

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Tomas Šinkūnas

**I tipo CRISPR-Cas sistemos DNR interferencijos
atkūrimas *in vitro***

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2009-2013 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 - Dr. **Česlovas Venclovas** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Nariai :

Prof. Dr. **Edita Sužiedelienė** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. Dr. **Matthias Bochtler** (Tarptautinis molekulinės ir ląstelės biologijos institutas, Lenkija, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

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

Dr. **Rolandas Meškys** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties posėdyje 2015 m. kovo 19 d. 11 val. Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto konferencijų salėje.

Adresas: Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2015 vasario 19 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto, Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY

Tomas Šinkūnas

***In vitro* reconstitution of DNA interference in a type I
CRISPR-Cas system**

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

Vilnius, 2015

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2009-2013.

Supervisor:

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

Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend

Chairman - Dr. **Česlovas Venclovas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Members:

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

Prof. Dr. **Matthias Bochtler** (The International Institute of Molecular and Cell Biology, Poland, physical sciences, biochemistry - 04 P)

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

Dr. **Rolandas Meškys** (Vilnius 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 19th of March, 2015, at 11 a.m.

The summary of doctoral dissertation was sent on 19th of February, 2015.

The thesis is available at the Library of Institute of Biotechnology, at the Library of Vilnius University, and at the VU internet link:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS.....	6
ĮVADAS	7
TYRIMŲ METODIKA	10
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	19
1. <i>S. thermophilus</i> CRISPR4-Cas sistema	19
2. Cas3 yra viengrandinės DNR nukleazė ir nuo ATP priklausoma helikazė.....	20
2.1. Cas3 baltymo ekspresija ir gryninimas.....	20
2.2. Cas3 nukleazinis aktyvumas yra lokalizuotas HD domene.....	20
2.3. Cas3 pasižymi vgDNR stimuliuojamu ATPaziniu aktyvumu.....	21
2.4. Cas3 pasižymi helikaziniu aktyvumu	22
3. DNR taikinio atpažinimas Cascade kompleksu	23
3.1. Cascade kompleksas formuoja R-kilpą, rišdamasis su PAM seką turinčia dgDNR.....	23
3.1.1. Cascade klonavimas, raiška ir gryninimas	23
3.1.2. <i>S. thermophilus</i> CRISPR4-Cas crRNR charakterizavimas.....	24
3.1.3. <i>S. thermophilus</i> CRISPR4-Cas sistemos PAM sekos analizė	25
3.1.4. Cascade rišimuisi su proskirtuku yra reikalinga PAM seka	25
3.2. Vienos Cascade molekulės sudaromos R-kilpos tiesioginis stebėjimas	27
3.2.1. R-kilpos susidarymo stebėjimas magnetiniais pincetais	27
3.2.2. R-kilpos susidarymo ir disociacijos priklausomybė nuo sukimo momento	29
3.2.3. Mutacijos PAM sekoje daro poveikį R-kilpos susidarymui, bet ne stabilumui	30
3.2.4. Proskirtuko galo trumpinimas keičia R-kilpos stabilumą	31
4. Cas3 degraduoja Cascade surištus DNR taikinius	32
4.1. Cascade sąveika su proskirtuku stimuliuoja Cas3 ATPazinį aktyvumą	32
4.2. Cascade sąveika su proskirtuku stimuliuoja Cas3 nukleazinį aktyvumą	33
4.3. Cas3 degraduoja plazmides su PAM seka ir „užrakinta“ R-kilpa.....	33
4.4. Cas3 kerpa DNR proskirtuko sekoje ir už jos	34
4.5. Cas3 degraduoja DNR kryptingai	35
5. I-E tipo CRISPR-Cas sistemos interferencijos mechanizmas	36
IŠVADOS.....	39
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	40
FINANSINĖ PARAMA.....	41
CURRICULUM VITAE	42
PADĖKA	43
SUMMARY	44
LITERATŪROS SĄRAŠAS	46

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

Ap ^r	atsparumas ampicilinui
bp	bazių pora(os)
Cas	<i>angl.</i> “CRISPR associated”
Cascade	<i>angl.</i> “CRISPR-associated complex for antiviral defense”
Cm ^r	atsparumas chloramfenikoliui
CRISPR	<i>angl.</i> “Clustered regularly interspaced palindromic repeats”
crRNR	CRISPR RNR
dg	dvigrandinė
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
EJPM	elektroforezinio judrumo poslinkio metodas
ESI-MS	elektros srauto jonizacijos masių spektrometrijos metodu
JSA	jaučio serumo albuminas
LB	Luria-Bertani
NDS	natrio dodecilsulfatas
nt	nukleotidas(ai)
OD ₆₀₀	optinis tankis, nustatytas esant 600 nm bangos ilgio šviesai
PAGE	poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PAM	proskirtukui artimas motyvas
PNK	polinukleotidų kinazė
R-kilpa	DNR-RNR hibridas, kuriame RNR grandinė yra susiporavusi su komplementaria DNR duplekso grandine, o nekomplementari DNR grandinė yra vgDNR formoje
RNB	ribonukleobaltyminis
St	<i>Streptococcus thermophilus</i> DGCC7710
Str ^r	atsparumas streptomycinui
tracrRNR	trans-koduojama mažoji RNR
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
vg	viengrandinė
W	A arba T nukleotidas
WT	laukinis tipas

IVADAS

Prokariotines ląsteles puola virusai (bakteriofagai), kurie kelia mirtiną grėsmę, todėl prokariotai sukūrė apsaugos sistemas, kurios veikia įvairiose fago raidos stadijose ir stabdo jo dauginimąsi (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013). Viena tokių sistemų yra vadinama CRISPR (*angl.* clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas (*angl.* CRISPR associated) (Barrangou et al., 2007). CRISPR – tai sekų masyvas, sudarytas iš pasikartojančių sekų (kartotinių) ir tarp jų išiterpusių svetimų kilmės unikalių sekų (skirtukų) (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). *cas* genų klasteris koduoja baltymus, kurie įveiklina CRISPR-Cas sistemą (Brouns et al., 2008; Gasiunas et al., 2012; Hale et al., 2009).

CRISPR-Cas sistemų veiklą sąlyginai galima suskirstyti į tris stadijas: (i) adaptacijos (kartais dar vadinama imunizacijos), (ii) raiškos ir brendimo bei (iii) interferencijos (kartais dar vadinama imuninio atsako) (van der Oost et al., 2014). Adaptacijos metu į ląstelę patekęs įsibrovėlis (fagas arba plazmidė) yra atpažįstamas ir jo DNR fragmentas, naujo skirtuko pavidalu, yra įstatomas į CRISPR regioną (Barrangou et al., 2007). CRISPR regionas, raiškos ir brendimo stadijos metu, yra nurašomas į ilgą pirminę CRISPR RNR (crRNR) molekulę, kuri kartotinių sekose yra sukarpoma iki mažų crRNR molekulių (Carte et al., 2008; Deltcheva et al., 2011). Interferencijos stadijoje subrendusios crRNR molekulės su Cas baltymais jungiasi į ribonukleobaltyminių (RNB) kompleksą, kuris aptinka ir sunaikina svetimą nukleorūgštį, jei ši turi komplementarią crRNR seką, vadinamą proskirtuku (Brouns et al., 2008; Gasiunas et al., 2012; Hale et al., 2009; Jinek et al., 2012; Tamulaitis et al., 2014).

Atsižvelgus į CRISPR-Cas sistemų genų sąstatą ir organizaciją, jos yra klasifikuojamos į tris pagrindinius tipus (Makarova et al., 2011). I ir II tipo sistemos sunaikina įsibrovėlio dvigrandinę (dg) DNR, o III tipo sistemų taikiny yra viengrandinė (vg) RNR. I tipo sistemose keli skirtingi Cas baltymai susijungia su crRNR molekule į RNB kompleksą, vadinamą Cascade (*angl.* CRISPR-associated complex for antiviral defense), kuris atsakingas už svetimų DNR atpažinimą (Jore et al., 2011). DNR interferencijai I tipo sistemose kartu su Cascade kompleksu reikia pagalbinio Cas3 baltymo (Brouns et al., 2008). Skirtingai nuo I tipo sistemų, II tipo sistemose DNR interferencijai pakanka vieno Cas9 baltymo, kuris sudaro kompleksą su 2 RNR molekulėmis: crRNR ir tracrRNR (Jinek et al., 2012; Karvelis et al., 2013). III tipo sistemose, panašiai kaip I tipo sistemose, svetimų nukleorūgšties sunaikinimui reikalingas RNB kompleksas, kurį sudaro keli Cas subvienetai susijungę su crRNR (Rouillon et al., 2013; Staals et al., 2013). II ir III sistemų RNB kompleksuose nukleazės aktyvusis centras yra komplekso dalis, todėl svetimų nukleorūgšties sunaikinimui nereikia papildomo baltymo, kuris būtinas I tipo sistemose (Brouns et al., 2008; Saprunas et al., 2011; Tamulaitis et al., 2014).

Svetimos DNR taikiniai, į kuriuos yra nukreipti I ir II tipo RNB kompleksai, turi crRNR atitinkančią proskirtuko seką bei proskirtukui artimą motyvą (PAM) (Deveau et al., 2008). Įvairiose CRISPR-Cas sistemose PAM sekos skiriasi (Mojica et al., 2009). DNR taikiny yra atpažįstamas susidarant R-kilpai, kurioje crRNR poruojasi su komplementaria proskirtuko grandine, o nekomplementari proskirtuko grandinė yra

ištumiami kaip vgDNR (Jore et al., 2011). R-kilpos susidarymas „pažymi“ DNR taikini sunaikinimui.

I tipo sistemose, Cascade kompleksas bei Cas3 baltymas, veikdami kartu, užtikrina atsparumą svetimai DNR (Brouns et al., 2008), tačiau DNR interferencijos stadijos molekulinis mechanizmas nėra aiškus. Pagrindinis šio darbo tikslas - ištirti I tipo CRISPR-Cas sistemų svetimos DNR sunaikinimo molekulinį mechanizmą, panaudojant *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 (St) I-E tipo CRISPR4-Cas modelinę sistemą (Horvath & Barrangou, 2010).

Darbo uždaviniai:

- (i). Nustatyti St-Cas3 biocheminius aktyvumus;
- (ii). Nustatyti St-Cascade komplekso sudėtį;
- (iii). Nustatyti PAM seką, reikalingą St-Cascade komplekso sąveikai su DNR taikiniu;
- (iv). Ištirti R-kilpų susidarymo mechanizmą vienos molekulės tyrimo metodais;
- (v). Atkurti I-E tipo St-CRISPR4-Cas sistemos DNR interferenciją *in vitro*.

Mokslinis naujumas.

Mes pirmieji ištyrėme Cas3 baltymo, kuris būdingas visoms I tipo CRISPR-Cas sistemoms, biochemines funkcijas ir parodėme, kad St-Cas3 yra vgDNR aktyvinama nukleazė ir ATPazė/helikazė. Mes taip pat išgryninome St-Cascade kompleksą iš heterologinio *Escherichia coli* kamieno ir nustatėme jo sudėtį. Parodėme, kad surišdamas DNR taikini, St-Cascade toleruoja platų PAM sekų spektrą. Be to, mes pirmieji ištyrėme R-kilpos susidarymo mechanizmą vienos molekulės metodu ir parodėme, kad kilpos susidarymas vyksta kryptinagai: R-kilpa prasideda nuo PAM sekos ir plinta iki proskirtuko galo, kur yra „užrakinama“. Mes taip pat pademonstravome, kad Cascade sąveika su DNR taikiniu, susidarant R-kilpai, aktyvina Cas3 baltymą, kuris kryptingai sukarpo DNR. Apibendrinę rezultatus, pasiūlėme detalų I tipo CRISPR-Cas sistemų DNR interferencijos stadijos mechanizmą.

Praktinė reikšmė.

Neseniai parodyta, kad II tipo CRISPR-Cas sistemų RNB kompleksas, kurį sudaro vienas Cas9 baltymas, prisijungęs dvi RNR molekules, gali būti naudojamas kaip universalus molekulinis genomų redagavimo įrankis (Hsu et al., 2014). I tipo CRISPR-Cas sistemų sandara yra žymiai sudėtingesnė, todėl jų taikymas genomų redagavimui, ypač eukariotuose, yra sudėtingas. Prokariotuose šios sistemos buvo sėkmingai panaudotos bakterijų kamienų, pernešančių antibiotikų atsparumo genus, selektyviam sunaikinimui (Gomaa et al., 2014) ir bakteriofagų genomų modifikacijai (Kiro et al., 2014). Cascade kompleksas taip pat buvo panaudotas tikslinių genų raiškos slopinimui (Luo et al., 2014). Be to, Cascade komplekso baltymus suliejus su kitais baltymais, pvz., genų raiškos aktyvatoriais arba fluorescenciniais baltymais, jį būtų galima panaudoti tikslinių genų raiškos aktyvinimui arba tikslinių DNR sekų žymėjimui. Detalesni molekulinio mechanizmo tyrimai gali atverti naujų I tipo sistemų pritaikymo galimybių.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- St-Cas3 yra domeninis baltymas, kuriam būdingi nuo vgdNR priklausomi nukleazinis ir ATPazinis/helikazinis kataliziniai aktyvumai.
- St-Cascade kompleksas yra sudarytas iš 5 Cas baltymų bei subrendusios 61 nt crRNR molekulės.
- St-Cascade kompleksas surišdamas DNR taikinį sudaro R-kilpą, jei šalia taikinio yra PAM seka.
- Nuo PAM sekos nutolusio proskirtuko galo sekos komplementarumas crRNR lemia R-kilpos stabilumą.
- St-Cascade suformuota R-kilpa aktyvina St-Cas3 baltymą, kuris kryptingai sukarpo DNR taikinį.

TYRIMŲ METODIKA

Reagentai

Aukščiausio grynumo laipsnio cheminės medžiagos buvo įsigytos iš „Sigma-Aldrich“, „Roth“, „Fluka“ ir „Thermo Scientific“. Fermentai: DreamTaq, *TaqI* ir *PfuI* DNR polimerazė; FastAP šarminė fosfatazė; T4 DNR ligazė; T4 polinukleotidų kinazė (PNK); jaučio serumo albuminas (JSA); FastDigest restrikcijos endonukleazės pirktos iš „Thermo Scientific“. Fermentai naudoti laikantis gamintojo rekomendacijų. P1 nukleazė pirktas iš „Sigma“.

Molekulinės biologijos rinkiniai

“CloneJET PCR Cloning Kit”, “Rapid DNA Ligation Kit”, “GeneJET Gel Extraction Kit”, “GeneJET PCR Purification Kit”, “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” ir “T7 high yield transcription kit” įsigyti iš „Thermo Scientific“. “Cycler Reader DNA Sequencing kit” buvo pagamintas „Fermentas“ įmonėje. „Malachite green assays kit“ rinkinys gautas iš „BioAssay Systems“. Rinkiniai naudoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

Bakterijų kamienai

Escherichia coli DH5 α buvo naudotos klonavimo procedūroms. Cas3 baltymas buvo sintetinamas *E. coli* ER2267 kamiene, o Cascade kompleksas – *E. coli* BL21(DE3).

DNR

Streptococcus thermophilus DGCC7710 genomine DNR gauta iš DuPont (Dangé-Saint-Romain, Prancūzija). Cas3 ir Cascade genai buvo klonuoti į raiškos vektorius: pBAD24-CHis (Ap^r), pCDF-Duet1 (Str^r; Novagen) ir pACYC-Duet1 (Cm^r; Novagen) (1 lentelė). Cas3 HD ir helikazės aktyvių centų aminorūgštys pakeistos į alaninus, kryptingos mutagenzės metodu, šablonu naudojant pCas3 plazmidę (1 lentelė).

Cas3 ATPaziniam ir nukleaziniam aktyvumams tirti buvo naudojamos vg M13mp18 (New England Biolabs) fago genomine DNR ir dg pUC57 (Thermo Scientific) DNR. Cas3 helikazinio aktyvumo analizei buvo naudoti M13mp18 ir oligonukleotidų (1 lentelė) daliniai dupleksai.

pSP1-NN (kur N yra PAM sekos nukleotidas A, G, C ar T) ar pSP3-AA (1 lentelė) plazmidės, turinčios proskirtuką-1 ar proskirtuką-3 bei atitinkamą PAM seką, buvo naudotos Cas3 ATPazinio ir nukleazinio aktyvumų tyrimams, reakcijoje esant Cascade kompleksui. Be to, šios plazmidės naudotos kaip šablonas gaminant DNR substratus magnetinių pincetų eksperimentams.

Oligonukleotidai

Visi oligonukleotidai įsigyti iš „Metabion“ (2 lentelė). Oligonukleotidai buvo pažymėti 5'-gale, naudojant PNK (Thermo Fisher Scientific) ir [γ -³³P]ATP (Hartmann Analytic), bei suldyti su nežymėta komplementaria DNR.

Magnetinių pincetų eksperimentuose naudotas proskirtuko seką turintis 2,1 kbp PGR fragmentas, kuris gautas naudojant pradmenis: 5'-gcgtaagtctcgagaactagtccgtaagatgctttctgtgact-3' ir 5'-gcgtaagtgcggccgcttcgctccactgagcgtcaga-3'. Šis fragmentas liguotas su 1,2 kbp biotinu ir digoksigenu žymėtais fragmentais, kurie padauginami 5'-gaccgagatagggttgagt-3' ir 5'-tttgtgatgctcgcagggg-3' pradmenimis.

1 lentelė. Tyrimui naudotos plazmidės.

Plazmidė	Aprašymas
pCas3	<i>cas3</i> genas, įterptas į pBAD24-CHis vektoriaus <i>NcoI</i> ir <i>XhoI</i> sekas; C-gale His ₆ -inkaras.
pCas3-D77A	Cas3 HD domene 77 aspartatas pakeistas į alaniną.
pCas3-D227A	Cas3 HD domene 227 aspartatas pakeistas į alaniną.
pCas3-Q290A	Cas3 helikazės domene 290 glutaminas pakeistas į alaniną.
pCas3-K316A	Cas3 helikazės domene 316 lizinas pakeistas į alaniną.
pCas3-D452A	Cas3 helikazės domene 452 aspartatas pakeistas į alaniną.
pCas3-E453A	Cas3 helikazės domene 453 glutamatas pakeistas į alaniną.
pCas3-R663A	Cas3 helikazės domene 663 argininas pakeistas į alaniną.
pCas3-R666A	Cas3 helikazės domene 666 argininas pakeistas į alaniną.
pCascade	<i>cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e</i> genų kasetė, įterpta į pCDF-Duet1 vektoriaus <i>NcoI</i> ir <i>PacI</i> sekas; inkarinių sekų nėra.
pCas7	<i>cas7</i> genas, įterptas į pBAD24-CHis vektoriaus <i>NcoI</i> ir <i>XhoI</i> sekas; C-gale His ₆ -inkaras.
pCRh	Homogeniškas CRISPR regionas, surinktas iš oligonukleotidų, buvo įterptas į pACYC-Duet1 vektoriaus <i>NcoI</i> ir <i>PacI</i> sekas; inkarinių sekų nėra.
pSP(X)-NN ar pSP(X)-ΔY	Oligonukleotidų dupleksai (2 lentelė), turintys proskirtuką ir tam tikrą PAM seką, buvo įterpti į pUC19 plazmidės <i>SmaI</i> seką. (X) – proskirtukas-1 arba proskirtukas-3; N – A, T, G ar C PAM srityje; Y – pašalintų bazių porų skaičius nuo proskirtuko-1 galo, nutolusio nuo PAM sekos.

2 lentelė. Tyrimui naudoti oligonukleotidų substratai.

Substratas	Seka	Komentaras
S1-AA or SP1-TAA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT TAA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATAT ATT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, TAA PAM , *
SP3-AA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA CGCAACCCCTCCTTAGACATGGGAACAGTACTAGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TT GCGTTGGGGAGGAATCTGTACCCTTGTCATGATCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-3, AA PAM , *
SP1-CC	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CC TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA GG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, CC PAM , *
SP1-AG	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AG TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TC ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AG PAM , *
SP1-AC	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AC TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AC PAM , *
SP1-AT	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AT TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TA ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AT PAM , *
SP1-GA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA CT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, GA PAM , *
SP1-GG	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GG TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA CC ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, GG PAM , *
SP1-GC	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GC TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA CG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, GC PAM , *
SP1-GT	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GT TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA CA ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, GT PAM , *
SP1-CA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA GT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, CA PAM , *
SP1-CG	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CG TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA GC ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, CG PAM , *
SP1-GC	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GC TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA CG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, GC PAM , *

2 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2 lentelės tęsinys

SP1-GT	5' -GACCACCCTTTTTGATAT GT TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA CA ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> GT PAM, *
SP1-CA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA GT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> CA PAM, *
SP1-CG	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CG TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA GC ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> CG PAM, *
SP1-CT	5' -GACCACCCTTTTTGATAT CT TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA AG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> CT PAM, *
SP1-TA	5' -GACCACCCTTTTTGATAT TA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA AT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> TA PAM, *
SP1-TG	5' -GACCACCCTTTTTGATAT TG TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA AC ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> TG PAM, *
SP1-TC	5' -GACCACCCTTTTTGATAT TC TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA AG ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> TC PAM, *
SP1-TT	5' -GACCACCCTTTTTGATAT TT TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA AA ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> TT PAM, *
SP1-AAA	5' -GACCACCCTTTTTGATA AAA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTAT TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> AAA PAM, *
SP1-GAA	5' -GACCACCCTTTTTGATA GAA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTAT CTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> GAA PAM, *
SP1-CAA	5' -GACCACCCTTTTTGATA CAA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAAGCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTAT GTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> CAA PAM, *
SP1-Δ2	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATAACGGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTATTCGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> AA PAM, Δ2 nt [#] , *
SP1-Δ4	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCATTCGGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAACTATA TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCGTAAAGCCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	<u>Proskirtukas-1,</u> AA PAM, Δ4 nt [#] , *

2 lentelės tęsinys kitame puslapyje

2 lentelės tęsinys

SP1-Δ6	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACGCTATTCGGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGCATAAGCCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AA PAM, Δ6 nt [#] , *
SP1-Δ8	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA TATACCTATATCAATGGCCTCCCACCGTATTCGGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGTGGCATAAGCCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AA PAM, Δ8 nt [#] , *
SP1-Δ10	5' -GACCACCCTTTTTGATAT AA TATACCTATATCAATGGCCTCCCGCAGATACGTTCTGAGGGAA-3' 3' -CTGGTGGGAAAAACTATA TTT ATATGGATATAGTTACCGGAGGGCGTCTATGCAAGACTCCCTT-5'	Proskirtukas-1, AA PAM, Δ10 nt [#] , *
H1	5' -CCTGCAGGTCGACTCTAGAG-3'	Komplementarus M13mp18
H2	5' -CAUGCCUGCAGGUCGACUCUAG-3'	Komplementarus M13mp18
H3	5' -GCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTT-3'	Komplementarus M13mp18
H4	5' -CTTTTCACCAGCGAG-3'	Komplementarus M13mp18
H5	5' -GGGGGGGGGTAGTTGAGAA-3'	Komplementarus H7 3'-galui
H6	5' -CCCGCGCGTCGTCATGCG-3'	Komplementarus H7 5'-galui
H7	5' -GGGCGCGCGCAGCAGTACGCTAGTACTGTTCCCATGTCTAAGGAGGGGTTCGTTCTCAACTACCCCCCCCC-3'	Komplementarus H5 ir H6

* Proskirtuką supančios sekos iš ALQ13.2 fago; viršutinė proskirtuko seka yra nekomentari skirtuko sekai, o apatinė – komplementari.

Proskirtuko-1 sekos galas, nutolęs nuo PAM, buvo sutrumpintas.

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Cas3 ir Cascade mėginių grynumas buvo tikrinamas denatūruojančiame NDS-PAGE gelyje. Buvo naudojami dviejų sluoksnių poliakrilamidiniai geliai (Sambrook, 1989). Koncentruojantį gelį sudarė 4% akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (37,5:1) ir 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% NDS buferinis tirpalas, o skiriamąjį gelį - 12-15% akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (37,5:1) ir 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% NDS buferinis tirpalas. Mėginiai buvo denatūruoti 5 min 95°C, po to, frakcionuoti kambario temperatūroje 1-1,5 val. (25 V/cm) elektroforezės buferiname tirpale (25 mM Tris, 190 mM glicinas, pH 8,3, 0,1% NDS). Geliai buvo dažomi „Page Blue“ (Thermo Scientific) tirpalu.

Elektroforezė agaroziname gelyje nedenatūruojančiomis sąlygomis

Plazmidinės DNR ir PGR produktų mėginiai buvo analizuojami 0,8% agarozės gelyje, pagamintame 100 mM H₃BO₃-NaOH, 15 mM natrio acetato, 2 mM EDTA (pH 8,2) buferiniame tirpale su 0,5 g/ml etidžio bromidu. Mėginiai frakcionuoti 50 min (3 V/cm), po to, vizualizuoti UV šviesoje.

DNR fragmentai, skirti genų inžinerijos manipuliacijoms, buvo frakcionuojami 1-1,5% agarozės gelyje, pagamintame 40 mM Tris, 20 mM acto rūgšties, 1 mM EDTA (pH 8,0) buferiniame tirpale be etidžio bromido. Iš gelio DNR išskirta naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkinį, vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

DNR elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Cas3 nukleazinės bei Cascade „pėdsako“ reakcijos produktai analizuoti denatūruojančiame PAGE gelyje. Gelį sudarė 20% akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (29:1), 7% karbamido, 100 mM Tris-borato (pH 8,2) ir 2 mM EDTA buferinis tirpalas. Prieš elektroforezę DNR mėginiai buvo denatūruoti 5 min 95 °C ir staigiai atšaldyti, po to, frakcionuoti 2-3 val. (30 V/cm). Išdžiovinus gelius, produktai vizualizuoti FLA - 5100 skaitytuvu.

crRNR analizei naudotas denatūruojantis 15% poliakrilamidinis gelis. Prieš elektroforezę mėginiai su crRNR denatūruoti 10 min 70 °C. Po 30 min (30 V/cm) frakcionavimo, geliai nudažyti CybrGold (Invitrogen). crRNR vizualizuota UV šviesoje.

Manipuliacijos su rekombinantine DNR

Rekombinantinės plazmidės (1 lentelė) buvo sukonstruotos pagal standartines klonavimo metodikas (Sambrook, 1989). Plazmidės grynintos „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkiniu. DNR gryninimui iš agarozinio gelio naudotas „GeneJET Gel extraction Kit“ rinkinys. Fermentai ir jų buferiniai tirpalai, skirti DNR manipuliacijoms, naudoti pagal gamintojo (Thermo Scientific) rekomendacijas.

Cas3 ir Cascade raiškos vektorių konstravimas

Cascade ir Cas3 genai padauginti PGR metodu šablonu naudojant *S. thermophilus* DGCC7710 genominę DNR. *cas3* genas buvo įterptas į pBAD24-CHis ekspresijos vektorių per *NcoI* ir *XhoI* kirpimo sekas. pCascade gautas, į pCDF-Duet1 vektoriaus *NcoI/PacI* kirpimo sekas įterpus *cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e* genų kasetę. pCas7 sukonstruotas, *cas7* geną klonavus į pBAD24-CHis per *NcoI/XhoI* sekas. Iš oligonukleotidų surinkus CRISPR regioną su 6 kartotinio-skirtuko-1 (kilusio iš *S. thermophilus* CRISPR4) kopijomis ir jį įstačius į pACYC-Duet1, sukonstruotas pCRh vektorius (1 lentelė).

D77A, D227A, Q290A, K316A, D452A, E453A, R663A ir R66A Cas3 mutantai (1 lentelė) buvo gauti kryptingos mutagenezės metodu, aprašytu (Tamulaitis et al., 2007). Įterptų genų bei tikslinių mutacijų buvimas buvo patvirtintas, nustatius genų sekas (Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto DNR sekoskaitos centre).

DNR substratų konstravimas

Oligodupleksai, turintys vieną proskirtuko bei PAM seką, buvo surinkti sulydžius du komplementarius oligonukleotidus tarpusavyje (2 lentelė). Plazmidės su vienu Cascade taikiniu gautos, klonavus šiuos dupleksus į pUC19 per *Sma*I taikinį (1 lentelė).

Magnetinių pincetų substratai sukonstruoti ligaze susiuvus tris DNR fragmentus, kurie gauti PGR metodu, šablonu naudojant pUC19 pagrindu sukonstruotas plazmidės (1 lentelė). Vidurinis ~2,1 kbp fragmentas turėjo Cascade taikinį. Vienas iš šoninių 1,2 kbp fragmentų buvo modifikuotas biotinu, o kitas digoksigeninu.

Cas3 raiška ir gryninimas

Transformuotas pCas3 vektoriumi *E. coli* ER2267 kamienas augintas 37°C LB terpėje, į kurią pridėta ampicilino (100 µg/ml) ir kanamicino (25 µg/ml). Optiniam tankiui (600 nm; OD₆₀₀) pasiekus ~0,5, temperatūra sumažinta iki 16°C. Cas3 raiška indukuota 0,2% arabinoze 20 valandų. Ląstelės suardytos ultragarsu, o ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant. Cas3 išgrynintas skysčių chromatografijos metodu, naudojant Ni²⁺ chelatinę bei heparino giminingumo kolonėles. Preparato grynumas patikrintas NDS-PAGE. Cas3 koncentracija nustatyta matuojant sugertį 280 nm bei naudojant 132 700/M/cm ekstinkcijos koeficientą (Gill & von Hippel, 1989).

Cascade komplekso raiška ir gryninimas

E. coli BL21 (DE3) ląstelės buvo transformuotos pCascade, pCas7 ir pCRh vektoriais ir augintos LB terpėje, į kurią pridėta ampicilino (25 µg/ml), chloramfenikolio (17 µg/ml), ir streptomicino (25 µg/ml), 37°C temperatūroje iki ~0,5 OD₆₀₀. Cascade komplekso raiška indukuota 3 valandas, pridėjus 0,2% arabinozės ir 1 mM IPTG. Ląstelės suardytos ultragarsu, ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant. Komplexas išgrynintas skysčių chromatografijos metodu, naudojant Ni²⁺ chelatinę, gelfiltracinę ir heparino giminingumo kolonėles. Komplexo baltymai identifikuoti masių spektrometrijos metodu. Bradford reagentu nustatyta Cascade koncentracija, JSA naudojant kalibracijai. Komplexo molekulinė masė apskaičiuota, remiantis *S. thermophilus* Cascade kompleksui homologiško *E. coli* komplekso Cse1₁:Cse2₂:Cas7₆:Cas5₁:Cas6e₁:crRNA₁ stecheometrija (Jore et al., 2011).

crRNR analizė

crRNR iš Cascade komplekso buvo išgryninta fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio tirpalu. Po elektroforezės denatūruojančiame 15% poliakrilamido gelyje, crRNR vizualizuota SybrGold dažų.

crRNR gryninimui taip pat naudota jonų porų atvirkštinių fazių efektyvioji skysčių chromatografija. Taip išgryninta crRNR analizuota elektros srauto jonizacijos masių spektrometrijos metodu (ESI-MS).

Cas3 ATPazinio aktyvumo tyrimas

Cas3 baltymo ATPazinis aktyvumas. ATP hidrolizės reakcijos vyko 30°C ATPaziniame buferiniame tirpale (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 30 mM KCl, 5% glicerolio, 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml JSA, 0,5 mM ATP), pridėjus 3 nM vgDNR (M13mp18) ar

dgDNR (pUC57) bei Cas3 baltymo. Į reakcijų mišinius pridėjus radioaktyvaus [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (Hartmann Analytic), reakcijos produktai analizuoti, naudojant plonasluoksne chromatografiją. Reakcijose be radioaktyvaus ATP, išsiskyrusio fosfato koncentracija matuota, naudojant rinkinį su žaliuoju malachitu (BioAssay Systems). Apskaičiuoti reakcijų greičiai.

Cas3 baltymo ATPazinis aktyvumas, esant Cascade kompleksui. ATP hidrolizės reakcijos vyko 37°C ATPaziniame buferiniame tirpale (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 75 mM NaCl, 40 mM KCl, 7% glicerolio, 0,1 mg/ml JSA, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM ATP), pridėjus 3 nM plazmidės (1 lentelė), turinčios Cascade taikinį, 12 nM Cascade komplekso ir 300 nM Cas3 baltymo. Reakcijų greičiai nustatyti, naudojant žaliojo malachito rinkinį.

Cas3 helikazinio aktyvumo tyrimas

Helikazinio aktyvumo tyrimui naudoti daliniai DNR ir RNR-DNR dupleksai, kurie gauti sulydžius radioaktyvia žyme pažymėtą oligonukleotidą (2 lentelė) su vgDNR M13mp18 (arba komplementariu oligonukleotidu). Helikazės reakcijos vyko 60 minučių 30°C temperatūroje, į reakcijos buferinį tirpalą (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25 mM KCl, 15% glicerolio, 1 mM MgCl₂, 2 mM ATP [ar AMP-PNP]) pridėjus 0,5 nM substrato ir Cas3 baltymo. Produktai frakcionuoti 8% poliakrilamido gelyje nedenaatūruojančiomis sąlygomis.

Cascade sąveikos su DNR tyrimas

Sintetiniai oligodupleksai (2 lentelė), turintys 33 bp proskirtuką ir įvairias PAM sekas, buvo radioaktyviai pažymėti ir naudoti sąveikos su Cascade tyrimui. Cascade kompleksas rišimosi buferiniame tirpale (40 mM Tris, 20 mM acto rūgšties, 1 mM EDTA, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml JSA, 10% glicerolio) įvairiomis koncentracijomis sumaišytas su 0,1 nM oligoduplekso bei inkubuotas 20 minučių 37°C temperatūroje. Mėginiai frakcionuoti 8% akrilamidiniame gelyje nedenaatūruojančiomis sąlygomis. K_d vertės apskaičiuotos pagal tris nepriklausomus eksperimentus, remiantis šaltiniu (Tamulaitis et al., 2006).

Cascade „pėdsakas“

SP1-AA, SP1-AG, SP1-CC ir SP3-AA oligodupleksai (2 lentelė), 5'-gale radioaktyviai pažymėti ant vienos arba kitos grandinės, buvo naudoti reakcijose su P1 nukleaze. Pažymėtas oligodupleksas (2 nM) su 10 nM arba be Cascade 15 minučių 37°C temperatūroje buvo inkubuotas buferiniame tirpale (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, and 0,1 mg/ml JSA). Po to, pridėtas toks pats tūris 30 mM natrio acetato buferinio tirpalo (pH 5,3), turinčio 1 mU/μl P1 nukleazės, ir inkubuota 10 minučių 37°C. Reakcijos produktai analizuoti 20% poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

Cas3 nukleazinio aktyvumo tyrimas

Cas3 baltymo nukleazinis aktyvumas. Nukleazinės reakcijos vyko 120 minučių 37°C, į reakcijos buferinį tirpalą (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 60 mM KCl, 10% glicerolio, 10 mM MgCl₂), turintį 4 nM vgDNR (M13mp18) ar dgDNR (pUC57), pridėjus 500 nM Cas3. Produktai frakcionuoti 0,8% agaroziniame gelyje ir vizualizuoti etidžio bromidu.

Cas3 baltymo nukleazinis aktyvumas, esant Cascade kompleksui. Šiose reakcijose substratu naudotos superspiralizuotos arba linijinės pUC19 pagrindo plazmidės (1 lentelė) arba oligodupleksai (2 lentelė), radioaktyviai žymėti ant vienos ar kitos

grandinės 5'-galo. Hidrolizės reakcijos vykdytos skirtingą laiką 37°C temperatūroje, į reakcijos buferinį tirpalą (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 75 mM NaCl, 40 mM KCl, 7% glicerolio, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM NiCl₂, 2 mM ATP), turintį 5 nM plazmidės arba 2 nM oligoduplekso, pridėjus atitinkamai 20 nM Cascade ir 100 nM Cas3 arba 4 nM Cascade ir 100–500 nM Cas3. Plazmidžių produktai frakcionuoti 0,8% agaroziniame gelyje ir vizualizuoti etidžio bromidu, o oligodupleksų produktai analizuoti 20% poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

Vienos molekulės eksperimentai

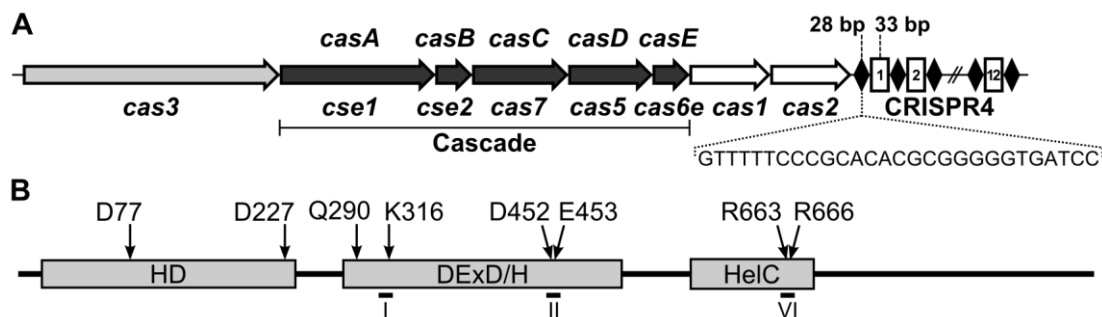
Vienos molekulės eksperimentai su Cascade buvo atliekami pagal (Revyakin et al., 2005; Seidel et al., 2005), naudojant magnetinius pincetus (Klaue & Seidel, 2009). DNR substrato biotinu modifikuotas galas buvo pririštas prie streptavidinu padengtos magnetinės dalelės (MyOne, Invitogen), o digoksigenu modifikuotas DNR galas pririštas prie tėkmės kameros paviršiaus, padengtos anti-digoksigenu (Roche). Eksperimentai vykdyti kambario temperatūroje 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml JSA buferiniame tirpale, pridėjus 9 nM Cascade komplekso. Magnetiniame lauke įtempta DNR molekulė buvo teigiamai arba neigiamai superspiralizuojama. Cascade sąveikos su DNR metu stebėti DNR ilgio pokyčiai, kurie atsirado susidarant R-kilpai ar jai išyrant.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. *S. thermophilus* CRISPR4-Cas sistema

Šiame tyrime buvo analizuota St-CRISPR4-Cas sistemos DNR interferencijos stadija *in vitro*. Ši sistema priklauso I-E tipui ir yra sudaryta iš 8 *cas* genų, kurių išsidėstymas atitinka *E. coli* K-12 CRISPR-Cas sistemą. CRISPR regioną sudaro dvylika 33 bp ilgio skirtukų, įsiterpusių tarp 28 bp ilgio kartotinių (1 A pav.).

Cascade kartu su Cas3 baltymu yra atsakingi už *E. coli* CRISPR-Cas sistemos DNR interferenciją (Brouns et al., 2008). Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ir Cas6e (dar vadinami atitinkamai CasA, CasB, CasC, CasD ir CasE) baltymai sąveikaudami su crRNR formuoja *E. coli* Cascade kompleksą (Jore et al., 2011). *S. thermophilus* DGCC7710 CRISPR4-Cas sistema koduoja homologiškus baltymus, todėl ji turėtų formuoti RNB kompleksą analogišką *E. coli* K-12 (1 A pav.). CRISPR4-Cas sistemos *cas3* genas koduoja 926 aminorūgščių baltymą (~106 kDa). *In silico* Cas3 baltymo sekos analizė atskleidė daugiadomeninę baltymo organizaciją (1 B pav.). Cas3 baltymo N-gale aptinkamos konservatyvios aminorūgštys, būdingos HD šeimos nuo metalo priklausomoms fosfohidrolazėms (HD domenas) (Aravind & Koonin, 1998), tuo tarpu C-galo dalis turi helikazių 2 superšeimai būdingus sekos motyvus (Singleton et al., 2007).



1 pav. *S. thermophilus* CRISPR4-Cas sistema ir Cas3 baltymas. (A) CRISPR4-Cas lokusas sudarytas iš 8 *cas* genų bei 12 kartotinių-skirtukų vienetų (konservatyvios 28 bp palindrominės kartotinių sekos yra atskirtos 33 bp variabilių skirtukų seku). *S. thermophilus* Cascade genai homologiški *E. coli* Cascade genams yra pabraukti. Genų pavadinimai pagal (Brouns et al., 2008) pateikti virš geno, o pagal (Makarova et al., 2011) – po geno. (B) *S. thermophilus* Cas3 baltymo domeninė organizacija, nustatyta *in silico*. HD žymi HD-tipo fosfohidrolazės/nukleazės domeną; DExD/H - DExD/H helikazinį domeną; HelC - C-galinį helikazinį domeną. Virš atitinkamų domenų pažymėtos konservatyvios aminorūgščių liekanos, kurios šiame tyrime buvo pakeistos į alaniną. I, II ir VI skaičiais pažymėti konservatyvūs helikazės motyvai (Singleton et al., 2007).

Norėdami išsiaiškinti *S. thermophilus* CRISPR4-Cas sistemos DNR interferencijos mechanizmą, pirmiausiai ištyrėme pavienius interferencijos stadijos komponentus: Cas3 bei Cascade. Po to, šiuos komponentus tyrėme drauge, *in vitro* atkuriant DNR interferencijos stadiją.

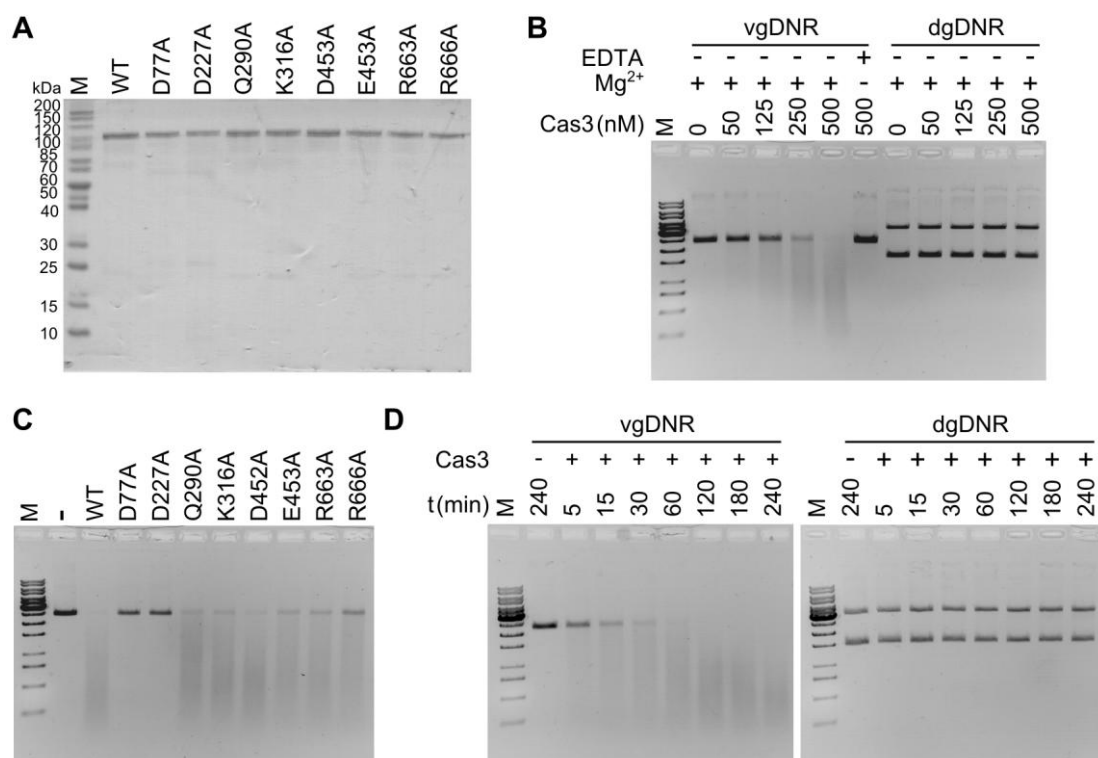
2. Cas3 yra viengrandinės DNR nukleazė ir nuo ATP priklausoma helikazė

2.1. Cas3 baltymo ekspresija ir gryninimas

S. thermophilus DGCC7710 *cas3* genas buvo klonuotas į pBAD24-CHis plazmidę, kuri ekspresuota *E. coli* ER2267 kamiene. Rekombinantinis Cas3 baltymas, turintis C-gale prilietą His₆-inkarinę seką, buvo gryninamas iš beląstelinio ekstrakto. Laukinio tipo (WT) bei mutantinių Cas3 baltymų preparatų homogeniškumas patvirtintas NSD-PAGE (2 A pav.).

2.2. Cas3 nukleazinis aktyvumas yra lokalizuotas HD domene

Cas3 nukleazinis aktyvumas buvo tirtas naudojant žiedinę M13mp18 vgDNR ar superspiralizuotą pUC57 dgDNR plazmidę (2 B pav.). M13mp18 vgDNR hidrolizė, esant Mg²⁺ jonams, priklausė nuo Cas3 koncentracijos ir inkubavimo trukmės (2 B ir D pav.). Tuo tarpu dgDNR nebuvo karpoma.

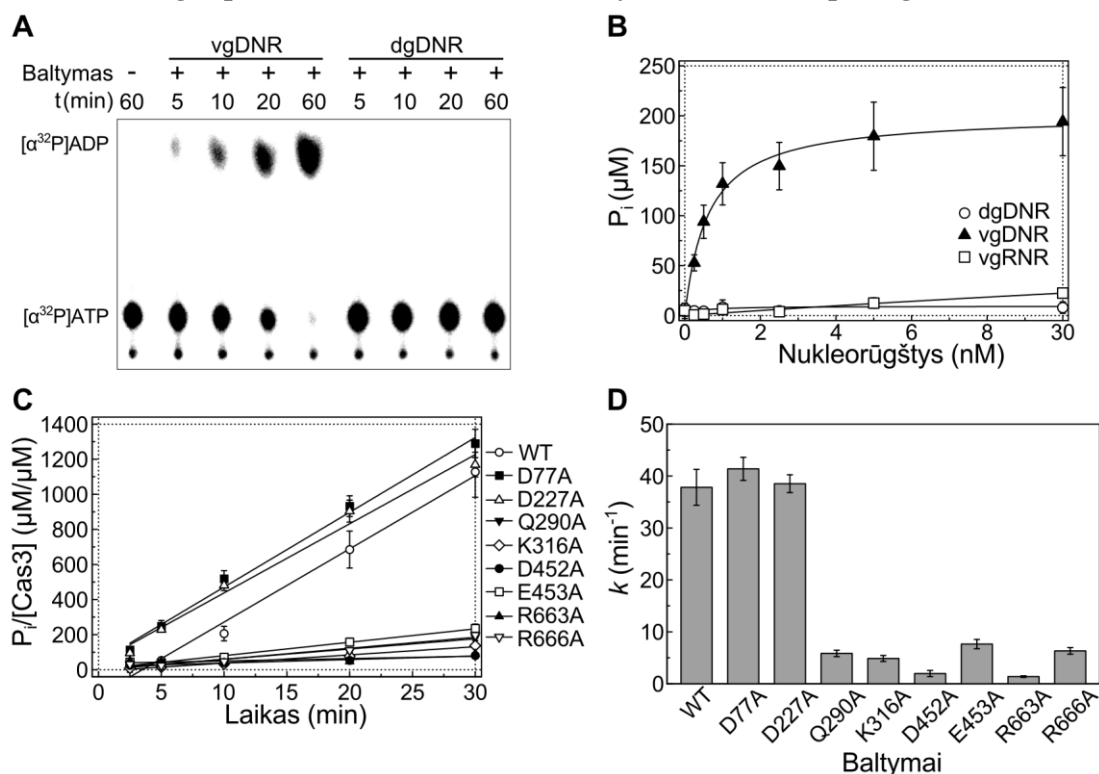


2 pav. Cas3 nukleazinis aktyvumas. (A) Išgryninto Cas3 ir jo mutantų NDS-PAGE. Į kiekvieną takelį užnešta po 750 ng baltymo. (B) VgDNR ir dgDNR degradacija. Įvairūs Cas3 kiekiai buvo inkubuoti su 4 nM M13mp18 vgDNR ar pUC57 dgDNR, esant (+) arba nesant (-) 10 mM MgCl₂ arba 10 mM EDTA, 2 valandas 37°C. (C) Mutacijų įtaka Cas3 nukleaziniam aktyvumui. 500 nM baltymo buvo inkubuota su 4 nM M13mp18 vgDNR 2 valandas 37°C. (D) Cas3 nukleazinio aktyvumo priklausomybė nuo laiko. 500 nM baltymo buvo inkubuota su 4 nM M13mp18 vgDNR ar pUC57 dgDNR 37°C. Reakcijų trukmė pažymėta virš paveikslo. M – baltymų ir DNR molekulių masių žymuo.

Iškelta hipotezė, kad konservatyvios aminorūgščių liekanos (H27, H76, D77 ir D227), lokalizuotos Cas3 N-galo HD domene (Aravind & Koonin, 1998) (1 B pav.), sudaro aktyvųjų centrą, kuris, surišęs divalencius metalo jonus, katalizuoja vgDNR hidrolizę. Hipotezė buvo patvirtinta, patikrinus D77A ir D227A taškinių Cas3 mutantų nukleazinį aktyvumą (2 A ir C pav.). Šie mutantai per 2 valandas nesugebėjo sukarchyti vgDNR, tuo tarpu WT Cas3 bei jo helikazės domeno taškiniai mutantai pilnai degradavo vgDNR (2 C pav.).

2.3. Cas3 pasižymi vgDNR stimuliuojamu ATPaziniu aktyvumu

Cas3 turi helikazėms charakteringus motyvus (I, II ir VI), kurie atsakingi už ATP surišimą ir hidrolizę (1 B pav.). Spėjamas Cas3 ATPazinis aktyvumas pirmiausiai patikrintas substratu naudojant radioaktyvų $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3 A pav.). ATP hidrolizė buvo stebima, kai į reakcijos mišinį buvo pridėta Cas3 kartu su vgDNR. Toliau Cas3 ATPazinis aktyvumas, esant vgDNR, dgDNR ar RNR, buvo tiriamas kolorimetriškai matuojant išsiskyrusio fosfato koncentraciją (Hyun et al., 2008). Duomenys parodė, kad vgDNR reikšmingai padidino Cas3 ATPazinį aktyvumą. Tuo tarpu, dgDNR ir RNR



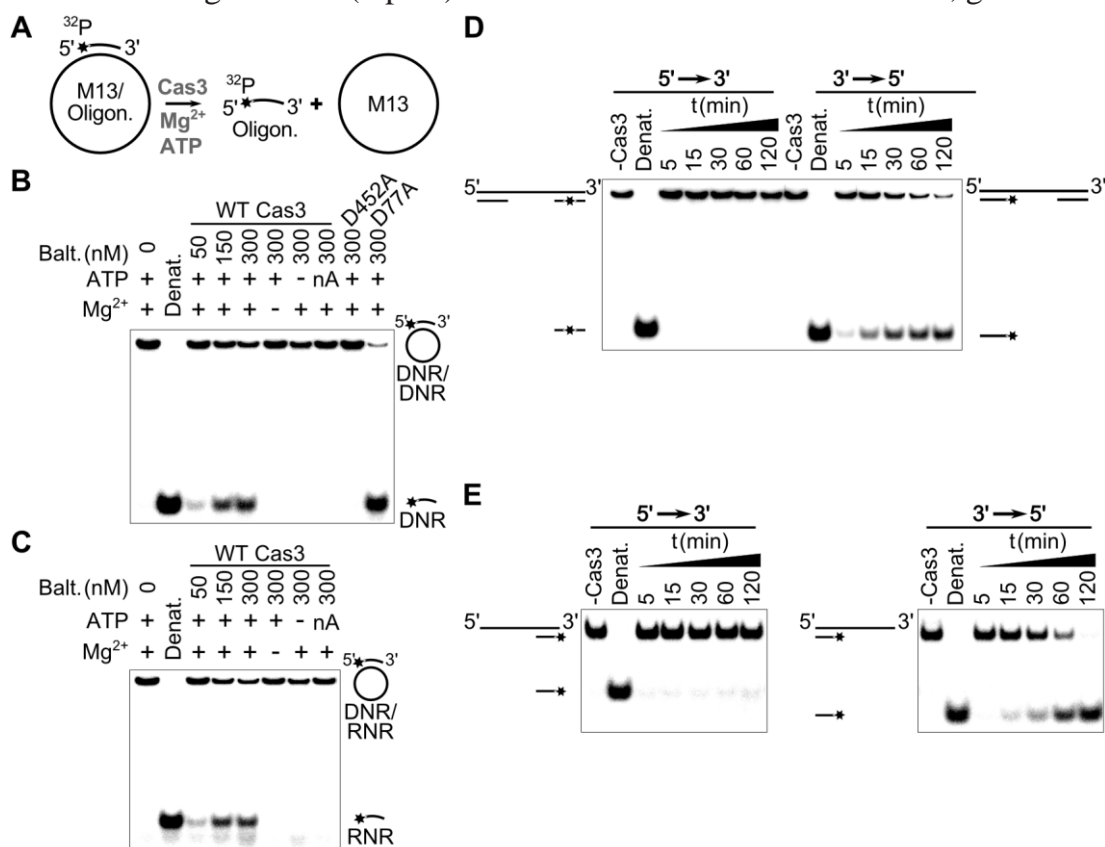
3 pav. Cas3 ATPazinis aktyvumas. (A) Radioaktyvaus ATP hidrolizė. Reakcijos mišiniai, turintys $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ hidrolizės produktų, frakcionuoti ant polietilenimino-celiuliozės plonasluoksnės chromatografijos plokštėlės. (B) ATP hidrolizės priklausomybė nuo nukleorūgšties tipo. ATP hidrolizės metu išsiskyręs fosfatas buvo nustatomas žaliuoju malachitu. Reakcijos mišiniuose buvo įvairios koncentracijos vgDNR (M13mp18), dgDNR (superspiralizuota pUC57 plazmidė) ar 2223 nt RNR. (C) ATP hidrolizės priklausomybė nuo reakcijos trukmės. Reakcijos mišiniuose buvo 3 nM vgDNR. Žaliasis malachitas buvo naudotas ATPazinės reakcijos metu išsiskyrusio fosfato nustatymui. (D) ATP hidrolizės greičiai. Reakcijų greičio konstantos k (min^{-1}) atitinka tiesinių priklausomybių, pavaizduotų (C), posvyrio kampą. Paklaidų intervalai vaizduoja \pm standartinius nuokrypius, apskaičiuotus pagal tris nepriklausomus eksperimentus.

Cas3 ATPazinio aktyvumo nestimuliuo (3 B pav.). Cas3 hidrolizavo ATP $\sim 38 \text{ min}^{-1}$ greičiu (apskaičiuotas pagal fosfato susidarymo tiesinę priklausomybę nuo laiko; 3 C pav.), reakcijos mišinyje esant 0,5 mM ATP. Šie rezultatai rodo, kad Cas3 turi nuo vgDNR priklausomą ATPazinį aktyvumą.

Norėdami patikrinti, ar helikazinių domenų konservatyvios aminorūgščių liekanos yra svarbios ATPaziniam aktyvumui, mes jas pakeitėme alaninu bei patikrinome Q290A, K316A, D452A, E453A, R663A ir R666A Cas3 mutantų sugebėjimą hidrolizuoti ATP (3 D pav.). Kaip ir buvo tikėtasi, mutacijos reikšmingai sumažino ATPazinį aktyvumą. Tai rodo konservatyvių aminorūgščių liekanų svarbą ATP surišimui/hidrolizei. Priešingai, mutacijos N-galo HD domene neturėjo įtakos ATPaziniam aktyvumui (3 D pav.).

2.4. Cas3 pasižymi helikaziniu aktyvumu

Nuo vgDNR priklausomas ATPazinis aktyvumas rodo, kad Cas3 galėtų funkcionuoti kaip translokazė/helikazė. Norėdami tai įrodyti, mes patikrinome, ar Cas3 sugeba išvynioti dvi DNR grandines (4 pav.). Tam Cas3 inkubuotas su substratu, gautu



4 pav. Cas3 helikazinis aktyvumas ir poliškumas. (A). Duplekso išvyniojimo aktyvumo tyrimo schema. (B, C) DNR-DNR ir DNR-RNR dupleksų išvyniojimas Cas3 baltymu. (B) ³²P-žymėto 20 nt oligodeoksiribonukleotido ar (C) 22 nt oligoribonukleotido, prilydyto prie M13mp18 vgDNR, nuo Cas3 priklausomas išvyniojimas buvo stebimas poliakrilamidiniuose geliuose. nA žymi ATP analogą AMP-PNP. D452A ir D77A yra atitinkamai ATPazės ir nukleazės mutantai. (D) Cas3 poliškumo tyrimas I. Substratai sudaryti iš ilgos (kelių tūkstančių nt) vgDNR su 30 nt dupleksais galuose. Vienas iš dupleksų yra žymėtas. (E) Cas3 poliškumo tyrimas II. Naudoti 73 nt substratai, turintys 20 bp dupleksą 5'– arba 3'–gale bei 53 nt vgDNR regioną.

sulydžius 20 nt oligonukleotidą, 5'-gale žymėtą ^{32}P , su komplementarią seką turinčia M13mp18 vgDNR (4 A pav.). Eksperimentiniai rezultatai rodo (4 B pav.), kad Cas3 turi DNR išvyniojimo aktyvumą, kurį aktyvina Mg^{2+} ir ATP. Reakcijos mišinyje ATP pakeitus nehidrolizuojamu analogu 5'-adenilil- β,γ -imidodifosfatu (AMP-PNP), Cas3 helikazinis aktyvumas nėra stimuliuojamas. Nukleazės aktyvaus centro mutantas D77A išvynioja DNR panašiai kaip WT baltymas, tačiau D452A mutacija ATPazės aktyviajame centre visiškai nuslopina išvyniojimo aktyvumą.

Norėdami patikrinti, ar Cas3 baltymas sugeba išvynioti RNR/DNR heterodupleksus, sukonstravome substratą, kuriame 22 nt oligoribonukleotidas sulydytas su M13mp18 vgDNR. Eksperimentas rodo (4 C pav.), kad esant ATP ir Mg^{2+} jonams Cas3 sugeba nustumti 22 nt oligoribonukleotidą. Tad Cas3 galima klasifikuoti kaip DNR-DNR ir DNR-RNR helikazę.

Dažniausiai DNR helikazės rišasi prie vgDNR regiono ir kryptingai judėdamos išvynioja jų kelyje pasitaikiusius dgDNR regionus. Siekdami nustatyti Cas3 kryptingumą, pirmiausiai pasiruošėme du žymetus substratus (4 D pav.), kurie turėjo trumpus DNR dupleksus abiejuose ilgos vgDNR galuose. Cas3 rišantis prie substrato centre esančio vgDNR regiono ir judant 3'→5' kryptimi, turėtų būti išstumiamas 5'-žymėtas oligonukleotidas. Priešingai, fermentui migruojant 5'→3' kryptimi, turėtų būti išstumiamas 3'-žymėtas fragmentas. Eksperimentiniai duomenys rodo, kad Cas3 juda 3'→5' vgDNR kryptimi (4 D pav.).

Mes atlikome alternatyvų išvyniojimo eksperimentą, naudodami kitokios struktūros radioaktyviai žymėtus substratus. Šie 73 nt daliniai oligodupleksai turėjo 20 bp DNR dupleksą 3'- arba 5'-gale bei 53 nt vgDNR regioną (4 E pav.). Cas3 sugebėjo išvynioti tik substratą su 5'-dupleksu, taip patvirtindamas 3'→5' poliškumą.

3. DNR taikinio atpažinimas Cascade kompleksu

PAM sekų bioinformatinę analizę atliko dr. Philippe Horvath (DuPont; Prancūzija).

S. thermophilus Cascade komplekso baltymų ir crRNR masių spektrometrijos analizės atliko dr. Sakharam P. Waghmare ir dr. Mark J. Dickman (Šefildo Universitetas; Didžioji Britanija).

Vienos molekulės eksperimentus su Cascade kompleksu, naudojant magnetinius pincetus, atliko Maria S. Tikhomirova ir prof. dr. Ralf Seidel (Miunsterio Universitetas; Vokietija).

3.1. Cascade kompleksas formuoja R-kilpą, rišdamasis su PAM seką turinčia dgDNR

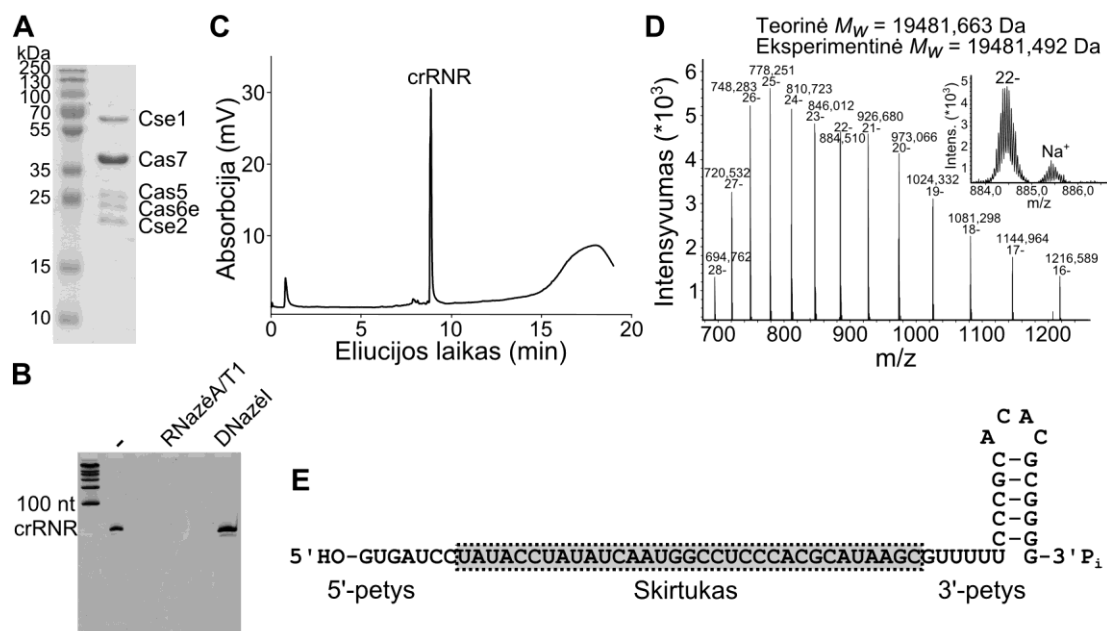
3.1.1. Cascade klonavimas, raiška ir gryninimas

E. coli Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, ir Cas6e ir crRNR molekulė formuoja Cascade kompleksą (Brouns et al., 2008), kuris kartu su Cas3 blokuoja svetimės DNR proliferaciją. Iškėlėme hipotezę, kad homologiški *S. thermophilus* Cas baltymai (1 A pav.) turėtų formuoti panašų Cascade kompleksą. Pirmiausiai, sukonstravome pCascade,

pCasC ir pCRh suderinamus heterologinius vektorius (1 lentelė), kurie kodavo Cascade komplekso komponentus. Šios plazmidės buvo ekspresuotos *E. coli* BL21 (DE3) kamiene, o Cascade kompleksas išgrynintas skysčių chromatografijos metodu, naudojant Ni²⁺ chelatinę, gelfiltracinę ir heparino kolonėles. Analizuojant išgrynintą kompleksą NDS-PAGE (5 A pav), buvo stebimos penkios juostelės, atitinkančios Cascade baltymų molekulinės mases. Šių baltymų tapatybė buvo patvirtinta ir masių spektrometrijos metodu. Tad *S. thermophilus* Cse1, Cse2, Cas7, Cas5, ir Cas6e baltymai tikrai formuoja kompleksą, panašų į *E. coli* Cascade. Pašalinus Cascade baltymus, aptikome, kad Cascade kompleksas buvo išgrynintas drauge su maža crRNR molekule (5 B pav.).

3.1.2. *S. thermophilus* CRISPR4-Cas crRNR charakterizavimas

Toliau tyrėme subrendusias Cascade komplekso crRNR molekules, naudodami RNR denatūruojančią chromatografiją drauge su ESI-MS. crRNR molekulės iš Cascade komplekso išgrynintos, naudojant jonų porų atvirkštinių fazių chromatografiją (Dickman & Hornby, 2006; Waghmare et al., 2009). Jų ilgis buvo ~60 nt (5 C pav.). Analizuojant crRNR ESI-MS, nustatyta 19482 Da crRNR molekulinė masė (5 D pav.). Subrendusią crRNR molekulę buvo paveikta RNaze T1 ir RNaze A, o susidarę oligoribonukleotidiniai fragmentai analizuoti ESI-MS/MS. Panaudojus crRNR fragmentacijos duomenis bei pilno ilgio molekulės masę, nustatyta, kad St-CRISPR4-Cas subrendusios crRNR yra 61 nt ilgio molekulės (turinčios 7 nt 5'-petį, 33 nt skirtuką ir 21 nt 3'-petį) su 5'-OH ir 3'-P_i (MW 19481.5 Da) (5 E pav.).



5 pav. *S. thermophilus* Cascade kompleksas. (A) NSD-PAGE gelyje Coomassie blue nudažyti Cascade komplekso baltymai. (B) Cascade kompleksas riša mažas crRNR molekules. Nukleorūgštys, išgrynintos iš Cascade komplekso, buvo paveiktos RNazeA/T1 ar DNazeI. (C) Subrendusių crRNR molekulių chromatografinė analizė. (D) Išgrynintų *S. thermophilus* crRNR molekulių ESI-MS analizė. Padidinta 22-krūvio būseną parodyta įsiuve. (E) Cascade komplekse surištos crRNR architektūra.

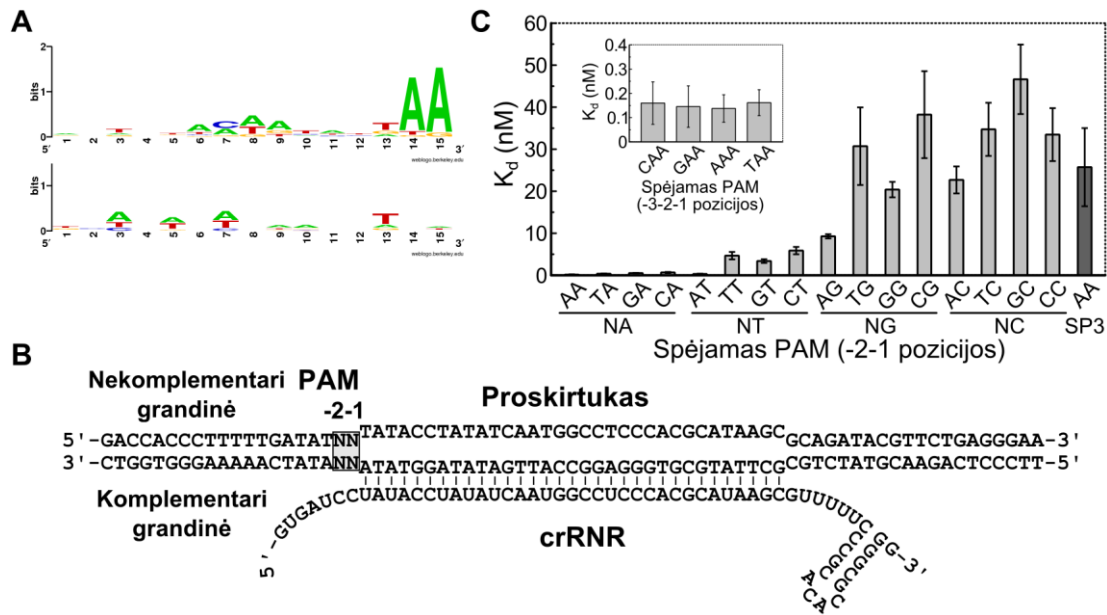
3.1.3. *S. thermophilus* CRISPR4-Cas sistemos PAM sekos analizė

I ir II tipo sistemose PAM seka, aptinkama greta proskirtuko, yra būtina svetimoms DNR ribojimui (Deveau et al., 2008; Horvath et al., 2008; Sapranauškas et al., 2011; Semenova et al., 2011). *E. coli* I-E tipo sistemos PAM yra 5'-AWG-3' seka, lokalizuota prieš proskirtuką (Mojica et al., 2009), ir būtina *E. coli* Cascade rišimuisi ir po to sekančiai DNR interferencijai (Semenova et al., 2011). Norėdami nustatyti CRISPR4-Cas sistemos PAM seką, mes išanalizavome CRISPR4 skirtukų sekas. CRISPR4 lokusas randamas DGCC7710 (Horvath & Barrangou, 2010) bei dar trijuose *S. thermophilus* kamienuose (DuPont kultūrų kolekcija). CRISPR4 lokusas DGCC7710 kamienne turi 12 unikalių skirtukų, o kiti trys CRISPR4 teigiami kamienai turi 26 unikalios skirtukus. Didžioji skirtukų dalis (26 iš 38) atitiko *S. thermophilus* fagų sekas (proskirtukus). Tolimesnei analizei atrinktos 106 proskirtukų sekos, identiškoms skirtukų sekoms. Spėjamai PAM sekai nustatyti buvo naudojamos sekos, aptinkamos iškart prieš ir už proskirtuko sekos. Atmetus perteklines sekas, gautos 15 nt ilgio 28 unikalios sekos prieš proskirtuką ir 21 seka už proskirtuko, kurių konservatyvumas pavaizduotas Weblogo programa (Crooks et al., 2004) (6 A pav.). Buvo aptiktas dviejų bazių porų konservatyvus motyvas 5'-AA-3' iškart prieš proskirtuką.

3.1.4. Cascade rišimuisi su proskirtuku yra reikalinga PAM seka

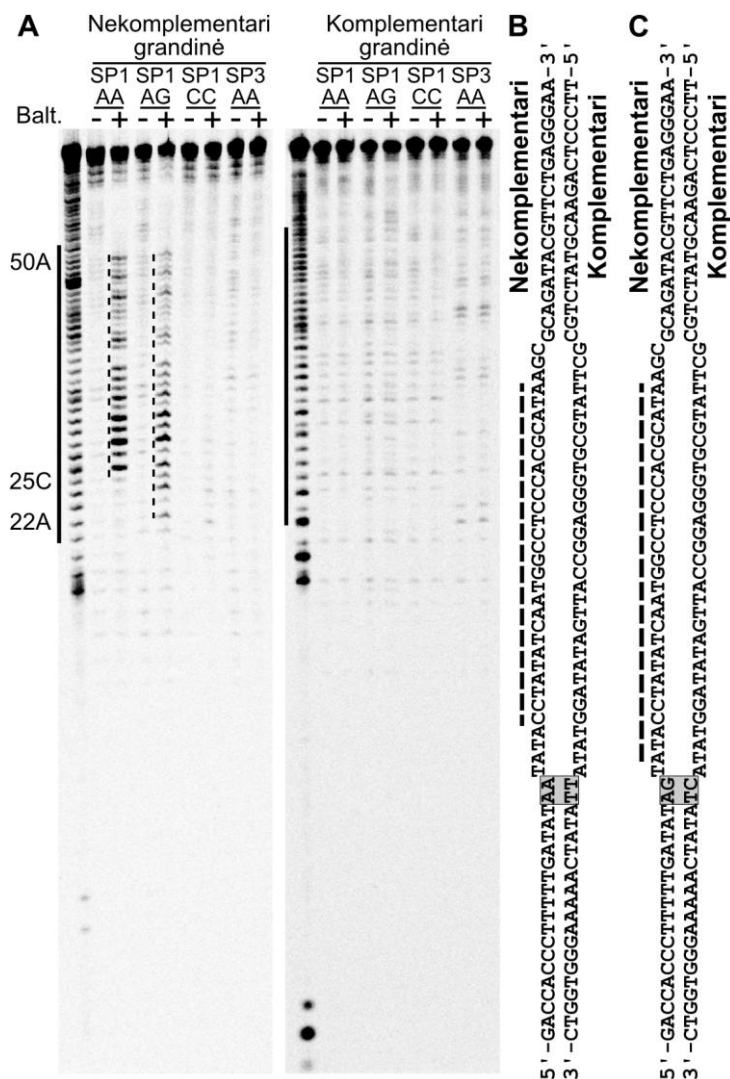
Norėdami patikrinti, ar spėjama PAM seka yra svarbi taikinio atpažinimui, mes analizavome Cascade rišimąsi su grupe sintetinių 73 bp oligodupleksų, kurie turėjo proskirtuko-1 seką ir skirtingus nukleotidus -2 ir -1 spėjamo PAM pozicijose (6 B pav.). Cascade sąveika su radioaktyviai pažymėtais oligodupleksais buvo tiriama elektroforezinio judrumo poslinkio metodu (EJPM). Šis tyrimas atskleidė, kad, pagal sąveiką su Cascade stiprumą, oligodupleksus galima suskirstyti į tris grupes. Spėjamo PAM srityje N(-2)A(-1) sekas turintys oligodupleksai yra labai giminingi Cascade ($K_d \sim 0,2$ nM). Tuo tarpu N(-2)T(-1) bei A(-2)G(-1) sekas turintys oligodupleksai su Cascade sąveikauja silpniau ($K_d < 10$ nM), o kitų oligodupleksų sąveikos stiprumas panašus į nespecifinio substrato, vietoje proskirtuko-1 turinčio nekomplementarų proskirtuką-3. Taigi, rezultatai rodo, kad CRISPR4-Cas sistemos PAM seka yra tik vienas A arba T (W) nukleotidas -1 pozicijoje. Šioje pozicijoje netoleruojami G ir C nukleotidai, išskyrus A(-2)G(-1) dinukleotidą (6 C pav.).

Siekdami įsitikinti, kad nekonservatyvi -3 pozicija šalia spėjamo PAM yra nesvarbi taikinio atpažinimui, patikrinome Cascade sąveiką su oligodupleksais, turinčiais konservatyvų A(-2)A(-1) dinukleotidą ir bet kokią nukleotidą -3 pozicijoje (SP1-TAA, SP1-AAA, SP1-GAA ir SP1-CAA). EJPM analizė patvirtino, kad Cascade giminingumas substratams, su variabilium N(-3), buvo panašus (6 C pav. įsiuvas), tad -3 pozicija yra nesvarbi Cascade rišimuisi.



6 pav. Nuo PAM priklausomas Cascade rišimasis. (A) CRISPR4-Cas sistemos spėjama PAM seka. Proskirtukus, kurie identiški CRISPR4 skirtukų sekoms, supančių 15 nt ilgio sekų konservatyvumas pavaizduotas Weblogo programa. Viršuje pateiktas prieš proskirtuką aptinkamų sekų palyginys, apačioje – už proskirtuko. Iškart prieš proskirtuką lokalizuota 2-nt PAM (5'-AA-3') seka. (B) Spėjamos R-kilpos struktūros, susidarančios Cascade rišantis prie 73-bp oligodeoksiribonukleotido, schema. Spėjamos PAM sekos nukleotidai NN buvo keičiami -1 ir -2 pozicijose. Susidarant R-kilpai, crRNR bazės poruojasi su komplementarios proskirtuko grandinės bazėmis, tuo tarpu nekomplementari grandinė yra išstumiamą kaip vgDNR. (C) PAM įtaka Cascade rišimuisi prie proskirtuko-1. Histogramoje pateiktos disociacijos konstantos K_d reikšmės, nustatytos EJPM. Paklaidų intervalai atitinka trijų nepriklausomų eksperimentų standartinį nuokrypį nuo K_d vidurkio. Oligodupleksas su nekomplementariu proskirtuku-3 naudotas kaip nespecifinės DNR kontrolė. K_d vertės gautos, keičiant -3 poziciją greta spėjamo PAM, pateiktos įsiuve.

I tipo CRISPR-Cas sistemose, pavyzdžiui, *E. coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* taikinio atpažinimui svarbi pradžia seka, lokalizuota crRNR skirtuko 5'-galo regione (Semenova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2011). Manoma, kad ši seka inicijuoja R-kilpos susidarymą. R-kilpoje crRNR skirtuko seka poruojasi su komplementaria proskirtuko grandine, o nekomplementari grandinė yra išstumiamą vgDNR pavidalu. Patikrinome, ar ir *S. thermophilus* Cascade, sąveikaudamas su DNR taikiniu, sudaro R-kilpą. Tam naudojome P1 nukleazę, kuri specifiskai karpą vgDNR regionus (Jore et al., 2011) (7 pav.). P1 nukleazė karpė nekomplementarias grandines SP1-AA ir SP1-AG oligodupleksuose, kurie turi geras PAM sekas, neliesdama komplementarių proskirtuko grandinių. Kita vertus, P1 nekarpė nei vienos grandinės oligodupleksuose, kurie turi blogą PAM (SP1-CC) ar nekomplementarų proskirtuką (SP3-AA). Vadinasi, R-kilpos susidaro tik tada, kai substratas turi gerą PAM seką ir komplementarų proskirtuką.



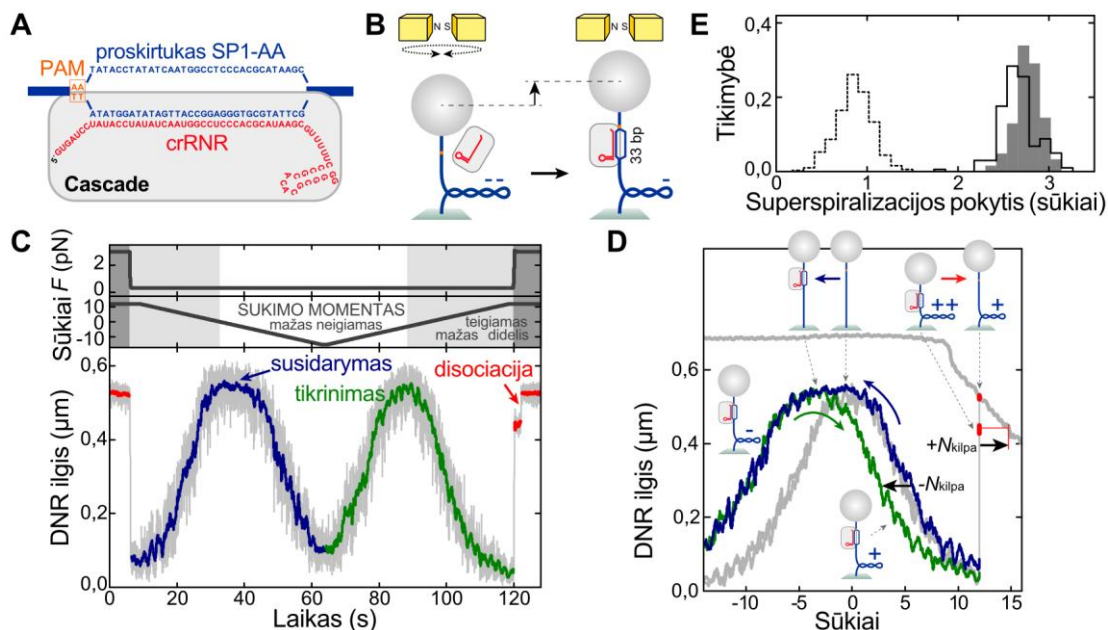
7 pav. VgDNR regionų aptikimas Cascade–DNR taikinio komplekse P1 nukleaze. (A) Cascade „pėdsakai“ denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje. P1 jautrių regionų intervalai pažymėti punktyrinėmis linijomis bei kraštiniais nukleotidais. Proskirtukų regionai pažymėti ištinėmis linijomis. (B) SP1–AA ir (C) SP1–AG oligodupleksų sekos. Proskirtukų regionai pavaizduoti kaip kilpos. PAM seka pažymėta pilku kvadratu. Nekomplementarių grandinių P1 jautriūs regionai pažymėti punktyrinėmis linijomis.

3.2. Vienos Cascade molekulės sudaromos R-kilpos tiesioginis stebėjimas

3.2.1. R-kilpos susidarymo stebėjimas magnetiniais pincetais

Tiriant Cascade komplekso sąveiką su DNR taikinio molekulėmis biocheminiais metodais tirpale, nustatyta, kad esant tinkamai PAM sekai susidaro R-kilpa (8 A pav.). Norėdami stebėti R-kilpos susidarymą pavienėse DNR molekulėse, mes panaudojome magnetinių pincetų metodą (Brutzer et al., 2010; Mosconi et al., 2009) (8 B pav.). Prie vieno 2,1 kbp DNR molekulės, turinčios vieną proskirtuką ir PAM seką, galo buvo pritvirtinta magnetinė dalelė, o kitas galas prikabintas prie tėkmės kameros paviršiaus. Magnetų poros pagalba DNR molekulę su prikabinta magnetine dalele galima ištempti ir keisti DNR superspiralizaciją, o videokamerą registruojant dalelės padėtį, galima įvertinti DNR ilgio pokyčius (Klaue & Seidel, 2009). Pastoviai keičiant sukimo momentą, DNR ilgis pradžioje nekinta. Pasiekus kritinį sukimo momentą, DNR pradeda trumpėti dėl susidarančių plektoneminių superspiralių. Gauti charakteringi sukimo kreivės ir sukimo momento profiliai (8 B pav.) naudojami kiekybinei duomenų analizei (Forth et al., 2008; Kauert et al., 2011; Mosconi et al., 2009; Oberstrass et al., 2012).

Jei baltymas, prisirišdamas prie DNR lokaliai išvynioja DNR (pvz., susidarant R-



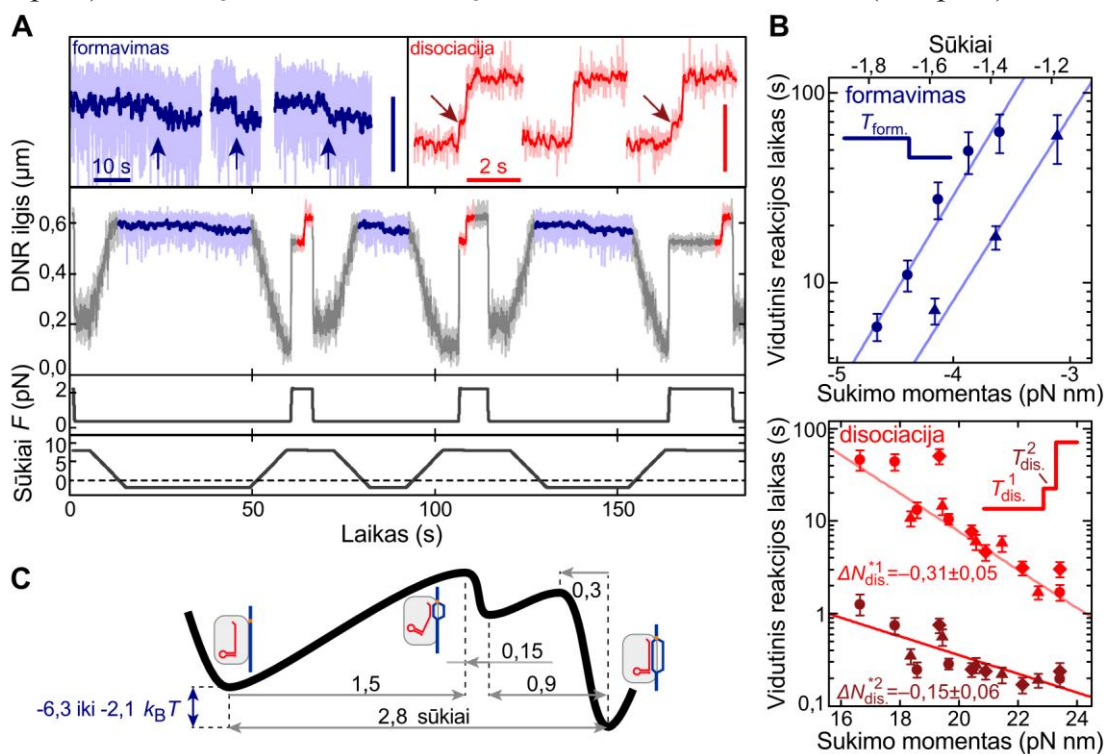
8 pav. Cascade komplekso R-kilpų susidarymas ir iširimasis (disociacija) vienos molekulės sukimo eksperimentuose. (A) Schematinis R-kilpos (33 bp) piešinys. (B) DNR sukimo magnetiniais pincetais principas. Esant tam tikram sūkių skaičiui, susidaro R-kilpa, kuri lokaliai išvynioja DNR grandinę, todėl pakinta DNR superspiralizacija ir ilgis. (C ir D) R-kilpos ciklai, esant 10 nM Cascade komplekso. Veikiant 0,31 pN jėgai, vedlio crRNR komplementarų proskirtuką/PAM turinti DNR (A) yra neigiamai superspiralizuojama, skatinant R-kilpos susidarymą (mėlyna kreivė). Teigiamai superspiralizuojant DNR, yra tikrinamas R-kilpos buvimas (žalia kreivė). R-kilpa disocijuoja, padidinus tempimo jėgą iki 3,0 pN (raudona kreivė). Mėlyna strėlytė žymi R-kilpos susidarymo poziciją, o raudona – disociacijos. (D) paveiksle viršutinė ir apatinė superspiralizacijos kreivė gauta be Cascade komplekso (pilkos kreivės), naudojant tą pačią DNR molekulę ir ją tempiant atitinkamai 0,31 ir 3,0 pN jėga. (E) Superspiralizacijos kreivių poslinkiai, sukelti Cascade komplekso. Pavaizduoti superspiralizacijos kreivės kairiojo šono poslinkiai po R-kilpos susidarymo (pilki stulpeliai; D pažymėta $-N_{kilpa}$) ir po pilnos R-kilpos disociacijos (stulpeliai vientisu juodu kontūru; D pažymėta $+N_{kilpa}$). Juodo brūkšninio kontūro stulpeliai vaizduoja R-kilpos pirmojo disociacijos žingsnio poslinkį (9 A pav.).

kilpai), keičiasi DNR superspiralizacija, ir tai sukelia visos sukimo kreivės poslinkį arba DNR ilgio pokytį (Howan et al., 2012) (8 B pav.). Norėdami pritaikyti šį metodą Cascade formuojamos R-kilpos susidarymo tyrimui, atlikome DNR, turinčios komplementarų proskirtuką ir 5'-AA-3' PAM seką (8 A pav.), superspiralizacijos eksperimentus, kuriuos pavadiname „R-kilpos ciklais“. Pirmiausiai, veikiant nedidele jėga, DNR buvo šiek tiek išvyniota (neigiama superspiralizacija), taip skatinant R-kilpos susidarymą (8 C ir D pav. mėlyna kreivė). Po to, susukdami DNR (teigiama superspiralizacija), stebėjome R-kilpos susidarymą (8 C ir D pav. žalia kreivė). Cascade sudaromos R-kilpos (100% iš visų tirtų atvejų; $n = 89$) buvo stebimos kaip sukimo kreivės kairiojo šono poslinkis į neigiamų sukinių pusę, lyginant su kreive, gauta be baltymo (8 D pav.). Esant mažai neigiamai superspiralizacijai (nuo -1 iki -2 sūkių), Cascade R-kilpą sudarydavo akimirksniu. R-kilpos buvo stabilios esant teigiamai DNR superspiralizacijai ir mažai tempimo jėgai (tikrinimo kreivės dešiniojo šono poslinkis) (8 D pav.). R-kilpų iširimą buvo galima stebėti kaip staigų DNR pailgėjimą, padidinus tempimo jėgą (tai atitinka padidėjusį sukimo momentą) (8 C ir D pav.). Dešiniojo

superspiralizacijos kreivės šono poslinkis atitiko $-2,62 \pm 0,04$ (R-kilpos susidarymas) ir $+2,67 \pm 0,03$ (R-kilpos iširimas) sūkius. Tuo tarpu kreivės maksimumo poslinkis buvo $2,81 \pm 0,07$ sūkių (8 E pav.). Šios vertės yra šiek tiek mažesnės, nei buvo tikėtasi (3,1 sūkių, skaičiuojant pagal DNR spiralės 10,5 bp žingsnį), greičiausiai, dėl DNR superspirališkumą kompensuojančio DNR lenkimo, kurį sukelia Cascade rišimasis (Westra et al., 2012b).

3.2.2. R-kilpos susidarymo ir disociacijos priklausomybė nuo sukimo momento

Norėdami kiekybiškai įvertinti anksčiau pasiūlytą DNR superspiralizacijos įtaką R-kilpos susidarymui (Westra et al., 2012b) bei R-kilpos energetinius parametrus, mes pamatavome R-kilpos susidarymo ir iširimo (disociacijos) kinetines priklausomybes nuo sukimo momento, veikiančio DNR (9 A pav.). Nustatėme, kad tiek R-kilpos susidarymas, tiek iširimas yra priklausomi nuo sukimo momento (9 B pav.). R-kilpos iširimui reikia apie keturis kartus didesnio sukimo momento nei R-kilpos susidarymui. Didžioji dalis stebėtų disociacijos įvykių (76%; $n = 482$) turėjo nuo sukimo momento priklausančią trumpai gyvuojančią tarpinę stadiją, atitinkančią $0,9 \pm 0,1$ sūkių (8 E bei 9 A ir B pav.). Pritaikę Arrhenius modelį sukimo momento kinetikai (9 B pav.),



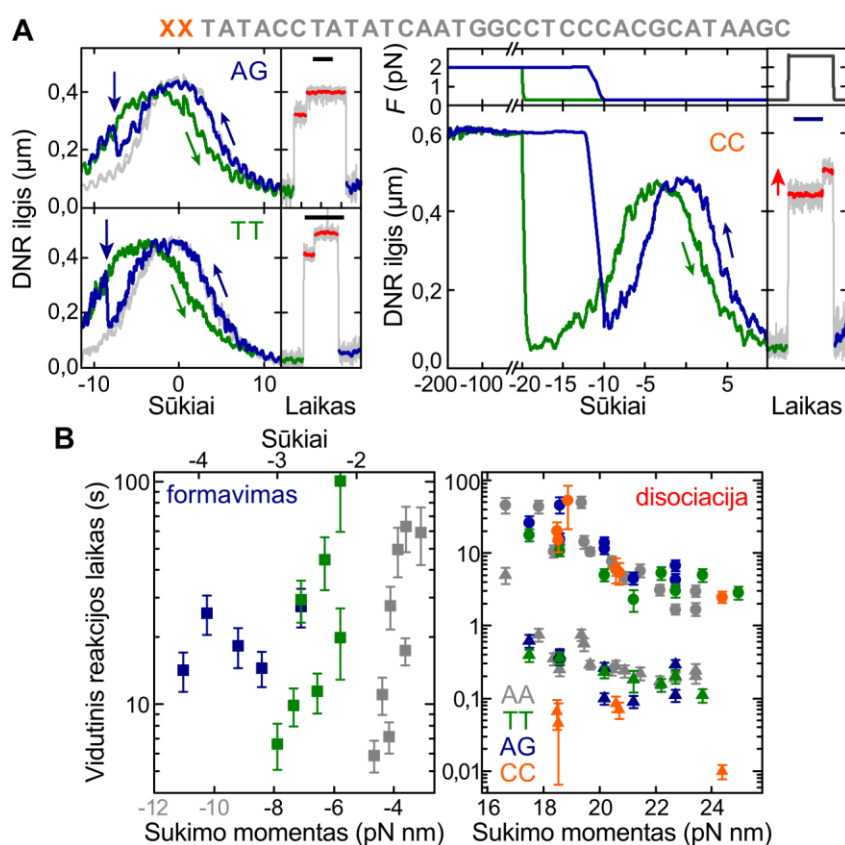
9 pav. Cascade R-kilpos susidarymo ir disociacijos priklausomybė nuo sukimo momento. (A) Cascade R-kilpos susidarymo ($-1,6$ sūkiuose, $0,36$ pN) ir disociacijos ($+8$ sūkiuose, $2,2$ pN) kartotiniai ciklai. R-kilpos susidarymas yra registruojamas kaip DNR ilgio sumažėjimas, o R-kilpos disociacija – kaip padidėjimas (padidinti vaizdai viršuje; vertikalios linijos atitinka 100 nm mastelį). Mėlynos rodyklės žymi R-kilpos susidarymą, o rudos – R-kilpos disociacijos tarpines stadijas. (B) Vidutinių R-kilpos susidarymo (mėlyni taškai) ir disociacijos laikų (pirmąją disociacijos žingsnį žymi raudoni taškai, o antrąją – rudi) priklausomybė nuo sukimo momento. Duomenų svyravimai tarp skirtingų DNR molekulių pavaizduoti skirtingais simboliais. Ištininės linijos žymi duomenų atitikimą eksponentinio modelio priklausomybei, pagal kurią apskaičiuoti atstumai tarp tarpinių būsenų. (C) Cascade formuojamos R-kilpos energetiniai būviai, gauti iš sukimo momento priklausomybių.

apskaičiavome atstumus tarp tarpinių būsenų ($\Delta N_{\text{form.}} = 1,5 \pm 0,2$ sūčiai R-kilpos susidarymui; $\Delta N_{\text{dis.}}^1 = 0,31 \pm 0,05$ ir $\Delta N_{\text{dis.}}^2 = 0,15 \pm 0,06$ sūčiai dviems tarpinėms disociacijos būsenoms). Nustatėme, kad R-kilpos formavimui reikia 2,1–6,3 $k_B T$ laisvosios energijos. Apibendrinami šiuos duomenis, pasiūlėme supaprastintą Cascade formuojamos R-kilpos energetinių būvių schemą (9 C pav.).

3.2.3. Mutacijos PAM sekoje daro poveikį R-kilpos susidarymui, bet ne stabilumui

Siekdami ištirti PAM sekos įtaką R-kilpos susidarymo greičiui bei stabilumui,

magnetinių pincetų eksperimentuose naudojome DNR substratus, turinčius tą patį proskirtuką, bet skirtingas PAM sekas, kurių giminingumas Cascade skyrėsi ($AA > TT > AG \gg CC$). R-kilpos buvo stebimos su TT ir AG PAM sekas turinčiais substratais, tačiau, lyginant su AA PAM seka, jų susidarymui reikėjo labiau išvynioti DNR (t.y., reikalinga didesnė neigiama superspiralizacija/ didesnis sukimo momentas) (10 A ir B pav.). Susidarius R-kilpoms, nuo sukimo momento priklausomi vidutiniai disociacijos

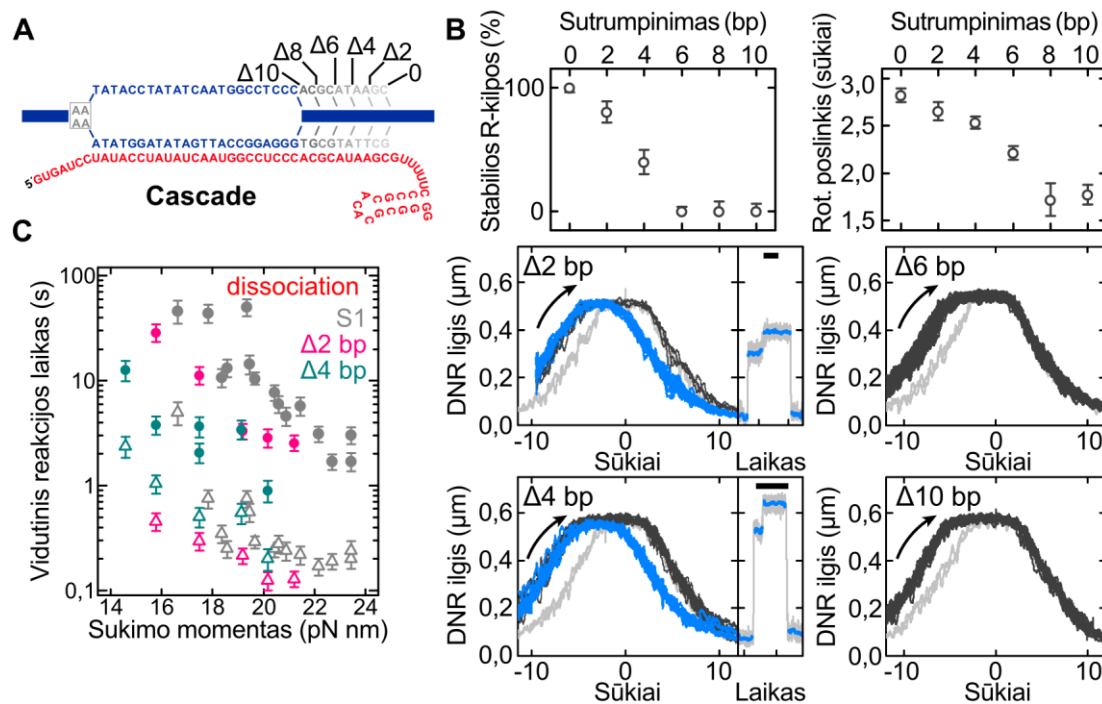


10 pav. PAM sekos įtaka R-kilpos susidarymui ir disociacijai. (A) Kartotiniai Cascade R-kilpų ciklai, naudojant DNR su komplementariu proskirtuku-1 bei skirtingomis PAM sekomis (taikinio seka viršuje). Kreivių spalvos ir eksperimentinės sąlygos tokios pat kaip 9 pav. C ir D. R-kilpų susidarymui substrate su CC PAM seka reikėjo -200 sūčių ($2,0$ pN; mėlyna kreivė). R-kilpos buvimą rodo poslinkis kontrolinėje kreivėje (žalia) bei disociacijos žingsnis (raudona kreivė; mastelio juostelė lygi 10 s). (B) R-kilpos susidarymo ir disociacijos vidutinio laiko priklausomybės nuo sukimo momento skirtingą PAM seką turinčiuose substratuose (spalvinis kodavimas pateiktas paveikslėlyje). Apskritimai žymi pirmąjį disociacijos žingsnį, trikampiai – antrąjį. Nepriklausomų nuo sūčių skaičiaus sukimo momento reikšmių intervalas nuspalvintas pilkai.

laikai abiem disociacijos žingsniams buvo vienodi (paklaidų ribose). Tai rodo, kad susidariusių R-kilpų stabilumas yra vienodas ir nepriklauso nuo PAM sekos. Substratuose su CC PAM seka tose pačiose sąlygose užregistruoti R-kilpų susidarymo nepavyko. Tiesa, padidinus tempimo jėgą ir labai neigiamai superspiralizavus DNR, t.y., praktiškai mechaniškai atskyrus DNR grandines, R-kilpos buvo stebimos [35% iš visų tirtų atvejų, atlikus -200 sūkių ($n = 51$), 19% -100 sūkių ($n = 27$); 0% -10 sūkių ($n = 78$)] ir CC PAM seką turinčiuose substratuose. Pažymėtina, kad CC PAM turinčiuose substratuose susidariusios R-kilpos yra taip pat stabilios. Palyginus su AA, TT ir AG PAM sekas turinčiais substratais, šių R-kilpų pirmojo disociacijos žingsnio vidutinio laiko priklausomybė nuo sukimo momento nesiskyrė, tačiau antrojo disociacijos žingsnio laikas reikšmingai sumažėjo (10 B pav.). Apibendrinant galima teigti, kad PAM reguliuoja R-kilpos susidarymo greitį, bet neturi įtakos disociacijai.

3.2.4. Proskirtuko galo trumpinimas keičia R-kilpos stabilumą

Magnetinių pincetų eksperimentai parodė, kad PAM seka lemia R-kilpos susidarymo greitį, tačiau neturi įtakos susidariusios R-kilpos stabilumui. Norėdami patikrinti, ar R-kilpos susidarymas yra vienkryptis, mes ištyrėme substratus, kurie nuo PAM nutolusiame gale turi laipsniškai sutrumpintus proskirtukus (11 A pav.). Eksperimentai parodė, kad R-kilpos susidarė ir substratuose su trumpesniais proskirtukais. Trumpėjant komplementariai proskirtuko daliai, proporcingai trumpėjo ir sūkių poslinkis (11 B pav.).



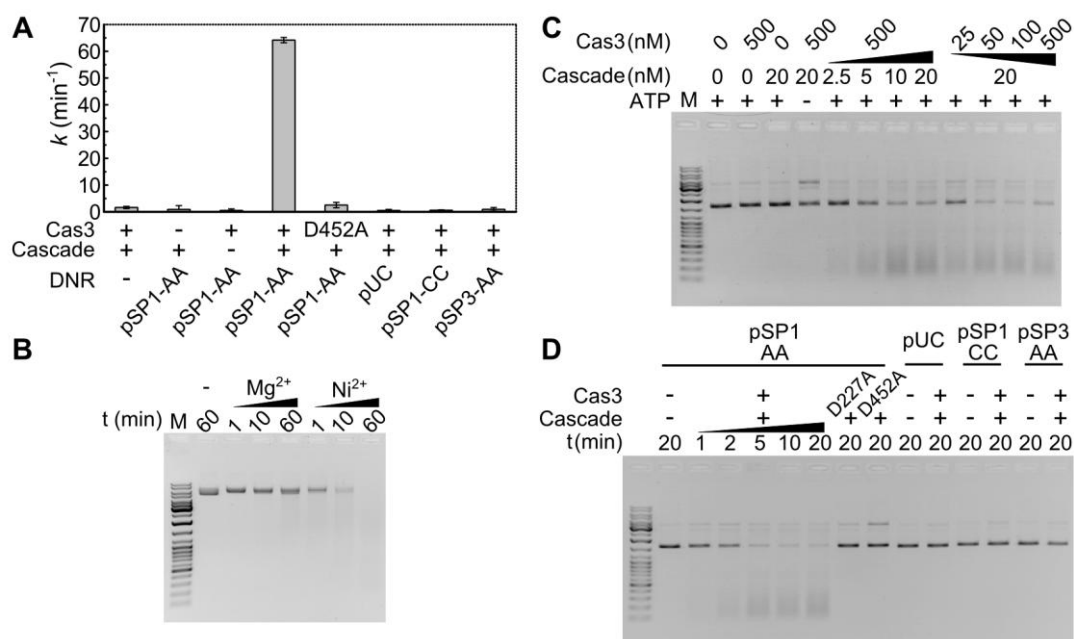
11 pav. Proskirtuko sutrumpinimas sumažina R-kilpos stabilumą. (A) Proskirtuko-1 galas, esantis priešingoje pusėje nei PAM, buvo sutrumpintas 2, 4, 6, 8 ar 10 bp. (B) 2, 4, 6 ir 10 bp sutrumpinto proskirtuko-1 R-kilpų tikrinimo ir disociacijos kreivės, esant Cascade kompleksui. Stebimos stabilios (mėlyna) ir nestabilios (tamsiai pilkos) R-kilpos. Viršuje pateiktas procentinis R-kilpų stabilumas ir rotacinių poslinkių dydžiai. (C) Vidutinių disociacijos laikų priklausomybė nuo sukimo momento (apskaičiuota iš B pateiktų eksperimentų) stabilioms 0, 2, ir 4 bp sutrumpintoms R-kilpoms. Pilni apskritimai žymi pirmąją disociacijos žingsnį, o tušti trikampiai – antrąjį.

Proskirtuką sutrumpinus 6 bp arba daugiau, R-kilpos tapo nestabilios (11 B pav.) ir iširdavo esant nedidelei teigiamai superspiralizacijai, DNR tempiant nedidele jėga (disociacijos šiems substratams pamatuoti nepavyko). Naudojant substratus, turinčius 2 ar 4 bp sutrumpintus proskirtukus, buvo stebimos tiek stabilios, tiek nestabilios R-kilpos (11 B pav.). Tiriant stabilių R-kilpų frakcijos disociaciją, nustatyta, kad 2 bp trumpesnių R-kilpų disociacijos greitis buvo šiek tiek padidėjęs, o 4 bp trumpesnių R-kilpų pirmo žingsnio disociacijos greitis žymiai padidėjo lyginant su pilno ilgio proskirtuku (11 C pav.).

4. Cas3 degraduoja Cascade surištus DNR taikinius

4.1. Cascade sąveika su proskirtuku stimuliuoja Cas3 ATPazinį aktyvumą

Rišdamasis prie proskirtuko, Cascade kompleksas formuoja R-kilpą (6 B pav.), kurioje nekomplementari grandinė yra išstumama vgDNR formoje, tad ši grandinė galėtų būti Cas3 rišimosi vieta. Patikrinome, ar Cascade su dgDNR taikiniu skatina ATPazinį Cas3 aktyvumą. Cas3 baltymas buvo maišomas su Cascade kompleksu ir plazmide, neturinčia arba turinčia proskirtuką-1 bei PAM seką (lentelė 2). Cas3 ATPazinis aktyvumas buvo skatinamas tik pSP1-AA plazmide, turinčia komplementarų proskirtuką-1 bei gerą PAM seką (12 A pav.). Plazmidė su kitu proskirtuku (pSP3-AA),



12 pav. Cascade sąveika su proskirtuku stimuliuoja Cas3 ATPazinį bei nukleazinį aktyvumus. (A) ATP hidrolizės greičiai. Reakcijos greičio konstantos k (min⁻¹) apskaičiuotos pagal išsiskyrusio fosfato koncentracijos priklausomybę nuo laiko, įdėjus fiksuotą Cas3 kiekį. Reakcijos mišinyje buvo 3 nM superspiralizuotos plazmidės, 12 nM Cascade bei 300 nM Cas3 ar jo mutanto D452A. Paklaidų intervalai žymi trijų nepriklausomų eksperimentų ±standartinį nuokrypį. (B) Nikelio jonai yra geresnis Cas3 HD domeno kofaktorius nei magnio jonai. (C) Cas3, Cascade, ir ATP yra reikalingi dgDNR degradacijai. Substratu naudota superspiralizuota pSP1-AA plazmidė (5 nM). (D) PAM ir proskirtukas yra būtini DNR degradacijai. Superspiralizuotos (5 nM) plazmidės hidrolizuotos reakcijos mišiniuose, turinčiuose 100 nM Cas3 ir 20 nM Cascade.

bloga PAM seka (pSP1-CC) ar neturinti proskirtuko nei PAM (pUC) Cas3 ATPazinio aktyvumo nestimuliavo. ATPazinis aktyvumas nebuvo stebimas ir su Cas3 ATPazinio centro mutantu D452A. Taigi, rezultatai patvirtina Cas3 ATPazinio aktyvumo sąsają su vgDNR regionu, susidariusiu Cascade rišantis su komplementariu proskirtuku, lokalizuotu šalia teisingos PAM sekos.

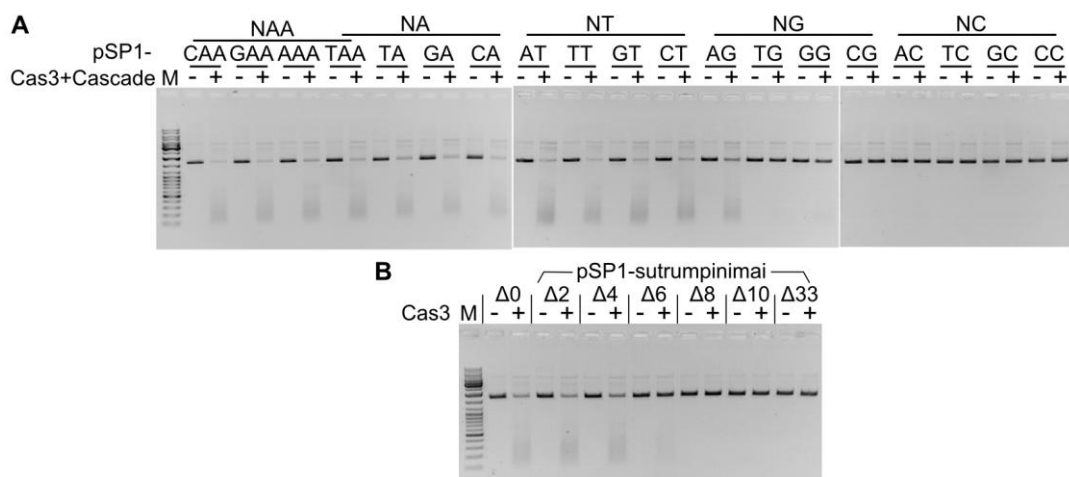
4.2. Cascade sąveika su proskirtuku stimuliuoja Cas3 nukleazinį aktyvumą

S. thermophilus Cas3, taip pat kaip *Thermus thermophilus* Cas3 baltymas (Mulepati & Bailey, 2011), M13mp18 vgDNR degradoja žymiai greičiau esant Ni^{2+} jonams, nei esant Mg^{2+} jonams (12 B pav.). Kadangi ATPazinis Cas3 aktyvumas nėra stimuliuojamas Ni^{2+} jonų, tolimesniems eksperimentams buvo naudojamas Mg^{2+} ir Ni^{2+} jonų mišinys, katalizuojantis Cas3 ATPazinį/helikazinį bei nukleazinį aktyvumus.

Norėdami išsiaiškinti, ar Cascade formuojama R-kilpa stimuliuoja Cas3 nukleazinį aktyvumą, substratu naudojome dgDNR plazmides. pSP1-AA plazmidė inkubuota su Cascade ir ATP, po to pridėta Cas3 baltymo. pSP1-AA plazmidės degradacija priklausė nuo Cascade bei Cas3 koncentracijos ir reakcijos laiko (12 C ir D pav.). Tuo tarpu Cas3 nekarpė plazmidžių, neturinčių taikinio (pUC19), turinčių nekomplementarų proskirtuką (pSP3-AA) ar blogą PAM seką (pSP1-CC) (12 D pav.). Be to, pSP1-AA plazmidės degradacijai buvo reikalinga ATP hidrolizė. Į plazmidę buvo įvedamas viengrandinis DNR trūkis, kai reakcijos mišinyje nebuvo ATP (12 C pav.) arba reakcijose su ATP vietoj WT Cas3 baltymo naudojant ATPazinio centro mutantą D452A (12 D pav.). Cas3 HD domeno mutantas D227A plazmidžių nekarpė. Vadinasi Cas3 ATPazinis/helikazinis bei nukleazinis aktyvumai yra atsakingi už pSP1-AA plazmidės degradaciją, reakcijoje esant Cascade kompleksui.

4.3. Cas3 degradoja plazmides su PAM seka ir „užrakinta“ R-kilpa

Cascade sąveikos su DNR analizė parodė, kad Cascade rišimuisi prie komplementaraus proskirtuko reikalinga teisinga PAM seka (6 C pav. ir 10 A pav.). Norėdami įsitikinti, kad plazmidžių karpymas vyksta pagal tą pačią priklausomybę nuo PAM sekos kaip ir rišimasis, sukonstravome plazmides su visais -2 ir -1 pozicijos deriniais. Plazmidžių karpymas stebėtas, pridėjus Cascade, ATP ir Cas3 (13 A pav.). Nustatėme, kad greta komplementaraus proskirtuko-1 A(-1), T(-1), ar A(-2)G(-1) sekas turinčios plazmidės buvo efektyviai karpomos. Plazmidės su B(-2)G(-1) (kur B=T ar C, ar G) arba C(-1) sekomis karpomos nebuvo. Šie rezultatai atitinka Cascade rišimosi rezultatus. Tad DNR rišimo ir karpymo eksperimentai įrodo, kad Cascade proskirtuką atpažįsta priklausomai nuo PAM sekos, o Cascade suformuota R-kilpa yra signalas Cas3 baltymui sukarpyti dgDNR.

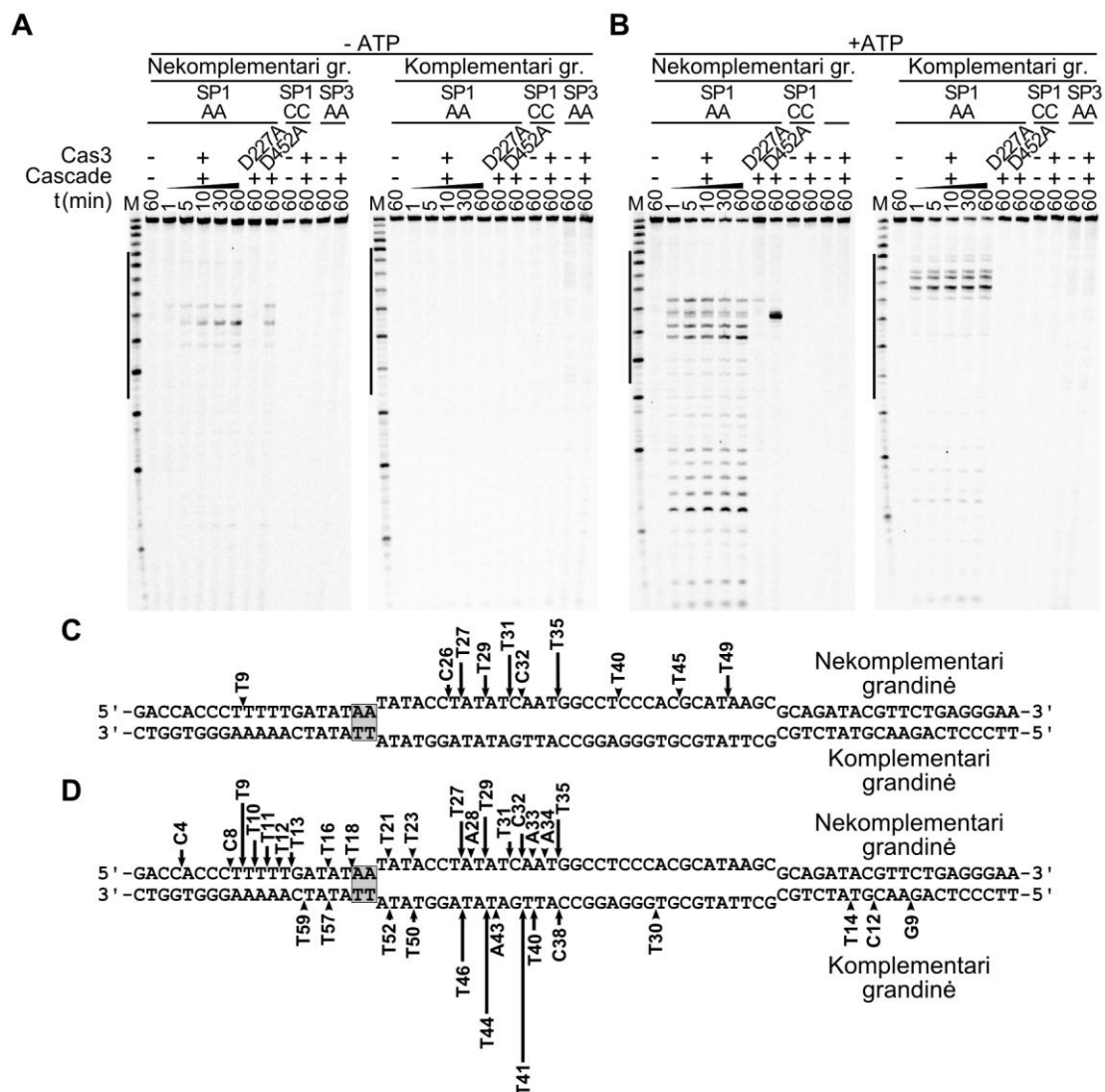


13 pav. Skirtingas PAM sekas bei sutrumpintus proskirtukus turinčių DNR karpymas. (A) Skirtingas PAM sekas turinčių DNR karpymas. Plazmidės turėjo komplementarų proskirtuką-1 bei pateiktą sekos variantą -3,-2 ir -1 pozicijose. **(B)** Sutrumpintus proskirtukus turinčių DNR karpymas. Plazmidės turėjo AA PAM seką bei proskirtuką-1, sutrumpintą nuo PAM nutolusiame gale. Δ0 ir Δ33 atitinka pilnai komplementarų ir nekomplementarų proskirtuką. Superspiralizuota plazmidė (5 nM) buvo hidrolizuojama reakcijos mišinyje, kuriame nebuvo (-) arba buvo (+) 20 nM Cascade ir 100 nM Cas3.

Magnetinių pincetų eksperimentais pademonstravome, kad, proskirtukui pilnai susiporavus su crRNR, R-kilpa yra „užrakinama“, susidarant labai stabiliam Cascade-DNR kompleksui (11 pav.). Patikrinome, kokią įtaką proskirtuko galo, nutolusio nuo PAM sekos, trumpinimas turi plazmidžių degradacijai. Proskirtuką sutrumpinus 2 bp, plazmidės buvo karpomos panašiu greičiu kaip ir plazmidės su pilno ilgio proskirtuku. Sutrumpinus proskirtuką 4 ir 6 bp karpymo greičiai žymiai sumažėjo, o plazmidės su daugiau kaip 6 bp sutrumpintais proskirtukais buvo nekarpomos (13 B pav.). Tad stabili „užrakinta“ R-kilpa yra būtina Cas3 rišimuisi bei DNR karpymui.

4.4. Cas3 kerpa DNR proskirtuko sekoje ir už jos

Siekdami nustatyti Cas3 kirpimo pozicijas reakcijos mišinyje su arba be ATP, naudojome radioaktyviai pažymėtus SP1-AA, SP1-CC ir SP3-AA oligodupleksus. Be ATP Cas3 kerpa tik nekomplementarią SP1-AA oligoduplekso grandinę proskirtuko sekoje, o komplementari grandinė nėra hidrolizuojama (14 A ir C pav.). Į reakcijos mišinį pridėjus ATP, kerpamos abi SP1-AA oligoduplekso grandinės (14 B ir D pav.). Komplementari grandinė hidrolizuojama proskirtuko sekoje bei netoli 5'-galo už PAM sekos. Nekomplementari grandinė intensyviausiai skeliama proskirtuko sekoje bei silpniau netoli 5'- ir 3'-galų (14 D pav.). Taip pat kaip ir plazmidės, oligodupleksai be komplementaraus proskirtuko (SP3-AA) ar su bloga PAM seka (SP1-CC) nebuvo hidrolizuojami. Be to, nukleazės mutantas D227A nekirpo SP1-AA substrato. ATPazinio centro mutantas D452A kirpo tik nekomplementarią grandinę esant ATP (14 A ir B pav.). Tai paaiškina, kodėl D452 mutantas, esant ATP, ar WT Cas3 be ATP į plazmidę įveda viengrandinį trūkį. Įdomu tai, kad didžioji dalis kirpimo pozicijų yra lokalizuotos pirimidino (T ar C) bazės 3'-gale (14 C ir D pav.). Nekomplementarios grandinės

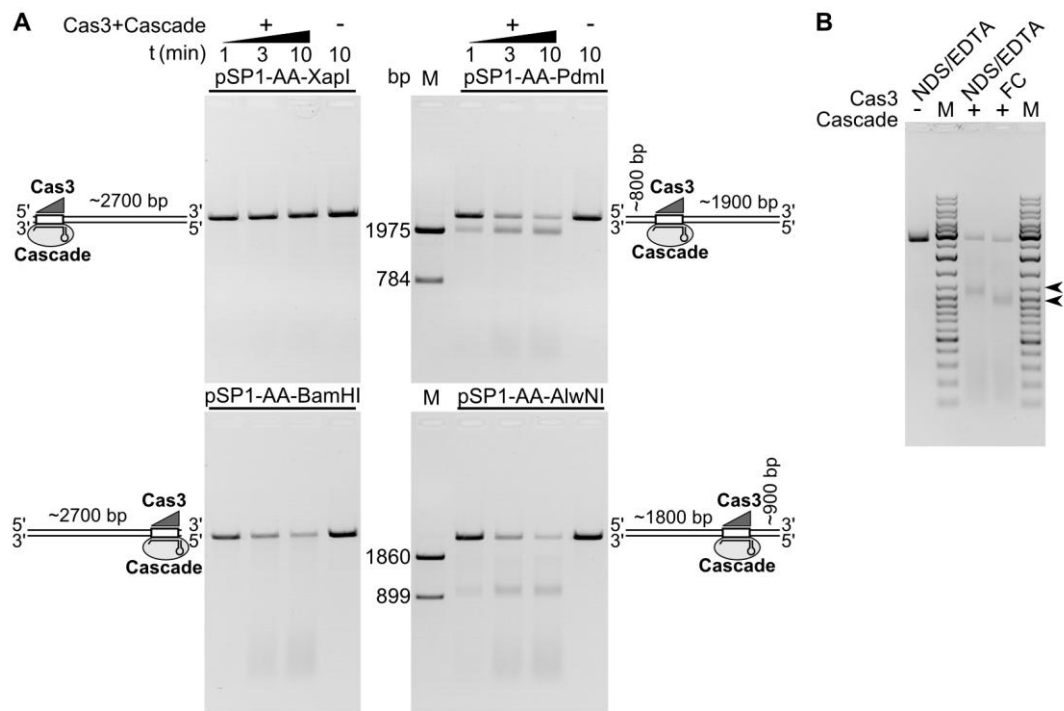


14 pav. Cas3 kirpimo pozicijos Cascade atpažįstamoje dgDNR molekulėje. Oligodupleksai, pažymėti komplementarios arba nekomplementarios grandinės 5'-gale, inkubuoti su Cascade ir Cas3 reakcijos mišinyje (**A**) be arba (**B**) su ATP. Reakcijos produktai, matomi denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje, atitinkamai pažymėti SP1-AA sekoje (**C**, **D**). Vientisos linijos gelių kairėje (**A** ir **B**) žymi proskirtukų ribas. Strėlės (**C** ir **D**) žymi kirpimo pozicijas, o jų aukštis koreliuoja su santykiniu kirpimo produktų kiekiu po 10 min inkubavimo.

kirpimo pozicijas netoli 5'-galo galima paaikšinti Cas3 translokacija 3'→5' kryptimi, kurią seka DNR degradacija.

4.5. Cas3 degraduoja DNR kryptingai

Norėdami įsitikinti, ar Cas3 karpymas yra kryptingas, mes susikonstravome linijinius DNR substratus, perkirpdami pSP1-AA plazmidę skirtingomis restrikcijos endonukleazėmis (*XapI*, *BamHI*, *PdmI*, *AlwNI*). Šiuose substratuose proskirtuko pozicija nuo DNR galo skyrėsi (15 A pav.). Proskirtukas pSP1-AA-*XapI* molekulėje yra lokalizuotas šalia nekomplementarios grandinės 5'-galo, o pSP1-AA-*PdmI* DNR - ~800 bp nuo 5'-galo. Tuo tarpu proskirtukas pSP1-AA-*BamHI* yra lokalizuotas šalia 3'-galo, o pSP1-AA-*AlwNI* - ~900-bp nuo 3'-galo. Cas3 degradavo pSP1-AA-*BamHI* molekulę



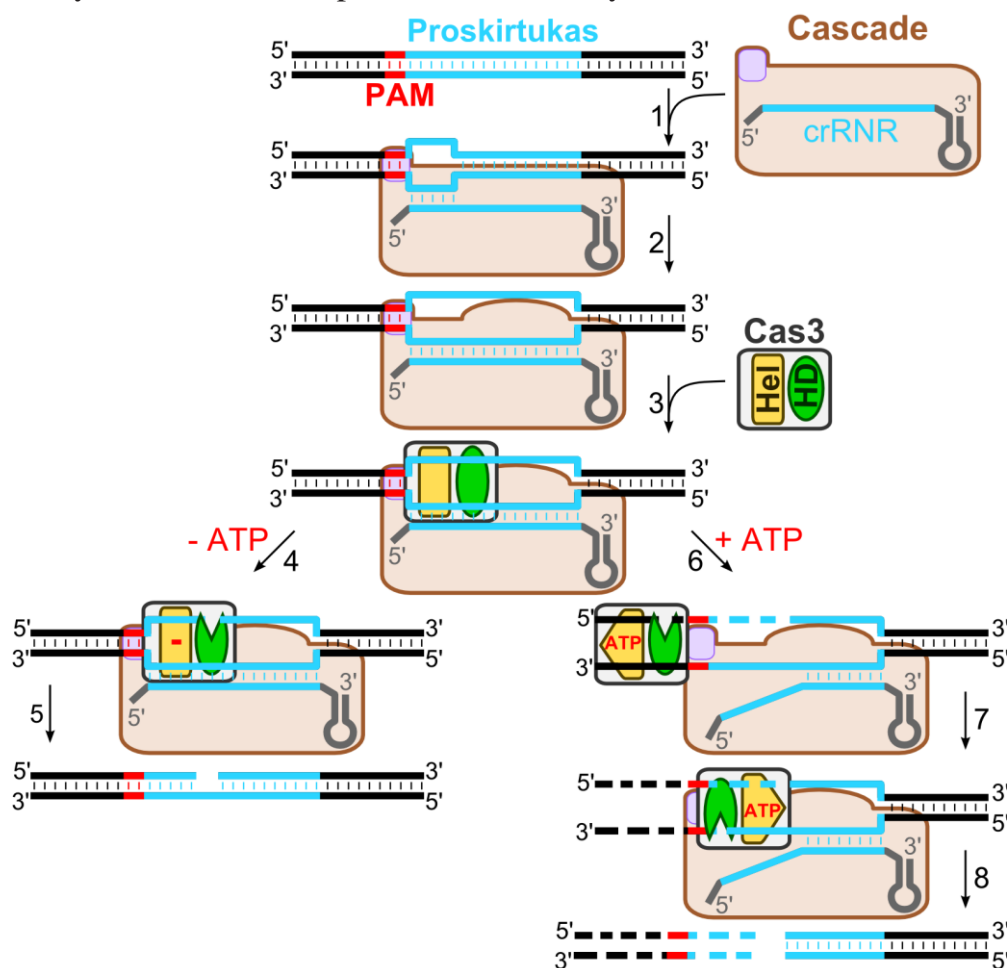
15 pav. Cas3 degraduoja DNR kryptingai. (A) Linijinių 2759 bp DNR substratų pSP1-AA-*XapI*, pSP1-AA-*PdmI*, pSP1-AA-*BamHI* ir pSP1-AA-*AlwNI* degradavimas. Šiuose DNR substratuose proskirtuko seka yra lokalizuota skirtingais atstumais nuo DNR galo. DNR molekulių, susirišusių su Cas3 ir Cascade, schemas pateiktos greta atitinkamų gelių. (B) CRISPR interferencijos kompleksas lieka susirišęs su proskirtuku po reakcijos. Reakcijoms, kuriuose buvo (+) arba nebuvo (-) Cascade ir Cas3, naudotas pSP1-AA-*AlwNI* linijinis substratas. Reakcijos po 10 min buvo stabdytos NDS/EDTA arba fenolio/chloroformo tirpalu (FC), kuris atplėšia baltymus nuo DNR. Juodos strėlės rodo pakitusios migracijos DNR fragmentus.

panašiai kaip žiedinę DNR, o pSP1-AA-*XapI* substrato degradacijos nebuvo. pSP1-AA-*PdmI* ir pSP1-AA-*AlwNI* substratai buvo perkirpti, susidarant atitinkamai ~1,9 ir ~0,9 kb produktams, o kiti kirpimo produktai buvo hidrolizuoti į smulkesnius fragmentus (15 A pav.). Idomu tai, kad ~0,9 kb produkto, susidariusio po SP1-AA-*AlwNI* hidrolizės, migravimas gelyje yra pakitęs (15 B pav.). Tai reiškia, kad Cascade (ar Cascade-Cas3) kompleksas greičiausiai lieka susirišęs su perkirpta DNR. Šie duomenys neprieštaruja modeliui, kuriame Cas3 pirmiausiai perkerpa abi proskirtuko grandines, o po to, judėdamas nekomplementaria grandine 3'→5' kryptimi, sukarmo DNR grandinę už proskirtuko. Todėl likusi DNR grandinės dalis lieka nepaliesta.

5. I-E tipo CRISPR-Cas sistemos interferencijos mechanizmas

CRISPR-Cas sistemos skirstomos į tris tipus, kurie tarpusavyje skiriasi RNB kompleksų, dalyvaujančių svetimų nukleorūgščių interferencijoje, struktūrine organizacija bei veikimo mechanizmais (Bhaya et al., 2011; Sorek et al., 2013; van der Oost et al., 2014; Westra et al., 2012a; Wiedenheft et al., 2012). I-E tipo *E. coli* CRISPR-Cas sistemos formuoja didelį RNB kompleksą, vadinamą Cascade, kuris atpažįsta DNR taikinį ir kartu su Cas3 baltymu riboja svetimą DNR (Brouns et al., 2008). *S. thermophilus* DGCC7710 kamieno CRISPR4-Cas sistema (Horvath &

Barrangou, 2010) yra homologiška *E. coli* sistemai. Mes parodėme, kad ortologiški *S. thermophilus* Cas baltymai sudaro panašų Cascade kompleksą, kuris kartu su Cas3 sunaikina DNR taikinį *in vitro*. DNR interferencijos mechanizmą (16 pav.) CRISPR4-Cas sistemoje galima perskelti į taikinio atpažinimo ir kirpimo stadijas, kurias atitinkamai vykdo Cascade kompleksas ir Cas3 baltymas.



16 pav. I-E tipo CRISPR-Cas sistemos DNR interferencijos mechanizmas. Cascade kompleksas ieško proskirtuko ir PAM sekos svetimoje DNR. Identifikavus teisingą PAM seką ir trumpą komplementarią pirminę seką (1), crRNR vedlio seka pilnai hibridizuojasi su proskirtuko komplementaria seka, susiformuojant R-kilpai. Jei nuo PAM nutolęs proskirtuko galas yra komplementarus crRNR, tai jis yra „užrakinamas“, susidarant labai stabiliai R-kilpai (2). Išstumta nekomplementari proskirtuko grandinė yra Cas3 rišimosi platforma (3). Nesant ATP, Cas3 nukleaziniu (HD) domenu kerpa tik nekomplementarią proskirtuko grandinę (4) ir susidaro viengrandinis DNR trūkis (5). Esant ATP, Cas3, greičiausiai, pertvarko Cascade-DNR kompleksą taip, kad priėtų prie abiejų proskirtuko grandinių (6). Cas3 helikazinių domenų (Hel) pagalba juda 3'→5' kryptimi, tuo tarpu HD domenas karo DNR (6; 7), susidarant degradacijos produktams tik vienoje proskirtuko pusėje (8).

Taikinio atpažinimo stadijoje Cascade kompleksas atpažįsta ir rišasi su svetima DNR (Jore et al., 2011). Cascade taikinį apibrėžia dvi sekos: (i) proskirtuko seka, komplementari crRNR vedlio sekai, bei (ii) kelių bp PAM seka, randama iškart prieš proskirtuką. PAM seka yra svetimos DNR indikatorius, kurio nėra savoje DNR (pvz., CRISPR regionai turi crRNR vedliui komplementarias sekas, tačiau greta jų nėra PAM sekos, todėl CRISPR-Cas sistema jų „nemato“). Skirtingi kompleksai dažniausiai

atpažįsta skirtingas PAM sekas (Mojica et al., 2009). Parodyta, kad *E. coli* Cascade komplekso Cse1 subvienetas dalyvauja PAM sekos (5'-AWG-3') atpažinime (Sashital et al., 2012). Mes nustatėme, kad St-Cascade atpažįsta platų PAM sekų spektrą: A(-1), T(-1) ar A(-2)G(-1). Įsibrovėliai (t.y. fagai) mutuoja PAM sekas, siekdami išvengti CRISPR-Cas interferencijos (Samson et al., 2013), todėl neišrankus PAM sekai šeimininkas turi didesnę tikimybę apsiginti nuo mutavusio įsibrovėlio.

Mes pademonstravome, kad teisinga PAM seka yra Cascade rišimosi pradžios taškas, nuo kurio prasideda crRNR poravimasis su komplementaria proskirtuko grandine, susidarant R-kilpai. *E. coli* Cascade R-kilpos susidarimui reikalinga greta PAM esanti 8 nt seka, vadinama pradžios seka (Semenova et al., 2011). Greičiausiai, pradžios seka reikalinga pradiniam DNR grandinių atskyrimui. Jei pradžios sekai poruojantis su proskirtuko grandine visos bazės yra komplementarios, tai hibridizacija tęsiasi iki vedlio sekos pabaigos. Visiškai komplementarios R-kilpos yra labai stabilios, tačiau jei bent 6 nt proskirtuko gale, nutolusiame nuo PAM, yra nesuporuoti su crRNR, tai R-kilpos yra „neužrakinamos“ ir linkusios disocijuoti. Šis papildomas patikros punktas įvertina, ar vedlio seka yra visiškai komplementari proskirtukui. *E. coli* Cascade komplekso struktūriniai duomenys (Mulepati et al., 2014) rodo, kad Cse2 subvienetai galėtų būti atsakingi už R-kilpos „užrakinimą“.

Taikinio karpymo stadijoje R-kilpa aktyvina Cas3 baltymą, kuris sunaikina DNR taikinį. Cas3 baltymo HD domenai yra atsakingas už nukleazinį aktyvumą, o helikaziniai domenai – už ATPazinį/helikazinį aktyvumą. Vienas Cas3 baltymas kardo vgDNR bei juda vgDNR 3'→5' kryptimi, hidrolizuodamas ATP, tačiau dgDNR šių aktyvumų nestimuliuoja. Cascade suformuotoje R-kilpoje, crRNR hibridizuojasi su proskirtuko komplementaria grandine, išstumdamas nekomplementarią grandinę kaip vgDNR, kuri galėtų būti Cas3 taikiniu. Iš tiesų, Cas3, nesant ATP, kerpa nekomplementarią DNR grandinę proskirtuke, susirišusiame su Cascade. ATP stimuliuoja abiejų grandinių kryptingą hidrolizę. Neseniai analogiškai aktyvumai buvo pademonstruoti I-E tipo *E. coli* CRISPR-Cas sistemos Cas3 baltymui, kuris sąveikaudamas su Cascade Cse1 subvienetu, hidrolizuoja DNR taikinį (Hochstrasser et al., 2014; Mulepati & Bailey, 2013; Westra et al., 2012b). Be to, panašus kirpimų profilis stebimas ir I-A tipo *Thermoproteus tenax* CRISPR-Cas sistemoje (Plagens et al., 2014).

Apibendrinant, Cascade ir Cas3 sudaro efektorinį kompleksą, kuris degradoja DNR taikinį *in vitro*. Mes siūlome molekulinį *S. thermophilus* CRISPR4-Cas sistemos DNR interferencijos mechanizmą (16 pav.), kuris, greičiausiai, yra panašus ir kitose I tipo sistemose. Vedamas crRNR, Cascade kompleksas aptinka teisingą PAM seką turintį DNR taikinį. PAM seka inicijuoja Cascade rišimąsi su komplementaria proskirtuko grandine, susidarant R-kilpai, kuri yra stabilizuojama, užrakinant nuo PAM nutolusį proskirtuko galą. Prie R-kilpos vgDNR rišasi Cas3, kuris galbūt permodeliuoja Cascade kompleksą ir kerpa abi DNR grandines proskirtuko sekoje. Po to Cas3, hidrolizuodamas ATP, juda nekomplementaria grandine 3'→5' kryptimi, o HD domenai šią grandinę sukardo.

Išsiaiškinus DNR interferencijos molekulinį mechanizmą, atsiveria kelias jo praktiniam pritaikymui. Neseniai buvo pademonstruoti keli I-E tipo sistemų pritaikymo pavyzdžiai. *E. coli* CRISPR-Cas sistema buvo panaudota bakterijų kamienų, pernešančių antibiotikų atsparumo genus, selektyviam sunaikinimui (Gomaa et al., 2014) bei bakteriofagų genomų modifikacijoms (Kiro et al., 2014), o Cascade kompleksas panaudotas tikslinių genų raiškos slopinimui (Luo et al., 2014).

IŠVADOS

1. *S. thermophilus* Cas3 baltymo HD domenas kerpa vgDNR nepriklausomai nuo sekos, o helikaziniai domenai, hidrolizuodami ATP, 3'→5' kryptimi išvynioja DNR dupleksą.
2. *S. thermophilus* Cascade kompleksą sudaro Cse1, Cse2, Cas7, Cas5 ir Cas6e baltymai, surišę 61 nt ilgio crRNR molekulę, kuri sudaryta iš 33 nt skirtuko bei jį supančių 7 nt kartotinio 5'-peties ir 21 nt kartotinio 3'-peties.
3. *S. thermophilus* Cascade kompleksas atpažįsta dgDNR taikini, turintį komplementarų proskirtuką ir PAM seką.
4. *S. thermophilus* Cascade sąveika su dgDNR taikiniu prasideda A(-1), T(-1) ar A(-2)G(-1) PAM sekoje, nuo kurios crRNR vedlio seka poruojasi su komplementaria proskirtuko grandine, susidarant R-kilpai.
5. Nuo PAM nutolusio proskirtuko galo poravimasis su crRNR vedlio seka lemia R-kilpos „užrakinimą“ ir Cascade-DNR komplekso stabilumą.
6. R-kilpa, susidariusi Cascade kompleksui sąveikaujant su DNR taikiniu, aktyvina Cas3 baltymą, kuris kryptingai sukarpo DNR, pradėdamas nuo proskirtuko.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. **Sinkunas T**, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2011) Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J* 30: 1335-1342
2. **Sinkunas T**, Gasiunas G, Waghmare SP, Dickman MJ, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2013) *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO J* 32: 385-394
3. Gasiunas G, **Sinkunas T**, Siksnys V (2014) Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell Mol Life Sci* 71: 449-465
4. Szczelkun MD, Tikhomirova MS, **Sinkunas T**, Gasiunas G, Karvelis T, Pschera P, Siksnys V, Seidel R (2014) Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 9798-9803

Knygos skyrius:

Sinkunas T, Gasiunas G and Siksnys V. Cas3 nuclease-helicase activity assays. *Methods in Molecular Biology: CRISPR, Methods and Protocols*. [Priimtas].

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. Seidel R, Tikhomirova M, **Sinkunas T**, Rutkauskas M, Szczelkun MD, Siksnys V. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cascade effector complex. Berlin-Brandenburg Academy of Sciences and Humanities. CRISPR 2014 - The Prokaryotic Immune System CRISPR/Cas, Berlin, Germany, 2014.05.14 – 16.
2. **Sinkunas T**, Gasiunas G, Waghmare SP, Dickman MJ, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Mechanism of Type I-E CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. University of St Andrews. CRISPR: evolution, mechanisms and infection. St Andrews, United Kingdom, 2013.06.17-19.
3. Waghmare SP, Nwokeoji AO, Wiedenheft B, **Sinkunas T**, Brouns SJ, van der Oost J, Doudna JA, Siksnys V, Dickman MJ. Analysis of CRISPR RNA processing using RNA mass spectrometry. University of St Andrews. CRISPR: evolution, mechanisms and infection. St Andrews, United Kingdom, 2013.06.17-19.
4. **Šinkūnas T**. Bakterijų imuninės sistemos CRISPR/Cas baltymas Cas3: du viename. Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija. Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Lietuvos Mokslų Akademija, Vilnius 2011-12-07.
5. Siksnys V, **Sinkunas T**, Gasiunas G, Horvath P. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. FASEB Summer Research Conference. Helicases & Nucleic Acid Translocases:

Structure, Mechanism, Function, & Roles in Human Diseases. Steamboat Springs, Colorado, USA. 2011.07.31-08.05.

6. **Sinkunas T**, Gasiunas G, Horvath P, and Siksnys V. Cas3 of the *Streptococcus thermophilus* CRISPR4 system (Ecoli-subtype) is a multifunctional protein possessing nuclease and translocase/helicase activities. Wageningen University. CRISPR meeting: CRISPR Mechanisms & Applications, Wageningen, Netherlands, 2010.10.21-22.

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo finansuoti Visuotinės dotacijos (R100) projekto lėšomis. Stipendijas už mokslinius pasiekimus skyrė Lietuvos Mokslo Taryba.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	Tomas Šinkūnas
Gimimo data	1984 10 25
Darbo adresas	Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius Vilniaus Universitetas Biotechnologijos institutas V.A. Graičiūno 8 Vilnius LT-02241
Telefonai	+370 5 2602111 (darbo) +370 602 20501 (asmeninis)
Faksas	+370 5 2602116 (darbo)
E-paštas	sinkunas@ibt.lt
Išsilavinimas	
2003-2007	Biochemijos bakalauras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
2007-2009	Biochemijos magistras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
Darbo patirtis	Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto
2007-2009	Laborantas Eukariotų genų inžinerijos skyriuje
2009-2011	Laborantas Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje
2011-2013	Bioinžinierius Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje
2013-dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje

PADĖKA

Noriu padėkoti savo darbo vadovui prof. dr. Virginijui Šikšniui už galimybę dirbti šioje įdomioje ir dinamiškoje srityje, taip pat už mokslines diskusijas, patarimus ir pagalbą ruošiant šią disertaciją.

Dėkoju dr. Aušrai Ražanskienei ir dr. Kęstučiui Sasnauskui už darbo laboratorijoje “abėcėlę”.

Esu dėkingas dr. Phillipe Horvath (DuPont) už *S. thermophilus* DGCC7710 genominę DNR bei diskusijas, Maria S. Tikhomirova ir prof. dr. Ralf Seidel (Munsterio Universitetas) už magnetinių pincetų eksperimentus, dr. Sakharam P. Waghmare ir dr. Mark J. Dickman (Šefildo Universitetas) už masių spektrometrijos analizes ir dr. Mark D. Szczelkun (Bristolio Universitetas) už supažindinimą su sustabdytos tėkmės eksperimentais.

Taip pat norėčiau padėkoti visam Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimo skyriui, ypač dr. Giedriui Gasiūnui, dr. Gintautui Tamulaičiui, dr. Giedriui Sasnauskui, dr. Minadaugui Zarembai, dr. Giedrei Tamulaitienei ir dr. Arūnui Šilanskui už mokslines diskusijas, patarimus ir pagalbą įsisavinant naujus eksperimentinius metodus.

Labiausiai dėkoju savo tėvams, Jonitai ir artimiesiems už supratimą bei palaikymą, siekiant užsibrėžtų tikslų.

SUMMARY

Prokaryotic cell is a subject for virus (phage) infection; therefore, prokaryotes have developed a multilayered defence barrier interfering with every step of the phage attack (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013). One of the layers is an adaptable defence system of prokaryotes, which is comprised of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) locus and CRISPR associated (*cas*) genes (Barrangou et al., 2007). CRISPR is an array of repetitive sequences (repeats) interspaced by unique non-repetitive sequences of extracellular origin called spacers (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). A cluster of *cas* genes encode proteins that execute the CRISPR-Cas immunity (Brouns et al., 2008; Gasiunas et al., 2012; Hale et al., 2009).

Mechanism of CRISPR-Cas defence systems can be dissected into three stages: (i) adaptation, (ii) expression and processing, and (iii) interference (van der Oost et al., 2014). Cell intruder is recognized and its small DNA fragment is integrated into the CRISPR locus as a new spacer during the adaptation stage (Barrangou et al., 2007). In the expression and processing stage, small CRISPR RNA (crRNA) molecules are generated from a long transcript of CRISPR array, which is cut within the repeat sequences (Carte et al., 2008; Deltcheva et al., 2011). In the interference stage, mature crRNA together with Cas proteins assemble into an effector complex, which targets and destroys foreign nucleic acid containing a crRNA-complementary sequence termed protospacer (Brouns et al., 2008; Gasiunas et al., 2012; Hale et al., 2009; Jinek et al., 2012; Tamulaitis et al., 2014).

Composition of *cas* genes as well as action mechanisms diverge between different CRISPR-Cas systems; therefore, these systems are classified into three types, which are further subdivided into subtypes (Makarova et al., 2011). Type I and type II systems interfere with double-stranded (ds) DNA, while single-stranded (ss) RNA is targeted by the type III. Multiple Cas protein subunits assemble on the crRNA molecule, forming a ribonucleoprotein complex termed Cascade, which is responsible for DNA target recognition in type I systems (Jore et al., 2011). However, an accessory Cas3 protein is required for DNA interference in the type I (Brouns et al., 2008).

Besides complementary protospacer, DNA targets has a protospacer adjacent motif (PAM), which is the main determinant discriminating foreign from self DNA (Deveau et al., 2008). PAM sequences are diverse and in most cases are specific for CRISPR-Cas system (Mojica et al., 2009). DNA target recognition leads to an R-loop formation where target DNA strand of the protospacer is base-paired with the crRNA, while non-target strand is displaced as an ssDNA (Jore et al., 2011). The R-loop formation triggers target DNA destruction.

The main objective of this study was to establish mechanistic details of DNA interference stage in type I CRISPR-Cas systems. Type I-E CRISPR4-Cas from *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 strain was used as a model system (Horvath & Barrangou, 2010). It is comprised of eight *cas* genes and a CRISPR region bearing twelve spacers. The *cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e* gene cassette encodes proteins that form Cascade complex, while *cas3* gene encodes a large multidomain protein.

In this work we for the first time provide biochemical characterization of the Cas3 protein that is a hallmark protein for type I systems. We show here that Cas3 combines both an ssDNA nuclease and ATPase/helicase catalytic activities. We have isolated and established molecular composition of the *S. thermophilus* Cascade complex, and demonstrated that it binds DNA targets, containing promiscuous PAM sequence. Furthermore, we provide first experimental evidences for the R-loop formation by a single Cascade molecule that revealed locking step of the stable R-loops. Last but not least, we show Cascade-triggered directional degradation of the DNA target by the Cas3 protein. Summarising our results, we propose detailed mechanism of DNA interference stage for the type I CRISPR-Cas systems, which sets the stage for molecular exploitation of the Cas machinery.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Aravind L, Koonin EV (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23: 469-472
2. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712
3. Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011) CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45: 273-297
4. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151: 2551-2561
5. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960-964
6. Brutzer H, Luzzietti N, Klaue D, Seidel R (2010) Energetics at the DNA supercoiling transition. *Biophys J* 98: 1267-1276
7. Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP (2008) Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev* 22: 3489-3496
8. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188-1190
9. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471: 602-607
10. Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190: 1390-1400
11. Dickman MJ, Hornby DP (2006) Enrichment and analysis of RNA centered on ion pair reverse phase methodology. *RNA* 12: 691-696
12. Forth S, Deufel C, Sheinin MY, Daniels B, Sethna JP, Wang MD (2008) Abrupt buckling transition observed during the plectoneme formation of individual DNA molecules. *Phys Rev Lett* 100: 148301

13. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2579-2586
14. Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182: 319-326
15. Goma AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL (2014) Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio* 5: e00928-00913
16. Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP (2009) RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* 139: 945-956
17. Hyun M, Bohr VA, Ahn B (2008) Biochemical characterization of the WRN-1 RecQ helicase of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry* 47: 7583-7593
18. Hochstrasser ML, Taylor DW, Bhat P, Guegler CK, Sternberg SH, Nogales E, Doudna JA (2014) CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6618-6623
19. Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170
20. Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R (2008) Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190: 1401-1412
21. Howan K, Smith AJ, Westblade LF, Joly N, Grange W, Zorman S, Darst SA, Savery NJ, Strick TR (2012) Initiation of transcription-coupled repair characterized at single-molecule resolution. *Nature* 490: 431-434
22. Hsu PD, Lander ES, Zhang F (2014) Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157: 1262-1278
23. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821
24. 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 AP, Dickman MJ, Doudna JA, Boekema EJ, Heck AJ, van der Oost J, Brouns SJ (2011) Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol* 18: 529-536
25. Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2013) crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol* 10: 841-851

26. Kauert DJ, Kurth T, Liedl T, Seidel R (2011) Direct mechanical measurements reveal the material properties of three-dimensional DNA origami. *Nano Lett* 11: 5558-5563
27. Kiro R, Shitrit D, Qimron U (2014) Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol* 11: 42-44
28. Klaue D, Seidel R (2009) Torsional stiffness of single superparamagnetic microspheres in an external magnetic field. *Phys Rev Lett* 102: 028302
29. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8: 317-327
30. Luo ML, Mullis AS, Leenay RT, Beisel CL (2014) Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Res*
31. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9: 467-477
32. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155: 733-740
33. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60: 174-182
34. Mosconi F, Allemand JF, Bensimon D, Croquette V (2009) Measurement of the torque on a single stretched and twisted DNA using magnetic tweezers. *Phys Rev Lett* 102: 078301
35. Mulepati S, Bailey S (2011) Structural and biochemical analysis of nuclease domain of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 3 (Cas3). *J Biol Chem* 286: 31896-31903
36. Mulepati S, Bailey S (2013) *In vitro* reconstitution of an *Escherichia coli* RNA-guided immune system reveals unidirectional, ATP-dependent degradation of DNA target. *J Biol Chem* 288: 22184-22192
37. Mulepati S, Heroux A, Bailey S (2014) Crystal structure of a CRISPR RNA-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. *Science* 345: 1479-1484
38. Oberstrass FC, Fernandes LE, Bryant Z (2012) Torque measurements reveal sequence-specific cooperative transitions in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6106-6111

39. Plagens A, Tripp V, Daume M, Sharma K, Klingl A, Hrle A, Conti E, Urlaub H, Randau L (2014) *In vitro* assembly and activity of an archaeal CRISPR-Cas type I-A Cascade interference complex. *Nucleic Acids Res* 42: 5125-5138
40. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151: 653-663
41. Revyakin A, Ebright RH, Strick TR (2005) Single-molecule DNA nanomanipulation: improved resolution through use of shorter DNA fragments. *Nat Methods* 2: 127-138
42. Rouillon C, Zhou M, Zhang J, Politis A, Beilsten-Edmands V, Cannone G, Graham S, Robinson CV, Spagnolo L, White MF (2013) Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with Cascade. *Mol Cell* 52: 124-134
43. Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Samson JE, Magadan AH, Sabri M, Moineau S (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* 11: 675-687
45. Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2011) The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 39: 9275-9282
46. Sashital DG, Wiedenheft B, Doudna JA (2012) Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Mol Cell* 46: 606-615
47. Seidel R, Bloom JG, van Noort J, Dutta CF, Dekker NH, Firman K, Szczelkun MD, Dekker C (2005) Dynamics of initiation, termination and reinitiation of DNA translocation by the motor protein EcoR124I. *EMBO J* 24: 4188-4197
48. Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, Wanner B, van der Oost J, Brouns SJ, Severinov K (2011) Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10098-10103
49. Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* 76: 23-50
50. Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B (2013) CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Biochem* 82: 237-266
51. Staals RH, Agari Y, Maki-Yonekura S, Zhu Y, Taylor DW, van Duijn E, Barendregt A, Vlot M, Koehorst JJ, Sakamoto K, Masuda A, Dohmae N, Schaap PJ, Doudna JA, Heck AJ, Yonekura K, van der Oost J, Shinkai A (2013) Structure and activity

- of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Mol Cell* 52: 135-145
52. Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas Č, Nwokeoji Alison O, Dickman Mark J, Horvath P, Siksnys V (2014) Programmable RNA Shredding by the Type III-A CRISPR-Cas System of *Streptococcus thermophilus*. *Mol Cell* 56: 506-517
 53. Tamulaitis G, Mücke M, Siksnys V (2006) Biochemical and mutational analysis of EcoRII functional domains reveals evolutionary links between restriction enzymes. *FEBS Lett* 580: 1665-1671
 54. Tamulaitis G, Zaremba M, Szczepanowski RH, Bochtler M, Siksnys V (2007) Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence. *Nucleic Acids Res* 35: 4792-4799
 55. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B (2014) Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 12: 479-492
 56. Waghmare SP, Pousinis P, Hornby DP, Dickman MJ (2009) Studying the mechanism of RNA separations using RNA chromatography and its application in the analysis of ribosomal RNA and RNA:RNA interactions. *J Chromatogr A* 1216: 1377-1382
 57. Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J (2012a) The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet* 46: 311-339
 58. Westra ER, van Erp PB, Kunne T, Wong SP, Staals RH, Seegers CL, Bollen S, Jore MM, Semenova E, Severinov K, de Vos WM, Dame RT, de Vries R, Brouns SJ, van der Oost J (2012b) CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Mol Cell* 46: 595-605
 59. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331-338
 60. Wiedenheft B, van Duijn E, Bultema JB, Waghmare SP, Zhou K, Barendregt A, Westphal W, Heck AJ, Boekema EJ, Dickman MJ, Doudna JA (2011) RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10092-10097