Uloga nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj i pripremljenoj ugradnji razmaknica i vijabilnosti bakterije Escherichia coli

Petanjek, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:798087

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Valentina Petanjek

Uloga nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj i pripremljenoj ugradnji razmaknica i vijabilnosti bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2017. godina

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Ivančić Baće te je predan na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra kemije.

Zahvala

Mentorici...

Vama što ste mi bili neprekidan izvor motivacije te konstantan poticaj na razmišljenje. Hvala na strpljenju, razumijevanju, uloženom trudu i vremenu te toplini koju ste unosili u svaki razgovor.

Tati, mami, bratu...

Mojoj obitelji koja je uvijek, bez iznimke, tu za mene. Hvala na bezuvjetnoj ljubavi, pruženoj podršci, snazi, utjehi. Hvala na toplini doma i otvorenim mekim rukama zagrljaja kojima me svaki put iznova dočekate.

Matiji...

Tebi koji mi iz dana u dan pokazuješ što ljubav uistinu znači. Hvala na toplim riječima ohrabrenja, potpori u ostvarenju mojih snova, vjerovanju da mogu sve što si zamislim.

Ivani...

Mojoj prijateljici, mojoj stijeni u uzburkanom moru života. Hvala za svu ljubav i podršku, za sve trenutke koje smo podijelile i koji nas tek čekaju.

Inki...

Mojoj kolegici koja me uvijek podsjećala da mi to možemo. Hvala na spremnosti da pomogneš u bilo koje doba dana ili noći, na potpori te prijateljstvu koje će me pratiti i dalje kroz život.

Svima prijateljima i kolegama koje nisam spomenula a koji su mi pomogli da danas budem upravo ovdje gdje jesam.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek Diplomski rad

Uloga nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj i pripremljenoj ugradnji razmaknica i vijabilnosti bakterije *Escherichia coli*

Valentina Petanjek
Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Sustav CRISPR-Cas (od eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* i *CRISPR associated*) bakterijski je mehanizam obrane od stranih genetičkih elemenata. Sustav se sastoji od lokusa CRISPR u koji se ugrađuju razmaknice stranog podrijetla između ponavljajućih sljedova, te pridruženih proteina Cas. Sustav CRISPR-Cas predstavlja adaptivni imunološki odgovor koji se odvija u tri koraka. U prvom koraku zvanom adaptacija dolazi do ugradnje strane DNA u obliku razmaknice i sinteze dodatnog ponavljajućeg slijeda. Adaptacija se odvija, ovisno o proteinima Cas koji u njoj sudjeluju, na dva načina - kao naivna ili pripremljena. Proteini Cas1 i Cas2 su neophodni u oba načina.

U ovom radu istražen je utjecaj nukleazne aktivnosti enzima RecBCD (mutanti *recB* i *recD*) na naivnu i pripremljenu ugradnju, te na vijabilnost, odnosno stabilnost plazmida u bakteriji *Escherichia coli*. Potvrdili smo ključnu ulogu nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj adaptaciji. U pripremljenoj adaptaciji nukleazna aktivnost enzima RecBCD nije neophodna, ali efikasnost ugradnje razmaknice je znatno manja i ovisi o broju stanica što nije slučaj u stanicama divljeg tipa. Ekspresija gena *cas1* i *cas2* s plazmida nije utjecala na vijabilnost istih mutanata, ali je za 1000 puta smanjila udio stanica s plazmidom u dvostrukom mutantu *recD recJ*. Genetičkom analizom pokazali smo da gubitak plazmida ovisi o kompleksu Cas1-Cas2. Diskutirani su mogući razlozi ovog efekta.

(41 stranica, 14 slika, 4 tablice, 34 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, naivna ugradnja, pripremljena ugradnja, RecBCD, vijabilnost

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

Komisija: doc. dr. sc. Morana Dulić

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

dr. sc. Nenad Judaš, izv. prof.

Rad prihvaćen: 23. 2. 2017.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Chemistry department

Graduation Thesis

The role of nuclease activity of RecBCD enzyme in naïve and primed adaptation and viability in *Escherichia coli*

Valentina Petanjek
Faculty of Science, Kemijski odsjek
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

The CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR associated*) system is a bacterial defence mechanism against foreign genetic elements. The system is comprised of CRISPR locus in which the foreign genetic sequences are incorporated, and of Cas associated proteins. CRISPR-Cas is an adaptive immunity that takes place in three steps. In the first step termed adaptation, the foreign DNA is inserted into the locus in form of a spacer and additional repeat is synthesised. Adaptation can be naïve or primed, depending on participating Cas proteins. Cas1 and Cas2 proteins are essential in both forms of adaptations.

In this research we investigated the role of the nuclease activity of the RecBCD enzyme (*recB* and *recD* mutants) on naïve and primed adaptation, and also on viability, or plasmid stability in *Escherichia coli*. We confirmed a key role of the nuclease activity of the RecBCD enzyme in naïve adaptation. In primed adaptation, the nuclease activity of the RecBCD enzyme is not essential, but the efficiency of spacer integation is much lower and is dependent on the cell number which is not the case in wild type cells. Expression of the *cas1* and *cas2* genes from the plasmid did not affect the viability of the same mutants, but it caused a plasmid decrease of 1000 fold in double mutant *recD recJ*. Genetic analysis showed that the reason of this decrease is dependent on the Cas1-Cas2 complex. Possible reasons of this effect are discussed.

(41 pages, 14 figures, 4 tables, 34 references, original in Croatian)

This thesis is deposited in Central chemistry library.

Key words: CRISPR-Cas, naïve adaptation, primed adaptation, RecBCD, viability

Supervisor: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Asst. Prof. dr. sc. Morana Dulić

dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

dr. sc. Nenad Judaš, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 23. 2. 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Sustav CRISPR-Cas i imunitet kod prokariota 1

1.1.1. Adaptacija 3

1.1.1. a) Naivna ugradnja (adaptacija) 6

1.1.1. b) Pripremljena ugradnja (adaptacija) 6

1.1.2. Biogeneza i sazrijevanje crRNA 7

1.1.3. Interferencija 9

1.2. Enzim RecBCD 11

1.2.1. RecF put rekombinacije 13

1.3. Cilj istraživanja 15

2. MATERIJALI I METODE 16

2.1. Materijali 16

2.2.1. Bakterijski sojevi 16

2.1.2. Plazmidi 17

2.1.3. Hranidbeni mediji 18

2.1.4. Početnice 20

2.2. METODE 21

2.2.1. Transformacija bakterijskih stanica plazmidima 21

2.2.2. Priprema stanica za naivnu ugradnju 21

2.2.3. Priprema stanica za pripremljenu ugradnju 22

2.2.4. Liza bakterijskih stanica 23

2.2.5. PCR reakcija za umnažanje linerane DNA 23

2.2.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu 24

2.2.7. Određivanje vijabilnosti 24

3. REZULTATI 25

3.1. Naivna ugradnja u mutantu *recD* 25

3.1.1. Potvrda genotipa sojeva IIB1156 i IIB1157 27

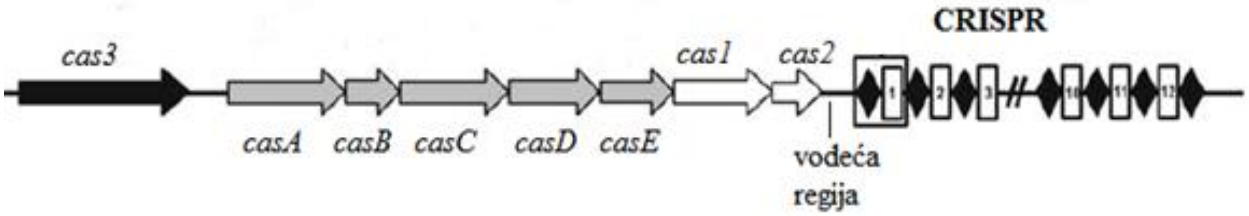
3.2. Pripremljena ugradnja u mutantima *recB* i *recD* 29
3.3. Utjecaj enzima RecBCD na vijabilnost stanica (stabilnost plazmida) 30
4. RASPRAVA 33
5. ZAKLJUČAK 37
6. LITERATURNA VRELA 38

1. UVOD

1.1. Sustav CRISPR-Cas i imunitet kod prokariota

Prokariotski su organizmi pod stalnim napadom plazmida i virusa (bakteriofaga) te su iz tog razloga razvili brojne mehanizme obrane. Jedan od tih mehanizama je nasljedni sustav CRISPR-Cas koji pruža adaptivni imunitet protiv stranih invazivnih elemenata [1]. Za razliku od urođenog imuniteta koji je genetički nasljedan sustav prepoznavanja generalnih značajki patogena, adaptivni imunitet omogućuje specifični odgovor te stvaranje imunološke memorije protiv stranih patogena koji prije nisu susretani [2].

Sustavi CRISPR-Cas pronađeni su kod 40 % bakterija te kod većine arheja čiji su genomi sekvencirani [3] a sadrže lokus CRISPR (od eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) te pridružene proteine Cas (od eng. *CRISPRS associated*) [1,3]. Lokus CRISPR sastoji se od identičnih ponavljajućih sljedova duljine 25-50 pb [4] razmaknutih različitim sljedovima slične duljine, tj. razmaknicama koje potiču od invadirajućih genetičkih elemenata [5]. Ponavljajući sljedovi su obično očuvani unutar istog lokusa te su u većini slučajeva djelomično palindromski [2]. Uzvodno od prvog ponavljajućeg slijeda nalazi se vodeća regija bogata AT baznim parovima koja sadrži promotor za prepisivanje lokusa CRISPR što je ključno za pronalaženje invadirajuće strane DNA [6]. Ispred vodeće regije nalazi se regija gena *cas* koja se sastoji od 8 gena: *cas1*, *cas2*, *cas3*, *casA*, *casB*, *casC*, *casD* i *casE* [7] (Slika 1).



Slika 1. Regija CRISPR bakterije *E. coli*: sastoji se od lokusa u kojem su ponavljajući sljedovi prikazani crnim rombovima a razmaknice bijelim pravokutnicima. Uzvodno od lokusa smještena je vodeća regija, a za njom slijede geni *cas1* i *cas2* označeni bijelom bojom, geni *casA*, *casB*, *casC*, *casD* i *casE* označeni sivom bojom te *cas3* označen crnom bojom [7].

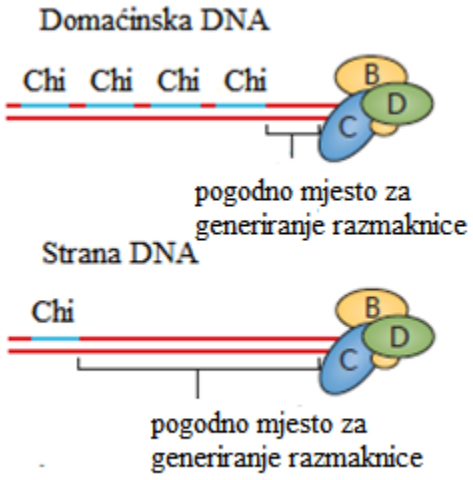
Adaptivni imunološki odgovor sustavom CRISPR-Cas odvija se u tri faze. U prvoj fazi zvanoj adaptacija (ili akvizicija) dolazi do ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR, odnosno dolazi do imunizacije stanice domaćina stvaranjem genetičke memorije koja će zaštiti stanicu od ponovne infekcije istim virusom ukoliko on sadrži taj slijed prepoznavanja, odnosno proto-razmaknicu [2,7]. U drugoj fazi dolazi do prepisivanja lokusa CRISPR u svrhu stvaranja kratkih crRNA od kojih svaka sadrži slijed jedne razmaknice. Prilikom interferencije, tj. treće faze, kratke crRNA zajedno u kompleksu s proteinima CasABCDE – kompleks Cascade (od eng. *CRISPR-associated complex for anti-viral defence*), prepoznaju stranu DNA koju potom degradira protein Cas3 [7].

Sustav CRISPR-Cas se na temelju raznolikosti gena *cas*, lokusa CRISPR te sličnostima sljedova proteina Cas grupira u dva razreda (I i II) koja sadrže 6 tipova i 19 podtipova [8]. Razred I prisutan je kod većine arheja te gotovo 50 % prokariota dok je razred II prisutan samo kod prokariota. Adaptacija je u većini sustava CRIPSR-Cas konzervirana te sadrži esencijalne proteine Cas1 i Cas2. U nekim tipovima nađeno je prisustvo i proteina Cas4. Za razliku od adaptacije, stvaranje crRNA te interferencija pokazuju znatno veću raznolikost između raznih tipova sustava CRISPR-Cas [8].

1.1.1. Adaptacija

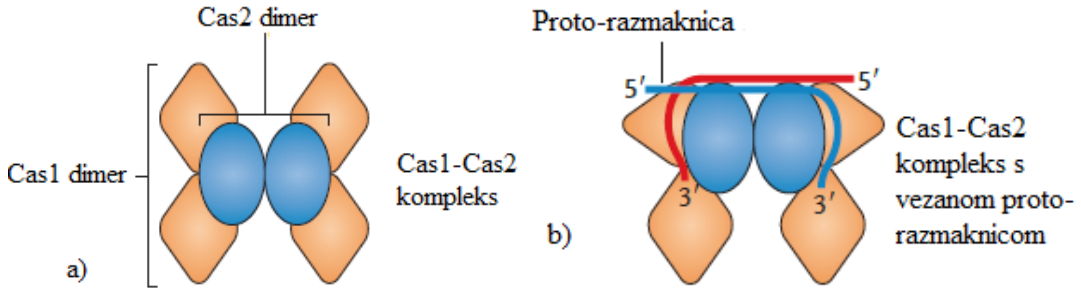
U početnoj fazi adaptacije, strana DNA treba biti prepoznata i procesirana u kratke DNA od kojih će nastati razmaknice za ugradnju u lokus CRISPR. Smatra se da su potencijalne sekvence za ugradnju međuprodukti koji nastaju prilikom popravka dvolančanog loma DNA tijekom replikacije virusne DNA. Kada dođe do dvolančanog loma, egzonukleaza RecBCD prepoznaje izložene dvolančane krajeve te počinje odmatati i cijepati DNA do oktamerne sekvence zvane Chi koja mijenja aktivnost enzima RecBCD. Istraživanja su pokazala da se najveći izvor razmaknica nalazi između mjesta Chi i zaustavljenih replikacijskih rašlji koje su glavni izvor dvostrukih lomova DNA [9].

Genom *E. coli* je visoko obogaćen mjestima Chi te se ona pojavljuju svakih ~4,6 kb, stoga kada dođe do dvolančanog loma, egzonukleaza RecBCD odmota tek manji dio DNA prije nego je degradacija zaustavljena mjestom Chi. Na taj način samo mali dio bakterijske DNA može poslužiti kao izvor proto-razmaknica. S druge strane, strana DNA nema mjesta Chi i time pruža više materijala za proto-razmaknice, kao što je slučaj kod genoma virusa [3] (Slika 2).



Slika 2. Genom stanice domaćina, *E. coli* i genom strane, invadirajuće DNA. Crvenom bojom su prikazana pogodna mjesta za generiranje razmaknica, a koja su smještena između mjesta Chi (označena plavom bojom) i nukleaze RecBCD (podjedinice B, C i D obojane žutom, plavom i zelenom bojom) [3].

Proteini Cas1 i Cas2 tvore heteroheksamerni kompleks sastavljen od dva Cas1 dimera pozicioniranih sa svake strane Cas2 dimera [3] (Slika 3). Uloga kompleksa Cas1-Cas2 je dvostruka budući da veže proto-razmaknicu, a potom je ugrađuje u lokus CRISPR [3]. Proto-razmaknica, na koju se veže kompleks, sastoji se od dvolančane DNA veličine 23 pb sa 3' jednolančanim krajevima sa svake strane. Dvolančana DNA se veže na površinu dimera Cas2 te je stabilizirana interakcijama između seta argininskih ostataka kompleksa Cas1-Cas2 i fosfatnih ostataka fosfodiesterskih veza proto-razmaknice. 3' jednolančani krajevi vežu se u aktivno mjesto jednog monomera u svakom dimeru Cas1 (preostala dva monomera ne sudjeluju u vezanju proto-razmaknice) [10] te se sastoje od minimalno 7 nukleotida [11].

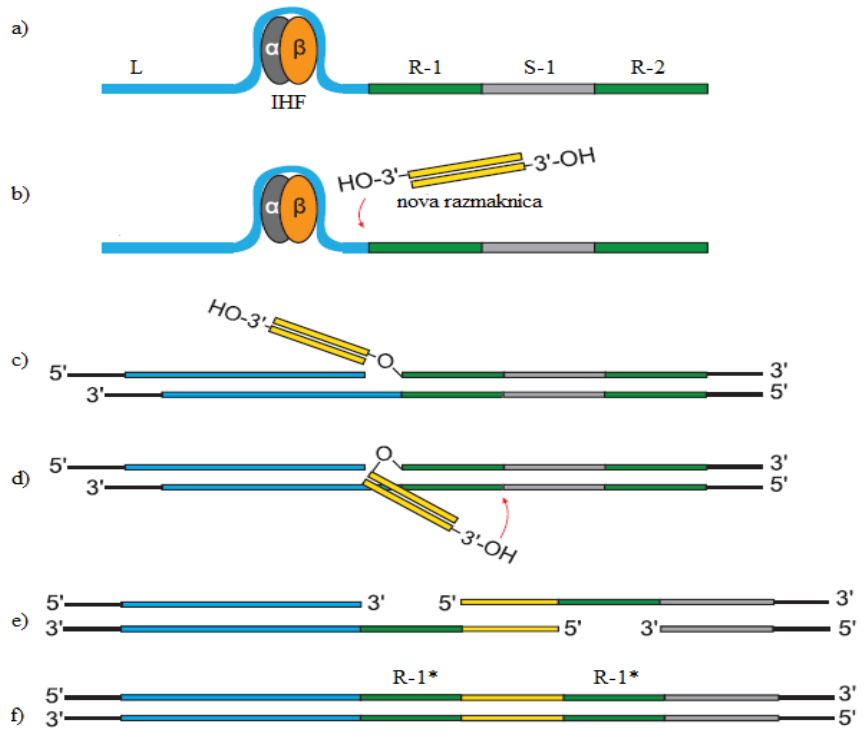


Slika 3. Struktura kompleksa Cas1-Cas2. a) Slika prikazuje kompleks Cas1-Cas2 bez vezane proto-razmaknice. Plavom bojom prikazan je dimer Cas2 a narančastom bojom prikazani su dimeri Cas1. b) Slika prikazuje kompleks Cas1-Cas2 kada je na njega vezana proto-razmaknica – dolazi do konformacijskih promjena dimera Cas1 [3].

Prilikom odabira proto-razmaknice, osim veličine i strukture (dvolančana DNA s jednolančanim 3' privjescima), bitan je motiv PAM (od eng. *protospacer adjacent motiv*) veličine 2-4 pb. Prepoznavanje motiva PAM temelji se na komplementarnosti sa sekvencom 5'-CTT-3' u aktivnom mjestu dimera Cas1. U aktivnom mjestu dimera Cas1 ujedno dolazi do cijepanja motiva PAM između nukleotida G1 i A2 pri čemu nastaje razmaknica veličine 33 pb čiji 3' kraj završava s OH skupinom gvanina, tj. nukleotidom motiva PAM [11]. Motiv PAM bitan je za prepoznavanje strane DNA te za zaštitu vlastite genomske DNA od sustava CRISPR-Cas.

Za ugradnju nove razmaknice u lokus CRISPR potreban je heterodimerni faktor IHF (od eng. *integration host factor*) iz bakterijske porodice histonskih proteina. IHF osigurava

specifičnu ugradnju razmaknice između vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda. On prepoznaje regije bogate A-T baznim parovima a koje sadrže slijed 5'-WATCAANNNNTTR-3', gdje W može biti A ili T, R može biti A ili G dok je N bilo koji nukleotid. Navedena sekvenca prepoznavanja leži unutar 60 pb vodeće regije uzvodno od lokusa CRISPR. Nakon vezanja faktora IHF dolazi do savijanja DNA što omogućuje integrazi Cas1-Cas2 da napravi urez na granici vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda. Potom slijedi nukleofilni napad 3'-OH skupine na 5' kraj vodeće regije što čini prvu integracijsku reakciju [12]. Hidroksilna skupina koja čini prvi nukleofilni napad vezana je na citozin koji potječe iz slijeda komplementarnog motivu PAM [3]. Drugi nukleofilni napad odvija se 28 pb nizvodno na granici ponavljajući slijed-razmaknica [12] (Slika 4). Nakon ugradnje razmaknice potrebne su aktivnosti DNA-polimeraze i ligaze za završetak integracije.



Slika 4. Model ugradnje razmaknice u lokus CRISPR. a) faktor IHF sastavljen od podjedinica α (sivo) i β (narančasto) veže se za vodeću regiju (L) označenu plavom bojom. b) Prvi nukleofilni napad nove razmaknice na granicu vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda. c) Međuprodukt između dva nukleofilna napada. d) Drugi nukleofilni napad razmaknice na granicu ponavljajući slijed-razmaknica. e) Razmaknica koja je ugrađena u lokus CRISPR. f) Popravljena DNA s dupliciranim ponavljajućim sljedovima označenim s R-1* [12].

1.1.1. a) Naivna ugradnja (adaptacija)

Cas1 i Cas2 su jedini proteini konzervirani kod svih tipova sustava CRISPR-Cas te su neophodni za adaptaciju dok nisu neophodni prilikom interferencije te sazrijevanja crRNA [2]. U uvjetima prekomjerne ekspresije gena *cas1* i *cas2*, ali u nedostatku ekspresije ostalih gena *cas*, dolazi do ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR. Ugradnja posredovana samo proteinima Cas1 i Cas2 dodaje novu razmaknicu u lokus CRISPR koji se sastoji od samo jednog ponavljajućeg slijeda. Naivni mehanizam adaptacije ne zahtijeva prisutstvo razmaknice u lokusu, odnosno, nije potrebna prethodna izloženost stanice domaćina tom istom ili srodnom fagu [2]. Dakle, za naivnu adaptaciju potrebna je i dovoljana jedna ponavljajuća regija u lokusu [6].

Mehanizam naivne adaptacije odvija se u 5 koraka: a) fragmentacija invazivne DNA putem aktivnosti enzima RecBCD b) aktivna domena jedne podjedinice Cas1 kompleksa Cas1-Cas2 pretražuje proto-razmaknice za pronalazak odgovarajućeg motiva PAM, c) nukleaza Cas1 provjerava veličinu potencijalne proto-razmaknice, d) prvi nukleofilni napad nove razmaknice na granicu vodeća regija-ponavljajuća regija te drugi nukleofilni napad na granicu ponavljajuća regija-razmaknica, e) djelovanjem DNA polimeraze i ligaze završava se proces integracije [8].

1.1.1. b) Pripremljena ugradnja (adaptacija)

Pripremljena adaptacija predstavlja mehanizam kod kojeg prethodno ugrađena razmaknica potiče brzu i efikasnu ugradnju novih razmaknica iz iste strane DNA. Pripremljena adaptacija, za razliku od naivne ugradnje gdje je dovoljna samo aktivnost proteina Cas1 i Cas2, zahtijeva, uz aktivnost proteina Cas1 i Cas2, aktivnost proteina Cas 3 te kompleksa Cascade [3]. Ukoliko već postojeće razmaknice pokazuju potpunu komplementarnost s invadirajućom DNA, protein Cas3 cijepa stranu dvolančanu DNA te ne dolazi do ugradnje dodatnih razmaknica [13]. Ukoliko se kompleks Cascade veže na ne-optimalni motiv PAM ili pak već postojeća razmaknica ugrađena u crRNA nije u potpunosti komplementarna proto-razmaknici strane DNA tada dolazi do pripremljene ugradnje [5]. Prilikom vezanja kompleksa Cascade na stranu DNA

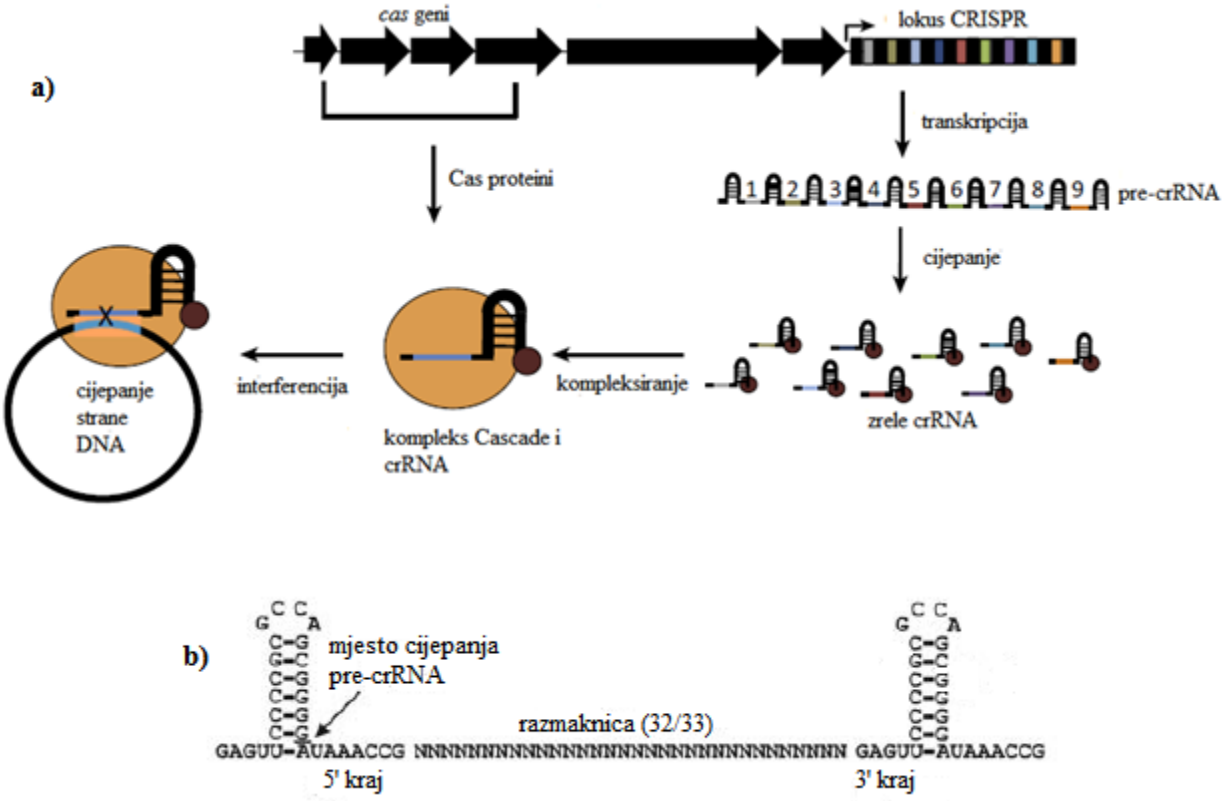
dolazi do formiranja R-omče koja blokira replikaciju strane DNA. Ukoliko vezanje nije u potpunosti komplementarno helikaza RecG odmata RNA-DNA hibrid te dolazi do disocijacije R-omče i uklanjanja vezanih proteina uključujući proteine Cascade, PriA i SSB. Uklanjanje R-omče pomoću proteina RecG je ključan korak za odvijanje pripremljene adaptacije [5]. Na taj se način formiraju izložene dvolančane i jednolančane regije DNA za stvaranje proto-razmaknica pomoću proteina Cas1 koji cijepa jednolančane regije DNA [5] te pomoću proteina Cas3 [14]. Protein Cas3 odmata dvolančanu DNA te cijepa nastale jednolančane lance DNA jednog po jednog za razliku od enzima RecBCD koji prilikom naivne ugradnje simultano cijepa oba jednolančana lanca [25]. Helikaznom i nukleaznom aktivnošću proteina Cas3 nastaju jednolančani produkti koji se ponovo sparuju vjerojatno posredstvom staničnih proteina [14]. Na taj način nastaju fragmenti veličine 30-100 nukleotida s motivom PAM (CTT) na 3' kraju koje dalje procesira i ugrađuje u lokus CRISPR kompleks Cas1-Cas2.

Efikasnost pripremljene adaptacije je povećana kada postoji mutacija u već ugrađenoj razmaknici ili motivu PAM što sugerira kako se ovakav mehanizam adaptacije razvio kao odgovor na brze mutacije invadirajućih faga u pokušaju bijega od mehanizma CRISPR [15]. Pripremljena adaptacija tolerira do 13 mutacija u ciljnoj stranoj DNA. Na adaptaciju utječe kombinacija broja mutacija u stranoj DNA, njihov položaj te vrsta [14]. Nadalje, prilikom adaptacije dolazi do ugradnje višestrukih razmaknica iz iste strane DNA što također smanjuje vjerojatnost bijega faga te također jača imunitet stanice domaćina [2].

1.1.2. Biogeneza i sazrijevanje crRNA

Sazrijevanje crRNA je kritičan korak u mehanizmu obrane protiv strane DNA. Prepisivanjem lokusa CRISPR dolazi do formiranja dugog primarnog transkripta zvanog pre-crRNA. Cijepanjem primarnog transkripta nastaju sekvence dugačke 61 nukleotid tzv. zrele crRNA. Zrela crRNA sadrži 8 nukleotida koji potječu od ponavljajuće regije na 5’ kraju, cijelu razmaknicu u sredini te ukosnicu sastavljenu od 7 baznih parova na 3’ kraju, a koju formiraju palindromski sljedovi sljedeće ponavljajuće regije [16,17]. Duge pre-crRNA cijepa endonukleaza CasE, neovisna o metalu, na specifičnom mjestu udaljenom 8 pb uzvodno od

granice ponavljajuća regija-razmaknica. Ukosnica nastaje kako bi specifično mjesto cijepanja bilo izloženo napadu proteina CasE te za stabilizaciju interakcija crRNA i kompleksa Cascade [16]. Za aktivnost proteina CasE bitan je konzervirani aminokiselinski ostatak His^{20} [17]. Protein CasE zajedno s proteinima CasA, CasB, CasC, CasD tvori kompleks Cascade ali je samo on neophodan za cijepanje nezrele molekule pre-crRNA [17]. Jednom kada je zrela, crRNA formira kompleks sa Cascadom te služi kao vodilja za prepoznavanje komplementarne proto-razmaknice u stranoj DNA te potom dolazi do cijepanja uz pomoć proteina Cas3 (Slika 5).



Slika 5. a) Prepisivanje lokusa CRISPR i gena *cas*. Prepisivanjem lokusa CRISPR nastaje nezrela molekula pre-crRNA koja na 3' krajevima ima ukosnicu formiranu od palindromskih sljedova ponavljajuće regije. Cijepanjem pre-crRNA nastaju zrele molekule crRNA koje tvore kompleks sa Cascadom u svrhu prepoznavanja i cijepanja strane DNA pomoću proteina Cas3. b) Nukleotidni slijed pre-crRNA te mjesto cijepanja [17,18].

Prepisivanje lokusa CRISPR je pod kontrolom promotora koji se nalazi unutar vodeće regije smještene uzvodno od lokusa. Promotor odgovoran za prepisivanje proteina Cascade smješten je uzvodno od gena koji kodira protein CasA. Oba promotora utišana su DNA

vezujućim proteinom H-NS (od eng. *heat stable nucleoid structuring*) koji se veže za regije bogate AT baznim parovima [19] (Slika 6). Promotor za prepisivanje gena koji kodiraju proteine Cas je u potpunosti reprimiran proteinom H-NS dok je promotor u vodećoj regiji reprimiran djelomično te nastaju bazalne količine crRNA koje omogućuju tek limitirajuću obranu protiv stranih elemenata [20]. Inaktivacija proteina H-NS pomoću DNA-vezujućeg proteina LeuO omogućuje inicijaciju prepisivanja [21]. Protein LeuO se veže na regiju koja sadrži promotor te na taj način sprječava polimerizaciju proteina H-NS duž te regije [20].

Takav mehanizam utišavanja je potreban za stvaranje auto-imuniteta jer bi prekomjernom ekspresijom gena *cas* moglo doći do ugradnje DNA stanice domaćina. Također, prekomjerna ekspresija mogla bi dovesti do preopterećenja te posljedično i oštećenja stanice [19].



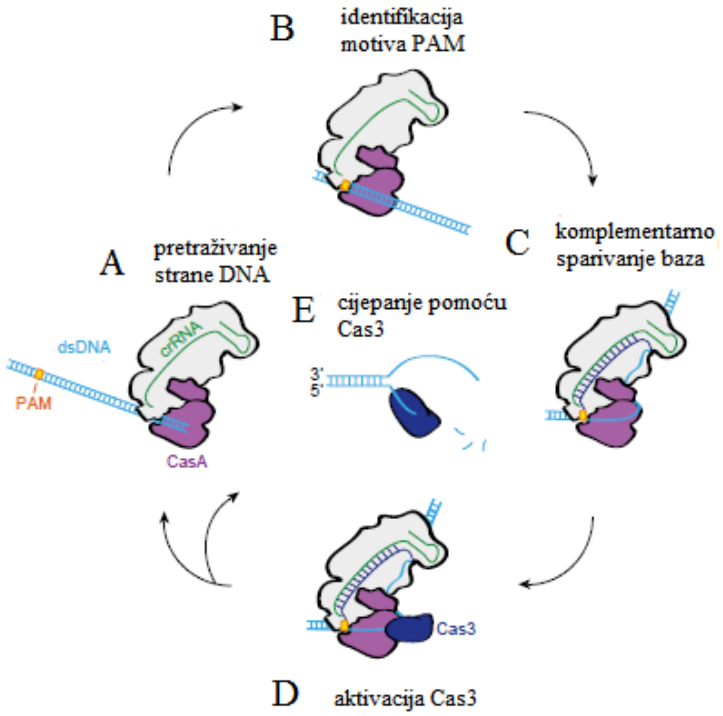
Slika 6. Mjesta vezanja proteina H-NS prilikom represije prepisivanja. Vezna mjesta proteina H-NS označena su crvenim točkama te su smještena uzvodno od lokusa CRISPR u vodećoj regiji te uzvodno od regije gena koji kodiraju proteine kompleksa Cascade [20].

Dakle, mehanizam CRISPR-Cas je u divljem tipu bakterije *E. coli* neaktivan jer je negativno reguliran proteinom H-NS koji sprječava prepisivanje gena *cas* te lokusa CRISPR [21].

1.1.3. Interferencija

Nakon što protein CasE kompleksa Cascade pocijepa pre-crRNA, nastala zrela crRNA ostaje vezana na Cascadu te služi kao vodilja u prepoznavanju strane DNA. Prepoznavanje strane DNA uključuje prepoznavanje sekvence veličine 7-8 pb u neposrednoj blizini motiva PAM te prisutstvo samog motiva PAM u stranoj DNA (ali ne i lokusu CRISPR) što omogućuje razlikovanje vlastite bakterijske od strane DNA [8,22]. Dvolančana DNA ulazi u kompleks

Cascade te potom slijedi pretraživanje strane DNA za motivom PAM pomoću podjedinice CasA koja je odgovorna za prepoznavanje pomoću petlje L1 pozicionirane na N-terminusu [23]. Prepoznavanjem motiva dolazi do konformacijskih promjena kompleksa Cascade koje omogućuju komplementarno sparivanje jednog lanca invadirajuće DNA (drugi lanac ostaje istisnut) te razmaknice dugačke 32 bp ugrađene u crRNA čime se stvara R-omča [22]. Nakon prepoznavanja, vezanja i stvaranja R-omče dolazi do aktivacije nukleaze/helikaze Cas3 koja odmata i cijepa stranu dvostruku DNA (Slika 7).

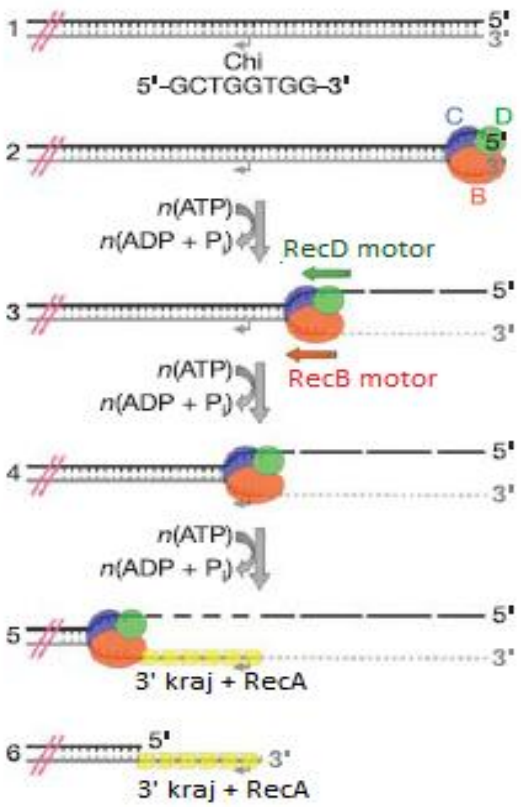


Slika 7. Mehanizam inteferencije. A) Kompleks Cascada klizi stranom dvostrukom DNA u potrazi za motivom PAM. B) Podjedinica CasA pomoću L1 petlje prepoznaje motiv PAM. C) Nakon prepoznavanja dolazi do konformacijskih promjena kompleksa Cascade što omogućuje odvijanje DNA te komplementarno sparivanje razmaknice iz crRNA te odgovarajućeg slijeda strane DNA. D) Aktivacija nukleaze/helikaze Cas3. E) Nakon prvog ureza te razmatanja dvolančane DNA, Cas3 se translocira na jednolančanu DNA te nastavlja degradaciju [22].

1.2. Enzim RecBCD

Enzim RecBCD je kompleks veličine 330 kDa, sastavljen od tri polipeptida: RecB, RecC i RecD [24]. Podjedinica RecB ima 3'-5' helikaznu i endonukleaznu aktivnost, podjedinica RecC prepoznaje mjesto Chi dok podjedinica RecD ima 5'-3' helikaznu aktivnost [25]. Enzim RecBCD se veže za tupe krajeve nastale dvolančanim lomom DNA te odmata lance do oktamerne sekvence, odnosno mjesta Chi (od. eng. *crossover hotspot instigator*) koje prepoznaje podjedinica RecC. Mjesto Chi ima slijed 5'-GCTGGTGG-3' te se on prepoznaje kao jednolančana DNA prilikom odmatanja dvolančane DNA [25].

Enzim RecBCD kombinacijom helikaznih aktivnosti podjedinica RecB i RecD odmata stranu DNA do mjesta Chi [25,26]. Oba lanca cijepana su nukleaznom aktivnošću podjedinice RecB. Kada je mjesto Chi prepoznato enzim pauzira te dolazi do utišavanja i promjene polarnosti nukleazne aktivnosti. Posljednje cijepanje na 3' kraju zbiva se ili na početku mjesta Chi ili nekoliko baza unutar njega te nakon posljednjeg cijepanja 3' stršeći kraj biva zaštićen od daljnjeg cijepanja [25] (Slika 8). Na taj se način formira 3' kraj na koji se potom veže protein RecA koji inicira homologno sparivanje te razmjenu lanaca u putu RecA homologne rekombinacije [25,26]. Protein RecA sudjeluje u potrazi za homolognom DNA, invadiranju u dvolančanu DNA te formiranju D-omče potrebne za homolognu rekombinaciju [24]. Nakon prepoznavanja mjesta Chi jednolančana DNA s 5' krajem je cijepana učestalije [25]. Također, genetičke analize pokazuju kako helikazna aktivnost podjedinice RecD nakon prepoznavanjan mjesta Chi nije potrebna te se smatra kako dolazi do njene deaktivacije premještanjem na neki drugi dio proteina RecBCD [25].



Slika 8. Prikaz mehanizma djelovanja enzima RecBCD. Podjedinica RecB označena je narančastom bojom, podjedinica RecC plavom a podjedinica RecD zelenom bojom. Mjesto Chi označeno je savinutom strelicom. U koraku 1 dolazi do dvostrukog loma uzrokovanog oštećenjem DNA ili kolapsom replikacijskih rašlji. U koraku 2 enzim RecBCD se veže na tupe izložene krajeve dvolančane DNA te započinje odmatanje. Korak 3 prikazuje ATP ovisno odmatanje dvolančane DNA te cijepanje obaju odmotanih lanaca. Donji lanac, odnosno lanac koji se odmata u 3'-5' smjeru cijepan je učestalije nego gornji lanac. U koraku 4 dolazi do prepoznavanja mjesta Chi na donjem lancu, enzim RecBCD staje te se zaustavlja cijepanje donjeg lanca. U koraku 5 vidljivo je da prepoznavanjem mjesta Chi cijepanje gornjeg lanca postaje učestalije. Na donji lanac, tj. na formirani 3' kraj veže se protein RecA koji sudjeluje u homolognoj rekombinaciji. U koraku 6 dolazi do disocijacije enzima RecBCD nakon čega može početi homologna rekombinacija [**25**].

Aktivnost enzima RecBCD u stanici je utišana ukoliko nije prisutna odgovarajuća DNA (izloženi tupi krajevi DNA nastali lomom) jer u suprotnom on bi mogao biti vrlo štetan za stanicu. Nukleazno aktivno mjesto koje se nalazi unutar podjedinice RecB utišano je α-heliksom koji je pak stabiliziran interakcijama s α-heliksom iz podjedinice RecC. Kada se enzim RecBCD veže na izložene krajeve DNA, prvih 6 parova baza odmata podjedinica RecB sama u ATP neovisnom putu. Svrha tog odmatanja jest vezanje jednostruke DNA u vezno mjesto podjedinice RecB. Daljnje odmatanje odvija se uz pomoć hidrolize ATP-a te jednolančana DNA s 5' krajem

prolazi kroz podjedinicu RecC do podjedinice RecD. Jednom kada je jednolančana DNA ušla u podjedinicu RecD, dolazi do konformacijskih promjena podjedinice RecD što posljedično izaziva konformacijske promjene u podjedinici RecC a potom i RecB. Na taj način dolazi do aktivacije nukleazne aktivnosti podjedinice RecB [27].

Enzim RecBCD popravlja lomove u molekuli DNA bakterijske stanice nastalih pod utjecajem raznih čimbenika. Enzim se također veže na tupe krajeve nastale dvolančanim lomom prilikom replikacije virusne DNA. Budući da virusna DNA nema mjesta Chi, enzim RecBCD u potpunosti degradira invadirajuću DNA pri čemu nastaje potencijalne proto-razmaknice [27]. Enzim RecBCD može degradirati i dvolančanu i jednolančanu DNA ali mu je afinitet znatno veći za dvolančanu DNA [28].

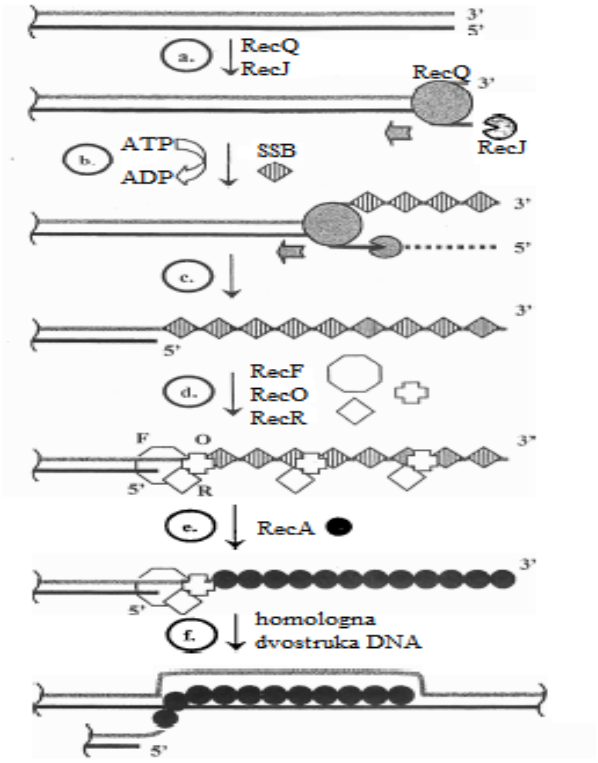
Enzim RecBCD s *nul* mutacijama u genima *recB* i *recC* za podjedinice RecB i RecC je deficijentan u rekombinaciji, popravku DNA, vijabilnosti stanica te degradaciji DNA. S druge strane, mutanti *recD* su deficijentni u degradaciji dok su rekombinacija, vijabilnost stanica te popravak DNA slični divljem tipu stanice s funkcionalnim enzimom RecBCD [29]. Mutantni enzim RecBC(D^-) zapravo inicira Chi neovisnu rekombinaciju *in vivo* budući da se mutacijom u genu *recD* gubi nukleaznu aktivnost te mogućnost interakcije s mjestom Chi dok je mogućnost poticanja vezanja proteina RecA na jednostruku DNA i dalje prisutna kao i helikazna aktivnost ali koja je ipak slabija u usporedbi s divljim tipom [29].

1.2.1. RecF put rekombinacije

U divljem tipu *E. coli* popravak loma u DNA te vezanje proteina RecA na jednolančanu DNA može se odvijati putem RecBCD ili putem RecF [30]. Imena puteva otkrivaju esencijalne enzime koji u njima sudjeluju. Put RecBCD služi za inicijaciju rekombinacije kod dvolančanih lomova dok put RecF obično služi za popravak jednolančanih lomova. Uz odgovarajuće supresorske mutacije te ukoliko bakterijska stanica ima nefunkcionalan put popravka RecBCD, put RecF može učinkovito popraviti i dvolančane lomove u DNA. Premda navedeni putevi popravka imaju različite početne vezne korake, ishodi su im jednaki. I u putu RecBCD i u putu RecF dolazi do vezanja proteina RecA na jednolančanu DNA. U putu RecBCD za to vezanje

odgovorna je kombinirana helikazna/nukleazna aktivnost enzima RecBCD koji ovisi o mjestu Chi dok su u putu RecF potrebne helikaza RecQ i nukleaza RecJ u kombinaciji s proteinskim kompleksom RecFOR [30].

Kako bi enzim RecBCD bio neaktivan mora postojati mutacija u genu za *recB* ili *recC* podjedinicu. Također, potrebna je kombinacija dviju supresorskih mutacija koje utišavaju nukleaznu aktivnost Egzonukleaze I te koje onemogućuje cijepanje ukosnica nastalih prilikom replikacije palindromskih sljedova [30]. Helikaza RecQ ima 3'-5' smjer te ona odmata dvolančanu DNA. Istovremeno nukleaza RecJ cijepa nastali jednolančani lanac s 5' krajem ostavljajući lanac s 3' krajem nepocijepan (Slika 9). Na nastali lanac s 3' krajem veže se protein RecA na mjesto proteina SSB pomoću proteinskog kompleksa RecFOR [30, 31].



Slika 9. Shema puta RecF. a) Helikaza RecQ se veže na kraj dvolančane DNA. b) Helikaza RecQ odmata dvolančanu DNA, a nukleaza RecJ degradira jednolančani 5' kraj. Jednolačani 3' kraj ostaje nepocijepan te se na njega vežu proteini SSB. c) Disocijacija proteina RecQ i RecJ. d) Vezanje proteina RecF, RecO i RecR na granicu dsDNA i ssDNA. e) Vezanje proteina RecA na jednolačani 3' kraj na koji su vezani proteini SSB. f) Homologno sparivanje i izmjena lanaca DNA [30].

1.3. Cilj istraživanja

Ugradnja razmaknice u lokus CRISPR bakterijske stanice predstavlja stjecanje imuniteta protiv infekcije fagom. Ugradnja razmaknice može se odvijati naivnim ili pripremljenim mehanizmom gdje je za naivu ugradnju potrebno prisutstvo samo proteina Cas1 i Cas2 dok su za pripremljenu osim proteina Cas1 i Cas2 potrebni i protein Cas3 te kompleks Cascade. Enzim RecBCD neophodan je u naivnoj ugradnji razmaknice dok u pripremljenoj ugradnji njegova uloga nije ključna.

Enzim RecBCD važan je u naivnoj ugradnji razmaknica jer pomaže u stvaranju malih fragmenata invazivne DNA, dok u pripremljenoj tu ulogu ima protein Cas3 [14]. U skladu s tim, mutanti *recB* (bez nukleazne aktivnosti) ne mogu ugraditi novu razmaknicu u naivnoj adaptaciji, ali mogu u pripremljenoj [5]. Međutim, za ugradnju razmaknica važna je i replikacija DNA, naročito u blizini terminusa replikacije [9]. Mutant *recB* ima smanjenu replikaciju u tom području, dok mutant *recD* ima prekomjernu replikaciju iako nijedan mutant nema nukleaznu aktivnost. Kako bismo razlučili što je važnije za ugradnju razmaknice, nukleazna aktivnost enzima RecBCD ili replikacija DNA, ciljevi istraživanja ovog rada su:

- Istražiti utjecaj nukleazne aktivnosti enzima RecBCD (mutanti *recB* i *recD*) na naivnu i pripremljenu ugradnju razmaknice.
- Istražiti na koji način ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida utječe na vijabilnost *recD* stanica budući da je *in vivo* i *in vitro* pokazana interakcija između ovih proteina [4].

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.2.1. Bakterijski sojevi

U eksperimentalnom radu korišteni su bakterijski sojevi *Escherichia coli* K12. Oznake pojedinih sojeva te genotip i podrijetlo prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz korištenih sojeva bakterije *Escherichia coli*.

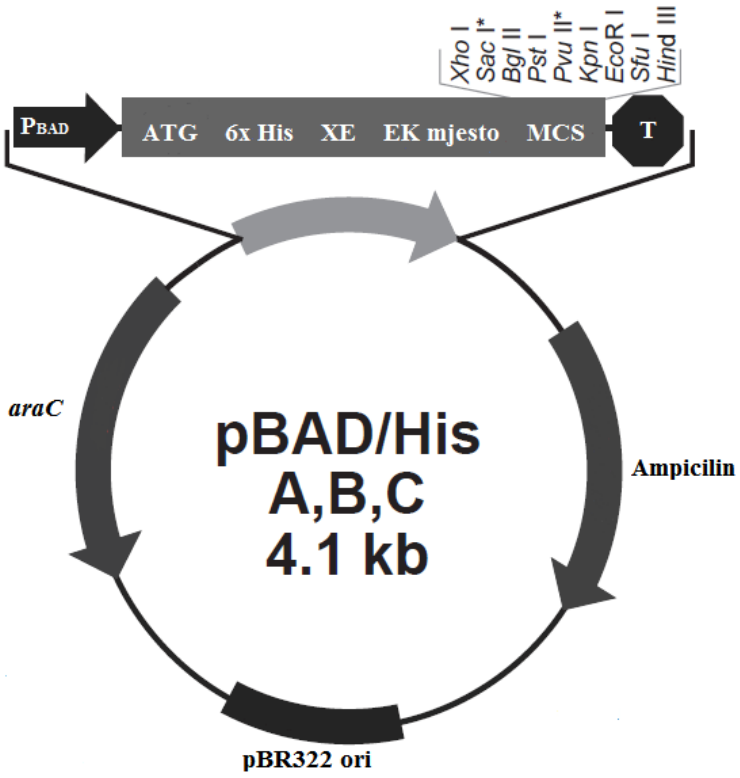
Oznaka soja	Genotip	Podrijetlo
MG1655	F^-, λ^-, *rph*$^-$	CGSC štok centar
Derivati MG1655:		
IIB983	*recJ2052::*Tn*10kan*	Ovaj rad
IIB980	*recB268*::Tn*10*	Ovaj rad
IIB1151	*recD*::Tn*10*	Ovaj rad
IIB1161	*recD*::Tn*10 recJ2052*::Tn*10kan*	Ovaj rad
BW25113	F− *rrnB* Δ*lacZ4748* (::*rrnB-3*) *hsdR514* Δ (*araBAD*) *567* Δ (*rhaBAD*) *568 rph-1 λ*−	Ivančić Baće i sur. 2015.
Derivati BW25113:		
IIB976	λT3 *lac*UV5-*cas3 cat*::*ara*Bp8*casA recB268*::Tn*10*	Ivančić Baće i sur. 2015.
IIB969	λT3 *lac*UV5-*cas3 cat*::*ara*Bp8*casA*	Ivančić Baće i sur. 2015.
IIB1161	*recD*::Tn*10 recJ2052*::Tn*10kan*	Ovaj rad
IIB1153	λT3 *lac*UV5-*cas3 cat*::*ara*Bp8*casA recD*::Tn*10*	Ovaj rad
IIB1156	Δ*cas3*::*apra* Δ*casC* Δ*cas1*::*kan*	Ovaj rad
IIB1157	Δ*cas3*::*apra* Δ*casC* Δ*cas1*::*kan recD*::Tn*10*	Ovaj rad

2.1.2. Plazmidi

U ovom radu korišten je plazmid pBad te njegovi derivati pEB628, pEB647, pEB646 i pSWJ7. Navedeni plazmidi te njihov opis i podrijetlo prikazani su u Tablici 2. Plazmid pBad nosi selektivni gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin te ima arabinozni promotor čija se transkripcija aktivira pri povišenoj koncentraciji L-arabinoze (Slika 10). Derivati plazmida pBad dobiveni su insercijom gena u sam plazmid pBad. Plazmid pEB628 dobiven je ukloniravanjem gena *cas1* i *cas2*, plazmid pEB646 ukloniravanjem gena *cas1*, plazmid pEB647 ukloniravanjem gena *cas1* s uvedenom mutacijom te plazmid pSWJ7 ukloniravanjem gena *cas1* s uvedenom mutacijom i gena *cas2*.

Tablica 2. Prikaz korištenih plazmida.

Plazmid	**Opis**	**Podrijetlo**
pBad-HisA	Negativna kontrola	Thermo Fisher Scientific
pEB628	Uklonirani geni *cas1* i *cas2* u plazmid pBad	E. Bolt, University of Nottingham
pEB647	Uklonirani promijenjen gen *cas1D218A* u plazmid pBad	E. Bolt, University of Nottingham
pEB646	Uklonirani gen *cas1* u plazmid pBad	E. Bolt, University of Nottingham
pSWJ7	Uklonirani geni *cas1R123G* i *cas2* u plazmid pBad	E. Bolt, University of Nottingham



Slika 10. Mapa plazmida pBad. Plasmid pBad ima gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Ima izvorište replikacije plazmida pBR322 za kojim slijedi gen za represorski protein AraC. Pod kontrolom arabinoznog promotora P_{BAD} nalaze se geni za histidinski privjesak, aminokiselinski slijed kojeg prepoznaje specifična proteaza te gen za protein koji želimo eksprimirati. U oktaedru, slovo T predstavlja terminator transkripcije. (preuzeto s http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pbadhis_map.pdf)

2.1.3. Hranidbeni mediji

Tekući LB medij:

Tripton (BD & Co.)	10,0 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g
NaCl (Kemika)	10,0 g

Navedene komponente otopljene su u destiliranoj vodi do volumena 1 L te je pH podešen dodatkom natrijeve lužine, c(NaOH) = 5 mol/dm^3. Priređena otopina potom je autoklavirana.

LB kruti medij:

Za pripravu krutih LB podloga potrebno je dodati 15 g agara u tekući LB medij (prethodno opisana priprava) prije autoklaviranja. U Petrijevu zdjelicu izlije se 25 mL tekućeg LB medija te se pusti da se medij stvrdne prije spremanja podloga u hladnjak.

Osim krutih LB podloga bez antibiotika korištene su i podloge s antibiotikom ampicilinom. U tekući LB medij prethodno autoklaviran te potom ohlađen u kupelji na temperaturu 50 – 60 ^{o}C dodaje se 1 μL ampicilina na 1 mL LB medija tako da finalna koncentracija iznosi 100 μg/mL. Podloge se potom izijevaju u Petrijeve zdjelice.

Ukoliko je kruti medij ohlađen na sobnu temperaturu potrebno ga je zagrijavati u mikrovalnoj pećnici 22 minute pri snazi P 30 te potom ohladiti u kupelji na temperaturu 50 – 60 ^{o}C.

M/15 pufer:

Na_2HPO_4 x $12H_2O$ (Kemika)	5,97 g
KH_2PO_4 (Kemika)	2,26 g

Navedene komponente otopljene su u destiliranoj vodi do konačnog volumena 500 mL te je priređena otopina potom autoklavirana. Tako priređena otopina ima pH 7.

TAE (50 x) pufer za agaroznu gel elektroforezu:

Tris, $C_{14}H_{11}NO_3$ (Roth)	60,5 g
Octena kiselina, w(CH_3COOH) = 99,5 % (T.T.T.)	14,3 mL
EDTA, c(EDTA) = 0, 5 mol/dm^3, pH 8	25,0 mL

Navedene komponenete otopljene su u destiliranoj vodi do konačnog volumena 250 mL i otopina je potom autoklavirana. Na taj je način priređena štok otopina pufera TAE (50x). Za eksperimentalni rad koristi se pufer TAE (1x) dobiven razrijeđivanjem štok otopine destiliranom vodom.

2.1.4. Početnice

U Tablici 3 prikazane su korištene početnice, njihov nukleotidni slijed i uloga.

Tablica 3. Korištene početnice u reakcijama umnažanja polimerazom (PCR).

Ime početnice	Slijed	Uloga
apra1	5’ CCA GAA TGT GTC AGA GAC AAC 3’	Umnaža unutar apramicinske kazete
upcas3	5’ CGA TAT TTA TGA GCA GCA TC 3’	Umnaža oko gena *cas3*
cas1del-F	5' CAGCTAAATCGATGGGATGTG 3'	Umnaža oko gena *cas1*
cas1del-R	5’ GATGGCTAATCTGCCTCGTAAG 3’	Umnaža oko gena *cas1*
CRISPR I-R	5’-GAGATGCAGGCCATCGGA-3’	Umnaža oko lokusa CRISPR
spacer 4	5’-GCGACCGCTCAGAAATTCCAGACCCGATCCAAA-3	Umnaža unutar lokusa CRISPR
ygcJ-3	5'-GGATGTTGACCTGGTGG-3’	Umnaža oko gena *casC*
ygcJ-4	5'-GCACACTCTCTGATAACG-3’	Umnaža oko gena *casC*

2.2. METODE

2.2.1. Transformacija bakterijskih stanica plazmidima

Bakterijski sojevi čuvaju se u 15 %-tnom glicerolu pri temperaturi -80 ^{o}C. Mali alikvot smrznutih stanica se ili razmaže na kruti LB medij i inkubira preko noći u inkubatoru dok ne narastu pojedinačne kolonije ili direktno doda u epruvetu u koju je prethodno u sterilnim uvjetima otpipetirano 3 mL tekućeg LB medija. Dobivena smjesa stavlja se na rast u tresilicu pri temperaturi 37 ^{o}C preko noći. Idući dan se 40 μL prekonoćne kulture doda u 3 mL svježeg tekućeg LB medija i uzgaja u tresilici do logaritamske faze, OD_{600} = 0,6, što traje otprilike 90 minuta ili duže ovisno o genotipu bakterijskog soja.

Bakterije narasle do logaritamske faze vorteksiraju se te se potom razdijele u dvije Eppendorf epruvete volumena 1,5 mL. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 8400 rpm, 2 minute i 30 sekundi. Nakon centrifugiranja odlije se supernatant te se talog resuspendira sa 200 μL kalcijeva klorida, $c(CaCl_2)$ = 50 mmol/dm^3. Potom se centrifugiranje ponavlja te se nakon izlijevanja supernatanta talog resuspendira sa 50 μL $CaCl_2$. Kalcijev klorid se veže na bakterijsku ovojnicu te destabilizira negativno nabijenu membranu koja postaje polupropusna za plazmidu DNA. Bakterije se ostavljaju na ledu 15 – 20 minuta, potom se doda 1 μL plazmida te se bakterije ponovo vraćaju na led.

Nakon 20 minuta na ledu, bakterije se podvrgavaju temperaturnom šoku: 90 sekundi u kupelji na 42 ^{o}C te potom 90 sekundi na ledu čime se potiče unos DNA u stanicu. 30 μL bakterijskih stanica razmaže se sterilnim etalerom po ampicilinskoj podlozi te nakon što se upiju u podlogu, stavljaju se u inkubator na 37 ^{o}C preko noći.

2.2.2. Priprema stanica za naivnu ugradnju

S ampicilinske podloge odabere se jedna kolonija koja se sterilnom ezom prenese u 3 mL tekućeg LB medija koji sadrži 30 μL 20% L-arabinoze (finalna koncentracija 0,2 %) te se

ostavlja u tresilici preko noći na 37 ^{o}C (prva pasaža). Odabire se jedna kolonija jer se pretpostavlja kako su bakterije unutar iste kolonije genetički istovjetne. Potom se iz dobivene noćne kulture otpipetira 10 μL stanica u 3 mL LB medija s dodanom arabinozom i opet ostavlja u tresilici preko noći. Postupak se ponavlja još jedanput tako da se sveukupno dobiju tri pasaže. Budući da korišteni plazmidi imaju arabinozni promotor ispred mjesta za kloniranje, dodatkom L-arabinoze potiče se ekspresija kloniranog gena na plazmidu. Uzastopnim ponavljanjem opisanog postupka rasta bakterija inducira se kontinuirana prekomjerna ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida (pEB628). Kao kontrola se umjesto plazmida pEB628 koristi prazan plazmid pBad. Ampicilin se ne dodaje jer se očekuje da će se plazmid s vremenom izgubiti prilikom ugradnje razmaknica.

2.2.3. Priprema stanica za pripremljenu ugradnju

Iz noćne kulture otpipetira se 40 μL stanica u 3 mL LB medija u koji je dodano 3 μL ampicilina, 3 μL 1M IPTG i 30 μL 20% L-arabinoze te se stavi u tresilicu na rast do logaritamske faze OD_{600} = 0,5 otprilike 90 minuta. Naime, stanice za pripremljenu ugradnju imaju gen *cas3* pod laktoznim promotorom, a gene za kompleks Cascade pod arabinoznim promotorom i u lokusu CRISPR anti-lambda razmaknicu koja je komplementarna proto-razmaknici s mutacijom u mjestu PAM što će potaknuti ugradnju novih razmaknica.

U posebnu praznu sterilnu epruvetu otpipetira se 200 μL induciranih stanica te se doda 5 μL štoka faga λ*vir*. Potom slijedi pred-adsorpcija: smjesa bakterija i faga inkubira se 15 minuta bez aeracije u inkubatoru na 37 ^{o}C kako bi se fagi vezali na stanice i ubacili svoju DNA.

Smjesi bakterija i faga doda se 2 mL tekućeg LB medija, 20 μL 20 % L-arabinoze, i 2 μL 1M IPTG-a te se smjesa potom ostavi u tresilici preko noći na 37 ^{o}C.

2.2.4. Liza bakterijskih stanica

Bakterijske stanice kod kojih je inducirana naivna/pripremljena ugradnja podvrgavaju se lizi kako bi se oslobodila genomska DNA. Lizirane stanice, odnosno lizom oslobođena DNA, koristi se kao kalup za reakciju PCR.

Potrebno je uzeti oko 25 μL noćne kulture (volumen koji se uzima ovisi o gustoći noćnih bakterija) te je pomiješati s 35 μL sterilne destilirane vode (hipotonična otopina koja pomaže lizu) u maloj epruvetici za PCR (ukupan volumen od 60 μL). U uređaju PCR stanice se liziraju 3 minute na 98 ^{o}C nakon čega se hlade na 4 ^{o}C.

2.2.5. PCR reakcija za umnažanje linearne DNA

PCR reakcijska smjesa:

Master 2x Mix*	12,5 μL
Početnica 1	1 μL
Početnica 2	1 μL
Sterilna destilirana H_2O	9,5 μL
Kalup	1 μL
Ukupni volumen	25 μL

*Master 2x Mix Emmerald (Takara) sadrži dNTP-ove, DNA polimerazu, boju za nanošenje na gel te odgovarajući pufer.

PCR program umnažanja:	Početna denaturacija	2 minute pri 98 ^{o}C
	Denaturacija*	30 sekundi pri 98 ^{o}C
*30 ciklusa	Sparivanje početnica*	30 sekundi pri 53 ^{o}C
	Produljivanje lanca DNA*	1 minuta pri 72 ^{o}C
	Završno produljivanje lanca	7 minuta pri 72 ^{o}C
	Hlađenje	pri 4 ^{o}C

2.2.6. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Za provjeru uspješnosti umnažanja DNA reakcijom PCR koristi se agarozna gel elektroforeza. Kada je razlika između fragmenata DNA mala (nova razmaknica i ponavljajući slijed povećavaju lokus CRISPR za 61 nukleotid), tada se koristi gušći gel kako bi se fragmenti mogli razdvojiti.

2% gel za agaroznu gel elektroforezu: 0,3 g agaroze otopi se u 15 mL pufera TAE (1x) i zagrijava u mikrovalnoj pećnici 1 minutu i 10 sekundi pri snazi P 50. Otopinu je potom potrebno ohladiti pod mlazom hladne vode te dodati 1,1 μL boje Syber Safe. Gel se izlije u kadicu za elektroforezu s dodanim češljićem te se pušta da odstoji 10 - 15 minuta prije nanošenja uzoraka. Elektroforeza na 2 %-tnom agaroznom gelu traje ~45 minuta pri 50 V.

2.2.7. Određivanje vijabilnosti

Iz noćne kulture transformiranih stanica otpipetira se 40 μL stanica u 3 mL LB medija u koji je dodano 3 μL ampicilina i 30 μL 20 % L-arabinoze te se smjesa stavlja rasti u tresilici oko 90 min do logaritamske faze OD_{600} = 0,5.

Nakon rasta do odgovarajuće logaritamske faze slijedi decimalno razrijeđenje tako da se dobije 10 000 puta (10^{-5}) razrijeđena smjesa bakterijskih stanica u fosftnom puferu M/15. Alikvoti od 10 μL razrijeđenih bakterijskih stanica kapaju se na „čistu“ LB i ampicilinsku podlogu. Kad se uzorci upiju u podlogu, stavljaju se u inkubator na 37 ^{o}C preko noći. Idući dan se izbroje narasle kolonije na LB i ampicilinskoj podlozi te se odredi ukupan broj kolonija (cfu, od eng. *colony forming unit*) po mL na obje podloge množenjem broja kolonija, volumena dodane smjese i decimalnog razrjeđenja.

3. REZULTATI

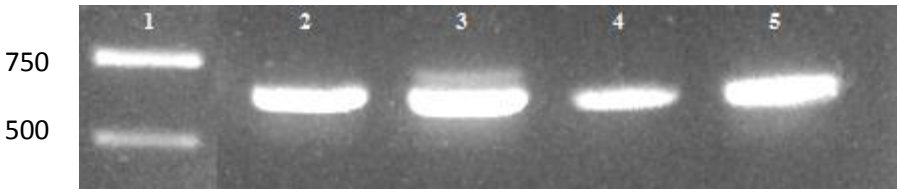
3.1. Naivna ugradnja u mutantu *recD*

Naivna ugradnja odvija se ukoliko je stanica prvi puta inficirana određenim fagom, odnosno ukoliko u lokus CRISPR nije prethodno ugrađena razmaknica koja bi odgovarala tom ili sličnom fagu [2]. Prilikom naivne ugradnje potrebna je i dovoljna samo prekomjerna ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida. Također, kako bi se ugradnja razmaknice u lokus CRISPR odvila naivnim putem, neophodna je nukleazna aktivnost enzima RecBCD [5]. U ovom dijelu eksperimentalnog rada željeli smo provjeriti hoće li isti rezultat dati *recB* i *recD* mutanti koji se međusobno razlikuju u učinku na replikaciju DNA, ali oba nemaju nukleaznu aktivnost. Iz literature je poznato da naivna ugradnja nije moguća u mutantu *recB* [5, 9] ali nije poznato što se događa u mutantu *recD*.

Za naivnu ugradnju korišteni su sojevi IIB1156 ($recD^+$) i IIB1157 (u genu *recD* ugrađen je transpozon koji prekida gen te daje tetraciklinsku rezistenciju). Oba soja imaju deletirane kromosomske gene *cas3*, *casC* i *cas1* (Tablica 1). Delecijom navedenih gena onemogućena je njihova ekspresija te posljedično i nastanka proteina koje ti geni kodiraju: protein Cas3 čija je nukleazna aktivnost bitna za cijepanje strane DNA, protein CasC koji je podjedinica kompleksa Cascade a koji sudjeluje u formiranju zrelih crRNA i prepoznavanju strane DNA te protein Cas1 koji zajedno s proteinom Cas2 čini kompleks potreban za ugradnju nove razmaknice. Delecijom navedenih gena osigurava se odvijanje naivne ugradnje samo putem prekomjerne ekspresije gena *cas1* i *cas2* s plazmida bez interferencije gena *cas* stanice domaćina.

Nakon što je inducirana prekomjerna ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida dodatkom L-arabinoze kroz 3 uzastopna uzgoja, u sojevima IIB1156 i IIB1157 je metodom PCR određeno je li došlo do ugradnje nove razmaknice. Korištene su početnice CRISPR I-R koja ima smjer 3'-5' te spacer 4 koja ima smjer 5'-3' a koje se vežu unutar i ispred lokusa CRISPR. Početnica CRISPR I-R sljubljuje se sa zadnjih 60 nt u genu *cas1* a početnica spacer 4 priljubljuje se na četvrti ponavljajući slijed unutar lokusa. Dobiveni PCR produkti nanosili su se na 2 %-tni agarozni gel te je potom provedena elektorforeza. Očekivana veličina vrpce koja odgovara

lokusu CRISPR je ~700 nt, dok je vrpca koja odgovara lokusu CRISPR s ugrađenom razmaknicom i dodatnim ponavljajućim slijedom veća za 61 nt (Slika 11).



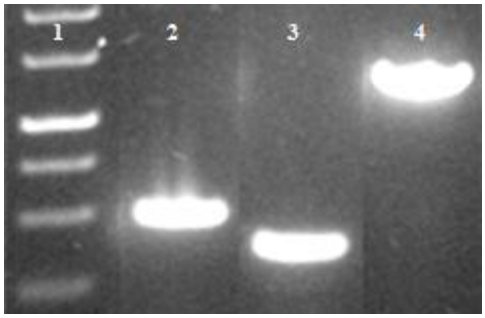
Slika 11. Agarozna gel elektroforeza za vizualizaciju produkata naivne ugradnje. Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) IIB1156 + pBad (3. pasaža), 3) IIB1156 + pEB628 (3. pasaža), 4) IIB1157 + pBad (2. pasaža), 5) IIB1157 + pEB628 (3. pasaža).

U jažicama broj 2 i 4 nalaze se sojevi IIB1156 (*recD*$^{+}$) i IIB1157 (*recD*) transformirani praznim plazmidom pBad, koji služe kao nagativna kontrola. Kod tih sojeva nije došlo do ugradnje razmaknica iz dva razloga: 1) geni *cas* na domaćinskom genomu su deletirani te njihova ekspresija prema tome nije moguća, 2) plazmid pBad je prazan, tj. ne nosi gene *cas1* i *cas2* potrebne za naivnu ugradnju kao što je slučaj kod plazmida pEB628 (Cas1-Cas2). U tim sojevima se vidi samo jedna vrpca početnog lokusa CRISPR. U jažici broj 3 nalazi se vrpca za soj IIB1156 s plazmidom pEB628 te je vidljiva dodatna gornja vrpca manjeg intenziteta koja predstavlja lokus CRISPR s ugrađenom novom razmaknicom i ponavljajućim slijedom. U jažici broj 4 vidljiva je samo jedna vrpca za soj IIB1157 (*recD*) što ukazuje kako nije došlo do ugradnje razmaknice unatoč prekomjernoj ekspresiji proteina Cas1 i Cas2 s plazmida. To upućuje da niti u mutantu *recD*, u kojem se gubi nukleazna aktivnost enzima RecBCD i pojačana je replikacija DNA, ne dolazi do generiranja proto-razmaknica za ugradnju u lokus CRISPR.

Iz navedenih rezultata potvrđeno je da je za naivnu ugradnju razmaknice u lokus CRISPR potrebna prekomjerna ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida te nukleazna aktivnost enzima RecBCD koji sudjeluje u procesu formiranja potencijalnih proto-razmaknica koje potom u lokus CRISPR ugrađuje kompleks Cas1-Cas2.

3.1.1. Potvrda genotipa sojeva IIB1156 i IIB1157

Genotip sojeva nužno je provjeriti kako bi se potvrdile delecije i mutacije uvedene u genom stanica domaćina. Genotip se može provjeriti ili preko fenotipa (npr. otpornost na antibiotik) ili, kad to nije moguće, određivanjem veličine fragmenata umnoženih metodom PCR. Kao kalup se, umjesto izolirane genomske DNA, koriste lizirane stanice istraživanih sojeva. Dobiveni PCR produkti razdvoje se agaroznom gel elektroforezom (Slika 12).



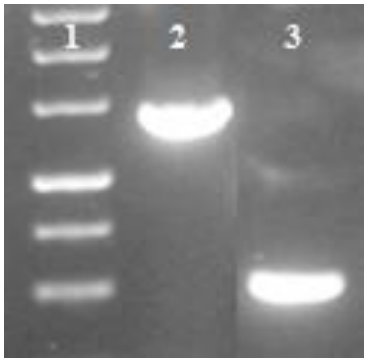
Slika 12. Genotip soja IIB1156. Jažice: 1) marker GeneRuler 1kb DNA Ladder, 2) provjera Δ*cas3*, 3) provjera Δ*casC* , 4) provjera Δ*cas1*.

U jažici broj 2 nalazi se vrpca soja IIB1156 koja je dobivena korištenjem početnica upcas3 i apra1 a koje umnažaju regiju ispred gena *cas3* i pola apramicinske kazete. Početnica upcas3 ima smjer 5'-3' a početnica apra1 ima smjer 3'-5'. U soju 1156 gen *cas3* je deletiran te je na njegovo mjesto ugrađena apramicinska kazeta koja daje otpornost na antibiotik apramicin. Korištenjem navedenih početnica očekiva se vrpca veličine ~500 pb.

U jažici broj 3 nalazi se vrpca liziranog soja IIB1156 dobivena koristem početnica ygcJ3 i ygcJ4 koje umažaju sekvence oko gena *casC*. Očekuje se vrpca veličine ~300 pb jer je na mjesto deletiranog gena *casC* ugrađena kanamicinska kazeta koja je potom izrezana te ostaje mali FRT ostatak (FRT – kratki ponavljajući slijed inače potreban za rekombinaciju pomoću Flp rekombinaze). Izrezivanjem kanamicinske kazete ugrađene na mjesto deletiranog gena casC gubi se kanamicinska otpornost .

Vrpca u jažici broj 4 dobivena je korištenjem početnice cas1-delF koja ima smjer 3'-5' i početnice cas1-delR koja ima smjer 5'-3' a koje umažaju sekvence oko gena *cas1*. U soju IIB1156 gen *cas1* (inače velik 915 pb) je deletiran te je na njegovo mjesto ugrađena kanamicinska kazeta što soju daje kanamicinsku otpornost. Očekuje se vrpca veličine 1,4 kb što odgovara veličini kanamicinske kazete s dodatnim sekvencama na koje se početnice priljubljuju.

Agaroznom gel elektroforezom potvrđen je genotip soja IIB1156, odnosno potvrđeno je da taj soj ima deletirane gene *cas3, casC* i *cas1*. Dobivene veličine vrpci u sva tri slučaja su u skladu s očekivanim veličinama, te je soj otporan na antibiotike apramicin i kanamicin.



Slika 13. Genotip soja IIB1157. Jažice: 1) marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) provjera Δ*cas1*, 3) provjera Δ*cas3*.

Kako bi se provjerile delecije gena *cas1* i *cas3* soja IIB1157 korištene su početnice cas1-delF i cas1-delR te upcas3 i apra1. Umnažanjem regija oko navedenih gena dobivena je vrpca veličine 1,4 kb što odgovara ugrađenoj kanamicinskoj kazeti na mjesto izrezanog gena *cas1* te vrpca veličine 500 pb što odgovara veličini ampicilinske kazete ugrađenoj na mjesto izrezanog gena *cas3* (Slika 13).

Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanim te potvrđuju genotip soja IB1157, odnosno potvrđuju da je on mutantan obzirom na gene *cas1* i *cas3*. Mutacija *recD* potvrđena je otpornošću na antibiotik tetraciklin.

3.2. Pripremljena ugradnja u mutantima *recB* i *recD*

Do pripremljene ugradnje razmaknice dolazi ukoliko je fag koji ponovo inficira stanicu mutirao. U tom slučaju dolazi do ugradnje nove razmaknice kao odgovor stanice na novonastalu mutaciju [3]. Premda je poznato da enzim RecBCD ne sudjeluje u mehanizmu pripremljene ugradnje (mutant *recB* [5]), željeli smo provjeriti je li pripremljena ugradnja razmaknica moguća u mutantu *recD.*

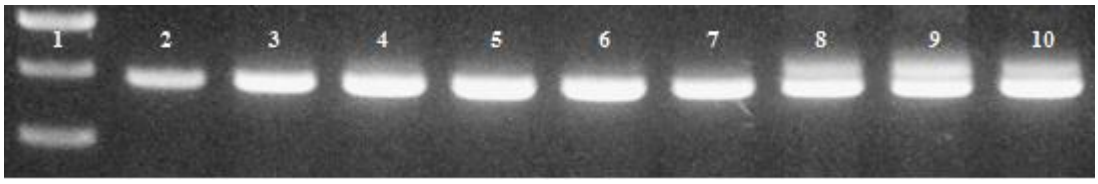
Za pripremljenu ugradnju korišteni su sojevi u kojima su geni *cas* inducibilni i dodatno nose mutacije u genima za podjedinice enzima RecBCD. Također, svi sojevi imaju ugrađenu anti-lambda razmaknicu koja služi za prepoznavanje strane DNA faga λ. Kako bi se osigurao mehanizam pripremljene ugradnje, DNA faga λ ima mutaciju u motivu PAM.

Soj IIB976 ima mutaciju *recB268*::Tn*10*. Tom mutacijom gubi se nukleazna i helikazna aktivnost enzima RecBCD uslijed insercije transpozona Tn*10* koja potom čini stanice otpornim na tetraciklin.

Soj IIB1153 ima mutaciju *recD*::Tn*10*, i kao mutant *recB*, otporan je na tetraciklin i nema nukleaznu aktivnost.

Soj IIB969 je divlji tip za gene *recB* i *recD*, što znači da nema dodatne mutacije.

Nakon inficiranja fagom λ i inkubacije preko noći, kao i kod naivne ugradnje, slijedi liza stanica, umažanje u uređaju za PCR te razdvajanje dobivenih produkata agaroznom gel elektroforezom (Slika 14).



Slika 14. Agarozna gel elektroforeza za vizualizaciju produkata pripremljene ugradnje. Jažice: 2, 3 i 4) soj IIB976 (*recB*), jažice 5, 6 i 7) soj IIB1153 (*recD*), jažice 8, 9 i 10) soj IIB969 (*recBCD*$^{+}$).

Stanice su inficirane fagom λ pri različitim fazama rasta: ranoj, srednjoj i kasnoj logaritmskoj, odnosno pri optičkim gustoćama OD_{600} = 0,4; OD_{600} = 0,6 i OD_{600} = 0,8. Na ovaj način željelo se dodatno istražiti utječe li broj stanica i faza rasta na efikasnost ugradnje razmaknica. Kod soja IIB976 u drugoj jažici nema vrpce koja bi odgovarala ugradnji razmaknice dok se u trećoj i četvrtoj jažici naziru vrpce koje odgovaraju ugrađenim razmaknicama. Njihov intenzitet se pojačava u kasnijim fazama rasta. Kod soja IIB1153 naziru se vrpce koje odgovaraju razmaknicama u svim trima jažicama, ali se njihov intenzitet ne mijenja. Kod soja IIB969 koji ima aktivan enzim RecBCD razmaknica se ugradila u sva tri slučaja te su vrpce koje odgovaraju ugradnjama intenzivne i istog intenziteta.

Iz priloženih rezultata vidljivo je da učinkovitost ugradnje razmaknice pripremljenim mehanizmom ne ovisi o gustoći bakterija u stanicama s aktivnim enzimom RecBCD i u mutantu *recD*. Međutim, povećanjem gustoće bakterija povećava se učinkovitost ugradnje razmaknica u mutantu *recB* iako je sama učinkovitost ugradnje u sojevima IIB976 i IIB1153 bitno manja. To ukazuje da iako enzim RecBCD nije potreban za mehanizam pripremljene ugradnje, čini se kako on indirektno ipak utječe na ugradnju razmaknica u lokus CRISPR.

3.3. Utjecaj enzima RecBCD na vijabilnost stanica (stabilnost plazmida)

U zadnjem dijelu istraživanja željeli smo istražiti na koji način ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida utječe na vijabilnost stanica *wt* i *recD.* Iz literature je poznato da proteini Cas1 i Cas2 stupaju u interakciju s podjedinicama RecB i RecD *in vivo* i *in vitro* [4] stoga bi u budućim istraživanjima bilo zanimljivo provjeriti i bakterijski soj *recB (Tablica 1).* Zanimalo nas je hoće li indukcija proteina Cas1-Cas2 (osim u ugradnji razmaknica) i na neki drugi način utjecati na stanice budući da ovi proteini moraju pocijepati plazmid na fragmente i ugraditi ga u kromosom. Prvo smo stanice *wt* i *recD* transformirali s plazmidima pBad i pEB628, koristeći iste plazmide kao i za naivnu ugradnju razmaknica. Transformirane stanice smo uzgojili do logaritamske faze i decimalna razrjeđenja nasadili na krute LB i ampicilinske podloge. Korišteni sojevi nisu sadržavali niti jednu drugu dodatnu mutaciju u genima *cas* (Tablica 1). Nismo primijetili da se broj stanica promijenio niti ovisno o genotipu, korištenom plazmidu ili selektivnoj podlozi. To

upućuje da ekspresija proteina Cas1-Cas2 ne utječe negativno na replikaciju plazmida ili na vijabilnost domaćina kada ima/nema nukleazne aktivnosti i popravka DNA enzimom RecBCD.

Kako je u stanicama *recD* zadržana rezidualna 5' nukleazna aktivnost [29], isti pokus smo napravili u *recJ* (IIB983) i *recD recJ* (IIB1161) stanicama u kojima nedostaje 5'-3' nukleazna aktivnost enzima uključenog u RecF put rekombinacije [30].

Zanimljivo, uočeno je veliko smanjenje broja stanica s plazmidom od oko 1000 puta u mutantu *recD recJ* kada je transformiran s plazmidom pEB628 i oko 100 puta kada je transformiran s pBad. To smanjenje nije uočeno na podlogama bez antibiotika ni u mutantu *recJ* što upućuje da nije došlo do smanjenja vijabilnosti stanica već smanjenja stabilnosti plazmida. Kako bi pokazali da ovaj učinak ovisi o kompleksu Cas1-Cas2, tj. da on utječe na stabilnost plazmida, mutant *recD recJ* transformirali smo s plazmidima pEB646 (nosi gen *cas1*), pEB647 (nosi mutirani gen *cas1*) i pSWJ7 (nosi gen *cas2* i mutirani gen *cas1*). Kada je soj *recD recJ* transformiran s navedenim plazmidima primjećen je veći broj transformiranih stanica na ampicilinskim podlogama nego što je slučaj kad je taj soj transformiran s plazmidom pEB628.

Navedeni rezultati upućuju kako stabilnost plazmida u soju *recD recJ* vjerojatno ovisi o kompleksu Cas1-Cas2.

Tablica 4. Utjecaj kompleksa Cas1-Cas2 na vijabilnost soja IIB1161 tranformiranog različitim plazmidima.

Soj	**LB podloga**	**Amp podloga**
MG1655 (divlji tip) + pBad	$1{,}43*10^8$	$1{,}2*10^8$
MG1655 (divlji tip) + pEB628	$1{,}3*10^8$	$1{,}5*10^8$
IIB983 (*recJ*) + pBad	$1{,}3*10^8$	$1{,}3*10^8$
IIB983 (*recJ*) + pEB628	$1{,}3*10^8$	$2*10^8$
IIB1151 (*recD*) + pBad	$1{,}6*10^8$	$1{,}5*10^8$
IIB1151 (*recD*) + pEB628	$1{,}5*10^8$	$9{,}3*10^7$
IIB1161 (*recD recJ*) + pBad	$1{,}6*10^8$	$4*10^7$
IIB1161 (*recD recJ*) + pEB628	$1{,}4*10^8$	$2{,}4*10^5$
IIB1611 (*recD recJ*) + pEB647	$1{,}3*10^8$	$4{,}3*10^7$
IIB1161 (*recD recJ*) + pEB646	$1{,}1*10^8$	$1{,}7*10^7$
IIB1161 (*recD recJ*) + pSWJ7	$1{,}2*10^8$	$2{,}1*10^7$

4. RASPRAVA

Ključan korak u mehanizmu CRISPR-Cas jest imunizacija, odnosno ugradnja razmaknice u lokus CRISPR. Ugradnja može biti naivna što znači da bakterijska stanica u lokusu nema ugrađenu razmaknicu tog ili sličnog faga [2] te pripremljena što znači da se bakterijska stanica već susrela s tim ili sličnim fagom te je kao posljedicu tog susreta došlo do ugradnje razmaknice, tj. DNA tog ili sličnog faga u lokus CRISPR [3]. Kod naivne ugradnje od proteina Cas potrebni su samo proteini Cas1 i Cas2 [2] dok su kod pripremljene ugradnje osim proteina Cas1 i Cas2, potrebni protein Cas3 te kompleks Cascade [3].

Prilikom inficiranja bakterijske stanice viralnom DNA dolazi do dvolančanih lomova tijekom replikacije. Izložene krajeve DNA prepoznaje enzim RecBCD te je njegov cilj popraviti nastali lom. Nakon što se veže na dvolančani kraj strane DNA, enzim započinje odmotavanje lanaca te ih istovremeno cijepa nukleaznom aktivošću. U bakterijskoj stanici prilikom popravka vlastite DNA, enzim RecBCD odmata DNA do mjesta Chi. Mjesto Chi predstavlja signal za enzim te on staje i mijenja polarnost nukleazne aktivnosti, odnosno 3'-5' nukleazna aktivnost se u potpunosti utiša dok 5'-3' nukleazna aktivnost postaje procesivnija. Kako u viralnoj DNA nema mjesta Chi koje bi zaustavilo enzim RecBCD, on cijepa cijelu DNA ostavljajući za sobom produkte razgradnje (ssDNA fragmenti) koji su potencijalne proto-razmaknice za ugradnju u lokus CRISPR pomoću kompleksa Cas1-Cas2 [25]. U naivnoj ugradnji nukleazna aktivnost enzima RecBCD je esencijalna dok u pripremljenoj ugradnji njegova aktivnost nije ključna [5]. U pripremljenoj ugradnji već postojeća razmaknica povećava efikasnost ugradnje te nakon inficiranja fagom, dolazi do prepisivanja lokusa te formiranja zrelih crRNA koje nose po jednu razmaknicu te tvore kompleks s Cascadom [15]. Nastali kompleks pretražuje stranu DNA za komplementom razmaknice integrirane u crRNA te ukoliko dođe do potpunog podudaranja protein Cas3 će pocijepati stranu DNA te će nastali produkti ubrzo propasti [13]. Ukoliko je fag mutirao motiv PAM ili slijed komplementaran razmaknici, doći će do cijepanja strane DNA nukleaznom aktivnošću proteina Cas3 te će nastali produkti (opet ssDNA fragmenti) biti potencijalne razmaknice za ugradnju u lokus CRISPR također pomoću kompleksa Cas1-Cas2 [14].

Naivna ugradnja

Prilikom istraživanja naivne ugradnje razmaknice u lokus CRISPR željelo se provjeriti jesu li za ugradnju dovoljni samo proteini Cas1 i Cas2 prekomjerno eksprimirani s plazmida te je li neophodana nukleazna aktivnosti enzima RecBCD, ali kad nedostaje podjedinica RecD. Ugradnja razmaknica samo pomoću proteina Cas1 i Cas2 osigurana je delecijom kromosomskih gena *cas1*, *cas3* i *casC*. Kako bi se provjerila uloga nukleazne aktivnosti enzima RecBCD u naivnoj ugradnji jedan soj je imao funkcionalan enzim, a drugi je imao mutaciju u genu za podjedinicu RecD čime se gubi nukleazna aktivnost enzima.

Transformacijom soja IIB1156 (*recBCD*$^{+}$) plazmidom koji nosi gene *cas1* i *cas2* te indukcijom prekomjerne ekspresije tih gena dolazi do naivne ugradnje razmaknice u lokus CRISPR čime je dokazano kako je za naivnu ugradnju potrebno prisutstvo samo proteina Cas1 i Cas2 dok ostali proteini sustava CRISPR-Cas nisu potrebni. Proteini Cas1 i Cas2 tvore kompleks koji veže proto-razmaknicu te radi ureze u lokusu kako bi se razmaknica mogla ugraditi. Iako mutant *recD* nema posve iste osobine kao mutant *recB*, jer ima pojačanu replikaciju oko terminusa replikacije što je važno za raspad replikacijskih rašlji i nastanak dsDNA loma potrebnog za vezanje enzima RecBCD, isto nema nukleaznu aktivnost. Prilikom naivne ugradnje esencijalna je nukleazna aktivnost enzima RecBCD što je vidljivo usporedbom soja IIB1156 u kojem je došlo do ugradnje i soja IIB1157 (*recD*) u kojem nije došlo do ugradnje premda je kod oba soja inducirana prekomjerna ekspresija proteina Cas1 i Cas2 (Slika 11). Dakle, do naivne ugradnje razmaknice ne dolazi ni u mutantu *recB* [5] niti u *recD* što je u skladu s potrebom za nukleaznom aktivnošću enzima RecBCD za cijepanje strane DNA čime se formiraju potencijalne proto-razmaknice za ugradnju u lokus CRISPR.

Pripremljena ugradnja

Za razliku od naivne ugradnje, kod pripremljene su ugradnje osim proteina Cas1 i Cas2 potrebni protein Cas3 i kompleks Cascade. Budući da je enzim RecBCD neophodan tijekom naivne ugradnje razmaknice [5], željeli smo provjeriti je li njegova nukleazna aktivnost neophodna i prilikom pripremljene ugradnje u mutantu *recD*.

Za pripremljenu ugradnju korišteni su sojevi koji u lokusu CRISPR već imaju ugrađenu razmaknicu protiv faga λ, kojim se sojevi inficiraju, i koji ima mutaciju u motivu PAM što će stimulirati ugradnju nove razmaknice. Kako brzina razgradnje DNA proteinom Cas3 utječe na efikasnost ugradnje razmaknica [13], kroz veći udio DNA supstrata, dodatno smo pratili i mogući utjecaj faze rasta (broja stanica). Dobiveni rezultati su pokazali da inficiranjem bakterijskih sojeva fagom λ pri različitim gustoćama dolazi do jako slabe ugradnje u sojevima koji su *recB* i *recD* mutanti, dok je ugradnja u soju divljeg tipa efikasna pri svim gustoćama. Zanimljivo, u mutantu *recB* ugradnja je ovisila o gustoći stanica, dok u mutantu *recD* i stanicama divljeg tipa nije (Slika 14).

Navedeni rezultati ukazuju da je replikacija DNA dijelom odgovorna za dobivene rezultate. Naime, vijabilnost je smanjena u mutantu *recB* jer u njemu uopće ne postoji rekombinacijska aktivnost enzima RecBCD, a replikacija je jako smanjena naročito u području terminusa [32]. S druge strane, u mutantu *recD* rekombinacija je očuvana, vijabilnost je ista kao u stanicama divljeg tipa, a replikacija je čak pojačana u području terminusa [29, 32, 33]. Zbog normalne replikacije u stanicama divljeg tipa i mutantu *recD*, efikasnost ugradnje nije ovisila o gustoći stanica, dok je u mutantu *recB* ovisila. Razlog je vjerojatno taj što se ista potrebna količina DNA postiže tek pri većem broju stanica, odnosno u kasnijim fazama rasta. Budući da je u sojevima *recB* i *recD* efikasnost pripremljene ugradnje razmaknica znatno manja, može se zaključiti kako je enzim RecBCD na indirektan način ipak bitan za pripremljenu ugradnju razmaknica. Budući pokusi su potrebni kako bi razjasnili točnu ulogu enzima RecBCD u pripremljenoj ugradnji.

Vijabilnost

U zadnjem dijelu ovog rada istraživali smo hoće li će indukcija proteina Cas1-Cas2 (osim u ugradnji razmaknica) utjecati na vijabilnost stanica domaćina. Istraživanja u stanicama divljeg tipa i pojedinačnim mutantima *recD* i *recJ* pokazala su da se nije smanjio broj stanica s plazmidom ili vijabilnost stanica (Tablica 4). Kako je iz literature poznato da se plazmidi lošije repliciraju samo u mutantu *recD* [32], a ugradnja razmaknica ovisi i o replikaciji i nukleaznoj aktivnosti enzima RecBCD, odlučili smo dodatno istražiti utjecaj proteina Cas1-Cas2 u

dvostrukom mutantu *recD recJ*. U ovom mutantu nema niti nukleazne aktivnosti enzima RecJ (5'-3' egzonukleaze) koji kompenzira nedostatak nukleazne aktivnosti mutanta *recD* [34].

U soju IIB1161 koji je *recD recJ* mutant, došlo je do velikog smanjenja broja stanica na ampicilinskoj podlozi od oko 1000 puta kada je transformiran plazmidom koji nosi gene *cas1* i *cas2*, a oko 100 puta kada je transformiran praznim plazmidom (Tablica 4). Broj stanica nije bio smanjen na podlogama bez antibiotika, što ukazuje da se nije smanjila vijabilost stanica već se gubio plazmid. Razlog nestabilnosti plazmida je kompleks Cas1-Cas2 što smo provjerili transformacijom soja IIB1161 s plazmidima pEB646 (*cas1*), pEB447 (mutirani gen *cas1*) te s pSWJ7 (*cas2*, mutirani *cas1*) u kojima je mutirana aktivnost proteina Cas1 ili nedostaje protein Cas2. Transformacijom s navedenim plazmidima nije se uočio isti efekt gubitka plazmida. Protein Cas1 ima nukleaznu aktivnost samo kada se nalazi u kompleksu s proteinom Cas2 a budući da je soj IIB1161 transformiran plazmidom koji nosi gene za te proteine, ekspresijom gena *cas1* i *cas2* došlo je do formiranja funkcionalnog kompleksa Cas1-Cas2 koji može rezati plazmide, odnosno izostanak kompleksa s mutantnim proteinima. Kada je soj transformiran s praznim plazmidom kao i s plazmidima koji nose mutantne gene za kompleks Cas1-Cas2 također dolazi do smanjenja stabilnosti plazmida unatoč tome što nije došlo do ekspresije funkcionalnog kompleksa s plazmida. Razlog bi mogao biti taj da je došlo do rezidualne ekspresije kromosomskih gena *cas1* i *cas2* koji u ovim sojevima nisu bili deletirani. Da bi se istražio ovaj učinak, bilo bi potrebno ponoviti ove pokuse u stanicama u kojima su geni *cas1* i/ili *cas2* deletirani i metodom qPCR pokazati da su geni *cas1* i *cas2* prepisani u mutantu *recD recJ*. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se objasnilo zašto su plazmidi nestabilni upravo u dvostrukom mutantu *recD recJ* i koju točno ulogu ima kompleks Cas1-Cas2 u tom procesu. Moguće je da u uvjetima smanjene nukleazne ali očuvane rekombinazne aktivnosti enzima RecBCD, ulogu nukleaze i cijepanja strane DNA preuzima kompleks Cas1-Cas2.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata zaključuje se da je nukleazna aktivnost enzima RecBCD neophodna za generiranje fragmenata DNA koji služe kao potencijalne proto-razmaknice za ugradnju u lokus prilikom naivne ugradnje. Tijekom pripremljene ugradnje, enzim RecBCD direktno ne sudjeluje u samom mehanizmu ugradnje ali je ipak njegova nukleazna aktivnost indirektno bitna za efiksnu ugradnju razmaknica u lokus CRISPR. Također, rezultati ukazuju na utjecaj kompleksa Cas1-Cas2 na stabilnost plazmida u dvostrukom mutantu *recD recJ* te je tu ulogu tek potrebno istražiti. Zaključak se izvodi iz sljedećih navoda:

- U soju *recBCD*$^{+}$ koji ima deletirane kromosomske gene *cas* prekomjernom ekspresijom proteina Cas1 i Cas2 s plazmida dolazi do naivne ugradnje razmaknice u lokus CRISPR dok kod soja *recD* kojem nedostaje funkcionalna nukleazna aktivnost enzima RecBCD do naivne ugradnje razmaknice ne dolazi.

- U sojevima *recB* i *recD* kojima nedostaje funkcionalna nukleazna aktivnost enzima RecBCD efikasnost pripremljene ugradnje razmaknica je jako niska u odnosu na divlji tip. Povećanje učinkovitosti ugradnje razmaknice postiže se povećanjem gustoće bakterija kod mutanta *recB* dok taj učinak kod mutanta *recD* i divljeg tipa nije uočen.

- U soju *recD recJ* koji ne posjeduje nikakvu nukleaznu aktivnost dolazi do gubitka plazmida ekspresijom proteina Cas1 i Cas2. Uzrok smanjenjoj stabilnosti plazmida je kompleks Cas1-Cas2 u kojem protein Cas1 ima funkcionalnu nukleaznu aktivnost zbog koje dolazi do rezanja plazmida. Smanjenje stabilnosti plazmida dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica na ampicilinskoj podlozi. Budući da taj efekt nije primjećen kod mutanata *recD* i *recJ*, neriješeno ostaje pitanje zašto baš kod dvostrukog mutanta *recD recJ* dolazi do navedenog smanjenja.

6. LITERATURNA VRELA

[1] L. A. Marraffini, *Nature* **526** (2015) 55-61.

[2] R. Heler, L. A. Marraffini, D. Bikard, *Molecular Microbiology* **93** (2014) 1-9.

[3] G. Amitai, R. Sorek, *Nature* **14** (2016) 67-76.

[4] M. Babu, N. Beloglazova, R. Flick, C. Graham, T. Skarina, B. Nocek, A. Gagarinova, O. Pogoutse, G. Brown, A. Binkowski, S. Phanse, A. Joachimiak, E. V. Koonin, A. Savchenko, A. Emili, J. Greenblatt, A. M. Edwards, A. F. Yakunin, *Molecular Microbiology* **79** (2011) 484-502.

[5] I. I. Baće, S. D. Cass, S. J. Wearne, E. L. Bolt, *Nucleic Acids Research* **43** (2015) 10821-10830.

[6] S. H. Sternberg, H. Richter, E. Charpentier, U. Qimron, *Molecular Cell* **61** (2016) 797-808.

[7] S. J. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. H. Slijkhuis, A. P. L. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost, *Science* **321** (2008) 960-964.

[8] P. Mohanraju, K. S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E. V. Kooin, J. van der Oost, *Science* **353** (2016) 556-568.

[9] A. Levy, M. G. Goren, I. Yosef, O. Auster, M. Manor, G. Amitai, R. Edgar, U. Qimron, R. Sorek, *Nature* **520** (2015) 505-510.

[10] J. K. Nunez, L. B. Harrington, P- J. Kranzusch, A. N. Engelman, J. A. Doudna, *Nature* **527** (2015) 535-538.

[11] J. Wang, J. Li, H. Zhao, G. Sheng, M. Wang, M. Yin, Y. Wang, *Cell* **163** (2015) 840-853.

[12] J. K. Nunez, L. Bai, L. B. Harrington, T. L. Hinder, J. A. Doudna, *Molecular Cell* **62** (2016) 824-833.

[13] E. Semenova, E. Savitskaya, O. Musharova, A. Strotskaya, D. Vorontsova, K. A. Datsenko, M. D. Logacheva, K. Severinov, *PNAS* **113** (2016) 7626-7631.

[14] T. Kunne, S. N. Kieper, J. W. Banneenberg, M. Depken, M. Suarez-Diez, S. J. J. Brouns, *Molecular Cell* **63** (2016) 852-864.

[15] K. A. Datsenko, K. Pougach, A. Tikhonov, B. L. Wanner, K. Severinov, E. Semenova, *Nature Communications* **3** (2012) 945.

[16] E. Charpentier, H. Richter, J. van der Oost, M. F. White, *FEMS Microbiology Reviews* **39** (2015) 428-441.

[17] S. J. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. H. Slijkhuis, A. P. L. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost, *Science* **321** (2008) 960-964.

[18] J. B. Denomy, A. R. Davidson, *Trends in Microbiology* **22** (2014) 218-225.

[19] U. Pul, R. Wurm, Z. Arslan, R. Geiβen, N. Hofmann, R. Wagner, *Molecular Microbiology* **75** (2010) 1495-1512.

[20] F. J. M. Mojica, C. D. Villasenor, *Molecular Microbiology* **77** (2010) 1341-1345.

[21] E. R. Westra, U. Pul, N. Heldrich, M. M. Jore, M. Lundgren, T. Stratmann, R. Wurm, A. Raine, M. Mescher, L. van Heereveld, M. Mastop, E. G. H. Wagner, K. Schnetz, J. van der Oost, R. Wagner, S. J. J. Brouns, *Molecular Microbiology* **77** (2010) 1380-1393.

[22] M. L. Hochstrasser, D. W. Taylor, P. Bhat, C. K. Guegler, S. H. Sternberg, E. Nogales, J. A. Doudna, *PNAS* **111** (2014) 6618-6623.

[23] D. G. Sashital, B. Wiedenheft, J. A. Doudna, *Molecular Cell* **46** (2012) 606-615.

[24] G. R. Smith, *Microbiology And Molecular Biology Review* **76** (2012) 217-228.

[**25**] M. R. Singleton, M. S. Dillingham, M. Gaudier, S. C. Kowalczykowski, D. B. Wigley, *Nature* **432** (2004) 187-193.

[26] S. C. Kowalczykowski, *Trends in Biochemical Science*, **25** (2000) 156-165.

[27] M. Wilkinson, Y. Chaban, D. B. Wigley, *ELife* **5** (2016) 18227-18239.

[28] D. A. Arnold, S. C. Kowalczykowski, Encyclopaedia of Life Science (2001), preuzeto s: http://www.els.net [doi: 10.1038/npg.els.0000586]

[29] I. I. Baće, P. Peharec, S. Moslavac, N. Škrobot, E. S. Šmic, K. B. Kostić, *Genetics* **163** (2002) 485-494.

[30] M. Spies, S. C. Kowalczykowski, *The Bacterial Chromosome*, 2005. 389-403.

[31] N. Handa, K. Morimatsu, S. T. Lovett, S. C. Kowalczykowski, *Genes & Development* **23** (2009) 1234-1245.

[32] J. Courcelle, B. M. Wendel, D. D. Livingstone, C. T. Courcelle, *HHS Public Access* **32** (2015) 86-95.

[33] J. U. Dimunde, A. Stockum, S. L. Midgley-smith, A. L. Upton, H. A. Foster, A. Khan, N. J. Saunders, R. Retkute, C. J. Rudolph, *mBio* **6** (2015) 01294-01315

[34] I. I. Baće, E. Salaj-Šmic, K. Brčić-Kostić, *Journal of Bacteriology* **187** (2005) 1350-1356.

Životopis

Rođena sam 22. 1. 1992. u Zaboku. Nakon završene osnovne škole Ljudevit Gaj u Krapini, upisala sam Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Srednjoj školi Krapina. Godine 2010. upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet, te sam titulu Sveučilišne prvostupnice kemije stekla 2014. Iste godine upisala sam Diplomski studij kemije, smjerovi Biokemija i Analitička kemija uz dodatno pohađanje predmeta s nastavničkog smjera kemije. Dvije godine sam sudjelovala u Otvorenom danu kemije te time i u popularizaciji znanosti.