonukleaze koje sam koristio u svojim pokusima u kompeticiji s egzonukleazom DnaQ za vezanje na prekursore razmaknica, što bi objasnilo zašto je njihovo uklanjanje iz stanica djelovalo pozitivno na adaptaciju. U istom istraživanju je pokazano da kompleks Cas1-Cas2 može vezati i spojiti komplementarne jednolančane molekule DNA nastale nukleaznom aktivnošću enzima RecBCD u dvolančane, te da kompleks Cas1-Cas2 štiti 3'-kraj u kojem se nalazi mjesto PAM čime osigurava pravilnu orijentaciju ugrađene razmaknice. I u mojim *in vitro* istraživanjima je kompleks Cas1-Cas2 vezao jednolančane molekule DNA. Zanimljivo da je dr. Killelea u supstratu IIB9 s 5'-stršećim krajem mapirao dva mjesta cijepanja blizu granice s regijom dvolančane DNA, tj. cijepanjem su nastale jednolančane DNA od 30 i 36 nukleotida¹³³. Ovaj jednolančani produkt bi možda bio i veći da maksimalna veličina sintetiziranih supstrata DNA nije bila ograničena na 50 nt. Konačna razmaknica u *E. coli* je duljine 31-34 pb¹⁴¹, stoga je moguće da cijepanjem dvolančanih DNA s dugačkim 5'-stršećim krajevima kompleks Cas1-Cas2 stvara jednolančane DNA koje može spojiti u dvolančane prekursore razmaknica koje dalje dorađuju druge nukleaze u stanici, poput DnaQ. Osim primjera prikazanog u predloženom modelu (Slika 25), izvor dvolančane DNA s 5'-stršećim krajevima kao supstrat za "hvatanje" i cijepanje od strane kompleksa Cas1-Cas2 mogu biti fagi u različitim fazama svog replikativnog ciklusa. Primjerice neki fagi ubacuju DNA u stanicu u obliku linearne dvolančane DNA s 5'-stršećim krajevima, a 5'-stršeći krajevi nastaju i prilikom σ -replikacije faga i plazmida^{105,163}. Moguće je da slične strukture nastaju i u kolabiranim replikacijskim rašljama ili u regijama terminusa replikacije prilikom segregacije kromosoma. Sve ovo su mogući razlozi zašto je uklanjanje 5'-jednolančanih egzonukleaza iz stanice, tj. nastajanje 5'-stršećih krajeva, pogodovalo adaptaciji u mojim pokusima. Pozitivan učinak uklanjanja 3'-egzonukleaza na adaptaciju je vjerojatno posljedica uklanjanja egzonukleaza koje su u kompeticiji s egzonukleazom DnaQ potrebnom za sazrijevanje razmaknice.

Dominantna ugradnja kromosomskih (vlastitih) razmaknica u mojim pokusima, dokazana autoimunost na 30 °C u prisustvu sastavnica CRISPR-Cas neophodnih za interferenciju (kompleks Cascade i protein Cas3), te preživljenje na 37 °C me navodi na zaključak da u prirodnom okruženju bakterije *E. coli* sustav CRISPR-Cas možda ima prvenstveno regulatornu ulogu, a ne obrambenu. Moguće je da su na 37 °C drugi mehanizmi obrane, poput maskiranja receptora i obrane restrikcijским nukleazama, primarni način obrane bakterije *E. coli* od strane DNA. U nedavno provedenoj bioinformatičkoj analizi¹⁶⁴ svih

razmaknica iz lokusa CRISPR bakterije *E. coli* većina razmaknica je mapirana na bakterijski kromosom, a ne na genome faga dostupne u online bazama podataka ili nasumične sekvence stvorene iz genoma faga (koje su služile da se razmaknice eventualno pronađu i u fagima čije sekvence genoma nisu poznate). Također, većina razmaknica je mapirana na regije kromosoma koje su povezane s transkripcijom i regulacijom transkripcije. Zanimljivo, analiza metaboličkih procesa vezanih za mapirane regije je pokazala da se uglavnom radi o procesima transpozicije i rekombinacije koji su procesi često vezani i za horizontalni transfer gena (tj. prisustvo strane DNA).

6. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja procesa naivne adaptacije sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* K-12 može se zaključiti sljedeće:

- Nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije neophodna za uspješnu ugradnju razmaknica u lokus CRISPR; dostatna je helikazna aktivnost enzima.
- Protein RecA negativno utječe na učinkovitost ugradnje razmaknica u lokus CRISPR.
- Nastajanje 3'- i 5'-stršećih krajeva na molekuli DNA *in vivo* pozitivno utječe na ugradnju razmaknica u lokus CRISPR.
- *In vitro*, kompleks Cas1-Cas2 može vezati jednolančane molekule DNA, te kratke dvolančane DNA dugih 3'- ili 5'-stršećih krajeva, no cijepati može samo kratku dvolančanu DNA dugačkog 5'-kraja. Za cijepanje je potreban cijeli kompleks Cas1-Cas2, dok nukleaza Cas1 samostalno ne može pocijepati isti model molekule DNA.
- Većina novougrađenih razmaknica je porijeklom s kromosoma, a najčešća izvorišta novih razmaknica su regije izvorišta replikacije (*oriC*), lokus CRISPR i regija završetka replikacije (*ter*) koja je dominantni izvor razmaknica u mutantu *recB1080*.
- U prisustvu kompleksa Cascade i nukleaze/helikaze Cas3 može doći do interferencije protiv vlastitog kromosoma, tj. autoimunosti, pri temperaturi 30 °C. Za interferenciju je neophodno prisustvo pravilnog motiva PAM (5'-AAG-3') koji je ujedno najčešće prisutan motiv PAM u analiziranim (proto)razmaknicama. U slučaju da ista razmaknica cilja više mjesta na kromosomu, do interferencije može doći i na 37 °C, no vjerojatno se radi o različitom obliku interferencije (nastajanje prepreka na kromosomu u obliku većeg broja R-omči s vezanim velikim nukleoproteinskim kompleksima) u odnosu na 30 °C (nastajanje R-omči i cijepanje ciljane DNA nukleazom/helikazom Cas3).
- Za ugradnju razmaknica u lokus CRISPR potrebna je ekspresija proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 s plazmida, dok ekspresija s inducibilnog promotora *araBp8* na kromosomu ne rezultira ugradnjom razmaknica.
- Mutacije u genima *yayD* i *ycfH*, koji kodiraju istoimene slabo istražene nukleaze, nemaju utjecaj na ugradnju razmaknica.

7. LITERATURA

1. Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7 (2006).
2. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
3. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* **322**, 1843–1845 (2008).
4. Brouns, S. J. J. *et al.* Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* **321**, 960–964 (2008).
5. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 722–736 (2015).
6. Pougach, K. *et al.* Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1367–1379 (2010).
7. Díez-Villaseñor, C., Almendros, C., García-Martínez, J. & Mojica, F. J. M. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **156**, 1351–1361 (2010).
8. Yosef, I., Goren, M. G. & Qimron, U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5569–5576 (2012).
9. Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J. & Bolt, E. L. Different genome stability proteins underpin primed and naïve adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10821–10830 (2015).
10. Xue, C. & Sashital, D. G. Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus* **8**, 100–106 (2019).
11. Hayes, R. P. *et al.* Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I–E Cascade from *E. coli*. *Nature* **530**, 499–503 (2016).
12. Westra, E. R. *et al.* Type I-E CRISPR-Cas Systems Discriminate Target from Non-

- Target DNA through Base Pairing-Independent PAM Recognition. *PLoS Genet.* **9**, e1003742 (2013).
13. Nuñez, J. K. *et al.* Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 528–534 (2014).
 14. Wang, J. *et al.* Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell* **163**, 840–853 (2015).
 15. Levy, A. *et al.* CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature* **520**, 505–510 (2015).
 16. Ponticelli, A. S., Schultz, D. W., Taylor, A. F. & Smith, G. R. Chi-dependent DNA strand cleavage by RecBC enzyme. *Cell* **41**, 145–151 (1985).
 17. Dillingham, M. S. & Kowalczykowski, S. C. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 642–671 (2008).
 18. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987).
 19. Nakata, A., Amemura, M. & Makino, K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* **171**, 3553–3556 (1989).
 20. Hermans, P. W. M. *et al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* **59**, 2695–2705 (1991).
 21. Groenen, P. M. A., Bunschoten, A. E., Soolingen, D. van & Erftbden, J. D. A. van. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* **10**, 1057–1065 (1993).
 22. Mojica, F. J. M., Juez, G. & Rodriguez-Valera, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* **9**, 613–621 (1993).

23. Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–1575 (2002).
24. Ishino, Y., Krupovic, M. & Forterre, P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J. Bacteriol.* **200**, e00580-17 (2018).
25. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005).
26. Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**, 653–663 (2005).
27. Jackson, S. A. *et al.* CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* **356**, eaal5056 (2017).
28. Tamulaitis, G., Venclovas, Č. & Siksnys, V. Type III CRISPR-Cas Immunity: Major Differences Brushed Aside. *Trends Microbiol.* **25**, 49–61 (2017).
29. Mohanraju, P. *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* **353**, aad5147 (2016).
30. Charpentier, E., Richter, H., van der Oost, J. & White, M. F. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 428–441 (2015).
31. Deveau, H. *et al.* Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390–1400 (2008).
32. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733–740 (2009).
33. CRISPR Systems - Doudna Lab. https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/.
34. Shmakov, S. *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 169–182 (2017).

35. Koonin, E. V. & Makarova, K. S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **374**, 20180087 (2019).
36. Beloglazova, N. *et al.* Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. *EMBO J.* **30**, 4616–4627 (2011).
37. Plagens, A., Tjaden, B., Hagemann, A., Randau, L. & Hensel, R. Characterization of the CRISPR/Cas Subtype I-A System of the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *J. Bacteriol.* **194**, 2491–2500 (2012).
38. Zhang, D. *et al.* Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 1651–1669 (2020).
39. Jiang, W., Samai, P. & Marraffini, L. A. Degradation of Phage Transcripts by CRISPR-Associated RNases Enables Type III CRISPR-Cas Immunity. *Cell* **164**, 710–721 (2016).
40. Paul, B. & Montoya, G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed. J.* **43**, 8–17 (2020).
41. Nishimasu, H. *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).
42. Chen, B. *et al.* Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell* **155**, 1479–1491 (2013).
43. Bikard, D. *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7429–7437 (2013).
44. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **152**, 1173–1183 (2013).
45. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* **154**, 442–451 (2013).
46. Kamerbeek, J. *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 907–914 (1997).
47. Cui, Y. *et al.* Insight into Microevolution of *Yersinia pestis* by Clustered Regularly

- Interspaced Short Palindromic Repeats. *PLoS One* **3**, e2652 (2008).
48. Liu, F. *et al.* Novel Virulence Gene and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Multilocus Sequence Typing Scheme for Subtyping of the Major Serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1946–1956 (2011).
 49. Liu, F. *et al.* Subtyping *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates from Different Sources by Using Sequence Typing Based on Virulence Genes and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs). *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4520–4526 (2011).
 50. Mokrousov, I., Narvskaya, O., Limeschenko, E. & Vyazovaya, A. Efficient Discrimination within a *Corynebacterium diphtheriae* Epidemic Clonal Group by a Novel Macroarray-Based Method. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1662–1668 (2005).
 51. Bikard, D. *et al.* Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1146–1150 (2014).
 52. Citorik, R. J., Mimee, M. & Lu, T. K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1141–1145 (2014).
 53. Xue, C. *et al.* CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10831–10847 (2015).
 54. Swarts, D. C., Mosterd, C., van Passel, M. W. J. & Brouns, S. J. J. CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition. *PLoS One* **7**, e35888 (2012).
 55. Datsenko, K. A. *et al.* Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.* **3**, 945 (2012).
 56. Nuñez, J. K., Lee, A. S. Y., Engelman, A. & Doudna, J. A. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature* **519**, 193–198 (2015).
 57. Szczelkun, M. D. *et al.* Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 9798–9803 (2014).
 58. Xiao, Y. *et al.* Structure Basis for Directional R-loop Formation and Substrate Handover Mechanisms in Type I CRISPR-Cas System. *Cell* **170**, 48–60.e11 (2017).

59. Xiao, Y., Luo, M., Dolan, A. E., Liao, M. & Ke, A. Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3. *Science* **361**, eaat0839 (2018).
60. Xue, C., Whitis, N. R. & Sashital, D. G. Conformational Control of Cascade Interference and Priming Activities in CRISPR Immunity. *Mol. Cell* **64**, 826–834 (2016).
61. van Erp, P. B. G. *et al.* Conformational Dynamics of DNA Binding and Cas3 Recruitment by the CRISPR RNA-Guided Cascade Complex. *ACS Chem. Biol.* **13**, 481–490 (2018).
62. Sinkunas, T. *et al.* Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.* **30**, 1335–1342 (2011).
63. Huo, Y. *et al.* Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 771–777 (2014).
64. Gong, B. *et al.* Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16359–16364 (2014).
65. Pul, Ü. *et al.* Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* **75**, 1495–1512 (2010).
66. Westra, E. R. *et al.* H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in Escherichia coli K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol. Microbiol.* **77**, 1380–1393 (2010).
67. Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H. & Ogasawara, N. Escherichia coli Histone-Like Protein H-NS Preferentially Binds to Horizontally Acquired DNA in Association with RNA Polymerase. *DNA Res.* **13**, 141–153 (2006).
68. Yang, C. D., Chen, Y. H., Huang, H. Y., Huang, H. Da & Tseng, C. P. CRP represses the CRISPR/Cas system in Escherichia coli: Evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication. *Mol. Microbiol.* **92**, 1072–1091 (2014).
69. Mitić, D., Radovčić, M., Markulin, D. & Ivančić-Baće, I. StpA represses CRISPR-Cas immunity in H-NS deficient Escherichia coli. *Biochimie* **174**, 136–143 (2020).
70. Sashital, D. G., Wiedenheft, B. & Doudna, J. A. Mechanism of Foreign DNA Selection

- in a Bacterial Adaptive Immune System. *Mol. Cell* **46**, 606–615 (2012).
71. Yosef, I., Goren, M. G., Kiro, R., Edgar, R. & Qimron, U. High-temperature protein G is essential for activity of the Escherichia coli clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20136–20141 (2011).
 72. Edgar, R. & Qimron, U. The Escherichia coli CRISPR System Protects from λ Lysogenization, Lysogens, and Prophage Induction. *J. Bacteriol.* **192**, 6291–6294 (2010).
 73. Semenova, E. *et al.* Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10098–10103 (2011).
 74. Fineran, P. C. *et al.* Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E1629–E1638 (2014).
 75. Shmakov, S. *et al.* Pervasive generation of oppositely oriented spacers during CRISPR adaptation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5907–5916 (2014).
 76. Semenova, E. *et al.* Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the Escherichia coli type I-E CRISPR-Cas interfering complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 7626–7631 (2016).
 77. Musharova, O. *et al.* Spacer-length DNA intermediates are associated with Cas1 in cells undergoing primed CRISPR adaptation. *Nucleic Acids Res.* **45**, 3297–3307 (2017).
 78. Krivoy, A. *et al.* Primed CRISPR adaptation in Escherichia coli cells does not depend on conformational changes in the Cascade effector complex detected in Vitro. *Nucleic Acids Res.* **46**, 4087–4098 (2018).
 79. Sampson, T. R. & Weiss, D. S. Alternative Roles for CRISPR/Cas Systems in Bacterial Pathogenesis. *PLoS Pathog.* **9**, e1003621 (2013).
 80. Nuñez, J. K., Harrington, L. B., Kranzusch, P. J., Engelman, A. N. & Doudna, J. A. Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* **527**, 535–538 (2015).

81. Díez-Villaseñor, C., Guzmán, N. M., Almendros, C., García-Martínez, J. & Mojica, F. J. M. CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli*. *RNA Biol.* **10**, 792–802 (2013).
82. Yosef, I. *et al.* DNA motifs determining the efficiency of adaptation into the *Escherichia coli* CRISPR array. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14396–14401 (2013).
83. Amitai, G. & Sorek, R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 67–76 (2016).
84. Lee, H., Zhou, Y., Taylor, D. W. & Sashital, D. G. Cas4-Dependent Prespacer Processing Ensures High-Fidelity Programming of CRISPR Arrays. *Mol. Cell* **70**, 48–59.e5 (2018).
85. Kieper, S. N. *et al.* Cas4 Facilitates PAM-Compatible Spacer Selection during CRISPR Adaptation. *Cell Rep.* **22**, 3377–3384 (2018).
86. Rollie, C., Graham, S., Rouillon, C. & White, M. F. Prespacer processing and specific integration in a Type I-A CRISPR system. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1007–1020 (2018).
87. Shiimori, M., Garrett, S. C., Graveley, B. R. & Terns, M. P. Cas4 Nucleases Define the PAM, Length, and Orientation of DNA Fragments Integrated at CRISPR Loci. *Mol. Cell* **70**, 814–824.e6 (2018).
88. Rollie, C., Schneider, S., Brinkmann, A. S., Bolt, E. L. & White, M. F. Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. *Elife* **4**, (2015).
89. Nuñez, J. K., Bai, L., Harrington, L. B., Hinder, T. L. & Doudna, J. A. CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Mol. Cell* **62**, 824–833 (2016).
90. Yoganand, K. N. R., Sivathanu, R., Nimkar, S. & Anand, B. Asymmetric positioning of Cas1–2 complex and Integration Host Factor induced DNA bending guide the unidirectional homing of protospacer in CRISPR-Cas type I-E system. *Nucleic Acids Res.* **45**, 367–381 (2017).
91. Wright, A. V. *et al.* Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*

- 357**, 1113–1118 (2017).
92. Arslan, Z., Hermanns, V., Wurm, R., Wagner, R. & Pul, Ü. Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR–Cas system. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7884–7893 (2014).
 93. Shipman, S. L., Nivala, J., Macklis, J. D. & Church, G. M. Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition. *Science* **353**, aaf1175 (2016).
 94. Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O. & Qimron, U. Experimental Definition of a Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Duplicon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **423**, 14–16 (2012).
 95. Michel, B. & Leach, D. Homologous Recombination—Enzymes and Pathways. *EcoSal Plus* **5**, (2012).
 96. Smith, G. R. How RecBCD Enzyme and Chi Promote DNA Break Repair and Recombination: a Molecular Biologist’s View. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 217–228 (2012).
 97. Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S. C. & Wigley, D. B. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* **432**, 187–193 (2004).
 98. Wiktor, J., van der Does, M., Büller, L., Sherratt, D. J. & Dekker, C. Direct observation of end resection by RecBCD during double-stranded DNA break repair in vivo. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1821–1833 (2018).
 99. Forget, A. L. & Kowalczykowski, S. C. Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature* **482**, 423–427 (2012).
 100. Churchill, J. J., Anderson, D. G. & Kowalczykowski, S. C. The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of chi, resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev.* **13**, 901–911 (1999).
 101. Babu, M. *et al.* A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol. Microbiol.* **79**, 484–502 (2011).
 102. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-

- strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8241–8246 (2001).
103. Michel, B. *et al.* Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8181–8188 (2001).
 104. Shee, C. *et al.* Engineered proteins detect spontaneous DNA breakage in human and bacterial cells. *Elife* **2013**, (2013).
 105. Weigel, C. & Seitz, H. Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 321–381 (2006).
 106. Lovett, S. T. The DNA Exonucleases of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* **4**, (2011).
 107. Đermić, E., Zahradka, D., Vujaklija, D., Ivanković, S. & Đermić, D. 3'-Terminated Overhangs Regulate DNA Double-Strand Break Processing in *Escherichia coli*. *G3 (Bethesda)* **7**, 3091–3102 (2017).
 108. Brutlag, D. & Kornberg, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* **247**, 241–8 (1972).
 109. Kushner, S. R., Nagaishi, H., Templin, A. & Clark, A. J. Genetic Recombination in *Escherichia coli*: The Role of Exonuclease I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 824–827 (1971).
 110. Kushner, S. R., Nagaishi, H. & Clark, A. J. Indirect Suppression of *recB* and *recC* Mutations by Exonuclease I Deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1366–1370 (1972).
 111. Connelly, J. C., de Leau, E. S., Okely, E. A. & Leach, D. R. F. Overexpression, Purification, and Characterization of the SbcCD Protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**, 19819–19826 (1997).
 112. Connelly, J. C., Kirkham, L. A. & Leach, D. R. F. The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7969–7974 (1998).
 113. Connelly, J. DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1039–1046 (1999).
 114. Eykelenboom, J. K., Blackwood, J. K., Okely, E. & Leach, D. R. F. SbcCD Causes a

- Double-Strand Break at a DNA Palindrome in the Escherichia coli Chromosome. *Mol. Cell* **29**, 644–651 (2008).
115. Zahradka, K., Buljubašić, M., Petranović, M. & Zahradka, D. Roles of ExoI and SbcCD Nucleases in “Reckless” DNA Degradation in recA Mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **191**, 1677–1687 (2009).
 116. Viswanathan, M. & Lovett, S. T. Exonuclease X of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **274**, 30094–30100 (1999).
 117. Đermić, D. Functions of Multiple Exonucleases Are Essential for Cell Viability, DNA Repair and Homologous Recombination in recD Mutants of Escherichia coli. *Genetics* **172**, 2057–2069 (2006).
 118. Chase, J. W. & Richardson, C. C. Exonuclease VII of Escherichia coli. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **249**, 4545–52 (1974).
 119. Chase, J. W. & Richardson, C. C. Exonuclease VII of Escherichia coli. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **249**, 4553–61 (1974).
 120. Chase, J. W. & Richardson, C. C. Escherichia coli mutants deficient in exonuclease VII. *J. Bacteriol.* **129**, 934–947 (1977).
 121. Lovett, S. T. & Kolodner, R. D. Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2627–2631 (1989).
 122. Han, E. S. RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1084–1091 (2006).
 123. Horii, Z.-I. & Clark, A. J. Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in Escherichia coli k12: Isolation and characterization of mutants. *J. Mol. Biol.* **80**, 327–344 (1973).
 124. Gillen, J. R., Willis, D. K. & Clark, A. J. Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **145**, 521–532 (1981).
 125. Lovett, S. T. & Clark, A. J. Genetic analysis of the recJ gene of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **157**, 190–196 (1984).

126. Thoms, B. & Wackernagel, W. Interaction of RecBCD Enzyme with DNA at Double-Strand Breaks Produced in UV-Irradiated *Escherichia coli*: Requirement for DNA End Processing. *J. Bacteriol.* **180**, 5639–5645 (1998).
127. Thoms, B., Borchers, I. & Wackernagel, W. Effects of Single-Strand DNases ExoI, RecJ, ExoVII, and SbcCD on Homologous Recombination of recBCD⁺ Strains of *Escherichia coli* and Roles of SbcB15 and XonA2 ExoI Mutant Enzymes. *J. Bacteriol.* **190**, 179–192 (2008).
128. Bachmann, B. J. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology* (eds. Neidhardt, F. et al.) 2460–2488 (ASM Press, 1996).
129. Ivančić-Baće, I., Vlašić, I., Salaj-Šmic, E. & Brčić-Kostić, K. Genetic Evidence for the Requirement of RecA Loading Activity in SOS Induction after UV Irradiation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 5024–5032 (2006).
130. Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14 (1995).
131. Thomason, L. C., Costantino, N. & Court, D. L. E. coli Genome Manipulation by P1 Transduction. in *Current Protocols in Molecular Biology* 1.17.1-1.17.8 (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/0471142727.mb0117s79.
132. Gibson, F. P., Leach, D. R. F. & Lloyd, R. G. Identification of sbcD mutations as cosuppressors of recBC that allow propagation of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**, 1222–1228 (1992).
133. Radovčić, M. *et al.* CRISPR–Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Res.* **46**, 10173–10183 (2018).
134. Bell, J. C. & Kowalczykowski, S. C. RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 491–507 (2016).
135. Anderson, D. G. & Kowalczykowski, S. C. The Translocating RecBCD Enzyme Stimulates Recombination by Directing RecA Protein onto ssDNA in a χ -Regulated

- Manner. *Cell* **90**, 77–86 (1997).
136. Wendel, B. M., Courcelle, C. T. & Courcelle, J. Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16454–16459 (2014).
 137. Wexler, M. *et al.* TatD Is a Cytoplasmic Protein with DNase Activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 16717–16722 (2000).
 138. Riley, M. *et al.* *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1–9 (2006).
 139. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2579–E2586 (2012).
 140. Leenay, R. T. *et al.* Identifying and Visualizing Functional PAM Diversity across CRISPR-Cas Systems. *Mol. Cell* **62**, 137–147 (2016).
 141. Savitskaya, E., Semenova, E., Dedkov, V., Metlitskaya, A. & Severinov, K. High-throughput analysis of type I-E CRISPR/Cas spacer acquisition in *E. coli*. *RNA Biol.* **10**, 716–725 (2013).
 142. Majsec, K., Bolt, E. L. & Ivančić-Baće, I. Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. *BMC Microbiol.* **16**, 28 (2016).
 143. Mosterd, C., Rousseau, G. M. & Moineau, S. A short overview of the CRISPR-Cas adaptation stage. *Can. J. Microbiol.* **67**, 1–12 (2021).
 144. Wade, J. T. *et al.* Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 806–814 (2006).
 145. Sonden, B. & Uhlin, B. E. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* **15**, 4970–4980 (1996).
 146. Uyar, E. *et al.* Differential Binding Profiles of StpA in Wild-Type and hns Mutant Cells: a Comparative Analysis of Cooperative Partners by Chromatin Immunoprecipitation-Microarray Analysis. *J. Bacteriol.* **191**, 2388–2391 (2009).
 147. Shiimori, M. *et al.* Role of free DNA ends and protospacer adjacent motifs for CRISPR

- DNA uptake in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* **45**, 11281–11294 (2017).
148. Wei, Y., Terns, R. M. & Terns, M. P. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. *Genes Dev.* **29**, 356–361 (2015).
 149. Sinha, A. K. *et al.* Broken replication forks trigger heritable DNA breaks in the terminus of a circular chromosome. *PLOS Genet.* **14**, e1007256 (2018).
 150. White, M. A., Azeroglu, B., Lopez-Vernaza, M. A., Hasan, A. M. M. & Leach, D. R. F. RecBCD coordinates repair of two ends at a DNA double-strand break, preventing aberrant chromosome amplification. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6670–6682 (2018).
 151. Feulner, G. *et al.* Structure of the *rhsA* locus from *Escherichia coli* K-12 and comparison of *rhsA* with other members of the *rhs* multigene family. *J. Bacteriol.* **172**, 446–456 (1990).
 152. Hill, C. W., Sandt, C. H. & Vlazny, D. A. *Rhs* elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein. *Mol. Microbiol.* **12**, 865–871 (1994).
 153. Jore, M. M. *et al.* Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 529–536 (2011).
 154. Radovčić, M., Čulo, A. & Ivančić-Baće, I. Cas3-stimulated runaway replication of modified ColE1 plasmids in *Escherichia coli* is temperature dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* **366**, 1–7 (2019).
 155. Ivančić-Baće, I., Radovčić, M., Bočkor, L., Howard, J. L. & Bolt, E. L. Cas3 stimulates runaway replication of a ColE1 plasmid in *Escherichia coli* and antagonises RNaseHI. *RNA Biol.* **10**, 770–778 (2013).
 156. Itoh, T. & Tomizawa, J. Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 2450–2454 (1980).
 157. Killelea, T., Hawkins, M., Howard, J. L., McGlynn, P. & Bolt, E. L. DNA replication roadblocks caused by Cascade interference complexes are alleviated by RecG DNA repair helicase. *RNA Biol.* **16**, 543–548 (2019).
 158. Drolet, M. *et al.* Overexpression of RNase H partially complements the growth defect

- of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3526–3530 (1995).
159. Luo, M. L., Mullis, A. S., Leenay, R. T. & Beisel, C. L. Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Res.* **43**, 674–681 (2015).
160. Rath, D., Amlinger, L., Hoekzema, M., Devulapally, P. R. & Lundgren, M. Efficient programmable gene silencing by Cascade. *Nucleic Acids Res.* **43**, 237–246 (2015).
161. Moch, C., Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P. DNA binding specificities of *Escherichia coli* Cas1–Cas2 integrase drive its recruitment at the CRISPR locus. *Nucleic Acids Res.* **45**, gkw1309 (2016).
162. Kim, S. *et al.* Selective loading and processing of pre-spacers for precise CRISPR adaptation. *Nature* **579**, 141–145 (2020).
163. Wawrzyniak, P., Płucienniczak, G. & Bartosik, D. The Different Faces of Rolling-Circle Replication and Its Multifunctional Initiator Proteins. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13 (2017).
164. Bozic, B., Repac, J. & Djordjevic, M. Endogenous Gene Regulation as a Predicted Main Function of Type I-E CRISPR/Cas System in *E. coli*. *Molecules* **24**, 784 (2019).

8. PRILOZI

Tablica P1. Srednja vrijednost (sa standardnom devijacijom) relativnog intenziteta naivne adaptacije, tj. postotka ugradnje novih razmaknica, kroz tri uzastopne pasaže (p1, p2, p3) sojeva bakterije *E. coli*. Sve vrijednosti su rezultat najmanje tri replike.

Soj transformiran plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) s naznačenim genotipom u zagradama*	Ugradnja novih razmaknica (%) ± standardna devijacija		
	p1	p2	p3
IIB1165 (<i>wt</i>)	2,20 ± 0,20	8,80 ± 3,00	11,00 ± 1,50
IIB1252 (<i>recA</i>)	3,10 ± 0,70	8,60 ± 0,80	13,30 ± 1,10
IIB1214 (<i>recB1080</i>)	2,40 ± 0,02	0,68 ± 0,20	0,77 ± 0,10
IIB1239 (<i>sbcB</i>)	0,27 ± 0,05	13,60 ± 1,90	14,90 ± 1,90
IIB1228 (<i>sbcD</i>)	1,40 ± 0,40	8,40 ± 3,80	17,20 ± 6,50
IIB1229 (<i>exoXI</i>)	1,60 ± 1,10	8,60 ± 3,50	16,70 ± 4,80
IIB1226 (<i>xseA</i>)	0,25 ± 0,20	12,50 ± 3,80	19,10 ± 6,20
IIB1255 (<i>sbcB recA</i>)	5,60 ± 3,40	11,10 ± 1,80	8,30 ± 1,80
IIB1258 (<i>sbcD recA</i>)	5,00 ± 0,10	16,20 ± 0,40	21,70 ± 0,05
IIB1254 (<i>exoXI recA</i>)	4,70 ± 1,70	13,70 ± 0,70	23,40 ± 3,00
IIB1253 (<i>xseA recA</i>)	3,73 ± 0,50	12,69 ± 1,00	19,30 ± 2,40
IIB1245 (<i>recD recA</i>)	4,00 ± 2,40	9,10 ± 0,60	2,90 ± 0,30
IIB1242 (<i>recD recA sbcB</i>)	1,56 ± 0,30	0,78 ± 0,40	0,32 ± 0,30
IIB1213 (<i>recD recA sbcD</i>)	2,28 ± 2,00	0,30 ± 0,19	0,28 ± 0,10
IIB1222 (<i>recD recA exoXI</i>)	3,10 ± 0,40	1,59 ± 0,40	1,20 ± 0,60
IIB1218 (<i>recD recA xseA</i>)	3,90 ± 4,20	10,02 ± 1,30	2,59 ± 0,60
IIB1199 (<i>recJ</i>)	0,70 ± 0,47	10,20 ± 2,50	20,50 ± 1,50
IIB1259 (<i>recJ recA</i>)	2,80 ± 0,40	13,90 ± 0,20	18,50 ± 2,00
IIB1235 (<i>recJ xseA</i>)	2,10 ± 0,50	4,30 ± 3,00	7,10 ± 2,80
IIB1248 (<i>recJ xseA recA</i>)	3,10 ± 0,60	5,90 ± 9,70	9,70 ± 0,70
IIB1209 (<i>recD recA recJ</i>)	3,29 ± 1,30	1,70 ± 1,40	1,50 ± 0,88
IIB1236 (<i>recD recA recJ xseA</i>)	8,00 ± 2,00	16,30 ± 2,00	19,20 ± 6,00
IIB1316 (<i>yayD</i>)	0,42 ± 0,17	6,84 ± 1,78	12,39 ± 2,17
IIB1319 (<i>ycfH</i>)	1,31 ± 0,70	9,00 ± 0,98	13,64 ± 0,84

Tablica P1 - nastavak

IIB1336 (<i>yayD recA</i>)	2,33 ± 0,54	9,98 ± 1,07	16,10 ± 2,18
IIB1337 (<i>ycfH recA</i>)	2,39 ± 0,22	12,40 ± 2,67	17,61 ± 2,55
IIB1338 (<i>yayD recA recD</i>)	5,06 ± 1,54	12,11 ± 1,21	4,30 ± 1,11
IIB1339 (<i>ycfH recA recD</i>)	5,98 ± 0,51	10,22 ± 1,66	4,11 ± 1,39

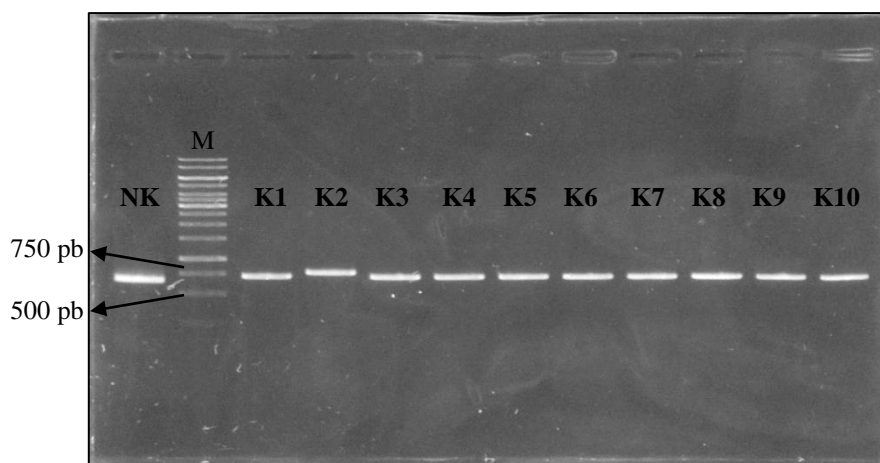
*Svi sojevi, uključujući i soj IIB1165 (*wt*) imaju mutacije $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT$.

Tablica P2. Gubitak plazmida za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 (pEB628) kroz tri pasaže (p1, p2, p3) u korištenim sojevima. Rezultat je srednja vrijednost barem dvije replike.

Soj transformiran plazmidom pEB628 (Amp^r) za ekspresiju Cas1-Cas2	Amp ^r stanice/mL (± standardna devijacija)		
	p1	p2	p3
IIB1165 (<i>wt</i>)	2,32 x 10⁹ (1,28 x 10 ⁹)	3,10 x 10⁹ (2,30 x 10 ⁹)	1,93 x 10⁹ (1,06 x 10 ⁸)
IIB1252 (<i>recA</i>)	1,85 x 10⁸ (9,25 x 10 ⁷)	1,34 x 10⁸ (5,48 x 10 ⁶)	9,39 x 10⁷ (2,53 x 10 ⁷)
IIB1192 (<i>recD</i>)	3,00 x 10⁸ (2,18 x 10 ⁸)	3,54 x 10⁷ (3,47 x 10 ⁷)	4,12 x 10⁶ (2,92 x 10 ⁶)
IIB1208 (<i>recB268</i>)	2,28 x 10⁶ (9,88 x 10 ⁵)	1,16 x 10⁶ (8,12 x 10 ⁵)	2,03 x 10⁵ (3,00 x 10 ⁵)
IIB1244 (<i>recB268 recA</i>)	2,98 x 10⁵ (9,78 x 10 ⁴)	8,50 x 10⁴ (0)	3,83 x 10⁴ (6,21 x 10 ⁴)
IIB1214 (<i>recB1080</i>)	2,05 x 10⁷ (1,61 x 10 ⁷)	7,95 x 10⁵ (7,63 x 10 ⁵)	3,33 x 10³ (2,89 x 10 ³)
IIB1239 (<i>sbcB</i>)	1,30 x 10⁹ (5,66 x 10 ⁸)	1,25 x 10⁹ (5,66 x 10 ⁸)	1,25 x 10⁹ (7,07 x 10 ⁸)
IIB1228 (<i>sbcD</i>)	2,08 x 10⁹ (3,54 x 10 ⁷)	2,45 x 10⁹ (1,13 x 10 ⁹)	1,78 x 10⁹ (5,30 x 10 ⁸)
IIB1229 (<i>exoX1</i>)	2,22 x 10⁹ (3,79 x 10 ⁸)	2,27 x 10⁹ (8,75 x 10 ⁸)	9,83 x 10⁸ (8,52 x 10 ⁸)
IIB1226 (<i>xseA</i>)	1,67 x 10⁹ (5,11 x 10 ⁸)	1,70 x 10⁹ (1,62 x 10 ⁹)	1,15 x 10⁹ (8,67 x 10 ⁸)
IIB1255 (<i>sbcB recA</i>)	1,58 x 10⁷ (3,54 x 10 ⁵)	3,75 x 10⁶ (1,77 x 10 ⁶)	6,50 x 10⁶ (4,24 x 10 ⁶)
IIB1258 (<i>sbcD recA</i>)	1,31 x 10⁸ (5,41 x 10 ⁷)	5,34 x 10⁷ (1,69 x 10 ⁷)	7,11 x 10⁷ (4,87 x 10 ⁷)
IIB1254 (<i>exoX1 recA</i>)	9,96 x 10⁷ (1,22 x 10 ⁷)	6,99 x 10⁷ (2,39 x 10 ⁷)	9,05 x 10⁷ (2,55 x 10 ⁷)

Tablica P2 - nastavak

IIB1253 (<i>xseA recA</i>)	7,28 x 10⁷ (4,74 x 10 ⁷)	5,71 x 10⁷ (1,08 x 10 ⁷)	6,63 x 10⁷ (5,48 x 10 ⁷)
IIB1245 (<i>recD recA</i>)	4,21 x 10⁷ (2,03 x 10 ⁷)	6,75 x 10⁶ (4,60 x 10 ⁶)	6,80 x 10⁵ (4,53 x 10 ⁵)
IIB1242 (<i>recD recA sbcB</i>)	8,80 x 10⁵ (1,40 x 10 ⁵)	1,25 x 10⁴ (1,66 x 10 ⁴)	1,38 x 10⁴ (1,89 x 10 ⁴)
IIB1213 (<i>recD recA sbcD</i>)	6,98 x 10⁵ (2,63 x 10 ⁵)	3,75 x 10³ (4,79 x 10 ³)	3,33 x 10³ (5,77 x 10 ³)
IIB1222 (<i>recD recA exoXI</i>)	6,11 x 10⁵ (3,71 x 10 ⁵)	1,59 x 10⁵ (2,44 x 10 ⁵)	1,14 x 10⁵ (8,75 x 10 ⁴)
IIB1218 (<i>recD recA xseA</i>)	4,21 x 10⁷ (3,72 x 10 ⁷)	4,38 x 10⁶ (3,09 x 10 ⁶)	5,13 x 10⁵ (3,56 x 10 ⁵)
IIB1199 (<i>recJ</i>)	2,02 x 10⁹ (2,02 x 10 ⁸)	1,92 x 10⁹ (3,21 x 10 ⁸)	1,48 x 10⁹ (3,54 x 10 ⁷)
IIB1259 (<i>recJ recA</i>)	9,64 x 10⁷ (3,47 x 10 ⁷)	1,25 x 10⁸ (1,91 x 10 ⁷)	9,15 x 10⁷ (5,72 x 10 ⁷)
IIB1235 (<i>recJ xseA</i>)	1,78 x 10⁹ (1,77 x 10 ⁸)	1,40 x 10⁹ (7,07 x 10 ⁷)	1,48 x 10⁹ (3,18 x 10 ⁸)
IIB1248 (<i>recJ xseA recA</i>)	8,61 x 10⁷ (6,54 x 10 ⁶)	6,65 x 10⁷ (2,23 x 10 ⁷)	5,53 x 10⁷ (7,07 x 10 ⁵)
IIB1209 (<i>recD recA recJ</i>)	8,07 x 10⁵ (3,01 x 10 ⁵)	5,00 x 10³ (8,66 x 10 ³)	0 (0)
IIB1236 (<i>recD recA recJ xseA</i>)	1,20 x 10⁷ (9,84 x 10 ⁶)	1,28 x 10⁷ (5,01 x 10 ⁶)	9,50 x 10⁶ (2,12 x 10 ⁶)
IIB1316 (<i>yayD</i>)	1,93 x 10⁹ (1,04 x 10 ⁸)	1,83 x 10⁹ (3,06 x 10 ⁸)	1,77 x 10⁹ (4,86 x 10 ⁸)
IIB1319 (<i>ycfH</i>)	1,77 x 10⁹ (7,64 x 10 ⁷)	1,93 x 10⁹ (5,77 x 10 ⁷)	1,70 x 10⁹ (2,60 x 10 ⁸)
IIB1334 (<i>yayD recD</i>)	1,71 x 10⁸ (7,10 x 10 ⁷)	2,83 x 10⁷ (2,15 x 10 ⁷)	1,02 x 10⁶ (6,79 x 10 ⁵)
IIB1335 (<i>ycfH recD</i>)	1,68 x 10⁸ (1,55 x 10 ⁷)	2,89 x 10⁷ (2,13 x 10 ⁷)	1,22 x 10⁶ (4,89 x 10 ⁵)
IIB1336 (<i>yayD recA</i>)	1,54 x 10⁸ (4,21 x 10 ⁷)	9,71 x 10⁷ (3,31 x 10 ⁷)	1,39 x 10⁸ (2,16 x 10 ⁷)
IIB1337 (<i>ycfH recA</i>)	8,58 x 10⁷ (1,02 x 10 ⁷)	1,67 x 10⁸ (2,37 x 10 ⁷)	1,59 x 10⁸ (4,18 x 10 ⁷)
IIB1338 (<i>yayD recD recA</i>)	5,29 x 10⁷ (2,51 x 10 ⁷)	2,18 x 10⁷ (4,19 x 10 ⁶)	3,75 x 10⁶ (1,77 x 10 ⁶)
IIB1339 (<i>ycfH recD recA</i>)	2,75 x 10⁷ (5,29 x 10 ⁶)	1,27 x 10⁷ (1,42 x 10 ⁷)	3,04 x 10⁶ (5,17 x 10 ⁶)



Slika P1. Produkti reakcije PCR na lokusu CRISPR u 2 % agaroznom gelu iz 10 pojedinačnih kolonija (K1-K10) soja IIB1214 (*recB1080*) prije pročišćavanja i sekvenciraja u svrhu analize novougrađenih razmaknica. U prvoj jažici je produkt reakcije PCR na neproduljenom lokusu CRISPR (negativna kontrola; NK), a u drugoj marker veličina DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (M). Kolonija 2 je ugradila dvije razmaknice pa je DNA manje migrirala na gelu od ostalih kolonija koje su ugradile jednu razmaknicu.

9. ŽIVOTOPIS

Marin Radovčić rođen je 21. veljače 1987. u Šibeniku gdje je završio osnovnu i srednju školu (opću gimnaziju). Godine 2005. je upisao preddiplomski, a 2008. diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je u veljači 2011. na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a s temom "Uloga proteina Cas3 u nastanku R-omči u bakteriji *Escherichia coli*", pod mentorstvom dr. sc. Ivančić Baće. Nakon diplome radio je kao stručni suradnik za farmakovigilanciju, a u studenom 2016. se zaposlio na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a u Zagrebu i istovremeno upisao doktorski studij biologije.

Za vrijeme trajanja dokorskog studija radio je kao suradnik na projektu "CRISPR Adaptation - the basis for prokaryotic adaptive immunity" dr. sc. Edwarda L. Bolta sa Sveučilišta u Nottinghamu, te na projektu "Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*" dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Istovremeno je vodio laboratorijske vježbe iz kolegija Molekularna genetika na preddiplomskom studiju molekularne biologije i diplomskom studiju kemije, te vodio studente na laboratorijskoj stručnoj praksi i pomagao studentima u izradi diplomskih radova. Pomagao je u organizaciji Noći biologije i Smotre Sveučilišta u Zagrebu u svrhu popularizacije znanosti.

Koautor je 6 znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog genetičkog društva (HGD). Dobitnik je nagrade "Željko Trgovčević" HGD-a i nagrade mladim znanstvenicima Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu, obje za 2018. godinu.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2016-06-8861, Biotechnology and Biological Sciences Research Council projektom broj BB/M020541-1 te Russian Foundation for Basic Research projektom broj 16-04-00767.