

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Biochemijos magistro studijų programos II kurso studentas

Danas Klimavičius

Magistro darbas

Su III tipo CRISPR-Cas sistemomis susijusios spėjamos žiedo nukleazės tyrimas

Darbo vadovas:

dr. Gintautas Tamulaitis

Vilnius, 2022

Su III tipo CRISPR-Cas sistemomis susijusios spėjamos žiedo nukleazės tyrimas

Darbas atliktas VU Gyvybės mokslų centro
Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje
(vedėjas prof. dr. Virginijus Šikšnys)

Darbą atliko:

Danas Klimavičius

.....

Darbo vadovas:

Dr. Gintautas Tamulaitis

.....

TURINYS

TURINYS	3
SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	7
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Prokariotų apsaugos nuo svetimų nukleorūgščių sistemos	9
1.2 CRISPR-Cas sistemos.....	10
1.3 III tipo CRISPR-Cas sistemos	13
1.4 CARF baltymai	14
1.5 CRISPR-Cas sistemų reguliacija.....	16
1.5.1 CRISPR-Cas genų raiškos reguliacija.....	16
1.5.2 CRISPR-Cas efektorių aktyvumo reguliacija dalyvaujant Acr baltymams	17
1.6 III tipo CRISPR-Cas sistemų cOA signalinio kelio reguliacija: žiedo nukleazės	18
1.6.1 Crn1	19
1.6.2 Save inaktyvuojančios CRISPR-Cas pagalbinės ribonukleazės	20
1.6.3 AcrIII-1	21
1.6.4 Crn2.....	22
1.6.5 Crn3.....	23
1.6.6 Membraninė nukleazė MAD.....	24
1.6.7 Žiedo nukleazių biologinė funkcija.....	25
1.6.8 Spėjamos žiedo nukleazės.....	25
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	27
2.1 Tyrimo medžiagos	27
2.1.1 Antibiotikai, bakterijų kamienai ir terpės.....	27
2.1.2 Buferiniai tirpalai	27
2.1.3 Fermentinėse reakcijose naudoti komerciniai fermentiniai preparatai	28
2.1.4 Rinkiniai, skirti nukleorūgšties gryninimui.....	29
2.1.5 Kiti tirpalai	29
2.1.6 Nukleorūgščių preparatai	29
2.1.7 Baltymų molekulinės masės standartai	29
2.1.8 Reagentai Western-Blot analizei.....	30
2.1.9 Įvairūs kiti reagentai.....	30

2.2	Tyrimo metodai.....	30
2.2.1	Genų klonavimas į pET raiškos vektorių.....	30
2.2.2	Kompetentinių ląstelių paruošimas.....	31
2.2.3	Ląstelių transformacija.....	31
2.2.4	DNR elektroforezė agaroziniame gelyje.....	31
2.2.5	Kryptinga mutagenezė PGR būdu.....	31
2.2.6	Baltymų raiška.....	32
2.2.7	Baltymų gryninimas.....	32
2.2.8	NDS-PAGE elektroforezė.....	33
2.2.9	Baltymų erdvinių struktūrų modeliavimas ir analizė.....	33
2.2.10	SEC-MALS analizė.....	33
2.2.11	cOA hidrolizės aktyvumo tyrimai.....	34
2.2.12	<i>E. coli</i> ląstelių augimo ribojimo eksperimentas.....	34
3.	<i>REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....</i>	35
3.1	Darbo objektas.....	35
3.2	Baltymų raiškos vektorių konstravimas, baltymų raiška ir gryninimas.....	35
3.3	Csx20 oligomerinės būsenos nustatymas.....	37
3.4	Csx20 struktūriniai modeliai ir jų analizė.....	38
3.5	Csx20 aktyvumo tyrimas in vitro.....	40
3.6	Csx20 aktyvumo tyrimas in vivo.....	42
	<i>IŠVADOS.....</i>	45
	<i>SANTRAUKA.....</i>	46
	<i>SUMMARY.....</i>	47
	<i>PADĖKA.....</i>	48
	<i>LITERATŪROS ŠALTINIAI.....</i>	49

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

a.r. – aminorūgštis

A₂>p – linijinis di-adenilatas, turintis 2'3'-ciklinį fosfatą

A₂p – linijinis di-adenilatas, turinčio 5'-hidroksi ir 3'-fosfato grupes

Acr – angl. *anti-CRISPR*

AMP – adenzino monofosfatas

Ap – ampicilinas

BCIP – 5-Bromo-4-chloro-3-indolil fosfatas

bp – bazių pora

Can1 – angl. *CRISPR ancillary nuclease 1*

Card1 – angl. *cOA-activated RNase and DNase 1*

CARF – angl. *CRISPR-associated Rossmann fold*

Cas – angl. *CRISPR-associated*

Cb – karbenicilinas

Cm – chloramfenikolis

cOA – ciklinis oligoadenilatas

CRISPR – angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

Crn – angl. *CRISPR ring nuclease*

crRNR – *CRISPR RNR*

dg – dvigrandinis

DNazė – deoksiribonukleazė

EtBr – etidžio bromidas

Gent – gentamicinas

HTH – angl. *helix-turn-helix*

Kn – kanamicinas

LB – Luria-Bertani (mitybinė terpė)

Me²⁺ – divalenčio metalo jonai

NBT – angl. *nitro blue tetrazolium*

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato-poliakrilamidinio gelio elektroforezė

nt – nukleotidas

PAA – poliakrilamidas

PAM – angl. *proto-spacer adjacent motif*

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PNK – T4 polinukleotidkinazė

RNazė – ribonukleazė

Str – streptamicinas

Tris – tri-(hidroksimetil)-aminometanas

vg – viengrandinis

wt – laukinis tipas

IVADAS

III tipo CRISPR-Cas yra prokariotinės apsaugos nuo virusų ir kitų invazinių nukleorūgščių sistemos. Bakterijoms ir archėjoms apsaugą suteikia efektorinis kompleksas Csm arba Cmr, kurį sudaro 5 Csm arba 6 Cmr baltymai ir trumpa RNR (crRNR). Šiam kompleksui transkripcijos metu atpažinus susintetintą viruso RNR yra aktyvuojami trys komplekso aktyvumai. Komplekso Csm3/Cmr4 subvienetai degraduoja atpažintą transkriptą (Tamulaitis et al., 2014), Cas10 subvieneto HD domenas hidrolizuoja invazinę DNR transkripcijos vietoje (Kazlauskienė et al., 2016), o Cas10 Palm domenas iš ATP sintetina 3-6 AMP dydžio ciklinius oligoadenilatus (cOA) (Kazlauskienė et al., 2017). Priklausomai nuo konkrečios sistemos, cA₄ arba cA₆ veikia kaip signalinės molekulės, aktyvuojančios papildomus III tipo CRISPR-Cas sistemų efektorinius baltymus. Daugelis šių baltymų-efektorių turi CARF (angl. *CRISPR-associated Rossmann fold*) domeną, surišantį cOA, ir efektorinį domeną, kuris gali pasižymėti įvairiais fermentiniais aktyvumais: nespecifiniu ribonukleaziniu, deoksiribonukleaziniu, deaminaziniu ir kt. (Makarova, Timinskas, et al., 2020). CARF efektoriai padeda Csm/Cmr kompleksui įveikti infekciją, tačiau taip pat gali būti toksiški pačiai ląstelei ir sukelti altruistinę ląstelės žūtį. Siekiant to išvengti, reikalingi cOA kiekį ląstelėje reguliuojantys mechanizmai. Šią funkciją atlieka dar vieni III tipo CRISPR-Cas pagalbiniai fermentai, pavadinti žiedo nukleazėmis (Cnr, angl. *CRISPR-Cas ring nucleases*). Žiedo nukleazės baltymai dažnai turi CARF sanklodą ir degraduoja cA₄ (Athukoralage et al., 2018) ar cA₆ (Smalakyte et al., 2020). Cnr koduojantys genai yra randami šalia III tipo CRISPR-Cas sistemų, tačiau yra žinoma, kad žiedo nukleazės savo genomuose koduoja ir virusai, kurie pasitelkia jas neutralizuodami III tipo CRISPR-Cas apsaugą (Athukoralage, McMahon, et al., 2020).

Šiuo metu išskiriamos kelios Cnr šeimos, besiskiriančios sankloda, veikimo mechanizmu ir katalizuojamos reakcijos greičiu. Taip pat spėjama, kad kai kurie nežinomos funkcijos III tipo CRISPR-Cas kaimynystėje esantys genai galėtų koduoti naujas žiedo nukleazes (Makarova, Timinskas, et al., 2020). Viena iš tokių spėjamų nukleazių – necharakterizuoti Csx20 baltymai. Šiame darbe charakterizavome dviejų Csx20 šeimos baltymų aktyvumus *in vitro* ir *in vivo*. Su III tipo CRISPR-Cas asocijuotų baltymų mokslinių tyrimų aktualumą rodo tai, kad šiuo metu CARF efektorius bandoma pritaikyti intensyviai kuriant jautrias virusų nukleorūgščių detekcijos sistemas, tokias kaip pvz. skirtas detektuoti SARS-CoV-2 RNR, tokiu būdu prisidedant suvaldant COVID-19 pandemiją (Nemudraia et al., 2022; Steens et al., 2021).

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Ištirti Csx20 šeimos spėjamų žiedo nukleazių aktyvumą *in vitro* ir *in vivo*.

Uždaviniai:

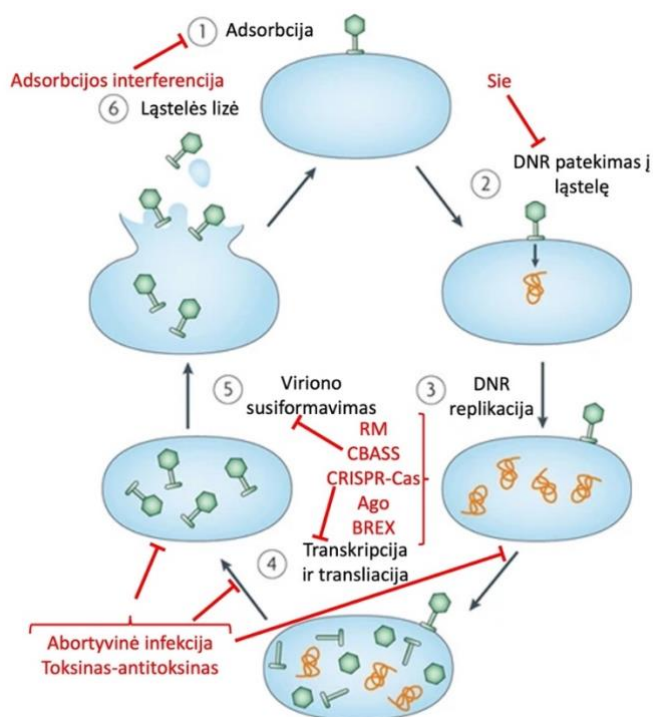
1. Nustatyti HpCsx20 ir Rm378Csx20 oligomerinę būseną.
2. Įvertinti HpCsx20 ir Rm378Csx20 gebėjimą hidrolizuoti cA₄ ir cA₆ *in vitro*.
3. Identifikuoti HpCsx20 aktyvųjį centrą.
4. Ištirti, ar HpCsx20 ir Rm378Csx20 geba panaikinti cOA paremtą III-A tipo CRISPR-Cas sistemos toksiškumą *in vivo*.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Prokariotų apsaugos nuo svetimų nukleorūgščių sistemos

Svetimos nukleorūgštys yra išgyvenimui grėsmę kelianti kliūtis, su kuria gamtoje nuolat susiduria bakterijos ir archėjos. Svetimos nukleorūgštys į ląstelės vidų gali patekti virusinės infekcijos metu, natūralios transformacijos būdu ir kitais keliais. Vieni iš pagrindinių bakterijų priešų, galintys sutrikdyti mikroorganizmo gyvenimo ciklą – virusai yra gausiausi organizmai biosferoje (Clokie et al., 2011). Skaičiuojama, kad jų yra apie dešimt kartų daugiau, nei pačių bakterijų (Brüssow & Hendrix, 2002). Manoma, kad kiekvienai bakterijų rūšiai egzistuoja bent viena ją infekuojančių bakteriofagų rūšis (Keen, 2015), be to virusai itin lengvai mutuoja (Weinbauer, 2004). Kad apsigintų nuo virusų, evoliucijos eigoje bakterijos įgijo įvairias bakterijų apsaugos sistemas (Samson et al., 2013), kurios sudaro reikšmingą genomo dalį ir paprastai telkiasi vienoje genomo vietoje, vadinamose „gynybinėse salose“ (angl. *defense islands*) (Makarova et al., 2011).

Bakteriofago infekcijos ciklą sudaro keli etapai: adsorbcija prie ląstelės, DNR patekimas į ląstelę, DNR replikacija, transkripcija ir translacija, subrendusio viriono susiformavimas ir ląstelės lizė (Labrie et al., 2010). Bakterijos turi gynybinių pajėgumų, nutaikytų į kiekvieną iš šių etapų (1.1 pav.)



1.1 pav. Prokariotų antivirinės sistemos virusinės infekcijos metu. Prokariotams būdinga didelė apsaugos sistemų įvairovė, įgalinanti apsisaugoti kiekviename virusinės infekcijos etape. Adaptuota pagal (Labrie ir kt., 2010).

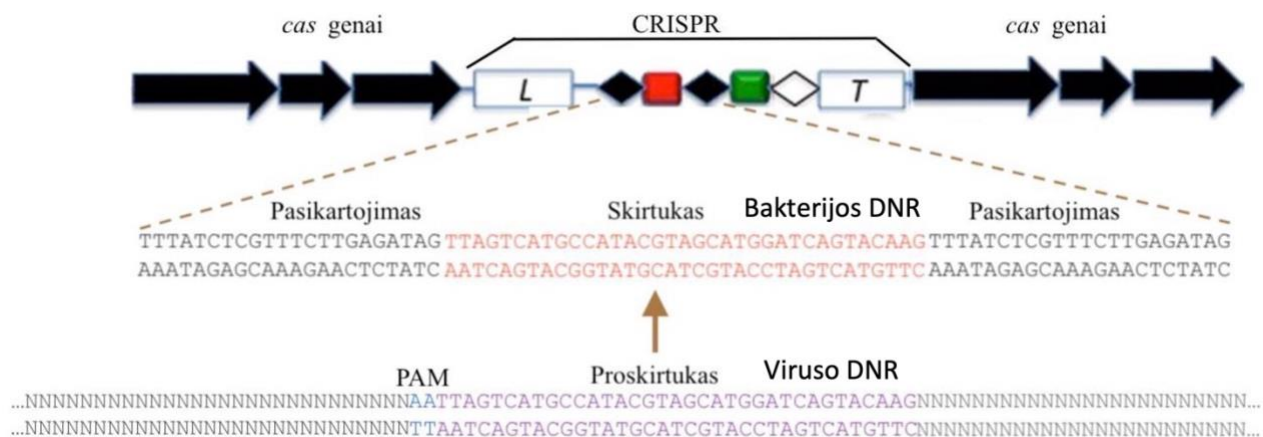
Virusinė ataka gali būti atremta dar adsorbcijos metu. Tai pasiekama įvairiais būdais: viruso atpažįstamų nuosavų receptorių blokavimu ar maskavimu, taip pat panaudojant konkurentinius receptorių slopiklius (Labrie et al., 2010). Jei šios strategijos viruso adsorbcijos nesustabdo, jo DNR patekimą į ląstelę gali sustabdyti Sie (angl. *Superinfection exclusion*) sistemos, kurias sudaro superinfekciją slopinantys baltymai (Mahony et al., 2008). Su DNR metabolizmu susijusius infekcijos etapus stabdo daugybė nukleorūgštis hidrolizuojančių sistemų, iš kurių geriausiai ištirtos yra restrikcijos-modifikacijos (Pingoud et al., 2014) bei CRISPR-Cas (Wright et

al., 2016). Jeigu virusas apeina visas minėtas sistemas, bakterijos gali pasitelkti toksino-antitoksino bei abortyvinės infekcijos sistemas. Abortyvinių sistemų yra įvairių, tačiau jos visos veikia „altruistinės ląstelės savižudybės“ principu, apsaugodamos kaimyninių bakterijų populiacijas nuo viruso išplitimo (Lopatina et al., 2020).

Istoriškai beveik visas dėmesys buvo sutelktas restrikcijos-modifikacijos, abortyvinių infekcijų, vėliau ir CRISPR-Cas tyrimams (Hampton et al., 2020; Ofir & Sorek, 2018). Vis dėlto, 2018 m. atlikti tyrimai pradėjo naują prokariotinių antivirusinių sistemų tyrimų erą. Buvo atrasta 10 naujų apsaugos sistemų (Doron et al., 2018), vėliau kiti tyrimai identifikavo dar dešimtis iki tol nežinomų sistemų (Cohen et al., 2019; Gao et al., 2020; Millman et al., 2022). Šiais metais Millman ir kolegės kompiuterinės analizės pagalba identifikavo >7000 genų klasterių, kurie, spėjama, koduoja naujas gynybines sistemas. Manoma, kad didelė dalis bakterijų gynybinio arsenalo vis dar išlieka neatrasta (Millman et al., 2022). Tolimesniuose skyriuose aptarsiu vieną iš išsamiausiai ištyrinėtų bakterijų apsaugos sistemų – CRISPR-Cas.

1.2 CRISPR-Cas sistemos

CRISPR-Cas yra prokariotų adaptyvaus imuniteto sistemos. Pastaruoju metu išgarsėjusios kaip naujos kartos genomo redagavimo įrankiai, CRISPR-Cas apsaugo nuo svetimų nukleorūgščių bakterijose ir archėjose. CRISPR-Cas genominiis regionas yra sudarytas iš CRISPR regiono ir *cas* genų (1.2 pav.).



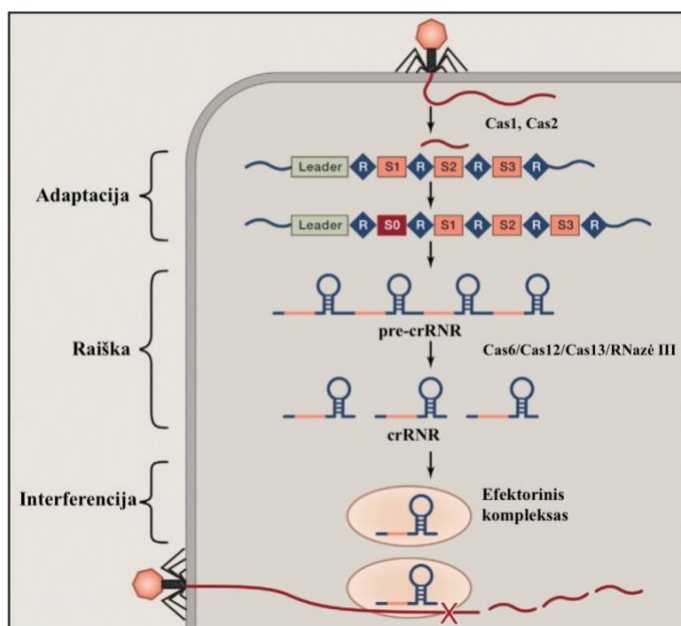
1.2 pav. CRISPR-Cas genominiio regiono sandara. CRISPR-Cas sudaro CRISPR regionas ir *cas* genai (juodos rodyklės), galintys būti išsidėstę prieš CRISPR regioną, už jo arba supantys jį iš abiejų pusių. CRISPR regioną sudaro unikalūs skirtukai (kvadratai) ir identiški bakterijai saviti pasikartojimai (rombai), apsupti lyderinės sekos (L) ir terminalinio pasikartojimo (T). Skirtukai yra kilę iš egzogeninės nukleorūgšties, kurioje skirtukų sekų atitikmenys yra vadinami proskirtukais. Kai

kuriuose sistemose taikinio atpažinimui yra svarbi ne tik proskirtuko, bet ir PAM (angl. *proto-spacer adjacent motif*) seka, kuri viruso genome yra šalia proskirtuko sekos (Wright et al., 2016).

CRISPR-Cas imuninį atsaką sudaro trys pagrindiniai etapai: adaptacija, raiška ir interferencija (1.3 pav.). Kai sistema susiduria su nauja svetima nukleorūgštimi, vyksta adaptacija. Cas1 ir Cas2 baltymai sudaro kompleksą, kuris prisijungia prie taikinio DNR, neretai atpažindamas PAM seką – trumpą savitą 1-5 bp ilgio fragmentą, reikalingą atskirti svetimą nukleorūgštį nuo savos, esančios CRISPR regione (Shah ir kt., 2013). Tuomet yra iškerpama DNR dalis, vadinama proskirtuko seka, kuri kaip skirtuko seka yra įstatoma į CRISPR regioną.

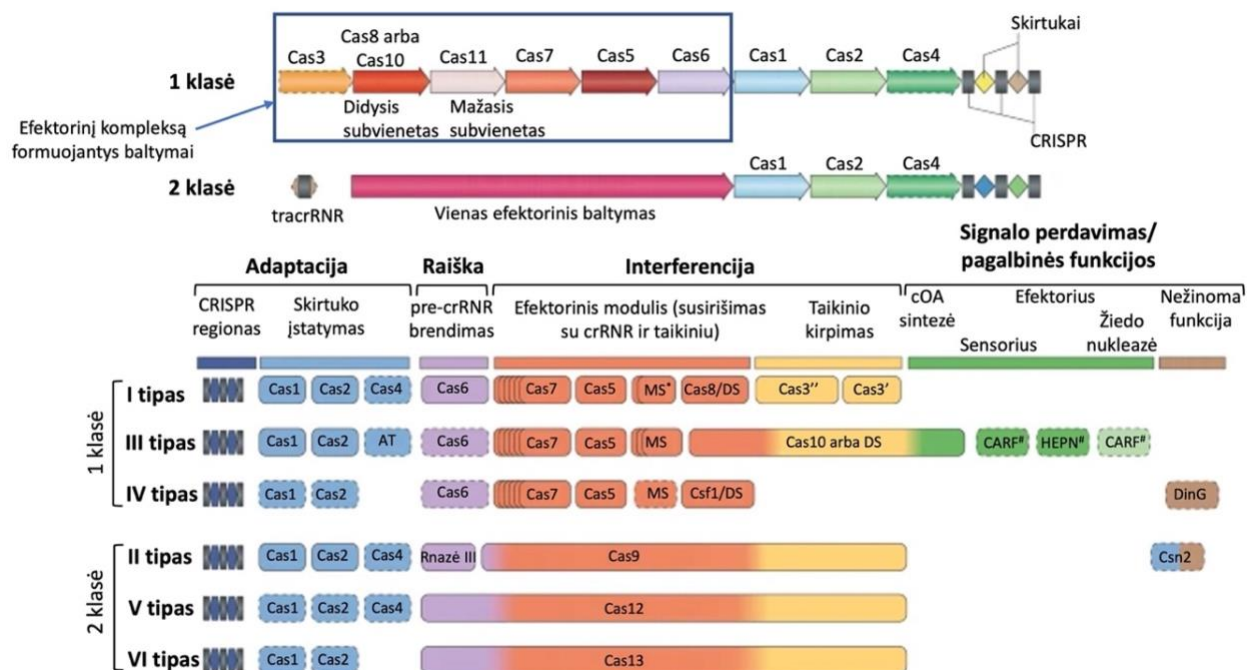
Raiškos metu CRISPR regionas yra nurašomas kaip vienas transkriptas, dar vadinamas pre-crRNR (trumpinys nuo angl. *pre-CRISPR RNA*). Jis yra subrandinamas iki trumpesnių RNR – crRNR (angl. *CRISPR RNA*), kurių šerdį sudaro tik vieno skirtuko seka. I, III ir IV tipo CRISPR-Cas sistemose (1.4 pav.) pre-crRNR brandina Cas6 ribonukleazės, kurios specifiskai hidrolizuoja pre-crRNR kiekvienoje pasikartojančioje sekoje. V ir VI tipo CRISPR-Cas pre-crRNR brandimą vykdo atitinkamai Cas12 ir Cas13 baltymai, II tipo sistemose – CRISPR-Cas nepriklausanti ribonukleazė (RNazė) III.

Svetimą nukleorūgštį interferencijos metu degraduoja kompleksas, sudarytas iš Cas baltymų ir subrendusios crRNR. Komplekse surišta crRNR atlieka gido vaidmenį, atpažindama proskirtuką, esantį viruso ar plazmidės genome. Efektorinis kompleksas atpažįsta taikinio seką pagal šios komplementarumą crRNR ir hidrolizuoja ją. Kai kuriose sistemose taikinio hidrolizei pasitelkiami papildomi Cas baltymai (Makarova, Wolf, et al., 2020).



1.3 pav. CRISPR-Cas sistemų veikimo mechanizmas. Adaptacijos stadijoje svetimos nukleorūgšties fragmentas (proskirtukas) yra įstatomas į CRISPR regioną (skirtukai pavaizduoti spalvotais stačiakampiais, pasikartojimai – rombais) kaip naujas skirtukas (S0). CRISPR regiono nuorašas (pre-crRNR) subrandinamas iki crRNR molekulių, kurių šerdį sudaro vienas skirtukas. Interferencijos metu Cas baltymai su crRNR suformuoja efektorinį kompleksą, kuris sukarto skirtukui komplementarią seką turinčias nukleorūgštis. Adaptuota pagal (Wright ir kt., 2016).

CRISPR-Cas sistemos gamtoje pasižymi itin didele įvairove. Pagal interferenciją vykdančio komplekso sandarą, CRISPR-Cas skirstomos į 2 klases, kurios, pagal koduojamą konservatyvų baltymą, smulkiau skirstomos į tipus: I tipo CRISPR-Cas turi Cas3, II – Cas9, III – Cas10, V – Cas12, VI – Cas13, o IV tipo efektoriui nėra identifiikuotas taikinio hidrolizę atliekantis baltymas (1.4 pav.). 1 klasei (I, III ir V tipai) priskiriamos CRISPR-Cas sistemos turi daugianarį interferenciją atliekantį kompleksą, sudarytą iš 4-7 skirtingų baltymų: Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 arba Cas10 bei Cas11 (1.4 pav.). Tuo tarpu 2 klasės CRISPR-Cas sistemos turi vieną, iš daugelio domenų sudarytą efektorinį baltymą, surišantį crRNR: Cas9 – II tipo sistemose, Cas12 – V tipo sistemose, Cas13 – VI tipo sistemose. Žinomiausias tokio efektoriaus pavyzdys – Cas9. Cas9 baltymas ir kiti 2 klasės sistemų efektoriai turi visus aktyvumus, reikalingus interferencijai.

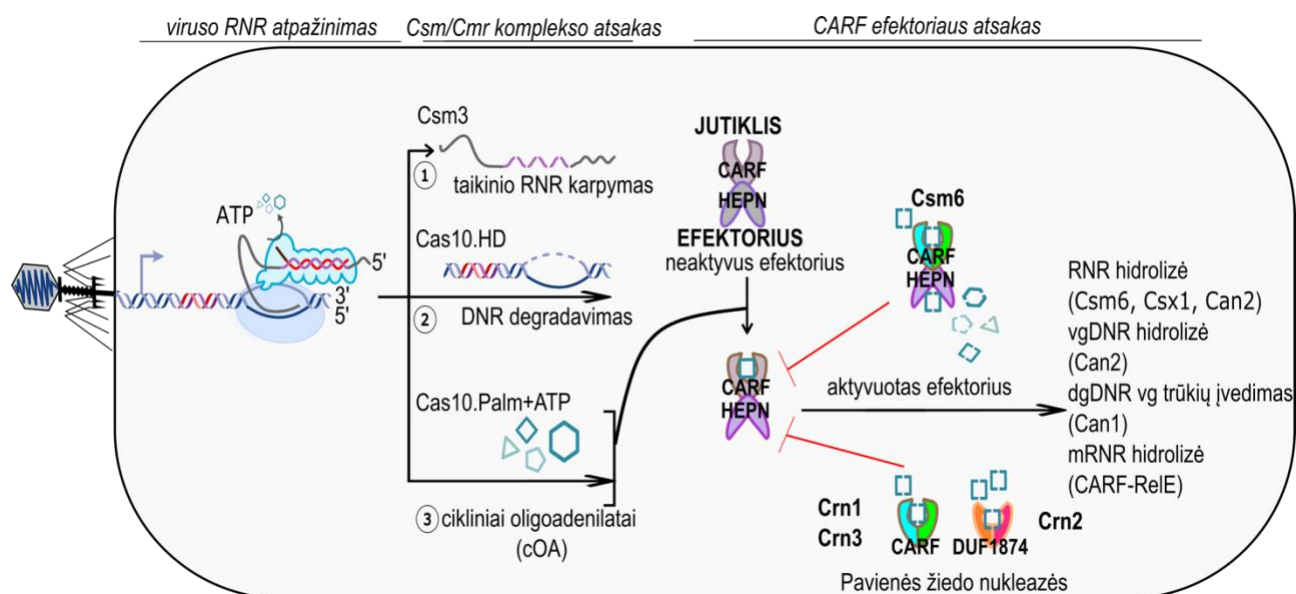


1.4 pav. CRISPR-Cas sistemų klasifikacija. (A) 1 ir 2 klasės sistemų genominių regionų sandara. (B) CRISPR-Cas sistemų funkciniai moduliai. DS – didysis subvienetas, MS – mažasis subvienetas. Adaptuota pagal (Makarova, Wolf, et al., 2020).

Kai kurios CRISPR-Cas sistemos yra asocijuotos su genais, kurie tiesiogiai nėra susiję su CRISPR-Cas imuniteto stadijomis: adaptacija, raiška ar interferencija. Tokių genų pavyzdžiai – įvairūs CARF domeną turintys baltymai, sutinkami šalia III tipo sistemų, DinG ir CysH baltymai – šalia IV tipo sistemų (Makarova, Wolf, et al., 2020). Geriausiai charakterizuoti su CRISPR-Cas sistemomis susiję baltymai yra pagalbinės III tipo CRISPR-Cas CARF-HEPN RNazės Csm6 (būdingos III-A tipo sistemoms) bei Csx1 (būdingos III-B tipo sistemoms).

1.3 III tipo CRISPR-Cas sistemos

III tipo CRISPR-Cas sistemos pasižymi kompleksiniu veikimu, skirtingai nuo kitų tipų CRISPR-Cas sistemų, kurių taikinyis yra arba viruso dvigrandinė DNR, arba RNR. III tipo sistemose crRNR ir Cas baltymai susijungia į efektorinį kompleksą ir III-A tipo sistemose jis vadinamas Csm, o III-B – Cmr. Csm ir Cmr kompleksai vykdo interferenciją nuo transkripcijos priklausomu DNR nutildymo būdu (Elmore et al., 2016; Estrella et al., 2016; Kazlauskienė et al., 2016; Tamulaitis et al., 2017). Virusui patekus į bakterijos ląstelę, transkripcijos metu Csm ar Cmr efektorinis kompleksas atpažįsta sintetinius svetimus transkriptus (1.5 pav.). Kai Csm/Cmr susiriša su RNR molekule, tuomet yra alosteriškai aktyvuojami 3 komplekso fermentiniai aktyvumai: (i) Csm3/Csm4 subvienetai sukarpo transkribuojamą RNR, (ii) Cas10 subvieneto HD domenas degraduoja transkripcijos burbulą vietoje RNR polimerazės išstumtą vieną iš DNR grandinių (Tamulaitis et al., 2017), (iii) Cas10 Palm domenas iš ATP sintetina 3-6 AMP dydžio ciklinius oligoadenilatus (cOA) (Kazlauskienė et al., 2017; Niewoehner et al., 2017).



1.5 pav. III tipo CRISPR-Cas sistemų veikimo mechanizmas. Virusų infekcijos metu Csm ar Cmr kompleksas atpažįsta transkripcijos metu susintetintą svetimą RNR ir įsijungia 3 komplekso aktyvumai: Csm3 subvienetų vykdomas taikinio RNR karpymas, Cas10 subvieneto Palm domeno vykdoma cOA sintezė ir Cas10 HD domeno vykdomas transkripcijos burbulė susidariusios vienos iš DNR grandinių degradavimas. Susintetinti cOA tarnauja kaip signalas ląstelėje įjungti papildomą efektorinį baltymą, kuris padeda III tipo CRISPR-Cas sistemai kovoti su infekcija. cOA rišasi su efektorinio baltymo Csm6 CARF domenu ir aktyvuoja jo HEPN domeną. Aktyvuotas Csm6 HEPN domenas pradeda nespecifinį RNR degradavimą. Šis aktyvumas išjungiamas Csm6 CARF domenui degradavus cOA. Csm6 CARF domenas veikia kaip cOA žiedo nukleazė. cOA degradavimą taip pat gali atlikti ir atskiros žiedo nukleazės.

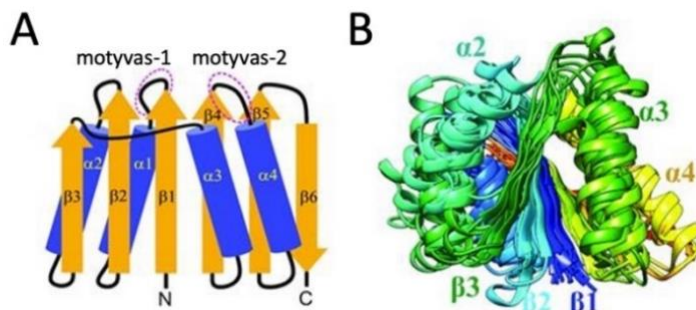
cOA veikia kaip antrinės signalinės molekulės, kurios aktyvuoja III tipo CRISPR-Cas pagalbinius baltymus, turinčius CARF domeną. Csm/Cmr komplekso susintetinti, dažniausiai, cA₄ arba cA₆ prisijungia prie sensoriaus – Csm6 ar Csx1 (Foster et al., 2020) baltymo CARF domeno (1.5

pav.). CARF-cOA sąveika lemia baltymo konformacinius pokyčius, kurie aktyvuoja su CARF sulieto HEPN (angl. *higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding*) domeno RNazinį aktyvumą. Skirtingose bakterijose Csm6/Csx1 įjungia skirtingo dydžio cOA molekulė. *Thermus thermophilus* (Tt) Csm6 (Kazlauskienė et al., 2017) ir *Sulfolobus solfataricus* (Ss) Csm6 (Rouillon et al., 2018) aktyvuoja cA₄, Csm6 iš *Streptococcus thermophilus* (St) aktyvuoja cA₆ (Kazlauskienė et al., 2017).

CARF (angl. *CRISPR-associated Rossmann fold*) domeną turintys baltymai sudaro didelę baltymų superšeimą, kuri yra paplitusi tiek bakterijose, tiek ir archėjose. Kompiuterinė analizė atskleidė, kad CARF baltymai randami sulieti su įvairius aktyvumus turinčiais domenais, RNazių, įvairių deoksiribonukleazių (DNazių), deaminazių, membranų poras formuojančių domenų, taip pat su spėjamais transkripcijos reguliatoriais HTH (angl. *helix-turn-helix*) ir kt. (Makarova, Timinskas, et al., 2020). Toliau aptarsiu CARF baltymų šeimos nomenklatūrą ir charakterizuotus atstovus.

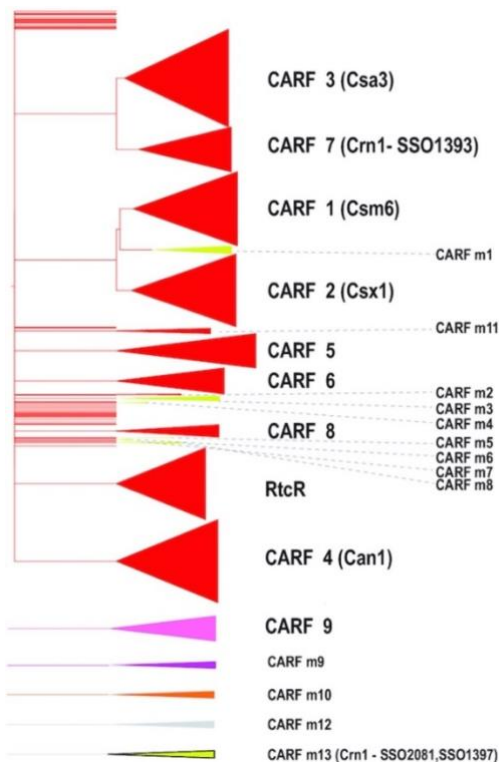
1.4 CARF baltymai

CARF domenas pasižymi į Rossmann panašia sankloda: 6 β juostomis, iš kurių penkta ir šešta suformuoja β segtuką (1.6 pav.) Dalis turi būdingus a.r. motyvus, kurių pozicija CARF sanklodoje pažymėta kaip motyvas-1 ir motyvas-2. Šiuose fermentuose minėti motyvai yra reikalingi cOA surišimui.



1.6 pav. CARF domeno sankloda. (A) Schematinis konservatyvios CARF sanklodos šerdies pavaizdavimas. Motyvas-1 ir motyvas-2, esantys atitinkamai β1-α1 ir β4-α4 sandūrose, yra svarbūs CARF surišant cOA. (B) 11 skirtingų CARF domenų struktūrų superpozicija. Adaptuota pagal (Makarova, Timinskas, et al., 2020).

CARF superšeima pasižymi itin didele a.r. sekų divergencija, taip pat didele domeninių architektūrų įvairove. Šiuo metu pagal sekų panašumus išskiriama 9 pagrindinės CARF šeimos (angl. *major clade*) bei 13 mažesnių (angl. *minor clade*) (1.7 pav.). Csm6 ir Csx1 RNazės priklauso atitinkamai CARF 1 ir CARF 2 šeimoms.



1.7 pav. Dendrograma, vaizduojanti sąsajas tarp CARF baltymų šeimų. Pagrindinės šeimos pavaizduotos raudonais trikampiais. Skliausteliuose paminėti charakterizuoti atitinkamų šeimų atstovai. Adaptuota pagal (Makarova, Timinskas, et al., 2020).

Neseniai buvo charakterizuoti dar vienos – CARF4 šeimos baltymai. Šiuose baltymuose CARF yra sulietas su efektoriumi nespecifine DNaze. Parodyta, kad Can1 (angl. *CRISPR ancillary nuclease I*) baltymo PD(D/E)XK restrikcijos endonukleazių šeimos DNazinis domenas įveda viengrandinius trūkius į dvigrandinę DNR, kai cA₄ prisijungia prie šio baltymo CARF domeno (McMahon et al., 2020). Taip pat parodyta, kad su Can1 susijęs Can2, dar pavadintas Card1 (angl. *cOA-activated RNase and DNase I*) yra dvigubo specifiškumo nukleazė, gebanti hidrolizuoti tiek DNR, tiek ir RNR (Rostøl et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Csm6/Csx1 bei Can1/Can2 aktyvumai galėtų pasitarnauti kaip atsarginis CRISPR-Cas atsakas į infekciją, kuomet įprastų pajėgumų ląstelės gynybai neužtenka. Csm6 ir Csx1 atveju nespecifinis RNazinis aktyvumas naikina tiek viruso, tiek ir ląstelės transkriptus. Tai gali nulemti abortyvinę infekciją – altruistinę ląstelės žūtį apsaugant kaimynines bakterijas/archėjas nuo viruso pavojaus (Kazlauskienė et al., 2017). Vis dėlto, abortyvinė infekcija nėra vienintelė galima baigtis: parodyta, kad Csm6 RNazinis aktyvumas geba sustabdyti ląstelės augimą, kuris yra atstatomas pašalinus infekciją (Rostøl & Marraffini, 2019). Manoma, kad Can1/Can2 taip pat atlieka reikšmingą vaidmenį ląstelėms ginantis nuo infekcijos: šie fermentai, įvesdami dvigrandinėje DNR viengrandinius trūkius galėtų suardyti replikacijos šakutes ir taip sulėtinti virusų replikaciją (Athukoralage, McMahon, et

al., 2020; Zhu et al., 2021). Išties, parodyta, kad Can2/Card1 *in vivo* suteikia apsaugą prieš bakteriofagų infekciją (Rostøl et al., 2021). Įdomu, kad kai kurios III tipo CRISPR-Cas sistemos turi katalitiškai neaktyvų Cas10 baltymo DNazinį HD domeną arba kai kuriose sistemose Cas10 šio domeno neturi (Grüschow et al., 2019; Makarova, Timinskas, et al., 2020; Staals et al., 2013). Tai rodo, kad cOA signalinis kelias itin svarbus šiose III tipo CRISPR-Cas sistemose (Athukoralage & White, 2021).

Bakterijai siekiant išvengti ląstelės žūties dėl abotyvinės infekcijos mechanizmo, būtina kontroliuoti cOA koncentraciją ląstelėje ir pašalinti perteklių infekcijai pasibaigus. III tipo CRISPR-Cas šiam tikslui pasitelkia du mechanizmus. Pirma, cOA sintezė yra išjunginama, kuomet Csm3/Csm4 perkerpa taikinio RNR (Grüschow et al., 2019; Han et al., 2018; Kazlauskienė et al., 2017; Nasef et al., 2019; Rouillon et al., 2018). Antra, cOA perteklių degradoja CRISPR-Cas pagalbiniai baltymai – žiedo nukleazės, kurios geba hidrolizuoti III tipo CRISPR-Cas efektorinio kompleso susintetintus cOA. Buvo atrasta, kad žiedo nukleazės gali būti arba atskiri baltymai, kurie turi CARF sanklodą (Athukoralage et al., 2018), arba žiedo nukleazės yra integruotos į efektoriaus sudėtį. Pasirodo, kad Csm6 baltymo CARF domenas veikia ne tik kaip signalo sensorius, bet ir kaip žiedo nukleazė, hidrolizuojanti savo aktyvatorių (1.5 pav.).

1.5 CRISPR-Cas sistemų reguliacija

Nors CRISPR-Cas sistemos savo šeimininkams sugeba užtikrinti apsaugą nuo svetimų nukleorūgščių, jos taip pat gali sukelti autoimuninį atsaką bei būti našta ląstelės metabolizmui (Vale et al., 2015). Siekiant išlaikyti CRISPR-Cas imunitetą efektyviai panaudojant resursus, ląstelė pasitelkia įvairias reguliacines priemones. Vis dėlto, CRISPR-Cas sistemų šeimininkai prokariotai nėra vieninteliai, kurie siekia reguliuoti CRISPR-Cas funkcijas. Dėl vykstančių vadinamų bakterijų-virusų ginklavimosi varžybų, virusai savo genomuose koduoja CRISPR-Cas reguliacinius baltymus, vadinamus Acr (angl. *anti-CRISPR*), kurie, panaudodami skirtingus mechanizmus, slopina CRISPR-Cas aktyvumus. Toliau apžvelgsiu žinomus tiek prokariotų, tiek ir virusų naudojamus CRISPR-Cas sistemų reguliacijos mechanizmus.

1.5.1 CRISPR-Cas genų raiškos reguliacija

Daugelyje prokariotų genomų, CRISPR-Cas sistemų genų raiška yra reguliuojama transkripciniame ir po-transkripciniame lygmenyse. Pavyzdžiui, *Escherichia coli* ir *Salmonella typhi* bakterijose yra identifikuoti su DNR asocijuotas baltymas H-NS bei leucino koncentracijai jautrūs baltymai LRP (angl. *leucine-responsive regulatory protein*) ir LeuO. H-NS ir LRP yra I-E tipo CRISPR-Cas transkripcijos represoriai, o LeuO teigiamai reguliuoja tos pačios sistemos raišką panaikindamas minėtų represorių vykdomą transkripcijos slopinimą (Medina-Aparicio et al., 2011;

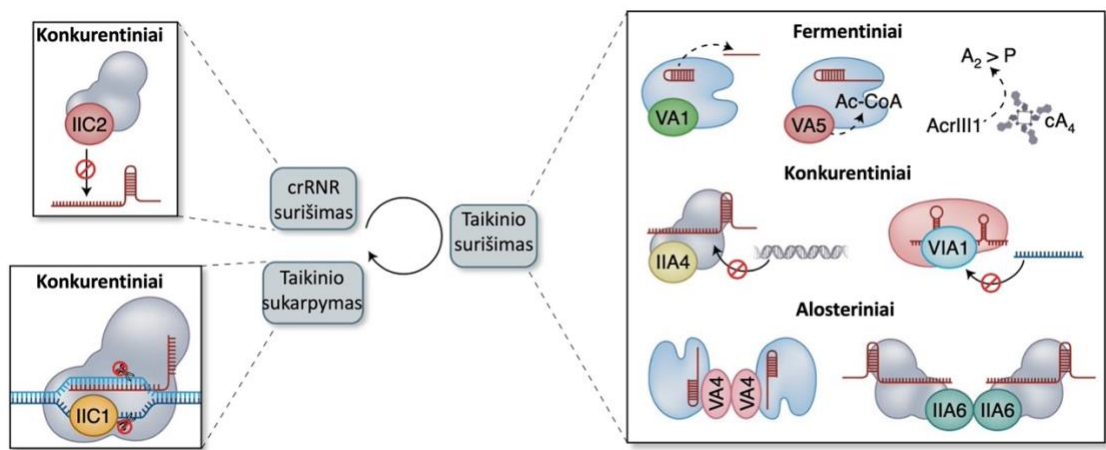
Westra et al., 2010). Taip pat parodyta, kad archėjos *Sulfolobus islandicus* I-A tipo CRISPR-Cas sistemos raišką reguliuoja Csa3a ir Csa3b. Abu šie baltymai turi CARF ir HTH domenus (žr. 1.4), kurie veikia kaip transkripcijos reguliatoriai. Transkripcijos metu Csa3a aktyvuoja CRISPR regiono ir adaptacijai reikalingų genų raišką, o Csa3b slopina tos pačios sistemos interferencijos genų raišką (He et al., 2017; Liu et al., 2017).

Bakterijos geba reguliuoti CRISPR-Cas genų raišką reaguodamos į išorinius veiksnius, tokius kaip mitybinių medžiagų prieinamumas. Pavyzdžiui, *Pectobacterium atrosepticum* bakterijose gliukozės prieinamumas gali sumažinti *cas* genų raišką per sumažėjusią transkripcijos aktyvatoriaus cAMP reguliacinio baltymo (CRP, angl. *cAMP regulatory protein*) ir cAMP komplekso koncentraciją. CRP-cAMP kompleksą sudaro CRP dimeras, susirišęs su cAMP molekule, kurią sintetina fermentas adenilatciklazė. Esant aukštai gliukozės koncentracijai, adenilatciklazės aktyvumas yra žemas, todėl CRP-cAMP komplekso kiekis ląstelėje taip pat mažas. Šis CRP-cAMP koncentracijos sumažėjimas lemia sumažėjusią *cas* genų raišką (Patterson et al., 2015). Panašiai, kai aplinkoje trūksta geležies jonų, *Pseudomonas aeruginosa* bakterijose yra stebima I-F tipo CRISPR-Cas genų raiška, kurią reguliuoja ECF (angl. *extracytoplasmic function*) sigma veiksnys PvdS. PvdS sąveikauja su *cas* genų promotoriumi ir taip skatina CRISPR-Cas regiono transkripciją (Ahator et al., 2020). Bakterijos galimai panaudoja šiuos atsakus į ribojančias gliukozės ir geležies koncentracijas kaip strategiją prisitaikyti prie padidėjusio metabolinio streso esant bakteriofagų infekcijai (Patterson et al., 2015).

Be *cas* genų raiškos reguliacijos transkripcijos veiksmų pagalba, buvo atrasti ir reguliaciniai mechanizmai po-transkripciniame genų raiškos lygmenyje dalyvaujant sRNR (angl. *small RNA*), kurie reguliuoja daugelio bakterinių genų raišką (Sedlyarova et al., 2016). Parodyta, kad sRNR PhrS skatina I tipo CRISPR-Cas regiono raišką *P. aeruginosa* bakterijose. PhrS blokuoja Rho baltymo prisijungimą prie CRISPR regiono lyderinės sekos ir taip slopina nuo Rho priklausomą transkripcijos terminaciją (Lin et al., 2019).

1.5.2 CRISPR-Cas efektorių aktyvumo reguliacija dalyvaujant Acr baltymams

Siekdami išgyventi intensyvioje tarpusavio kovoje, bakterijos ir virusai nuolat adaptuojasi. Virusai šiai kovai pasitelkia CRISPR-Cas sistemoms neutralizuoti skirtus Acr baltymus. Kaip ir CRISPR-Cas efektoriai, Acr yra labai įvairūs: išskiriama ~90 skirtingų šeimų, kurios pavadintos pagal jų slopinamą CRISPR-Cas tipą bei atradimo eiliškumą (Bondy-Denomy et al., 2018). Pagal veikimo mechanizmą, Acr baltymai skirstomi į 3 klases: konkurencinius, alosterinius ir fermentinius slopiklius (1.8 pav.).



1.8 pav. CRISPR-Cas sistemų slopinimo strategijos dalyvaujant Acr baltymams. Acr gali slopinti CRISPR-Cas aktyvumą blokuodami Cas baltymų sąveiką su crRNR (crRNR surišimas), Cas baltymų sąveiką su nukleorūgšties taikiniu (taikinio surišimas) arba taikinio sukarpymą. Pagal veikimo mechanizmą Acr skirstomi į konkurencinius, alosterinius ir fermentinius slopiklius. Kiekvienai Acr kategorijai pateikti konkretūs pavyzdžiai. $A_2 > p$ – linijinis di-adenilatas, turintis 2'3'-ciklinį fosfatą; cA_4 – ciklinis tetra-adenilatas; Ac-CoA – acetil kofermentas-A. Adaptuota pagal (Shivram et al., 2021).

Konkurenciniai Acr slopikliai yra labiausiai paplitę ir sąveikauja su CRISPR-Cas interferencijos efektoriais, taip užblokuodami šių kompleksų sąveiką su taikinio nukleorūgštimis arba Cas nukleazėmis. Dauguma konkurencinių Acr turi neigiamai įkrautą paviršių, kuris mėgdžioja dvigrandinės DNR karkasą, tokiu būdu konkuruodamas su DNR dėl tos pačios Cas efektoriaus susirišimo vietos. Tuo tarpu alosteriniai slopikliai prisijungdami prie įvairių CRISPR-Cas baltymų pakeičia jų konformaciją į tokią, kurioje šie negali sąveikauti su savo taikiniai ar jų perkirpti (Shivram et al., 2021). Fermentiniai Acr katalizuoja fermentines reakcijas, kurios sutrikdo CRISPR-Cas funkcijas. Prie fermentinių Acr slopiklių yra priskiriamos III tipo CRISPR-Cas sistemos veiklą sutrikdančios virusinės žiedo nukleazės, kurias kartu su bakteriniais giminaičiais aptarsiu kitame skyriuje.

1.6 III tipo CRISPR-Cas sistemų cOA signalinio kelio reguliacija: žiedo nukleazės

Nespecifinė RNR ir DNR degradacija, kurią vykdo cOA aktyvuojamos III tipo CRISPR-Cas pagalbinės nukleazės, nereguluojama gali sunaikinti ląstelę. Csm/Cmr efektorinių kompleksų vykdoma taikinio RNR hidrolizė išjungia cOA sintezę, tačiau išliekantis cOA perteklius ląstelėje, manoma, ir toliau palaiko imuninį atsaką (Athukoralage, Graham, et al., 2020). Parodyta, kad *Sulfolobus solfataricus* archėjų III-D tipo CRISPR-Cas sistema susintetina apie 1000 cA_4 molekulių esant vos 1 virusinei mRNR taikinio molekulei, kas atitinka ~ 6 μM cA_4 koncentraciją *S. solfataricus* ląstelėje ir yra daug daugiau nei pakanka aktyvinti Csx1 RNazę (Athukoralage, Graham, et al., 2020; Rouillon et al., 2018). Manoma, kad poreikis po sėkmingo apsigynimo pašalinti cA_4 perteklių lėmė cOA degraduojančių fermentų, kurie buvo pavadinti žiedo nukleazėmis, atsiradimą (Athukoralage et

al., 2018). cOA degradaciją taip pat panaudoja virusai kaip dar vieną Acr strategiją (Athukoralage, McMahon, et al., 2020). Toliau aptarsiu charakterizuotus cOA hidrolizuojančius baltymus virusuose ir bakterijose.

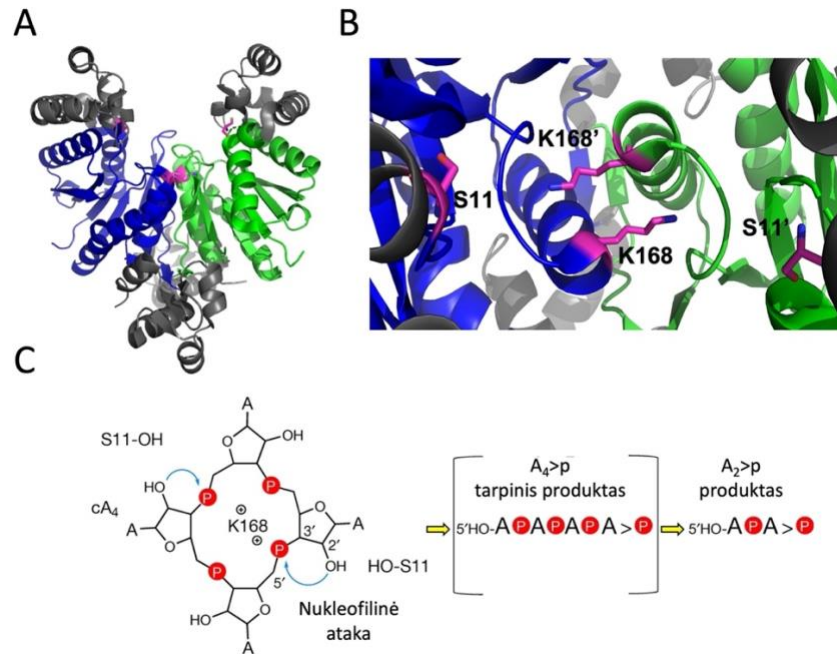
1.6.1 Crn1

Pirmą kartą cOA hidrolizuojantys fermentai buvo aptikti archėjose *S. solfataricus*, jų lizatais veikiant cA₄ (Athukoralage et al., 2018). Klasikiniais biocheminiais metodais atskiriant lizato frakcijas, masių spektrometrijos pagalba buvo nustatytas cA₄ degraduojantis baltymas Sso2081. Šis ir giminingas baltymas Sso1393 buvo charakterizuoti kaip cA₄ specifinės fosfodiesterazės ir pavadinti žiedo nukleazėmis. Vėliau šiai baltymų šeimai duotas vardas Crn1 (angl. *CRISPR ring nuclease I*) (Athukoralage, McMahon, et al., 2020).

Crn1 randami išimtinai krenarchėjose. Paprastai *Sulfolobales* būrio archėjos koduoja kelis Crn1 ortologus III tipo CRISPR-Cas sistemose, šalia Csm6 ar Csx1 efektorių (Zink et al., 2020). Pavyzdžiui, *S. islandicus* REY15A koduoja du Crn1 fermentus, kurie degraduoja cA₄, kuriuos sintetina III-B tipo CRISPR-Cas sistemos (Molina et al., 2019).

Nors ciklinių nukleotidų fosfodiesterazės substratų hidrolizei paprastai koordinuoja metalų jonus, Crn1 pasižymi nuo metalų jonų nepriklausomu aktyvumu. Crn1 hidrolizės produktai – linijiniai oligoadenilatai, turintys 2'3'-ciklinį fosfatą. Crn1 katalizuoja cA₄ hidrolizę pozicionuodamas ir/arba aktyvuodamas ribozės 2'-hidroksilo grupę gretimo fosfodiesterinio ryšio nukleofilinei atakai (1.9C pav.). Pirmoji nukleofilinė ataka generuoja linijinį tetra-adenilatą, turintį 2'3'-ciklinį fosfatą (A₄>p), kurį antroji nukleofilinė ataka iš kitos molekulės pusės paverčia dvejomis linijinio di-adenilato (A₂>p) molekulėmis (Athukoralage et al., 2018).

Nustatyta Sso1393 kristalinė struktūra atskleidė, kad Crn1 pasižymi kanonine CARF domenu sankloda (žr. 1.4) ir baltymo du subvienetai formuoja homodimerą (1.9 pav.). Baltymo aktyvųjų centrą sudaro S11 ir K168 a.r. liekanos. K168A mutacija pilnai panaikina katalitinį aktyvumą, o S11A variantas yra >30 kartus lėtesnis nei laukinio tipo baltymas (Athukoralage et al., 2018). Tikslus katalizės mechanizmas nėra nustatytas, tačiau manoma, kad S11 galėtų dalyvauti ribozės 2'-OH grupės orientavime nukleofilinei atakai, o bazinis K168, galbūt, stabilizuoja pereinamajame būvyje susidarantį pentavalentį fosforo atomą (1.9C pav.).



1.9 pav. Crn1 struktūra ir cA₄ hidrolizės mechanizmas. (A) Sso1393 baltymo kristalinė struktūra (PDB 3QYF). CARF dimerą sudarantys subvienetai nuspalvinti mėlynai ir žaliai. (B) Sso1393 (PDB 3QYF) aktyvusis centras. Katalizei svarbios a.r. liekanos pažymėtos ir atvaizduotos *sticks* (angl.) būdu. (C) Crn1 katalizės schema. cA₄ pavečiamas į tarpinį linijinį produktą A₄>p, kuris toliau hidrolizuojamas iki A₂>p. Aktyviajame centre esančios S11 galimai pozicionuoja ribozių 2'-OH grupes nukleofilinei atakai, o K168 galimai stabilizuoja pereinamajame nukleofilinės atakos būvyje susidarantį pentavalentį fosforą. (A) ir (B) atvaizdavimui naudota PyMOL programa. (C) Pritaikyta iš (Athukoralage et al., 2018).

Kadangi du Crn1 subvienetai formuoja dimerą, yra manoma, jog du aktyvieji centrai vienodai veikia priešingas simetrinio cA₄ žiedo puses. Įdomu, kad Sso1393 atveju, kuris yra 10 kartų lėtesnis fermentas nei Sso2081 (Sso2081 greičio konstanta lygi 0.23 min⁻¹, o Sso1393 – 0.024 min⁻¹), po inkubacijos su cA₄ aptinkama nemažai A₄>p, kuris po ilgesnės inkubacijos paverčiamas į A₂>p. Tai leidžia manyti, kad du Crn1 aktyvieji centrai veikia nekoordinuotai (Athukoralage et al., 2018).

1.6.2 Save inaktyvuojančios CRISPR-Cas pagalbinės ribonukleazės

Be atskirų cOA hidrolizei dedikuotų žiedo nukleazių, kai kurie Csm6 baltymai geba hidrolizuoti savo pačių aktyvatorius. Keletas Csm6 fermentų turi CARF domeną, kuris veikia ir kaip cOA sensorius, ir kaip žiedo nukleazė (Athukoralage et al., 2019; Garcia-Doval et al., 2020; Jia et al., 2019; Smalakyte et al., 2020). Manoma, kad tokie dvigubos funkcijos CARF domenai ne tik aktyvuoja, bet ir reikiamu metu išjungia Csm6 RNazinio domeno aktyvumą. Kaip ir pavienių Crn1 atveju cA₄, CARF aktyviajame centre, pirmiausiai yra perkerpamas iki A₄>p tarpinio produkto, kuris kaip ir cA₄ geba alosteriškai aktyvuoti efektorinio domeno HEPN RNazinį aktyvumą (Niewoehner et al., 2017; Rouillon et al., 2018). CARF aktyviajame centre perkirpus A₄>p iki dviejų A₂>p molekulių, HEPN aktyvumas yra išjungiamas.

Įdomu, kad iki šiol neidentifikuota nė viena atskira žiedo nukleazė, degraduojanti cA₆, tačiau keletas Csm6 fermentų turi cA₆ hidrolizuojančius CARF domenus (Garcia-Doval et al., 2020; Smalakyte et al., 2020). Analogiškai cA₄, cA₆ Csm6 CARF domenas paverčia į tarpinį linijinį A₆>p, kuris vėliau yra hidrolizuojamas į 2 dalis iki galutinio reakcijos produkto A₃>p (Garcia-Doval et al., 2020; Smalakyte et al., 2020). Garcia-Doval ir bendradarbiai parodė, kad cA₆ žiedo nukleazinį aktyvumą išjungianti aktyvaus centro mutacija įgalina nuolat palaikomą Csm6 RNR hidrolizę, kuri stabdo ląstelių augimą (Garcia-Doval et al., 2020). Toks rezultatas pabrėžia itin svarbų žiedo nukleazių vaidmenį ląstelėms suvaldant nereguliuojamos Csm6 RNazės galimas neigiamas pasekmes.

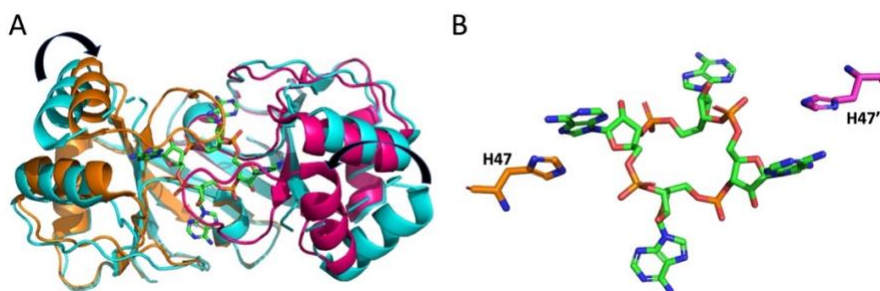
Buvo parodyta, kad Csm6/Csx1 cA₄ ir cA₆ hidrolizei naudoja ne tik CARF domeną, bet ir HEPN domeno RNazinis aktyvumas naudojamas cOA degradacijai (Foster et al., 2020; Jia et al., 2019; Smalakyte et al., 2020). Parodyta, kad Csm6 iš *S. thermophilus* hidrolizuoja cA₆ tiek CARF, tiek ir HEPN domenas. Izoliuoto StCsm6 CARF domeno ir cA₆ reakcijos mišinyje randami A₆>p ir A₃>p produktai, tačiau A₆>p po ilgesnės inkubacijos paverčiamas A₃>p. Tai papildė žiedo nukleazių atradėjų duomenis ir patvirtina teoriją, kad CARF žiedo nukleazių subvienetai veikia simetrinę cOA molekulę iš abiejų pusių vienodai, bet nekoordinuotai, kaip aprašyta skyrelyje 1.6.1. Tuo tarpu izoliuotas StCsm6 HEPN domenas nespecifiškai degraduoja įvairaus ilgio cOA, paversdamas juos A₂>p ir A>p mišiniu (Smalakyte et al., 2020).

Nustatyta, kad StCsm6 CARF domenas yra giminingesnis cA₆, lyginant su HEPN domenu. Taip pat, esant fermento pertekliui, CARF degraduoja cA₆ žymiai greičiau, nei HEPN. Vis dėlto, esant substrato pertekliui, HEPN vykdoma cA₆ hidrolizė yra žymiai greitesnė. Šie duomenys leidžia manyti, kad CARF žiedo nukleazinis aktyvumas yra ypač svarbus esant žemoms cA₆ koncentracijoms, tačiau HEPN yra žymiai efektyvesnė žiedo nukleazė esant dideliems cA₆ kiekiams (Smalakyte et al., 2020).

1.6.3 AcrIII-1

III tipo CRISPR-Cas antivirusinių bakterijų apsaugos kompleksinis veikimas skatina virusus išvystyti mechanizmus, slopinančius cOA signalinius kelius. Pastebėta, kad daugybė skirtingų archėjų virusų, provirusų, bakteriofagų, profagų ir plazmidžių koduoja itin efektyvų cA₄ degraduojantį fermentą (Athukoralage, McMahon, et al., 2020). Ši CARF sanklodai negimininga, DUF1874 šeimos virusinė žiedo nukleazė hidrolizuoja cA₄ ~ 100 kartų greičiau nei ląsteliniai Crn1 fermentai. Tai įgalina virusus efektyviai neutralizuoti III tipo CRISPR-Cas imunitetą. Virusinė žiedo nukleazė pagal pasiūlytą anti-CRISPR baltymų nomenklatūrą buvo pavadinta AcrIII-1 (Bondy-Denomy et al., 2018). Fermentas degraduoja cA₄ ir todėl nėra specifinis III tipo CRISPR-Cas potipiui.

AcrIII-1 yra nuo metalo jonų nepriklausoma žiedo nukleazė, panašiai kaip Crn1 degraduojanti cA₄ iki A₂>p. Yra nustatyta AcrIII-1 baltymo iš SIRV-1 viruso kristalinė struktūra tiek apo formoje, tiek ir sąveikaujant su cA₄. Panašiai kaip CARF baltymai, AcrIII-1 subvienetai taip pat sudaro homodimerą. Iš AcrIII-1-cA₄ struktūros matoma, kad cA₄ prie baltymo yra prisijungęs ertmėje, kurioje susikerta subvienetai (1.10 pav.). AcrIII-1 apo ir komplekso su cA₄ struktūrų palyginimas parodė reikšmingą baltymo nestruktūrizuotos kilpos ir alfa-spiralės postūmį, kuris uždaro cA₄ molekulę baltymo dimero viduje.



1.10 pav. AcrIII-1 ir cA₄ komplekso struktūra. (A) apo-AcrIII-1 (PDB 2X4I) ir cA₄-AcrIII-1 H47A varianto (PDB 6SCF) struktūrų superpozicija. Baltymo apo forma pavaizduota žydra spalva, o komplekse su ligandu dimerą sudarantys monomerai nuspalvinti oranžine ir rožine spalvomis. cA₄ anglies atomų karkasas pažymėtas žalia spalva. Rodyklėmis parodomas kiekvieno monomero α -spiralės poslinkis prisijungus substratui. (B) cA₄ AcrIII-1 aktyviajame centre. Katalizei svarbių H47 a.r. liekanų cA₄-AcrIII-1 struktūroje nėra, todėl šios a.r. liekanos sumodeliuotos superpozicijos būdu su apo-AcrIII-1 struktūra. Atvaizduota naudojant PyMOL programą remiantis (Athukoralage, McMahon, et al., 2020).

cA₄ molekulė simetriškai sąveikauja su kiekvienu AcrIII-1 monomeru. Dvejuose pozicijose, priešingose žiedo pusėse, ribozių 2'-hidroksi grupės yra pozicionuojamos nukleofilinei fosfodiesterinio ryšio atakai (1.10B pav.), panašiai kaip ir Crn1 atveju (1.9C pav.). Tiek AcrIII-1, tiek ir Crn1 sąveika su cA₄ yra stipriai gimininga, todėl greitesnis AcrIII-1 veikimas yra paaiškinamas geresniu ribozės 2'-hidroksilo grupės pozicionavimu nukleofilinei atakai, geresniu pereinamojo būvio stabilizavimu ir nueinančios oksianijono grupės protonizavimu (Athukoralage, McMahon, et al., 2020). AcrIII-1 šeimoje absoliučiai konservatyvus H47 yra orientuotas, kad galėtų veikti kaip bendroji rūgštis ir dalyvauti katalizėje (1.10B pav.).

1.6.4 Crn2

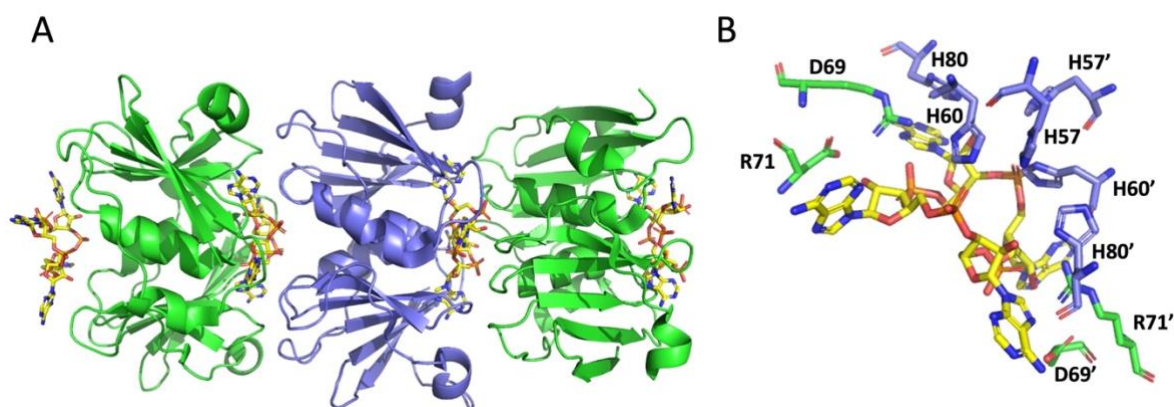
AcrIII-1 sanklodos baltymas taip pat yra randamas ir kai kuriose bakterijose asocijuotas su III tipo CRISPR-Cas sistemomis. Tokie baltymai buvo pavadinti Crn2 (angl. *CRISPR ring nuclease 2*) (Athukoralage, McMahon, et al., 2020). Kadangi AcrIII-1/Crn2 atstovai yra itin paplitę mobiliuose genominiuose elementuose, spėjama, kad bakterijos įgijo šį baltymą koduojantį geną horizontalios

pernašos metu ir pritaikė fermentą reguliuoti III CRISPR-Cas cOA signalinį kelią. Visgi, kokia yra baltymo kilmė – virusinė ar bakterinė – nėra galutinai žinoma.

Marinitoga piezophila (Mpi) bakterijose Crn2 randamas sulietas su Csx1 ir reguliuoja Csx1 HEPN aktyvumą (žr. 1.3). Parodyta, kad šio baltymo Crn2 domenas hidrolizuoja cA₄ AcrIII-1 fermentams panašiu greičiu. Vis dėlto, kitaip nei AcrIII-1, MpiCsx1-Crn2 hidrolizuodamas cA₄ sulėtina, bet ne visiškai sustabdo Csx1 vykdomą RNR hidrolizę. Tai paremia hipotezę, kad MpiCsx1-Crn2 funkcionuoja kaip savo aktyvumą reguliuojanti ribonukleazė (Samolygo et al., 2020). Parodyta, kad norint stebėti MpiCsx1-Crn2 RNazinį aktyvumą *in vitro*, reikalingos aukštos (μM) cA₄ koncentracijos. Manoma, kad tokį efektą sukelia Crn2 domeno didesnis giminingumas cA₄ molekulei bei greitas žiedo nukleazinis aktyvumas (Samolygo et al., 2020).

1.6.5 Crn3

Prokariotai, savo genomuose neturintys *crn1* genų, dažnai šalia III tipo CRISPR-Cas sistemų turi Csx3 baltymą koduojantį geną. Šalia jo dažniausiai aptinkami genai yra *csx1* ir *csm6* (Makarova, Timinskas, et al., 2020; Shah et al., 2019), kas leidžia postuliuoti apie galimą reguliacinę šio baltymo funkciją. Pirmieji Csx3 iš *Archaeoglobus fulgidus* (Afu) tyrimai charakterizavo baltymą kaip nuo mangano jonų priklausomą RNR egzoribonukleazę, specifiskai perkerpančią 3'-poli(A) uodegas (Yan et al., 2015). Vis dėlto, baltymo vaidmuo antivirusiniame imunitete nebuvo iki galo suprastas. Neseniai AfuCsx3 buvo iš naujo pradėtas tyrinėti kitos mokslininkų grupės, kuri pademonstravo, kad Csx3 yra cA₄-specifinė žiedo nukleazė (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020). Taip pat parodyta, kad Csx3 geba reguliuoti Csx1 vykdomą imunitetą *in vivo*, todėl Csx3 buvo pervadintas Crn3 (angl. *CRISPR ring nuclease 3*). *In vitro* Crn3 degradoja cA₄ panašiu greičiu kaip AcrIII-1, tačiau *in vivo* tyrimai atskleidė, kad Crn3 tik iš dalies apsaugo *E. coli* ląsteles nuo Csx1 toksiškumo. Tuo tarpu AcrIII-1 klonuotas į *E. coli* suteikia ląstelėms beveik pilną apsaugą, visiškai inaktyvuodamas cA₄ signalinį kelią (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020).



1.11 pav. cA₄-Crn3 H60A varianto komplekso struktūra. (A) Crn3 dimerai kartu su cA₄ formuoja filamentinę ketvirtinę struktūrą (PDB kodas 6YUD). Parodyti 3 dimerai (žalia ir mėlyna), cA₄ anglies atomų karkasas nuspalvintas geltonai. (B) Crn3 aktyvusis centras (spalvos kaip (A) dalyje). Katalizei svarbi H60 a.r. liekana yra pakeista į alaniną nustatytos struktūros cA₄-Crn3 komplekse, todėl šiame paveiksle H60 pozicija sumodeliuota cA₄-Crn3 (PDB 6YUD) ir apo-Crn3 (PDB 3WZI) struktūrų superpozicijos būdu. Atvaizduota PyMOL programa, remiantis (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020).

Remiantis struktūrine topologija, Crn3 pirmiausia buvo laikomas nutolusiu CARF šeimos nariu (Topuzlu & Lawrence, 2016). Tačiau, pastaroji struktūrų analizė nurodė, kad Crn3 sankloda yra artimesnė STAS (angl. *sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist*) domenams (Makarova, Timinskas, et al., 2020). Athukoralage ir bendradarbiai nustatė Crn3-cA₄ komplekso struktūrą parodė, kad Crn3 subvienetai kartu su cA₄ formuoja filamentus, kuriuose cA₄ yra įsiterpęs tarp dviejų Crn3 dimerų (1.11 pav.) (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020). Kitaip nei nuo metalo jonų nepriklausomoms Crn1 ir Crn2 šeimoms, Crn3 nukleaziniam aktyvumui yra būtini Mn²⁺ jonai. Crn3 hidrolizuoja cA₄ iki A₂>p ir A₂p (di-adenilato, turinčio 5'-hidroksi ir 3'-fosfato grupes) produktų. Vienoje Crn3 pusėje yra aktyvusis centras su trimis konservatyviomis histidino liekanomis, kurios galėtų koordinuoti iki trijų mangano jonų, reikalingų katalizei. Tuo tarpu kitoje baltymo pusėje yra taip pat katalizei svarbi, konservatyvi aspartato liekana. Dimero-dimero paviršių sąveikos lemia šių dviejų pusių sąjungą į vieną aktyvųjų centrą (1.11B pav.). Nors Crn3 vykdomos cA₄ hidrolizės mechanizmas nėra visiškai supastas, tačiau kinetiniai tyrimai atskleidžia katalizuojamos reakcijos ciklo kooperatyvumą, todėl manoma, kad greitis, kuriuo cA₄ yra pašalinamas, gali būti kontroliuojamas keičiant Crn3 viduląstelinę koncentraciją (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020).

Įdomu, kad cianobakterijose aptinkami baltymai, susidedantys iš N-galinio Crn3 ir C-galinio AAA+ (angl. *ATPases associated with diverse cellular activities*) ATPazinių domenų (Shah et al., 2019). AAA+ ATPazės hidrolizuoja ATP, taip stimuliuodamos įvairius ląstelinius procesus, pvz. baltymų denatūraciją, degradaciją, DNR replikaciją, reparaciją ir rekombinaciją (Ogura & Wilkinson, 2001). Todėl Crn3 ir AAA+ ATPazinių domenų buvimas viename polipeptide leidžia spėti, kad cOA degradacija gali būti susijusi su kitais ląsteliniiais procesais. Be to, *Thermodesulfobium narugense* bakterijose yra aptinkamas genas, koduojantis baltymą, kuriame sulieti Csx1 ir Crn3 domenai, panašiai kaip MpiCsx1-Crn2 atveju, (žr. 1.6.4), kas leidžia siūlyti Crn3 vaidmenį reguliuojant Csx1 RNazinį aktyvumą (Makarova, Timinskas, et al., 2020).

1.6.6 Membraninė nukleazė MAD

Be CARF ir DUF1874 šeimų baltymų, cOA taip pat geba degraduoti su membrana susijusi DHH-DHHA1 šeimos nukleazė MAD (angl. *metal-dependent and membrane-associated DHH-DHHA1 family nuclease*). Zhao ir bendradarbiai, analizuodami archėjos *S. islandicus* REY15A lizatą,

identifikavo nuo Mn^{2+} jonų priklausomą, nespecifinį, t.y. įvairaus dydžio cOA hidrolizės aktyvumą (Zhao et al., 2020). *S. islandicus* REY15A turi III-B tipo CRISPR-Cas sistemą, generuojančią cA₄, cA₄ aktyvuojamą Csx1 RNazę, bei 2 Crn1 šeimos žiedo nukleazes (Molina et al., 2019). Autoriai parodė, kad su Crn1 nesusijęs, nuo Me^{2+} jonų priklausomas cOA hidrolizės aktyvumas yra asocijuotas su ląstelės membrana ir su membrana susijusi MAD nukleazė geba sudegraduoti cOA itin greitai, esant aukštomis šios molekulės koncentracijoms, taip inaktyvuodama Csx1. Manoma, kad dėl membraninės lokalizacijos MAD geba degraduoti tik tuos cOA, kurie difuzijos būdu pasiekia ląstelės membraną (Zhao et al., 2020). Autoriai pasiūlė, kad Crn1 žiedo nukleazės ir MAD kooperuoja reguliuojant cOA koncentraciją ląstelėje: nuo Me^{2+} jonų nepriklausomos Crn1 efektyviai pašalina mažus cOA kiekius, o daug greitesnės MAD efektyviai hidrolizuoja cOA aukštose koncentracijose (Zhao et al., 2020). Parodyta, kad *S. solfataricus* bakterijose, kuriose buvo atrasta pirmoji žiedo nukleazė (Athukoralage et al., 2018), žiedo nukleazių aktyvumo nepakanka degraduoti didelių kiekių cOA (Athukoralage, Graham, et al., 2020). *S. solfataricus* taip pat koduoja MAD homologą, todėl MAD galėtų būti svarbi III tipo CRISPR-Cas reguliacijai *S. solfataricus* ir kituose organizmuose, ląstelėje esant daug susintetintų cOA (Zhao et al., 2020).

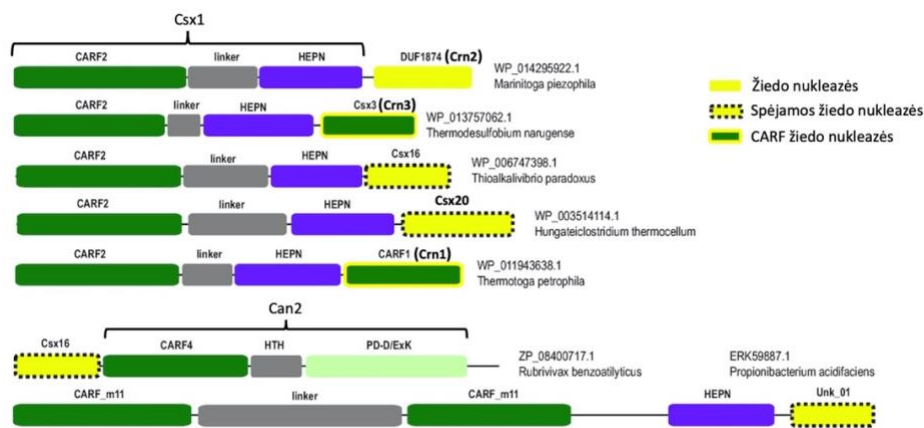
1.6.7 Žiedo nukleazių biologinė funkcija

Atradus pirmąją žiedo nukleazę Crn1 buvo pasiūlyta, kad žiedo nukleazių paskirtis yra šalinti cOA perteklių po to, kai sėkmingai yra sunaikinamos viruso nukleorūgštys (Athukoralage et al., 2018). Tokiu būdu būtų išvengta abortyvinės infekcijos scenarijaus III tipo CRISPR-Cas apsaugos metu. Vis dėlto, MpiCsx1-Crn2 tyrimo (žr. 1.6.4) autoriai, pastebėję, kad Csx1 domeno RNaziniams aktyvumui reikalingos aukštos cA₄ koncentracijos, pasiūlė alternatyvią šio baltymo reguliacinio domeno funkciją: galimai Crn2 domeno reikšmė yra ne tik abortyvinės infekcijos scenarijaus išvengimas, bet ir virusinės invazijos atskyrimas nuo „netikro pavojaus“. Šis galėtų pasireikšti esant mažoms cOA koncentracijoms, kurios galėtų būti, pavyzdžiui, klaidingai atpažinto Csm/Cmr komplekso taikinio rezultatas. Tad žiedo nukleazės, pašalindamos mažus cOA kiekius, apsaugo ląstelę nuo autoimuninės reakcijos. Šią hipotezę taip pat paremia lėta Crn1 fermento kinetika. Be to, Crn1 nepajėgia degraduoti didelių kiekių cOA – šį darbą galimai atlieka itin greita membraninė MAD nukleazė, randama kartu su Crn1 (Zhao et al., 2020), bei Csm6 HEPN domenai (Smalakyte et al., 2020) (žr. 1.6.2).

1.6.8 Spėjamos žiedo nukleazės

Makarova ir bendradarbiai neseniai prognozavo, kad keli necharakterizuoti baltymai galėtų būti naujos žiedo nukleazės. Atlikę kompiuterinę CARF baltymų ir jų kaimynų analizę jie įvardino su III tipo CRISPR-Cas asocijuotus Csx15, Csx20, Csx16, unk_01 atstovus kaip spėjamas žiedo nukleazes

(Makarova, Timinskas, et al., 2020). Csx20 ir Csx16 baltymuose buvo identifikuotos konservatyvios polinės a.r. liekanos – His, Arg ir Asp arba Glu spėjama, kad galėtų dalyvauti katalizėje. Taip pat buvo pastebėti a.r. sekų panašumai tarp Csx20 ir Csx16, bei tarp Csx16 ir DUF1874 šeimos, kuriai priklauso Crn2/AcrIII-1 žiedo nukleazės (Makarova, Timinskas, et al., 2020). Tai galėtų rodyti, kad visi šie baltymai yra smarkiai vienas nuo kito nutolę tos pačios baltymų šeimos nariai.



1.12 pav. Baltymų, sulietų su žinomomis ir spėjamomis žiedo nukleazėmis, domeninė organizacija. Kiekvieno domeno šeimos pavadinimai užrašyti virš atitinkamų juostelių. Charakterizuotų žiedo nukleazių pavadinimai užrašyti ir paryškinti skliaustuose šalia atitinkamų šeimų pavadinimų.

Taip pat Csx20, Csx16 ir unk_01 yra randami sulieti su Csx1 (1.12 pav.), kas sustiprina hipotezę, kad šie baltymai dalyvauja III tipo CRISPR-Cas sistemų reguliacijoje (Makarova, Wolf, et al., 2020). Šiame magistro baigiamajame darbe aprašyti mūsų atlikti spėjamos žiedo nukleazės Csx20 aktyvumo tyrimai.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo medžiagos

2.1.1 Antibiotikai, bakterijų kamienai ir terpės

Antibiotikai:

- Ampicilinas (Ap);
- Karbenicilinas (Cb);
- Kanamicinas (Kn);
- Streptomicinas (Str);
- Gentamicinas (Gent);
- Chloramfenikolis (Cm);

E. coli kamienai:

- Arctic Express (DE3), Gent^R (baltymų raiškai);
- ER2566 (DE3) (*in vivo* eksperimentams)
- DH5α (klonavimui)

Bakterijų auginimo terpės:

- LB terpė: 1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl vandeninis tirpalas, pH 7,0 (25 °C);
- agarizuota LB terpė: 1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl vandeninis tirpalas, 1,5 % agar-agaro, pH 7,0 (25 °C)

2.1.2 Buferiniai tirpalai

Elektroforezės buferiniai tirpalai:

- baltymų elektroforezės buferis: 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicino, 0,1 % NDS, pH 8,3 (25°C);
- 4 % koncentruojantis poliakrilamidinis gelis: 4 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37,5:1), 125 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, pH 6,8 (25°C);
- 12 % skiriantysis poliakrilamidinis gelis: 12 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37,5:1), 375 mM Tris-HCl, 0,1 % NDS, pH 8,8 (25°C).
- Nukleorūgščių elektroforezės NBE buferis: 0,1 M H₃BO₃, 0,2 mM EDTA, 0,5 μg/ml etidžio bromido (EtBr), pH 8,3 (25 °C);

Baltymų gryninimo buferiniai tirpalai:

- Gryninimo buferis: 20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 7 mM 2-merkaptoetanolio, pH 7,4 (25 °C);
- HisTrap eliuacijos buferis: 20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 7 mM 2-merkaptoetanolio, 500 mM imidazolo, pH 7,4 (25 °C);
- StrepTrap eliuacijos buferis: 20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 7 mM 2-merkaptoetanolio, 2,5 mM d-destiobiotino, pH 7,4 (25 °C);
- Saugojimo buferis: 10 mM Na₃PO₄, 300mM NaCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% glicerolio, pH 7,4 (25 °C).
- SEC-MALS buferis: 10 mM Na₃PO₄, 300mM NaCl, 7 mM 2-merkaptoetanolio, 50%, pH 7,4 (25 °C).

Fermentinėse reakcijose naudoti buferiniai tirpalai:

- 10× „Yellow“ buferis: 330 mM Tris-acetato, 100 mM Mg(CH₃COO)₂, 660 mM, CH₃COOK, 1 mg/ml BSA, pH 7,9 (37 °C) („Thermo Scientific“);
- 10× „Fast Digest“ buferis („Thermo Scientific“);
- 5× Phusion HF reakcijos buferis („Thermo Scientific“);
- 10× T4 PNK reakcijos buferis A: 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidino, pH 7,6 (25 °C) („Thermo Scientific“);
- 10× T4 DNR ligazės buferis: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 (25 °C) („Thermo Scientific“);

2.1.3 Fermentinėse reakcijose naudoti komerciniai fermentiniai preparatai

- DpnI, LguI, EheI, PdmI, GsuI ir kitos „Thermo Scientific“ „Fast Digest“ linijos restrikcijos endonukleazės;
- T4 polinukleotidkinazė (PNK) („Thermo Scientific“);
- T4 DNR ligazė („Thermo Scientific“);
- Rinkinys Gibsono surinkimo metodui „NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix” („New England BioLabs”)
- DNR polimerazė „Phusion“ („Thermo Scientific“);

2.1.4 Rinkiniai, skirti nukleorūgšties gryninimui

- plazmidinės DNR gryninimui skirtas rinkinys „GeneJET Plasmid miniprep Kit“ („Thermo Scientific“);
- PGR produktų gryninimui skirtas rinkinys „GeneJET PCR Purification Kit“ („Thermo Scientific“).

2.1.5 Kiti tirpalai

- 4× baltymų dažas: 200 mM Tris-HCl, 400 mM DTT, 8 % NDS, 0,4 % bromfenolio mėlio, 40 % glicerolio, pH 6,8 (25 °C);
- baltyminių gelių dažas „PageBlue™ Protein Staining Solution“ („Thermo Scientific“);

E. coli kompetentinių ląstelių paruošimo tirpalai:

- „Na⁺“ tirpalas: 5 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8,0 (25 °C);
- „Ca²⁺“ tirpalas: 5 mM Tris-HCl, 100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 8,0 (25 °C).

2.1.6 Nukleorūgščių preparatai

- DNR molekulinės masės standartas elektroforezei „MassRuler DNA Ladder Mix“ („Thermo Scientific“).

Plazmidės (sukonstravo VU doktorantas Irmantas Mogila):

- pBAD-CARF-RelE.A, Ap^R
- pBAD-CARF-RelE.B, Ap^R
- pET-MBP, Ap^R

Cikliniai RNR adenilatai:

- cA₄ – ciklinis 3',5'-tetra adenilatas;
- cA₆ – ciklinis 3',5'-heksa adenilatas;

2.1.7 Baltymų molekulinės masės standartai

- Baltymų molekulinės masės standartas elektroforezei „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ („Thermo Scientific“). Baltymų dydžiai (kDa): 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10.

2.1.8 Reagentai Western-Blot analizei

- Pernešimo „1-Step Transfer“ buferis („Pierce“)
- 10×TBS buferis: 0,1 M Tris-HCl, 9 % NaCl, pH 7,4;
- Blokuojantis buferis: 1×TBS, 0,5 % Tween-20, 3 % BSA;
- Atplovimo buferis: 1×TBS, 0,1 % Tween-20;
- Substratinis buferis: 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,005 M MgCl₂;
- BCIP 50 mg/ml;
- NBT 50 mg/ml;
- Antikūnai „Strep-Tactin alkaline phosphatase conjugate“

2.1.9 Įvairūs kiti reagentai

- Dejonizuotas vanduo (milliQ), etanolis, izopropanolis, fenolis, 2-merkptoetanolis, DTT, glicerolis, NDS, CaCl₂, HCl, NaOH, NaCl, EDTA, PMSF, imidazolas, d-destiobiotinas, IPTG, L-(+)-arabinozė, „TopVision“ agarozės tabletės, RiboLock RNazių slopiklis („Thermo Scientific“).

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 Genų klonavimas į pET raiškos vektorių

RmCsx20, Rm378Csx20 ir HpCsx20 koduojantys genai buvo užsakyti susintetinti „Twist Bioscience“ kompanijoje. Norimi klonuoti DNR fragmentai pBAD raiškos vektoriuje buvo padauginti PGR metodu panaudojant Phusion („Thermo Scientific“) polimerazę (pagal gamintojo rekomendacijas). Taip pat buvo padaugintas pET arba pET-MBP raiškos vektorius, į kurį buvo klonuoti tiksliniai genai. Padauginti fragmentai išgryninti panaudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ („Thermo Scientific“) rinkinį. Toliau vykdytas DNR fragmentų surinkimas Gibsono surinkimo metodu naudojant „NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix“ („New England BioLabs“), pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinys naudotas *E.coli* transformacijai 2.2.3 metodu. Plazmidę turinčios kolonijos atrinktos kolonijų polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu naudojant „Phusion“ („Thermo Scientific“) DNR polimerazę. Viena iš plazmidę turinčių kolonijų užsėjama į 4 ml šviežios LB terpės ir auginama per naktį. Ryte plazmidinė DNR išgryninama naudojant „GeneJET Plasmid miniprep Kit“ („Thermo Scientific“). Išskirtos DNR koncentracija nustatoma matuojant šviesos sugertį esant bangos ilgiui 260 nm spektrofotometru „ND-1000“ („NanoDrop Technologies“). Plazmidės patikrinamos unikaliose vietose kerpančiomis restrikcijos

endonukleazėmis, DNR fragmentus analizuojant agaroziniame gelyje pagal 2.2.4 metodą. Geno seka patvirtinta atlikus DNR sekoskaitą VU Gyvybės Mokslų Centro Sekvenavimo centre.

2.2.2 Kompetentinių ląstelių paruošimas

E. coli ląstelės užsėjamos į mėgintuvėlį su 4 ml LB terpės. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, kol kultūra pasiekia optinį tankį 0,5-0,6. Ląstelės surenkamos mėgintuvėlio turinį perkeliant į 1,5 ml tūrio „Eppendorf“ mėgintuvėlius ir centrifuguojant mikrocentrifugoje 6000 rpm, 1 min., 4 °C. Nupylus supernatantą, nuosėdos resuspenduojamos 1 ml „Na⁺“ tirpalo ir centrifuguojama esant toms pačioms sąlygoms. Nupylus supernatantą, ląstelės resuspenduojamos 1 ml „Ca²⁺“ tirpalo. Ląstelės inkubuojamos ledo vonioje 20 min, nusukamos tomis pačiomis sąlygomis, supernatantas nupilamas, ląstelės dar kartą resuspenduojamos 100 µl „Ca²⁺“ tirpalo.

2.2.3 Ląstelių transformacija

Kompetentinės *E. coli* ląstelės paruošiamos 2.2.2 aprašytu metodu. Reikiamas kompetentinių ląstelių suspensijos tūris sumaišomas su plazmidine DNR arba ligavimo mišiniu ir 20 min laikomas ledo vonioje, po to mišinys 1 min. perkeliamas į 42 °C vandens termostatą. Po temperatūrinio šoko ląstelės užpilamos kambario temperatūros LB terpe santykiu 1:10 ir inkubuojamos dar 60 min 37 °C temperatūroje. Suspensija centrifuguojama, ląstelės resuspenduojamos mažesniame tūryje LB terpės ir išsėjamos Petri lėkštelėse ant agarizuotos mitybinės LB terpės su reikiamu antibiotiku. Lėkštės inkubuojamos oriniame termostate 37 °C temperatūroje 16-20 h.

2.2.4 DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

Kolboje su NBE buferiniu tirpalu ir 0,5 µg/ml EtBr, dedant „TopVision“ agarozės tablečių („Thermo Scientific“) paruošiamas 1 % agarozės gelis. Agarozė išlydoma ir karšta supilama į paruoštą gelio formą, įstatomos šukos. Sustingęs gelis perkeliamas į elektroforezės vonelę su NBE buferiniu tirpalu, turinčiu 0,5 µg/ml EtBr. DNR mėginiai maišomi su „6× DNA Gel Loading Dye“ („Thermo Scientific“) ir į gelio šulinėlius įnešama po 5-20 µl mėginio. Elektroforezė vykdoma esant 7 V/cm įtampai 40-50 min. Po elektroforezės gelis vizualizuojamas UV šviesoje.

2.2.5 Kryptinga mutagenėzė PGR būdu

Pagal 2.2.1 metodiką gautas raiškos vektorius pET-MBP-HpC_{sx}20 buvo naudojamas kaip matrica mutantinio geno konstravimui. Pagal gamintojo rekomendacijas paruošiamas PGR mišinys su pradmenų pora, kuri skirta įvesti taškinei mutacijai, ir išpilstomas į 0,2 ml mėgintuvėlius. PGR

reakcijai naudota „Phusion“ („Thermo Scientific“) DNR polimerazė. PGR vykdoma termocikleryje, pradmenų lydymosi temperatūrą parenkant naudojantis gamintojo kompiuterine programa. PGR produktai analizuojami elektroforezės agaroziniame gelyje pagalba (žr. 2.2.4). PGR produktai išgryninami „GeneJET PCR Purification Kit“ („Thermo Scientific“) rinkiniu. Kad pašalintume galimus matricos likučius, išgrynintas PGR produktas paveikiamas DpnI restrikcijos endonukleazės preparatu. DpnI sukarpo metilintą iš bakterijų išskirtą matricinę DNR, tačiau nehidrolizuoja nemetilinto PGR produkto. PGR produktas yra veikiamas T4 polinukleotidkinaze ir ATP. Gauta fosforilinta linijinė DNR molekulė yra susiuvama naudojant T4 DNR ligazę. *E. coli* ląstelės transformuojamos gauta plazmidine DNR, mutantinės plazmidės gryninamos, tikrinamos įvairiomis restrikcijos endonukleazėmis, geno seka patvirtinta atlikus DNR sekoskaitą (žr. 2.2.1-2.2.3). Visos procedūros atliktos pagal gamintojo „Thermo Scientific“ rekomendacijas.

2.2.6 Baltymų raiška

Naudojant 2.2.3 metodiką *E. coli* Arctic Express (DE3) kamienas transformuojamas laukinio tipo ir mutantine plazmidėmis. Gautos kultūros nakčiai atskirai užsėjamos į kolbas su 400 ml LB terpės, ampicilinu (0,1 mg/ml) ir gentamicinu (0,03 mg/ml), kultūra auginama purtyklėje 37 °C, esant 200 rpm. Ryte 1/20 naktinės kultūros persėjama į šviežią 4× 400 ml LB terpę su ampicilinu ir gentamicinu ir toliau auginama iki optinio tankio 0.7-0.75. Tikslinio baltymo raiška indukuojama pridėdant į terpę 0,2 % L-(+)-arabinozės. Po indukcijos kultūra auginama dar 5-6 val. Biomasa surenkama centrifuguojant „Beckman“ centrifugoje (JA-10 rotorius, 5 min., 6000 rpm, 4 °C). Baltymų raiška patikrinama Western-Blot metodu, pagal „Thermo Scientific“ rekomendacijas.

2.2.7 Baltymų gryninimas

Užauginta biomasa suspenduota baltymų gryninimo buferyje su 20 mM imidazolo, 2 mM PMSF ir suardyta ultragarsu. Ląstelių nuolaužos ir netirpūs baltymai pašalinti centrifuguojant „Beckman“ centrifugoje su JA-20 rotoriumi 1 h., 18000 rpm, 4 °C. Supernatantas saugomas lede. pBAD vektoriuose išreikštus baltymus buvo bandoma gryninti giminingumo chromatografijos būdu naudojant „AKTA Avant“ („GE Healthcare“) sistemą ir „HisTrap“ arba „StrepTrap“ („GE Healthcare“) kolonėles.

pET raiškos vektoriuose išreikšti baltymai buvo gryninami per „HisTrap“. Pirmame etape, užnešus ląstelių lizatą tiksliniai baltymai buvo nuplauti nuo „HisTrap“ kolonėlės naudojant imidazolo gradientą (5-500 mM). Gryninimo frakcijos apjungiamos remiantis NDS-PAGE analize, iš jų buvo pašalinamas imidazolas panaudojant „HiPrep 26/10 desalting“ („GE Healthcare“) kolonėlę. His₁₀-

MBP inkaras buvo pašalintas pridodant 15 mM DTT ir 1/50 tikslių baltymų masės dalies TEV proteazės, inkubuojant 4 °C, 48-72 val. Toliau baltymai gryninti per „HisTrap“, surenkama prašokimo frakcija. Tikslių baltymų turinčios frakcijos dializuojamos per naktį 4 °C prieš saugojimo buferį. Baltymų koncentracijos įvertintos matuojant šviesos sugertį esant 280 nm bangos ilgiui spektrofotometru „ND-1000“ („NanoDrop Technologies“).

2.2.8 NDS-PAGE elektroforezė

Baltymai analizuoti NDS-PAGE elektroforezės būdu. Baltymų mėginiai paruošti baltyminių preparatų sumaišius su 4× baltymų dažu ir denatūravus 5 min kaitinant verdančiame vandenyje. Baltymai frakcionuoti 12 % NDS poliakrilamidiniame gelyje. Baltymų masei įvertinti panaudotas baltymų molekulinės masės standartas „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ („Thermo Scientific“). Elektroforezė vykdoma esant 200 V įtampai. Po elektroforezės gelis nudažytas „PageBlue™ Protein Staining Solution“ dažu pagal gamintojo („Thermo Scientific“) rekomendacijas.

2.2.9 Baltymų erdvinių struktūrų modeliavimas ir analizė

Baltymų tretinių struktūrų modeliavimui pagal pirminę struktūrą buvo naudota ColabFold sistema (Mirdita et al., 2022), vykdanči AlfaFold2 kodą. Į užklauso langą buvo įvestos HpCsx20 arba Rm378Csx20 baltymų sekos. Siekiant modeliuoti dimerines struktūras, baltymų sekos buvo įvestos du kartus, jas atskiriant dvitaškiu. Siekiant modeliavimui panaudoti informaciją iš PDB duomenų bazėje esančių homologų struktūrų, buvo pasirinktas parametras *use_templates*. Buvo sukurta po 5 kiekvieno baltymo modelių, iš kurių tolimesnei analizei buvo panaudotas 1 geriausias. Gautų HpCsx20 ir Rm378Csx20 struktūrų modelių panašumo su nustatytais struktūrų baltymais PDB duomenų bazėje buvo ieškoma panaudojant DALI serverį pateikiant modelius .pdb formatu.

2.2.10 SEC-MALS analizė

Baltymų oligomerinės būsenos tirpale analizė atlikta panaudojant MiniDAWN („Optilab“) prietaisą ir Superdex 200 Increase 10/300 GL („Cytiva“) gelfiltracijos kolonėlę. Iki analizės sistema 2-3 val. lygsvarinama SEC-MALS buferiu 0,4 ml/min greičiu. Saugojimo buferyje esantys baltyminiai mėginiai praskiesti iki 0,3-0,8 mg/ml koncentracijos SEC-MALS buferiu, mėginiai centrifuguojami 20 min., 16000 g mikrocentrifugoje. Analizei užnešama 200 µL mėginio. Mėginiai buvo išanalizuoti ir jų baltymų molekulinės masės apskaičiuotos panaudojant ASTRA programą.

2.2.11 cOA hidrolizės aktyvumo tyrimai

1-20 μM Csx20 baltymo buvo inkubuota su 10 μM cA₄/cA₆, pridėjus 0.5 U/ μl RiboLock RNazių slopiklio („Thermo Scientific“). Reakcijos vykdytos 37 °C, 25 °C, 15 °C arba 4 °C temperatūrose, „Yellow“ („Thermo Scientific“) buferiniame tirpale. Reakcijos pradedamos pridėjus fermento ir stabdomos skirtingais laiko intervalais paimant iš reakcijos mišinio 20 μl ir inkubuojant 65 °C arba 95 °C, atitinkamai HpCsx20 ir Rm378Csx20 baltymų atvejais, 15 min. Reakcijų produktai buvo analizuoti HPLC-MS metodo pagalba Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Atviros prieigos centre. Analizę atliko Audronė Rukšėnaitė.

2.2.12 *E. coli* ląstelių augimo ribojimo eksperimentas

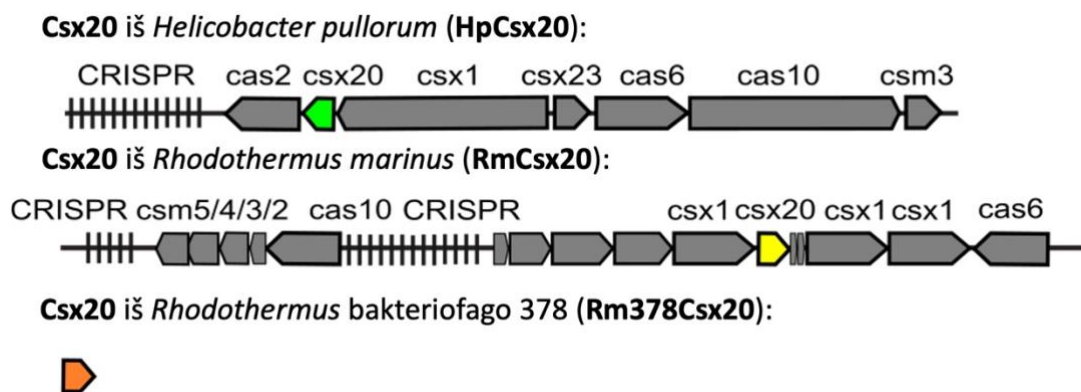
E. coli ER2566 (DE3) kamienas transformuotas pCsm (laukinio tipo arba su Csm3D33A, Cas10D16A ir/arba Cas10D575A/D576A mutacijomis; Str^R), pCRISPR (Cm^R) ir pTarget(Kn^R) plazmidėmis. Atrinkus šias plazmidės turinčius transformantus, toliau ląstelės buvo transformuotos pET tuščiu vektoriumi, pET-CARF-RelE.A, pET-CARF-RelE.B, pET-CARF-RelE.A_HpCsx20, pET-CARF-RelE.A_Rm378Csx20, pET-CARF-RelE.B_HpCsx20 arba pET-CARF-RelE.B_Rm378Csx20 plazmidėmis (Amp^R), kurios buvo sukonstruotos pagal 2.2.1 metodiką. Gauti transformantai buvo auginami skystoje LB terpėje, 4 ml tūryje, terpėje esant reikiamų antibiotikų ir 2 % D-gliukozės, 17 val, 37 °C temperatūroje, purtant 200 rpm greičiu. Toliau vykdomi 8 10-kartiniai kultūrų skiedimai LB terpėje. Kiekvieno skiedimo po 8 μl išlašinama ant kambario temperatūroje pašildytų lėkštelių su agarizuota LB terpe, kurioje yra pridėta reikiamų antibiotikų ir 0,02 mM IPTG. Lėkštelės auginamos 37 °C temperatūroje per naktį, transformantų kiekis suskaičiuojamas ir paverčiamas į CFU/ml išraišką, remiantis formule:

$$\frac{CFU}{ml} = \frac{\text{kolonijų skaičius} \times \text{skiedimo faktorius}}{\text{terpės tūris, ml}}$$

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Darbo objektas

Makarova ir bendradarbiai nuspėjo, kad necharakterizuoti Csx20 baltymai galėtų būti nauja žiedo nukleazių šeima (Makarova, Timinskas, et al., 2020). Norėdami funkciškai charakterizuoti šiuos baltymus, atlikome kompiuterinę Csx20 homologų paiešką ir analizę. Dr. Česlovas Venclovas (VU, Biotechnologijos Institutas), naudodamas PSI-BLAST įrankį, iš NCBI duomenų bazės atrinko Csx20 baltymų homologų sekas ir su CLANS įrankiu jas sugrupavo pagal tarpusavio panašumą (nepublikuoti duomenys). Buvo išskirtos 3 pagrindinės grupės, iš jų biocheminiams tyrimams pasirinkome po vieną atstovą. Darbo objektais pasirinkome du atstovus iš *Helicobacter pullorum* (HpCsx20) ir *Rhodothermus marinus* (RmCsx20) bakterijų, jų genomuose šalia Csx20 yra, atitinkamai, III-D ir III-A tipų CRISPR-Cas sistemos ir papildomi CARF efektoriai (3.1 pav.). Taip pat charakterizavimui pasirinkome Csx20 iš *Rhodothermus* bakteriofago 378 (Rm378Csx20), kuris spėjome galėtų būti virusinė žiedo nukleazė, panašiai kaip AcrIII-1 baltymas (Athukoralage, McMahon, et al., 2020), kuri virusas naudoja neutralizuodamas infekuojamos bakterijos III tipo CRISPR-Cas antivirusinę apsaugą. Šiame darbe mes siekėme išgryninti pasirinktus baltymus ir charakterizuoti jų aktyvumus *in vitro* ir *in vivo*.



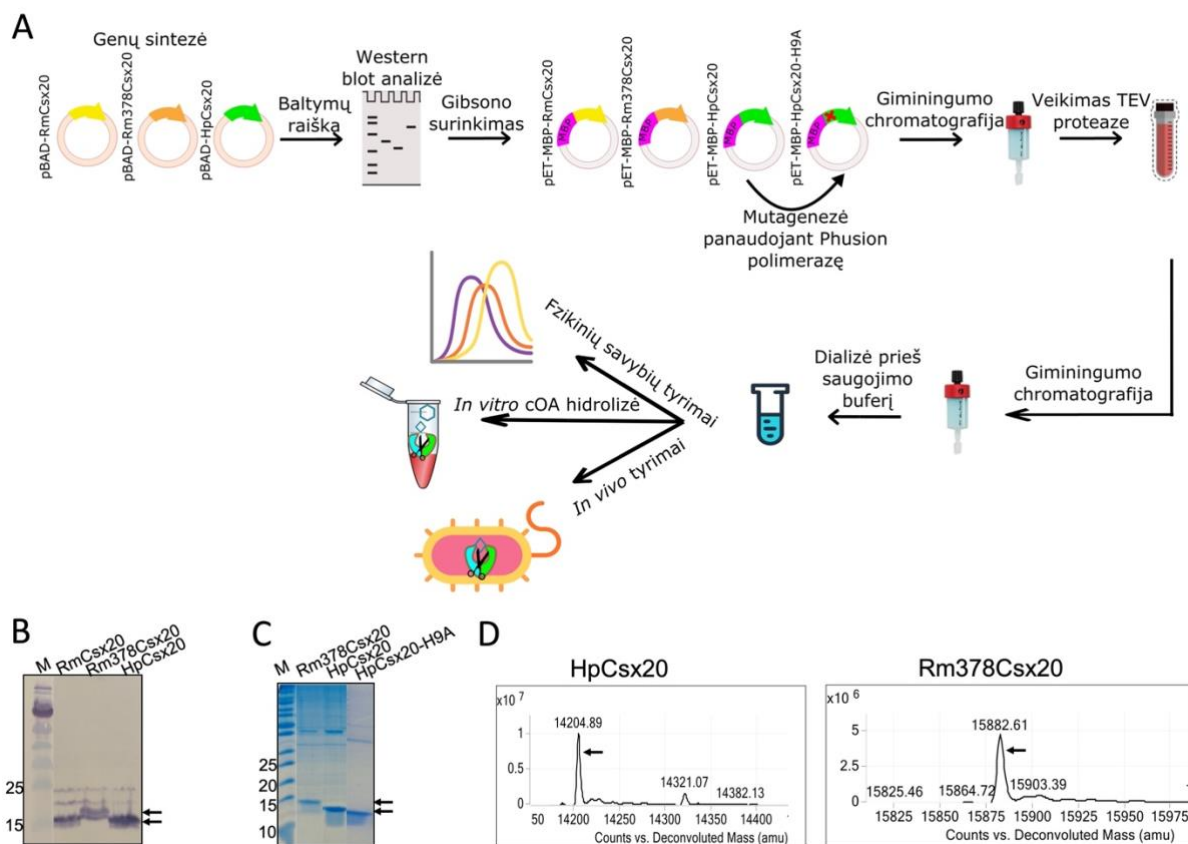
3.1 pav. Tyrimui pasirinktų Csx20 homologų genominiai kaimynai.

3.2 Baltymų raiškos vektorių konstravimas, baltymų raiška ir gryninimas

Pirmiausiai nusprendėme sukonstruoti Csx20 raiškos vektorius ir išgryninti pasirinktus tikslinius baltymus. Tuo tikslu „Twist Bioscience“ kompanijoje užsakėme susintetinti genus, koduojančius laukinio tipo (wt) RmCsx20, HpCsx20 ir Rm378Csx20 baltymų sekas. Šie genai N-galinėje dalyje turėjo prilietas TEV proteaze nukerpamas His₆-StrepII-His₆ giminingumo inkaro sekas, kurios bus skirtos baltymų gryninimui giminingumo chromatografijos metodu. Csx20 genai „Twist Bioscience“ buvo klonuoti į raiškos vektorių pBAD, kuriame tikslinio baltymo raiška yra

griežtai kontroliuojama. Sukonstruotas plazmidės panaudojome Csx20 baltymams išreikšti *E. coli* bakterijose. Naudojant StrepII sekai specifinius antikūnus jų raišką patikrinome Western-blot analizės metodu (3.2B pav.). Įsitikinus, kad visų baltymų raiška vyksta, baltymai buvo gryninti naudojant aukšto slėgio baltymų giminingumo chromatografijos metodą ir HisTrap bei StrepTrap kolonėles („GE Healthcare“). Deja, šiuo metodu mums nepavyko išgryninti pakankamų kiekių baltymų, reikalingų tolimesniems darbams.

Norėdami padidinti tikslinių baltymų išeią, toliau pasitelkėme dvi strategijas: nusprendėme (i) perkelti *csx20* genus iš pBAD raiškos vektoriaus į mažiau kontroliuojamą, bet didesne tikslino baltymo raiška pasižymintį pET raiškos vektorių, (ii) kiekvieno baltymo N-galą sulieti su maltozę surišančiu baltymu (angl. *maltose binding protein*, MBP), kuris padidina tikslino baltymo tirpumą (3.2A pav.). Šis baltymas N-gale taip pat turi prilietų 10 histidino liekanų, skirtų išgryninti baltymą. Tarp šio His₁₀-MBP inkaro bei kiekvieno tikslinio geno įterpėme TEV proteazės atpažinimo seką, kad inkaras galėtų būti pašalinamas išgryninus baltymą. Visų tiriamų Csx20 baltymų raiškos vektorius sukonstravome Gibsono DNR fragmentų surinkimo metodu 2.2.1. Sukonstruotų plazmidžių (3.1 lentelė) sekas patikrinome DNR sekoskaitos pagalba Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro DNR sekoskaitos centre.



3.2 pav. Darbo apibendrinta schema ir gryninamų baltymų identifikavimas. (A) Tyrime vykdytų darbų apibendrinta schema. (B) Baltymų raiškos Western-Blot analizės rezultatai. (C) Išgrynintų

baltymų kokybę pavaizduojantis NDS-PAGE gelis. (D) HpC_{sx20} ir Rm378C_{sx20} baltymų masių spektrai. (B) ir (C) M – baltymų molekulinės masės standartai. Šalia standartų nurodytos molekulinės masės atitinkančios juostelės, kDa. (B), (C) ir (D) rodyklėmis parodytos tikslinių baltymų juostelės (B, C) ir smailės (D).

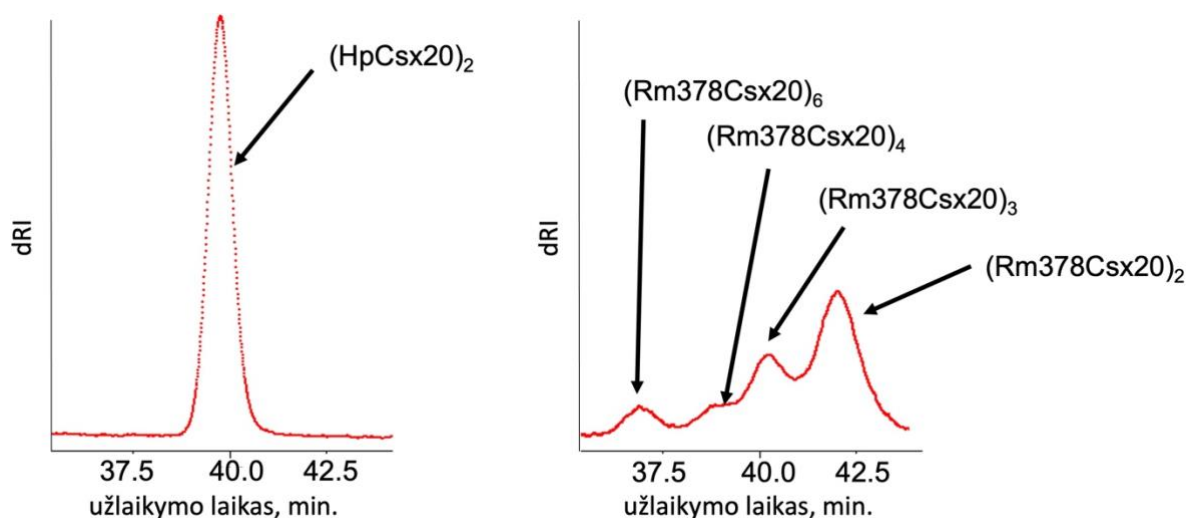
3.1 lentelė. Darbe sukonstruotos C_{sx20} baltymų raiškos plazmidės

Pradinės plazmidės	Sukonstruotos plazmidės	Baltymai
pBAD-RmC _{sx20}	pET-MBP-RmC _{sx20}	RmC _{sx20}
pBAD-HpC _{sx20}	pET-MBP-HpC _{sx20}	HpC _{sx20}
	pET-MBP-HpC _{sx20} -H9A	HpC _{sx20} -H9A
pBAD-Rm378C _{sx20}	pET-MBP-Rm378C _{sx20}	Rm378C _{sx20}

Naudojant aukšto slėgio baltymų giminingumo skysčių chromatografijos metodą ir HisTrap kolonėlę („GE Healthcare“) mums pavyko išgryninti HpC_{sx20} ir Rm378C_{sx20} baltymus. His₁₀-MBP inkarai buvo pašalinti paveikus His-TEV proteaze ir gauti preparatai išgryninti dar kartą panaudojant HisTrap kolonėlę. Prašokimo frakcijas apjungėme ir C_{sx20} preparatus dializavome prieš saugojimo buferį. Išgrynintų HpC_{sx20} ir Rm378C_{sx20} baltymų molekulinės masės buvo identifikuotos naudojant masių spektrometrijos metodą (3.2D pav.). RmC_{sx20} baltymo mums nepavyko išgryninti dėl neefektyvaus N-His₁₀-MBP inkaro hidrolizės TEV proteaze. To galima priežastis – gryninimo inkaras galimai yra įsiterpęs į baltymo globulės vidų. Baltyminių preparatų kokybę iliustruoja elektroforegramos, pateiktos 3.2C pav.

3.3 C_{sx20} oligomerinės būsenos nustatymas

Toliau siekėme nustatyti išgrynintų C_{sx20} baltymų oligomerines būsenas. Tuo tikslu atlikome baltymų SEC-MALS analizę (2.2.10). Pagal apskaičiuotas molekulinės masės nustatėme, kad wt HpC_{sx20} ir mutantinis HpC_{sx20}-H9A baltymai tirpale yra dimerai (3.3 pav., 3.2 lentelė), kaip ir Crn1 (Athukoralage et al., 2018) bei Crn2/AcrIII-1 žiedo nukleazės (Athukoralage, McMahan, et al., 2020; Samolygo et al., 2020). Rm378C_{sx20} atveju didžiausiu intensyvumu pasižymėjo smailė, kurios nustatyta molekulinė masė atitiko Rm378C_{sx20} dimerą, tačiau taip pat buvo aptiktos ir mažesnio intensyvumo smailės, kurių apskaičiuotos molekulinės masės atitiko Rm378C_{sx20} trimerą, tetramerą ir heksamerą (3.3 pav., 3.2 lentelė). Toks rezultatas leidžia manyti, kad, galbūt, įprasta C_{sx20} būsena yra dimeras, tačiau baltymas geba oligomerizuotis. Rm378C_{sx20} oligomerizacija galėtų vykti baltymui sąveikaujant su cOA substratu, panašiai kaip C_{sx3}/Crn3 nukleazės dimerai sąveikaudami su cA₄ formuoja tetramerą (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020). Norint tai patvirtinti, reikalingi papildomi baltymo ir cOA ligando sąveikos tyrimai.



3.3 pav. HpCsx20 ir Rm378Csx20 oligomerinės būsenos. SEC-MALS metodu idenifikuotų oligomerinių būsenų smailės parodytos rodyklėmis. Indeksai šalia baltymo pavadinimo nurodo oligomerinę būseną, nustatytą pagal 3.2 lentelėje pateiktas molekulinės masės.

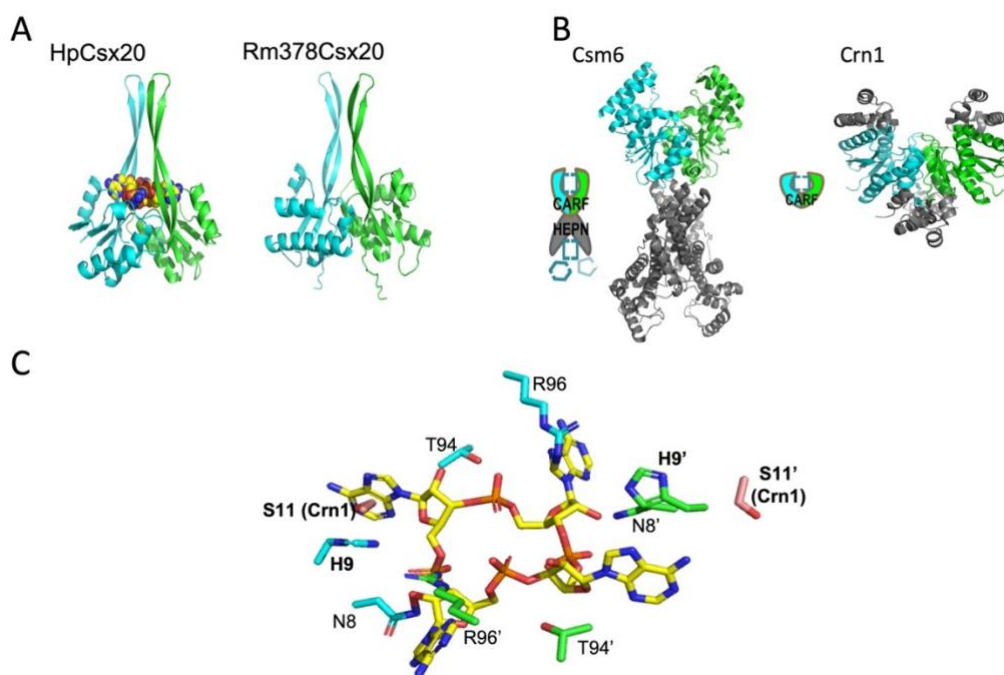
3.2 lentelė Csx20 teorinės ir eksperimentinės molekulinės masės bei nustatytos oligomerinės būsenos

Baltymai	Teorinė monomero masė, kDa	Eksperimentinė masė, kDa	(Eksp. m) / (Teor. m)	Oligomerinė būseną, n
HpCsx20	14,2	31,9	2,2	2
HpCsx20-H9A	14,1	28,6	2,0	2
Rm378Csx20	15,9	35,2	2,2	2
		43,2	2,7	3
		59,2	3,7	4
		102,2	6,4	6

3.4 Csx20 struktūriniai modeliai ir jų analizė

Norėdami patikrinti ar mūsų tiriami baltymai yra panašūs į CARF baltymus ir galėtų turėti žiedo nukleazėms būdingą aktyvų centrą, baltymų struktūras sumodeliavome panaudodami AlfaFold2 metodą (2.2.9). Atsižvelgdami į eksperimentiškai nustatytas oligomerines būsenas, HpCsx20 ir Rm378Csx20 modeliuojome kaip dimerinius baltymus. Gautus erdvinių struktūrų modelius analizavome naudodami DALI serverį (2.2.9). Modelių analizė atskleidė, kad HpCsx20 baltymas labiausiai panašus į cA₄ žiedo nukleazės aktyvumą turintį *T. thermophilus* (Tt) Csm6 efektorių (PDB 5FSH, Z-įvertis 6.1) ir cA₆ žiedo nukleazės aktyvumą turintį *Enterococcus italicus* (Ei) Csm6 efektorių (PDB 6TUG, Z-įvertis 5.7), žiedo nukleazę Crn1 iš *Sulfolobus solfataricus* (Ss) (PDB

3QYF, Z-įvertis 5.1), taip pat į Csx1 iš *Sulfolobus islandicus* (Si), kuris yra aktyvuojamas cA₄, bet nepasižymi žiedo nukleaziniu aktyvumu (PDB 6QZQ, Z-įvertis 5.5). Įdomu, kad HpCsx20 rodė patikimą panašumą ir į *Asticcacaulis sp. Cap5* (PDB 7RWK, Z-įvertis 5.3), antivirusinės bakterijų apsaugos sistemos CBASS efektorių (Fatma et al., 2021), turintį SAVED domeną, giminingą CARF domenui. Tuo tarpu Rm378Csx20 struktūrinis modelis nebuvo patikimai panašus į CARF baltymus. Stebėtas tik nedidelis panašumas į Csm6 efektorių iš *T. thermophilus* (PDB 5FSH, Z-įvertis 4.1).



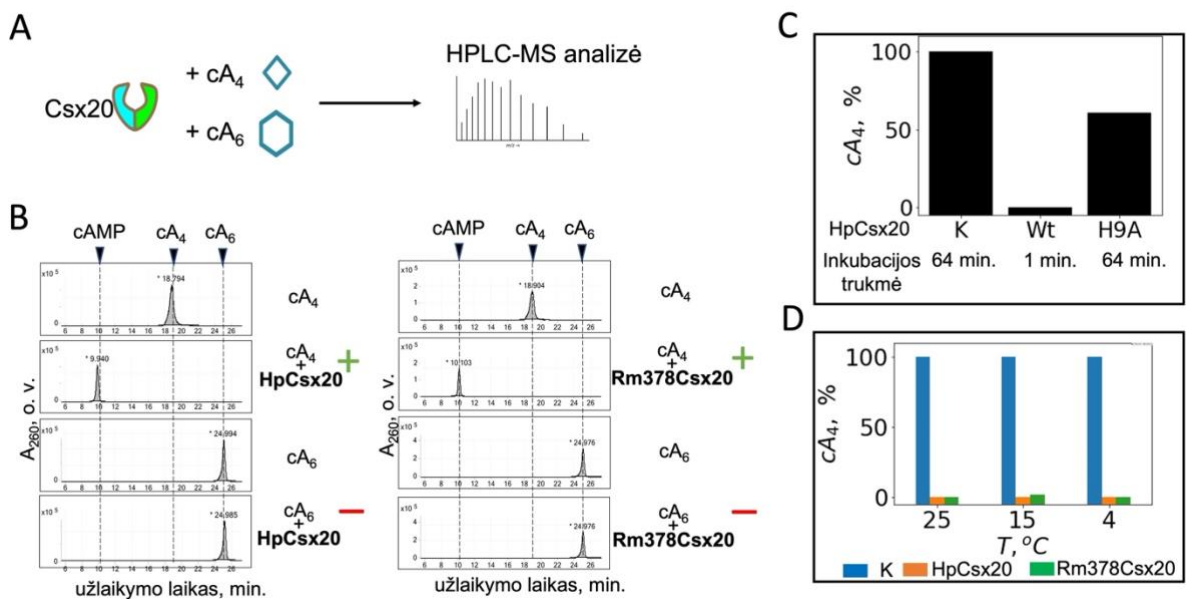
3.4 pav. HpCsx20 ir Rm378Csx20 struktūriniai modeliai. (A) HpCsx20 ir Rm378Csx20 struktūriniai modeliai sukonstruoti naudojant AlfaFold2 metodą. (B) TtCsm6 (PDB 5FSH) ir SsCrn1 (PDB 3QYF) struktūros, panašios į HpCsx20 modelį pavaizduotą (A). (C) HpCsx20 modelio, SsCrn1 ir cA₄ superpozicija. Superpozicijai buvo naudotas HpCsx20 modelis, SsCrn1 (PDB 3QYF) ir cA₄ iš SiCsx1-cA₄ (PDB 6R7B) struktūros.

Kadangi yra nustatytos SiCsx1 (PDB 6R7B) ir EiCsm6 (PDB 6TUG) kompleksų struktūros su, atitinkamai, cA₄ ir cA₆, pabandėme TtCsm6 ir EiCsm6 struktūras palyginti su HpCsx20 modeliu. Tam naudojome top3D programą. HpCsx20 modelio ir SiCsx1-cA₄ superpozicija parodė, kad cA₄ vizualiai telpa į HpCsx20 spėjamą cOA surišimo kišenę (dr. G. Tamulaitienė, nepublikuoti duomenys). Todėl galima manyti, kad cA₄ galėtų būti Csx20 baltymo substratas. Toliau panaudodami PyMOL programą, HpCsx20-cA₄ superpoziciją sugretinome su SsCrn1 (PDB 3QYF) struktūra (3.4 pav.). Gautame superpozicijos modelyje Asn8, His9, Thr94 ir Arg96 a.r. išsidėsto vandenilinės jungties atstumu iki cA₄ molekulę sudarančių fosfodiesterinių jungčių. HpCsx20 His9 šoninė grandinė modelyje išsidėsto netoli SsCrn1 Ser11 šoninės grandinės, kuris kaip buvo pasiūlyta (Athukoralage et al., 2018), katalizės metu dalyvauja ribozės 2'-OH grupės orientavime nukleofilinei atakai. *Archaeoglobus fulgidus* Crn3 buvo parodyta, kad His60 yra svarbus žiedo nukleaziniui

aktyvumui (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020). Taip pat AcrIII-1 His47 yra būtinas cA₄ hidrolizei (Athukoralage, McMahon, et al., 2020). Todėl spėjame, kad HpCsx20 aktyviame centre His9 galėtų būti nukleofilas, dalyvaujantis cA₄ fosfodiesterinės jungties hidrolizės katalizėje.

3.5 Csx20 aktyvumo tyrimas *in vitro*

Norėdami patikrinti ar mūsų tiriami baltymai geba degraduoti cOA, ištyrėme jų aktyvumą *in vitro*. Tuo tikslu HpCsx20 ir Rm378Csx20 (1 μM) inkubavome su cA₄ ir cA₆ (10 μM) junginiais ir reakcijos produktus analizavome HPLC-MS metodo pagalba (3.5A pav.). Kadangi parodėme, kad HpCsx20 yra panašus į Crn1 ir Csm6 žiedo nukleazės, kurios cOA hidrolizuoja nepriklausomai nuo metalo jonų, tad tiriamų baltymų aktyvumo reakcijas inkubavome 2 val. 37 °C temperatūroje nesant Me²⁺ jonų. Reakcijų produktus analizavome HPLC-MS metodo pagalba Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Atviros prieigos centre. Analizę atliko Audronė Rukšėnaitė. Eksperimento rezultatai pateikti 3.5B pav..



3.5 pav. Csx20 aktyvumo tyrimas *in vitro*. (A) Eksperimento schema, (B) HpCsx20 ir Rm378Csx20 cA₄ ir cA₆ hidrolizės chromatogramos. (C) HpCsx20 laukinio tipo (wt) ir H9A mutantinio baltymo aktyvumų palyginimas. (D) HpCsx20 cA₄ hidrolizės efektyvumas skirtingose temperatūrose.

HPLC-MS analizė parodė, kad HpCsx20 ir Rm378Csx20 pilnai suhidrolizuoja cA₄ iki cAMP, o cA₆ nehidrolizuoja. Tai rodo, kad Csx20 šeima veikia panašiai kaip Crn1 ir Crn2/AcrIII-1 šeimų žiedo nukleazės, kurios taip pat hidrolizuoja cA₄ nesant Me²⁺ jonų (Athukoralage et al., 2018; Athukoralage, McMahon, et al., 2020; Samolygo et al., 2020). Norėdami įrodyti, kad surastas aktyvumas priklauso tiksliniam baltymui, nusprendėme HpCsx20 His9 pakeisti alaninu. HpCsx20 mutantinį H9A baltymo raiškos vektorių sukonstravome kryptingos mutagenozės būdu. Sukonstruotos mutantinės plazmidės (3.1 lentelė) seką patikrinome Vilniaus Universiteto, Gyvybės

mokslų centro DNR sekoskaitos centre. HpCsx20-H9A išgryninome taip pat kaip laukinio tipo HpCsx20 (3.5C pav). SEC-MALS analizė patvirtino, kad HpCsx20-H9A tirpale formuoja dimerą, kaip ir laukinio tipo HpCsx20 (3.2 lentelė). Toliau HpCsx20-H9A baltymą inkubavome cA₄. Nustatėme, kad mutantinis baltymas suhidrolizavo vos 40 % cA₄ substrato, kai tuo tarpu wt baltymas per tą patį laiką pilnai (>99 %) su degradavo visą cA₄ (3.5C pav.). Skirtingai nuo wt reakcijos, H9A reakcijos mišinyje nebuvo detektuotas galutinis produktas cAMP. Šis eksperimentas parodo, kad His9 yra svarbi a.r. HpCsx20 vykdomai cA₄ hidrolizei ir mūsų surastas cA₄ hidrolazinis aktyvumas yra būdingas Csx20.

Įdomu, kad Csx20 reakcijos produktas yra cAMP (3.5B pav.). Tuo tarpu visos šiuo metu iširtos žiedo nukleazės – Crn1/Crn2/AcrIII-1/Crn3 cA₄ paverčia į galutinį produktą A₂>p. Šiose žiedo nukleazėse kiekvienas dimero CARF subvienetas turi po vieną aktyvų centrą, kuris perkerpa po vieną fosfodiesterinę jungtį susidarant linijiniam A₂>p. Csx20 atveju susidaro galutinis produktas cAMP ir jokio tarpinio produkto nestebime. Tai būtų galima paaiškinti, kad (i) jis susidaro ir reakcijos eigoje labai greitai paverčiamas į galutinį produktą; (ii) Csx20 aktyvūs centrai veikia sutartinai ir tarpinio produkto nesusidaro. cAMP susidarymui reikalingi 4 nepriklausomi aktyvūs centrai. Tai galėtų vykti, jeigu Csx20 surišęs substratą cA₄ tetramerizuojasi. Tam neprieštarauja mūsų gauti SEC-MALS eksperimento rezultatai, kurie parodė, kad nors tirpale Rm378Csx20 egzistuoja daugiausiai dimerinėje formoje, bet yra linkęs ir oligomerizuotis. Alternatyvus būdas kaip Csx20 galėtų cA₄ paversti cAMP – Csx20 katalizėje dalyvauja dar viena aktyvaus centro a.r., kuri A₂>p galėtų paversti dvejomis cAMP molekulėmis. Parodėme, kad katalizei svarbi HpCsx20 spėjamo aktyvaus centro His9. Thr94 arba Arg96, kurie HpCsx20-cA₄ modelyje yra arti fosfodiesterinės jungties, galbūt, taip pat galėtų dalyvauti katalizėje kartu su His9 (3.5C pav.). Norint išsiaiškinti detalų veikimo mechanizmą, reikalingi tolimesni Csx20 aktyvumo tyrimai.

Toliau darbe patikrinome, kaip efektyviai Csx20 hidrolizuoja cA₄. Tuo tikslu vykdėme HpCsx20 ir Rm378Csx20 hidrolizės reakcijas esant skirtingoms temperatūroms, bei reakcijas sustabdėme skirtingais laiko intervalais. Reakcijas atlikome fermento pertekliaus sąlygomis, esant 20 μM HpCsx20 arba Rm378Csx20 ir 10 μM cA₄. Reakcijų mišiniai buvo inkubuoti 25, 15 arba 4 °C temperatūrose. Reakcijas stabdėme po 1, 4, 16 ir 64 min. Abu Csx20 homologai visiškai suhidrolizavo substratą visose tirtose temperatūrose, įskaitant 4 °C, jau po 1 min. inkubacijos (3.5D pav.). Toks rezultatas rodo, kad Csx20 pasižymi greitu fermentiniu efektyvumu, panašiai kaip Crn2/AcrIII-1 (Athukoralage, McMahan, et al., 2020) ir Crn3 (Athukoralage, McQuarrie, et al., 2020) žiedo nukleazės, bei skirtingai negu Crn1, kurie yra žymiai lėtesni fermentai (Athukoralage et al., 2018). Tai galėtų rodyti, kad bakteriniai Csx20 atstovai gali suteikti apsaugą efektyviai degraduojant cA₄ aktyvatorių po to, kai bakterija apsigina nuo virusinės infekcijos. Tuo tarpu virusinis

Rm378C_{sx20} dėl savo efektyvaus veikimo, galbūt, galėtų neutralizuoti III tipo CRISPR-Cas imunitetą hidrolizuodamas didelius cA₄ kiekius ir veikti panašiai kaip AcrIII-1 žiedo nukleazės (Athukoralage, McMahon, et al., 2020).

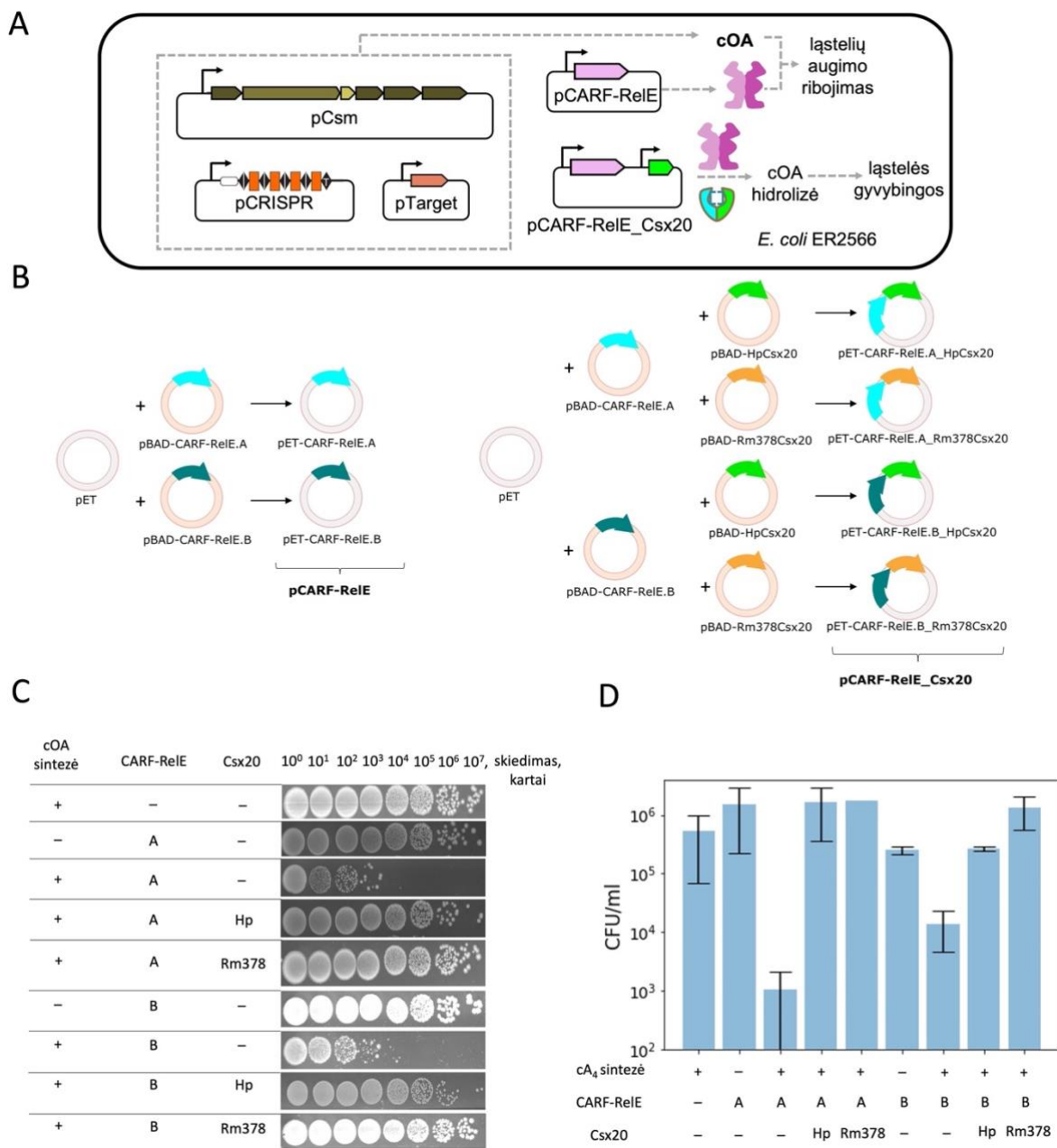
3.6 C_{sx20} aktyvumo tyrimas *in vivo*

Mūsų atlikti eksperimentai parodė, kad C_{sx20} pasižymi cA₄ nukleaziniu aktyvumu. Toliau darbe siekėme pademonstruoti, kad C_{sx20} yra veiklios žiedo nukleazės *in vivo* sąlygose. Tam panaudojome *E. coli* ląstelių augimo ribojimo metodą. Šiam eksperimentui pasitelkėme dirbtinę III-A tipo CRISPR-Cas sistemą, kurią sukonstravo Vilniaus Universiteto doktorantas Irmantas Mogila. Sistemą sudaro 4 IPTG indukuojami raiškos vektoriai: 1) pCsm vektorius, koduojantis visus Csm kompleksą sudarančius baltyminius subvienetus – Cas10, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, taip pat Cas6 ribonukleazę, reikalingą crRNR brendimui; 2) pCRISPR vektorius, koduojantis crRNR, nutaikytą atpažinti GFP transkriptą; 3) pTarget vektorius, koduojantis GFP baltymo transkriptą (ir turintis crRNR komplementarią seką); 4) pBAD_CARF-RelE vektorius, koduojantis CARF-RelE efektorius, kuris susirišęs su cA₄, hidrolizuoja ribosomose transliuojamą iRNR (Irmantas Mogila, Gintautas Tamulaitis, nepublikuoti duomenys). *E. coli* ląstelės, transformuotos šiomis 4 plazmidėmis, nustoja augti pridėjus induktoriaus, nes tuomet III tipo CRISPR-Cas sistema susintetina cA₄, kuris aktyvuoja CARF-RelE iRNR nukleazę ir ši sustabdo ląstelių augimą (Irmantas Mogila, Gintautas Tamulaitis, nepublikuoti duomenys). Nusprendėme, kad papildomai į šią sistemą įvedę *csx20* geną, galėtume pademonstruoti, kad C_{sx20} baltymai, hidrolizuodami cA₄, geba neutralizuoti III tipo CRISPR-Cas efektorius CARF-RelE toksinį poveikį *E. coli* ląstelėms (3.6A pav.).

Siekdami stebėti vien tik cOA sintezės poveikį ląstelėms, eksperimente naudojome pCsm variantą, kuris koduoja Csm kompleksą, kuriame yra išmutuoti Cas10.HD DNazinis, bei Csm3 RNazinis aktyvieji centrai. Toks Csm kompleksas turi tik Cas10 Palm domeno polimerazinį aktyvumą, tad atpažinęs RNR taikinį sintetins cOA molekules, bet nehidrolizuos RNR ir DNR (žr. 1.3).

pBAD_CARF-RelE vektorius yra valdomas tik vienu promotoriumi, o mūsų eksperimentui buvo reikalingas raiškos vektorius, kuriame vienu metu būtų galima išreikšti du skirtingus cA₄ surišančius CARF baltymus. Tuo tikslu Gibsono surinkimo metodu *csx20* ir *carf-rele* genus perklonavau į dvejais promotoriais valdomą pET-Duet raiškos vektorius (3.6B pav.). Sukonstravome 4 skirtingus raiškos vektorius, kuriuos pavadinome: pCARF-RelE.A_HpC_{sx20} ir pCARF-RelE.A_Rm378C_{sx20}, pCARF-RelE.B_HpC_{sx20} ir pCARF-RelE.B_Rm378C_{sx20}, koduojančius skirtingas iRNR nukleazes ir skirtingus C_{sx20}. Taip pat sukonstravome plazmidės pCARF-RelE.A

ir pCARF-RelE.B, kurias naudosime tik iRNR nukleazės raiškai. Apibendrinta plazmidžių konstravimo schema pateikta 3.6B pav.



3.6 pav. Csx20 aktyvumo tyrimas *in vivo*. (A) Eksperimento principinė schema, (B) pCARF-RelE ir pCARF-RelE_Csx20 raiškos plazmidžių konstravimo schema. (C) *E. coli* augimo ribojimo eksperimento rezultatai. (D) Sutartinis kolonijų susidarymo skaičius (angl. *colony forming units*, CFU) *E. coli* ląstelėse, kuriose išreiškiamas Csm kompleksas, CARF-RelE ir Csx20. CFU buvo apskaičiuota, kaip aprašyta (Medžiagos ir metodai 2.2.12). Paklaidų juostos (angl. *error bars*) rodo standartinę nuokrypį tarp 3 pakartojimų.

E. coli ER2566 (DE3) kamieną transformavome pCsm, pCRISPR ir pTarget plazmidėmis. Atrinkę šias plazmidės turinčius transformantus, toliau ląsteles transformavome skirtingais pCARF-RelE arba pCARF-RelE_Csx20 plazmidžių variantais (3.6B pav.). Kontroliniame eksperimente vietoje pCARF-RelE ir pCARF-RelE_Csx20 naudojome pET-Duet vektorių (nekoduojantį nei vieno

iš baltymų). Taip pat norėdami įsitikinti, jog ląstelės gyvybingumas yra susijęs su Csm komplekso cOA signaliniu keliu, transformacijai naudojome 2 skirtingus pCsm variantus: (i) pCsm-Cas10.Palm-wt, koduojantį Cas10, gebantį sintetinti cOA, bei (ii) pCsm-Cas10.Palm-mut, Cas10 cOA sintazės aktyvaus centro mutantą, kuris nesintetina cOA. Gautus transformantus pasidauginome, praskiedėme $1-10^7$ kartų ir skirtingus ląstelių skiedimus išsėjome ant agarizuotos terpės su reikiamais antibiotikais ir IPTG induktoriui (3.6C pav.). Ląstelių gyvybingumą įvertinome suskaičiuodami kiek užaugo transformantų (3.6D pav.).

Ląstelių, kuriose išreiškiamas Csm kompleksas kartu su CARF-RelE.A ar CARF-Rel.B, transformacijos efektyvumas buvo atitinkamai 1000 ir 100 kartų žemesnis, lyginat su kontrolinėmis ląstelėmis, kuriose buvo vien tik išreiškiamas Csm kompleksas. Tai rodo, kad CARF-RelE raiška yra toksiška *E. coli* ląstelėms. Terpėje esant IPTG induktoriaus, vyksta visų 4 plazmidžių genų raiška, ląstelėje susirinkę Csm kompleksai sintetina cA₄ ir aktyvuoja CARF-RelE efektorių, kuris degraduoja ląstelėje transliuojamą rNR. Ląstelės, kuriose išreiškiamas mutantinis Csm kompleksas, negebantis sintetinti cA₄, pasižymėjo transformacijos efektyvumu tokiu pačiu kaip kontrolinės ląstelės (nėra nei CARF-RelE, nei HpCsx20). Tai rodo, kad ląstelių transformacijos sumažėjimas Csm ir CARF-RelE raiškos atveju yra susijęs su cA₄ raiška.

Tuo tarpu, ląstelių, kuriose išreiškiamas Csm kompleksas kartu su vienu iš CARF-RelE ir HpCsx20 arba Rm378Csx20, transformacijos efektyvumas buvo lygus kontrolinėmis ląstelėmis, kuriose buvo išreiškiamas vien tik Csm kompleksas. Tai rodo, kad papildoma tiek HpCsx20, tiek ir Rm378Csx20 baltymų raiška pilnai atstato ląstelių gyvybingumą, sumažėjusį dėl Csm ir CARF-RelE aktyvumų. Šiuo atveju *E. coli* ląstelėse Csx20 žiedo nukleazės sudegraduoja cA₄ molekules, tokiu būdu užkirsdomos kelią CARF-RelE aktyvacijai bei ląstelių augimo ribojimui.

Taigi šie rezultatai paremia *in vitro* mūsų surastą Csx20 cA₄ nukleazinį aktyvumą, bei patvirtina, kad Csx20 yra nauja žiedo nukleazių šeima.

IŠVADOS

1. HpCsx20 tirpale yra dimeras. Rm378Csx20 tirpale formuoja dimerą, bet baltymas yra linkęs sudaryti ir aukštesnes oligomerines formas (trimerą, tetramerą bei heksamerą).
2. HpCsx20 ir Rm378Csx20 yra cA₄-specifinės nuo metalo jonų nepriklausomos žiedo nukleazės, hidrolizuojančios cA₄ iki cAMP.
3. HpCsx20 ir Rm378Csx20 cA₄ hidrolizuoja efektyviai, kaip AcrIII-1/Crn2 bei Csx3/Crn3 šeimos baltymai, ir greičiau nei charakterizuotos Crn1 žiedo nukleazės.
4. HpCsx20 spėjamo aktyvaus centro His9 pakeitimas alaninu stipriai sumažina fermentinį aktyvumą.
5. HpCsx20 ir Rm378Csx20 panaikina *S. thermophilus* III-A tipo CRISPR-Cas sistemos cA₄ efektoriaus sukeltą *E. coli* bakterijų augimo ribojimą.

SANTRAUKA

Danas Klimavičius

Su III tipo CRISPR-Cas sistemomis susijusios spėjamos žiedo nukleazės tyrimas

III tipo CRISPR-Cas prokariotų apsaugos sistemose Csm arba Cmr ribonukleoproteino kompleksas viruso transkripcijos metu atpažįsta svetimą RNR ir ją hidrolizuoja. Hidrolizuojamas ir šalia esantis DNR taikiny. Tai suteikia bakterijoms ir archėjoms apsaugą nuo virusų ir kitų invazinių nukleorūgščių. Taip pat Csm(Cmr) atpažindamas taikinį iš ATP sintetina 3-6 AMP dydžio ciklinius oligoadenilatus (cOA). cA₄ arba cA₆ alosteriškai aktyvuoja įvairius pagalbinius sistemos baltymus, turinčius CARF domeną. Kai cOA ligandas prisijungia prie sensoriaus – CARF domeno, yra įjungiamas kito domeno – efektoriaus aktyvumas. Efektorių būna įvairių: nespecifinės ribonukleazės, deoksiribonukleazės, deaminazės, transkripcijos faktoriai ir kt. Šie pagalbiniai efektoriai kartu su Csm ar Cmr kompleksu efektyviai apsaugo nuo virusinės infekcijos, tačiau jie taip pat gali būti toksiški ląstelei ir lemti ląstelės altruistinę žūtį. Norint to išvengti, pasibaigus infekcijai reikia pašalinti ląstelėje susikaupusius cOA. Šią funkciją atlieka cOA degraduojantys fermentai – žiedo nukleazės (Crn). Skirtingos Crn hidrolizuoja specifiškai cA₄ arba cA₆. Šiuo metu yra charakterizuotos kelios Crn šeimos, besiskiriančios baltymo sankloda, katalizės mechanizmu ir efektyvumu. Įvairiuose mikroorganizmuose šalia III tipo CRISPR-Cas sistemų randami baltymai, kurie, spėjama, galėtų būti žiedo nukleazės.

Šio darbo tikslas yra ištirti vienos spėjamos žiedo nukleazių šeimos – Csx20 aktyvumą *in vitro* ir *in vivo*. Darbo metu nustatėme, kad bakterinis Csx20 baltymas, kaip ir daugelis kitų žiedo nukleazių, tirpale yra dimeras, o virusinis Csx20 nors daugiausia formuoja dimerus, bet egzistuoja ir trimerinėje, tetramerinėje bei heksamerinėje formose. Abu Csx20 atstovai vykdo nuo metalo jonų nepriklausomą cA₄ hidrolizę iki cAMP. Taip pat parodėme, kad lyginant su Crn1 žiedo nukleazėmis, Csx20 yra greiti fermentai. Sukonstravę spėjamo bakterijos Csx20 aktyvaus centro mutantą parodėme, kad His9 pakeitimas alaninu stipriai sumažina fermentinį aktyvumą. Galiausiai pademonstravome, kad abu Csx20 atstovai panaikina *S. thermophilus* III-A tipo CRISPR-Cas sistemos cA₄ efektoriaus sukeltą *E. coli* bakterijų augimo ribojimą. Visi šie rezultatai įrodo, kad Csx20 šeimos baltymai yra žiedo nukleazės.

SUMMARY

Danas Klimavičius

Investigation of Type III CRISPR-associated Hypothetical Ring Nuclease

Type III CRISPR-Cas systems employ Csm or Cmr ribonucleoprotein complexes to cleave foreign RNA and DNA target to confer immunity against viruses and other nucleic acids. By recognizing target RNA Csm/Cmr also synthesizes 3-6 nt cyclic oligoadenylates (cOA) from ATP. Either cA₄ or cA₆ allosterically activates CARF domain-containing accessory proteins. cOA ligand binding to a CARF sensor results in activation of various effector domains that can possess non-specific ribonuclease, deoxyribonuclease, deaminase and other enzymatic activities. These ancillary effectors together with Csm/Cmr provide immunity to its host, however they can also be toxic to a cell and result in altruistic suicide unless extant cOA's are removed after infection is over. Recently characterized enzymes called ring nucleases degrade cA₄ or cA₆. At this point several families of ring nucleases that differ in protein fold, reaction mechanism and efficiency are characterized. Some uncharacterized CRISPR-associated genes are also hypothesized to possess ring nuclease activity.

The aim of this work was to examine an activity of hypothetical ring nuclease Csx20 *in vitro* and *in vivo*. We discovered that similarly to other ring nucleases bacterial Csx20 exists in a dimeric state in solution. Although present as a dimer, Csx20 homologue from a virus is found also in trimeric, tetrameric, and hexameric states. We showed that Csx20 catalyze metal-independent hydrolysis of cA₄ producing cAMP. We also determined that Csx20 are efficient enzymes compared to Crn1 ring nucleases. By changing hypothetical active site residue His9 to alanine the observed activity was significantly reduced. Lastly, we demonstrate that both of our tested Csx20 abolish growth restriction of *E. coli* caused by type III CRISPR cA₄-effector. Together these results show that proteins of Csx20 family are ring nucleases.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti prof. Dr. Virginijui Šikšniui už įkvėpimą ir galimybę dirbti jo vadovaujamame skyriuje.

Ačiū Daliai Smalakytei ir Irmantui Mogilai už patarimus ir pagalbą laboratorijoje greitai įsisavinti įvairius darbo metodus.

Ačiū visam VU GMC BNSTS kolektyvui už jaukią ir mokslui palankią skyriaus atmosferą.

Labiausiai esu dėkingas savo vadovui dr. Gintautui Tamulaičiui pirmiausia už tai, kad jo dėka turiu galimybę dirbti prie labai įdomių tyrimų, įprasminančių šešis metus vykusį studijų procesą. Taip pat ačiū už tikėjimą, kantrybę bei visokeriopą pagalbą visuose su moksliniais tyrimais ir rašymu susijusiuose darbuose.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Ahator, S. D., Jianhe, W., & Zhang, L. (2020). The ECF sigma factor PvdS regulates the type I-F CRISPR-Cas system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Preprint at bioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.01.31.929752>
2. Athukoralage, J. S., Graham, S., Grüşchow, S., Rouillon, C., & White, M. F. (2019). A Type III CRISPR Ancillary Ribonuclease Degrades Its Cyclic Oligoadenylate Activator. *Journal of Molecular Biology*, *431*(15), 2894–2899. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.041>
3. Athukoralage, J. S., Graham, S., Rouillon, C., Grüşchow, S., Czekster, C. M., & White, M. F. (2020). The dynamic interplay of host and viral enzymes in type iii crispr-mediated cyclic nucleotide signalling. *eLife*, *9*, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.55852>
4. Athukoralage, J. S., McMahon, S. A., Zhang, C., Grüşchow, S., Graham, S., Krupovic, M., Whitaker, R. J., Gloster, T. M., & White, M. F. (2020). An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity. *Nature*, *577*(7791), 572–575. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1909-5>
5. Athukoralage, J. S., McQuarrie, S., Grüşchow, S., Graham, S., Gloster, T. M., & White, M. F. (2020). Tetramerisation of the crispr ring nuclease crn3/csx3 facilitates cyclic oligoadenylate cleavage. *eLife*, *9*, 1–33. <https://doi.org/10.7554/eLife.57627>
6. Athukoralage, J. S., Rouillon, C., Graham, S., Grüşchow, S., & White, M. F. (2018). Ring nucleases deactivate type III CRISPR ribonucleases by degrading cyclic oligoadenylate. *Nature*, *562*(7726), 277–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0557-5>
7. Athukoralage, J. S., & White, M. F. (2021). Cyclic oligoadenylate signaling and regulation by ring nucleases during type III CRISPR defense. *Rna*, *27*(8), 855–867. <https://doi.org/10.1261/rna.078739.121>
8. Bondy-Denomy, J., Davidson, A. R., Doudna, J. A., Fineran, P. C., Maxwell, K. L., Moineau, S., Peng, X., Sontheimer, E. J., & Wiedenheft, B. (2018). A unified resource for tracking anti-CRISPR names. *The CRISPR Journal*, *1*(5), 304–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
9. Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage Genomics: Small is beautiful. *Cell*, *108*(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00637-7)
10. Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
11. Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kacen, A., Doron, S., Amitai, G., & Sorek, R. (2019). Cyclic GMP–AMP signalling protects bacteria against viral infection. *Nature*, *574*(7780), 691–695. <https://doi.org/10.1038/s41586-019->

12. Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G., & Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), 0–12. <https://doi.org/10.1126/science.aar4120>
13. Elmore, J. R., Sheppard, N. F., Ramia, N., Deighan, T., Li, H., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2016). Bipartite recognition of target RNAs activates DNA cleavage by the Type III-B CRISPR–Cas system. *Genes and Development*, 30(4), 447–459. <https://doi.org/10.1101/gad.272153.115>
14. Estrella, M., Kuo, F., & Bailey, S. (2016). RNA-activated DNA cleavage by the Type III-B CRISPR–Cas effector complex. *GENES & DEVELOPMENT*, 30, 460–470. <https://doi.org/10.1101/gad.273722.115.460>
15. Fatma, S., Chakravarti, A., Zeng, X., & Huang, R. H. (2021). Molecular mechanisms of the CdnG–Cap5 antiphage defense system employing 3',2'-cGAMP as the second messenger. *Nature Communications*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26738-2>
16. Foster, K., Grüşchow, S., Bailey, S., White, M. F., & Terns, M. P. (2020). Regulation of the RNA and DNA nuclease activities required for *Pyrococcus furiosus* Type III-B CRISPR–Cas immunity. *Nucleic acids research*, 48(8), 4418–4434. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa176>
17. Gao, L., Altae-Tran, H., Böhning, F., Makarova, K. S., Segel, M., Schmid-Burgk, J. L., Koob, J., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2020). Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science*, 369(6507), 1077–1084. <https://doi.org/10.1126/science.aba0372>
18. Garcia-Doval, C., Schwede, F., Berk, C., Rostøl, J. T., Niewoehner, O., Tejero, O., Hall, J., Marraffini, L. A., & Jinek, M. (2020). Activation and self-inactivation mechanisms of the cyclic oligoadenylate-dependent CRISPR ribonuclease Csm6. *Nature Communications*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15334-5>
19. Grüşchow, S., Athukoralage, J. S., Graham, S., Hoogeboom, T., & White, M. F. (2019). Cyclic oligoadenylate signalling mediates *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR defence. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9259–9270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz676>
20. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., & Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
21. Han, W., Stella, S., Zhang, Y., Guo, T., Sulek, K., Peng-Lundgren, L., Montoya, G., & She, Q. (2018). A Type III-B Cmr effector complex catalyzes the synthesis of cyclic oligoadenylate second messengers by cooperative substrate binding. *Nucleic Acids*

- Research*, 46(19), 10319–10330. <https://doi.org/10.1093/nar/gky844>
22. He, F., Vestergaard, G., Peng, W., She, Q., & Peng, X. (2017). CRISPR-Cas type I-A Cascade complex couples viral infection surveillance to host transcriptional regulation in the dependence of Csa3b. *Nucleic acids research*, 45(4), 1902–1913. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1265>
23. Jia, N., Jones, R., Yang, G., Ouerfelli, O., & Patel, D. J. (2019). CRISPR-Cas III-A Csm6 CARF Domain Is a Ring Nuclease Triggering Stepwise cA4 Cleavage with ApA^{>p} Formation Terminating RNase Activity. *Molecular Cell*, 75(5), 944–956.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.014>
24. Kazlauskienė, M., Kostiuk, G., Venclovas, Č., Tamulaitis, G., & Siksnys, V. (2017). A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science*, 357(6351), 605–609. <https://doi.org/10.1126/science.aao100>
25. Kazlauskienė, M., Tamulaitis, G., Kostiuk, G., Venclovas, Č., & Siksnys, V. (2016). Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with the Target RNA Recognition. *Molecular Cell*, 62(2), 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.024>
26. Keen, E. C. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays*, 37(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
27. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
28. Lin, P., Pu, Q., Wu, Q., Zhou, C., Wang, B., Schettler, J., Wang, Z., Qin, S., Gao, P., Li, R., Li, G., Cheng, Z., Lan, L., Jiang, J., & Wu, M. (2019). High-throughput screen reveals sRNAs regulating crRNA biogenesis by targeting CRISPR leader to repress Rho termination. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11695-8>
29. Liu, T., Liu, Z., Ye, Q., Pan, S., Wang, X., Li, Y., Peng, W., Liang, Y., She, Q., & Peng, N. (2017). Coupling transcriptional activation of CRISPR-Cas system and DNA repair genes by Csa3a in *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Research*, 45(15), 8978–8992. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx612>
30. Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology*, 7, 371–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>
31. Mahony, J., McGrath, S., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2008). Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6206–6215. <https://doi.org/10.1128/AEM.01053-08>

32. Makarova, K. S., Timinskas, A., Wolf, Y. I., Gussow, A. B., Siksnyš, V., Venclovas, Č., & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary and functional classification of the CARF domain superfamily, key sensors in prokaryotic antiviral defense. *Nucleic Acids Research*, *48*(16), 8828–8847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa635>
33. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
34. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., & Koonin, E. V. (2011). Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. *Journal of Bacteriology*, *193*(21), 6039–6056. <https://doi.org/10.1128/JB.05535-11>
35. McMahon, S. A., Zhu, W., Graham, S., Rambo, R., White, M. F., & Gloster, T. M. (2020). Structure and mechanism of a Type III CRISPR defence DNA nuclease activated by cyclic oligoadenylate. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14222-x>
36. Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Gallego-Hernández, A. L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*, *193*(10), 2396–2407. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-10>
37. Millman, A., Melamed, S., Leavitt, A., Doron, S., Bernheim, A., Hör, J., Lopatina, A., Ofir, G., Hochhauser, D., Stokar-avihail, A., Tal, N., Sharir, S., Voichek, M., Erez, Z., Ferrer, J. L. M., Dar, D., Kacen, A., Amitai, G., & Sorek, R. (2022). An expanding arsenal of immune systems that protect bacteria from phages. *Preprint at bioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2022.05.11.491447>
38. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold - Making protein folding accessible to all. *bioRxiv*, 2021.08.15.456425. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v3%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v3.abstract>
39. Molina, R., Stella, S., Feng, M., Sofos, N., Jauniskis, V., Pozdnyakova, I., López-Méndez, B., She, Q., & Montoya, G. (2019). Structure of Csx1-cOA4 complex reveals the basis of RNA decay in Type III-B CRISPR-Cas. *Nature Communications*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12244-z>

40. Nasef, M., Muffly, M. C., Beckman, A. B., Rowe, S. J., Walker, F. C., Hatoum-Aslan, A., & Dunkle, J. A. (2019). Regulation of cyclic oligoadenylate synthesis by the *Staphylococcus epidermidis* Cas10-Csm complex. *Rna*, *25*(8), 948–962.
<https://doi.org/10.1261/rna.070417.119>
41. Nemudraia, A., Nemudryi, A., Buyukyoruk, M., Scherffius, A., Zahl, T., Wiegand, T., Pandey, S., Nichols, J., Hall, L., McVey, A., Lee, H., Wilkinson, R., Snyder, L., Jones, J., Koutmou, K., Santiago-Frangos, A., & Wiedenheft, B. (2022). Sequence-specific capture and concentration of viral RNA by type III CRISPR system enhances diagnostic. *Research square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1466718/v1>
42. Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., Bigler, L., Hall, J., Marraffini, L. A., & Jinek, M. (2017). Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*, *548*(7669), 543–548.
<https://doi.org/10.1038/nature23467>
43. Ofir, G., & Sorek, R. (2018). Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell*, *172*(6), 1260–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045>
44. Ogura, T., & Wilkinson, A. J. (2001). *AAA 1 superfamily ATPases : common structure ± diverse function*. 575–597.
45. Patterson, A. G., Chang, J. T., Taylor, C., & Fineran, P. C. (2015). Regulation of the type I-F CRISPR-Cas system by CRP-cAMP and GalM controls spacer acquisition and interference. *Nucleic Acids Research*, *43*(12), 6038–6048.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv517>
46. Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases - A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, *42*(12), 7489–7527.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku447>
47. Rostøl, J. T., & Marraffini, L. A. (2019). Non-specific degradation of transcripts promotes plasmid clearance during type III-A CRISPR–Cas immunity. *Nature Microbiology*, *4*(4), 656–662. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0353-x>
48. Rostøl, J. T., Xie, W., Kuryavyi, V., Maguin, P., Kao, K., Fromm, R., Patel, D. J., & Marraffini, L. A. (2021). The Card1 nuclease provides defence during type III CRISPR immunity. *Nature*, *590*(7847), 624–629. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03206-x>
49. Rouillon, C., Athukoralage, J. S., Graham, S., Grüşchow, S., & White, M. F. (2018). Control of cyclic oligoadenylate synthesis in a type III CRISPR system. *eLife*, *7*, 1–22.
<https://doi.org/10.7554/eLife.36734>
50. Samolygo, A., Athukoralage, J. S., Graham, S., & White, M. F. (2020). Fuse to defuse: A self-limiting ribonuclease-ring nuclease fusion for type III CRISPR defence. *Nucleic Acids*

- Research*, 48(11), 6149–6156. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA298>
51. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
52. Sedlyarova, N., Shamovsky, I., Bharati, B. K., Epshtein, V., Chen, J., Gottesman, S., Schroeder, R., & Nudler, E. (2016). sRNA-Mediated Control of Transcription Termination in *E. coli*. *Cell*, 167(1), 111–121.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.004>
53. Shah, S. A., Alkhnbashi, O. S., Behler, J., Han, W., She, Q., Hess, W. R., Garrett, R. A., & Backofen, R. (2019). Comprehensive search for accessory proteins encoded with archaeal and bacterial type III CRISPR-cas gene cassettes reveals 39 new cas gene families. *RNA Biology*, 16(4), 530–542. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1483685>
54. Shah, S. A., Erdmann, S., Mojica, F. J. M., & Garrett, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5), 891–899. <https://doi.org/10.4161/rna.23764>
55. Shivram, H., Cress, B. F., Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2021). Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature Chemical Biology*, 17(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00700-7>
56. Smalakyte, D., Kazlauskienė, M., Havelund, J. F., Rukšenaite, A., Rimaite, A., Tamulaitienė, G., Færgeman, N. J., Tamulaitis, G., & Siksnys, V. (2020). Type III-A CRISPR-associated protein Csm6 degrades cyclic hexa-adenylate activator using both CARF and HEPN domains. *Nucleic Acids Research*, 48(16), 9204–9217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa634>
57. Staals, R. H. J., Agari, Y., Maki-Yonekura, S., Zhu, Y., Taylor, D. W., vanDuijn, E., Barendregt, A., Vlot, M., Koehorst, J. J., Sakamoto, K., Masuda, A., Dohmae, N., Schaap, P. J., Doudna, J. A., Heck, A. J. R., Yonekura, K., Van der Oost, J., & Shinkai, A. (2013). Structure and Activity of the RNA-Targeting Type III-B CRISPR-Cas Complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell*, 52(1), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.013>
58. Steens, J. A., Zhu, Y., Taylor, D. W., Bravo, J. P. K., Prinsen, S. H. P., Schoen, C. D., Keijser, B. J. F., Ossendrijver, M., Hofstra, L. M., Brouns, S. J. J., Shinkai, A., van der Oost, J., & Staals, R. H. J. (2021). SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25337-5>
59. Tamulaitis, G., Kazlauskienė, M., Manakova, E., Venclovas, Č., Nwokeoji, A. O., Dickman, M. J., Horvath, P., & Siksnys, V. (2014). Programmable RNA Shredding by the Type III-A CRISPR-Cas System of *Streptococcus thermophilus*. *Molecular Cell*, 56(4), 506–517.

- <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.027>
60. Tamulaitis, G., Venclovas, Č., & Siksnys, V. (2017). Type III CRISPR-Cas Immunity: Major Differences Brushed Aside. *Trends in Microbiology*, 25(1), 49–61.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.012>
61. Topuzlu, E., & Lawrence, C. M. (2016). Recognition of a pseudo-symmetric RNA tetranucleotide by Csx3, a new member of the CRISPR associated Rossmann fold superfamily. *RNA Biology*, 13(2), 254–257.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1130209>
62. Vale, P. F., Lafforgue, G., Gatchitch, F., Gardan, R., Moineau, S., & Gandon, S. (2015). Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1812). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1270>
63. Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
64. Westra, E. R., Pul, Ü., Heidrich, N., Jore, M. M., Lundgren, M., Stratmann, T., Wurm, R., Raine, A., Mescher, M., Van Heereveld, L., Mastop, M., Wagner, E. G. H., Schnetz, K., Van Der Oost, J., Wagner, R., & Brouns, S. J. J. (2010). H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1380–1393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07315.x>
65. Wright, A., Nunez, J., & Doudna, J. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164, 29–44.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>
66. Yan, X., Guo, W., & Yuan, Y. A. (2015). Crystal structures of CRISPR-associated Csx3 reveal a manganese-dependent deadenylation exoribonuclease. *RNA Biology*, 12(7), 749–760. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1051300>
67. Zhao, R., Yang, Y., Zheng, F., Zeng, Z., Feng, W., Jin, X., Wang, J., Yang, K., Liang, Y. X., She, Q., & Han, W. (2020). A Membrane-Associated DHH-DHHA1 Nuclease Degrades Type III CRISPR Second Messenger. *Cell Reports*, 32(11), 108133.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108133>
68. Zhu, W., McQuarrie, S., Grüşchow, S., McMahon, S. A., Graham, S., Gloster, T. M., & White, M. F. (2021). The CRISPR ancillary effector Can2 is a dual-specificity nuclease potentiating type III CRISPR defence. *Nucleic Acids Research*, 49(5), 2777–2789.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab073>
69. Zink, I. A., Wimmer, E., & Schleper, C. (2020). Heavily armed ancestors: CRISPR immunity and applications in archaea with a comparative analysis of CRISPR types in

sulfolobales. *Biomolecules*, 10(11), 1–41. <https://doi.org/10.3390/biom10111523>