

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**Giedrius Gasiūnas**

**DNR interferencijos mechanizmas II tipo CRISPR/Cas  
sistemose**

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

**Vilnius, 2012**

Disertacija rengta 2007-2011 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

### **Mokslinis vadovas**

Prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

### **Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:**

#### **Pirmininkas**

Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

#### **Nariai**

Prof. habil. dr. **Arvydas Janulaitis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Mark D. Szczelkun** (Bristolio universitetas, Jungtinė Karalystė, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Vilmantė Borutaitė** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

dr. **Aurelija Žvirblienė** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

#### **Oponentai**

Prof. dr. **Edita Sužiedalienė** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Rimantas Daugelavičius** (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties posėdyje 2012 m. gruodžio 7 d. 10 val. Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto konferencijų salėje.  
Adresas: Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2012 m. lapkričio 6 d.  
Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto ir Vilniaus universiteto bibliotekose.

**VILNIUS UNIVERSITY**

**Giedrius Gasiūnas**

**Mechanism of DNA interference by Type II CRISPR/Cas  
systems**

Summary of doctoral dissertation  
Physical science, biochemistry (04 P)

**Vilnius, 2012**

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2007-2011.

### **Supervisor**

Prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

### **Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend**

#### **Chairman**

Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

#### **Reviewers**

Prof. habil. dr. **Arvydas Janulaitis** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Mark D. Szczelkun** (Bristol University, UK, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Vilmantė Borutaitė** (Lithuanian University of Health Sciences, physical sciences, biochemistry - 04 P)

dr. **Aurelija Žvirblienė** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

#### **Opponents**

Prof. dr. **Edita Sužiedelienė** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Rimantas Daugelavičius** (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

The thesis defence will take place at the Institute of Biotechnology, Vilnius University (Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania) on 7<sup>th</sup> of December, 2012, at 10 a.m.

The summary of doctoral dissertation was sent on 6<sup>th</sup> of November, 2012.

The thesis is available at the Library of Institute of Biotechnology and at the Library of Vilnius University.

# TURINYS

<b>ĮVADAS</b> .....	<b>7</b>
<b>TYRIMŲ METODIKA</b> .....	<b>9</b>
<b>REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	<b>15</b>
<b>1. <i>S. thermophilus</i> bakterijų CRISPR/Cas sistemos</b> .....	<b>15</b>
<b>2. CRISPR3/Cas sistemos tyrimai <i>E. coli</i></b> .....	<b>16</b>
2.1. CRISPR3/Cas sistemos klonavimas į <i>E. coli</i> bakterijas .....	16
2.2. CRISPR3/Cas sistema riboja <i>E. coli</i> transformaciją plazmidėmis .....	16
2.3. CRISPR3/Cas sistema riboja λ bakteriofago infekciją.....	18
2.4. Pro-skirtuko mutacinė analizė .....	18
2.5. PAM seka svarbi transformacijos plazmidėmis ribojimo užtikrinimui.....	19
2.6. Vienintelis <i>cas9</i> genas būtinas transformacijos plazmidėmis ribojimo užtikrinimui .....	19
2.7. <i>cas9</i> geno mutacinė analizė .....	20
2.8. Cas baltymų vaidmuo CRISPR3/Cas sistemos koduojamame apsaugos mechanizme .....	21
2.9. “Skiepai” bakterijoms prieš virusus ir plazmidės.....	21
<b>3. II Tipo CRISPR/Cas sistemų efektorinis kompleksas</b> .....	<b>22</b>
3.1. Cas9-crRNR komplekso gryninimas ir sudėties analizė .....	22
3.2. Cas9-crRNR kompleksas kerpa dvigrandinę DNR pro-skirtuko sekoje	25
3.3. Cas9-crRNR komplekso taikinio pasirinkimą nulemia crRNR .....	26
3.4. PAM seka yra būtina DNR taikinių surišimui ir perkirpimui .....	29
3.5. Cas9 baltymo RuvC ir HNH motyvų mutagenezė .....	31
3.6. Cas9-crRNR kompleksas kerpa taikinius dvigrandinėje DNR .....	33
3.7. DNR sunaikinimo mechanizmas II tipo CRISPR/Cas sistemose.....	33
3.8. CRISPR/Cas sistemų efektorinių kompleksų palyginimas .....	34
<b>IŠVADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>37</b>
<b>FINANSINĖ PARAMA</b> .....	<b>38</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>39</b>
<b>PADĖKA</b> .....	<b>40</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>41</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	<b>43</b>

## SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

AHT	anhydrotetraciklinas
Ap <sup>f</sup>	atsparumas ampicilinui
bp	bazių pora(os)
Cas	<i>angl.</i> “CRISPR associated”
Cascade	<i>angl.</i> “CRISPR-associated complex for antiviral defense”
Cm <sup>f</sup>	atsparumas chloramfenikolui
crRNR	CRISPR RNR
CRISPR	<i>angl.</i> “Clustered regularly interspaced palindromic repeats”
dg	dvigrandininis(ė)
DTT	1,4-ditiotreitolis
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
HGP	horizontalus genų pernešimas
JSA	jaučio serumo albuminas
kfv	kolonijas formuojantys vienetai
kbp	kilobazių pora(os)
L	linijinė DNR forma
N	bet koks nukleotidas
nt	nukleotidas(ai)
PAAG	poliakrilamidinis gelis
PAGE	poliakrilamidinio gelio elektroforezė
NDS	natrio dodecilsulfatas
OD <sub>600</sub>	optinis tankis matuojamas esant 600 nm bangos ilgio šviesai
SS	superspiralizuota DNR forma
PAM	pro-skirtukui artimas motyvas
TALE	transkripcijos aktyvatorius primenantis efektorius
tracrRNR	trans-koduojama mažoji RNR
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
UV	ultravioletinė šviesa
vg	viengrandininis(ė)
VT	viengrandininį trūkį turinti DNR forma
W	A arba T nukleotidas
WT	laukinis tipas

## IVADAS

Bakterijas pastoviai atakuoja bakterijų virusai (bakteriofagai), kurie kelia mirtiną grėsmę, nes patekę į bakterijas jas dažnai nužudo. Siekdamos išgyventi tokioje aplinkoje, bakterijos evoliucijos eigoje sukūrė įvairius apsaugos mechanizmus, padedančius išvengti bakteriofagų infekcijos (Labrie *ir kiti*, 2010; Sturino ir Klaenhammer, 2006). Kadangi bakteriofagai suranda būdus, padedančius įveikti esamus bakterijų gynybinius barjerus, bakterijos priverstos kurti naujus apsaugos mechanizmus. Neseniai rasta nauja prokariotų apsaugos sistema lemianti atsparumą bakteriofagams yra paremta CRISPR (*angl.* “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”) (Barrangou *ir kiti*, 2007). Sistemą sudaro pasikartojančios DNR sekos, vadinamos “kartotiniaisiais” (*angl.* “repeats”), kurias skiria įsiterpusios unikalios DNR sekos, vadinamos „skirtukais” (*angl.* “spacers”). Skirtukai dažnai atitinka bakteriofagų ar plazmidžių DNR sekų fragmentus, vadinamus “pro-skirtukais” (*angl.* “proto-spacer”) (Barrangou *ir kiti*, 2007; Bolotin *ir kiti*, 2005; Mojica *ir kiti*, 2005). Šalia CRISPR lokuso randami Cas (*angl.* „CRISPR associated”) baltymus koduojantys genai, atsakingi už CRISPR/Cas sistemų veiklą.

CRISPR sistemos yra plačiai paplitę ir jas turi apie pusė bakterijų ir beveik visos archėjos, kurių genomines sekas yra žinomas. Yra duomenų, jog CRISPR sistemos gali būti pernešamos tarp skirtingų bakterijų rūšių horizontalaus genų pernešimo (HGP) mechanizmo pagalba, bet šių sistemų mobilumas kol kas nebuvo tiesiogiai pademonstruotas.

Pradžioje bakterija į savo genomo CRISPR skirtukų–kartotinių lokusą įstato trumpą “svetimos” DNR sekos fragmentą (Barrangou *ir kiti*, 2007; Brouns *ir kiti*, 2008). CRISPR lokusas vėliau nurašomas į ilgą RNR molekulę, kurią Cas baltymai sukarpo į trumpas crRNR (CRISPR RNR), turinčias po vieną unikalų skirtuką (Carte *ir kiti*, 2008; Brouns *ir kiti*, 2008; Hale *ir kiti*, 2009). crRNR su Cas baltymais susijungia į efektorinį ribonukleoproteininį (RNP) kompleksą ir veikia kaip “vedlys” atpažįstant ir sunaikinant svetimą DNR (Jore *ir kiti*, 2011). Kadangi skirtukas įstatomas į genomą, bakterijos gali perduoti atsparumą kitoms kartoms.

Pagal pagrindinių elementų išsidėstymą bei jų sekas, CRISPR/Cas sistemos skirstomos į tris tipus (Makarova *ir kiti*, 2011). Skirtingų CRISPR/Cas tipų efektorinio RNP komplekso sudėtis ir funkcijos skiriasi (Wiedenheft *ir kiti*, 2012). I-E tipo sistemoje (geriausiai ištirta sistema iš *Escherichia coli*) crRNR yra įjungiamas į 5 skirtingų baltyminių subvienetų Cascade efektorinio komplekso sudėtį. Šis kompleksas suriša DNR esantį taikinį ir lemia jo sunaikinimą, kurį atlieka papildomas Cas3 baltymas (Sinkunas *ir kiti*, 2011). III tipo sistemų iš *Sulfolobus solfataricus* ir *Pyrococcus furiosus* efektorinis kompleksas *in vitro* atpažįsta ir kerpa sintetines RNR (Hale *ir kiti*, 2012; Zhang *ir kiti*, 2012), tuo tarpu CRISPR/Cas sistemos iš *Staphylococcus epidermidis* taikiny *in vivo* yra DNR (Marraffini ir Sontheimer, 2008). II tipo RNP komplekso struktūra ir sudėtis kol kas buvo nežinoma.

Šiame darbe mes siekėme išaiškinti *Streptococcus thermophilus* bakterijose esančios II tipo CRISPR/Cas sistemos veikimo mechanizmą. CRISPR3/Cas sistema, randama *S. thermophilus* DGCC7710 kamiene, yra sudaryta iš 4 cas genų (*cas9*, *cas1*, *cas2*, ir *csn2*), kurie yra išsidėstę prieš 12 kartotinių-skirtukų vienetų CRISPR regioną (Horvath ir Barrangou, 2010). Neseniai buvo parodyta, kad *cas9* geno inaktyvavimas giminingoje

to paties kamieno CRISPR1/Cas sistemoje sutrikdo DNR interferenciją (Barrangou *ir kiti*, 2007; Garneau *ir kiti*, 2010).

#### **Pagrindiniai darbo tikslai ir uždaviniai:**

- (i). Genetiniais ir biocheminiais metodais ištirti *S. thermophilus* CRISPR3/Cas sistemą klonuotą ir išreikštą *E. coli* šeimininke.
- (ii). Nustatyti II tipo CRISPR3/Cas sistemos efektorinio komplekso sudėtį, bei išaiškinti DNR interferencijos mechanizmą.

**Mokslinis naujumas.** Šiame darbe pirmą kartą parodėme, jog Gram-teigiamų *S. thermophilus* bakterijų CRISPR3/Cas sistema, gali būti perkelta į Gram-neigiamą *E. coli* šeimininką ir užtikrinti atsparumą virusams ir plazmidėms. Taip pat parodėme, kad *cas9* yra vienintelis *cas* genas reikalingas CRISPR3 koduojamo atsparumo svetimai DNR užtikrinimui. Mes pirmą kartą parodėme, kad Cas9-crRNR kompleksas *in vitro* perkerpa abi grandines DNR sekoje, kuri yra komplementari crRNR. Kirpimą atlieka Cas9 baltymas, kuris panaudoja atskirus RuvC- ir HNH-aktyvius centrus, priešingų DNR grandinių kirpimui. Apibendrinus, mūsų rezultatai parodė, kad Cas9-crRNR kompleksas veikia kaip RNR programuojama endonukleazė, kur RNR komponentas dalyvauja taikinio atpažinime, o baltyminis komponentas - DNR kirpime. Šis atradimas sukuria prielaidas universalios programuojamos RNR kreipiamos DNR endonukleazės konstravimui.

**Praktinė reikšmė.** Mes pademonstravome, jog funkciškai aktyvi CRISPR3/Cas sistema gali būti pernešta tarp skirtingų rūšių, ir ten užtikrinti atsparumą į ląstelę patenkančioms svetimoms nukleorūgštims. Šis atradimas atveria naujas praktinio panaudojimo galimybes, pavyzdžiui, pernešus CRISPR/Cas sistemą į kitas rūšis galima jas „paskiepyti“ prieš atitinkamus virusus ar plazmidines sekas. Tokiu būdu, galima sukurti bakteriofagams atsparius bakterijų kamienus, arba žmogui saugesnius mikroorganizmus, kurie negalėtų iš aplinkos paimti nepageidaujamų genetinių elementų.

Be to, paprasta Cas9-crRNR komplekso sandara, kur specifiškumą lemia crRNR, o kirpimą atlieka vienintelis Cas9 baltymas, atveria galimybes universalios RNR kreipiančiosios DNR endonukleazės konstravimui. Šiame darbe mes pateikiame įrodymus, jog keičiant RNR komponentą, Cas9-crRNR kompleksą galima nutaikyti prieš norimas sekas tiek *in vivo*, tiek *in vitro* sąlygose. Tokiu būdu, Cas9-crRNR kompleksas galėtų būti panaudotas genų terapijos eksperimentams kaip alternatyva cinko pirštų nukleazėms ar transkripcijos aktyvatorius primenantiems efektoriams (TALE).

#### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- CRISPR3/Cas sistema iš Gram-teigiamų *S. thermophilus* bakterijų suteikia Gram-neigiamam *E. coli* šeimininkui apsaugą prieš bakteriofagus ir plazmides.
- Cas9 yra vienintelis Cas baltymas būtinas atsparumo prieš svetimą DNR užtikrinimui II tipo CRISPR/Cas sistemose.
- Cas9 baltymas sudaro ribonukleoproteininį kompleksą su 42 nt ilgio crRNR.
- crRNR nukreipia Cas9 baltymą prie DNR taikinio, o kirpimui yra būtinas trumpas konservatyvus DNR sekos motyvas esantis šalia DNR taikinio.
- Cas9 panaudoja du atskirus aktyvius centrus, RuvC ir HNH, priešingų DNR grandinių kirpimui.



## TYRIMŲ METODIKA

**Fermentai.** T4 polinukleotidkinazė; T4, Pfu, Taq ir DreamTaq DNR polimerazės; FastAP šarminė fosfatazė; T4 DNR ligazė ir visos darbe naudotos “FastDigest” restrikcijos endonukleazės buvo pagamintos “Thermo Fisher Scientific” (Anksčiau UAB “Fermentas”). Visi šie produktai naudoti atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas.

**Rinkiniai molekulinei biologijai.** “TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit”, “CloneJET PCR Cloning Kit”, “Rapid DNA Ligation Kit”, “GeneJET Gel Extraction Kit”, “GeneJET PCR Purification Kit”, “GeneJET Plasmid Miniprep Kit”, “GeneJET Plasmid Midiprep Kit” pagaminti “Thermo Fisher Scientific”, “miRNeasy Mini kit” pagamintas “Qiagen”.

**Bakterijų ir virusų kamienai.** Naudoti *E. coli* ER2267 ir RR1 kamienai.  $\lambda$  bakteriofago virulentinis mutantas ( $\lambda_{vir}$ ) gautas iš dr. R. Šapranausko.

**DNR.** *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 genomine DNR gauta iš “Danisco” (dabar “DuPont”). Darbe naudoti klonavimo vektoriai pACYC184 ( $Cm^r$ ) ir pUC18 ( $Ap^r$ ), bei raiškos vektoriai pASKIBA3plus ( $Ap^r$ ) ir pBAD24-Chis ( $Ap^r$ ).

**Oligonukleotidiniai substratai.** Visi šiame darbe naudoti oligonukleotidai buvo susintetinti “Metabion”. DNR dupleksai (1 lentelė) buvo gauti sulydant atitinkamus viengrandinius oligodeoksinukleotidus. Gaminant radioaktyviais izotopais žymėtus substratus, prieš sulydymą reikiama DNR grandinė buvo žymima 5'-gale panaudojant T4 polinukleotidkinazę ir  $[\gamma^{33}P]ATP$  (“Hartmann Analytic”).

**Elektroforezė agaroziniuose geliuose.** Įvairių plazmidžių formų, susidarančių karpant superspiralizuotus plazmides, atskyrimui naudoti 0.8 % koncentracijos agaroziniai geliai. Elektroforezės buferio sudėtis: 100 mM natrio borato, 15 mM natrio acetato, 2 mM EDTA (pH 8.2 esant 25 °C) ir 0,5  $\mu$ g/ml etidžio bromido. UV lempa apšviesti geliai buvo fotografuojami skaitmenine fotokamera. DNR fragmentai, reikalingi genų inžinerijos procedūroms, buvo frakcionuojami 0,8-1,5 % agaroziniuose geliuose elektroforezės buferyje be etidžio bromido (40 mM Tris-acetatas, 1 mM EDTA, pH 8,3).

**Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant nedenatūruojančioms sąlygoms.** Elektroforezės buferio sudėtis: 40 mM Tris-acetatas, 0,1 mM EDTA, pH 8,3 esant 25 °C. Darbe naudoti 8 % koncentracijos akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 29:1) geliai. Radioaktyviais izotopais žymėti oligonukleotidai buvo sumaišomi su įvairiais baltymo kiekiais susirišimo buferyje (elektroforezės buferis papildytas 10 % glicerolio ir 0,1 mg/ml JSA), o gauti mišiniai 3 valandas frakcionuojami gelyje, esant kambario temperatūrai ir 5 V/cm elektros lauko stiprumui. Po elektroforezės geliai buvo džiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fosforescencinių ekranų (“FujiFilm”) ir “Cyclone<sup>TM</sup>” skenerio (“Packard Instruments”) pagalba.

**Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.** Elektroforezės buferio sudėtis: 100 mM Tris-borato ir 2 mM EDTA (pH 8,2). Gelių sudėtis: 20 % akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 29:1) ir 8,5 M karbamido elektroforezės buferyje. Prieš užnešant pavyzdžius, 30 min elektroforezė (30 V/cm) vykdyta užnešus vien tik dažą, o po to užnešti pavyzdžiai frakcionuoti dar 4 h. Po elektroforezės geliai buvo džiovinami, o žymėta DNR aptinkama kaip aprašyta aukščiau.

**Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.** Elektroforezės buferio sudėtis: 25 mM Tris, 190 mM glicino (pH 8,3 esant 25 °C) ir 0,1 % natrio dodecilsulfato (NDS). Koncentruojančio ir frakcionuojančio gelių sudėtis: atitinkamai 4 % (125 mM Tris-HCl (pH 6,8 esant 25 °C) ir 0,1 % NDS) ir 10 % (375 mM Tris-HCl (pH 8,8 esant 25 °C) ir 0,1 % NDS) akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37,5:1). Baltymų mėginiai buvo sumaišomi 1:1 su mėginio buferiu (100 mM Tris-HCl (pH 6,8 esant 25 °C), 4 % NDS, 200 mM DTT, 20 % glicerolio), prieš elektroforezę mėginiai denatūruojami inkubuojant 4 min. 95°C. Pavyzdžiai buvo frakcionuojami 1-1,5 h kambario temperatūroje (30 V/cm). Geliai buvo dažomi "Page Blue" baltyminio dažo tirpalu ("Thermo Fisher Scientific"). Gauti vaizdai buvo analizuoti ir baltymų kiekis juose nustatytas programa "ImageJ" (NIH).

**Rekombinantinės DNR metodai.** Plazmidinės DNR buvo konstruojamos naudojant standartines procedūras (Sambrook *ir kiti*, 1989). Klonavimui buvo naudoti rinkiniai, skirti molekulinei biologijai, o sukonstruotų plasmidžių sekos patvirtintos DNR sekoskaitos pagalba. Dalį klonavimo darbų (CRISPR3/Cas sistemos klonavimas, dalies plazmidinių substratų konstravimas, *cas* genų delecinių mutantų konstravimas) atliko dr. R. Šapranauskas.

**Plazmidinių substratų konstravimas.** Plazmidės, naudotos transformacijos ribojimo bei karpymo eksperimentuose, buvo sukonstruotos pUC18 sukirpus su EcoRI restrikcijos endonukleaze, defosforilinus su FastAP fosfotaze bei įterpus sintetinius oligodupleksus (2 lentelė), turinčius EcoRI lipnius galus bei fosfatus 5' galuose.

**CRISPR3/Cas sistemos klonavimas.** CRISPR3/Cas sistema buvo padauginta kaip 3 atskiri PGR fragmentai, gale turintys SapI restrikcijos endonukleazės taikinius. Šie fragmentai buvo paeiliui klonuoti į pACYC184 vektorių, sukirptą su Eco32I restrikcijos endonukleaze, atstatant pilno 7,6-kbp ilgio CRISPR3/Cas sistemą (pCRISPR3 plazmidė).

***cas* genų inaktyvacija.** Rėmelio poslinkio mutacijos bei delecijos inaktyvuojančios vieną ar tris *cas* genus buvo sukonstruotos sukerpant pCRISPR3 su reikiamomis restrikcijos endonuklezėmis, užbukinant galus su T4 DNR polimeraze bei vėl plazmidę susiuvant su T4 DNR ligaze. Gautos plazmidės pCas9(-), pCas1(-), pCas2(-) ir pCsn2(-) nekodavo vieno iš Cas baltymų, o pCas9 plazmidė kodavo tik Cas9 baltymą.

**Cas9 geno klonavimas.** *S. thermophilus* DGCC7710 genomine DNR buvo naudojama kaip matrica *cas9* geno klonavimui. Konstruojant pASKIBA3-Cas9 plazmidę, skirtą baltymo sulieto su C-galine Strep(II)-uodega raiškai, PGR fragmentas buvo padaugintas naudojant pradmenis: 5'-ACGTCTCAAATGTTGTTTAATAA GTGTATAATAATTTTC-3' ir 5'-ACGTCTCCGCGCTACCCTCTCCTAGTTTG-3' ir įklonuotas per Esp3I taikinius. pBAD-Cas9 plazmidė, koduojanti C-gale (His)<sub>6</sub>-uodegą turintį baltymą, buvo gauta PGR fragmentą (pradmenys: 5'-ACGTCTCACATGACTA AGCCATACTCAATTGGAC-3' ir 5'-ACTCGAGACCCTCTCCTAGTTTGGCAA -3') įklonavus į pBAD24-Chis raiškos vektorių per NcoI ir XhoI taikinius.

**Kryptinga mutagenezė.** Mutacijoms į *cas9* geną pCas9 plazmidėje įvesti naudota dviejų stadijų PGR ("megapradmens" metodas) (Barik, 1996). D31A ir N891A mutantai pASKIBA3-Cas plazmidėje sukonstruoti pagal modifikuotą "QuickChange" mutagenezės protokolą (Tamulaitis *ir kiti*, 2007). Mutacijų įvedimas tik konkrečioje vietoje buvo patvirtintas nustatant viso geno nukleotidinę seką.

**1 lentelė.** Oligonukleotidiniai substratai. Pro-skirtuko seka pabraukta, PAM – pažymėtas ryškesniu šriftu.

Oligonukleotidas	Seka	Trumpas aprašymas
<b>SP1</b>	5' -GCTCGAATTGAAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTGAATTCGTAAT-3' 3' -CGAGCTTAAC <u>TTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCAC</u> TTAAGCATT-5'	55 bp ilgio dgDNR substratas turintis pro-skirtuką-1 ir PAM
<b>SP1-pΔ</b>	5' -GCTCGAATTGAAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACAAATTCGTAAT-3' 3' -CGAGCTTAAC <u>TTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTTTAAGCATT</u> -5'	50 bp ilgio dgDNR substratas turintis tik pro-skirtuką-1
<b>SP2</b>	5' -GCTCGAATTGTACTGCTGTATTAGCTTGGTTGTTGGTTTGTGGTGAATTCGTAAT-3' 3' -CGAGCTTAACATGACGACATAATCGAACCAACAACCAAAACCCACTTAAGCATT-5'	55 bp ilgio dgDNR substratas turintis pro-skirtuką-2 ir PAM (oligodupleksas be pro-skirtuko-1 sekos)
<b>S(+)<b>SP1</b></b>	5' -ATTACGAATT <u>CA</u> CCCATGTCCTCTTCTCCTTTAGCGTTT <u>AGAATTTCA</u> ATTCGAGC-3'	55 nt vgDNR oligonukleotidinis substratas, SP1 oligoduplekso (+)grandinė
<b>s(+)<b>SP1-pΔ</b></b>	5' -ATTACGAATTTGTCCTCTTCTCCTTTAGCGTTT <u>AGAATTTCA</u> ATTCGAGC-3'	50 nt vgDNR oligonukleotidinis substratas, SP1-pΔ oligoduplekso (+) grandinė
<b>S(+)<b>SP2</b></b>	5' -ATTACGAATT <u>CA</u> CCACAAACCAACAACCAAGCTAATACAGCAGTACAATTCGAGC-3'	55 nt vgDNR oligonukleotidinis substratas, SP2 oligoduplekso (+)grandinė
<b>S(-)<b>SP1</b></b>	5' -GCTCGAATTGAAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTGAATTCGTAAT-3'	55 nt vgDNR oligonukleotidinis substratas, SP1 oligoduplekso (-)grandinė
<b>SP1-20</b>	5' -GCTCGAATTGCGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTGAATTCGTAAT-3' 3' -CGAGCTTAACGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCAC <u>TTAAGCATT</u> -5'	55 bp ilgio dgDNR substratas turintis 20 nt iš pro-skirtuko-1 ir PAM
<b>SPN</b>	5' -GCTCGAATTGCCACCCAGCAAAATTCGGTTTTCTGGCTGATGGTGAATTCGTAAT-3' 3' - CGAGCTTAACGGTGGGTCGTTTTAAGCCAAAAGACCGACTACCAC <u>TTAAGCATT</u> -5'	55 bp ilgio dgDNR substratas turintis pro-skirtuką-N ir PAM

**2 lentelė.** Plazmidės pavadinimas bei įterpta DNR seka. Pro-skirtuko seka pažymėta ryškesniu šriftu, PAM – pabrauktas, pakeitimai sekoje pažymėti pilka spalva.

Plazmidė	Įterptas oligodupleksas
pSP1	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP2	5'-AATTT <b>ACTGCTGTATTAGCTTGGTTGTTGGTTTGTGGTG</b> -3' 3'- <b>ATGACGACATAATCGAACCAACAACCAAACACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sA2G	5'-AATTG <b>AGATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTCTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sC11T	5'-AATTG <b>AAATTCTAAATGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTACGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sG18C	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAACAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTGTCCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sA23T	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGATGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTACTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sA25T	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGTGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTACCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-sA28T	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGTCATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCAGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-pΔ	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACA</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGT</b> TAA-5'
pSP1-pG1C	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATCGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTAGCACTTAA</b> -5'
pSP1-pG2C	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGCTG</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-pG4C	5'-AATTG <b>AAATTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTC</b> -3' 3'- <b>CTTTAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-27	5'-AATTG <b>TTCTAAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CAAGATTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-23	5'-AATTG <b>AAACGCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTTGCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-19	5'-AATTG <b>GCTAAAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CCGATTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-15	5'-AATTG <b>AAGAGGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CTTCTCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'
pSP1-11	5'-AATTG <b>GGAAGAGGACATGGTG</b> -3' 3'- <b>CCCTTCTCCTGTACCACTTAA</b> -5'

**CRISPR srities modifikacijos.** pCas9(-)SP1 ir pCRISPR3-SP1 plazmidės koduojančios tik 1 skirtuką (skirtukas-1) buvo gautos PGR fragmentą (gautą su pradmenimis: 5'-GACCACTTATTGAGGTAAATGAG-3' ir 5'-CAAACCAGGATCCAAGCTAATACAGCAG-3') klonavus į pCas9(-) ir pCRISPR3 plazmides per Eco31I ir BamHI taikinius.

Anti-λ-skirtuko seka buvo parinkta iš λ bakteriofago geno sekos ir įstatyta į CRISPR3 regioną per kelis žingsnius. Pirmiausia, iš pCRISPR3 plazmidės pašalintas SapI taikinytis ir gauta pCRISPR3-ΔSapI plazmidė. Toliau PGR fragmentas (padaugintas

su pradmenų pora: 5'-GACCACTTATTGAGGTAAATGAG-3'/ 5'-AACCAGGATCC AAGCTAATAGCTCTTCAGTTTTGGAACCATTC-3') buvo klonuotas į pCRISPR3-ΔSapI vektorių. Gauta pCRISPR3-2R-SapI plazmidė turėjo SapI ir BamHI taikinius po antrojo kartotinio sekos. Sintetinis oligodupleksas koduojantis skirtuko-kartotinio vienetą (5'-AACCCACCCAGCAAAAATTCGGTTTTCTGGCTGAGTTTTAGAGCTGT GTTGTTCGAATGGTTCCAAAACG-3'/5'-GATCCGTTTTGGAACCATTCGAAC AACACAGCTCTAAACTCAGCCAGAAAACCGAATTTTGCTGGGTGG-3, anti-λ-skirtukas pabrauktas) bei turintis SapI ir BamHI būdingus lipnius galus buvo klonuotas į pCRISPR3-2R-SapI. Gauta pCRISPR3-anti-λ-SP plazmidė turėjo prieš λ fago DNR nukreiptą skirtuką.

pCas(-)SPN, pCas(-)SP-A ir pCas(-)SP-B plazmidės koduojančios atitinkamas crRNR buvo sukonstruotos į pCas(-)-R vektorių (neturi *cas* genų) įvedant skirtuko-kartotinio vienetus koduojančius oligodupleksus (skirtukų sekos atitinkamai: (5'-CCACCCAGCAAAAATTCGGTTTTCTGGCTG-3', 5'-TTAATGTCATGATAATA ATGGTTTTCTTAGACGTC-3' ir 5'-ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC TG-3'), kaip aprašyta aukščiau.

**E. coli transformacija plazmidėmis.** Transformacijos buvo atliekamos panaudojant CaCl<sub>2</sub> termošoko procedūrą (Sambrook *ir kiti*, 1989). Pateikiamas rezultatas - vidurkis iš bent 3 nepriklausomų bandymų ± standartinis nuokrypis. Dalį eksperimentų atliko dr. R. Šapranauskas.

**Atsparumo bakteriofagams įvertinimas.** Buvo tikrinamas *E. coli* RR1 kamieno, turinčio pCRISPR3 ar pCRISPR3-anti-λ-SP plazmidės jautrumas virulentiniam λ bakteriofago mutantui (λ<sub>vir</sub>). Naktinė *E. coli* ląstelių kultūra buvo užkrečiama skirtingais bakteriofago tirpalo praskiedimais ir skaičiuojamos susidariusios negatyvios kolonijos (Sambrook *ir kiti*, 1989). Bakterijų jautrumas bakteriofagams yra išreikštas, kaip negatyvių kolonijų susidarymo efektyvumas (Barrangou *ir kiti*, 2007): negatyvių kolonijų kiekio santykis tarp kamieno turinčio anti-λ<sub>vir</sub> skirtuką CRISPR regione, bei neturinčio. Pateikiamas rezultatas – vidurkis iš bent 3 nepriklausomų bandymų ± standartinis nuokrypis.

**Cas9 baltymo raiška ir gryninimas.** (His)<sub>6</sub> uodegą turinčio Cas9 baltymo raiška gauta bei baltymas išgrynintas naudojant tas pačias sąlygas, kurios naudotos Cas3 baltymui iš CRISPR4/Cas sistemos išgryninti (Sinkunas *ir kiti*, 2011).

**Cas9-crRNR komplekso raiška ir gryninimas.** Siekiant išgryninti Cas9-crRNR kompleksą, Strep(II)-uodegą turintis Cas9 baltymas buvo išreikštas *E. coli* RR1 kamiene, turinčiame pCas9(-)SP1 plazmidę. Ląstelės auginamos 2 žingsniais. Pirmiausia, 4 ml kultūros buvo auginama 37°C iki OD<sub>600</sub> pasieks 0,5, tada pridedama 0,2 μg/ml anhidrotetraciklino (AHT). Po 4 h nedidelis kiekis (1/400 dalis) kultūros užsėjamas į terpę, turinčią atitinkamų antibiotikų bei AHT, ir auginama 17 h. Cas9-crRNR kompleksas buvo išgrynintas skysčių giminingumo chromatografijos būdu, naudojant "StrepTrap HP" kolonėlę ("GE Healthcare"). Gauta ~ 1,5 μg Cas9 baltymo iš 1 l *E. coli* kultūros. Cas9 (bei Cas9-crRNR komplekso) koncentracija buvo nustatoma densitometrinės NDS-PAGE gelio analizės pagalba, lyginant Strep-taktino pagalba išgrynintą Cas9 baltymo kiekį, su žinomais (His)<sub>6</sub> uodegą turinčio baltymo kiekiais.

**"Northern blot" analizė.** Cas9 baltymo surišta RNR buvo išgryninta panaudojant "miRNeasy Mini kit" ("Qiagen") rinkinį ir išfrakcionuota 10% denatūruojančiame PAA gelyje (7 M karbamidas, 20 mM MOPS/NaOH, pH 8). RNR buvo pernešta ant

“SensiBlot Plus” neiloninės membranos (“Thermo Fisher Scientific”) pusiau sausu būdu ir priišta prie membranos su 0.16 M l-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimido (“Pierce”) ir 0.13 M 1-metilimidazolo (“Sigma”) tirpalu (pH=8) inkubuojant 60°C temperatūroje 1 h. Membrana buvo blokuojama 2× SSC buferyje turinčiame 1% NDS ir 0,1 mg/ml žuvies denatūruotos DNR (“Ambion”) 1 h 40°C temperatūroje. <sup>32</sup>P 5'- gale žymėtas 42 nt ilgio DNR oligonukleotidas komplementarus 20 nt skirtuko ir 22 nt kartotinio sekoms (5'-TCGAAACAACACAGCTCTAAAAGTGCCTCTTCCTCTTTA GC-3') buvo naudojamas kaip zondas inkubuojant 12 h. Membrana buvo tris kartus po 15 min nuplauta su 0,2× SSC buferiu turinčiu 0,2 % SDS. Radioaktyvi DNR detektuojama fosforescencinių ekranų pagalba, kaip aprašyta anksčiau.

**Oligonukleotidinių substratų hidrolizė.** Reakcijos buvo pradedamos į 1 nM radioaktyviai žymėto substrato turintį reakcijos buferį (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 0,1 mg/ml JSA ir 10 mM MgCl<sub>2</sub>) įdedant 2 nM Cas9-crRNR komplekso. Bandymai vykdyti esant 37°C temperatūrai, reakcijos stabdytos sumaišant su stabdymo tirpalu (95 % v/v formamido, 0.01 % bromfenolio mēlio, 25 mM EDTA, pH 9,0). Gauti pavyzdžiai frakcionuoti poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.

**Plazmidinių substratų hidrolizė.** 2,5 nM plazmidinės DNR sumaišoma 2 nM Cas9-crRNR komplekso ir inkubuojama esant 37 °C temperatūroje (buferis identiškas bandymams su oligonukleotidiniais substratais). Reakcijos stabdytos ekstrahuojant fenolio/chloroformo mišiniu. Susidariusios įvairios plazmidinės DNR formos buvo atskiriamos elektroforezės agaroziniuose geliuose pagalba ir detektuojamos kaip aprašyta anksčiau.

**Plazmidės kirpimo vietos nustatymas.** Norint gauti pilną plazmidinės DNR sukarpymą, 8 nM Cas9-crRNR komplekso buvo inkubuota su 2,5 nM pSP1 superspiralizuotos plazmidės 37°C temperatūroje 10 min. Reakcijos produktai išgryninti ir sukonzentruoti su “GeneJET PCR Purification” rinkiniu. pSP1 plazmidės pro-skirtuko regiono seka nuskaityta su 5'-CCGCATCAGGCGCCATTCGCC-3' ((+)grandinės nustatymas) ir 5'-GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCC-3' ((-)grandinės nustatymas) pradmenimis.

**Nukleorūgščių surišimo tyrimai.** Šiuose eksperimentuose buvo naudoti <sup>33</sup>P izotopu 5' gale pažymėti oligonukleotidai (1 lentelė). Įvairūs Cas9-crRNR komplekso kiekiai inkubuojami su 1 nM DNR susirišimo buferyje (40 mM Tris–acetato, pH 8,3, 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml JSA, 10% v/v glicerolio) 10 min, esant kambario temperatūrai. Laisva DNR ir baltymo-DNR kompleksai buvo frakcionuojami poliakrilamidiniame gelyje esant nedenaatūruojančioms sąlygoms ir detektuojami, kaip aprašyta anksčiau.

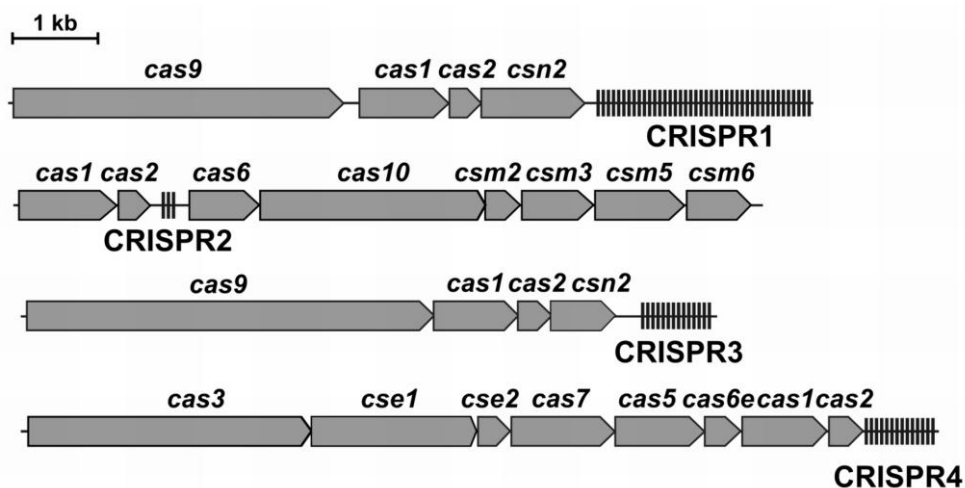
**Sekų analizė.** Teoriniai fizikiniai-cheminiai baltymų parametrai nustatyti panaudojant “ProtParam” įrankį (Gasteiger *ir kiti*, 2005). RuvC- ir HNH-aktyvių centrų aminorūgštis identifikuojantys palyginiai buvo surinkti atitinkamai su “COBALT” (Papadopoulou ir Agarwala, 2007) įrankiu ir “SMART 6” duomenų baze (Letunic *ir kiti*, 2009), bei vizualizuoti su “BioEdit 7.0.5” programa (Hall, 1999). Baltymų ar DNR sekos tarpusavyje lygintos naudojant “ClustalX” programą (Larkin *ir kiti*, 2007).

**Gelfiltracija.** Eksperimentai atlikti kambario temperatūroje, naudojant “Superdex 200 10/300 GL” kolonėlę (“GE Healthcare”). Gelfiltracijos buferio sudėtis: 10 mM Na-fosfatas (pH 7,4), 500 mM NaCl. (His)<sub>6</sub> uodegą turinčio Cas9 baltymo molekulinė masė buvo nustatyta naudojantis kalibracine kreive, sudaryta išmatavus žinomos molekulinės masės standartinių baltymų (“Bio-Rad”) eliuacijos tūrius.

# REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

## 1. *S. thermophilus* bakterijų CRISPR/Cas sistemos

Vienas iš CRISPR/Cas sistemų tyrimams naudojamų modelinių organizmų, *S. thermophilus* bakterijų DGCC7710 kamienas turi 4 skirtingas CRISPR/Cas sistemas: CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3 ir CRISPR4 (1 paveikslas) (Horvath ir Barrangou, 2010). Literatūriniai duomenys rodo, jog CRISPR1 ir CRISPR3 sistemos yra veiklios, tai yra, gali įsistatyti naujus skirtukus ir taip apsaugoti bakterijas nuo virusų ir plazmidžių patekimo (Barrangou *ir kiti*, 2007; Garneau *ir kiti*, 2010; Deveau *ir kiti*, 2008). Nors abi sistemos priklauso tam pačiam II-A potipiui (Makarova *ir kiti*, 2011), bei turi po 4 *cas* genus, išsidėsčiusius prieš CRISPR regioną, CRISPR1 sistema yra žymiai aktyvesnė už CRISPR3. Tiek *cas1*, tiek *cas2* genai yra universalūs (jų homologai randami visose sistemose), tuo tarpu *cas9* ir *csn2* genai yra būdingi tik II-A potipio CRISPR/Cas sistemoms. CRISPR1/Cas sistemoje *cas9* genas dalyvauja atsparumo užtikrinime, o *csn2* dalyvauja tik naujų skirtukų įstatyme (Barrangou *ir kiti*, 2007; Garneau *ir kiti*, 2010). Bioinformatinė analizė parodė, kad šalia skirtuką atitinkančių sekų (pro-skirtukų) bakteriofago genome randamos trumpos konservatyvios PAM (pro-skirtukui artimas motyvas) sekos. CRISPR1/Cas sistemos PAM yra 5'-NNAGAAW-3', o CRISPR3/Cas sistemos - 5'-NGGNG-3' (Deveau *ir kiti*, 2008; Horvath *ir kiti*, 2008). Viena taškinė mutacija pro-skirtuko ar PAM sekoje leidžia bakteriofagams išvengti CRISPR sąlygojamo atsparumo (Deveau *ir kiti*, 2008). CRISPR2 ir CRISPR4 sistemos yra kitokios bei priskiriamos III-A ir I-E tipams (Horvath ir Barrangou, 2010; Makarova *ir kiti*, 2011).



1 paveikslas. *S. thermophilus* DGCC7710 kamieno CRISPR/Cas sistemų sandara. CRISPR1 ir CRISPR3 priskiriamos II tipui, CRISPR2 – III tipui, o CRISPR4 – I tipui.

## 2. CRISPR3/Cas sistemos tyrimai *E. coli*

### 2.1. CRISPR3/Cas sistemos klonavimas į *E. coli* bakterijas

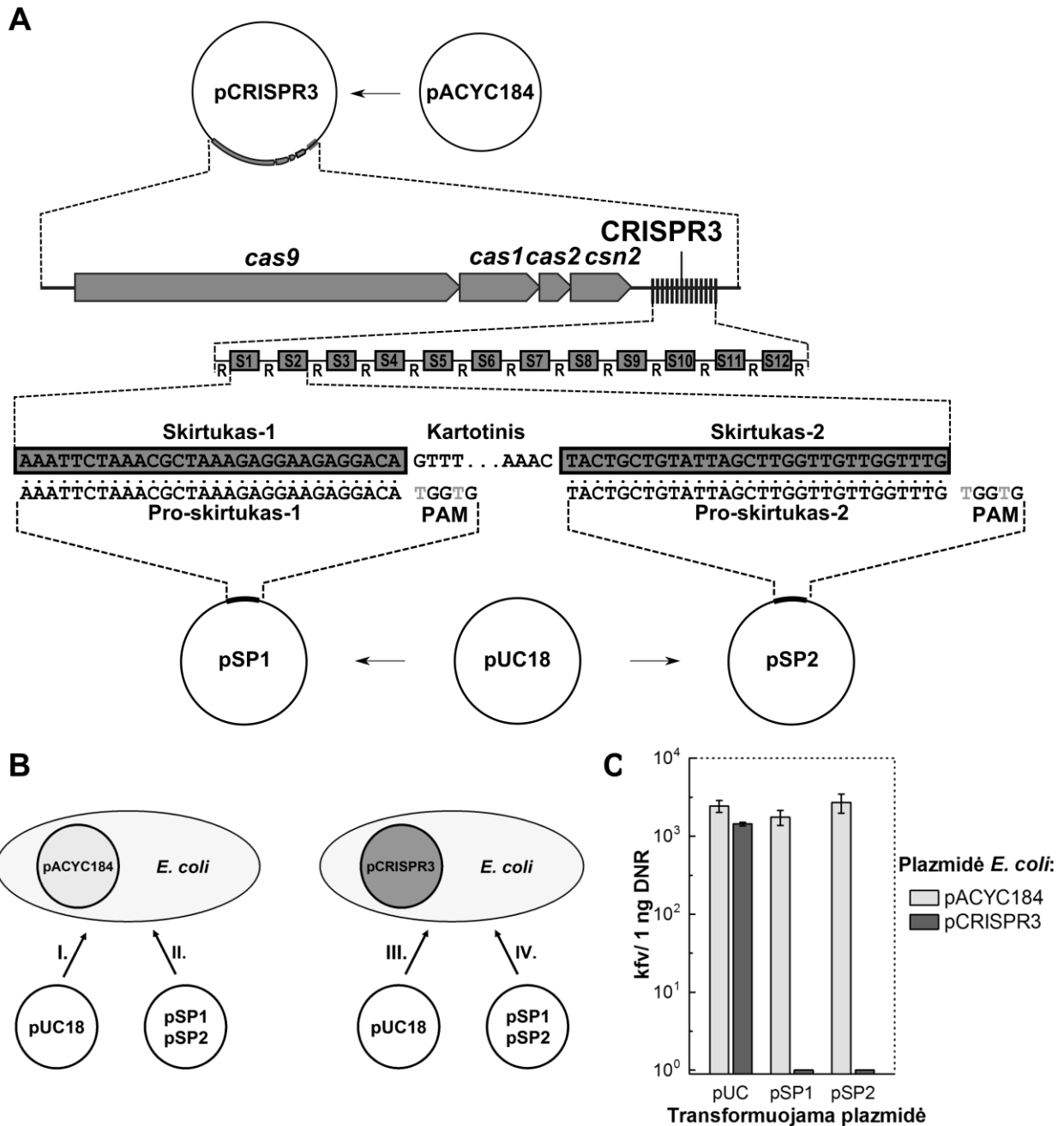
*S. thermophilus* DGCC7710 kamieno CRISPR3/Cas sistemą koduojantis 7,6-kbp ilgio regionas yra sudarytas iš 4 *cas* genų (*cas9*, *cas1*, *cas2* ir *csn2*), už jų esančios A+T turtingos 382 bp ilgio lyderinės sekos bei CRISPR regiono (12 skirtuko-kartotinio vienetų) (2A paveikslas). Visa sistema buvo klonuota į pACYC184 taip, kad gauta pCRISPR3 plazmidė turėjo *S. thermophilus* promotorius ir reguliacinius elementus, išsidėsčiusius prieš *cas9* geną.

### 2.2. CRISPR3/Cas sistema riboja *E. coli* transformaciją plazmidėmis

Norėdami patikrinti ar CRISPR3/Cas sistema yra veikli heterologiniame *E. coli* šeimininke, naudojome transformacijos plazmidėmis ribojimo eksperimentus. Panaudojant pUC18 plazmidę, kuri yra suderinama su pACYC184, buvo sukonstruotos pSP1 ir pSP2 plazmidės (2A paveikslas). Jos turėjo pro-skirtuko sekas, identišką atitinkamai pirmam ir antram skirtukui iš CRISPR3 regiono, bei reikiamą PAM seką (5'-TGGTG-3') už pro-skirtuko sekos (2 lentelė). Buvo tikrinamas *E. coli* kamieno, jau turinčio pACYC184 arba pCRISPR3, transformacijos su pUC18, pSP1 ir pSP2 plazmidėmis efektyvumas (2B paveikslas). 1 ml bakterijų kultūros ( $OD_{600} = 0.4$ ) buvo transformuojama 1 ng DNR, ir skaičiuojami susidarę kolonijas formuojantys vienetai (kfv). Visais atvejais, kai pACYC184 turintis kamienas buvo transformuojamas su pUC18, pSP1 ar pSP2 plazmidėmis, gautas kfv skaičius viršijo 1000 (2C paveikslas). Tuo tarpu kai šeimininkas turėjo pCRISPR3 plazmidę, transformuojant su pSP1 arba pSP2 plazmidėmis, kolonijų nebuvo gauta. Transformuojant su pUC18, neturintiu pro-skirtuko, taip pat gauta ~ 1000 kolonijų. Šie duomenys rodo, jog CRISPR3/Cas sistema apsaugo *E. coli* bakterijas nuo plazmidės patekimo į ląstelę. Be to, pUC18 plazmidė turi dar 95 sekas identišką PAM (5'-GGNG-3'), šalia kurių nėra pro-skirtuko. Tai rodo, jog atsparumo užtikrinimui reikalingas pro-skirtuko ir PAM sekos buvimas šalia.

Kad įvertintume plazmidinės DNR transformacijos ribojimo efektyvumą, bandėme bakterijas transformuoti su 100 ng plazmidės. Su pSP1 plazmide transformuojant kamieną, turintį pCRISPR3, kolonijų nebuvo gauta, o transformuojant su plazmide, kuri neturi pro-skirtuko (pUC18), gauta  $10^5$  kfv. Kai kontrolinis kamienas (turintis pACYC184 vektorių) buvo transformuotas su 100 ng pSP1, išaugo panašus skaičius kolonijų. Taigi, CRISPR3/Cas sistema sumažina transformacijos efektyvumą daugiau nei 5 eilėmis.

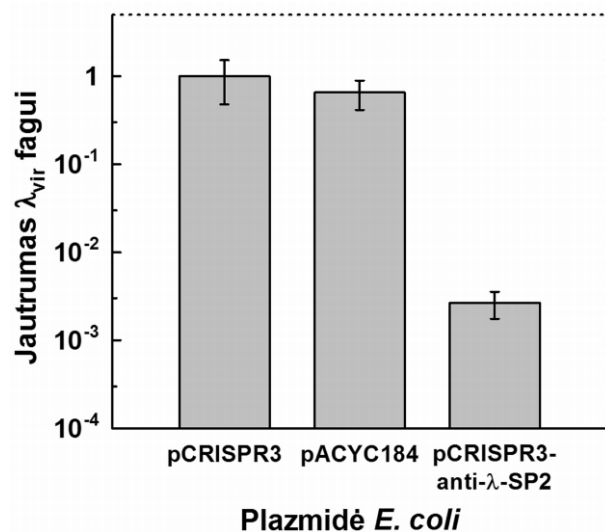




**2 paveikslas. CRISPR3/Cas sistema riboja *E. coli* transformaciją plazmidėmis. (A)** CRISPR3/Cas sistemos klonavimas, bei plazmidžių skirtų *E. coli* kamieno transformacijos ribojimo eksperimentams konstravimo schema. Pilno ilgio CRISPR3/Cas sistema buvo klonuota į pACYC184 plazmidę. Plazmidės naudotos transformacijos ribojimo eksperimentuose gautos į pUC18 plazmidę įterpiant pro-skirtuko ir PAM sekas. **(B)** *E. coli* kamieno transformacijos plazmidėmis ribojimo eksperimentų schema. *E. coli* RR1 kamienas jau turintis pACYC184 arba pCRISPR3 plazmidės, buvo transformuotas pUC18, pSP1 arba pSP2 plazmidėmis. **(C)** *E. coli* ląstelių transformacijos plazmidine DNR ribojimas. Transformacijos efektyvumas išreikštas kfv (koloniją formuojančiais vienetais)/ 1 ng DNR (3 eksperimentų vidurkis ± standartinis nuokrypis).

### 2.3. CRISPR3/Cas sistema riboja $\lambda$ bakteriofago infekciją

Kitame darbų etape tikrinome, ar į heterologines *E. coli* ląsteles įkelta CRISPR3/Cas sistema apsaugo ląsteles nuo bakteriofago infekcijos. Tuo tikslu į sutrumpinto CRISPR3 regiono antrąją poziciją buvo įstatytas skirtukas (anti- $\lambda_{vir}$ ), nutaikytas į  $\lambda$  bakteriofago genomine seką ir patikrinta, ar tokia sistema gali užtikrinti atsparumą  $\lambda$  fagui. Rezultatai parodė, jog *E. coli* ląstelių, koduojančių CRISPR sistemą su įstatytu anti- $\lambda_{vir}$  skirtuku, jautrumas bakteriofagui  $\lambda$  sumažėjo maždaug 3 eilėmis, lyginant su ląstelėmis, turinčiomis laukinio tipo CRISPR3/Cas sistemą (3 paveikslas). Šie preliminarūs rezultatai rodo, jog heterologinė sistema sustiprina *E. coli* bakterijų atsparumą ne tik plazmidėms, bet ir virusams.



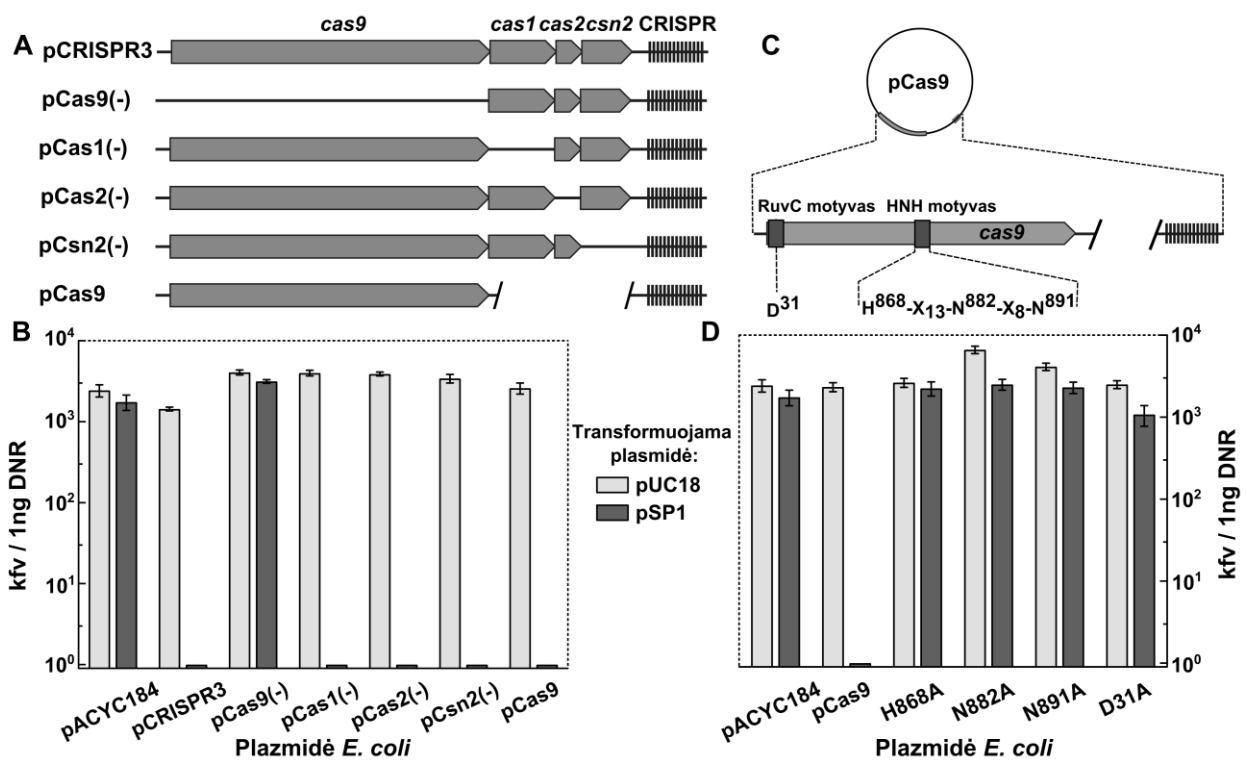
**3 paveikslas. *E. coli* ląstelių jautrumas lambda ( $\lambda_{vir}$ ) bakteriofagui.** Jautrumo virusui eksperimentai buvo atliekami su *E. coli* ląstelėmis, turinčiomis skirtingas rekombinantines plazmides. pCRISPR3 plazmidė turi pilno ilgio CRISPR3 regioną su natūraliais skirtukais; pACYC184 - neturi CRISPR/Cas sistemų; pCRISPR3-anti- $\lambda$ -SP - turi pilną *cas* genų rinkinį bei įstatytą anti- $\lambda_{vir}$  skirtuką. Jautrumas  $\lambda_{vir}$  bakteriofagui - tai negatyvių kolonijų skaičiaus santykis tarp analizuojamo kamieno (turinčio anti- $\lambda_{vir}$  skirtuką) ir kamieno, turinčio pCRISPR3 plazmidę (be anti- $\lambda_{vir}$  skirtuko).

### 2.4. Pro-skirtuko mutacinė analizė

Užkrėtimo bakteriofagais tyrimai *S. thermophilus* ląstelėse parodė, kad skirtuko seka turi būti identiška atitinkamai pro-skirtuko sekai bakteriofago genome (Barrangou *ir kiti*, 2007; Deveau *ir kiti*, 2008). Siekdami iširti, ar toks pat atitikimas reikalingas ir plazmidžių transformacijos ribojimui, sukonstravome plazmides pSP1-sA2G, pSP1-sC11T, pSP1-sG18C, pSP1-sA23T, pSP1-sA25T ir pSP1-sA28T (2 lentelė), kurios skirtingose pro-skirtuko vietose turėjo taškines mutacijas (atitinkamai A2G, C11T, G18C, A23T, A25T, ir A28T). Panaudodami šias plazmides analizavome *E. coli* kamieno, turinčio pCRISPR3, transformacijos efektyvumą (4A paveikslas). Kaip ir tikėtasi, plazmidės, pro-skirtuko A25 ir A28 pozicijose turinčios taškines mutacijas, transformavo *E. coli* ląsteles panašiu efektyvumu kaip ir pUC18, t.y. išvengė CRISPR sistemos koduojamos ląstelių apsaugos. Likusias mutacijas turinčios plazmidės netransformavo kamieno turinčio pCRISPR3 plazmidę, taigi šios mutacijos neturėjo įtakos apsaugos efektyvumui. Apibendrinant, mūsų duomenys rodo, jog mutacijos arti PAM sekos (25 ir 28 pozicija), CRISPR3/Cas sistemos nėra toleruojamos, tuo tarpu nuo PAM labiau nutolusioje dalyje galimi neatitikimai tarp skirtuko ir pro-skirtuko sekos.



nebegalėjo įsistatyti naujų skirtukų, tačiau sugebėjo užtikrinti atsparumą (Barrangou *ir kiti*, 2007). Siekdami iširti, kurie Cas baltymai dalyvauja CRISPR3/Cas sistemos DNR interferencijos stadijoje, sukonstravome mutantines plazmides, nekoduojančias vieno iš 4 Cas baltymų (pCas9(-), pCas1(-), pCas2(-), pCsn2(-)) (5A paveikslas) ir tyrėme atitinkamų *E. coli* kamienų transformacijos pSP1 plazmidė į efektyvumą. *E. coli* ląstelės, turinčios CRISPR3/Cas sistemą be *cas1*, *cas2* ar *csn2* genų, išsaugojo atsparumą plazmidinei DNR (5B paveikslas). Tuo tarpu jei sistema neturėjo *cas9* geno, ląstelės buvo efektyviai transformuojamos tiek pSP1, tiek pUC18 plazmidėmis. Norėdami įrodyti, jog vienintelio Cas9 baltymo užtenka atsparumui užtikrinti, iš pCRISPR3 plazmidės pašalinome visus 3 kitus *cas* genus (*cas1*, *cas2*, *csn2*), tokiu būdu buvo gauta pCas9 plazmidė. *E. coli* kamienas, turintis pCas9 plazmidę (5B paveikslas), riboja transformaciją pSP1 plazmidė taip pat efektyviai kaip ir kamienas, turintis pilno ilgio CRISPR3/Cas sistemą. Taigi, Cas9 yra vienintelis Cas baltymas, būtinas atsparumo prieš svetimą DNR užtikrinimui. Šie duomenys leidžia manyti, jog Cas1, Cas2 ir Csn2 baltymai dalyvauja tik naujų skirtukų įsistatymo stadijoje.



**5 paveikslas. CRISPR3/Cas sistemos *cas* genų mutacinė analizė *E. coli*.** (A) Sukonstruotos mutantinės plazmidės, nekoduojančios 1 ar 3 *cas* genų. Pavieniai *cas* genai inaktyvuoti rėmelio poslinkio mutacijų ar mažų delecijų pagalba. Trys *cas* genai pašalinti delecijos pagalba. (B) Vieno *cas9* geno užtenka atsparumo užtikrinimui *E. coli*. (C) Cas9 baltymo RuvC ir HNH motyvų konservatyvios aminorūgštys. (D) Taškinės mutacijos konservatyviuose RuvC ir HNH motyvuose inaktyvuoja *cas9* geną.

## 2.7. *cas9* geno mutacinė analizė

Spėjama, kad Cas9 baltymas turi 2 konservatyvius motyvus būdingus RuvC ir HNH šeimų nukleazėms (Makarova *ir kiti*, 2006). HNH motyvas būdingas nukleazėms,

kerpančioms dvigrandinę DNR, tokioms kaip kolicinai (Kleanthous *ir kiti*, 1999; Ko *ir kiti*, 1999), restrikcijos endonukleazės (Saravanan *ir kiti*, 2004) ar introninės/inteininės nukleazės (Shen *ir kiti*, 2004). RuvC motyvą turinčių nukleazių funkcijų spektras daug platesnis, jos dalyvauja tiek DNR, tiek ir RNR karpyme (RNazė H, DNR transpozazės ir retrovirusų integrazės, Argonautų baltymų PIWI domenai) (Nowotny *ir kiti*, 2005). Siekdami nustatyti, ar D31 (RuvC motyvas), H865, N882 ir H891 (visos iš spėjamo HNH motyvo) aminorūgštys (5C paveikslas) yra svarbios Cas9 baltymo funkcijai, sukonstravome taškinius šių aminorūgščių pakeitimo į alaniną mutantus. Transformacijos plazmidėmis ribojimo eksperimentai parodė, kad visos 4 mutacijos inaktyvavo CRISPR3/Cas sistemą (5D paveikslas). Taigi, HNH ir RuvC motyvų konservatyvios aminorūgštys yra svarbios Cas9 baltymo funkcijai *in vivo*.

## **2.8. Cas baltymų vaidmuo CRISPR3/Cas sistemos koduojamame apsaugos mechanizme**

CRISPR/Cas sistemos yra labai skirtingos tiek pagal *cas* genų šeimas, tiek pagal jų skaičių, bei *cas* genų operono išsidėstymą ir skirstomos į tris tipus ir bent 10 potipių (Makarova *ir kiti*, 2011). CRISPR/Cas sistemų skirtumai lemia ir DNR interferencijos mechanizmo skirtumus. Neseniai buvo pademonstruota, kad *S. thermophilus* CRISPR1/Cas sistema *in vivo* perkerpa plazmidės ir bakteriofago genomine dvigrandinę DNR pro-skirtuko viduje konkrečioje vietoje (Garneau *ir kiti*, 2010). Šiam kirpimui reikalingas Cas9 baltymas, bet dar neaišku, ar jame dalyvauja ir kiti Cas baltymai. *S. thermophilus* CRISPR3/Cas sistema priklauso tam pačiam II-A potipiui kaip ir CRISPR1/Cas, bei koduoja 4 panašius Cas baltymus (1 paveikslas), todėl abiem sistemoms gali būti būdingas toks pat mechanizmas.

Cas9 iš CRISPR3/Cas sistemos yra didelis baltymas, sudarytas iš 1388 aminorūgščių. *In silico* tyrimai identifikavo du konservatyvius motyvus (HNH ir RuvC tipo) (Haft *ir kiti*, 2005; Makarova *ir kiti*, 2006), kurie galėtų sudaryti du atskirus aktyvius centrus. Šiame darbe mes pateikiame eksperimentinius įrodymus, jog mutacijos *cas9* gene tiek RuvC, tiek HNH motyvuose inaktyvuoja visą CRISPR3/Cas sistemą. Kadangi HNH domenai dažnai randami dvigrandinę DNR kerpančiose nukleazėse, manome, jog Cas9 baltymo HNH domenai dalyvauja DNR karpyme. CRISPR1/Cas sistema perkerpa abi DNR grandines pro-skirtuko sekoje. Taigi, jei Cas9 baltymas DNR perkirpimui naudoja tik HNH aktyvų centrą, jis turėtų dimerizuotis, kad perkirptų abi DNR grandines. Kita vertus, gali būti, jog HNH ir RuvC aktyvūs centrai perkerpa atskiras DNR grandines. Tokią strategiją naudoja kai kurios restrikcijos endonukleazės (Armalyte *ir kiti*, 2005). Tarp RuvC domeną turinčių baltymų pasitaiko ir karpančių DNR, ir karpančių RNR, todėl negalima atmesti, jog N-galinis RuvC domenai dalyvauja crRNR brendime. Konkrečiai aktyvių centrų funkcijai nustatyti reikalingi tolimesni *in vitro* tyrimai.

## **2.9. “Skiepai” bakterijoms prieš virusus ir plazmides**

Yra nemažai duomenų rodančių, jog CRISPR/Cas sistemos tarp skirtingų bakterijų ir archėjų rūšių gali būti pernešamos HGP mechanizmo pagalba (Godde ir Bickerton, 2006; Horvath *ir kiti*, 2009; Portillo ir Gonzalez, 2009). Pirmiausia, artimų bakterijų rūšių koduojamos CRISPR/Cas sistemos gali ženkliai skirtis, o evoliuciškai stipriai

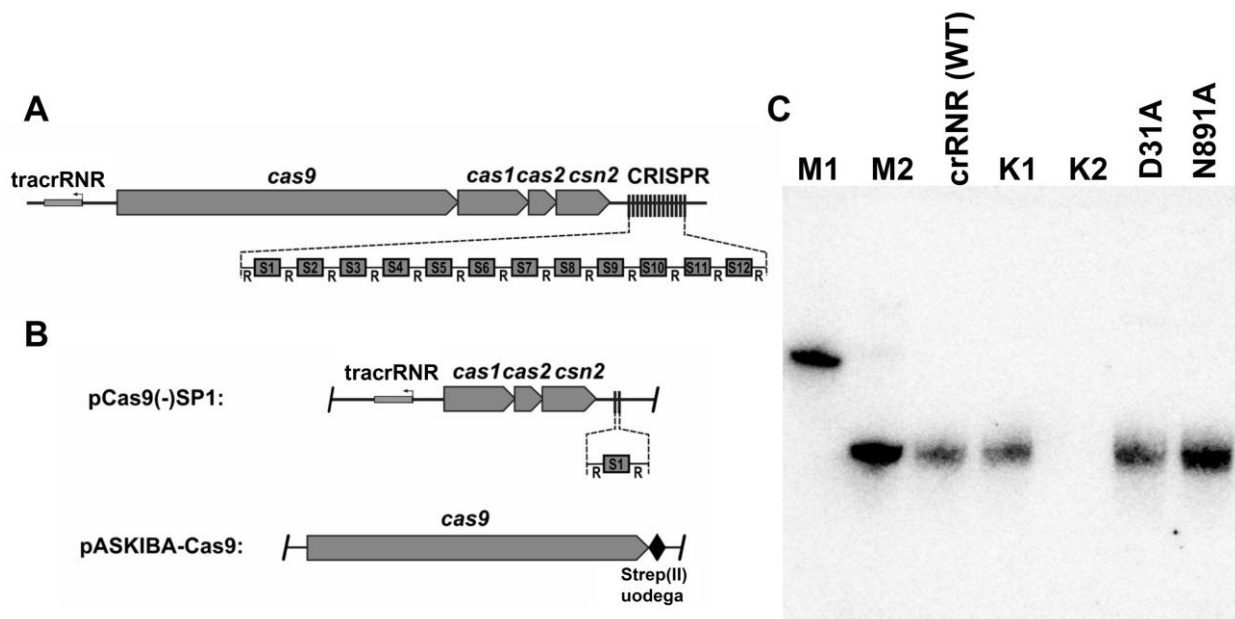
nutolę rūšys gali turėti panašias CRISPR/Cas sistemas (Haft *ir kiti*, 2005; Godde ir Bickerton, 2006; Makarova *ir kiti*, 2002). Pavyzdžiui, nustačius 3 labai giminingų *S. thermophilus* kamienų genomines DNR sekas paaiškėjo, jog du kamieniai CNRZ1066 ir LMG 18311 turi po dvi CRISPR/Cas sistemas (CRISPR1/Cas ir CRISPR2/Cas). LMD-9 kamienas turi papildomą II tipo sistemą – CRISPR3/Cas (Horvath *ir kiti*, 2008). Dar vienas *S. thermophilus* kamienas DGCC7710 turi papildomą I tipo CRISPR4/Cas sistemą (Horvath ir Barrangou, 2010). Taigi panašu, kad CRISPR4 sistema buvo įgyta vėliausiai HGP pagalba, juo labiau, kad šios rūšys turi gan aktyvią natūralios transformacijos sistemą (Fontaine *ir kiti*, 2010). HGP rodo ir tai, kad labai dažni kodonų neatitikimai ir skirtingas GC nukleotidų paplitimas tarp CRISPR/Cas sistemas koduojančių sekų bei aplinkinių sekų (Horvath *ir kiti*, 2009). Be to, šalia CRISPR/Cas sistemų dažnai randami judrieji genomo elementai (pvz. insercinės sekos), o keletas CRISPR/Cas sistemų yra koduojamos ne genomines DNR, bet didelių plazmidžių (>40 kbp) (Godde ir Bickerton, 2006) ar pro-fagų sekų (Sebahia *ir kiti*, 2006).

Šiame darbe mes pateikiame pirmuosius įrodymus, jog veikli CRISPR3/Cas sistema iš Gram-teigiamų *S. thermophilus* bakterijų genomo gali būti perkelta į Gram-neigiamos *E. coli* bakterijos plazmidę. Taip *E. coli* bakterijos gali būti apsaugotos nuo į ląstelę patenkančių bakterijų ir virusų DNR. Šis atradimas rodo, jog CRISPR/Cas sistemos gali veikti kaip mobilios genų kasetės, kurios įveikia barjerus tarp negiminingų rūšių, tokius kaip promotorių ir reguliacinių sekų nesuderinamumas. Sėkmingas veiklios CRISPR/Cas sistemos pernešimas į filogenetiškai nutolusį organizmą atveria naujas praktinio pritaikymo galimybes, tokias kaip bakterijų „paskiepijimas“ prieš virusų ir plazmidžių sekas. Neseniai buvo parodyta, jog CRISPR sistemos gali būti nutaikytos prieš atsparumą antibiotikams koduojančius genus (Garneau *ir kiti*, 2010), taigi heterologinės CRISPR/Cas sistemos galėtų būti panaudotos neleisti tam tikroms bakterijų rūšims įgyti atsparumo antibiotikams.

### **3. II Tipo CRISPR/Cas sistemų efektorinis kompleksas**

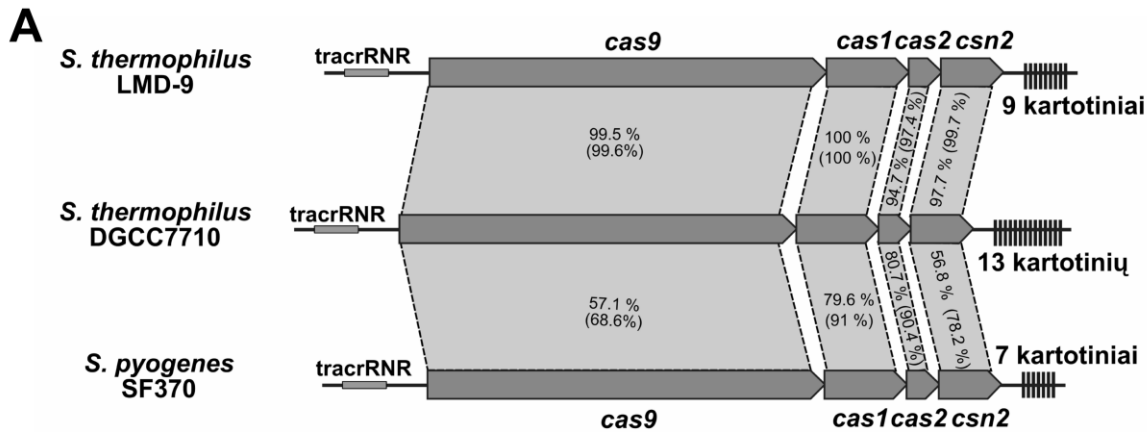
#### **3.1. Cas9-crRNR komplekso gryninimas ir sudėties analizė**

CRISPR3/Cas sistema sudaryta iš 4 *cas* genų išsidėsčiusių prieš CRISPR regioną (6A paveikslas). Norėdami išgryninti Cas9 baltymo kompleksą su homogenine crRNR, pirmiausia *cas9* geną klonavome į pASKIBA3 raiškos vektorių prie jo C-galo priliedami Strep(II) uodegą, skitą komplekso gryninimui (6B paveikslas). Siekdami, kad kompleksas turėtų tik vienos rūšies crRNR, sukonstravome pCas9(-)SP1 plazmidę, iš kurios buvo pašalintas *cas9* genas, bei paliktas tik vienas skirtukas (skirtukas-1) CRISPR regione (6B paveikslas). CRISPR3/Cas sistemos komponentai buvo koduojami dvejose atskirose plazmidėse bei reguliuojami skirtingais promotoriais todėl, kad gautume bendrą visų komponentų nurašymą, *cas9* geno raiška buvo vykdoma 2 etapais. Pirmiausia, Cas9 baltymo raiška buvo indukuota mažame *E. coli* kultūros tūryje 4 valandas. Po to, nedidelis kultūros kiekis užsėtas į terpę su induktoriumi ir inkubuota dar 17 valandų. Cas9 baltymas buvo išgrynintas panaudojant „Strep-Tactin Sepharose“ kolonėlę ir tikrinta, ar jis yra surišęs crRNR molekulę.



**6 paveikslas. Cas9 baltymas sudaro kompleksą su crRNR.** (A) *S. thermophilus* CRISPR3/Cas sistemos sandara. Keturi *cas* genai (*cas9*, *cas1*, *cas2* ir *csn2*) yra išsidėstę prieš CRISPR regioną, sudarytą iš 13 kartotinių (R) ir 12 unikalių skirtukų (S1-S12). TracrRNR, reikalinga crRNR brendimui II Tipo CRISPR/Cas sistemose (Deltcheva ir kiti, 2011) yra koduojama prieš *cas9* geną, priešingoje grandinėje. (B) Cas9-crRNR komplekso komponentų, koduojamų atskirose plazmidėse raiškos schema. *E. coli* RR1 kamienas turėjo pCas9(-)SP1 (koduoja Cas1, Cas2, Csn2, skirtuką-1 (S1) ir tracrRNR) ir pASKIBA-Cas9 (koduoja Cas9 su Strep(II) uodega) plazmides. (C) Cas9-crRNR komplekso “Northern blot” analizė panaudojant anti-crRNR oligonukleotidą kaip zondą. M1 – 84 nt ilgio oligodeoksinukleotidas turintis savo sudėtyje skirtuko-1 ir kartotinio seką; M2- 42 nt sintetinė RNR atitinkanti spėjama crRNR ilgį (7 paveikslas). crRNR (WT) – crRNR išskirta iš laukinio tipo Cas9-crRNR komplekso. K1 ir K2- crRNR (WT) mėginys inkubuotas atitinkamai su DNazės I arba RNazės I fermentais; D31A ir N891A– crRNR išskirta iš Cas9 D31A ir N891A mutantinių kompleksų.

CRISPR3/Cas sistema yra priskiriama IIA potipiui (Makarova ir kiti, 2011). Labai panašioje CRISPR/Cas sistemoje iš *Streptococcus pyogenes* bakterijų buvo parodyta, jog trans-koduojama mažoji RNR (tracrRNR) ir bakterijos fermentas RNazė III dalyvauja crRNR brendime. Susidariusi 42 nt crRNR turi 22 nt ilgio “3'-rankeną” iš kartotinio sekos bei 20 nt ilgio skirtuko fragmentą (Deltcheva ir kiti, 2011). Panašaus ilgio crRNR susidaro ir *S. thermophilus* LMD-9 kamieno CRISPR3/Cas sistemoje (Deltcheva ir kiti, 2011), kuri yra beveik identiška sistemai iš DGCC7710 kamieno (7A ir B paveikslas). Dėl šių priežasčių mes spėjome, kad DGCC7710 kamieno CRISPR3/Cas sistemos crRNR bus panašaus ilgio (7C paveikslas).



**B** Kartotinius koduojančios DNR:

	10	20	30	
DGCC7710	..... .....	..... .....	..... .....	..... .
LMD-9	GTTTTAGAGC	TGTGTTGTTT	CGAATGGTTC	CAAAAC
<i>S. pyogenes</i>	GTTTTAGAGC	TATGCTGTTT	TGAATGGTCC	CAAAAC
	*****	* ** *****	*****	* *****

tracrRNR koduojanti DNR:

	10	20	30	
DGCC7710	..... .....	..... .....	..... .....	..... .
LMD-9	TTTAACTCGC	TGTGTTGTTT	CGAATGGTTC	CAAACC
<i>S. pyogenes</i>	TTTAACTTGC	TATGCTGTTT	TGAATGGTTC	CAACAA
	*****	** * ** *****	*****	***

**C** Spėjama *S. thermophilus* DGCC7710 crRNR:

	-20	-10	10	20
	..... ..... .....		..... ..... ..... ..	
<i>S. pyogenes</i>	5' -GAUUUCUUCUUGCGCUUUUU		GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	3'
LMD-9	5' -GUUCACUGUACGAGUACUUA		GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG	3'
DGCC7710	5' -CGCUAAAGAGGAAGAGGACA		GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG	3'
			*****	** ***** *

**Skirtukas**

**Kartotinis**

7 paveikslas. II-A potipio CRISPR/Cas sistemų iš *S. thermophilus* DGCC7710, LMD9 bei *S. pyogenes* SF370 kamienų palyginimas. (A) CRISPR/Cas sistemų architektūros palyginimas. Nukleotidų sekos koduojančios tracrRNR, reikalingos crRNR brendimui *S. pyogenes* bakterijose (Deltcheva ir kiti, 2011) atitikmenys randami ir *S. thermophilus* kamienuose. Homologiški baltymai sujungti punktyrinėmis linijomis, bei pateiktas identiškų (panašių) aminorūgščių procentas. (B) Kartotinius ir tracrRNR molekules koduojančių sekų palyginimas. Sekos iš DGCC7710 ir LMD-9 kamienų yra vienodos. Nukleotidų sekos kurios, yra vienodos visuose kamienuose, pažymėtos žvaigždute. (C) crRNR sekų palyginimas. *S. pyogenes* crRNR seka nustatyta RNR sekoskaitos metodu (angl. “deep sequencing”). LMD-9 (Deltcheva ir kiti, 2011) ir DGCC7710 kamienų crRNR ilgis nustatytas “Northern blot” metodo pagalba.

Norėdami patikrinti ar išgrynintas Cas9 baltymas yra surišęs crRNR, kaip zondą naudojome 42 nt ilgio anti-crRNR viengrandinį DNR oligonukleotidą sudarytą iš 22 nt



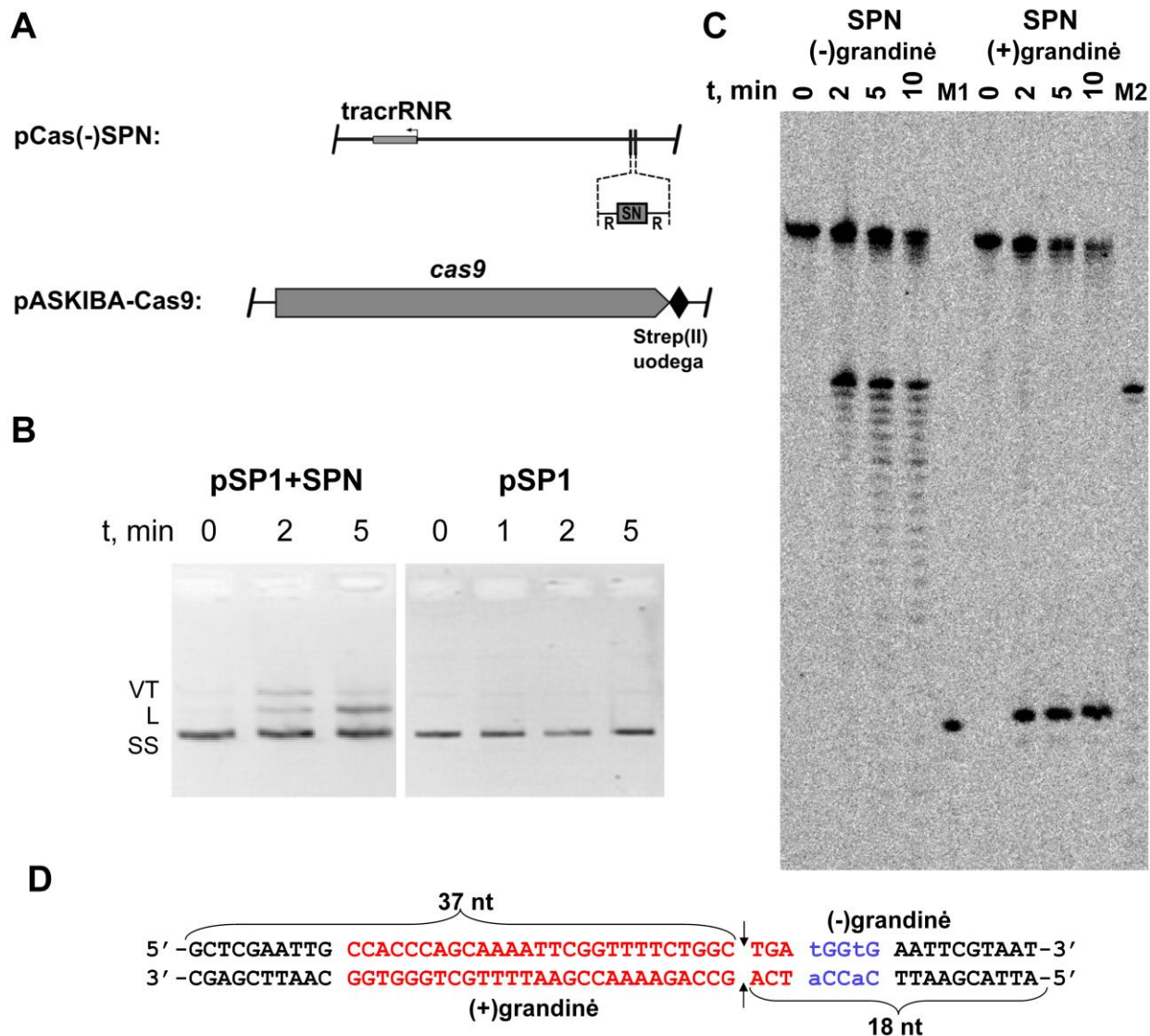
komplementarių kartotinio 3' galui bei 20 nt komplementarių skirtuko-1 5' galui. Nukleorūgštys, kurios buvo išgrynintos kartu su Cas9 baltymu, hibridizavosi su anti-crRNR oligonukleotidu, be to buvo karpomos RNazės, bet ne DNazės (6C paveikslas). Išskirtos RNR dydis buvo identiškas 42 nt ilgio sintetiniam oligoribonukleotidui, atitinkančiam spėjama crRNR ilgį (6C ir 7C paveikslas). Taigi, šie duomenys patvirtina, jog Cas9 baltymas sudaro kompleksą su 42 nt crRNR molekule, kilusia iš CRISPR3 regiono.

### 3.2. Cas9-crRNR kompleksas kerpa dvigrandinę DNR pro-skirtuko sekoje

Pradžioje norėdami patikrinti, ar išgrynintas Cas9-crRNR kompleksas yra veiklus, panaudojome SP1 oligodupleksą (1 lentelė), sudarytą iš pro-skirtuko sekos (pro-skirtukas-1) identiškos skirtukui-1 iš CRISPR3 regiono ir PAM sekos. (8A paveikslas). Oligoduplekso grandinę, komplementarią crRNR, pavadiname (+)grandine, o priešingą (-)grandine. Kad galėtume stebėti karpymo reakciją arba (+)grandinę, arba (-)grandinę buvo pažymėta 5' gale su radioaktyviu <sup>33</sup>P izotopu. Reakcijos produktų analizė parodė, kad abi oligoduplekso grandinės yra perkirtos vieną kartą fiksuotoje pozicijoje (8B paveikslas). Panaudodami sintetinius oligonukleotidus kaip dydžio žymeklius, nustatėme, jog abi grandinės perkerpamos pro-skirtuke, 3 nt prieš PAM seką (8C paveikslas). Kontroliniai eksperimentai patvirtino, jog crRNR yra būtina oligoduplekso kirpimui.

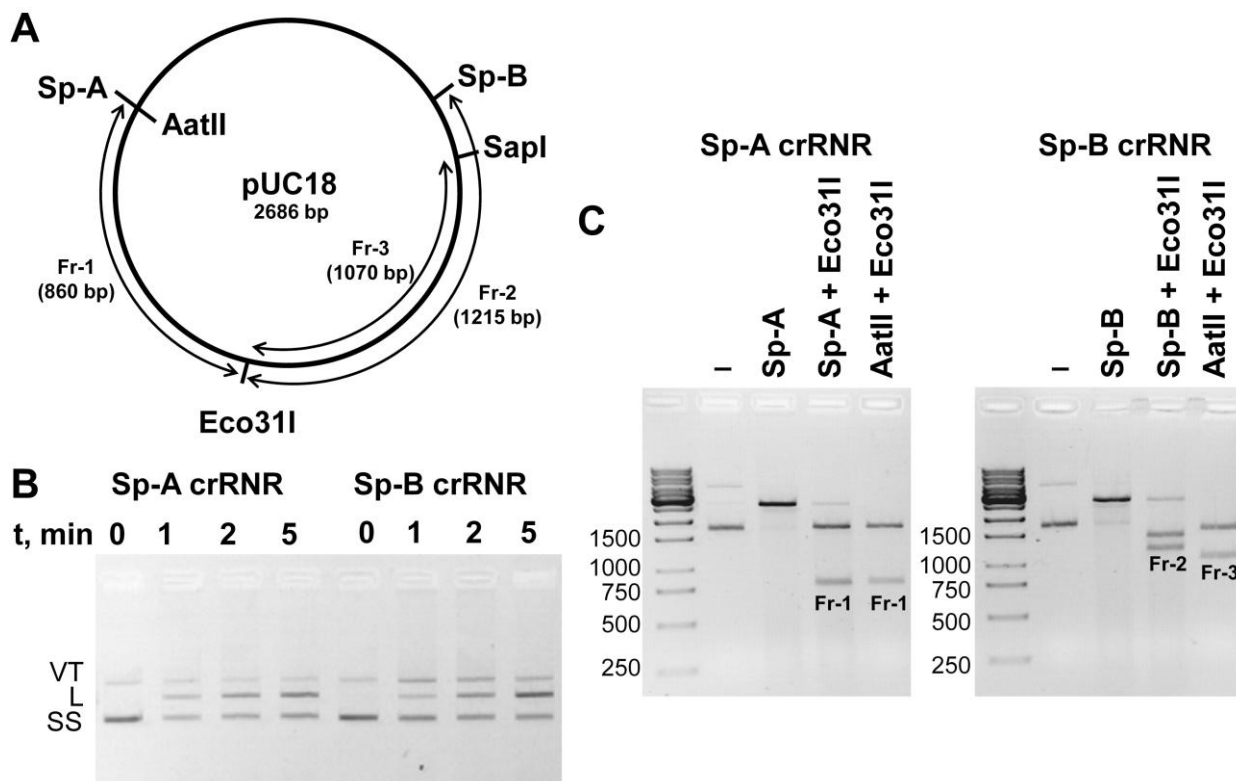
Norėdami patikrinti, ar Cas9-crRNR kompleksas *in vitro* sąlygose gali atpažinti pro-skirtuką ir perkirti DNR ilguose DNR substratuose, atitinkančiuose *in vivo* patenkančią svetimą DNR, mes tyrėme pSP1 plazmidės karpymą (8D paveikslas). Inkubuojant Cas9-crRNR kompleksą su susperspiralizuota plazmide, pSP1 buvo paverčiama į linijinę formą (8E paveikslas). Tuo tarpu pUC18 plazmidė, neturinti skirtukui-1 komplementarios sekos, liko sveika. Tai reiškia, kad abi pSP1 grandinės buvo perkirtos pro-skirtuko srityje. Tikslios kirpimo vietos nustatymui panaudojome DNR sekoskaitą. Buvo nustatyta, jog pSP1 plazmidė buvo kerpama pro-skirtuko sekoje, 3 nt nuo PAM sekos, t.y., toje pat pozicijoje kaip ir SP1 oligoduplekso atveju (8F paveikslas). *In vitro* nustatytos kirpimo vietos sutapo su anksčiau *S. thermophilus* CRISPR1/Cas sistemoje *in vivo* nustatytomis kirpimo vietomis (Garneau *ir kiti*, 2010).





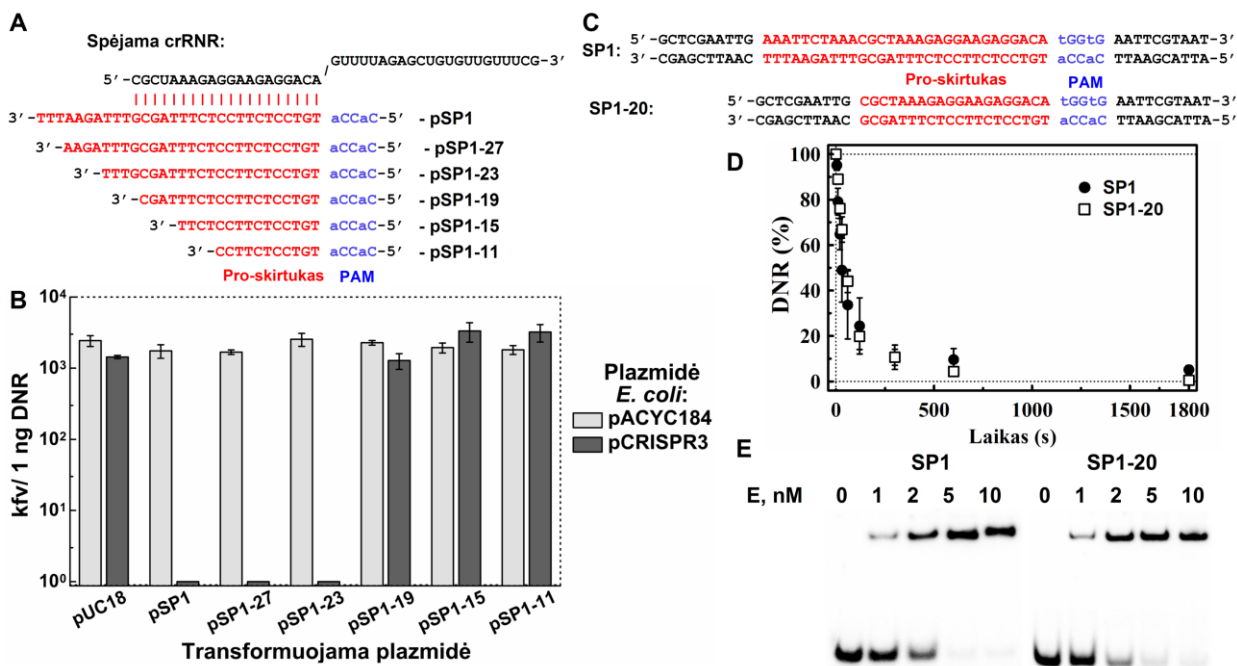
**9 paveikslas. Cas9-crRNR komplekso perprogramavimas.** (A) Cas9-crRNR komplekso raiškos schema. (B) Plazmidinių substratų karpymo eksperimentai. pSP1+SPN plazmidė turėjo ir pro-skirtuką1 ir pro-skirtuką-SN. Plazmidės formos: SS – superspiralizuota; VT-viengrandininį trūkų turinti; L – linijinė. (C) SPN oligoduplekso karpymas. Takeliai M1 ir M2 atitinka chemiškai susintetintus 18 nt ir 37 nt ilgio dydžio žymeklius, atitinkančius (-) ir (+)grandinių karpymo produktus. (D) SPN oligoduplekso kirpimo vietos pažymėtos rodyklėmis.

Naudodamiesi tuo pačiu principu, kaip aprašyta aukščiau, išgryninome 2 kompleksus, turinčius crRNR komplementarią taikiniams, esantiems pUC18 plazmidėje (10A paveikslas). Abu kompleksai, turintys crRNR molekules, nukreiptas prieš skirtingus taikinius pUC18, kirpo plazmidę reikiamose pozicijose (10B ir C paveikslas).



**10 paveikslas. pUC18 plazmidės karpymas panaudojant perprogramuotą Cas9-crRNR kompleksą.** (A) Kirpimo vietų ir susidarančių fragmentų schema. Sp-A taikinio vieta sutampa su restrikcijos endonukleazės AatII taikiniu, o Sp-B taikinis yra šalia SapI taikinio. (B) pUC18 karpymo reakcijų produktų agarozinis gelis. 2,5 nM pUC18 buvo inkubuota su 2 nM kompleksu, sudėtyje turinčio Sp-A arba Sp-B crRNR. Plazmidės formos: SS – superspiralizuota; VT-viengrandininį trūkų turinti; L – linijinė. (C) pUC18 kirpimas su Cas9-crRNR ir restrikcijos endonukleazėmis. 2,5 nM pUC18 buvo inkubuota su 5 nM Cas9-crRNR kompleksu 15 min 37°C temperatūroje (Sp-A ir Sp-B takeliai). Reakcijos stabdytos pakaitinant 5 min 65°C ir į reakcijos mišinį pridėta Eco31I restrikcijos endonukleazės. Gauti fragmentai Fr-1 (Sp-A + Eco31I) ir Fr-2 (Sp-B + Eco31I). DNR fragmentai gauti pUC18 plazmidę veikiant su AatII + Eco31I (Fr-1) ir AatII + Eco31I (Fr-3) buvo naudojami kaip dydžio žymekliai.

*S. thermophilus* CRISPR3/Cas sistemos visi skirtukai yra 30 nt ilgio (Horvath ir kiti, 2008). Cas9 baltymas suriša 42 nt ilgio crRNR, kurioje 22 nt yra kilę iš DNR kartotinio sekos. Tokiu atveju, tik 20 nt iš crRNR yra komplementari dvigrandinės DNR pro-skirtuko (+)grandinei. Taigi, norėdami išsiaiškinti ar 5' pro-skirtuko galas yra svarbus, mes sukonstravome plazmidės pSP1-27, pSP1-23, pSP1-19, pSP1-15 ir pSP1-11 (11A paveikslas), turinčias nuo 5' galo sutrumpintą pro-skirtuką ir analizavome *E. coli* kamieno, turinčio pilno ilgio CRISPR3/Cas sistemą, transformacijos efektyvumą (11B paveikslas). Plazmidės, turinčios 4 arba 7 nt trumpesnį pro-skirtuką, netransformavo *E. coli* bakterijų, kaip ir pilno ilgio pro-skirtuką turinti pSP1 plazmidė. Tuo tarpu trumpesnės pro-skirtuko versijos (11, 15 ar 19 bp) padėjo plazmidei išvengti CRISPR sąlygojamo atsparumo. Taigi, šie duomenys rodo, jog 5' pro-skirtuko gale esantys 10 nt, kurie nėra komplementarūs crRNR, nėra reikalingi CRISPR3 sąlygotam atsparumui. Be to, *in vitro* eksperimentai parodė, jog 20 nt ilgio pro-skirtuką turintis oligodupleksas (11C paveikslas) yra efektyviai karpomas bei surišamas Cas9-crRNR kompleksu (11D ir E paveikslas).



**11 paveikslas. Pro-skirtuko ilgio įtaka CRISPR koduojamam atsparumui.** (A) Plazmidės naudotos transformacijos ribojimo eksperimentuose. (B) Pro-skirtuko ilgio įtaka plazmidės transformacijos efektyvumui. Transformacijos efektyvumas išreikštas kfv/1 ng plazmidės (vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis). (C) Oligodupleksai naudoti karpymo ir surišimo tyrimo eksperimentuose. (D) Oligodupleksų, turinčių 30 bp (SP1, juodi apskritimai) ir 20 bp (SP1-20, kvadratai) ilgio pro-skirtukus, karpymo su Cas9-crRNR kompleksu greičio palyginimas. (E) SP1 ir SP1-20 oligodupleksų surišimo tyrimai.

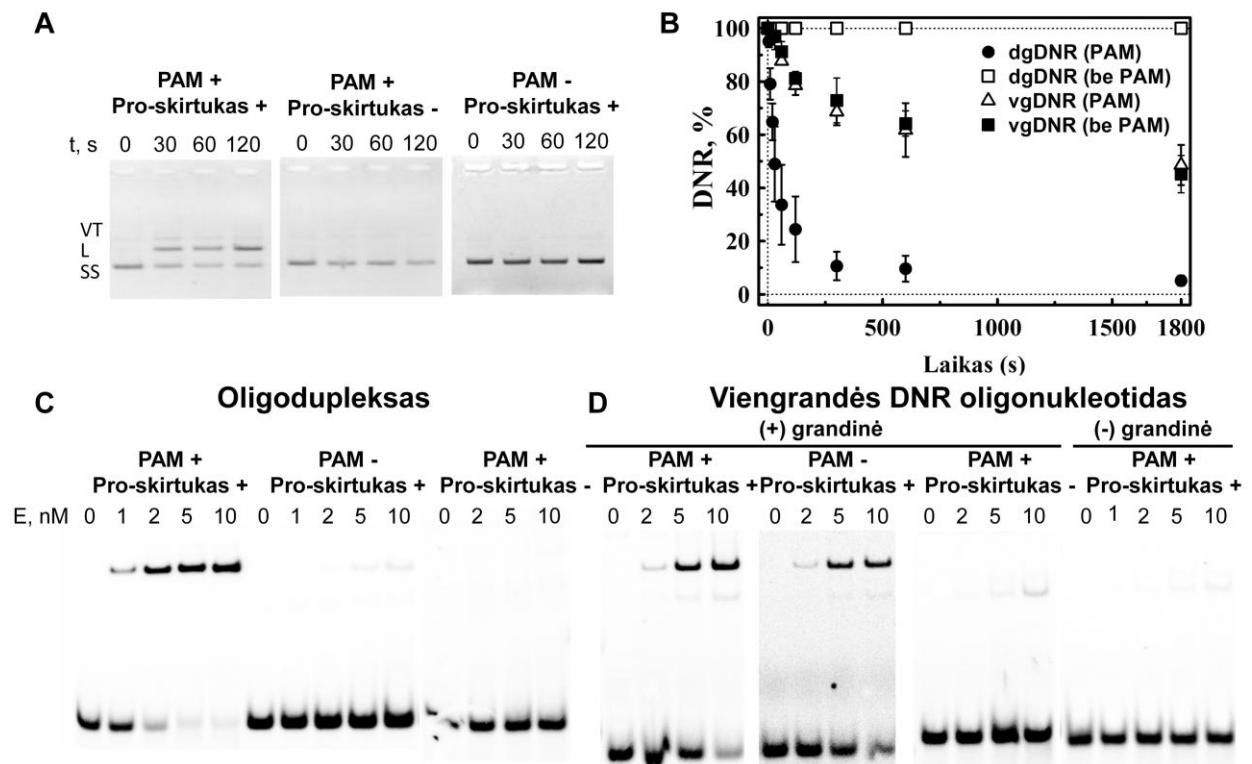
### 3.4. PAM seka yra būtina DNR taikinių surišimui ir perkirpimui

Plazmidės, kurios savo sudėtyje neturi reikiamos PAM sekos (pSP1-p $\Delta$ ) arba pro-skirtuko (pUC18), išlieka nepakitusios, kai yra inkubuojamos su Cas9-crRNR kompleksu (12A paveikslas). Šie rezultatai patvirtina *in vivo* eksperimentus, kad PAM seka yra būtina CRISPR3/Cas sistemos sąlygojamam atsparumo užtikrinimui. Tačiau neaišku, ar PAM yra atpažįstama dvigrandininėje ar viengrandininėje DNR formoje. Norėdami tai išsiaiškinti, tyrėme Cas9-crRNR komplekso gebėjimą suriši ir perkirpti įvairius oligonukleotidinius substratus: a). SP1 (turi ir pro-skirtuką, ir PAM); b). SP1- $\Delta$ p (neturi PAM); c). SP2 (turi tik PAM). Šių oligonukleotidų (+)grandinės buvo naudojamos kaip viengrandininiai DNR substratai (s(+))SP1, s(+))SP1- $\Delta$ p, s(+))SP2) (1 lentelė).

Kaip ir plazmidinių substratų atveju, oligoduplekso, kuris savo sudėtyje turėjo tik pro-skirtuką, bet ne PAM, Cas9-crRNR kompleksas nekarpė. Kita vertus viengrandininis oligonukleotidas ((+) grandinė) yra karpomas tokiu pat greičiu nepriklausomai nuo to, ar jis turi PAM (12B paveikslas). Šie duomenys rodo, jog PAM seka yra reikalinga dvigrandininės DNR karpymui.

Ar PAM seka yra svarbi DNR taikinio surišimui, tikrinome panaudodami elektroforetinio judrumo poslinkio poliakrilamidiniame gelyje metodą. Siekiant išvengti DNR skaldymo, visi eksperimentai buvo atliekami be Mg<sup>2+</sup> jonų, kurie reikalingi Cas9-crRNR komplekso katalizuojamam kirpimui. Kaip matome iš rezultatų (12C ir D

paveikslas), Cas9-crRNR kompleksas dvigrandinines ir viengrandines DNR molekules rišo skirtingai. Tiriant SP1 oligodupleksą, mažo judrumo kompleksas stebimas esant 1 nM Cas9-crRNA koncentracijai (12C paveikslas). Tuo tarpu DNR surišimas nestebimas, kai naudojamas substratas be PAM arba pro-skirtuko. Be to, dvigrandinė DNR nėra rišama, kai naudojamas Cas9 baltymas be crRNR. Taigi, šie eksperimentai rodo, kad Cas9 sąveikai su dvigrandinine DNR yra reikalinga tiek DNR substrate esanti PAM, tiek DNR taikiniui komplementari crRNR. Viengrandinės DNR oligonukleotidus ((+)grandinė) Cas9-crRNR kompleksas riša nepriklausomai ar jie turi, ar neturi PAM seką (12C ir D paveikslas).

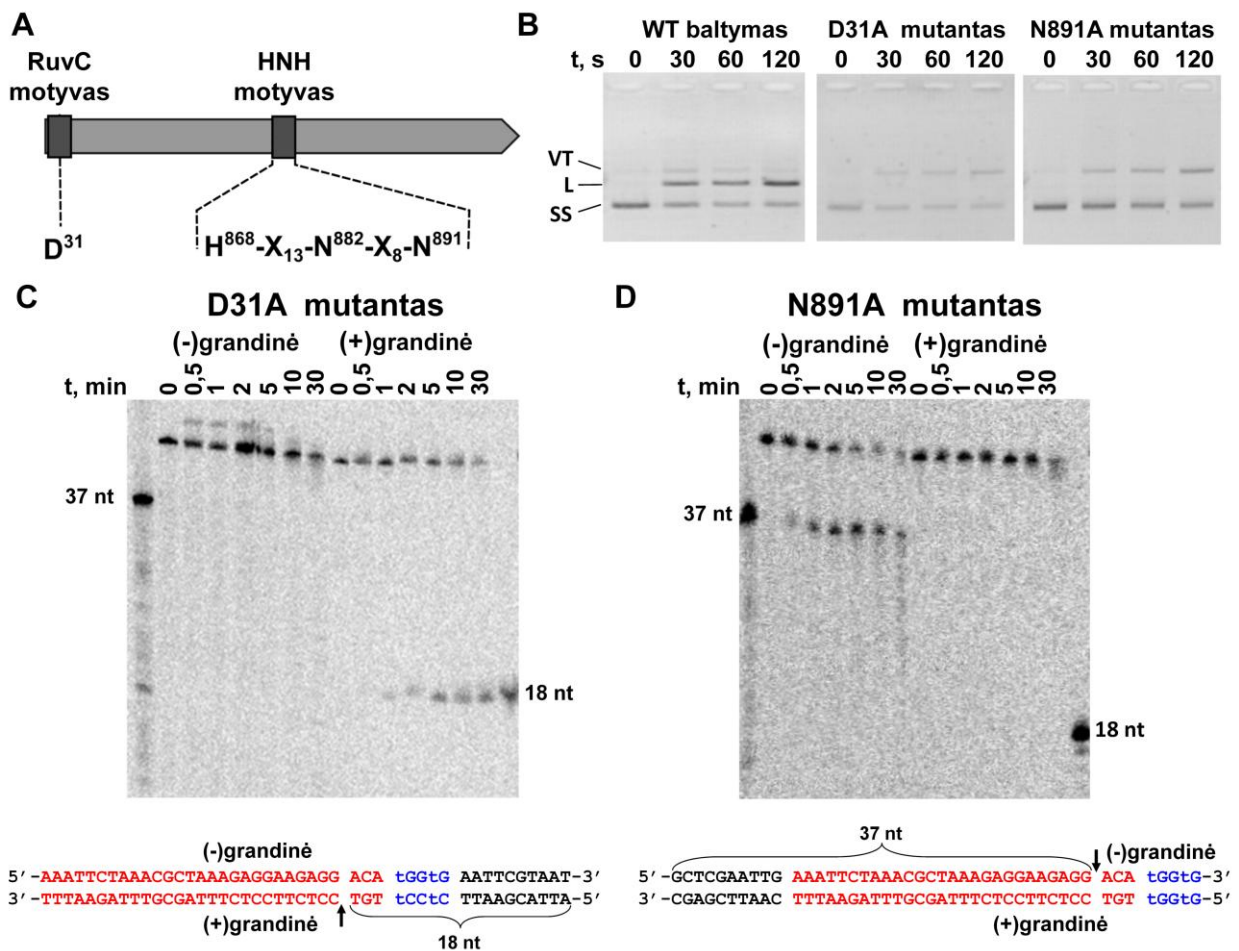


**12 paveikslas. DNR surišimui ir kirpimui su Cas9-crRNR kompleksu reikalinga PAM seka.** (A) Plazmidinio substrato karpymo tyrimai. Trys skirtingos plazmidės, PAM+Pro-skirtukas+ (pSP1), PAM+Pro-skirtukas- (pUC18) ir PAM-Pro-skirtukas+ (pSP1-pΔ), buvo inkubuojamos su Cas9-crRNR kompleksu. Plazmidės formos: SS – superspiralizuota; VT-viengrandininį trūkį turinti; L – linijinė. (B) (+)grandinės karpymo dvigrandininiuose ir viengrandininuose DNR substratuose greičio palyginimas. 2 nM Cas9-crRNR komplekso inkubuota su 1 nM oligodeoksinukleotido 37°C temperatūroje. SP1 (juodi apskritimai) ir SP1-pΔ (balti kvadratai) oligodupleksai naudoti kaip dgDNR, o s(+)SP1 (balti trikampiai) ir s(+)SP1-pΔ (juodi kvadratai) naudoti kaip vgDNR substratai. (C) ir (D) Cas9-crRNR komplekso dgDNR ir vgDNR substratų surišimo tyrimai. Naudota 0,5 nM radioaktyviai žymėto vgDNR arba dgDNR oligonukleotido, baltymo koncentracijos parašytos virš kiekvieno takelio.

Kai kurios III Tipo CRISPR/Cas sistemos kerpa ne DNR, bet RNR, todėl mes tyrinėjome ar Cas9-crRNR kompleksas gali atpažinti ir kirpti RNR molekules. Nei vgRNR, nei dgRNR turinčios reikiamą pro-skirtuką ir PAM nebuvo kerpanos (duomenys nepateikti), tačiau kompleksas galėjo surišti viengrandines RNR molekules, jei jos buvo komplementarios crRNR ((+)grandinė). Šie duomenys atitinka teoriją, jog pirminis II Tipo CRISPR/Cas sistemų taikiny yra DNR.

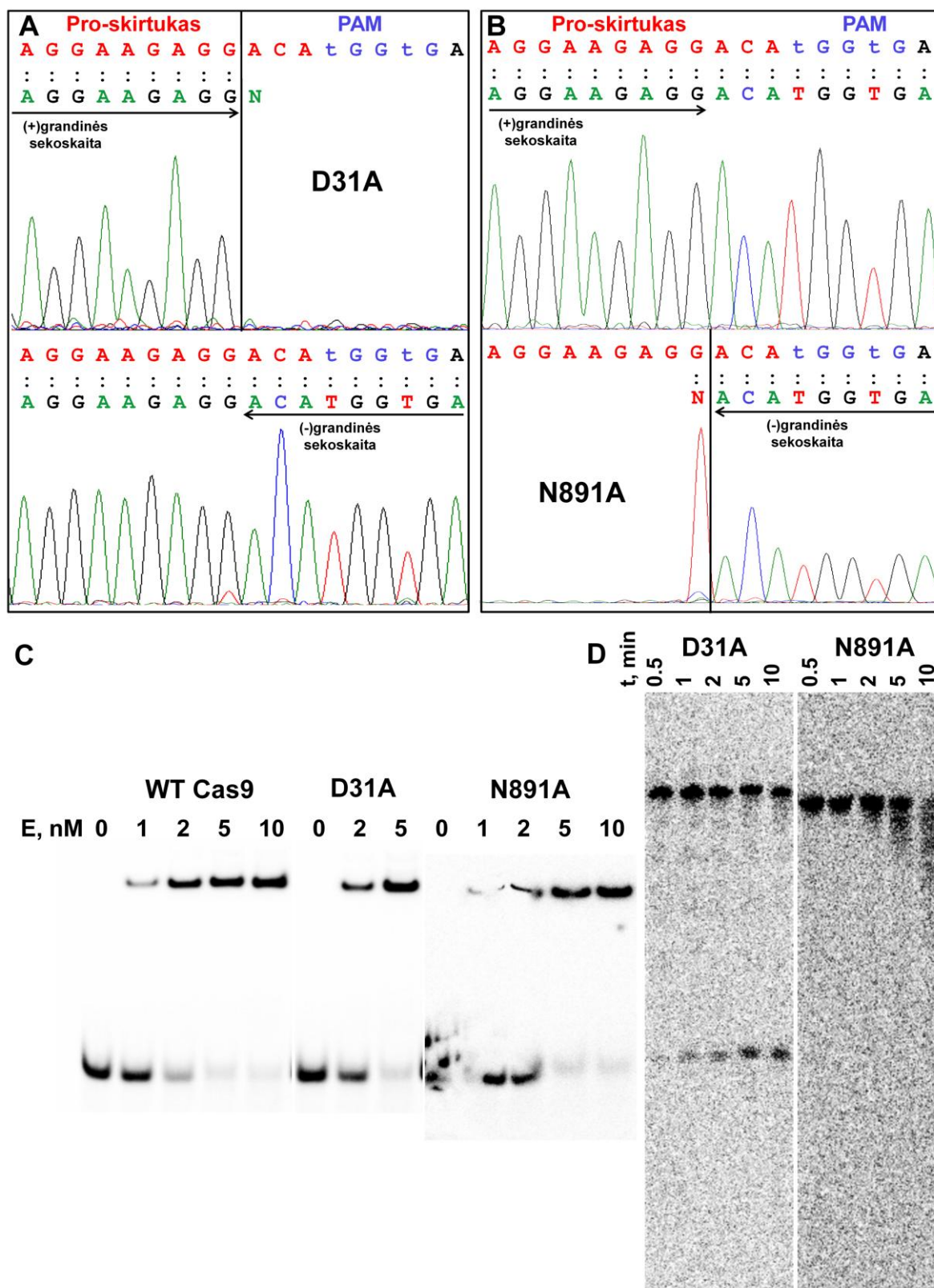
### 3.5. Cas9 baltymo RuvC ir HNH motyvų mutagenezė

Ankščiau aprašyti plazmidžių transformacijos ribojimo eksperimentai patvirtino, jog RuvC ir HNH motyvai yra reikalingi Cas9 baltymo funkcijos atlikimui (žiūrėti 2.7 skyrių). Norėdami patikrinti, ar šie motyvai tiesiogiai dalyvauja DNR taikinio kirpime, sukonstravome ir išgryninome Cas9 baltymo D31A ir N891A mutantus. Abu mutantiniai baltymai sudarė kompleksą su tokio pat ilgio crRNR, kaip ir laukinio tipo baltymas (6 paveikslas). Pirmiausia, atlikome pSP1 plazmidės karpymo su mutantiniais Cas9-crRNR kompleksais eksperimentus. Įdomu tai, jog abiejų mutantų atveju gauti viengrandinię DNR trūkį turintys produktai (13B paveikslas), kas rodytų, jog kerpama tik viena iš taikinio esančio plazmidinėje DNR grandinių.



**13 paveikslas. RuvC ir HNH aktyvūs centrai dalyvauja priešingų DNR grandinių kirpime.** (A) RuvC ir HNH motyvų išsidėstymo Cas9 baltyme schema. (B) pSP1 karpymo mutantiniais Cas9-crRNR kompleksais tyrimas. (C) ir (D) D31A ir N891A mutantų giminingumas DNR taikinio grandinėms. D31A mutantas karmo tik (+)grandinę, o N891A mutantas - tik (-)grandinę.

Siekdami išsiaiškinti, ar Cas9-crRNR komplekso D31A ir N891A mutantai specifiškai kerpa kurią nors vieną DNR grandinę, tyrėme SP1 oligoduplekso karpymą. Nustatėme, jog RuvC motyvo mutantas (D31A) kirpo tik (+)grandinę, tuo tarpu HNH motyvo mutantas (N891A) kirpo tik (-)grandinę. Abiem atvejais buvo kerpama toje pat vietoje, kaip ir WT komplekso atveju (13 C ir D paveikslas), o komplementari grandinė nebuvo kerpama. Šie duomenis būtų galima paaiškinti, jei RuvC ir HNH aktyvūs centrai kirptų priešingas DNR taikinio grandines.



**14 paveikslas. Cas9-crRNR mutantinių kompleksų savybės.** (A) ir (B) Reakcijos produktų gautų kerpant pSP1 plazmidę su RuvC ir HNH aktyvaus centro mutantais sekoskaita. (C) Cas9-crRNR komplekso ir jo mutantų susirišimo su SP1 oligodupleksu tyrimai. (D) Viengrandinio (+)SP1 oligonukleotido karpymas mutantiniais Cas9-crRNR kompleksais.

Norėdami išsiaiškinti, ar ilgesni substratai (pvz., plazmidės) karpomi taip pat, kaip ir oligodupleksai, nustatėme viengrandinį trūkį turinčių plazmidžių pro-skirtukų regionų



sekas. Gauti duomenys patvirtino, jog RuvC aktyvaus centro mutantas kerpa tik taikinio (+)grandinę, o HNH aktyvaus centro mutantas tik (-)grandinę (14A ir 14B paveikslas). Be to, kaip ir buvo galima tikėtis, RuvC mutantas kirpo viengrandininę oligonukleotidą ((+)grandinė), o HNH mutantas ne (14D paveikslas).

DNR susirišimo tyrimai (14C paveikslas) parodė, jog abu mutantiniai kompleksai dvigrandininę SP1 oligodupleksą riša su panašiu giminingumu, kaip ir laukinio tipo baltymas. Tai rodo, kad mutacijos aktyviame centre neturi įtakos komplekso gebėjimui surišti substratą. Kadangi mutantiniuose kompleksuose randama 42 nt ilgio crRNR, kompleksai prarado gebėjimą perkirpti vieną iš DNR taikinio grandinių dėl mutacijų įtakos. Gelfiltracijos eksperimentai parodė, kad Cas9 baltymas turintis (His)<sub>6</sub> uodegą tirpale egzistuoja kaip monomeras (duomenys nepateikti), todėl greičiausiai Cas9 baltymas komplekse veikia monomerinėje formoje ir panaudoja 2 aktyvius centrus perkirpti abiemis DNR grandinėms. Panašią strategiją naudoja kai kurios restrikcijos endonukleazės (Armalyte *ir kiti*, 2005).

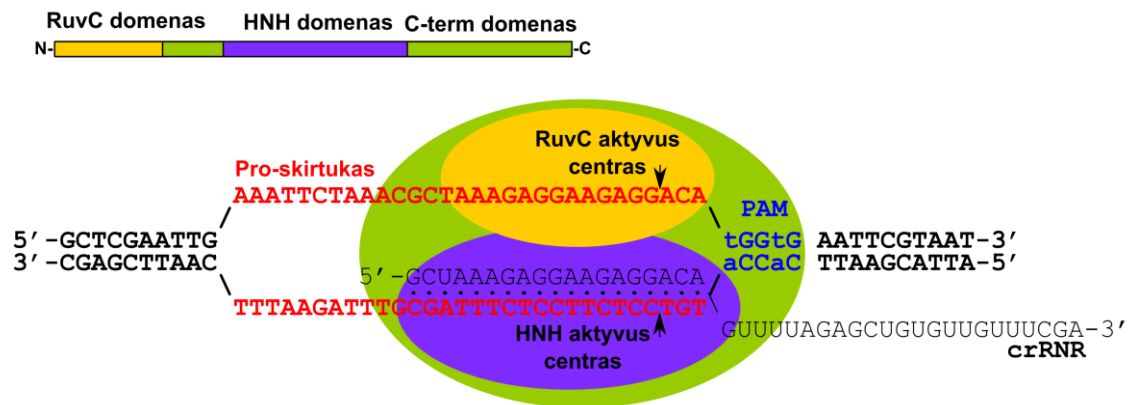
### **3.6. Cas9-crRNR kompleksas kerpa taikinius dvigrandininėje DNR**

Šio darbo rezultatai rodo, jog Cas9-crRNR kompleksas iš II Tipo CRISPR/Cas sistemų, veikia kaip endonukleazė, kerpanči abi DNR grandines pro-skirtuko viduje, 3 nt prieš PAM seką. Galutinis reakcijos produktas turi bukus DNR galus. Komplexas taikinį atpažįsta panaudodamas 42 nt ilgio crRNR molekulę, kurios 20 nukleotidų yra komplementarūs taikinio pro-skirtuko sekai. Todėl nenuostabu, kad 10 labiausiai nuo PAM nutolusių pro-skirtuko bazių porų pakeitimas nedaro įtakos DNR taikinio karpymui (11 paveikslas).

Cas9 baltymas DNR taikinio perkirpimui panaudoja du aktyvius centrus. RuvC ir HNH tipo aktyvūs centrai yra randami skirtinguose domenuose ir nepriklausomai vienas nuo kito perkerpa atskiras DNR grandines. Vieną iš aktyviuose centruose esančių svarbių aminorūgščių pakeitus į alaniną, Cas9-crRNR kompleksas įveda trūkį tik į vieną grandinę, ir šiuo atžvilgiu tampa panašus į gamtoje randamus fermentus – nikazes (Chan *ir kiti*, 2011). Kaip anksčiau buvo pademonstruota *in vivo* sąlygomis, Cas-crRNR komplekso katalizuojamam dgDNR kirpimui būtina PAM seka. Dvigrandininės DNR taikiniai yra surišami ir perkerpami tik tada, kai substratas turi tiek pro-skirtuką (seką komplementarią crRNR), tiek PAM. Viengrandininės DNR surišimui ir kirpimui PAM seka nėra būtina, o kirpimą atlieka tik HNH aktyvus centras.

### **3.7. DNR sunaikinimo mechanizmas II tipo CRISPR/Cas sistemose**

Šio darbo rezultatai atskleidžia pirmąsias modelinės II tipo CRISPR3/Cas sistemos efektorinio komplekso veikimo detales (15 paveikslas). Pirmiausia, Cas9-crRNR kompleksas, kol kas dar nežinomo mechanizmo dėka, suranda taikinį ir prisijungia prie pro-skirtuko sekos dvigrandininėje DNR molekulėje, jei šalia yra PAM. PAM seka greičiausiai veikia arba kaip pirminė vieta DNR grandinių atskyrimui, arba padeda stabilizuoti susidariusią R-kilpą, nes dvigrandininės DNR taikiniai neturintys PAM nėra surišami.



**15 paveikslas. Cas9-crRNR komplekso sandaros schema ir dgDNR kirpimo mechanizmas.** Spėjama Cas9 baltymo domeninė organizacija pavaizduota paveikslo viršuje. Cas9-crRNR kompleksas suriša dgDNR, turinčią PAM seką. crRNR atpažįsta komplementarią (+) grandinę, todėl DNR grandinės yra išskiriamos ir susidaro R-kilpa. Tretiniame komplekse RuvC aktyvus centras atsiduria šalia laisvos (-) DNR grandinės, o HNH šalia su crRNR susiporavusios (+) grandinės skeliamų fosfatų. Abu aktyvūs centrai kerpa DNR grandines toje pat vietoje, 3 nt nutolusioje nuo PAM sekos.

Nors dar trūksta detalių, mūsų duomenys rodo, kad PAM seka atpažįstama dgDNR formoje. Cas9-crRNR prisijungimas prie taikinio lemia R-kilpos struktūros susidarymą, kur DNR (-) grandinė lieka laisva, tuo tarpu (+) grandinė susiporuoja su komplementaria crRNR. Esant  $Mg^{2+}$  jonų abi grandinės kerpamos toje pat pozicijoje, nutolusioje per 3 nukleotidus nuo PAM sekos, todėl susidaręs produktas turi bukus galus. Tolimesnį svetimos DNR sunaikinimą greičiausiai atlieka ląstelės DNR nukleazės. Cas9 baltymo mutagenėzė parodė, jog RuvC ir HNH aktyvūs centrai perkerpa atitinkamai (-) ir (+) grandines. Todėl manome, jog baltymo N-gale esantis RuvC aktyvaus centro motyvas ir D31 amino rūgštis yra išsidėstę šalia nesuporuotos (-) grandinės, tuo tarpu centrinė baltymo dalis koduojanti HNH motyvą yra šalia (+) grandinės. Po kirpimo reakcijos Cas9-crRNR kompleksas lieka prisijungęs prie reakcijos produktų.

Kadangi *cas9* genas yra aptinkamas tiek II-A, tiek II-B tipo sistemose, kad pasiūlytas mechanizmas turėtų būti konservatyvus visose II tipo CRISPR/Cas sistemose.

### 3.8. CRISPR/Cas sistemų efektorinių kompleksų palyginimas

Šiame darbe pasiūlytas Cas9-crRNR komplekso DNR kirpimo mechanizmas smarkiai skiriasi nuo kitų tipų CRISPR/Cas sistemų DNR interferencijos mechanizmų. I-E potipio CRISPR/Cas sistemose crRNR ir Cas baltymai formuoja didelį ribonukleoproteininį kompleksą (Cascade), kuris padeda susidaryti crRNR ir komplementarios DNR grandinės dupleksui. Taikinio atpažinimui būtina PAM seka, esanti pro-skirtuko 5' gale. Hibridizacija prasideda nuo trumpos pirminės (*angl.* “seed”) sekos, kuri yra 5' skirtuko dalyje (Semenova *ir kiti*, 2011). Nors Cascade-crRNR kompleksas sugeba surišti dvigrandinę DNR, kirpimui reikalingas papildomas Cas3 baltymas (viengrandinės DNR nukleazė ir helikazė) (Sinkunas *ir kiti*, 2011).

III-B potipio sistemose, kurios randamos daugelyje archėjų ir kai kuriose bakterijose, Cas baltymai (Cmr) ir crRNR sudaro prieš RNR nukreiptą efektorinį kompleksą (Hale *ir kiti*, 2009, 2012). *P. furiosus* RNR interferencijos kompleksas, kurį sudaro 6 baltymai

(Cmr1, Cas10 ir Cmr3-6) bei crRNR, suriša RNR taikinį ir perkerpa jį fiksuotoje pozicijoje per 14 nt nutolusioje nuo crRNR molekulės 3' galo. Nors reakcijai reikalingi  $Mg^{2+}$  jonai, kol kas nežinoma, kuris iš baltymų katalizuoja RNR taikinio perkirpimą. Tuo tarpu *S. solfataricus* bakterijų III-B potipio CRISPR/Cas sistemos efektoriniam kompleksui, sudarytam iš 7 skirtingų Cmr baltymų ir crRNR, būdingas kitoks RNR taikinio perkirpimo mechanizmas. RNR yra skeliama ne fiksuotoje pozicijoje, o ties UA dinukleotidais (Zhang *ir kiti*, 2012). Abi šios sistemos yra nepriklausomos nuo PAM sekos.

Nors II tipo CRISPR/Cas sistemų Cas9-crRNR kompleksas iš esmės atlieka tokią pat funkciją, kaip Cascade ir Cas3 I-E potipio sistemose, jis yra žymiai paprastesnis. Paprasta komplekso sudėtis, kur crRNR atpažįsta DNR taikinį, o abi DNR grandines perkerpa vienintelis baltyminis komplekso komponentas, atveria galimybes universalios RNR-nukreipiančios endonukleazės konstravimui. Pakeičiant crRNR seką Cas9-crRNR komplekso viduje, gali būti kuriamos programuojamos endonukleazės kryptingam DNR karpymui *in vitro* ir *in vivo*. Siekdami parodyti principinę tokio pritaikymo galimybę, mes į CRISPR regioną įstatėme naujus skirtukus, nutaikytus į konkrečią vietą plazmidėje. Naujai išgryninti kompleksai kirpo plazmides tik tose vietose į kurias buvo nutaikyti. Tai, jog Cas9 baltymo RuvC ir HNH aktyvių centrų mutantai veikia, kaip sekai giminingi vieną grandinę kerpančios fermentai, atveria galimybes kryptingai įvesti viengrandinius DNR trūkius norimoje vietoje. Taigi, šis mūsų atradimas atveria kelius nauju molekulinu įrankiu kūrimui.

## IŠVADOS

1. CRISPR3/Cas sistema iš Gram-teigiamų *S. thermophilus* bakterijų suteikia Gram-neigiamam *E. coli* šeimininkui apsaugą prieš bakteriofagus ir plazmides.
2. Cas9 yra vienintelis Cas baltymas būtinas atsparumo prieš svetimą DNR užtikrinimui II tipo CRISPR/Cas sistemose.
3. Cas9 baltymas sudaro ribonukleoproteininį kompleksą su 42 nt ilgio crRNR.
4. crRNR nukreipia Cas9 baltymą prie DNR taikinio, o kirpimui yra būtinas trumpas konservatyvus DNR sekos motyvas esantis šalia DNR taikinio.
5. Cas9 panaudoja du atskirus aktyvius centrus, RuvC ir HNH, priešingų DNR grandinių kirpimui.

# MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

## Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Sapranauškas, R., **Gasiunas, G.** \*, Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39, 9275–82.  
\* - pirmas autorius kartu su R. Šapranaušku
2. **Gasiunas**, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(39):E2579–2586.

## Kitos publikacijos:

3. Sinkunas, T., **Gasiunas, G.**, Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.* 30, 1335–42.
4. **Gasiunas, G.**, Sasnauskas, G., Tamulaitis, G., Urbanke, C., Razaniene, D., and Siksnys, V. (2008). Tetrameric restriction enzymes: expansion to the GIY-YIG nuclease family. *Nucleic Acids Res.* 36, 938–49.
5. Armalyte, E., Bujnicki, J.M., Giedriene, J., **Gasiunas, G.**, Kosiński, J., and Lubys, A. (2005). Mva1269I: a monomeric type IIS restriction endonuclease from *Micrococcus varians* with two EcoRI- and FokI-like catalytic domains. *J Biol Chem.* 280, 41584–94.

## Knygų skyriai:

6. Horvath P, Gasiunas G, Siksnys V, Barrangou R. (2013) Applications of the Versatile CRISPR-Cas Systems. “CRISPR-Cas Systems”. R. Barrangou and J. van der Oost (editoriai), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (priimta).

## Patentinė paraiška:

7. Siksnys, V., **Gasiunas, G.**, Karvelis, T. (2012) RNA-directed DNA cleavage by the Cas9-crRNA complex from CRISPR3/Cas immune system of *Streptococcus thermophilus*. JAV patentinė paraiška Nr.: 61/613,373.

## Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **G. Gasiunas**, R. Sapranauškas, P. Horvath, V. Siksnys. Cas protein complexes. Production and characterization of macromolecular complexes, IGBMC, Illkirch, Strasbourg, France; 2012.03.19-21.

2. **G. Gasiunas**, R. Sapranaukas, G. Sasnauskas, P. Horvath, V Siksnyš. Quest for *S. thermophilus* Cas protein function. CRISPR: Mechanism and application. Wageningen University, Wageningen, Netherlands; 2010.10.21-22.
3. R. Sapranaukas, **G. Gasiunas**, P. Horvath, V. Siksnyš. Cloning of the *S. thermophilus* CRISPR3 system in heterologous host. CRISPR: Mechanism and application. Wageningen university, Wageningen, Netherlands; 2010.10.21-22.
4. **G. Gasiunas**, R. Sapranaukas, G. Sasnauskas, P. Horvath, V Siksnyš. Quest for *S. thermophilus* Cas protein function. 6th New England Biolabs Meeting on Restriction/Modification, Jacobs University, Bremen, Germany; 2010.08.01-06.

## FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo finansuoti Visuotinės dotacijos (R100) bei Žiliberio programos projektų lėšomis.

# CURRICULUM VITAE

<b>Vardas, Pavardė</b>	Giedrius Gasiūnas
<b>Gimimo data</b>	1983 03 05
<b>Darbo adresas</b>	Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius Vilniaus universitetas Biotechnologijos institutas V.A. Graičiūno 8 Vilnius LT-02241
<b>Telefonai</b>	+370 5 2602111 (darbo) +370 656 18738 (asmeninis)
<b>Faksas</b>	+370 5 2602116 (darbo)
<b>E-paštas</b>	gasiunas@ibt.lt
<b>Išsilavinimas</b>	
2001-2005	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2005-2007	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
<b>Darbo patirtis</b>	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius
2005-2007	Laborantas
2007-2011	Bioinžinierius
2011-dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas

## PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui prof. Virginijui Šikšniui už vadovavimą šiam darbui, mokslines diskusijas bei vertingus pasiūlymus, taip pat už pagalbą ruošiant šią disertaciją.

Dėkoju savo buvusiems vadovams bakalaurnio ir magistrinio darbo ruošimo metu: Elenai Armalytei, dr. Giedriui Sasnauskui ir dr. Gintautui Tamulaičiui už darbo laboratorijoje pradžiamokslį.

Dėkoju dr. Rimantui Šapranuskui už CRISPR3/Cas sistemos klonavimą ir mutacinę analizę, bei diskusijas CRISPR tema.

Esu dėkingas dr. Philippe Horvath iš “DuPont” (ankščiau “Danisco”) kompanijos už genominę *S. thermophilus* DGCC7710 kamieno DNR.

Dėkoju kolegoms iš Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimo skyriaus, ypatingai dr. Giedriui Sasnauskui, dr. Giedrei Tamulaitienei, dr. Gintautui Tamulaičiui, dr. Mindaugui Zarembai ir dr. Arūnui Šilanskui, už diskusijas, patarimus bei pagalbą atliekant eksperimentus.

Dėkoju savo šeimai ir draugams už supratingumą ir palaikymą. Ypatingas ačiū mano sužadėtinei Agnei, už visokeriopą palaikymą, kantrybę, bei supratimą.



## SUMMARY

Recently, an adaptive prokaryotic immune system based on Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) was identified that provides acquired immunity against viruses and plasmids (Barrangou *ir kiti*, 2007). CRISPR consists of arrays of short conserved repeat sequences interspaced by unique DNA sequences of similar size called spacers, which often originate from phage or plasmid DNA (Barrangou *ir kiti*, 2007; Bolotin *ir kiti*, 2005; Mojica *ir kiti*, 2005). CRISPR arrays, together with *cas* (CRISPR-associated) genes form the CRISPR/Cas adaptive immune system.

The CRISPR/Cas system functions by acquiring short pieces of foreign DNA (spacers) which are inserted into CRISPR region and provide immunity against subsequent exposures to phages and plasmids that carry matching sequences (Barrangou *ir kiti*, 2007; Brouns *ir kiti*, 2008). CRISPR repeat-spacer arrays are transcribed into long primary transcripts that are further processed into a set of short CRISPR RNAs (crRNAs), containing a conserved repeat fragment and a variable spacer sequence (a guide) complementary to the invading nucleic acid (Carte *ir kiti*, 2008; Brouns *ir kiti*, 2008; Hale *ir kiti*, 2009). crRNAs combine with Cas proteins to form an effector complex which recognizes the target sequence in the invasive nucleic acid by base pairing to the complementary strand (Jore *ir kiti*, 2011) and induces sequence-specific cleavage, thereby preventing proliferation and propagation of foreign genetic elements.

CRISPR/Cas systems have been categorized into three main Types, based on core elements content and sequences (Makarova *ir kiti*, 2011). The structural organization and function of effector ribonucleoprotein (RNP) complexes involved in crRNA-mediated silencing of foreign nucleic acids differ between distinct CRISPR/Cas Types (Wiedenheft *ir kiti*, 2012). In the Type I-E system, as exemplified by *Escherichia coli*, crRNAs are incorporated into a multisubunit effector complex called Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence) (Brouns *ir kiti*, 2008), which binds to the target DNA and triggers degradation by the signature Cas3 protein (Sinkunas *ir kiti*, 2011; Beloglazova *ir kiti*, 2011). In Type III CRISPR/Cas systems of *Sulfolobus solfataricus* and *Pyrococcus furiosus*, Cas RAMP module (Cmr) and crRNA complex recognize and cleave synthetic RNA *in vitro* (Hale *ir kiti*, 2012; Zhang *ir kiti*, 2012) while the CRISPR/Cas system of *Staphylococcus epidermidis* targets DNA *in vivo* (Marraffini *ir kiti*, 2008). The structure and composition of ribonucleoprotein complexes involved in DNA silencing by Type II CRISPR/Cas systems remain to be established.

Here we report the first cloning and heterologous expression of a functional CRISPR/Cas system into a different bacterial genus. We demonstrate that the *S. thermophilus* CRISPR3/Cas system prevents plasmid transformation and lambda phage infection in *E. coli*. We show that both the proto-spacer and PAM sequences are necessary for immunity, although mutations distant from the PAM are tolerated. We also establish that *cas9* is the sole *cas* gene necessary for CRISPR-encoded interference. Furthermore, mutation analysis revealed that interference relies on the Cas9 HNH- and RuvC-motifs. Altogether, *in vivo* results show that active CRISPR/Cas systems can be transferred across distant genera and provide heterologous interference against invasive nucleic acids. This can be leveraged to develop strains more robust against phage attack,

and safer organisms less likely to uptake and disseminate plasmid-encoded undesirable genetic elements.

In this work the Cas9–crRNA complex of the *S. thermophilus* CRISPR3/Cas system has been isolated and demonstrated that it cleaves both synthetic oligodeoxynucleotide and plasmid DNA bearing a nucleotide sequence complementary to the crRNA, in a PAM-dependent manner. Furthermore, we provide experimental evidence that the PAM is recognized in the context of dsDNA and is critical for *in vitro* DNA binding and cleavage. DNA cleavage is executed by two distinct active sites (RuvC and HNH) within Cas9 to generate site-specific nicks on opposite DNA strands. Sequence specificity of the Cas9–crRNA complex is dictated by the 42-nt crRNA, which includes a 20-nt fragment complementary to the proto-spacer sequence in the target DNA. These data demonstrate that the Cas9–crRNA complex functions as an RNA-guided endonuclease with sequence-specific target site recognition and cleavage through two distinct strand nicks. Present findings establish a molecular basis for CRISPR-mediated immunity in bacteria, specifically for type II systems, which rely solely on the signature Cas9 protein. Further, the simple modular organization of the Cas9–crRNA complex, in which specificity for DNA targets is encoded by a small crRNA and the cleavage machinery consists of a single, multidomain Cas protein, provides a versatile platform for the engineering of universal RNA-guided DNA endonucleases.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Armalyte E, Bujnicki JM, Giedriene J, Gasiunas G, Kosiński J ir Lubys A (2005) Mva1269I: a monomeric type IIS restriction endonuclease from *Micrococcus varians* with two EcoRI- and FokI-like catalytic domains. *J Biol Chem* **280**: 41584–94
2. Barik S (1996) Site-Directed Mutagenesis In Vitro by Megaprimer PCR. *Methods Mol Biol* **57**: 203–215
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA ir Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709–12
4. Beloglazova N, Petit P, Flick R, Brown G, Savchenko A ir Yakunin AF (2011) Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. *EMBO J* **30**: 4616–27
5. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A ir Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**: 2551–61
6. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV ir van der Oost J (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**: 960–4
7. Carte J, Wang R, Li H, Terns RM ir Terns MP (2008) Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev* **22**: 3489–96
8. Chan S-H, Stoddard BL ir Xu S-Y (2011) Natural and engineered nicking endonucleases--from cleavage mechanism to engineering of strand-specificity. *Nucleic Acids Res* **39**: 1–18
9. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada Z a, Eckert MR, Vogel J ir Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**: 602–7
10. Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P ir Moineau S (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**: 1390–400
11. Fontaine L, Dandoy D, Boutry C, Delplace B, de Frahan MH, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P ir Hols P (2010) Development of a versatile procedure based on natural transformation for marker-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7870–7
12. Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH ir Moineau S (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**: 67–71

13. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD ir Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, Walker JM (ed) pp 571–607. Humana Press.
14. Godde JS ir Bickerton A (2006) The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol* **62**: 718–29
15. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF ir Nelson KE (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* **1**: e60
16. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, Resch AM, Glover CVC, Graveley BR, Terns RM ir Terns MP (2012) Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Mol Cell* **45**: 292–302
17. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM ir Terns MP (2009) RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* **139**: 945–56
18. Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95–8.
19. Horvath P ir Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**: 167–70
20. Horvath P, Coûté-Monvoisin A-C, Romero D a D, Boyaval P, Fremaux C ir Barrangou R (2009) Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol* **131**: 62–70
21. Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin A-C, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C ir Barrangou R (2008) Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**: 1401–12
22. Jore MM, Lundgren M, van Duijn E, Bultema JB, Westra ER, Waghmare SP, Wiedenheft B, Pul U, Wurm R, Wagner R, Beijer MR, Barendregt A, Zhou K, Snijders APL, Dickman MJ, Doudna JA, Boekema EJ, Heck AJR, van der Oost J ir Brouns SJJ (2011) Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 529–36
23. Kleanthous C, Kühlmann UC, Pommer a J, Ferguson N, Radford SE, Moore GR, James R ir Hemmings a M (1999) Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nat Struct Biol* **6**: 243–52
24. Ko TP, Liao CC, Ku WY, Chak KF ir Yuan HS (1999) The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein. *Structure* **7**: 91–102
25. Labrie SJ, Samson JE ir Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 317–27
26. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ ir

- Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–8
27. Letunic I, Doerks T ir Bork P (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37**: D229–32
  28. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB ir Koonin EV (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research* **30**: 482–496
  29. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI ir Koonin EV (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* **1**: 7
  30. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J ir Koonin EV (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**: 467–77.
  31. Marraffini LA ir Sontheimer EJ (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**: 1843–5
  32. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J ir Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**: 174–82
  33. Nowotny M, Gaidamakov S a, Crouch RJ ir Yang W (2005) Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell* **121**: 1005–16
  34. Papadopoulos JS ir Agarwala R (2007) COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **23**: 1073–9
  35. Portillo MC ir Gonzalez JM (2009) CRISPR elements in the Thermococcales: evidence for associated horizontal gene transfer in *Pyrococcus furiosus*. *J Appl Genet* **50**: 421–30
  36. Sambrook J, Fritsch E ir Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.
  37. Saravanan M, Bujnicki JM, Cymerman I a, Rao DN ir Nagaraja V (2004) Type II restriction endonuclease R.KpnI is a member of the HNH nuclease superfamily. *Nucleic Acids Res* **32**: 6129–35
  38. Sebahia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerdeño-Tárraga AM, Wang H, Holden MTG, Wright A, Churcher C, Quail M a, Baker S, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, ir *kiti* (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet* **38**: 779–86.
  39. Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, Wanner B, van der Oost J, Brouns SJJ ir Severinov K (2011) Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 10098–103

40. Shen BW, Landthaler M, Shub D a ir Stoddard BL (2004) DNA binding and cleavage by the HNH homing endonuclease I-HmuI. *J Mol Biol* **342**: 43–56
41. Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P ir Siksnys V (2011) Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J* **30**: 1335–42
42. Sturino JM ir Klaenhammer TR (2006) Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol* **4**: 395–404
43. Tamulaitis G, Zaremba M, Szczepanowski RH, Bochtler M ir Siksnys V (2007) Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence. *Nucleic Acids Res* **35**: 4792–9
44. Wiedenheft B, Sternberg SH ir Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**: 331–338
45. Zhang J, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brugger K, Graham S, Reimann J, Cannone G, Liu H, Albers S-V, Naismith JH, Spagnolo L ir White MF (2012) Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol Cell* **45**: 303–13