

Određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora, temperaturi i šaperonu HtpG u bakteriji *Escherichia coli*

Barbarić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

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:217:291835>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Lea Barbarić

**Određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti
o jačini promotora,
temperaturi i šaperonu HtpG u bakteriji
*Escherichia coli***

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće i neposrednim voditeljstvom Damjana Mitića, mag. mol. biol. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Marko Močibob.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*“ (IP-2016-06-8861).

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić-Baće, na ukazanom povjerenju i stručnim savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela i pomoći prilikom pisanja, te najveće hvala na strpljenju koje je iskazala i kojim je omogućila da izradim ovaj diplomski rad.

Neizmjereno hvala asistentu Damjanu Mitiću, na prenesenom znanju i beskrajnom strpljenju, te svom vremenu koje mi je posvetio tijekom ove godine, bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć. Hvala na svim savjetima, optimizmu i opuštenoj atmosferi.

Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima, a ponajviše asistentima, sa Zavoda za molekularnu biologiju na pomoći i ugodnoj atmosferi u laboratoriju, i izvan njega.

Veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi olakšali studij i polaganje ispita, te na druženjima i provodima.

Najveće hvala mojim roditeljima i mom dečku koji su uvijek vjerovali u mene i pružili mi beskrajnu podršku i razumijevanje u najtežim trenucima.

Sadržaj

SAŽETAK	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Sustav CRISPR-Cas.....	3
2.2. Molekularni mehanizmi: adaptacija, sazrijevanje i interferencija	4
2.3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas.....	6
2.4. Sustav CRISPR-Cas u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	8
2.5. Regulacija sustava CRISPR-Cas I-E.....	12
§ 3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Sojevi i plazmidi	16
3.1.2. Hranjive podloge i mediji.....	19
3.1.3. Antibiotici.....	19
3.1.4. Otopine i puferi	20
3.1.5. Instrumenti	21
3.1.6. Komercijalni kompleti.....	21
3.1.7. Markeri veličina	21
3.1.8. Antitijela.....	21
3.2. Metode.....	22
3.2.1. Priprema plazmida.....	22
3.2.2. Uzgoj prekoćne kulture bakterijskih stanica.....	28
3.2.3. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica	29
3.2.4. Kemijska transformacija bakterijskih sojeva.....	29
3.2.5. Nasađivanje transformiranih bakterijskih stanica na krute hranjive podloge	29
3.2.6. Prekomjerna ekspresija i izolacija proteina iz bakterija	30
3.2.7. Određivanje ukupne koncentracije proteina.....	30
3.2.8. Gel-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata.....	31
3.2.9. Metoda western blot.....	32
3.2.10. Određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda pri dvije različite temperature inkubacije.....	34
§ 4. REZULTATI	35
4.1. Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi.....	35

4.1.1. Rekombinantni plazmid pDM11.....	35
4.1.2. Određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o šaperonu HtpG i temperaturi	37
4.2. Utjecaj temperature na količine proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora	43
4.3. Utjecaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG na aktivnost proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi <i>in vivo</i>	48
4.3.1. Određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda	51
§ 5. RASPRAVA	53
5.1. Relativna kvantifikacija proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora i šaperonu HtpG pri dvije različite temperature	53
5.2. Utjecaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG na obranu od infekcije fagom lambda.....	56
§ 6. ZAKLJUČAK	58
§ 7. POPIS KRATICA.....	59
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	61
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora, temperaturi i šaperonu HtpG u bakteriji *Escherichia coli*

Lea Barbarić

Zbog učestalih napada bakteriofaga, veliki udio bakterija razvilo je specifičan obrambeni sustav adaptivne imunosti koji se naziva CRISPR-Cas. Sustav se sastoji od seta gena *cas* i lokusa CRISPR koji se sastoji od kratkih ponavljajućih sljedova između kojih se ugrađuju razmaknice koje potječu od strane DNA. U bakteriji *Escherichia coli* efikasnost zaštite bakterija od faga sustavom CRISPR-Cas ovisi o aktivnosti proteina Cas3 koja pak ovisi o temperaturi inkubacije i šaperonu HtpG. U ovom radu istraženo je utječe li šaperon HtpG na količinu proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i jačini promotora. Uz to, istraženo je da li promjene u konformaciji šaperona HtpG utječu na aktivnost proteina Cas3, odnosno na efikasnost zaštite od infekcije. Rezultati sugeriraju da šaperon HtpG utječe na funkcionalne količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi, dok točkaste mutacije u proteinu HtpG nemaju utjecaja na interakciju HtpG s proteinom Cas3. Jačina promotora za gen *cas3* je ključna i analiza količina proteina Cas3 je moguća samo nakon ekspresije s inducibilnog promotora.

(6 stranica, 18 slika, 14 tablica, 54 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: CRISPR-Cas, Cas3, temperatura, fag lambda, HtpG, *E. coli*

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

Neposredni voditelj: Damjan Mitić, mag. mol. biol.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
3. doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Datum pristupa ispitu: 15. 7. 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Determination of the amount of Cas3 protein depending on the strength of the promoter, temperature and chaperone HtpG in *Escherichia coli*

Lea Barbarić

Due to frequent bacteriophage attacks, a large group of bacteria have developed a specific adaptive immunity defense system called CRISPR-Cas. The system consists of a set of *cas* genes and CRISPR locus consisting of short repeats between which spacers derived from foreign DNA are inserted. In *Escherichia coli*, the effectiveness of immunity against phages depends on the activity of Cas3, which depends on the incubation temperature and HtpG chaperone. In this work, the influence of HtpG chaperone on the amount of Cas3 protein as a function of temperature and promoter strength was investigated. In addition, it was investigated whether conformational changes of HtpG affect the activity of Cas3, ie the effectiveness of the immunity against infections. The results suggest that chaperone HtpG affects functional amounts of Cas3 protein as a function of temperature, whereas point mutations in HtpG protein have no effect on the interaction of HtpG with Cas3. The strength of the promoter for the *cas3* gene is critical and analysis of the amount of Cas3 is only possible from an inducible promoter.

(63 pages, 18 figures, 14 tables, 54 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb.

Keywords: CRISPR-Cas, Cas3, temperature, phage lambda, HtpG, *E. coli*

Mentor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor

Assistant mentor: Damjan Mitić, mag. mol. biol.

Supervisor: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

2. Dr. Ivana Ivančić Baće., Associate Professor

3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Substitute: Dr. Branimir Bertoša, Associate Profesor

Date of exam: 15. 7. 2021.

§ 1. UVOD

Zbog učestalih napada bakteriofagima, veliki udio bakterija i arheja razvilo je specifičan obrambeni sustav adaptivne imunosti koji se naziva CRISPR-Cas. Sustav se sastoji od seta gena *cas* (engl. *CRISPR-associated*), koji se razlikuju ovisno o organizmu, i lokusa CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) koji se sastoji od kratkih ponavljajućih palindromskih sljedova duljine oko 30-40 parova baza između kojih se ugrađuju razmaknice koje potječu od strane virusne ili ekstrakromosomske DNA poput plazmida. Mehanizam djelovanja sustava se sastoji od tri faze: (1) adaptacija ili ugradnja razmaknica u lokus CRISPR pomoću proteina Cas1 i Cas2, (2) prepisivanje i sazrijevanje transkripta lokusa CRISPR što uključuje nastanak duge molekule pre-crRNA i njeno procesiranje u kratke molekule crRNA koje sadrže po jednu razmaknicu omeđenu ponavljajućim slijedom, i (3) interferencija, tj. prepoznavanje ciljne nukleinske kiseline (dvolančna DNA (dDNA), jednolančana DNA (jDNA) ili RNA) pomoću efektorskih proteina te njeno cijepanje nukleazom ili ometanje amplifikacije pomoću malih molekula crRNA.¹ Proteini Cas1 i Cas2 prisutni su u gotovo svim poznatim sustavima CRISPR-Cas, dok se ovisno o efektorskim proteinima, jedinstvenim genima i genskim strukturama za pojedine lokuse, sustav može kategorizirati u dvije velike klase, šest tipova te barem 19 podtipova.^{1,2} Klasa I, koja obuhvaća tipove I, III i IV, koristi multiproteinski kompleks za prepoznavanje ciljne sekvence i zasebnu nukleazu za njenu degradaciju, dok sustavi klase II, tipovi II, V i VI, sadrže samo jedan efektorski protein koji vrši obje funkcije.³ Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* pripada klasi I tipu I (podtip I-E). Multiproteinski kompleks Cascade (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) prepoznaje ciljnu sekvencu, odmotava dvostruku zavojnicu i regrutira nukleazu Cas3 na mjesto cijepanja nakon čega Cas3 uvodi jednolančane lomove u molekuli DNA.³

U novijim istraživanjima dokazano je da je u *E. coli* sustav CRISPR-Cas strogo ovisan o temperaturi te da su geni za kompleks Cascade i protein Cas3 pod transkripcijskom kontrolom proteina H-NS (engl. *histone-like nucleoid-structuring protein*) koji utišava njihovu ekspresiju.⁴ Pretraživanjem i identifikacijom gena *E. coli* koji su esencijalni za funkciju sustava CRISPR-Cas nađeno je da ATP-ovisan molekulski šaperon HtpG (engl. *high-temperature protein G*), homolog eukariotskog šaperona Hsp90, pospješuje efikasnost obrane od bakteriofaga, tj. djeluje

kao pozitivan regulator sustava na posttranslacijskoj razini.⁵ Delecijom gena *htpG* sustav CRISPR-Cas gubi svoju aktivnost dok se komplementacijom istog ta aktivnost u potpunosti vraća. Također je uočeno da smanjenjem količine proteina HtpG dolazi do slabije aktivnosti proteina Cas3 koji je esencijalan za pružanje adaptivne imunosti bakterijskim stanicama.⁵ Zanimljivo je da sustav CRISPR-Cas u *E. coli* nije reguliran samo genetički, već i temperaturno. Uočeno je da pri temperaturi inkubacije od 37 °C dolazi do inaktivacije proteina Cas3 i s time i gubitka efikasnosti u obrani od strane DNA.

Cilj ovog istraživanja je odrediti kako temperatura, jačina promotora i šaperon HtpG utječu na količine proteina Cas3 u različitim delecijским sojevima bakterije *E. coli* da bi se bolje razumjela temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i regulacija sustav CRISPR-Cas. U tu svrhu istražen je utjecaj ekspresije šaperona HtpG na količine proteina Cas3 u različitim delecijским sojevima *E. coli*, divlji tip, Δhns , $\Delta htpG$ i $\Delta hns\Delta htpG$, u ovisnosti o temperaturi inkubiranja stanica i jačine promotora s kojeg se prepisuje gen *cas3*.

Drugi cilj je istražiti utjecaj točkastih mutacija u genu *htpG* na regulaciju i aktivaciju proteina Cas3, odnosno njihov utjecaj na obranu od infekcije fagom lambda pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Rezultati ovog rada pokušati će dodatno pojasniti utjecaj temperature i šaperona HtpG na funkcionalne količine proteina Cas3 u različitim bakterijskim sojeva *E. coli*. Također pokazati će se da li ciljani aminokiselinski ostaci u genu *htpG*, supstituirani ciljanom mutagenom, imaju utjecaj na interakciju genskog produkta s proteinom Cas3 i/ili uzrokuju konformacijsku promjenu u veznoj ili ATPaznoj domeni.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas je dvokomponentni sustav adaptivne imunosti prisutan u arhejama i bakterijama uključen u obranu od stranih genetičkih elemenata, najčešće virusne i plazmidne DNA. Sustav se sastoji od seta gena *cas* (engl. *CRISPR-associated*), koji se razlikuju ovisno o organizmu, i lokusa CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) koji se sastoji od kratkih ponavljajućih palindromskih sljedova duljine oko 30-40 parova baza između kojih se ugrađuju razmaknice koje potječu od strane DNA. Geni *cas* u bakteriji *E. coli* nalaze se uzvodno od lokusa CRISPR. Između gena i lokusa se još nalazi i vodeća regija (engl. *leader*), unutar koje se nalazi promotor s kojeg započinje transkripcija lokusa CRISPR.

Sustav je prvi put uočen 1987. godine kada su, istraživajući sekvencu gena izoenzima alkalne fosfataze *iap* u genomu *E. coli* K-12, nizvodno od njega Ishino i suradnici sa Sveučilišta u Osaki primijetili ponavljanja od 29 nukleotida međusobno odvojenih nepovezanim, neponavljajućim kratkim nukleotidnim sljedovima duljine 32 pb (razmaknice, engl. *spacers*).^{6,7} Organizacija razmaknica je bila neobična te nisu znali koja je njihova funkcija.

Najveći napredak u razumijevanju lokusa CRISPR dogodilo se kada je uočeno da uz lokus se pojavljuje set homolognih gena, tzv. gena *cas* koji su sadržavali helikazne i nukleazne motive.⁸

Tek 2005. godine pokazano je da neke razmaknice potječu od DNA faga i ekstrakromosomalne DNA poput plazmida.^{9,10} Ispostavilo se da su razmaknice zapravo fragmenti virusne DNA faga koji su prethodno pokušali inficirati stanicu. To je ukazivalo da bi sustav CRISPR-Cas mogao imati ulogu u adaptivnoj imunosti kod bakterija.¹¹

U 2008. godini identificiran je kompleks proteina Cas nazvan Cascade (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) u *E. coli* koji cijepa prekursorsku molekulu CRISPR RNA (engl. *pre-crRNA*) u male zrele molekule crRNA koji sadrže razmaknice.¹² Također je utvrđeno da su glavni elementi sustava kompleks Cascade, crRNA i jedna helikaza/nukleaza, tzv. protein Cas3 esencijalni da bi došlo do efikasne obrane od virusne DNA u bakterijskom domaćinu.

Uređivanjem lokusa CRISPR genetičkim inženjerstvom, pokazano je da obje orijentacije crRNA (*sense* i *antisense*) sudjeluju u pružanje imunosti, tj. da crRNA u konačnici cilja dvolančanu DNA¹² što je i potvrđeno 2010. godine studijom na bakteriji *Streptococcus thermophilus*.¹³

Predmet najviše istraživanja je sustav CRISPR-Cas u bakteriji *Streptococcus pyogenes* koji se oslanja na protein Cas9. Endonukleaza Cas9 sastoji se od 4 komponente koje uključuju dvije male molekule RNA: crRNA i tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*).¹⁴

Doudna i Charpentier rekonstruirale su Cas9 u dvokomponentni sustav koji sadrži samo jednu molekulu RNA, vodeća ili sgRNA (engl. *single-guide RNA*) koja u kombinaciji s Cas9 pronalazi i cijepa molekulu DNA koja je specifično ciljana molekulom sgRNA.¹⁵ To znači da manipulacijom nukleotidnog slijeda vodeće RNA moguće je ciljano cijepati bilo koju DNA sekvencu. To otkriće je bilo toliko značajno da je znanstvenicama dodijeljena Nobelova nagrada za kemiju 2020. godine.

2.2. Molekularni mehanizmi: adaptacija, sazrijevanje i interferencija

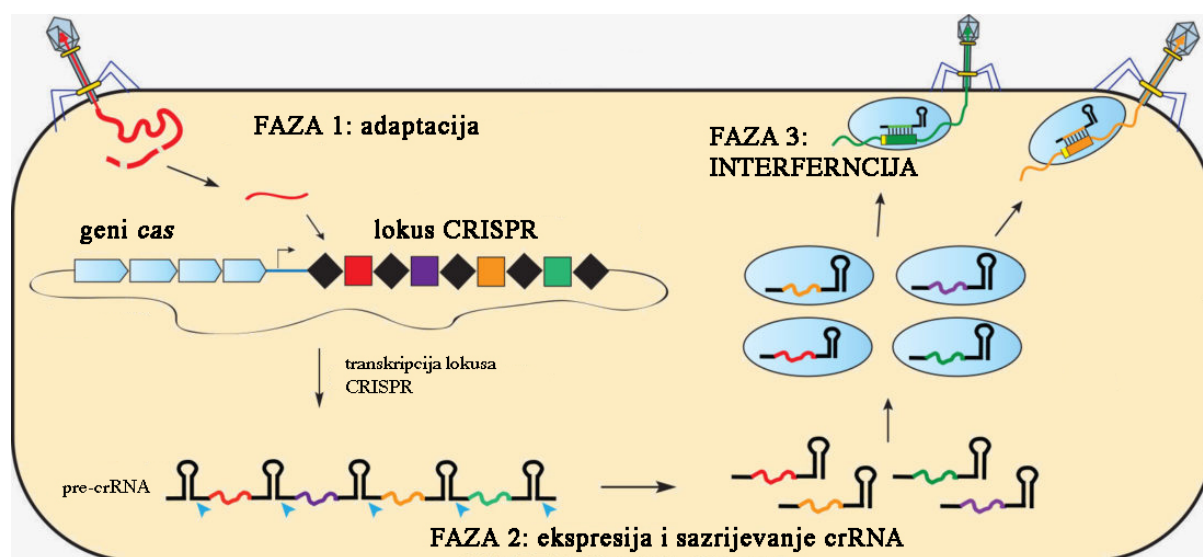
Prilikom napada bakteriofaga, prva faza imunskog odgovora je uhvatiti DNA faga te ju ugraditi u lokus CRISPR u obliku razmaknica. Proteini Cas1 i Cas2 konzervirani su u skoro svim klasama i tipovima sustava što ukazuje da sudjeluju u akviziciji razmaknica.¹⁶ Iako se proteini Cas1 između različitih organizama domaćina razlikuju po aminokiselinskom slijedu, njihove kristalne strukture su vrlo slične i svi su metal-ovisne nukleaze koje vežu DNA.¹⁷ Proteini Cas2 posjeduju endoribonukleazne aktivnosti te specifično cijepanju ili jednolančanu RNA¹⁸ ili dvolančanu DNA¹⁹. Bioinformatičkom analizom dijelova genoma faga koji su izrezani kao razmaknice, nazvani protorazmaknice (engl. *protospacer*), uočeno je da nisu nasumični već se nalaze u blizini kratkih DNA sekvenci (3-5 nukleotida) nazvanih PAM (engl. *protospacer adjacent motif*). Prilikom ugradnje razmaknice u lokus CRISPR ne dolazi do ugradnje sekvence PAM da bi se mogla razlikovati strana DNA od DNA domaćina.

Idući korak je generiranje crRNA. crRNA se inicijalno prepisuje kao dio dugog transkripta (pre-crRNA) koji obuhvaća veći dio niza lokusa CRISPR. Dugi transkript je tada pocijepan proteinima Cas da bi nastale male zrele molekule crRNA.²⁰ Mehanizam cijepanja pre-crRNA razlikuje se između sustava CRISPR-Cas. Novonastala crRNA asocira s proteinima Cas te nastaje ribonukleoproteinski kompleks koji prepoznaje ciljanu sekvencu DNA pri čemu

nema preferencije za kodirajući, odnosno lanac kalup molekule DNA.¹³ U sustavima tipa I-E molekula crRNA se veže za peteročlani kompleks proteina Cas zvan Cascade.

Posljednji korak je interferencija, odnosno prepoznavanje ciljne sekvence. U sustavima tipa I za interferenciju je neophodno prepoznavanje sekvence PAM na lancu komplementarnom crRNA i njegovo sparivanje s crRNA. Komplementarno sparivanje lanaca strane DNA i crRNA te sekvence PAM signalizira konformacijsku promjenu u kompleksu Cascade te dolazi do regrutiranja endonukleaze Cas3 za razgradnju DNA (Slika 1). Sustavi tipa II sadrže samo jedan dvokomponentni protein, Cas9, koji veže i cijepa stranu DNA. Proteinu Cas9 su potrebne i crRNA i tracrRNA da bi mogao izvršiti svoju funkciju dok cijepanje DNA se vrši endonukleaznom domenom sličnom RNAazi H.²¹ Komplementarnost sekvence PAM je nužna ali prepoznavanje se događa na istom lancu kao i crRNA (obrnuto od sustava tipa I). Sustavi tipa III zahtijevaju šest ili sedam proteina Cas koji se vežu na crRNA.²²

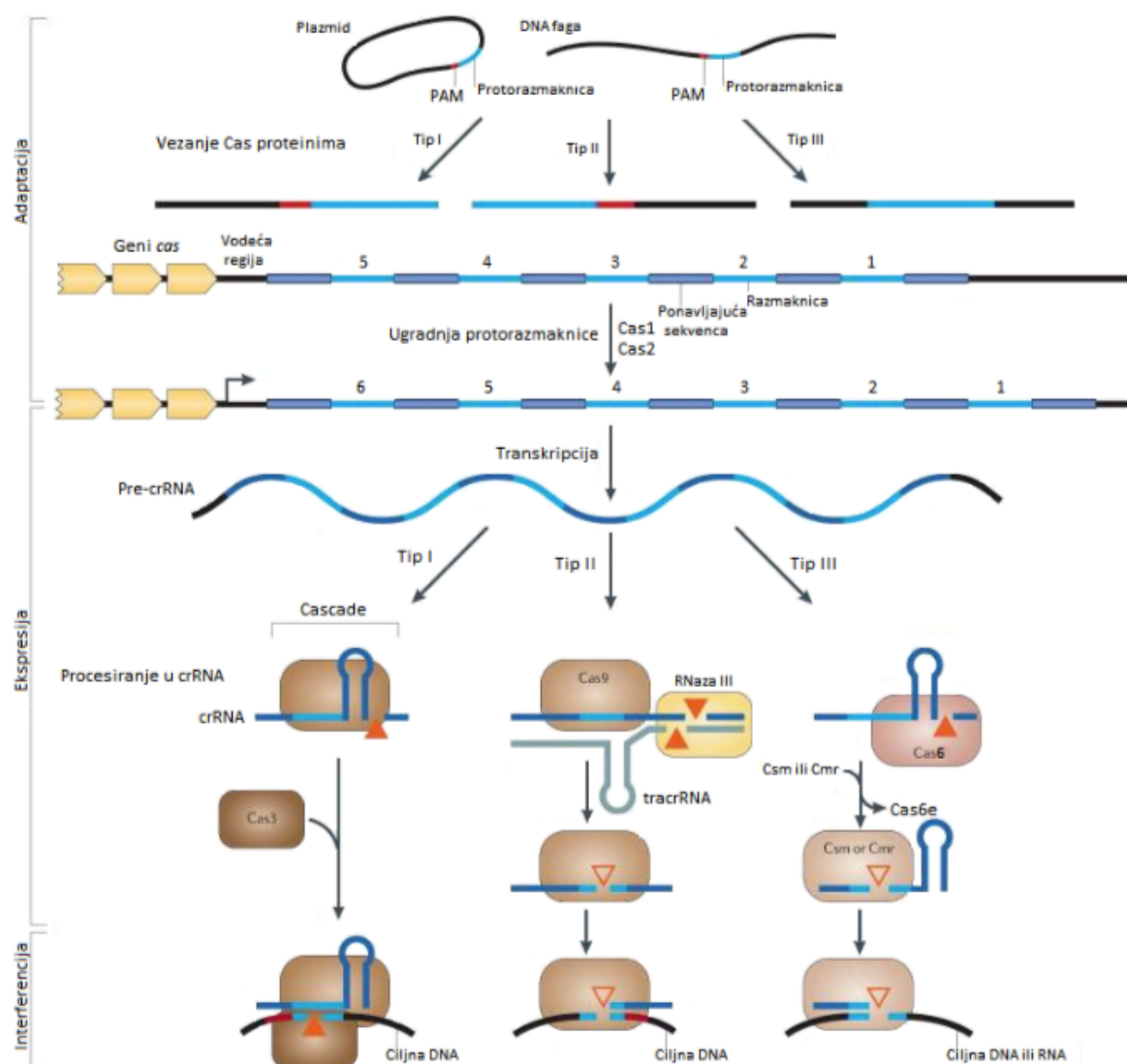
Da ne bi došlo do cijepanja vlastite DNA, zrela crRNA uz razmaknice sadrži i dio ponavljajućeg slijeda lokusa CRISPR što sprječava da sustav CRISPR-Cas prepozna vlastiti kromosom kao cilj za razgradnju.²³



Slika 1. Prikaz mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas na infekciju stranom DNA. Prikazani su geni *cas* i lokus CRISPR između kojih se nalazi vodeća regija unutar koje se nalazi promotor s kojeg započinje prepisivanje lokusa CRISPR. U obliku crnih rombova prikazani su ponavljajući sljedovi dok su šarenim kvadratićima prikazane razmaknice. Tijekom adaptacije (faza 1) fragmenti strane DNA se ugrađuju u lokus CRISPR u obliku razmaknica. U fazi 2 dolazi do ekspresije dugačke pre-crRNA i njenog sazrijevanja u male molekule crRNA od kojih svaka sadrži jednu razmaknicu. Prilikom interferencije, crRNA vežu proteini Cas koji pronalaze ciljnu protorazmaknicu i nakon komplementarnog sparivanja cijepaju stranu DNA. Preuzeto i doradeno iz reference 24.

2.3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas

Sustavi CRISPR-Cas klasificirani su u dvije klase prema proteinima Cas uključenih u interferenciju. Klasa I koristi kompleks višestrukih proteina Cas za razgradnju strane DNA dok klasa II koristi samo jedan veliki protein u iste svrhe. Klasa I se onda dijeli na tipove I, III i IV, dok se klasa II dijeli na tipove II, V i VI.²⁵ Šest tipova sustav se onda još dijeli na 19 podtipova ovisno o prepoznatljivim proteinima Cas (npr. I-A, I-B, I-C, itd.). Proteini Cas1 i Cas2 prisutni su u skoro svim sustavima CRISPR-Cas za koje se smatra da su aktivni.²⁶



Slika 2. Prikaz tipova sustava CRISPR-Cas, tip I, II i III, koji se razlikuju u procesiranju pre-crRNA i jedinstvenim efektorskim proteinima. U tipu I protein Cas3 vrši cijepanje ciljane DNA dok je crRNA stabilizirana kompleksom Cascade, u tipu II protein Cas9 vrši obje funkcije dok je u tipu III protein Cas6 odgovoran za funkciju sazrijevanja crRNA nakon čega funkciju preuzima kompleks Cms/Cmr. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 26.

Tipični lokusi sustava tipa I sadrže gen *cas3* koji kodira veliki protein s odvojenim helikaznim i DNaznim aktivnostima, uz gene koji kodiraju za komplekse proteina poput kompleksa Cascade.²⁷ Među proteinima koji sačinjavaju kompleks Cascade identificiran je protein koji spada u klasu proteina RAMP (engl. *receptor activity-modifying protein*) s RNA endonukleaznom aktivnošću kao glavni enzim koji katalizira procesiranje duge pre-crRNA.²⁸

Sustavi CRISPR-Cas tipa I ciljaju dvolančanu DNA te ciljano cijepanje kataliziraju HD (histidin-aspartat) domene proteina Cas3.²⁷

U sustavima tipa II dovoljan je jedinstveni, veliki protein Cas9 za generiranje crRNA i cijepanje ciljane DNA, pored proteina Cas1 i Cas2 nužnih za adaptaciju. Cas9 sadrži najmanje dvije nukleazne domene, nalik nukleazi RuvC, pri kraju aminokiselinskog slijeda, i HNH (histidin-asparagin-histidin) nukleaznoj domeni u sredini aminokiselinskog slijeda.²⁶ Funkcija tih domena je cijepanje ciljane molekule DNA. Prilikom sazrijevanja pre-crRNA nastaje dupleks između tracrRNA i dijela ponavljanju unutar crRNA te dolazi do cijepanja unutar te regije. Sazrijevanje katalizira enzim domaćina, RNaza III, koja specifično cijepa dvolančanu RNA.²⁹ Sustavi tipa III za stabilizaciju i sazrijevanje crRNA koriste komplekse slične kompleksu Cascade, te se mogu dalje podijeliti u sustave tipa III-A i III-B. Sustavi tipa III-A mogu cijepati kružnu DNA poput plazmida, dok sustavi III-B mogu ciljati molekule RNA. Jedine potvrđene RNA endonukleaze, osim proteina Cas2, su protein obitelji RAMP te sustavi tipa III uključuju najmanje dva proteina RAMP uz protein Cas6 koji je uključen procesiranje transkripata (Slika 2).²⁶

2.4. Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Sustav CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *Escherichia coli* sastoji se od osam gena *cas* smještenih uzvodno od lokusa CRISPR. Prvo se nalazi gen *cas3* nakon koje slijedi kratka intergenska regija, pa geni *casABCDEI2* pod regulacijom operona, vodeća regija i na kraju sam lokus CRISPR. Geni *casABCDE* kodiraju za proteine koji formiraju podjedinice kompleksa Cascade²⁸, dok proteini Cas1 i Cas2 sudjeluju u procesu adaptacije i formiraju kompleks Cas1-Cas2^{16,26} (Slika 3).



Slika 3. Organizacija gena *cas* i lokusa CRISPR u sustavu CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E. coli*. Preuzeto i prilagođeno iz ref. 30.

Faza adaptacije započinje detekcijom invazivnog genetičkog materijala. Cas1 i Cas2 su neophodni za akviziciju i umetanje razmaknice u lokus CRISPR kao što je slučaj kod većine sustava.¹⁶ Ti proteini tvore kompleks koji je građen od dva dimera Cas1 koji omeđuju jedan središnji dimer Cas2 (Cas1₂-Cas2₂-Cas1₂). Taj kompleks prepoznaje i odabire fragment DNA bakteriofaga (protorazmaknica) vodeći se sekvencom PAM. Nakon prepoznavanja protorazmaknice, strani fragment DNA se izrezuje pomoću nukleazne aktivnosti proteina Cas1.³¹ Proučavanjem kristalne strukture kompleksa Cas1-Cas2 u kompleksu s protorazmaknicom uočeno je da fragment DNA na 3' krajevima sadrže jednolančane stršće krajeve sa slobodnim hidroksilnim skupinama. Svaki dimer Cas1 koristi jednu hidroksilnu skupinu za kataliziranje integracije protorazmaknice u lokus CRISPR.^{16,32} Tako se omogućuje pozicioniranje jednog dimera Cas1 i jedne 3' OH skupine u blizini 5' fosfatne skupine prvog nukleotida ponavljajućeg slijeda lokusa CRISPR kodirajućeg lanca te dolazi do nukleofilnog napada i međusobne ligacije. U slijedećem koraku dolazi do nukleofilnog napada preostalog dimera Cas1 i 3' OH skupine protorazmaknice na 5' fosfatnu skupinu nekodirajućeg lanca pri čemu dolazi do intregacije proturazmaknice u lokus CRISPR omeđene jednolančanim ponavljanjima.³³ DNA-polimeraza I nadopunjuje preostale praznine i DNA ligaza dovršava proces uz koji dolazi i do replikacije prvog ponavljajućeg slijeda.^{16,34} Taj proces poznat je pod nazivom naivna adaptacija (engl. *naive*) i podrazumijeva akviziciju nove razmaknice od stranog genetičkog elementa na koji ne postoji prethodni imunitet. Zbog mnogih mutacija u genomima bakteriofaga, razmaknica strane DNA koja je već ugrađena u genom domaćina stimulira ugradnju novih dodatnih razmaknica iste molekule u procesu zvanom pripremljena adaptacija (engl. *primed*).³² Za ovaj oblik adaptacije, osim proteina Cas1 i Cas2, potrebni su i ostali proteini Cas uključeni u interferenciju. Uz Cas1, i Cas2 je nužan da bi cijeli proces adaptacije funkcionirao. Cas2 ima važnu funkciju pozicioniranja dimera Cas1 na ispravnu udaljenost da bi se dobila proturazmaknica duljine točko 33 nukleotida.³⁵

Rezultat adaptacije je novi fragment strane DNA ugrađen u lokus CRISPR. Kada dođe do napada istog bakteriofaga, bakterijski domaćin započinje prepisivanje gena *cas* i lokusa CRISPR. Nastaje multienzimski kompleks Cascade koji je građen od jednog monomera Cse1, dva Cse2, šest Cas7 te jednog Cas5 i Cas6e.^{28,36} Lokus CRISPR prepisuje se kao dugačka pre-crRNA pri čemu ponavljanja poprimaju strukturu ukosnice (engl. *hairpin*) što signalizira kompleksu Cascade da se može vezati. Taj dugački transkript procesira protein Cas6e pri čemu

nastaju male zrele molekule crRNA te se svaka sastoji od 7 nukleotida 5' ponavljajućeg slijeda, 33 nukleotida razmaknice i 21 nukleotida 3' ponavljajućeg slijeda.³⁶

U fazi interferencije, nastali ribonukleoproteinski kompleks Cascade-crRNA prepoznaje sekvencu PAM u stranoj DNA pomoću proteina Cse1. Sparivanjem crRNA i komplementarnog lanca strane DNA dolazi do formiranja tzv. R-omče (engl. *R-loop*) što signalizira i regrutira endonukleazu Cas3.³⁷ HD-nukleazna domena proteina Cas3, koja cijepa jednolančanu DNA, urezuje i degradira nekomplementarni lanac DNA u 3' → 5' smjeru. Njegova ATP-ovisna helikazna domena istiskuje stranu DNA iz kompleksa Cascade-crRNA pri čemu se generira nova jednolančana meta dostupna za razgradnju.^{37,38}

Mutacijama u regija PAM ili regijama homologije razmaknica i proturazmaknica, strani genetički elementi mogu izbjeći prepoznavanje sustava CRISPR-Cas, ali adaptivna imunost u bakterijama je i dalje efikasna zbog akvizicije više razmaknica iste molekule strane DNA, odnosno pripremljene adaptacije, čime se osigurava uspješna obrana od infekcije.³²

2.4.1. Cas3

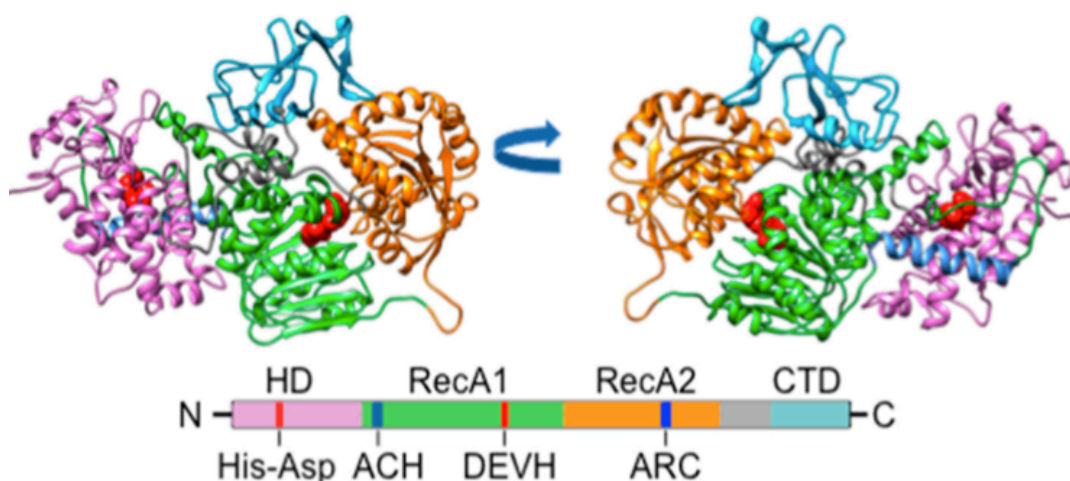
Protein Cas3 je esencijalna komponentna sustava CRISPR-Cas u *E. coli* te je njegova važnost otkrivena upravo u ovom organizmu. Cas3 je ATP-ovisna helikaza/translokaza koja prepoznaje jednolančanu DNA, spojena s HD-nukleaznom domenom.³⁹ Nukleazna i translokazna domena Cas3 razgrađuju ciljnu molekulu DNA cijepajući ju na kraće fragmente duljine 10-ak nukleotida poništavajući stranu DNA kao dio procesa interferencije.

N-terminalna HD-nukleazna domena, koja ima funkciju metal-ovisne fosfohidrolaze čiji je substrat jednolančana DNA, fuzionirana je s dvije helikazne podjedinice slične proteinu RecA karakteristične za helikaze superfamily-2 (SF2).⁴⁰ Njihovo surađivanje osigurava ATP-ovisnu translokaciju i razgradnju jednolančane DNA.²⁷ Aktivno mjesto HD-domene sadrži nekoliko konzerviranih elemenata koji su uključeni u koordinaciju jDNA iz domena RecA, poput izražene hidrofilne α -zavojnice i tirozinskih/triptofanskih bočnih ogranaka lociranih na granici RecA i HD-domene. Pronađeno je da funkcija HD-domene može biti stimulirana metalnim ionima poput kalcija (PDB: 3S4L), mangana⁴¹ i željeza⁴². Kao i mnoge helikaze, Cas3 sadrži i C-terminalnu domenu čije funkcije još nisu razjašnjene (Slika 4).

Da bi nukleazna aktivnost Cas3 bila funkcionalna, prvo je nužno da kompleks Cascade provjeri ciljnu DNA. Kompleks Cascade identificira sekvencu PAM pri čemu dolazi do stabilizacije i sparivanja komplementarnih lanaca crRNA-DNA. Sparivanjem lanaca nastaje R-

omča koja dovodi do promjene konformacije proteina Cse1 u kompleksu Cascade te dolazi do izlaganja regije koja u interakciji s Cas3 aktivira katalitičko cijepanje jLDNA.⁴³ Pomoću analize spektrometrijom masa spregnute s izmjenom vodika i deuterija, pronađena je α -zavojnica H1 u regiji Cse1 kao mjesto pristajanja i interakcije s proteinom Cas3 te je moguće da služi kao molekularni okidač za aktivaciju nukleazne HD-domene Cas3.⁴⁴

Kada se Cas3 veže na ciljnu jLDNA, hidrolizom ATP-a (engl. *adenosine triphosphate*) se može pomicati po DNA i odmatati lance helikaznom aktivnošću. Uz to, prilikom translokacije može ukloniti ostale proteine vezane na molekulu DNA što je karakteristično za obitelj translokaza.⁴⁵ Prvo se degradira jLDNA koja nije ciljane crRNA (engl. *non-target singlestrand DNA, NTS-DNA*). Pošto prilikom asocijacije Cas3 s regijom Cse1 kompleksa Cascade i cijepanja NTS-DNA dolazi do odmicanja DNA iza R-omče i nukleazne domene, nakon početnog urezivanja dolazi do translokacije u 3' → 5' smjeru mehanizmom namotavanja što omogućuje nastajanje jednolančanih praznina. Hvatanju molekule DNA i početku translokacije pomaže rascjep bogat argininom, visoko konzerviran u proteinima Cas3 među vrstama, pri čemu se DNA pomiče bliže domenama RecA koje kataliziraju njeno odmatanje hidrolizom ATP-a i usmjeravaju ciljani lanac prema HD-domeni. Namotavanjem DNA dolazi do akumulacije torzija među lancima što aktivira nukleaznu domenu te pritom dolazi do procesivnog cijepanja DNA u manje fragmente i disocijacije kompleksa Cascade s proturazmaknice.^{40,46} Nastale fragmente strane DNA mogu koristiti proteini Cas1 i Cas2 kao razmaknice za pripremljenu adaptaciju.^{16,47}



Slika 4. Kristalna struktura proteina Cas3 u *E. coli* pretpostavljena prema modelima riješenih struktura Cas3 iz *Thermobaculum terrenum* (PDB: 4Q2C) i *Thermobifida fusca* (PDB: 4QQW, 4QQX i 4QQY) pomoću programa *Phyre2*. Struktura je prikazana u dvije orijentacije. N-terminalna HD-domena prikazana je ružičastom bojom, domene RecA1 i RecA2 prikazane su zelenom, odnosno narančastom bojom, a C-terminalna domena (CTD) plavom bojom. Aktivno mjesto (His-Asp) HD-domene i aminokiselinski ostaci (DEVH) domene RecA1 koji sudjeluju u hidrolizi ATP-a prikazani su crvenim kuglicama, dok su hidrofилна zavojnica (ACH) i regija bogata argininom (ARC) označene plavom bojom. Preuzeto iz ref. 40.

2.5. Regulacija sustava CRISPR-Cas I-E

Regulacija sustava CRISPR-Cas u *E. coli* nije još uvijek u potpunosti razjašnjena. Sustav je snažno utišan proteinom H-NS koji je veoma zastupljen u prokariotskim stanicama i služi za organizaciju genomske DNA. Osim njega, negativni regulator transkripcije sustava je i protein cAMP-CRP (engl. *cAMP receptor protein*) i protein StpA (engl. *suppressor of td phenotype A*)³⁰, ali zanimljivo je da cAMP-CRP djeluje kao pozitivan regulator proteina Cas3⁴⁸. Protein LeuO (engl. *transcriptional activator of leuABCD operon*) je pozitivan regulator sustava i djeluje antagonistički proteinu H-NS aktivacijom gena *cas*.⁴ Šaperon HtpG djeluje kao posttranslacijski aktivator koji pomaže pri smatanju i agregaciji proteina Cas3.⁴⁸

Osim raznim proteinima, sustav je reguliran i temperaturom.

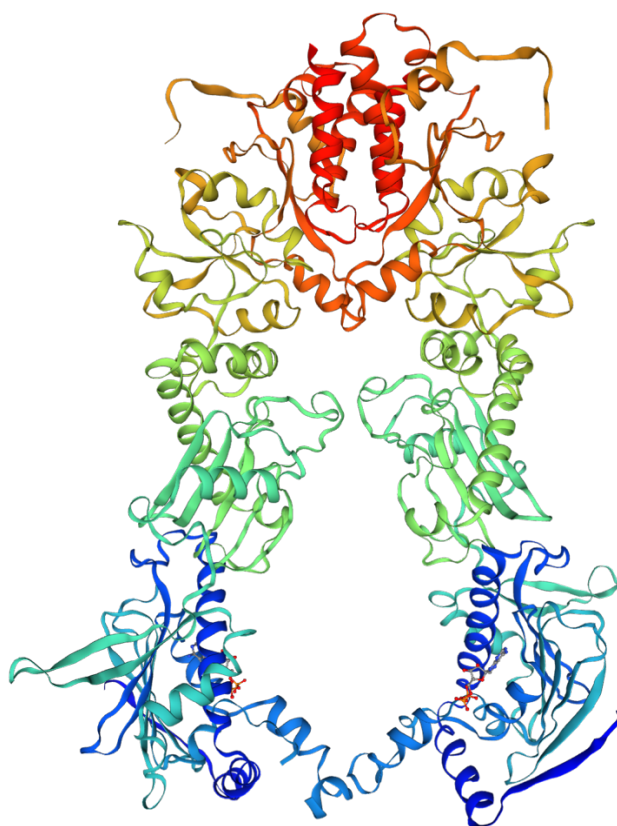
2.5.1. *Histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS)*

U *in vitro* uvjetima, transkripcija gena *cas* snažno je utišana proteinom H-NS koji je globalni regulator u mnogim Gram-negativnim bakterijama. Uglavnom djeluje kao represor u uvjetima stresa ili promjenama u okolišu, poput temperature, pH, udjelu kisika i/ili osmolalnosti.⁴⁸ U *E. coli*, H-NS sprječava transkripciju lokusa CRISPR i gena koji kodiraju za kompleks Cascade i Cas1-Cas2 vežući se na intragensku regiju u kojoj se nalazi promotor P_{cas} . Uz to, sprječava i transkripciju gena *cas3* vežući se na njegov promotor. Delecijom gena *hns* (Δhns) iz bakterijskih stanica koje sadrže razmaknicu anti-lambda T3 ($\lambda T3$) u lokusu CRISPR, uočena je povećana rezistencija na infekciju fagom lambda.⁴

2.5.2. *High temperature protein G (HtpG)*

Protein HtpG je bakterijski šaperon koji pripada obitelji proteina Hsp90 i spada u skupinu visoko konzerviranih ATP-ovisnih šaperona koji imaju funkciju pravilno smatati i modelirati proteinske supstrate. HtpG služi očuvanju funkcionalnih količina proteina Cas3 u *E. coli* te pomaže pri njegovom smatanju i stabilizaciji. Gen *htpG* nije esencijalan u bakteriji *E. coli* te je njegova povezanost s proteinom Cas3 otkrivena u delecijским stanicama $\Delta htpG$ pri čemu je sustav izgubio svoju sposobnost obrane od infekcije fagom lambda pri 32 °C.⁵ Njegova odsutnost može se nadomjestiti prekomjernom ekspresijom HtpG ili Cas3 s plazmida kada dolazi do vraćanja rezistencije na 32 °C, dok je na temperaturi od 37 °C taj odnos malo kompliciraniji.⁴⁸ To ukazuje da sustav treba HtpG da bi funkcionirao pri višim temperaturama iako njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena. Ta funkcija je uočena samo u bakteriji *E. coli* dok je u drugim bakterijama HtpG prisutan samo u specifičnim uvjetima.⁴⁹

Šaperon HtpG sadrži 624 aminokiseline te njegova molekulska masa iznosi 71,4 kDa. Aktivni protein nalazi se u stanicama u homodimernom obliku te se dimerizacija odvija na C-terminalnoj domeni (Slika 5). Na N-terminalnoj domeni nalazi se ATP-vezna i ATPazna domena slična proteinu Hsp90.⁵⁰

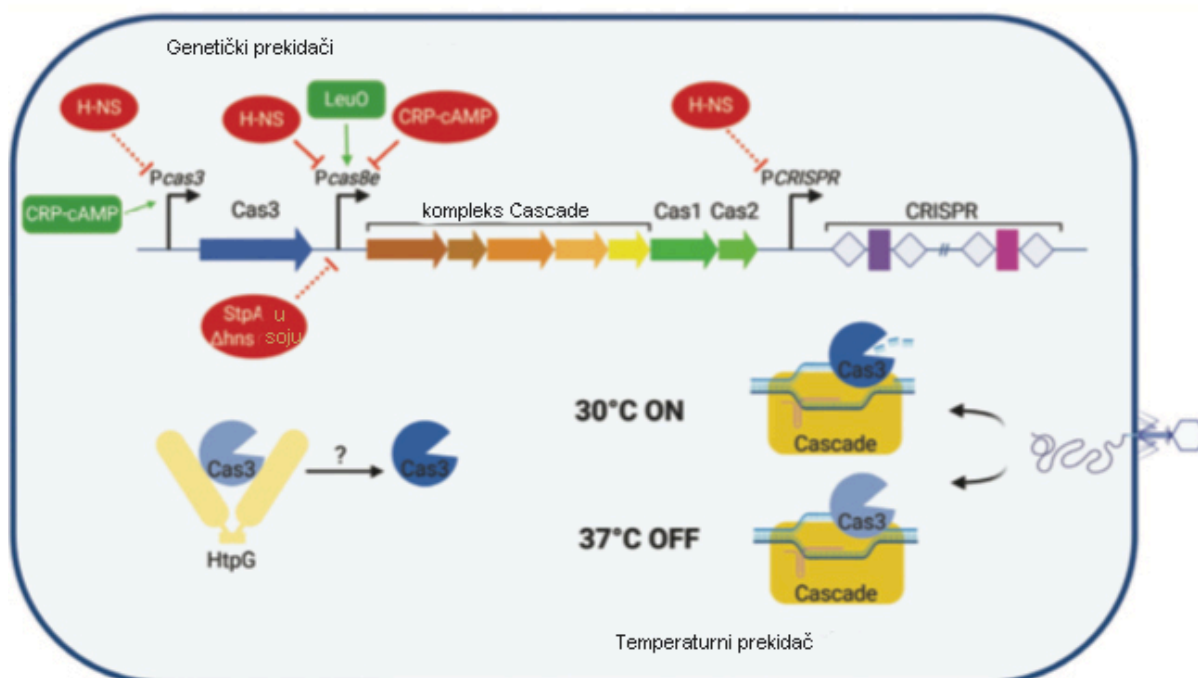


Slika 5. Kristalna struktura proteina HtpG u homodimernom obliku u kompleksu s molekulom ADP-a (PDB: 2IOP). Plavom bojom označen je N-terminalni kraj proteina na kojem se nalazi ATP-vezna domena, dok je crvenom bojom označen C-terminalni kraj. Preuzeto iz ref. 51.

2.5.3. Temperaturno uvjetovana osjetljivost proteina Cas3

U prijašnjim istraživanjima, uočeno je da je efikasnost obrane od infekcije faga lambda sustavom CRISPR-Cas u *E. coli* strogo ovisna o temperaturi. Pokazalo se da delecijom gena *hns* (Δhns) u soju *E. coli* koji sadrži anti-lambda razmaknicu T3 dolazi do znatnih povećanja u razini transkripata *cas3*, pogotovo u stacionarnoj fazi rasta bakterijskih stanica, i efikasnosti u obrani od strane DNA na 30 °C.⁴⁸ Ipak, na 37 °C da bi sustav efikasno funkcionirao protiv infekcije faga lambda, nije dovoljno regulirati sustav putem proteina H-NS i cAMP-CPR⁴⁸, već je potrebno pojačati ekspresiju Cas3 (Slika 6).⁴ Pretpostavljeno je da nestabilnost proteina Cas3 ili manjak njegovih količina u stanicama dovodi do temperaturne ovisnosti sustava što bi

značilo da je upravo Cas3 limitirajući faktor u obrani od strane DNA.⁴ Nije u potpunosti poznato da li je protein Cas3 nestabilan pri višim temperaturama ili dolazi do promjene u njegovoj konformaciji i/ili aktivnosti, ali potreban mu je šaperon HtpG za održavanje njegove funkcije iako njegova uloga nije do kraja razjašnjena.⁵ Novija istraživanja ukazuju da dolazi do konformacijske promjene proteina Cas3 na 37 °C pri čemu se Trp406 pomiče u tunel gdje prolazi jldDNA i na taj način ometa njen dolazak do nukleaznog centra.⁴⁰ Predloženo je da temperatura inkubacije služi kao prekidač koji indirektno aktivira, odnosno deaktivira sustav CRISPR-Cas, s obzirom da je protein Cas3 pri 30 °C aktivan, a pri 37 °C neaktivan kada je eksprimiran s vlastitog promotora.⁴⁸



Slika 6. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E u *E. coli*. Prikazane su uloge regulatornih proteina H-NS, LeuO, CRP i StpA koji služe kao genetički prekidači koji reguliraju ekspresiju komponenti sustava, dok temperatura inkubacije ima ulogu prekidača u aktivaciji sustava CRISPR-Cas u obrani od infekcije faga. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 48.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Sojevi i plazmidi

Za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i šaperonu HtpG u bakteriji *E. coli* korištena su četiri delecijaska soja *E. coli* K-12, divlji tip, Δhns , $\Delta htpG$ i $\Delta hns\Delta htpG$, prikazani u Tablici 1. Sva četiri soja u kromosomu sadrže gen *cas3* obilježen histidinskim privjeskom pod uvedenim inducibilnim arabinoznom promotorom araBAD (P_{BAD}) zbog kojeg se ekspresija inducira 0,2 %-tnom otopinom L-arabinoze. Insercijom His-Cas3 u kromosom *E. coli* ugrađena je i kanamicinska kazeta za lakšu selekciju stanica koje sadrže željenu promjenu. Histidinski privjesak na proteinu Cas3 je uveden da bi se njegova količina mogla ispravno i specifično kvantificirati metodom *western blot* koristeći antitijela koja prepoznaju histidinski privjesak. Sojevi su transformirani plazmidima pDM11, koji ekspirira divlji tip šaperona HtpG u vektoru pMR18, i praznim vektorom pMR18 koji služi kao negativna kontrola, a prikazani su u Tablici 2. pMR18 (izvor: M. Radovčić) je hibridni plazmid koji se sastoji od dijelova komercijalnih plazmida pBAD i pCDF-1b te nosi gen za otpornost na streptomycin (Slika 7). Plazmid također sadrži inducibilni promotor araBAD (P_{BAD}). Nužno je da protein HtpG ekspimiran s plazmida ne sadrži histidinski privjesak da ne bi došlo do ometanja detekcije prilikom određivanja količine proteina Cas3.

Tablica 1. Sojevi *E. coli* K-12 korišteni za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i šaperonu HtpG

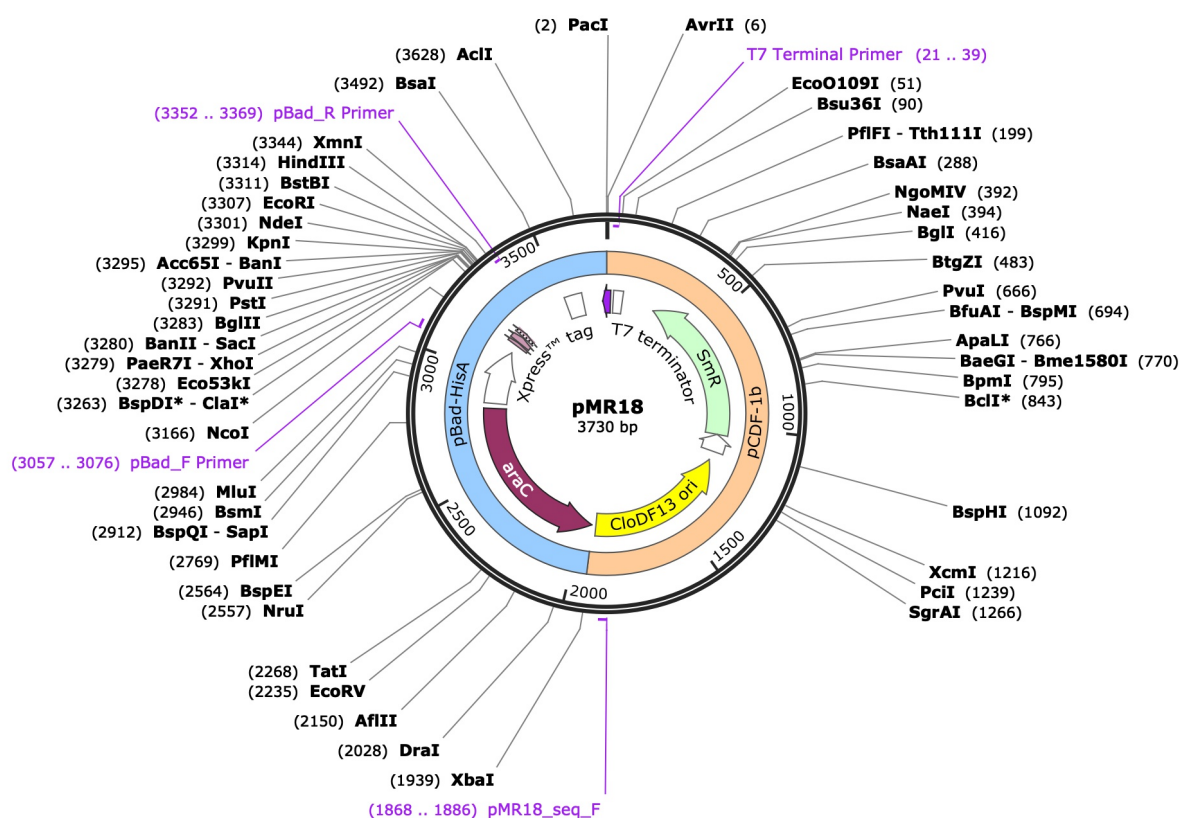
Sojevi	Genotip	Izvor
IIB1088	BW25113* + $P_{BAD}6xHis-cas3::kan$	I. Ivančić Baće
IIB1103	BW25113* + $P_{BAD}6xHis-cas3::kan \Delta hns::cat$	I. Ivančić Baće
IIB1104	BW25113* + $P_{BAD}6xHis-cas3::kan \Delta htpG::FRT$	I. Ivančić Baće

IIB1105	BW25113* + P _{BAD} 6xHis-cas3::kan Δ <i>hns</i> ::cat Δ <i>htpG</i> ::FRT	I. Ivančić Baće
---------	---------------------------------------------------------------------------------------	-----------------

*BW25113 genotip: F⁻ *rrnB* Δ*lacZ4748* (::rrnB-3) *hsdR514* Δ(*araBAD*) 567 Δ(*rhaBAD*) 568 *rph-1* λ⁻

Tablica 2. Plazmidni vektori korišteni za transformaciju delecijjskih sojeva *E. coli* K-12 za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o šaperonu HtpG i temperaturi

Plazmid	Opis	Izvor
pMR18	hibridni plazmid pCDF-1b-pBAD	M. Radovčić
pDM11	<i>htpG</i> u pMR18	L. B.



Slika 7. Mapa hibridnog plazmida pMR18 koji se sastoji od dijelova plazmida pBAD i pCDF-1b.

Za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i jačini promotora u bakteriji *E. coli* korištena su četiri slična delecijiska soja *E. coli* K-12, divlji tip, Δhns , $\Delta htpG$ i $\Delta hns\Delta htpG$, prikazani u Tablici 3. Sva četiri soja u kromosomu sadrže gen *cas3* obilježen histidinskim privjeskom, ali pod regulacijom vlastitog promotora. Sojevi nisu transformirani vektorima da bi se protein Cas3 mogao detektirati u nativnim uvjetima u stanici.

Tablica 3. Sojevi *E. coli* K-12 korišteni za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i jačini promotora

Sojevi	Genotip	Izvor
IIB1241	BW25113* + 6xHis- <i>cas3::kan</i> $\Delta hns::cat$	I. Ivančić Baće
IIB1243	BW25113* + 6xHis- <i>cas3::kan</i> $\Delta hns::cat$ $\Delta htpG::FRT$	I. Ivančić Baće
IIB1250	BW25113* + 6xHis- <i>cas3::kan</i>	I. Ivančić Baće
IIB1251	BW25113* + 6xHis- <i>cas3::kan</i> $\Delta htpG::FRT$	I. Ivančić Baće

*BW25113 genotip: F^- *rrnB* $\Delta lacZ4748$ ($::rrnB-3$) *hsdR514* Δ (*araBAD*) 567 Δ (*rhaBAD*) 568 *rph-1* λ^-

Za određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda korišten je delecijiski soj *E. coli* K-12, $\Delta hns\Delta htpG$, prikazan u Tablici 4. Uz delecije, soj sadrži dvije anti-lambda razmaknice $\lambda T3$ i λc kako bi prilikom infekcije fagom lambda došlo do prepoznavanja strane virusne DNA. Soj je transformiran plazmidnim vektorima pDM9, pDM10 i pDM13 koji sadrže gen *htpG* u koji su uvedene točkaste mutacije E34A, W467R i M546T, prikazani u Tablici 5. Plazmidi su priređeni ciljanom mutagenozom koristeći kao kalup plazmid pBAD18 koji sadrži divlji tip gena *htpG*. Vektori pDM9, pDM10 i pDM13 sadrže gen za otpornost na ampicilin. Sva tri vektora sadrže inducibilni promotor P_{BAD} te se ekspresija inducira dodatkom arabinoze.

Tablica 4. Soj *E. coli* K-12 korišten za određivanje efikasnosti obrane od infekcije fagom lambda

Soj	Genotip	Izvor
IIB1066	BW25113 + λc + $\lambda T3$ $\Delta hns::cat$ $\Delta htpG::kan$	I. Ivančić Baće

*BW25113 genotip: F^- *rrnB* $\Delta lacZ4748$ ($::rrnB-3$) *hsdR514* Δ (*araBAD*) 567 Δ (*rhaBAD*) 568 *rph-1* λ^-

Tablica 5. Vektori korišteni za transformaciju soja IIB1066 korištenog za određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda

Plazmidi	Opis	Izvor
pBAD18	komercijalni plazmid	L. M. Guzman i sur.
pBAD18-HtpG	<i>htpG</i> u pBAD18	Q. Udi
pDM9	E34A <i>htpG</i> u pBAD18	L. B.
pDM10	W467R <i>htpG</i> u pBAD18	L. B.
pDM13	M546T <i>htpG</i> u pBAD18	L. B.

3.1.2. Hranjive podloge i mediji

Za uzgoj bakterijskih stanica korišten je tekući hranjivi medij LB (*Luria-Bertani*) slijedećeg sastava: 10 g dm⁻³ baktotriptonu, 5 g dm⁻³ ekstrakta kvasca i 10 g dm⁻³ natrijeva klorida, dok su za nasađivanje stanica nakon transformacije korištene čvrste hranjive podloge LB identičnog sastava, osim što su dodatno sadržavale 15 g dm⁻³ agara za skrućivanje u gel, odgovarajući antibiotik potreban za selekciju i/ili odgovarajući induktor za poticanje ekspresije. Korišten je i meki agar koji je sadržavao 10 g dm⁻³ baktotriptonu, 5 g dm⁻³ ekstrakta kvasca, 10 g dm⁻³ natrijeva klorida i 6 g dm⁻³ agara za nasađivanje livada transformiranih bakterijskih stanica na krute hranjive podloge.

3.1.3. Antibiotici

U Tablici 6 navedeni su antibiotici korišteni za uzgoj bakterijskih stanica u tekućem mediju i selekciju transformanata na krutim podlogama.

Tablica 6. Antibiotici korišteni za uzgoj bakterijskih stanica i selekciju transformanata

Antibiotik	Konačna koncentracija / µg ml ⁻¹
Streptomycin	50
Kanamycin	100
Kloramfenikol	17
Ampicilin	100

3.1.4. Otopine i puferi

Pufer za lizu stanica: Tris-HCl ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH = 8,0), NaCl ($c = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$), PMSF ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Bradford matična otopina: 0,01 % *Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250*, 31,35 % (v/v) etanol, 58,6 % (v/v) H_3PO_4

Bradford radna otopina: 6 % (v/v) Bradford matična otopina, 2,85 % (v/v) etanol, 5,28 % (v/v) H_3PO_4

Elektrodni pufer (SDS-PAGE): Tris ($\gamma = 3,0 \text{ g dm}^{-3}$), glicin ($\gamma = 14,4 \text{ g dm}^{-3}$), SDS ($\gamma = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$), titrirano s 6 M HCl do pH = 8,3.

Pufer za nanošenje uzoraka: Tris-HCl ($c = 125 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH = 6,8), 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -merkaptotanol, 32 % (v/v) glicerol, kap bromfenolnog modrila

Otopina CBB: 2,5 g dm^{-3} *CBB G-250*, 10 % (v/v) ledena octena kiselina, 45 % (v/v) metanol

Otopina za odbojavanje: 10 % (v/v) ledena octena kiselina, 20 % (v/v) metanol

Pufer za prijenos: Tris ($\gamma = 3,35 \text{ g dm}^{-3}$), glicin ($\gamma = 14,4 \text{ g dm}^{-3}$), 10 % (v/v) metanol, titrirano s 6 M HCl do pH = 8,3.

PBS pufer: NaCl ($\gamma = 8,0 \text{ g dm}^{-3}$), KCl ($\gamma = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($\gamma = 1,15 \text{ g dm}^{-3}$), KH_2PO_4 ($\gamma = 0,2 \text{ g dm}^{-3}$).

Pufer za blokiranje: 0,5 % (w/v) mlijeka u prahu u PBS puferu

Pufer za ispiranje: 0,05 % (v/v) *Tween 20* u PBS puferu

TAE pufer: Tris ($\gamma = 4,85 \text{ g dm}^{-3}$), EDTA ($c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), ledena octena kiselina ($c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$)

3.1.5. Instrumenti

Sustav za elektroforezu *OneRun Electrophoresis Cell (Embi Tec)*, spektrofotometar za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina *NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)*, termostatirana tresilica *G25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)*, spektrofotometar za određivanje optičke gustoće stanica *Ultrospec 10 Cell Density Meter (Amersham Biosciences)*, centrifuga *Eppendorf 5415D*, termoblok *Thermomixer comfort (Eppendorf)*, centrifuga *SIGMA Laboratory Centrifuges 3K30*, sonikator za lizu stanica *Bioblock Scientific High Intensity Ultrasonic Processor*, spektrofotometar *Specord 50 Plus (Analytic Jena)*, skener za detekciju signala na nitroceluloznoj membrani *C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences)*.

3.1.6. Komercijalni kompleti

Komplet reagenasa za izolaciju plazmidne DNA iz bakterije *E. coli Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*, komplet reagenasa za pročišćavanje PCR produkata *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)*, komplet reagenasa za detekciju proteina na nitroceluloznoj membrani *ECL Western blot Substrate (Promega)*, komplet reagenasa za detekciju proteina na nitroceluloznoj membrani *Radiance ECL Western blot Detection Kit (Azure Biosystems)*, komplet reagenasa za ciljanu mutagenezu *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs)*.

3.1.7. Markeri veličina

Markeri za poliakrilamidnu gel-elektroforezu *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific)* i *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad)*, marker za agaroznu gel-elektroforezu *GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)*.

3.1.8. Antitijela

Anti-His konjugirana antijela za detekciju *Cas3 Monoclonal Anti-polyHistidine–Peroxidase antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich)*, anti-GAPDH primarna antitijela *GAPDH antibody (GeneTex)*, anti-rabbit sekundarna antitijela *Goat anti-Rabbit IgG (H&L), HRP conjugated (Agrisera)*.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema plazmida

Plazmidni vektor koji nosi divlji tip gena *htpG*, pDM11, korišten je za transformaciju sojeva *E. coli* za određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi i šaperonu HtpG (Tablica 1). Vektor je priređen tako da je u prazni vektor pMR18 (izvor: M. Radovčić) ukloniran gen za šaperon HtpG u restrikcijska mjesta *EcoRI* i *NcoI* pod inducibilnim promotorom P_{BAD}. Plazmid nosi gen za otpornost na antibiotik streptomycin. Gen *htpG* umnožen je s bakterijskog kromosoma *E. coli* metodom PCR koristeći odgovarajuće početnice.

Plazmidni vektori koji sadrže gen *htpG* u koji su uvedene točkaste mutacije E34A (pDM9), W467R (pDM10) i M546T (pDM13) korišteni su za transformaciju soja *E. coli* za određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda (Tablica 4). Vektori su priređeni ciljanom mutagenезom koristeći plazmid pBAD18-HtpG, koji sadrži divlji tip gena *htpG*, kao kalup. Vektori sadrže gen za otpornost na antibiotik ampicilin.

3.2.1.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) je *in vitro* metoda za jednostavno i brzo umnažanje ciljnog segmenta molekule DNA. Reakcija se provodi u tri koraka koji se uzastopno ponavljaju između 25 i 30 puta. U prvom koraku dolazi do denaturacije DNA pri čemu dolazi do odvajanja lanaca dvolančane DNA. DNA-polimerazi su potrebni kratki oligonukleotidi (početnice) na koje se može vezati da bi mogla umnožiti ciljni slijed pa je drugi korak reakcije sparivanje početnica na komplementarna mjesta na molekuli kalupu. Početnice omeđuju segment DNA koji će se amplificirati. Posljednji korak je elongacija ili produljivanje početnica pomoću termostabilne DNA-polimeraze. Produkt koji nastaje u slijedećem ciklusu služi kao kalup za umnažanje te dolazi do eksponencijalne amplifikacije molekula DNA. Osim navedena tri ponavljajuća koraka, reakcija se sastoji i od početne denaturacije i završne elongacije da bi se osigurala potpuna denaturacija kalupa na početku i potpuna sinteza novonastalih kalupa na kraju.

Metodom PCR umnožen je gen *htpG* s kromosoma *E. coli* početnicama navedenim u Tablici 7 koje su dizajnirane tako da na krajevima sadrže mjesto prepoznavanja odgovarajućih restrikcijskih endonukleaza. Pošto restrikcijske endonukleaze cijepaju molekulu DNA na točno određenim palindromskim sljedovima, njihovim djelovanjem nastaju komplementarni krajevi

što se može iskoristiti za stvaranje rekombinantne DNA koristeći iste enzime za razgradnju molekule plazmida i molekule inserta.

Volumen reakcijske smjese iznosio je 25 μ L te je korištena Q5-DNA-polimeraza visoke točnosti s 3' \rightarrow 5' endonukleaznom aktivnošću da bi se prilikom kloniranja gena od interesa osigurala ispravnost nukleotidnog slijeda. Sastav reakcijske smjese i uvjeti pri kojima je provedena PCR reakcija navedeni su u Tablici 8.

Tablica 7. Nukleotidni slijed početnica korištenih za umnažanje gena *htpG* s kromosoma *E. coli*. Restriksijsko mjesto koje prepoznaje endonukleaza *NcoI* označeno je zelenom bojom, dok je restriksijsko mjesto koje prepoznaje *EcoRI* označeno plavom bojom.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	$T_m / ^\circ\text{C}$
htpG_pMR18_F	GAGAGACCATGGGGATGAAAGGACAAGAACTCG	66
htpG_pMR18_R	GTGTGTGAATTCAGGAAACCAGCTGG	61

Tablica 8. Sastav PCR smjese i uvjeti pri kojima je provedena PCR reakcija za umnažanje kodirajućeg slijeda za šaperon HtpG. Denaturacija, sparivanje početnica i elongacija su provedeni u 30 ciklusa.

Sastav PCR reakcije	Konačna koncentracija	Uvjeti PCR reakcije	$T / ^\circ\text{C}$	Trajanje
htpG_pMR18_F	0,5 μ M	Početna denaturacija	98	30 s
htpG_pMR18_R	0,5 μ M	Denaturacija	98	10 s
kalup (genomska DNA)	20 ng / mL	Sparivanje početnica	55	30 s
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	1X	Elongacija	72	2 min
ReH ₂ O	do 25 μ L	Finalna elongacija	72	2 min

3.2.1.2. Ciljana mutageneza

Ciljana ili mjesno-specifična mutageneza je metoda kojom je moguće uvesti ciljanu, specifičnu promjenu nukleotidnom slijedu dvolančane molekule DNA. Moguće je provesti inserciju, deleciju ili zamjenu jednog ili više nukleotida.

U ovom istraživanju, ciljanom mutagenozom priređeni su plazmidni vektori pDM9, pDM10 i pDM13 koji sadrže gen za šaperon HtpG u koji su uvedene točkaste mutacije E34A, W467R i M546T. Izabrane su te specifične zamjene jer se pretpostavljalo da je glutamat 34, koji se nalazi na N-terminalnom kraju, važan u hidrolizi ATP-a, a triptofan 467 i metionin 546, koji se nalaze na C-terminalnom kraju, važni za dimerizaciju i interakciju s proteinskim supstratima.⁵²

Korištene su mutagene početnice koje sadrže željenu zamjenu u nukleotidnom slijedu te su njihove sekvence prikazane u Tablici 9, priređene prema web stranici *NEBaseChanger*. Ciljana mutageneza izvršena je prema uputama proizvođača koristeći komercijalno dostupan komplet za ciljanu mutagenezu *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs)*.

Tablica 9. Nukleotidni slijed mutagenih početnica korištenih za pripremu točkastih mutanata HtpG E34A, W467R i M546T u plazmidima pDM9, pDM10 i pDM13 i njihove temperature mekšanja. Promijene u nukleotidnom slijedu označene su malim slovima.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	$T_m / ^\circ\text{C}$
HtpG_E34A_F	TGCGTGCgctTATCTCTAACG	54
HtpG_E34A_R	GGAAGATTTCTTTATTGGAATAG	48
HtpG_W467R_F	CGCATCGATGAGcggAGATGAACTATCTG	63
HtpG_W467R_R	GTCGGAAAGCAGCAGAACTTC	54
HtpG_M546T_F	CGCGGACGAAacgAGCACTCAGA	69
HtpG_M546T_R	TCGGTCGAAACGATCGCTG	67

3.2.1.3. Restriksijska razgradnja DNA

Jedan od načina obrane bakterija od strane DNA je putem enzima zvanih restriksijske endonukleaze. Restriksijske endonukleaze kataliziraju hidrolizu fosfodieterske veze u molekulama DNA nakon prepoznavanja specifičnih nukleotidnih slijedova unutar sekvence prepoznavanja ili na nekom udaljenijem mjestu u molekuli. Ti nukleotidni slijedovi su uglavnom palindromi tako da cijepanjem DNA nastaju komplementarni krajevi, stršeći ili tupi. Stršeći krajevi nastali cijepanjem dvije različite molekule DNA istom restriksijskom endonukleazom su također komplementarni što je veoma korisno u genetičkom inženjerstvu. Koristeći dvije

različite restrikcijske endonukleaze na krajevima PCR produkta i plazmida može se osigurati da se insert ugradi u pravilnoj orijentaciji.

U prethodnom koraku, PCR produkt je umnožen tako da na krajevima sadrži nukleotidne sljedove koje prepoznaju restrikcijske endonukleaze *EcoRI* i *NcoI*. Istim restrikcijskim enzimima pocijepani su dobiveni PCR produkti i plazmidi u koje se ti produkti žele ugraditi.

Sastav restrikcijskih smjesa priređenih u ukupnom volumenu od 20 μL naveden je u Tablici 10. Nakon pripreme, uzorci su inkubirani 15 min na 37 °C.

Tablica 10. Sastav restrikcijske smjese za digestiju plazmida pMR18 i PCR produkta umnoženog s genomske DNA *E. coli*

Sastav smjese	Konačna koncentracija
pMR18 / PCR produkt	200-400 ng/ μL
<i>10X FastDigest Buffer (Thermo Fisher Scientific)</i>	1X
<i>NcoI</i>	20 U/ μL
<i>EcoRI</i>	20 U/ μL
ReH ₂ O	do 20 μL

3.2.1.4. Pročišćavanje DNA

Pročišćavanje DNA je izvršeno prema uputama proizvođača koristeći komercijalno dostupan komplet za pročišćavanje *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)*.

3.2.1.5. Ligacija fragmenata DNA

Nakon što su dobiveni odgovarajući komplementarni krajevi, potrebno je stvoriti novu fosfodietersku vezu koja će povezati insert i plazmid u jednu cjelinu. Djelovanjem ligaze na sparane dvolančane molekule DNA dolazi do nastanka fosfodieterske veze između fosfatne skupine na 5'-kraju jednog lanca i hidroksilne skupine na 3'-kraju drugog lanca uz utrošak jedne molekule ATP-a. Korištena je T4 DNA-ligaza.

Ligacijska smjesa priređena je u ukupnom volumenu od 20 μL u omjeru 1:5 te je sastav smjese naveden u Tablici 11. Uzorci su inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi.

Tablica 11. Sastav ligacijske smjese za povezivanje PCR produkta i plazmida pMR18.

Sastav	Konačna koncentracija
<i>10X T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Fisher Scientific)</i>	1X
T4 DNA-ligaza	0,2 U/ μL
pMR18	1 ng/ μL
Insert	1,5 ng/ μL
reH ₂ O	do 20 μL

Za transformaciju kemijski kompetentnih stanica *NEB 5-alpha (New England Biolabs)* korišteno je 2 μL ligacijske smjese na 25 μL stanica te je transformacija provedena prema uputama proizvođača. Krute podloge su inkubirane preko noći na 37 °C te su idući dan priređene prekonoćne kulture bakterijskih kolonija iz kojih je izoliran rekombinantni plazmid.

3.2.1.6. Pročišćavanje plazmidne DNA

Pročišćavanje DNA iz bakterijskih kolonija je izvršeno prema uputama proizvođača koristeći komercijalno dostupan komplet za pročišćavanje *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*.

3.2.1.7. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu

Fragmente DNA veličina između 100 i 25 000 parova baza moguće je razdvojiti metodom gel-elektroforeze na agaroznom gelu. Fosfatne skupine u molekulama DNA imaju naboj -1 stoga će svaka molekula imati isti naboj po nukleotidu. Omjer mase i naboja je isti te će se zato gibati na gelu samo u ovisnosti o veličini i obliku molekule. Linearne molekule DNA različitih duljina moguće je razdvojiti isključivo na temelju razlike u veličini. Tijekom elektroforeze fragmenti se razdvajaju primjenom vanjskog električnog polja te će se zbog negativnog naboja molekule gibati prema pozitivnom polu. Ovisno o rasponu veličine fragmenata koji se žele razdvojiti moguće je pripremiti gelove različitih udjela agaroze.

Korišteni su 1 %-tni agarozni gelovi pripremljeni otapanjem agaroze u puferu TAE te je smjesa zagrijavana dok se agarozna nije u potpunosti otopila. Otopina je ohlađena te joj je dodana fluorescentna boja *SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)* nakon čega je otopina izlivena u kadu za gelu u koju su umetnuti češljici za jažice. Kadica je prekrivena aluminijskom folijom da boja izgubi što manje fluorescencije prije detekcije. Kada je gel formiran, češljici su uklonjeni i gel je prenesen u kadu za elektroforezu napunjenu puferom TAE. Uzorci su pomiješani s bojom *6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)* te su nanešeni u jažice gela. Uz njih nanesen je i standard veličina *GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)*. Elektroforeza je provedena u *OneRun Electrophoresis Cell (Embi Tec)* sustavu za elektroforezu na 100 V u trajanju od 15 minuta. Fragmenti DNA su detektirani fotografiranjem gela na UV lampi i analizirani programom *Kodak 1D Analysis Software*.

3.2.1.8. Određivanje koncentracije plazmidne DNA

Koncentracija DNA u uzorcima izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)* pri valnoj duljini od 260 nm. Uređaj je anuliran otopinom kojom je eluirana DNA prilikom pročišćavanja. Naneseno je 2 μ L uzorka na pločicu te je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 260 nm koja je proporcionalna koncentraciji DNA u uzorku.

3.2.1.9. Restriksijska analiza plazmidne DNA

Da bi se dodatno provjerilo da li priređeni plazmidi sadrže željeni gen, plazmidi su razgrađeni restriksijskim endonukleazama. Izračunate su veličine očekivanih fragmenata DNA nakon što su rekombinantni plazmidi i prazni plazmidi razgrađeni restriksijskim enzimima (Tablica 12). Rekombinantni plazmid i prazni vektor se razlikuju u veličini te se to može lako uočiti razdvajanjem fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu.

Iako veličina plazmida pDM9, pDM10 i pDM13 odgovara početnom kalupu, tj. plazmidu pBAD18-HtpG, restriksijskom analizom provjerena je njihova ispravnost.

Tablica 12. Veličine očekivanih fragmenata nakon cijepanja rekombinantnih plazmida i praznih plazmida odgovarajućim restriktivnim endonukleazama

Rekombinantni plazmid	Prazan plazmid	Veličina praznog porezanog vektora / kb	Veličina inserta / kb	Insert + vektor / kb
pDM11	pMR18	3,6	1,9	5,5
pDM9	pBAD18	4,6	1,9	6,5
pDM10	pBAD18	4,6	1,9	6,5
pDM13	pBAD18	4,6	1,9	6,5

3.2.1.10. Lančana reakcija polimerazom na bakterijskim kolonijama

Transformacijom bakterija rekombinantnim plazmidom može se dogoditi da dio njih primi prazni plazmid u koji nije ukloniran željeni insert te time mogu steći rezistenciju na antibiotik i narasti na selektivnoj podlozi. Lančanom reakcijom polimerazom na bakterijskim kolonijama moguće je lako utvrditi koje kolonije sadrže rekombinantni vektor.

Metoda se provodi jednako kao klasični PCR, osim što se kao kalup koriste lizirane bakterijske kolonije sa selektivnih podloga pa je zato u prvom koraku potrebno lizirati stanice u 50 μ L vode na 98 °C u trajanju od 3 minute. Uvjeti PCR reakcije i sastav smjese bili su identični kao u poglavlju 3.2.1.1 osim što su korištene komercijalne početnice pBAD_F i pBAD_R.

Kada je potvrđeno da su bakterijske stanice sadržavale rekombinantni plazmid, uzorak je dodatno provjeren sekvenciranjem u servisu MacroGen (Nizozemska).

3.2.2. Uzgoj prekonoćne kulture bakterijskih stanica

Za pripremu prekonoćnih kultura stanica, pojedinačne kolonije bakterijskih sojeva na krutim podlogama inokulirane su u 3 mL tekućeg hranjivog medija uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Kulture su inkubirane preko noći na 37 °C uz miješanje u tresilici *G25 Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific) do stacionarne faze rasta ($OD_{600} \approx 2,00$).

3.2.3. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica

Da bi se bakterijske stanice efikasno transformirale željenim vektorom, potrebno ih je prethodno pripremiti. Za kemijsku transformaciju, bakterijske stanice su nasadene do logaritamske faze rasta ($OD_{600} = 0,5-0,6$) dodatkom 40 μL prethodno pripremljene prekonoćne kulture čistih sojeva u 3 mL tekućeg hranjivog medija uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Kulture su uzgajane na 37 °C u tresilici. Rast bakterijskih stanica je praćen pomoću vrijednosti optičke gustoće izmjerene pomoću fotospektrometra *Ultrospec 10 Cell Density Meter* (Amersham Biosciences) pri valnoj duljini od 600 nm.

Odvojeno je 1,5 mL bakterijskih stanica koje su istaložene 2,5 minute u centrifugi (*Eppendorf 5415D*) pri 8 000 okretaja po minuti na sobnoj temperaturi. Supernatanti su uklonjeni, dok su talozi stanica resuspendirani u 200 μL hladne otopine CaCl_2 ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$). Stanice su ponovno istaložene u centrifugi, supernatanti su uklonjeni te su talozi resuspendirani u 50 μL hladne otopine CaCl_2 nakon čega su inkubirani 5 minuta na ledu.

3.2.4. Kemijska transformacija bakterijskih sojeva

Kemijska transformacija se temelji na unosu strane DNA u bakterijske stanice putem temperaturnog šoka pri čemu dolazi do stvaranja pora u staničnoj stijenci bakterija.

U prethodno pripremljene kompetentne stanice dodano je 2 μL odgovarajućeg vektora te je smjesa inkubirana 15 minuta na ledu. Zatim su stanice izložene temperaturnom šoku u trajanju od 2 minute na 42 °C u termobloku *Thermomixer comfort* (*Eppendorf*) nakon čega su inkubirane 2 minute na ledu. Za oporavak stanica dodano je 250 μL tekućeg hranjivog LB medija te su stanice inkubirane sat vremena na 37 °C uz miješanje.

3.2.5. Nasađivanje transformiranih bakterijskih stanica na krute hranjive podloge

Nakon oporavka bakterijskih stanica potrebno ih je nasaditi na krute hranjive podloge da bi se transformanti uspješno selektirali. Selekcija se vrši dodatkom odgovarajućeg antibiotika u krute podloge tako da stanice koje nisu primile željeni plazmid ne sadrže gen za rezistenciju na isti pa na njima ne mogu rasti. Samo stanice koje su primile plazmid će moći formirati kolonije na takvim podlogama.

Na prethodno pripremljene krute podloge s odgovarajućim antibiotikom je nasadeno 100 μL transformiranih bakterijskih stanica. Podloge su inkubirane preko noći na 37 °C.

3.2.6. Prekomjerna ekspresija i izolacija proteina iz bakterija

Za prekomjernu ekspresiju željenih proteina, prethodno transformirane stanice s krutih podloga inokulirane su u 3 mL tekućeg hranjivog medija uz dodatak odgovarajućeg antibiotika i otopine L-arabinoze konačne koncentracije 0,2 % koja inducira ekspresiju proteina Cas3 s bakterijskog kromosoma i proteina HtpG s plazmida. Za određivanje ovisnosti količine proteina Cas3 o jačini promotora nije potrebno dodati induktor pošto sojevi sadrže vlastite promotore i nisu transformirani plazmidima. Bakterije su uzgajane preko noći u tresilici pri 250 okretaja u minuti na 30 i na 37 °C.

Nakon uzgoja oboreno je 1,5 mL stanica centrifugiranjem (*SIGMA Laboratory Centrifuges 3K30*) pri temperaturi od 4 °C i 14 000 g u trajanju od 5 minuta. Supernatanti su uklonjeni dekantiranjem, dok su preostali talozi resuspendirani u 600 µL pufera za lizu. Dodatkom fenilmetilsulfonil fluorida (*engl. phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF*) ($c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) u pufer za lizu sprječava se proteolitička razgradnja proteina tijekom i nakon lize stanice pošto djeluje kao ireverzibilni inhibitor serinskih proteaza.

Suspenzije stanica su lizirane sonikacijom (*Bioblock Scientific High Intensity Ultrasonic Processor*) 6 puta u trajanju od 2 sekunde. Zbog otpuštanja velikih količina topline, pri čemu može doći do denaturacije proteina u uzorcima, bakterijske stanice se inkubiraju na ledu tijekom cijelog postupka te je potrebno napraviti pauzu od 4 sekunde između pulseva. Pri završetku sonikacije, nije potrebno odvajati supernatant od taloga već se u daljnjoj analizi koristi ukupni lizat.

3.2.7. Određivanje ukupne koncentracije proteina

Za određivanje ukupne količine proteina u lizatu korištena je metoda mjerenja koncentracije po Bradfordu. Princip iza metode je vezanje boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* na proteine. Vezanjem anionske forme boje na bazične bočne ogranke lizina, histidina i arginina nastaje kompleks pri čemu dolazi do porasta apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm koja je proporcionalna koncentraciji proteina.

Da bi se odredila koncentracija, prethodno je potrebno pripremiti baždarni pravac koristeći otopine serumskog albumina goveda (*engl. bovine serum albumin, BSA*). Baždarni pravac određuje ovisnost apsorbancije baždarnih otopina o koncentraciji BSA. Pripravljen je niz otopina BSA u rasponu koncentracija 0,2-2,0 mg mL⁻¹ iz matične otopine BSA masene koncentracije 2 mg mL⁻¹ koja je priređena otapanjem 20 mg BSA u 10 µL pufera za lizu.

Uzorci su pripremljeni tako da ukupna koncentracija proteina u lizatu bude unutar raspona baždarnih otopina BSA, to jest u 1 mL Bradford radne otopine dodano je 20 µL lizata. Uzorci su inkubirani 5 minuta u mraku na sobnoj temperaturu. Uzorci su prebačeni u kivete te im je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm pomoću spektrofotometra *Specord 50 Plus (Analytic Jena)*. Koncentracija ukupnih proteina dobivena je uvrštavanjem apsorbancije u jednadžbu baždarnog pravca.

3.2.8. Gel-elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata

Za provjeru uspješnosti izolacije ukupnih staničnih proteina i prekomjerne ekspresije, uzorci lizata su podvrgnuti elektroforezi na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE*). Nanošenjem uzoraka na gel dolazi do razdvajanja molekula po molekularnoj masi.

Kako bi se proteini razdvojili isključivo u ovisnosti o masi, uzorcima je potrebno dodati natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate, SDS*), anionski deterdžent koji se veže na polipeptidnu okosnicu proteina, pri čemu dolazi do denaturacije. SDS se jednoliko veže na molekule proteina, otprilike 1,4 g po gramu proteina, što omogućava gibanje na gelu neovisno o njihovom obliku i ukupnom naboju, te je na taj način moguće lako razdvojiti proteine širokog raspona molekularnih masa.

Prethodno je potrebno pripremiti uzorke tako da se u njih doda pufer za nanošenje u omjeru 1:4. Uzorci su denaturirani u termobloku na 95 °C u trajanju od 5 minuta.

Korišten je gel koji se sastoji od dva dijela, 4 %-tnog gornjeg gela za sabijanje proteina i 10 %-tnog donjeg gela za razdvajanje. Sastav gelova naveden je u Tablici 13. Amonijev persulfat (engl. *ammonium persulfate, APS*) inicira reakciju polimerizacije dok *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (engl. *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED*) katalizira reakciju. TEMED je dodan neposredno prije izlijevanja da ne bi došlo do prijevremene polimerizacije. Između prethodno složenih stakalaca izliven je gel za razdvajanje pri čemu je na vrh nanosen tanki sloj otopine bromfenolnog modrila u etanolu da bi se spriječila inhibicija polimerizacije kisikom iz zraka i da bi se ujedno izravnao rub gela. Nakon što je gel polimerizirao, otopina bromfenola je odekantirana i nanosen je gel za sabijanje, te su odmah nakon umetnuti češljici za formiranje jažica koji su nakon polimerizacije uklonjeni. Denaturirani uzorci nanoseni su u jažice tako da svaka sadrži 9 µg proteina. Uz uzorke, nanosen je marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad)*. Gelovi s uzorcima su

uronjeni u kadicu za elektroforezu napunjenu elektrodnim puferom. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, prvo 15 minuta uz napon od 100 V te zatim 40 minuta uz napon od 200 V. Pri završetku elektroforeze gelovi su inkubirani na tresilici u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue R-250* u trajanju od sat vremena da bi se proteini mogli vizualizirati. Boja koja se nije vezala na proteine uklonjena je inkubacijom gelova u otopini za odbojavanje.

Tablica 13. Sastav poliakrilamidnih gelova za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

Sastav	Gel za sabijanje (4 %)	Gel za razdvajanje (10 %)
Akrilamid-bisakrilamid	4 % (w/v)	10 % (w/v)
Tris-HCl	125 mmol dm ⁻³ , pH = 6,8	375 mmol dm ⁻³ , pH = 8,8
Natrijev dodecil sulfat (SDS)	1 g dm ⁻³	
Amonijev persulfat (APS)	0,7 µg mL ⁻¹	
<i>N,N,N',N'</i> - tetrametiletilendiamin (TEMED)	0,05 % (v/v)	

3.2.9. Metoda western blot

Količina proteina Cas3 u *E. coli* analizirana je metodom *western blot*. *Western blot* je imunokemijska metoda u kojoj se protein, elektroforetski razdvojeni na gelu, prenose na nitroceluloznu membranu. Metoda se bazira na mokrom prijenosu proteina na membranu, blokiranju preostalih veznih mjesta, te najvažnije, inkubiranju membrane u primarnom i sekundarnom antitijelu s vezanim enzimom, pri čemu dodatkom specifičnog supstrata dolazi do otpuštanja kemiluminescentnog signala koji omogućava detekciju željenog proteina. Budući da signal nastaje samo na mjestu gdje se nalazi protein od interesa, *western blot* omogućuje specifičnu detekciju ciljanog proteina te njegovo kvantificiranje.

U tu svrhu, uzorci lizata razdvojeni su na gelu metodom SDS-PAGE kako je opisano u prethodnom poglavlju, osim što je uz navedeni marker nanesen i marker veličina *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific)* da bi se lakše pratio redoslijed nanošenja uzoraka. Nakon završetka elektroforeze, uklonjen je gel za sabijanje i gelovi su polegnuti na nitroceluloznu membranu postavljenu između dva *Whatman* papira i spužvica prethodno namočenih u puferu za prijenos. „Sendvič“ je postavljen na odgovarajuća postolja te

je sve zajedno uronjeno u kadicu napunjenu puferom za prijenos. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu provođen je na sobnoj temperaturi pri naponu od 60 V u trajanju od 60 minuta. Membrane su zatim pažljivo izvađene i prenesene u čiste Petrijeve zdjelice te su inkubirane na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje u trajanju od sat vremena da bi se preostala vezna mjesta na membrani blokirala kazeinom iz mlijeka. Nakon blokiranja, membrane su isprane 3 puta s po 15 mL pufera za ispiranje uz miješanje u trajanju od 5 minuta da bi se uklonio višak mlijeka i pufera za prijenos. Membrane su prerezane na dva dijela tako da se na gornjem dijelu membrane nalazi željeni protein Cas3 čija molekulska masa s His-privjeskom iznosi otprilike 100 kDa, te da se na donjem dijelu nalazi *housekeeping* protein gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*) molekulske mase 36 kDa koji služi kao kontrola nanošenja uzorka (engl. *loading control*). Detekcija i kvantifikacija proteina GAPDH omogućuje normalizaciju uzoraka na gelu, pošto je on konstitutivno eksprimiran u stanicama. Gornji dio membrane je potom inkubiran u anti-His konjugiranom antitijelu u trajanju od 2 sata uz miješanje na sobnoj temperaturi, dok je donji dio membrane inkubiran u anti-GAPDH primarnom antitijelu također 2 sata uz miješanje na sobnoj temperaturi, nakon čega je pohranjen preko noći na 4 °C. Anti-His antitijela su konjugati na koje je vezana peroksidaza iz hrena pa iz tog razloga membranu nije potrebno inkubirati u sekundarnom antitijelu, već se odmah može prijeći na detekciju. Sljedeći dan, primarna anti-GAPDH antitijela su uklonjena te su membrane isprane 3 puta s 15 mL pufera za ispiranje u trajanju od 5 minuta nakon čega je membrana inkubirana u anti-rabbit sekundarnom antitijelu u trajanju od 2 sata uz miješanje na sobnoj temperaturi. Pri završetku inkubacije, gornji dio i donji dio membrane su ponovno isprani 3 puta s 15 mL pufera za ispiranje u trajanju od 5 minuta. Pošto su anti-His konjugirana antitijela i anti-rabbit sekundarna antitijela fuzionirana s peroksidazom iz hrena, proteini na koje su se vezala antitijela detektirani su dodatkom kemiluminescentnog reagensa za detekciju *ECL Western blot Substrate (Promega)* prema uputama proizvođača. Signal je detektiran pomoću uređaja *C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences)* te su podaci analizirani programom *Image Studio Lite* uspoređivanjem intenziteta signala proteinskih vrpca detektiranih na nitroceluloznoj membrani.

Statistička analiza podataka provedena je u programu Microsoft Excel u kojem su izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije. T-testom uspoređene su srednje vrijednosti dvaju uzoraka, u ovom slučaju, srednje vrijednosti količina proteina Cas3 sojeva transformiranih s dvaju plazmida, praznim vektorom i pHtpG, za istu temperaturu rasta

koristeći alat „*data analysis*“ i opciju „*t-test: paired two sample for means*“. T-testom utvrđuje se da li je razlika srednjih vrijednosti dvaju seta podataka značajna, odnosno da li je razlika samo produkt slučajnosti. Razlike srednjih vrijednosti dvaju uzoraka smatrane su značajnima ako je vrijednost p manja od 0,05.

3.2.10. Određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda pri dvije različite temperature inkubacije

Kako bi se provjerio značaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG i njihova uloga u obrani bakterijskih stanica protiv infekcije fagom lambda, mjerena je učinkovitost stvaranja virusnih plakova faga lambda na dvije različite temperature inkubacije, 30 °C i 37 °C. Efikasnost infekcije određena je određivanjem broja plakova po mililitru (engl. *plaque forming units, PFU*). Bakterijski soj *E. coli* K-12 IIB1066 transformiran je vektorima pDM9, pDM10 i pDM13 koji sadrže točkaste mutante šaperona HtpG, točnije nukleotidne zamjene E34A, W467R i M546T. Prekonoćne kulture bakterijskih stanica nasadene su uz dodatak antibiotika i induktora. Na krute, svježe pripremljene podloge koje sadrže induktor i antibiotik izlivenne su livade bakterijskih stanica priređene u 3 mL mekog agara u koji je dodan induktor i 200 µL prekonoćne kulture. Prethodno su pripremljena svježa decimalna razrjeđenja faga lambda u rasponu koncentracija od 10^{-3} do 10^{-6} u otopini $MgSO_4$ ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$). Kada se sloj mekog agara stisnuo, na ploču su nanese 10 mikrolitarske kapljice svakog decimalnog razrjeđenja u dvije replike. Kada su se kapljice upile, podloge su inkubirane preko noći na 30 °C i 37 °C. Idući dan prebrojani su plakovi nastali na mjestu inficiranih liziranih bakterijskih stanica. Plakovi predstavljaju osjetljivost bakterija na infekciju fagom lambda. Efikasnost infekcije izračunata je prema slijedećoj jednadžbi:

$$PFU/ml = \frac{\text{broj plakova}}{\text{stupanj decimalnog razrjeđenja} \times V \text{ (aliquota)}}$$

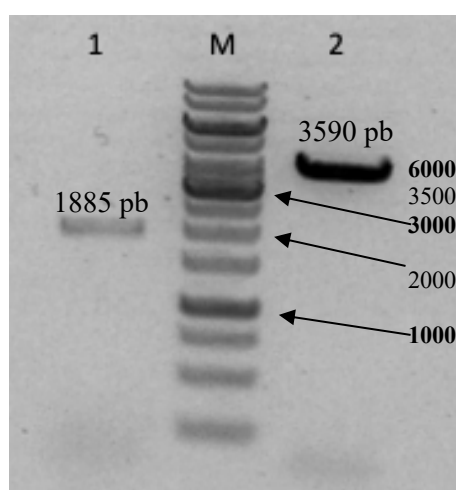
§ 4. REZULTATI

4.1. Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi

4.1.1. Rekombinantni plazmid pDM11

Za istraživanje uloge proteina HtpG na količine proteina Cas3 bilo je potrebno pripremiti rekombinantni plazmid koji eksprimira protein HtpG u vektoru koji ima otpornost na antibiotik drugačiju od kanamicina, ampicilina i kloramfenikola. Odlučili smo zato napraviti rekombinantni plazmid pDM11 koji je dobiven kloniranjem gena *htpG* u hibridni plazmid pMR18 (Slika 7). Plazmid pMR18 sadrži dijelove plazmida pBAD-HisA i plazmida pCDF-1b, gdje je otpornost na antibiotik uzeta od plazmida pCDF-1b, a višestruko mjesto za kloniranje od plazmida pBAD-HisA. Kloniranje u plazmid pMR18 je stoga jednako kloniranju u pBAD-HisA, samo vektor ima drugačiju otpornost na antibiotik i nije potrebna T7 RNA polimeraza što je slučaj s vektorom pCDF-1b.

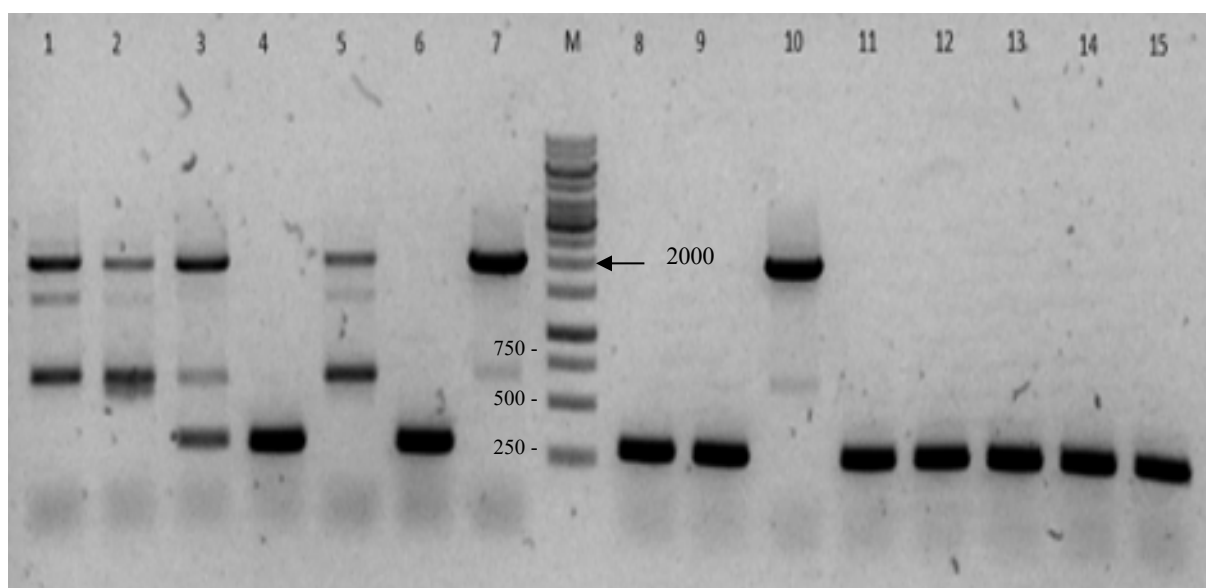
Pomoću specifičnih početnica koje na krajevima sadrže restrikcijska mjesta za enzime *EcoRI* i *NcoI* umnožen je gen *htpG* koristeći metodu PCR. Prazan plazmid pMR18 razgrađen je istim restrikcijskim endonukleazama. Uspješnost amplifikacije i restrikcije provjerena je agaroznom gel-elektroforezom (Slika 8).



Slika 8. Analiza fragmenata DNA na 1 %-tnom agaroznom gelu nakon amplifikacije metodom PCR i restrikcijske razgradnje: 1 – umnažanje gena *htpG* s kromosoma *E. coli*, 2 – restrikcijska razgradnja praznog plazmida pMR18, M – marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA*.

Izračunata veličina fragmenata iznosila je 1885 pb za PCR produkt (gen *htpG* + dijelovi početnica) i 3590 bp za porezani prazan vektor pMR18 te su eksperimentalno dobiveni podaci nakon analize u skladu s teorijskim vrijednostima (Slika 8).

Nakon što je utvrđena uspješnost reakcije PCR i restrikcije, produkt PCR je pročišćen komercijalnim kompletom *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)* i porezan istim restrikcijskim endonukleazama kao i prazan vektor, *EcoRI* i *NcoI*, te su insert i porezani plazmid ligirani. Nakon ligacije, kompetentne stanice *E. coli NEB 5-alpha (New England Biolabs)* transformirane su ligacijskom smjesom te nasađene na selektivne hranjive podloge. Metodom PCR na bakterijskim kolonijama provjereno je da li kolonije sadrže rekombinantni plazmid. Analizirano je 15 nasumičnih kolonija s krute hranjive podloge koristeći komercijalne početnice pBAD_F i pBAD_R. Dobiveni produkti PCR su analizirani agaroznom gel-elektroforezom te je uočeno da kolonije 7 i 10 sadrže signal pri 2,0 kb što odgovara veličini inserta (1885 pb) (Slika 9). Neke od ostalih kolonija također sadrže taj signal ali je vidljivo da je došlo i do nastanka drugih nespecifičnih produkata pa one nisu uzete u obzir za daljnje eksperimente. Ostale kolonije sadrže prazan vektor gdje je veličina inserta oko 300 pb.

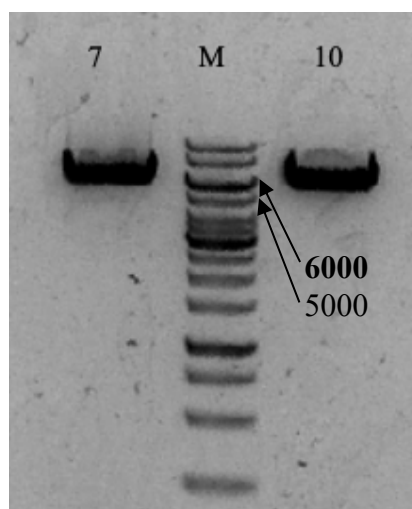


Slika 9. Analiza produkata PCR na 1 %-tnom agaroznom gelu nakon umnažanja rekombinantnog plazmida koristeći kao kalup transformirane bakterijske kolonije (1-15). Slovom M označen je marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA*.

S krute podloge nasađene su prekonocne kulture kolonija 7 i 10 uz dodatak streptomicina te je sutradan iz njih izoliran plazmid pDM11 pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju DNA

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Uzorcima plazmida spektrofotometrijski je određena koncentracija te su za dodatnu provjeru oba uzorka razgrađena restrikcijom endonukleazom *EcoRI* i analizirana agaroznom gel-elektroforezom.

Analizom gela uočeno je da signal kolonije 10 bolje odgovara veličini od 5,5 kb (Slika 10) što je u skladu s teorijski izračunatom veličinom rekombinantnog plazmida (5485 pb) te je taj uzorak dodatno provjeren sekvenciranjem kodirajućeg slijeda u servisu Macrogen (Nizozemska) kojim je potvrđeno da plazmid sadrži ispravan gen *htpG*.



Slika 10. Analiza fragmenata DNA na 1 %-tnom agaroznom gelu dobivenih restrikcijom razgradnjom plazmida izoliranih iz kolonija 7 i 10 enzimom *EcoRI*. Slovom M označen je marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA*.

4.1.2. Određivanje količine proteina Cas3 u ovisnosti o šaperonu HtpG i temperaturi

Nakon uspješne pripreme i provjere plazmida pDM11, sojevi IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns\Delta htpG$) transformirani su rekombinantnim plazmidom pDM11 (pHtpG) i praznim plazmidom pMR18 koji služi kao negativna kontrola. Transformanti su nanoseni na krute selektivne hranjive podloge i inkubirani preko noći na 37 °C. S krutih podloga nasađene su prekonoćne kulture uz dodatak 0,2 %-tne otopine L-arabinoze da bi se potakla ekspresija s inducibilnih promotora pod kojima se nalaze protein Cas3 u bakterijskom kromosomu i šaperon HtpG na plazmidu.

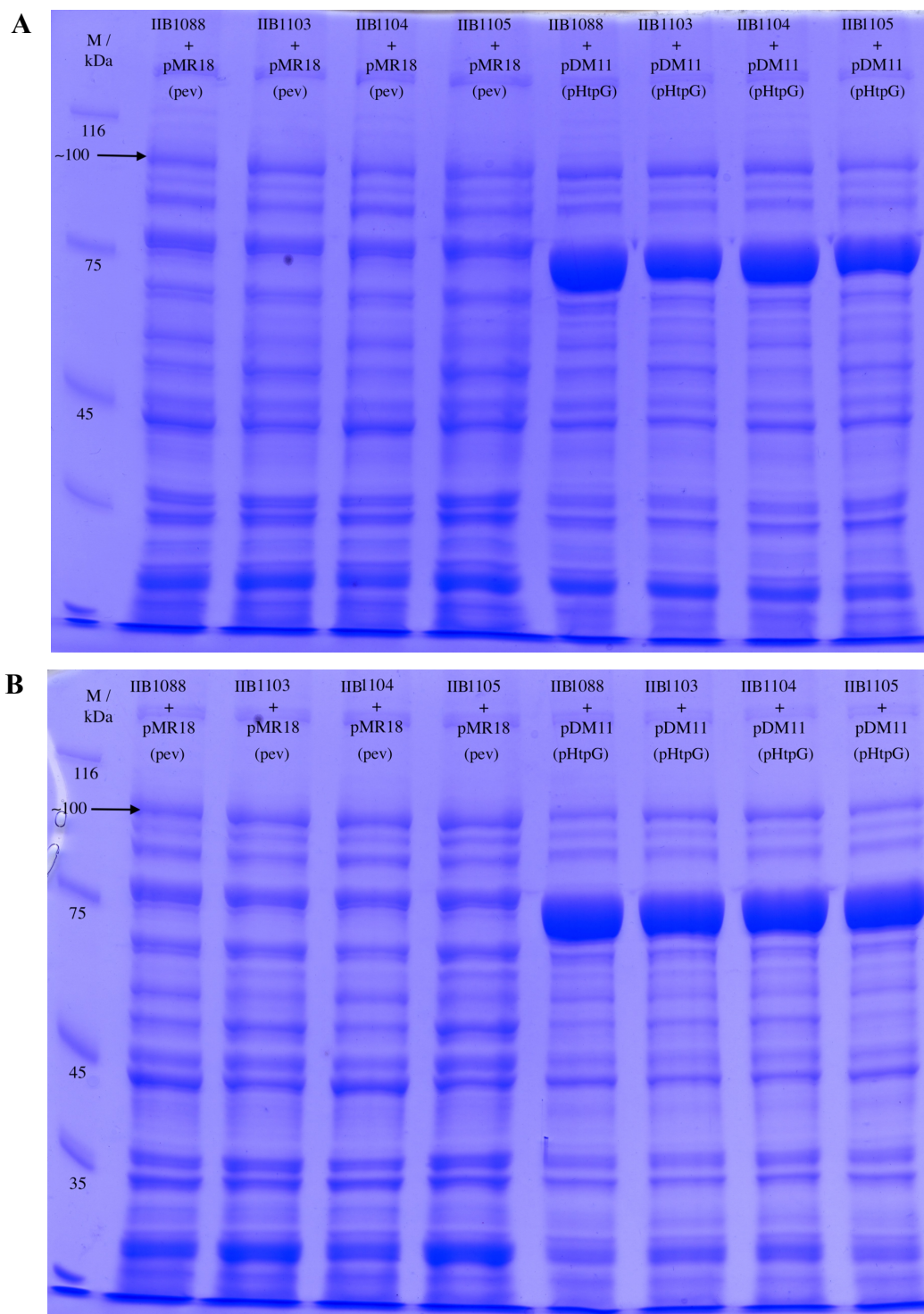
Uz L-arabinozu, dodani su i streptomycin i kanamicin da bi narasle isključivo bakterije koje sadrže konstrukt 6xHis-Cas3 u kromosomu i plazmid pDM11. Kanamicin je dodan jer je prilikom ugrađivanja proteina Cas3 koji sadrži histidinski privjesak ugrađena i kanamicinska kazeta pomoću koje se može lako provjeriti koje stanice sadrže uvedenu promjenu u

kromosomu. Prekonočne kulture su uzgojene na 30 °C, i 37 °C da bi se mogla analizirati temperaturna ovisnost. Idući dan iz bakterijskih stanica izolirani su ukupni proteini prilikom čega frakcija topljivih i frakcija netopljivih proteina nisu odvajane već su za daljnje istraživanje korišteni cjelokupni proteinski ekstrakti. Nakon izolacije određene su koncentracije ukupnih proteina u staničnim ekstraktima *E. coli* koristeći metodu po Bradfordu.

Prvo je ukupni proteinski sadržaj ekstrakata provjeren poliakrilamidnom gel-elektroforezom u prisutnosti SDS-a. Rezultati prikazani na Slici 11A i 11B pokazuju vrpce svih staničnih proteina iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns\Delta htpG$) transformiranih praznim vektorom pMR18 (pev, engl. *empty vector plasmid*) i vektorom koji sadrži gen *htpG*, pDM11, uzgojenih preko noći na 30, odnosno na 37 °C.

U prvu jažicu nanesen je marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards* (*Bio-rad*), dok su u jažice 2-5 naneseni ekstrakti ukupnih proteina iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns\Delta htpG$) transformiranih praznim vektorom pMR18 (pev), a u jažice 6-9 ekstrakti iz istih sojeva transformiranih rekombinantnim plazmidom pDM11 (pHtpG). Uzorci su naneseni tako da se u svakoj jažici nalazi 9 µg svih proteina.

Uzgoj bakterijskih stanica i izolacija ukupnih proteina napravljeni su u tri biološke replike te su prikazani reprezentativni rezultati.



Slika 11. Analiza ekstrakata ukupnih proteina poliakrilamidnom gel-elektroforezom. U prvu jažicu nanesen je marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards* (Bio-rad), u jažice 2-5 naneseni su proteinski ekstrakti sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δ *hns*), IIB1104 (Δ *htpG*) i IIB1105 (Δ *hns* Δ *htpG*) transformiranih praznim vektorom pMR18 (pev), a u jažice 6-9 ekstrakti iz istih sojeva transformiranih rekombinantnim plazmidom pDM11 (pHtpG) inkubiranih preko noći na **A**) 30 °C i **B**) 37 °C.

Analizom vrpce na gelu nakon elektroforeze uočena je vrpca pri veličini od oko 100 kDa, pri obje temperature, što bi teorijski moglo odgovarati proteinu Cas3. Vrpce proteina Cas3 u svim jažicama su podjednake te je teško uočiti razliku u količinama. Uočena je i jaka vrpca pri 75 kDa što bi moglo odgovarati šaperonu HtpG (71,4 kDa) koji je nadeksprimiran s plazmida. Također pri obje temperature, vidljivo je da sojevi koji su bili transformirani praznim plazmidom sadrže znatno manje količine šaperona HtpG od sojeva koji su transformirani rekombinantnim plazmidom koji sadrži gen *htpG*. Pri temperaturi od 30 °C, uočljiva je razlika između intenziteta vrpce šaperona HtpG u različitim sojevima transformiranim plazmidom pDM11 (nešto je jača u sojevima IIB1088 i IIB1104), dok je pri 37 °C ta razlika slabije vidljiva.

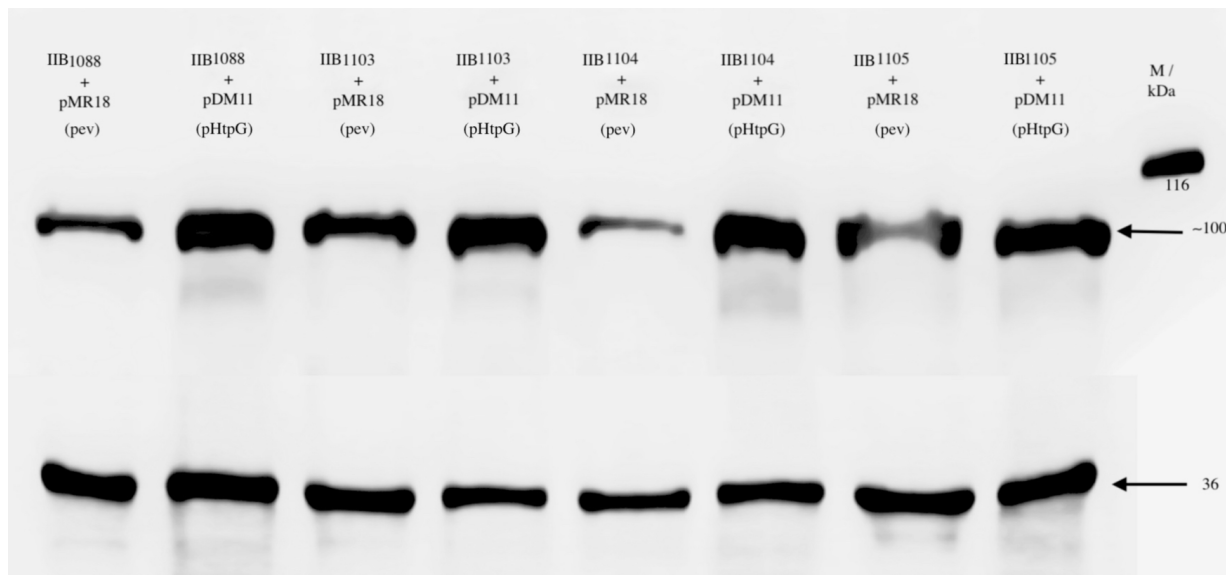
Metodom *western blot* određene su količine proteina Cas3 u proteinskim ekstraktima i njihova ovisnost o temperaturi i šaperonu HtpG. Protein Cas3 je detektiran indirektno pomoću polihistidinskog privjeska koji je ugrađen na N-terminalnoj domeni proteina. Anti-His antitijela koja specifično prepoznaju privjesak su konjugirana antitijela koja već sadrže vezanu peroksidazu iz hrena pa membrane nije potrebno inkubirati u sekundarnim antitijelima već samo dodati kemiluminescentni supstrat.

U prvom koraku ukupni proteini razdvojeni su poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz prisustvo SDS-a. U prvu jažicu nanosen je marker veličina *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific)* čije su vrpce vidljive na nitroceluloznoj membrani nakon prijenosa što olakšava praćenje redosljeda nanošenja uzoraka. Naizmjenično su nanoseni ekstrakti ukupnih proteina iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (*Δhns*), IIB1104 (*ΔhtpG*) i IIB1105 (*ΔhnsΔhtpG*) transformiranih praznim vektorom pMR18 i istih sojeva transformiranih rekombinantnim plazmidom pHtpG. U posljednju jažicu nanosen je drugi marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad)* čija je vrpca koja odgovara 116 kDa vidljiva prilikom detekcije što je korisno pri analizi signala. Uzorci su nanoseni tako da se u svakoj jažici nalazi 9 μg proteina te su inkubirani pri dvije različite temperature, 30 °C i 37 °C (Slika 12A i B). Postupak je dovršen kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode.

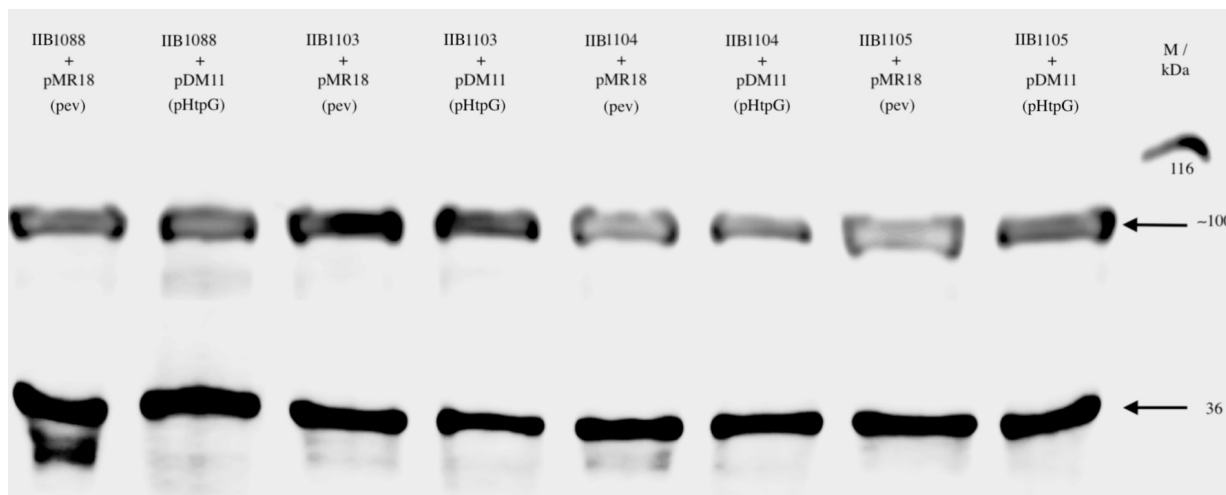
Da bi bili sigurni da su različite količine proteina Cas3 u različitim sojevima pouzdane, kao referentna kontrola (engl. *loading control*) korišten je *housekeeping* protein gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza čija ekspresija u stanici ostaje ista neovisno o okolišnim uvjetima i genotipu sojeva. GAPDH je detektiran pomoću primarnih anti-GAPDH i sekundarnih GAPDH anti-rabbit antitijela na koje je također vezana peroksidaza iz hrena. Dobiveni intenziteti signala izračunati u programu *Image Studio* normalizirani su prema odgovarajućim intenzitetima

signala vrpce proteina GAPDH te prema genotipu. Uzeto je da vrijednost intenziteta signala proteinske vrpce Cas3 u soju divljeg tipa jednaka 1 te su prema njemu prilagođeni intenziteti signala ostalih sojeva. Podaci su dodatno obrađeni u programu Microsoft Excel te prikazani na grafu (Slika 13A i B).

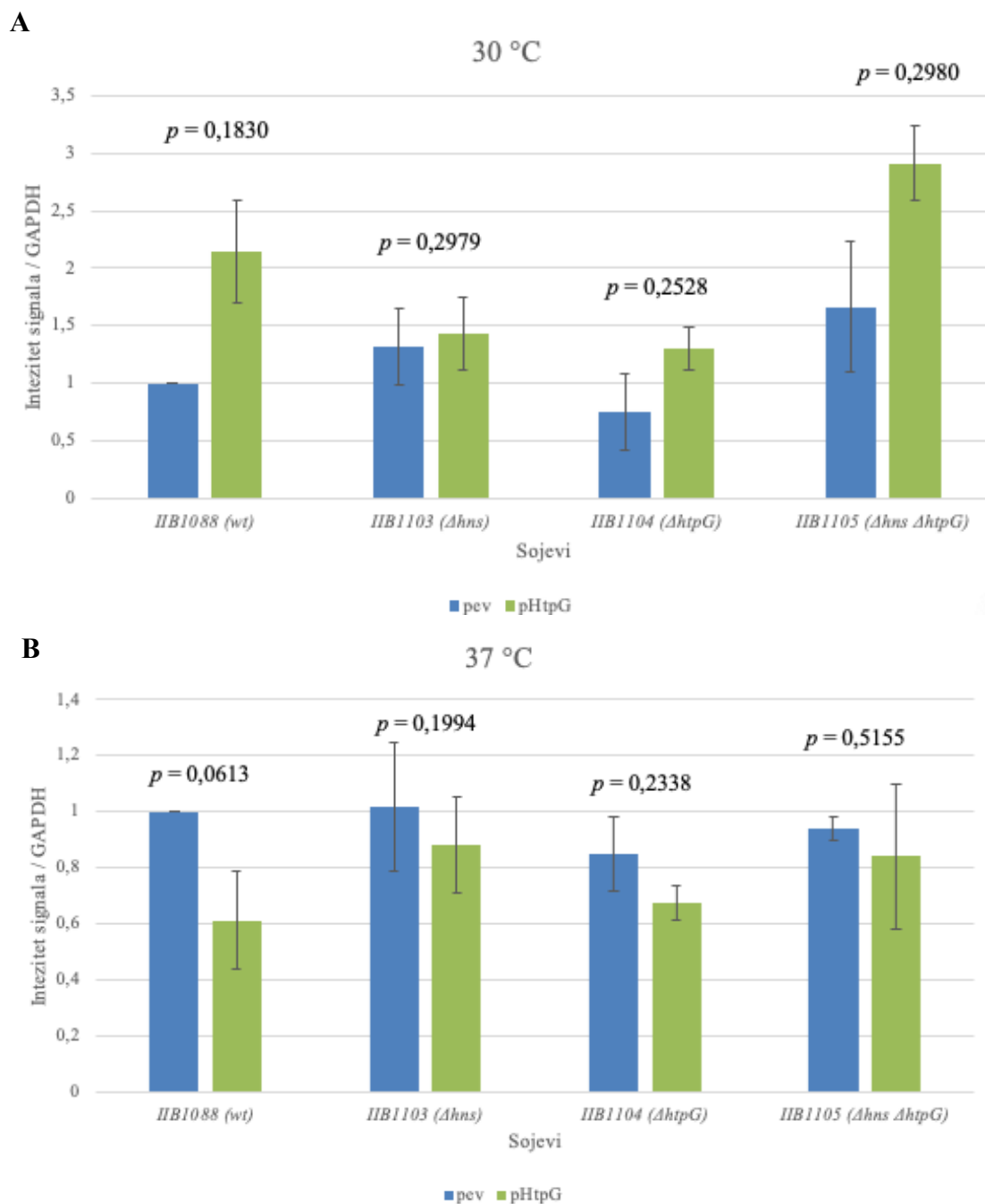
A



B



Slika 12. Analiza ekstrakata ukupnih proteina metodom *western blot*. Ekstrakti proteina sadrže ciljani protein Cas3 i kontrolni protein GAPDH iz bakterijskih sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δ *hns*), IIB1104 (Δ *htpG*) i IIB1105 (Δ *hns* Δ *htpG*) koji su transformirani praznim vektorom pMR18 i rekombinantnim vektorom pDM11 (pHtpG) te uzgojeni preko noći na **A**) 30 °C i **B**) 37 °C. Slovom M označen je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (*Thermo Fisher Scientific*). Proteini na membrani inkubirani su u anti-His konjugiranim antitijelima, odnosno primarnim anti-GAPDH i sekundarnim GAPDH anti-rabbit antitijelima te su detektirani kemiluminiscentno.



Slika 13. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije normaliziranih intenziteta signala proteinskih vrpca proteina Cas3 iz različitih bakterijskih sojeva uzgojenih pri **A)** 30 °C i **B)** 37 °C. Vrijednosti intenziteta signala proteinskih vrpca Cas3 normalizirane su prema odgovarajućim vrijednostima intenziteta signala vrpca referentnog proteina GAPDH i prema genotipu te im je određena standardna devijacija. Eksperiment je ponovljen u tri neovisne replike te je provedena statistička analiza.

Analizom intenziteta signala proteinskih vrpca proteina Cas3 može se uočiti da je povećanjem količina šaperona HtpG ekspresijom s plazmida došlo do porasta količine proteina

Cas3 u svim sojevima pri temperaturi od 30 °C u odnosu na iste sojeve s praznim plazmidom. Najveća razlika u porastu uočena je u soju divljeg tipa (oko 2 puta veća u odnosu na divlji tip transformiran praznim vektorom), dok je u sojevima Δhns i $\Delta hns\Delta htpG$ transformiranih s praznim plazmidom početna količina Cas3 veća nego u soju $\Delta htpG$ u kojem je ona nešto manja (Slika 13A). Komplementacijom gena *htpG* s plazmida vraća se njegova funkcija te intenzitet signala značajno raste. Iako je očekivano da količine proteina Cas3 u soju $\Delta hns \Delta htpG$ transformiranim praznim plazmidom budu manje nego kod istog soja *htpG*⁺ s obzirom da nedostatak šaperona HtpG smanjuje količine aktivnog proteina Cas3 u stanicama, dobiveni rezultati ukazuju da dvostruka delecija gena *hns* i *htpG* svejedno pospješuje njegovu ekspresiju kao u Δhns sojevima.

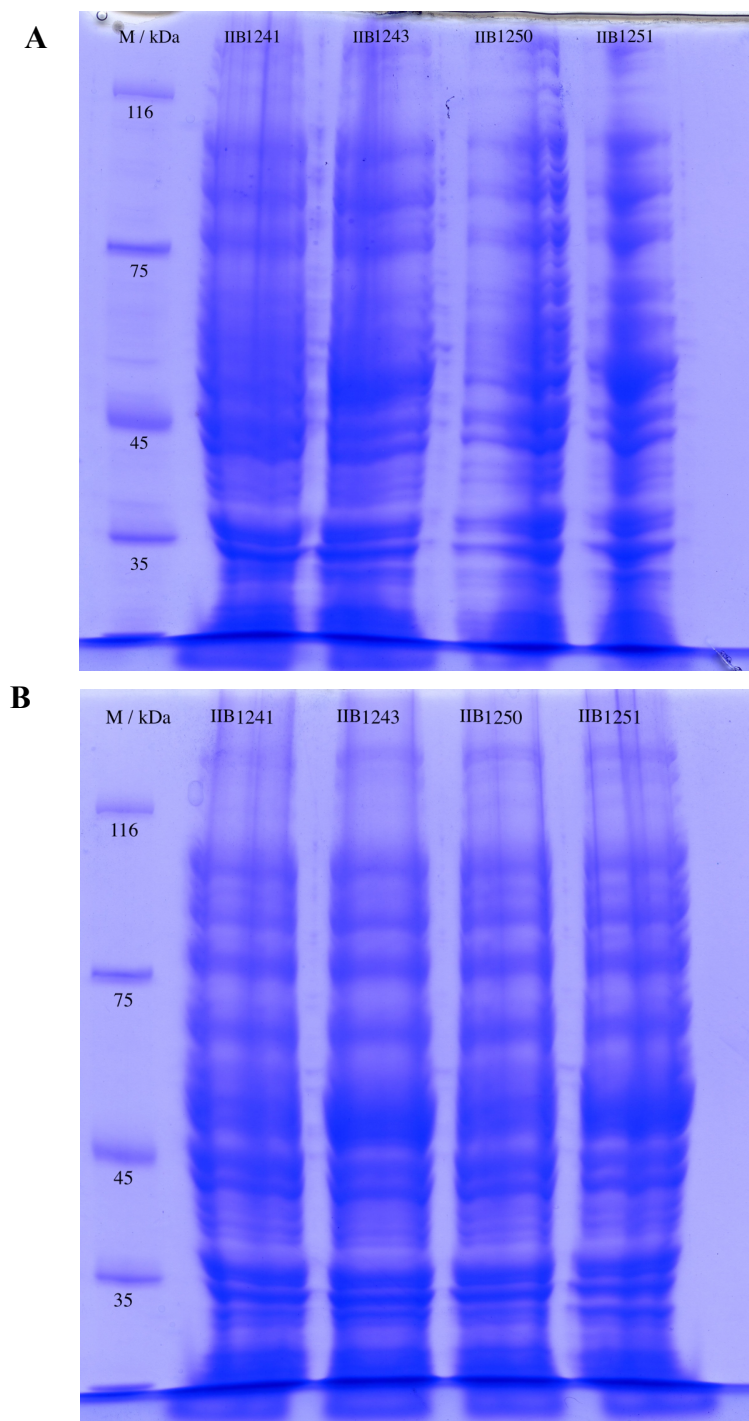
Pri 37 °C došlo je do suprotnog trenda (Slika 13B). Iako se na 37 °C uočava opadanje količine proteina Cas3 među sojevima, iz vrijednosti *p*, prikazanih na Slici 13 A i B, može se zaključiti da nema statistički značajne razlike između količina proteina Cas3 za iste sojeve transformirane praznim vektorom i pHtpG pri istoj temperaturi rasta, ni na 30 °C ni na 37 °C (*p* > 0,05).

4.2. Utjecaj temperature na količine proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora

Za ovo istraživanje koristili smo sojeve IIB1250 (*wt*), IIB1241 (Δhns), IIB1251 ($\Delta htpG$) i IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$) koji eksprimiraju protein Cas3 obilježen histidinom ali s vlastitog promotora. Sojevi su uzgojeni na 30°C i 37 °C i nisu bili transformirani plazmidnim vektorima jer smo željeli istražiti mogu li se detektirati protein Cas3 bez indukcije. Idući dan iz bakterijskih stanica su izolirani ukupni proteini prilikom čega frakcija topljivih i frakcija netopljivih nisu odvajane već su za daljnje istraživanje korišteni cjelokupni proteinski ekstrakti. Nakon izolacije određene su koncentracije ukupnih proteina u staničnim ekstraktima *E. coli* koristeći metodu po Bradfordu kao prethodno.

Ukupni proteinski sadržaj ekstrakata provjeren je poliakrilamidnom gel-elektroforezom u prisutnosti SDS-a. Rezultati prikazani na Slici 14A i B pokazuju vrpce cjelokupnih staničnih proteina iz čistih sojeva IIB1250 (*wt*), IIB1241 (Δhns), IIB1251 ($\Delta htpG$) i IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$) uzgojenih preko noći na 30, odnosno na 37 °C.

U prvu jažicu nanosen je marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards* (Bio-rad), dok su u jažice 2-5 nanoseni ekstrakti ukupnih proteina iz sojeva IIB1241 (Δhns), IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$), IIB1250 (*wt*) i IIB1251 ($\Delta htpG$), uzgajanih na 30 °C (Slika 14A). Na drugi gel su istim redosljedom nanoseni ekstrakti ukupnih proteina iz istih sojeva uzgajanih na 37 °C (Slika 14B). Uzorci su nanoseni tako da se u svakoj jažici nalazilo 9 μ g. Prilikom nanošenja proteinskih ekstrakata na gel uočeno je da su uzorci jako viskozni, pretpostavlja se zbog prevelikih količina genetičkog materijala uslijed nepotpune lize stanica prilikom sonikacije, te je ih teško nanijeti u jažice.

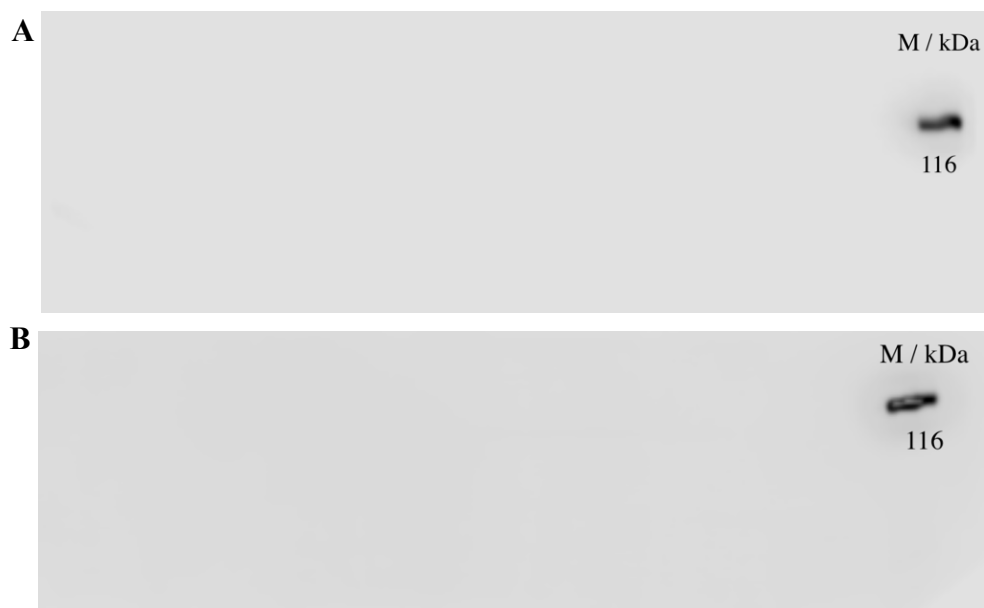


Slika 14. Analiza ekstrakata ukupnih proteina poliakrilamidnom gel-elektroforezom. U prvu jažicu nanesen je marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad)*, u jažice 2-5 nanesen su proteinski ekstrakti sojeva IIB1241 (Δhns), IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$), IIB1250 (*wt*) i IIB1251 ($\Delta htpG$) inkubiranih preko noći na **A**) 30 °C i **B**) 37 °C.

Analizom gela nakon provedbe elektroforeze uočeno je da proteinske vrpce koje odgovaraju ukupnim proteinima ekstrakata nisu u potpunosti razdvojene već je došlo do njihovog razmazivanja te je praktički nemoguće identificirati protein Cas3 na gelu pri obje temperature inkubacije.

Metoda *western blot* provedena je kako je opisano u potpoglavlju 4.1.4. U prvu jažicu poliakrilamidnog gela nanesen je marker veličina *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific)*, u jažice 2-5 ekstrakti ukupnih proteina iz čistih sojeva IIB1241 (Δhns), IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$), IIB1250 (*wt*) i IIB1251 ($\Delta htpG$) uzgajanih na 30 °C, a u jažice 6-9 ekstrakti iz istih sojeva uzgajanih na 37 °C. Na jedan gel su uzorci nanesen tako da se u svakoj jažici nalazi 9 μ g proteina, dok je na drugi gel nanesena maksimalna količina uzoraka koja stane u jažicu (30 μ L). U jažicu 10 nanesen je drugi marker veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad)*.

Nakon dodatka kemiluminescentnog supstrata i snimanja membrane na uređaju *C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences)* uočeno je da nije došlo do detekcije očekivanih proteinski vrpce na membrani pri obje temperature i obje količine uzoraka (Slika 15A i 15B). Na membrani je vidljiva samo vrpca koja odgovara 116 kDa i pripada markeru veličina *Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific)*.



Slika 15. Analiza ekstrakata ukupnih proteina metodom *western blot*. Ekstrakti proteina sadrže ciljni protein Cas3 obilježen histidinskim privjeskom iz bakterijskih sojeva IIB1241 (Δhns), IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$), IIB1250 (*wt*) i IIB1251 ($\Delta htpG$) uzgojeni preko noći na 30 °C i 37 °C. Uzorci su nanoseni na gel tako da ukupna proteina količina bude **A**) 9 μ g i **B**) maksimalna količina koja se može nanijeti u jažicu (30 μ l). Slovom M označen je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (*Thermo Fisher Scientific*). Proteini na membrani inkubirani su u anti-His konjugiranim antitijelima te su detektirani kemiluminiscentno komercijalnim kompletom *ECL Western blot Substrate* (*Promega*).

Eksperiment je ponovljen koristeći novi *stock* anti-His antitijela i osjetljivijeg reagensa za detekciju *Radiance ECL Western blot Detection Kit* (*Azure Biosystems*). Također, prilikom izolacije proteina talozi bakterijskih stanica nakon centrifuge resuspendirani u 200 μ L pufera za lizu umjesto u 600 μ L da bi uzorci bili što koncentriraniji (Slika 16 A i B).



Slika 16. Analiza ekstrakata ukupnih proteina metodom *western blot*. Ekstrakti proteina sadrže ciljni protein Cas3 obilježen histidinskim privjeskom iz bakterijskih sojeva IIB1241 (Δhns), IIB1243 ($\Delta hns\Delta htpG$), IIB1250 (*wt*) i IIB1251 ($\Delta htpG$) uzgojeni preko noći na 30 °C i 37 °C. Uzorci su nanoseni na gel tako da ukupna proteina količina bude **A**) 9 μ g i **B**) maksimalna količina koja se može nanijeti u jažicu (30 μ l). Slovom M označen je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific). Proteini na membrani inkubirani su u svježim anti-His konjugiranim antitijelima te su detektirani kemiluminescentno komercijalnim kompletom *Radiance ECL Western blot Detection Kit* (Azure Biosystems).

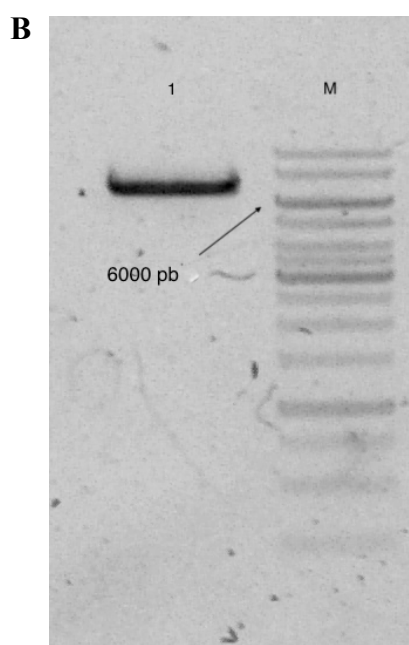
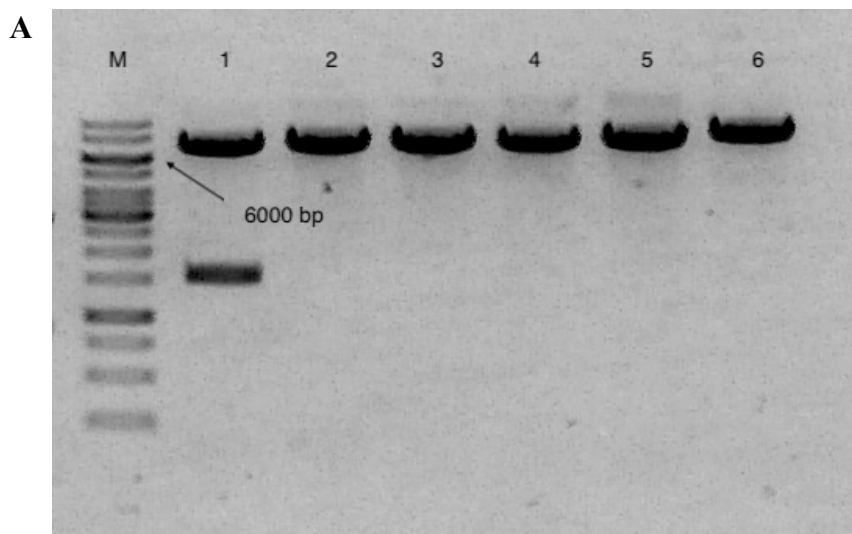
Nakon provedbe eksperimenta, ponovno nisu uočeni očekivani signali na membrani (Slika 16A i 16B) već je vidljiva samo vrpca koja odgovara 116 kDa i pripada markeru veličina *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Fisher Scientific) te je zaključeno da se protein Cas3 s vlastitog promotora ekspirira u premalim količina da bi se mogao detektirati ovom metodom, neovisno o genotipu sojeva i temperaturi rasta.

4.3. Utjecaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG na aktivnost proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vivo*

U zadnjem dijelu istraživanja željeli smo istražiti koja je enzimatska aktivnost šaperona HtpG odgovorna za povećanje količine proteina Cas3. Ciljanom mutagenozom uspješno su priređeni rekombinantni plazmidi pHtpG (u vektoru pBAD18) koji sadrže točkaste mutacije E34A i W467R u genu *htpG* (kako je opisano u potpoglavlju 3.2.1.2). Nakon izolacije plazmida iz

transformiranih stanica komercijalnim kompletom *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*, njihova ispravnost potvrđena je restrikcijskom analizom. Plazmidi su pocijepani restrikcijskom endonukleazom *EcoRI* i analizirani agaroznom gel-elektroforezom. pDM9 i pDM10 su izolirani iz tri različite kolonije (Slika 17A) dok je pDM13 izoliran iz dvije (Slika 17B). Analizom podataka utvrđeno je da signali na gelu odgovaraju veličini 6,5 kb što je u skladu s teorijski izračunatoj veličini porezanih plazmida.

Da bi se dodatno utvrdilo da li gen *htpG* sadržava željenu mutaciju, plazmidi su poslani na sekvenciranje kodirajućeg slijeda u servisu MacroGen (Nizozemska) te je potvrđena prisutnost željene mutacije u pDM9 i pDM10. Utvrđeno da plazmid pDM13 nije sadržavao željenu mutaciju što znači da uvođenje točkaste mutacije M546T ciljanom mutagenезom nije bilo uspješno.



Slika 17. Analiza fragmenata DNA agaroznom gel-elektroforezom nakon restrikcijske analize **A)** plazmida pDM9 (1-3) i pDM10 (4-5) i **B)** plazmida pDM13 (1). Slovom M označen je marker veličina *GeneRuler 1 kb DNA*.

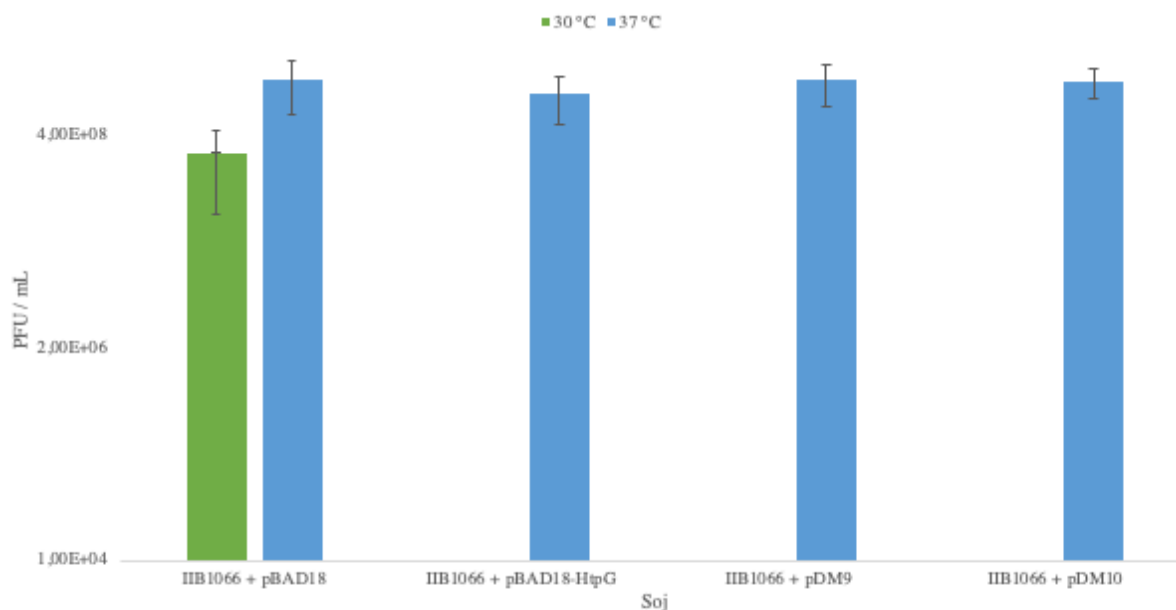
4.3.1. Određivanje efikasnosti infekcije fagom lambda

Nakon uspješne pripreme točkastih mutanata HtpG E34A i W467R na plazmidu koristeći metodu ciljane mutageneze, soj IIB1066 ($\lambda T3 \lambda c \Delta hns \Delta htpG$) transformiran je plazmidima pDM9 i pDM10. Uz njih, soj je transformiran praznim plazmidom pBAD18 za negativnu kontrolu i plazmidom pBAD18-HtpG za pozitivnu kontrolu. U ovom soju nedostaje šaperon HtpG koji je potreban za aktivnost proteina Cas3 što čini soj osjetljivim na infekciju fagom λvir na 30 °C. Ekspresijom šaperona HtpG s plazmida komplementira se ova mutacija i uspostavlja otpornost na infekciju fagom⁴. Na temelju pojave plakove može se zaključiti koja je aktivnost proteina HtpG neophodna za uspostavljanje aktivnosti i stabilizacije proteina Cas3.

Decimalna razrjeđenja faga λvir nanosena su na livade transformiranih bakterija te su krute podloge inkubirane preko noći na 30 °C i 37 °C. Decimalna razrjeđenja faga bila su svježe pripremljena te su bakterijske kulture soja IIB1066 + pBAD18/pBAD18-HtpG/pDM9/pDM10 uzgojene uz dodatak 0,2 %-tne otopine L-arabinoze i ampicilina. Eksperiment izveden u 4 neovisne replike te su prebrojane nastale čistine na bakterijskim livadama pri 30 °C i 37 °C prema kojima je izračunata srednja vrijednost jedinice formiranja plakova (PFU) po mililitru (Tablica 14). Podaci su analizirani i obrađeni pomoću programa Microsoft Excel te prikazani u grafičkom obliku (Slika 18).

Tablica 14. Srednje vrijednosti broja plakova (PFU) po mL na bakterijskim livadama sojeva IIB1066 ($\Delta hns \Delta htpG$) + pBAD18/pBAD18-HtpG/pDM9/pDM10 inkubiranih preko noći na 30 °C i na 37 °C. Bakterijske stanice inficirane su s četiri različita decimalna razrjeđenja faga λvir te je eksperiment ponovljen u četiri nezavisne replike.

Sojevi	PFU / mL	
IIB1066 + pBAD18	2,54 x 10 ⁸	1,60 x 10 ⁹
IIB1066 + pBAD18-HtpG	n/a	1,10 x 10 ⁹
IIB1066 + pDM9	n/a	1,57 x 10 ⁹
IIB1066 + pDM10	n/a	1,53 x 10 ⁹
Temperatura inkubacije	30 °C	37 °C



Slika 18. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije broja plakova (PFU) po mL na bakterijskim livadama sojeva IIB1066 ($\Delta hns\Delta htpG$) + pBAD18/pBAD18-HtpG/pDM9/pDM10 inkubiranih preko noći na 30 °C i na 37 °C. Bakterijske stanice inficirane su s četiri različita decimalna razrijeđenja faga λvir te je eksperiment ponovljen u četiri nezavisne replike.

Kao i što je očekivano, u soju IIB1066 ($\Delta hns\Delta htpG$) transformiranim praznim vektorom pBAD18, nije došlo do obrane od infekcije fagom λvir neovisno o temperaturi inkubacije zbog nedostatka gena *htpG*. Komplementacijom genom divljeg tipa šaperona HtpG s plazmida dolazi do povratka funkcije sustava i efikasne obrane od infekcije pri temperaturi od 30 °C što je u skladu s očekivanim rezultatima. Uočeno je da točkaste mutacije uvedene u kodirajući slijed šaperona HtpG, zamjena glutamata u alanin (E34A) i triptofana u arginin (W467R), ne utječu na efikasnost od obrane na infekciju fagom lambda u soju $\Delta hns\Delta htpG$ te se ponašaju kao divlji tip proteina HtpG pri 30 °C. Na 37 °C nema značajne razlike među vrijednostima PFU kod soja IIB1066 transformiranog praznim vektorom, pHtpG i točkastim mutantima pHtpG.

§ 5. RASPRAVA

5.1. Relativna kvantifikacija proteina Cas3 u ovisnosti o jačini promotora i šaperonu HtpG pri dvije različite temperature

U ovom istraživanju, cilj je bio proučiti kako protein HtpG utječe na količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi rasta. Slična istraživanja su već rađena u grupi prof. Ivančić Baće, ali zbog problema s plazmidom pHtpG rezultati nisu bili pouzdani. U diplomskom radu M. Pravica (2020), gen *htpG* je bio ukloniran u plazmid pCDF-1b, pod inducibilnim promotorom faga T7 koji za prepisivanje treba T7-RNA-polimerazu uz dodatak IPTG-a (izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid) kao induktora. Navedeni plazmid je odabran pošto sadrži gen za otpornost na streptomycin koja se razlikuje od onih koje se već nalaze u kromosomu korištenih sojeva. Problem je bio taj što transformirani bakterijski sojevi *E. coli* nisu sadržavali uvedeni gen za T7-RNA-polimerazu te u pravilu nije trebalo ni doći do ekspresije šaperona HtpG s plazmida s obzirom da bakterijska RNA-polimeraza ne može prepoznati navedeni promotor. Pošto je ipak došlo do tzv. *leaking* ekspresije, dobiveni rezultati nisu bili pouzdani. Da bi se ispravila pogreška, u bakterijske sojeve uveden je gen za T7-RNA-polimerazu te je s njima zapravo započelo moje istraživanje. Iako je konstrukcija sojeva u kojima se može pouzdano eksprimirati HtpG s navedenog plazmida koji sadrži T7 promotor trebala riješiti problem, prilikom detekcije proteina Cas3 metodom *western blot* nije došlo do pojave očekivanih signala kao što je dobiveno u diplomskom radu M. Pravica, te je zanimljivo da je zapravo došlo do pogoršanja umjesto poboljšanja. U nekim sojevima signali nisu ni detektirani te je zaključeno da plazmid ne funkcionira kako bi trebao iz razloga koju su i dalje nepoznati. Zato je zaključeno da se najbolje vratiti na prethodno korištene sojeve (koji ne sadrže gen za T7-RNA-polimerazu) i pripremiti novi plazmid pHtpG koji sadrži gen za otpornost na streptomycin i koji se može prepisivati RNA-polimerazom domaćina. S obzirom da većina komercijalno dostupnih plazmida ne sadrži gen za otpornost na streptomycin, novi prazan vektor priredio je M. Radović uzevši dio plazmida pCDF-1b, točnije njegovu otpornost, i spajajući ga s plazmidom pBAD-HisA tako da višestruko mjesto za kloniranje ostane nepromijenjeno. U njega je tada ukloniran divlji tip gena *htpG* pod inducibilnim promotorom P_{BAD} čija se ekspresija potiče L-arabinozom. Nakon provjere njegove ispravnosti, „stari“ sojevi su transformirani novim plazmidom pHtpG

i analizirani su ukupni proteini. Protein Cas3 je napokon uspješno detektiran u svim sojevima pri 30 °C i 37 °C.

Analizom poliakrilamidnih gelova nakon provedbe elektroforeze uočene su proteinske vrpce koje po veličini odgovaraju proteinu Cas3 i HtpG (Slika 11A i 11B). Za detekciju proteina Cas3 na nitroceluloznoj membrani korišten je ukupni proteinski ekstrakt, tj. nisu odvajane frakcije topljivih i netopljivih proteina nakon lize stanice, kao što je rađeno u prijašnjim istraživanjima, radi točnije detekcije količina u ukupnom lizatu stanica. Prilikom odvajanja taloga i supernatanta, pogotovo uoči prekomjerne ekspresije proteina, moguće su agregacije proteina od interesa i njegovo zaostajanje u talogu što može dovesti do velikih gubitaka u količini topljivog proteina te su zato metodom *western blot* analizirani ukupni stanični ekstrakti. Dodatno, pouzdanost rezultata se osigurala detekcijom proteina GAPDH čije se količine u stanicama ne mijenjaju te se tako korigiraju pogreške prilikom nanošenja uzoraka.

Pri 30 °C uočen je porast količina Cas3 u svim istraživanim sojevima transformiranim s plazmidom koji sadrži divlji tip gena *htpG*, u odnosu na iste sojeve transformirane s praznim plazmidom (Slika 13A), što je u skladu s dosadašnjim podacima da prekomjerna ekspresija šaperona HtpG pomaže pri očuvanju funkcionalnih količina proteina Cas3 u stanicama.⁵ Iako je gen *cas3* u svim sojevima bio eksprimiran s inducibilnog promotora P_{BAD} i količine transkripta *cas3* su bile slične, veće količine proteina Cas3 uočene su u soju Δhns što je mogući indirektni efekt mutacije *hns*.⁵³

U soju $\Delta htpG$ koji sadrži prazni plazmid, količina proteina Cas3 je bila manja nego u soju divljeg tipa što je i očekivano s obzirom da šaperon HtpG ima ulogu u stabilizaciji i očuvanju funkcionalnih količina proteina Cas3⁵. Kada se deletirani gen $\Delta htpG$ komplementirao ekspresijom HtpG s plazmida, intenzitet signala proteinskih vrpca Cas3 znatno se povećao u oba $\Delta htpG$ soja. Zanimljivo je da iako je očekivano da u dvostrukom mutantu $\Delta hns\Delta htpG$ transformiranim s praznim plazmidom intenzitet signala bude manji od intenziteta Δhns soja, uočeno je da delecija oba gena pospješuje količine proteina Cas3. Moguće je da delecija gena represora *hns* nadjačava efekt delecije gena *htpG* te svejedno dolazi do povećane ekspresije Cas3 (Slika 13A). Iako prema ovim rezultatima, dvostruki mutant $\Delta hns\Delta htpG$ sadrži veću količinu proteina Cas3 u odnosu na soj Δhns , soj nije otporan na infekciju fagom lambda pri 30 °C.⁴

Yosef i suradnici⁵ pokazali su da se količina proteina Cas3 u stanicama $\Delta htpG$ u kojima je eksprimiran šaperon HtpG s plazmida trostruko povećala na 37 °C, ali s obzirom da je u tom

istraživanju protein Cas3 eksprimiran s plazmida te su korištene stanice u logaritamskoj fazi rasta, teško je uspoređivati naše i njihove rezultate. U svom diplomskom radu, M. Macuka je pokazao da u logaritamskim stanicama nema razlike u količini proteina Cas3 između različitih sojeva i temperature uzgoja i zato se prešlo na istraživanje na stacionarnim stanicama.

U ovom istraživanju, u kojem su korištene stacionarne stanice i protein Cas3 je eksprimiran s kromosoma, rezultati pokazuju suprotno nego kod Yosef i suradnika⁵. Uz dodatak šaperona HtpG, došlo je do prividnog smanjenja količina proteina Cas3 u gotovo svim sojevima uzgojenim na 37 °C u odnosu na sojeve koji su sadržavali prazan plazmid što je neočekivano (Slika 13B). Statističkom analizom srednjih vrijednosti količina proteina Cas3 u različitim sojevima transformiranih praznim vektorom i pHtpG pri 37 °C procijenjeno je da razlike nisu statistički značajne kao što je dobiveno u istraživanju Yosefa i suradnika⁵ te za to nema konkretnog objašnjenja. Prethodni rezultati u grupi prof. Ivančić Baće ukazuju da dolazi do konformacijske promjene u proteinu Cas3 pri 35 °C na koju šaperon HtpG ne može utjecati.⁵⁴ Ipak, povećanje količina proteina Cas3 se uočava uz nadeskpresiju šaperona HtpG na 30 °C u svim sojevima osim Δhns gdje je povećanje povezano s *hns* mutacijom. Međutim, zbog velikih oscilacija u pokusima i malog broja nezavisnih replika, statistički značajno povećanje nije se dogodilo niti u jednom od sojeva s obzirom da su vrijednosti *p* bile veće od 0,05 te bi eksperiment trebalo ponoviti više puta.

Također, teško je procijeniti da li su ti podaci pouzdani. Zbog velike količine proteina Cas3 pri 37 °C i načina detekcije, kojim je intenzitet signala mjeren nakon nekog određenog vremena, postoji mogućnost je došlo do tzv. blijedenje (engl. *bleaching*), odnosno saturacije signala zbog prevelike količine kemiluminiscencije, što bi rezultiralo nepouzdanim vrijednostima. Treba uzeti u obzir i to da je protein Cas3 u svim sojevima eksprimiran s inducibilnog promotora i da dobivene količine nisu native za stanicu te je zato eksperiment proveden na sojevima koji sadrže protein Cas3 pod regulacijom vlastitog promotora i koji nisu transformirani plazmidima.

U te svrhe, u drugom dijelu istraživanja korišteni su slični delecijски sojevi koji sadrže gen *cas3* s polihistidinskim privjeskom, ali pod nativnim promotorom. Da bi se detektirale količine proteina Cas3 u fiziološkim količinama pri dvije različite temperature bilo je ključno da ne dolazi do nadekspresije Cas3 ni šaperona HtpG s plazmida pa sojevi nisu transformirani vektorima. Kao i u prethodnom eksperimentu, supernatant nije odvajan od taloga već su korišteni ukupni stanični ekstrakti.

Da bi lakše detektirao protein Cas3 na jedan gel uzorci su nanoseni tako da svaki sadrži 9 µg ukupnih proteina, dok je na drugi nanosena maksimalna količina u slučaju da je količina od 9 µg premala za detekciju. Analizom gela uočeno je da nije došlo do pravilnog razdvajanja proteina na gelu već je došlo do razmazivanja uzoraka u jažicama. Moguće je da su uzorci sadržavali velike količine genomske DNA što bi objasnilo njihovu viskoznost i razmazivanje na gelu. Tretiranjem uzoraka DNazom ili korištenjem kemijske lize umjesto sonikacije za razbijanje stanica moglo bi se poboljšati razdvajanje ukupnih proteina razgradnjom viška genomske DNA i ostalih staničnih komponenti.

Detekcijom na nitroceluloznoj membrani signali koji odgovaraju proteinu Cas3 u oba eksperimenta nisu uočeni (Slika 15A i B, Slika 16A i B). Nije došlo do pojave proteinskih vrpca ni na jednoj od membrana, niti kada je nanosena maksimalna količina uzoraka, već je samo vidljiva vrpca koja odgovara markeru veličina što znači da su korištena antitijela bila funkcionalna. Ovim pokusom se željela doznati stvarna situacija u ekspresiji proteina Cas3 – jesu li signali proteinski vrpca pri 30 °C jači u odnosu na 37 °C te da li će varirati ovisno o genotipu soja kao u prethodnom eksperimentu. Zbog izostanka signala proteina Cas3 može se zaključiti da su količine proteina Cas3 kad se prepisuje s vlastitog promotora toliko niske da se ne mogu detektirati metodom *western blot* te da je jačina promotora ključna prilikom njihove analize. Protokol bi se mogao poboljšati korištenjem kemijske lize stanica čime bi se povećala točnost prilikom nanošenja uzoraka na gel zbog manje viskoznosti. Osjetljivost metode bi se mogla značajno povećati korištenjem specifičnih anti-Cas3 antitijela za Cas3 iz bakterije *E. coli* koja bi omogućila direktnu detekciju proteina i samim time jači intenzitet signala.

5.2. Utjecaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG na obranu od infekcije fagom lambda

U posljednjem dijelu istraživanja, željelo se ispitati da li uvođenjem određenih točkastih mutacija u nukleotidni slijed gena *htpG* dolazi do promjena u aktivnosti proteina koje utječu na stabilnost proteina Cas3 i posljedično na efikasnost obrane od infekcije faga lambda.

Zamjene glutamata u alanin (E34A) i triptofana u arginin (W467R) u šaperonu HtpG korištene su u istraživanju Balasubramanian i suradnika⁵² gdje je pokazano da navedeni bočni ogranci sudjeluju u hidrolizi ATP-a, odnosno vezanju proteinskih supstrata, za što smo pretpostavili da bi moglo biti od važnosti u interakciji s proteinom Cas3. Htjelo se ispitati i

djelovanje točkaste mutacije M546T, odnosno zamjene metionina u treonin, koja je također korištena u navedenom istraživanju, ali nažalost promjena nije uspješno uvedena u nukleotidni slijed gena *htpG*. U bakterijskom soju IIB1066 u kojem su geni *hns* i *htpG* deletirani i koji sadrži odgovarajuće anti-lambda razmaknice, poznato je da su stanice osjetljive na infekciju fagom *λvir* na obje temperature, ali da uz prekomjernu ekspresiju šaperona HtpG s plazmida dolazi do potpune rezistencije pri 30 °C ali ne i 37 °C.⁴ Analizom bakterijskih kultura soja IIB1066 + pBAD18/pBAD18-HtpG/pDM9/pDM10 (Tablica 14, Slika 18), uočeno je da pri 30 °C, u skladu s prethodnim istraživanjima, dolazi do pojave plakova u soju transformiranog s praznim plazmidom pBAD18. Dodatkom šaperona HtpG na plazmidu nije došlo do pojave plakova što znači da su se stanice efikasno obranile od infekcije i što je u skladu s očekivanim. Međutim, isto je uočeno i u stanicama transformiranim s plazmidima koje sadrže točkaste mutacije u genu *htpG*. To ukazuje da zamijenjene aminokiseline u proteinu HtpG ne utječu na aktivnost proteina HtpG u interakciji s proteinom Cas3 i njegovu stabilizaciju. Moguće je da soj IIB1066 nije dobar model, možda je aktivnost proteina HtpG dovoljno očuvana na 30 °C da bi se uočile suptilne razlike. Možda bi se efekt mogao uočiti metodom *western blot* i istražiti dolazi li do promjena u količini proteina Cas3 kad se koristi mutirani HtpG.

Na 37 °C, sustav CRISPR-Cas gubi svoju efikasnost u obrani od infekcije, što se može objasniti konformacijskom promjenom u proteinu Cas3 i smanjenjem nukleazne aktivnosti.⁴⁰ HtpG je predložen da pomaže u predaji proteina Cas3 u pravilnoj konformaciji do kompleksa Cascade.⁴⁰ Međutim, povećanjem količina HtpG nije došlo do uspostavljanja otpornosti prilikom infekcije fagom lambda, neovisno da li se radilo o divljem tipu gena ili točkastim mutantima. Neobično je da šaperon HtpG, koji bi inače trebao biti zastupljen u većim količinama kao dio Hsp odgovora na 37 °C, čak i kad je u suvišku ne može suprimirati nedostatak aktivnosti proteina Cas3. Možda šaperon HtpG usmjerava protein Cas3 na proteolitičko cijepanje što može objasniti manje količine proteina Cas3 u njegovom suvišku na 37 °C. Daljnja istraživanja su potrebna da bolje razjasne ovaj efekt.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Uspješno je priređen rekombinantni plazmid pDM11 (pHtpG) za prekomjernu ekspresiju divljeg tipa šaperona HtpG pod inducibilnim arabinoznom promotorom.
- Protein Cas3 s polihistidinskim privjeskom uspješno je detektiran i kvantificiran metodom *western blot* samo kad je eksprimiran s inducibilnog a ne s vlastitog promotora.
- Nadekspresijom šaperona HtpG u svim istraživanim sojevima *E. coli* pri 30 °C došlo je do povećanja intenziteta signala proteinskih vrpca Cas3 u odnosu na sojeve koji sadrže prazan plazmid. Nadekspresijom šaperona HtpG pri 37 °C smanjile su se količine proteina Cas3 što sugerira moguću negativnu ulogu šaperona HtpG na količine proteina Cas3 pri povišenoj temperaturi. No, zbog velikih razlika u rezultatima i malog broja replika teško je donijeti pouzdane zaključke.
- Jačina promotora za gen *cas3* je ključna i analiza količina proteina Cas3 je moguća samo ekspresijom s inducibilnog promotora.
- Uspješno su priređeni samo točkasti mutanti E34A i W467R gena *htpG* na plazmidu.
- Točkasti mutanti šaperona HtpG, E34A i W467R, nisu pokazali mutantni fenotip i ponašali su se poput divljeg tipa. Uvedene mutacije nisu pokazale pogoršanje interakcije šaperona HtpG s proteinom Cas3 pri 30 °C.

§ 7. POPIS KRATICA

APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cAMP-CRP	engl. <i>cAMP receptor protein</i>
Cas	engl. <i>CRISPR-associated genes</i>
Cascade	engl. <i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>
CBB	engl. <i>Commassie brilliant blue</i>
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
CTD	C-terminalna domena
dl DNA	dvolančana DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
H-NS	engl. <i>histone-like nucleoid-structuring protein</i>
HD	histidin-aspartat
HNH	histidin-asparagin-histidin
HtpG	engl. <i>high-temperature protein G</i>
IPTG	izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid
j1DNA	jednolančana DNA
LB	Luria-Bertani
LeuO	engl. <i>transcriptional activator of leuABCD operon</i>

PAGE	engl. <i>polyacrylamide gel-electrophoresis</i>
PAM	engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
pb	parovi baza
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pev	engl. <i>empty vector plasmid</i>
PFU	engl. <i>plaque-forming units</i>
PMSF	engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pre-crRNA	engl. <i>primary crRNA</i>
RAMP	engl. <i>receptor activity-modifying protein</i>
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SF2	engl. <i>superfamily 2</i>
sgRNA	engl. <i>single-guide RNA</i>
StpA	engl. <i>suppressor of td phenotype A</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
tracrRNA	engl. <i>trans-activating CRISPR RNA</i>
Tris	engl. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. K. S. Makarova, E. V. Koonin, *Methods Mol. Biol.* **1311** (2015) 47–75.
2. D. P. Clark, N. J. Pazdernik, M. R. McGehee, M. R., *Molecular Biology*, Academic Cell, 2019, str. 622–653.
3. Makarova, Kira S., et al. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**(11) (2015) 722-736.
4. K. Majsec, E. L. Bolt, I. Ivančić-Baće, *BMC Microbiol.* **16**(1) (2016) 1-9.
5. I. Yosef, M. G. Goren, R. Kiro, R. Edgar, U. Qimron, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**(50) (2011) 20136-20141.
6. Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, *J. Bacteriol.* **169**(12) (1987) 5429–5433.
7. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang *Cell.* **157**(6) (2014) 1262–1278.
8. R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra, L. M. Schouls, *Mol. Microbiol.* **43**(6) (2002) 1565–1575.
9. A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, *Microbiol.* **151**(8) (2005) 2551–2561.
10. F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, *J. Mol. Evol.* **60**(2) (2005) 174–182.
11. P. Horvath, R. Barrangou, *Science.* **327**(5962) (2010) 167–170.
12. S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost, *Science.* **321**(5891) (2008) 960–964.
13. J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, *Nature.* **468**(7320) (2010) 67–71.
14. R. Barrangou, *Genome Biol.* **16** (2015) 247.
15. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science.* **337**(6096) (2012) 816–821.
16. I. Yosef, M. G. Goren, U. Qimron, *Nucleic Acids Res.* **40**(12) (2012) 5569–5576.
17. B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna, *Nature.* **482**(7385) (2012) 331–338.
18. N. Beloglazova, G. Brown, M. D. Zimmerman, M. Proudfoot, K. S. Makarova, M. Kudritska, *J. Biol. Chem.* **283**(29) (2008) 20361–20371.

19. K. H. Nam, F. Ding, C. Haitjema, Q. Huang, M. P. DeLisa, A. Ke, *J. Biol. Chem.* **287**(43) (2012) 35943–35952.
20. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, *Nat. Rev. Genet.* **11**(3) (2010) 181–190.
21. G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**(39) (2012) E2579–2586.
22. C. R. Hale, P. Zhao, S. Olson, M. O. Duff, B. R. Graveley, L. Wells, R. M. Terns, M. P. Terns, *Cell.* **139**(5) (2009) 945–956.
23. L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer, *Nature.* **463**(7280) (2010) 568–571.
24. https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/ (datum pristupa: 22. lipnja 21)
25. A. V. Wright, J. K. Nuñez, J. A. Doudna, *Cell.* **164**(1–2) (2016) 29–44.
26. K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, E. V. Koonin, *Nat. Rev. Microbiol.* **9**(6) (2011) 467–477.
27. T. Sinkunas, G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *EMBO J.* **30** (2011) 1335–1342.
28. S. J. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, M., E. R. Westra, R. H. J. Slijkhuis, A. P. L. Snijders, J. van der Oost, *Science.* **321** (2008) 960–964.
29. E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, E. Charpentier, *Nature.* **471** (2011) 602–607.
30. D. Mitić, M. Radovčić, D. Markulin, I. Ivančić-Baće, *Biochimie.* **174**(2020) 136–143.
31. F. J. M. Mojica, C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, C. Almendros, *Microbiol.* **155**(3) (2009) 733–740.
32. K. A. Datsenko, K. Pougach, A. Tikhonov, B. L. Wanner, K. Severinov, E. Semenova, *Nat. Commun.* **3**(1) (2012).
33. J. K. Nuñez, A. S. Y. Lee, A. Engelman, J. A. Doudna, *Nature.* **519**(7542) (2015) 193–198.
34. I. Ivančić-Baće, S. D. Cass, S. J. Wearne, E. L. Bolt, *Nucleic Acid Res.* **43**(22) (2015)
35. Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and Disease*, **76**(1).
36. M. M. Jore, M. Lundgren, E. van Duijn, J. B. Bultema, E. R. Westra, S. P. Waghmare, S. J. J. Brouns, *Nat. Struct. Mol.* **18**(5) (2011)

37. E. R. Westra, D. C. Swarts, R. H. J. Staals, M. M. Jore, S. J. J. Brouns, J. van der Oost, *Annu. Rev. Genet.* **46**(1) (2012) 311–339.
38. T. Sinkunas, G. Gasiunas, S. P. Waghmare, M. J. Dickman, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, *EMBO J.* **32**(3) (2013) 385–394.
39. G. J. Knott, J. A. Doudna, *Science.* **361** (2018) 866–869.
40. L. He, M. St. John James, M. Radovcic, I. Ivancic-Bace, E. L. Bolt, *Genes.* **11**(2) (2020) 208.
41. Y. Huo, K. H. Nam, F. Ding, H. Lee, L. Wu, Y. Xiao, M. D. Farchione Jr., S. Zhou, K. Rajashankar, I. Kurinov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21** (2014) 771–777.
42. B. Gong, M. Shin, J. Sun, C. H. Jung, E. L. Bolt, J. van der Oost, J. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (2014) 16359–16364.
43. M. L. Hochstrasser, D. W. Taylor, P. Bhat, C. K. Guegler, S. H. Sternberg, E. Nogales, J. A. Doudna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (2014) 6618–6623.
44. L. Loeff, S. J. J. Brouns, C. Joo, *Mol. Cell.* **70** (2018) 385–394.
45. S. Awate, R. M. Brosh Jr., *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017) 1233.
46. Y. Xiao, M. Luo, A. E. Dolan, M. Liao, A. Ke, *Science.* **361**(6397) (2018).
47. C. Richter, R. L. Dy, R. E. McKenzie, B. N. Watson, C. Taylor, J. T. Chang, M. B. McNeil, R. H. Staals, P. C. Fineran, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 8516–8526.
48. D. Markulin, D. Mitić, M. Radovčić, I. Ivančić Baće, *Period. biol.* **3-4** (2020) 155-160.
49. O. Genest, S. Wickner, S. M. Doyle, *J. Biol. Chem.* **294**(6) (2018) 2109–2120.
50. Q. Huai, H. Wang, Y. Liu, H. Y. Kim, D. Toft, H. Ke, *Structure.* **13**(4) (2005) 579–590.
51. <https://www.rcsb.org/structure/2iop> (datum pristupa: 24. lipnja 2021)
52. A. Balasubramanian, M. Markovski, J. R. Hoskins, S. M. Doyle, S. Wickner, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**(25) (2019) 12285–12294.
53. M. Macuka, *Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δhns i $\Delta htpG$ bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 36.
54. M. Pravica, *Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 i zaštitu od infekcije fagom lambda u ovisnosti o temperaturi u bakteriji *Escherichia coli**, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 36.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Lea Barbarić

Datum rođenja: 23. lipnja 1995.

Mjesto rođenja: Rijeka, Hrvatska

Obrazovanje

2002–2010 Osnovna škola Belvedere, Rijeka

2010–2014 Srednja talijanska škola u Rijeci

2015–2019 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016-2017 Otvoreni dani Kemijskog odsjeka