

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

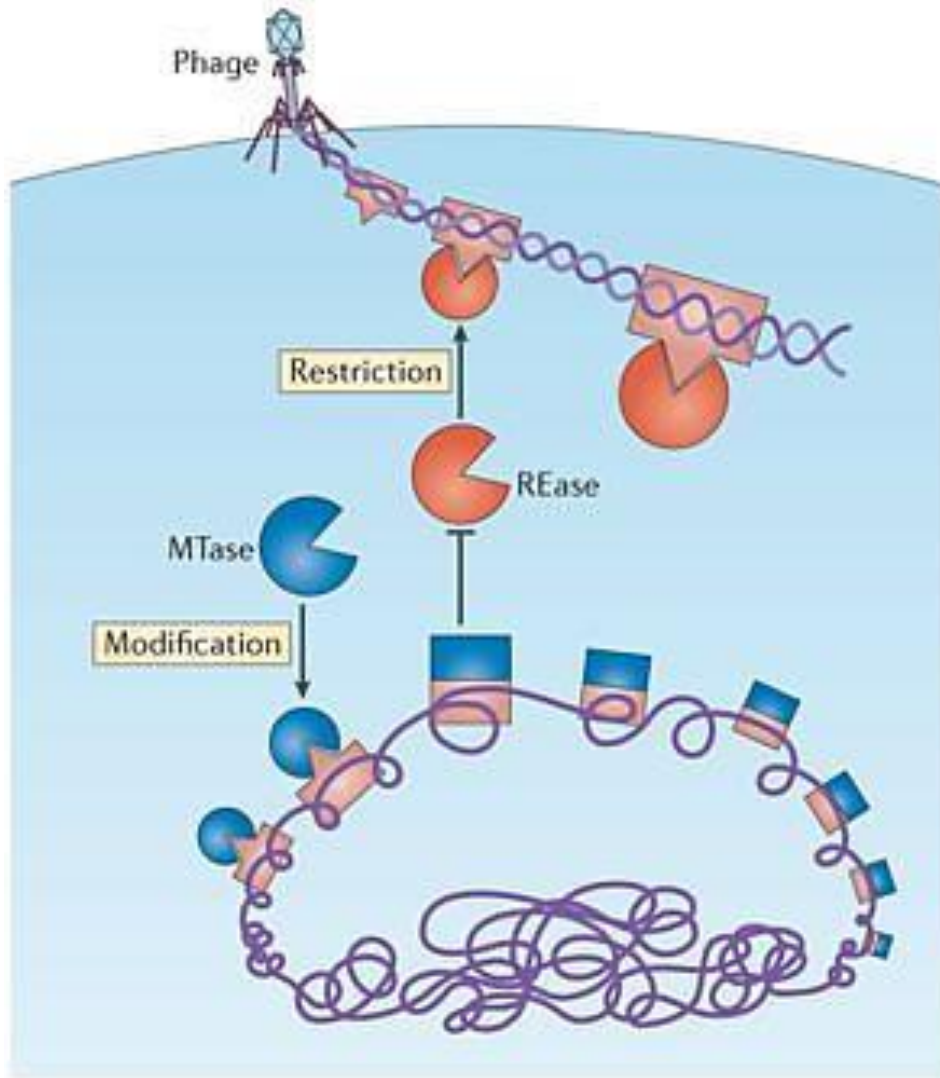
podzim 2018

CRISPR-Cas systémy prokaryot

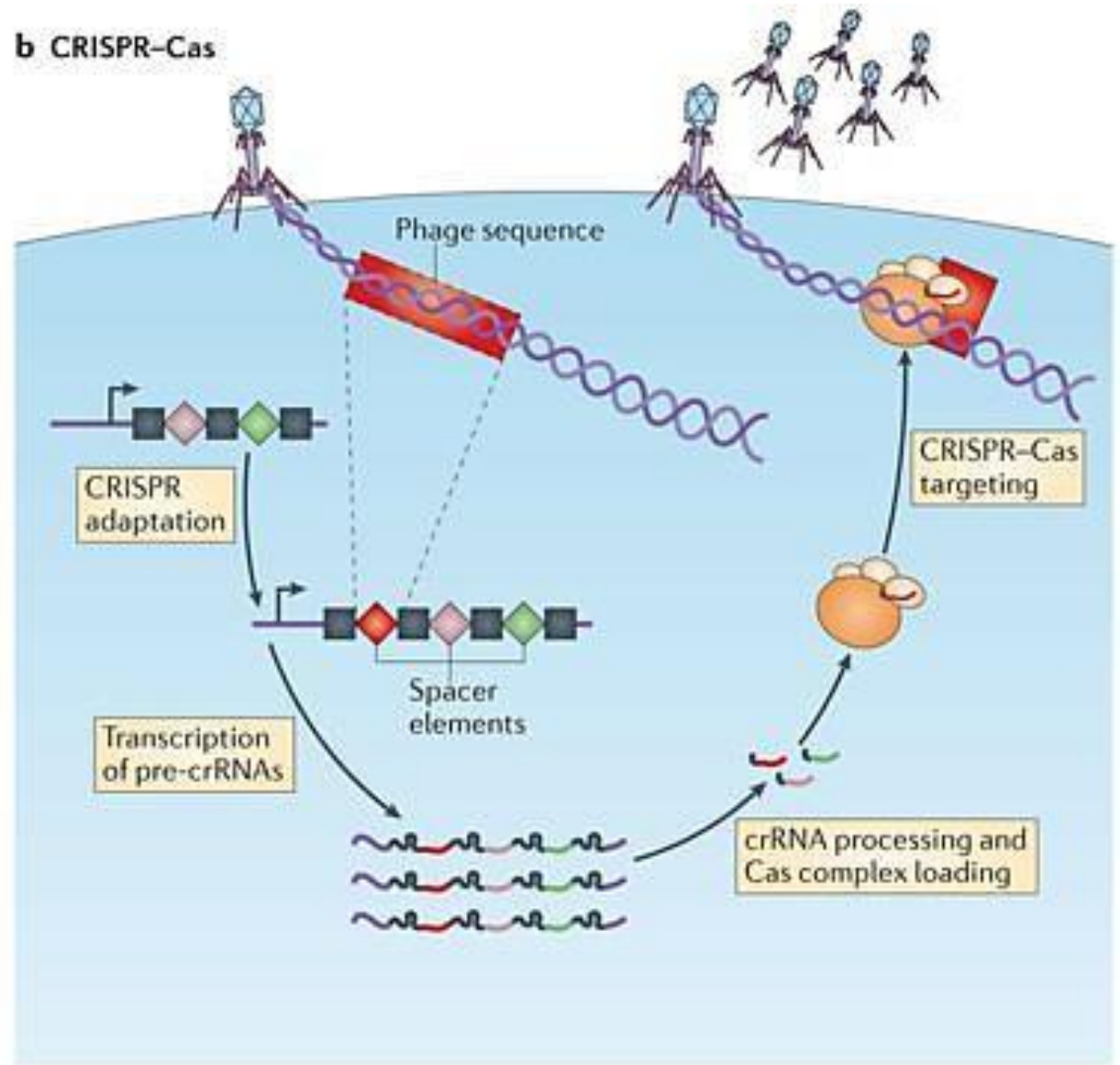
Ivana Mašlaňová

iva.maslanova@gmail.com

a Restriction-modification



b CRISPR-Cas



CRISPR-Cas – systémy adaptivní odpovědi

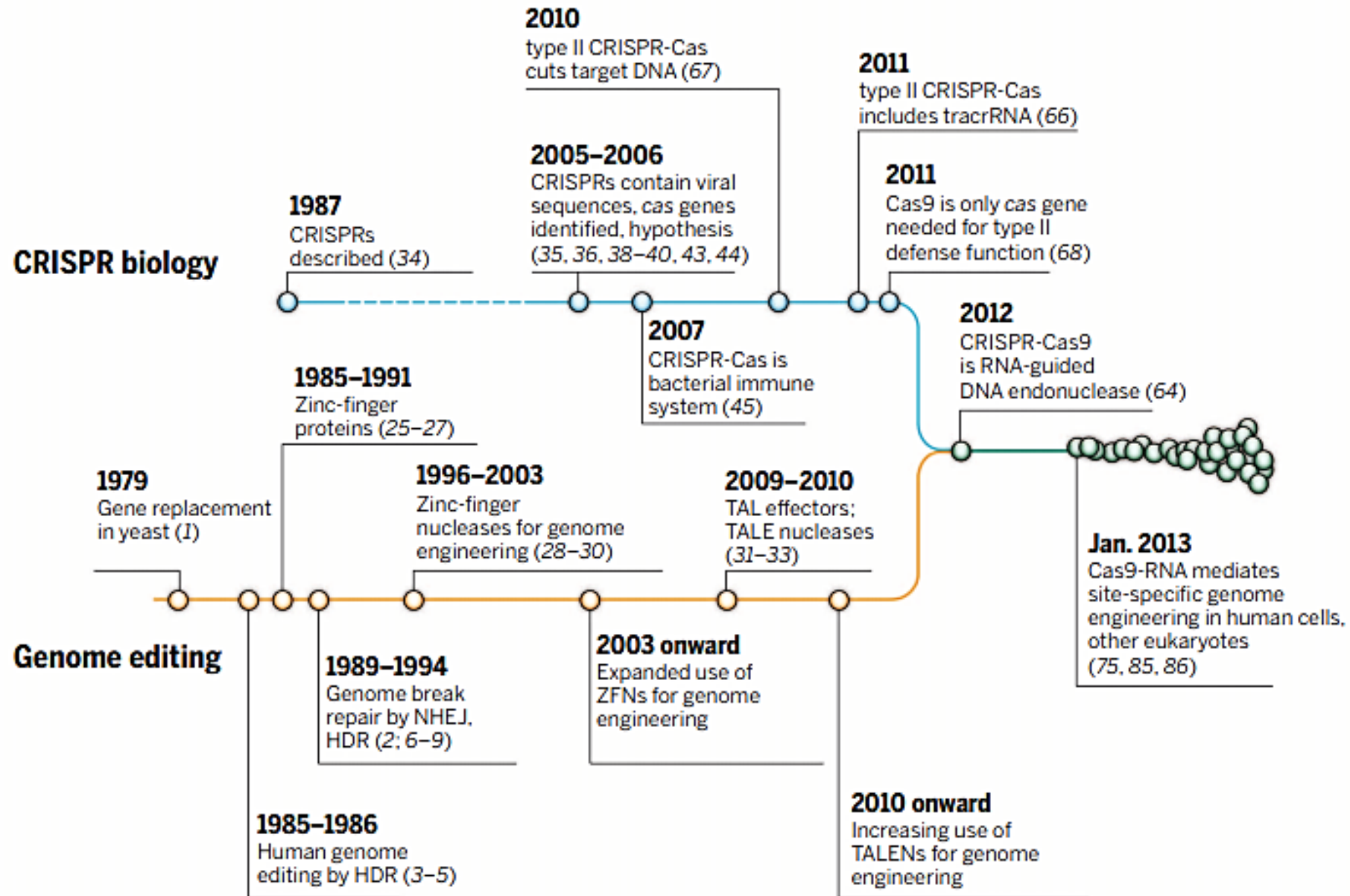
CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- Objev krátkých uspořádaných repeticí přerušovaných nerepetitivními krátkými sekvencemi (mezerníky) v r. 1987 u *E. coli* – Yoshizumi Ishino a kol. v Osace
- Genetická struktura těchto lokusů včetně genů Cas popsána v r. 2002 – Jansen a kol.
- V r. 2005 popsána podobnost mezi sekvencemi mezerníků v CRISPR-ech a sekvencemi mobilních genetických elementů (fágy a plazmidy)
- Představa o funkci CRISPR-ů prokázána experimentálně v r. 2007, kdy buňky *Streptococcus thermophilus* získaly rezistenci vůči bakteriofágům po začlenění části fágového genomu do genomu těchto bakterií
- Dnes popsány u 90% genomů archeí a 40% eubakteriálních genomů

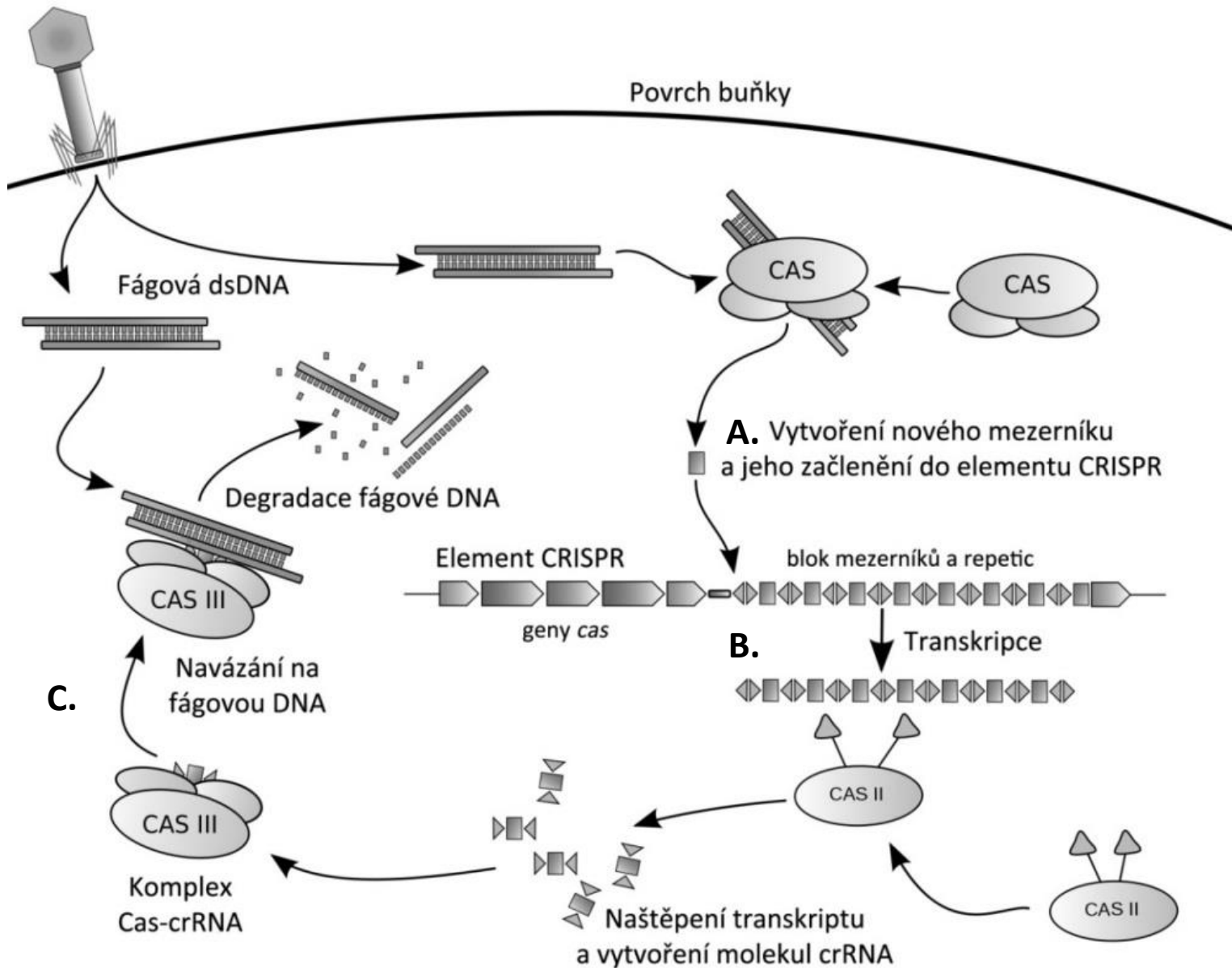
VYUŽITÍ PŘI EDITACÍCH GENOMŮ

	Celkový počet genomů	Obsahující CRISPR	Procentuální zastoupení
Archaea	232	202	87%
Bakterie	6782	3059	45%
Celkově	7014	3261	47%

CRISPR a editace genomů – časová osa nejvýznamnějších objevů



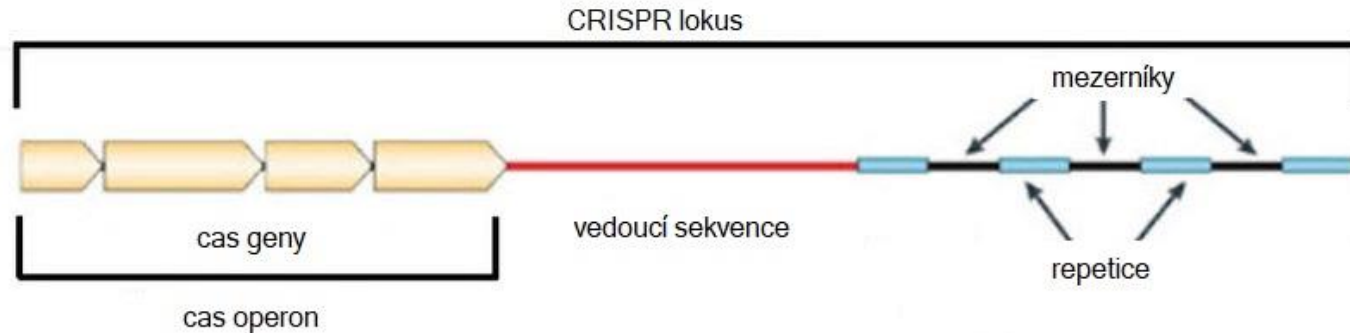
CRISPR-Cas systém



- A. Adaptace
- B. Exprese
- C. Interference

Struktura CRISPR-Cas systému

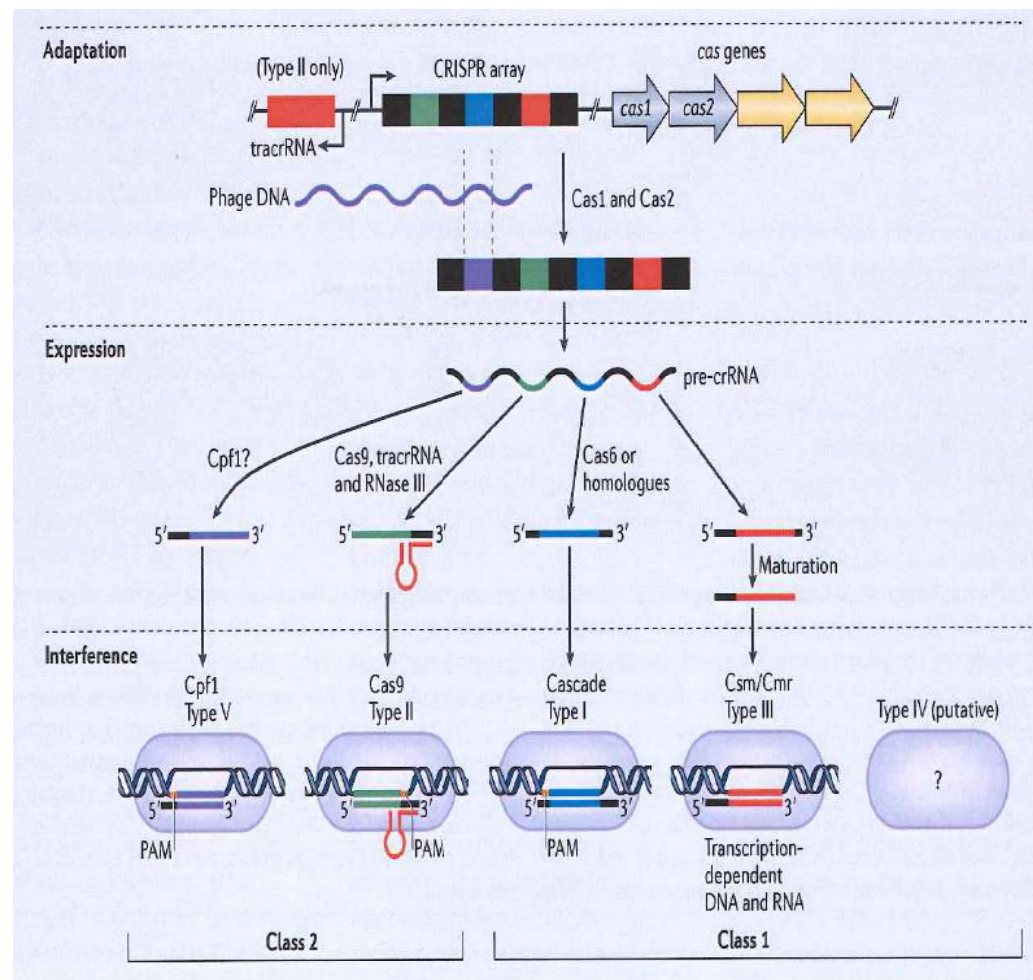
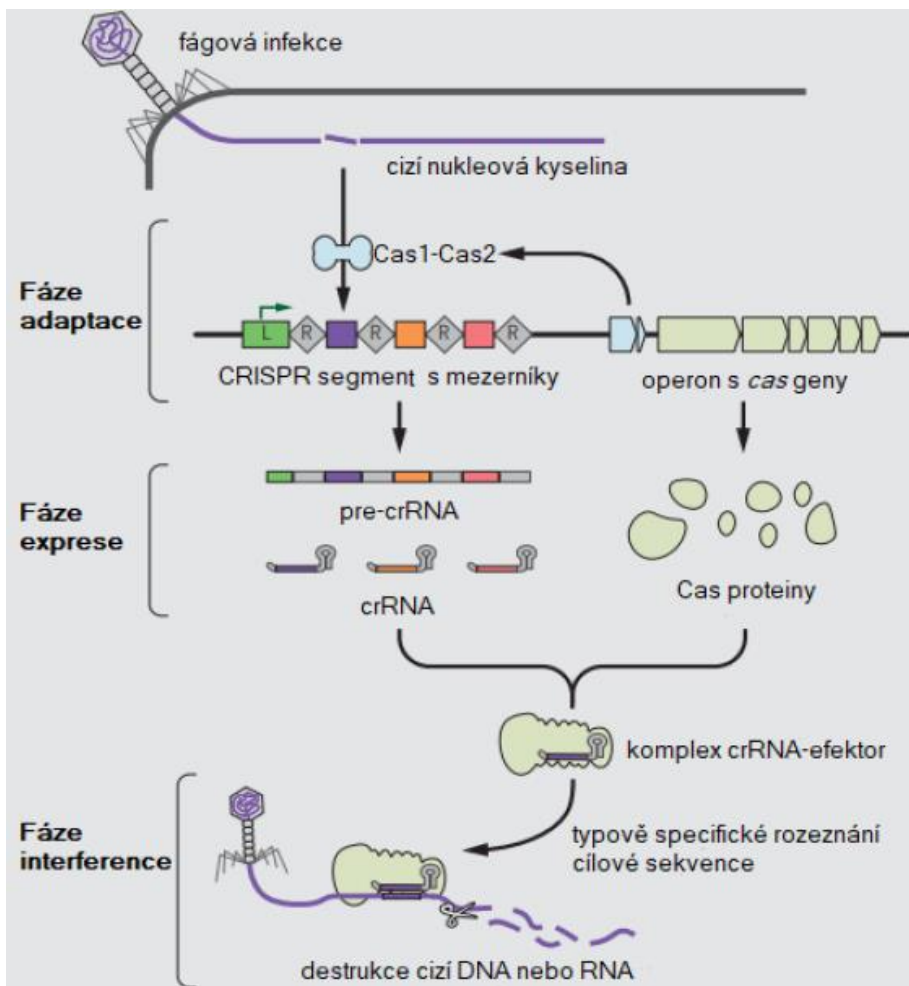
Struktura CRISPR lokusu



Části CRISPR-Cas systému:

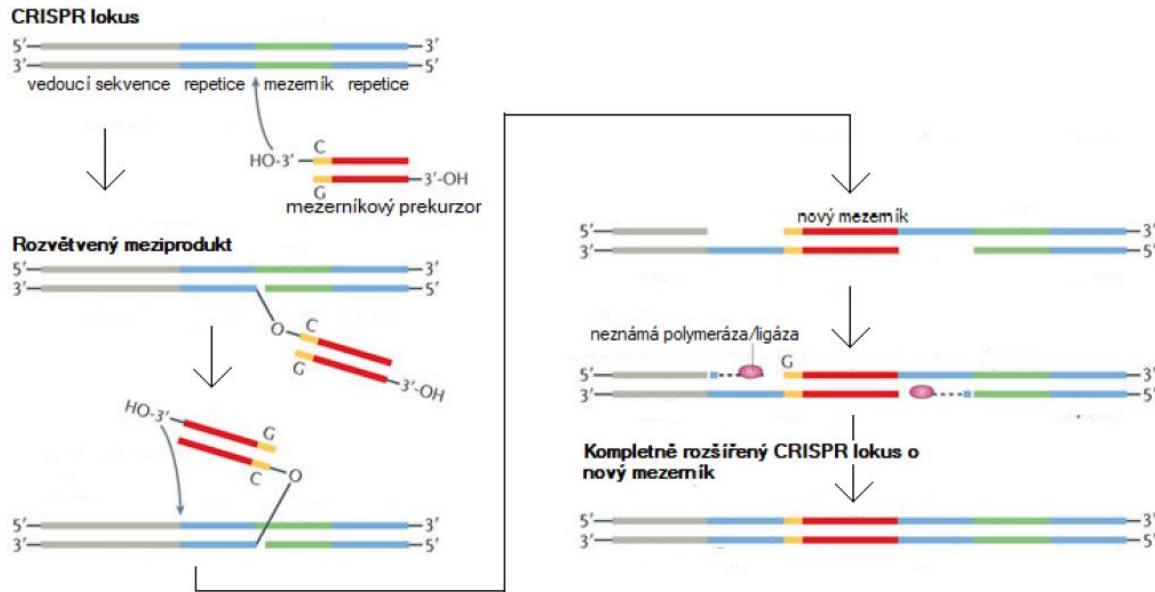
- CRISPR lokus** – velmi variabilní, tvořen mezerníky (spacer) a repetitivními oblastmi, ohraničen přímými repeticemi
 - repetice mají průměrnou délku 28 – 37 bp, počet variabilní, tvoří vlásenkovou strukturu
 - mezerníky (spacery) – odpovídají sekvencím MGE (fágy, plazmidy), délka 26 – 72 bp (až stovky bp, variabilní)
 - v CRISPR lokusu cca 50 mezerníků (neplatí ale vždy, např. 588 repetice v případě genomu *Haliangium ochraceum*)
 - počet CRISPR lokusů v genomech – variabilní (nejčastěji dva-tři CRISPR lokusy, ale např. rod *Methanocaldococcus* až 19 CRISPR lokusů v genomu).
- Cas endonukleázy** – geny *cas* asociované s CRISPR lokusem, lokalizace v těsné blízkosti, různé funkce v procesu adaptivní imunity, celkem cca 45 proteinových rodin – hlavní ukazatel pro klasifikaci CRISPR-Cas systémů

Fungování systému CRISPR-Cas a jeho struktura



Mechanismus CRISPR-Cas systému se skládá ze tří fází. V první fázi – adaptaci, dochází k získání mezníkové sekvence a začlenění do CRISPR lokusu (fialový čtverec) mezi repetice (R). V další fázi dochází k expresi *cas* genů a transkripci CRISPR lokusu, vzniká pre-crRNA. Ta je následně zpracována na crRNA. V poslední fázi dochází k navedení efektorového komplexu/proteinu pomocí crRNA na cílové místo v genomu. Následuje sestřih a degradace cizí nukleové kyseliny. 7

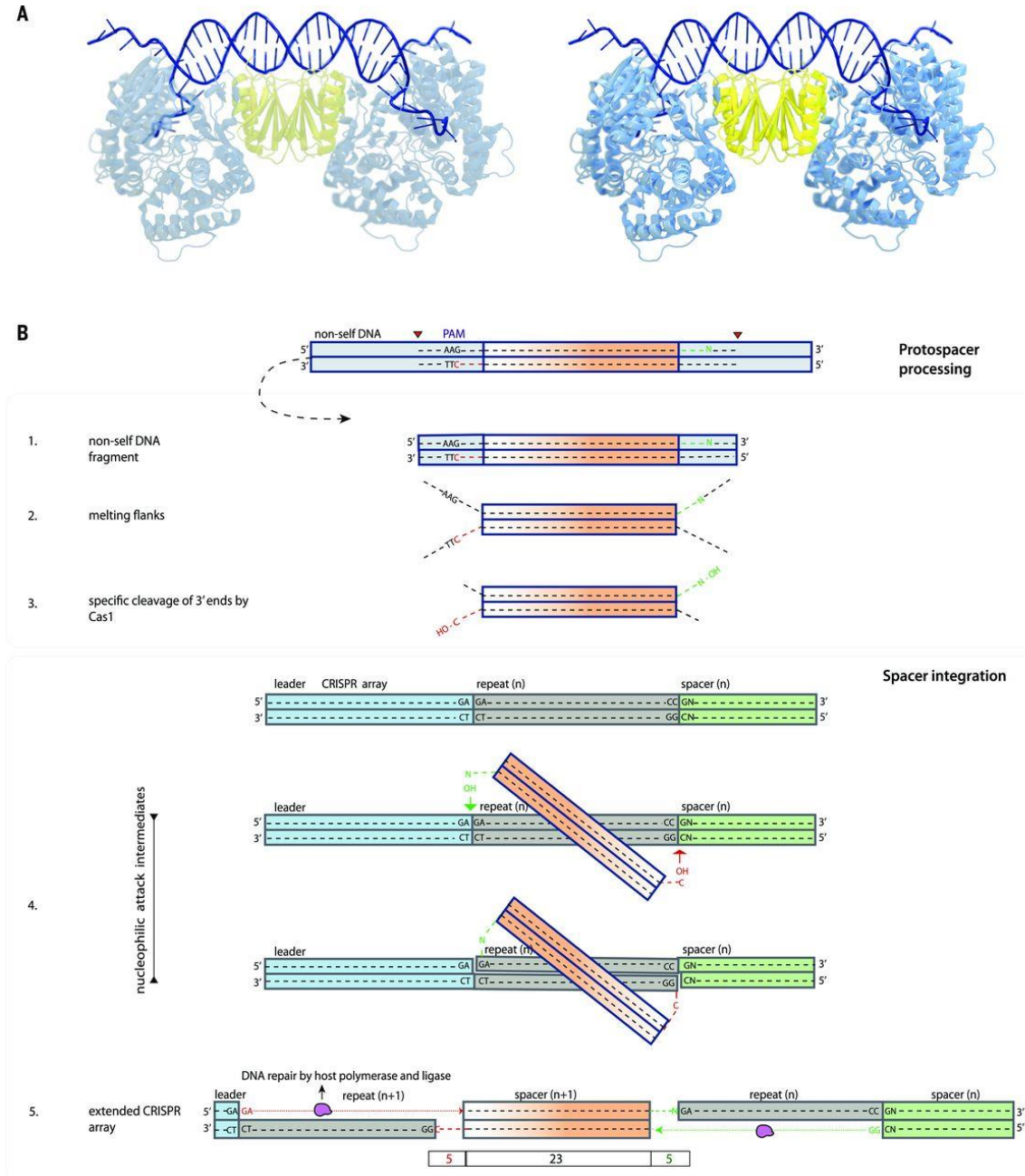
Fáze adaptace – začlenění mezerníku



- Komplex **Cas1 a Cas2** vkládá mezerníky mezi vedoucí sekvenci (dlouhý úsek bohatý na A-T, lokalizovaný po směru transkripce vedle repetice s mezerníky) a první repetici
- Vedoucí oblast obsahuje – promotor pro transkripci **crRNA** a **rozpoznávací sekvenci**
- Vkládání mezerníků vždy na 3' konec vedoucí sekvence - naposledy získaný mezerník vždy nejbliže k vedoucí sekvenci
- **Prekurzory mezerníků** – obsahují 2 – 5 nukleotidové motivy přiléhající k vlastní sekvenci mezerníku – **tzv. PAM sekvence** – nutná během fáze interference - navázání efektorového systému na mezerníkový prekurzor
- **RecBCD** (exonukleázová aktivita, RM systém, rozpoznávání Chi míst - 8 bp) degraduje lineární dsDNA a tvoří ssDNA fragmenty – substrát pro získání nových mezerníků
- Kompletní spojení řetězců – DNA polymeráza a ligáza

- **Vystřížení sekvence prekurzoru mezerníku z cizí molekuly DNA - integrace do CRISPR lokusu jako mezerník - zajištěna imunitní odpověď při opakované infekci**
- **Účastníci se komponenty:** proteiny Cas1 a Cas2, vedoucí sekvence a první CRISPR repetice
- **Cas1 a Cas2** – 1 operon – strukturní komplex tvořen Cas2 dimerem, vázajícím dva Cas1 dimery – komplex s endonukleázovou aktivitou

Cas1 a Cas2 komplex – začlenění mezerníku



Fáze exprese

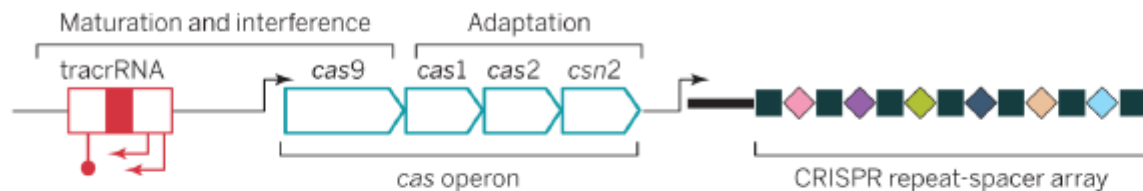
Fáze exprese zahrnuje: jak regulaci *cas* genů, tvorbu efektorového Cas komplexu, transkripci CRISPR lokusu a vznik crRNA

- přepisem CRISPR lokusu vzniká dlouhá prekurzorová CRISPR RNA (pre-crRNA), u které dochází ke štěpení v oblasti repetitivních sekvencí
- **molekula crRNA** - jedna mezerníková sekvence obklopená částmi repetice
- Zpracování pre-crRNA se liší mezi třídami CRISPR-Cas systémů

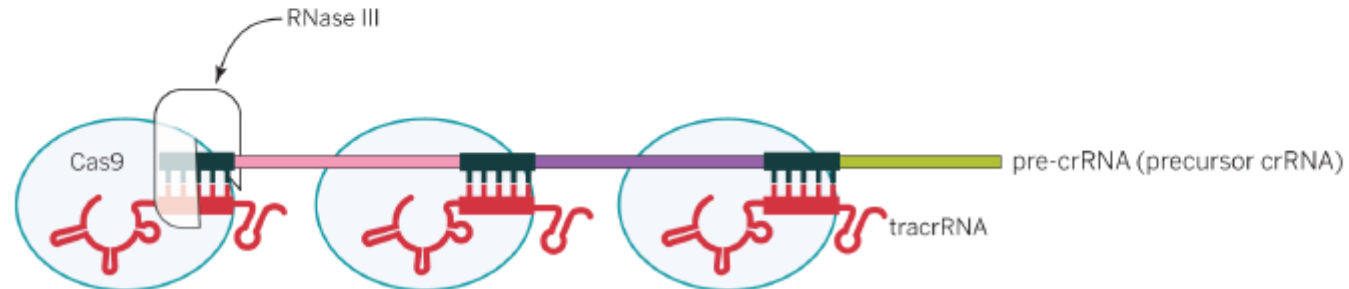
Třída I. – endonukleázová aktivita Cas6 (typ II a III)

Třída II. - proces zahrnuje také expresi **malé trans-aktivující CRISPR RNA** (tracrRNA). Ta se páruje s repeticemi pre-crRNA transkriptu a duplex je štěpen v repetitivních oblastech hostitelskou **RNázou III**

A Genomic CRISPR locus



B tracrRNA:crRNA co-maturation and Cas9 co-complex formation



Type II-A CRISPR-Cas systém

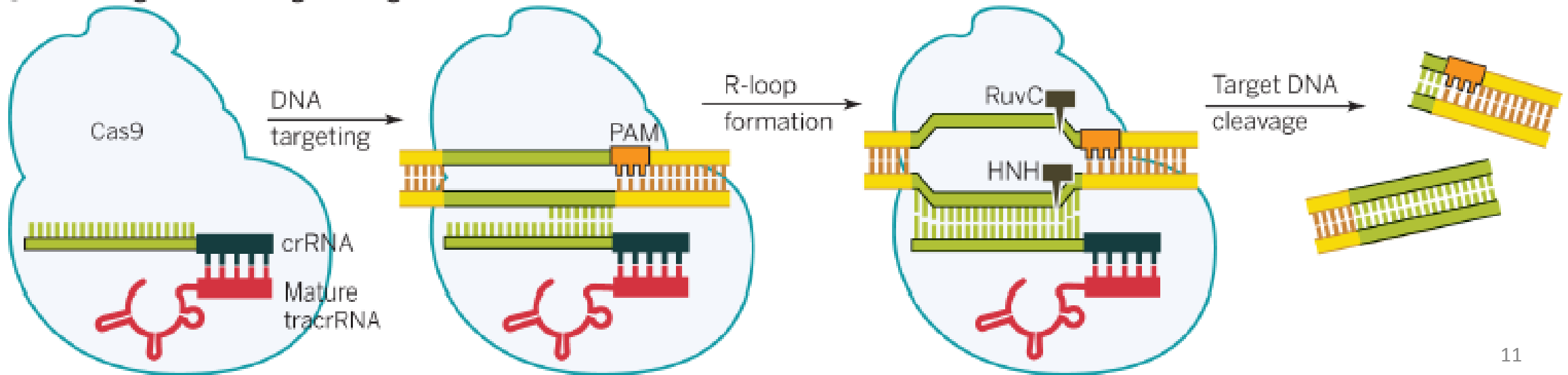
Fáze interference – degradace cílové nukleové kyseliny za využití crRNA jako naváděcí molekuly a Cas proteinů

Interference:

- Interakce molekuly crRNA s komplementárními úseky nukleových kyselin na invazivních MGE
- Efektorové nukleázy Cas cizorodý genetický materiál degradují
- **CRISPR-Cas I. třídy** - multiproteinový **komplex Cascade** (tvořený Cas proteiny) navázán na dsDNA a štěpení zprostředkovává efektorová **nukleáza Cas3**, která není součástí komplexu
- **CRISPR-Cas II. třídy** - duplex dvou RNA (crRNA a tracrRNA) doplněn jedinou efektorovou **nukleázou Cas9**, která identifikuje i degraduje cizorodý genetický element.

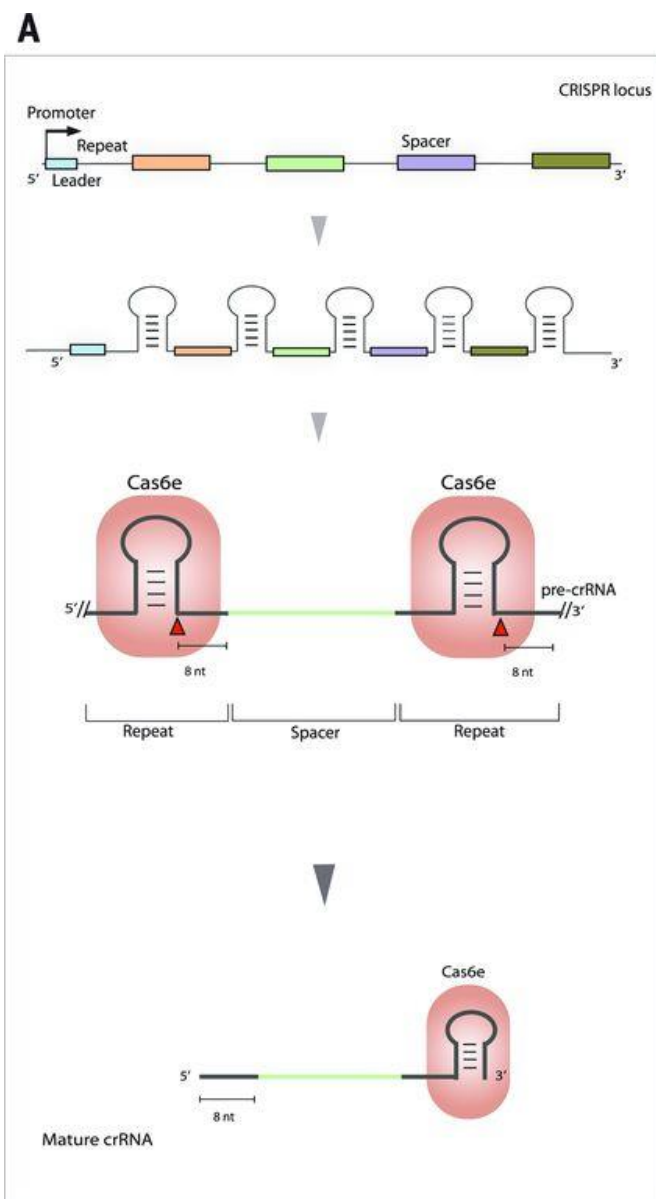
Type II-A CRISPR-Cas systém

C RNA-guided cleavage of target DNA

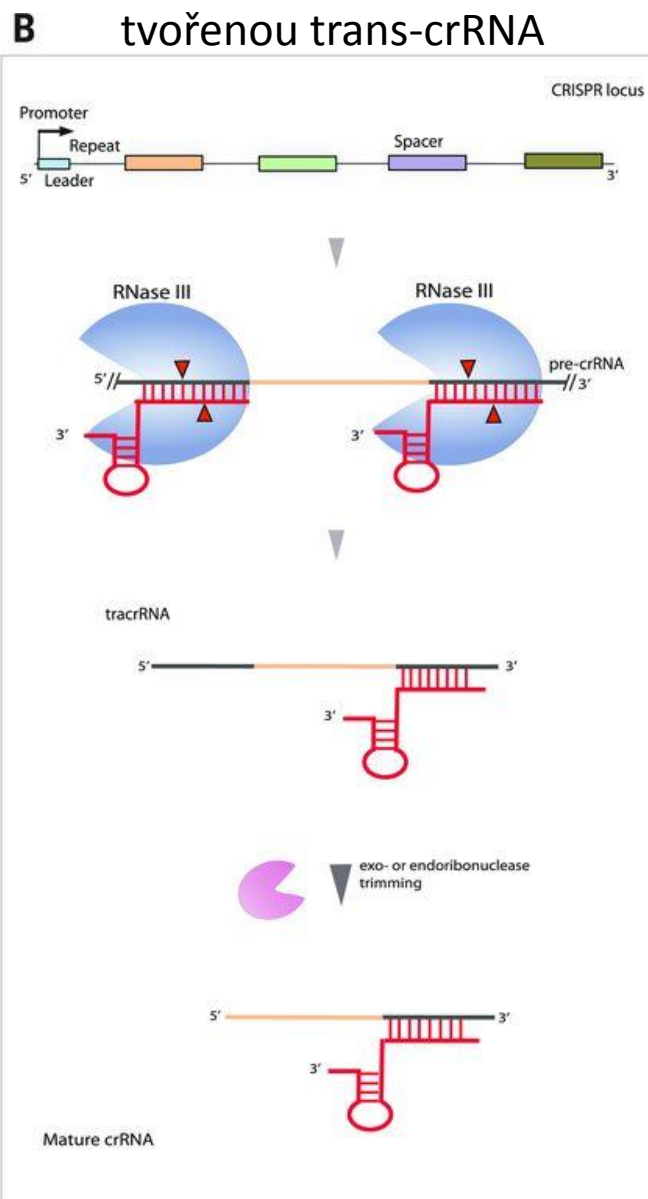


Fáze exprese a interference

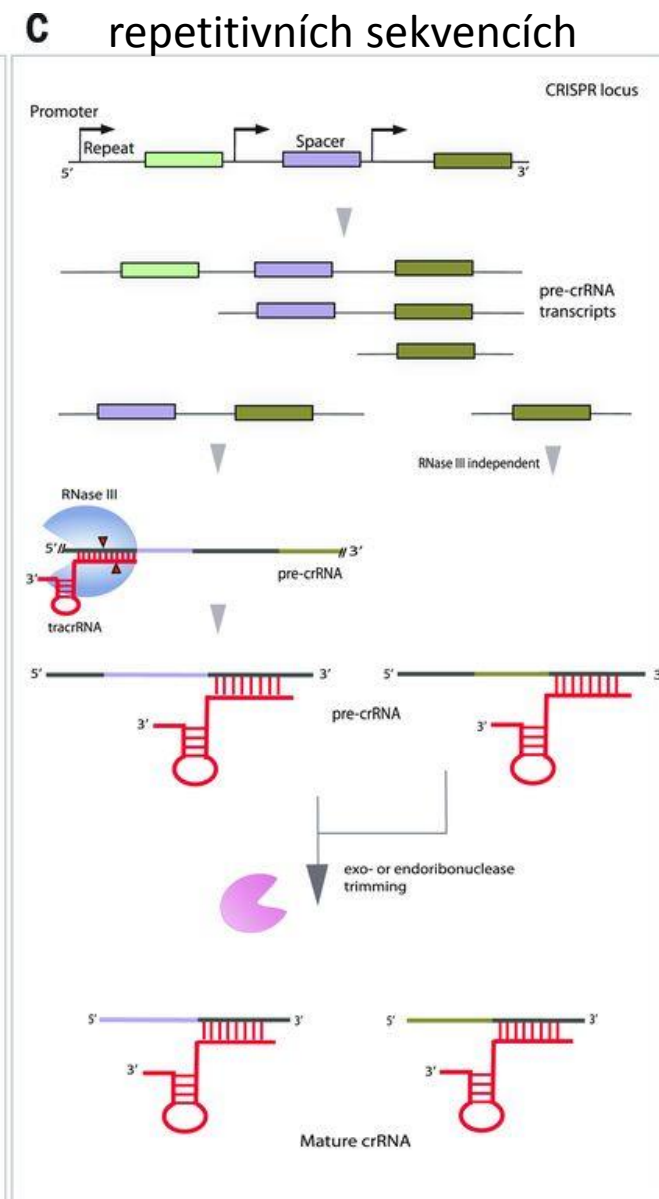
crRNA – typ I a typ III



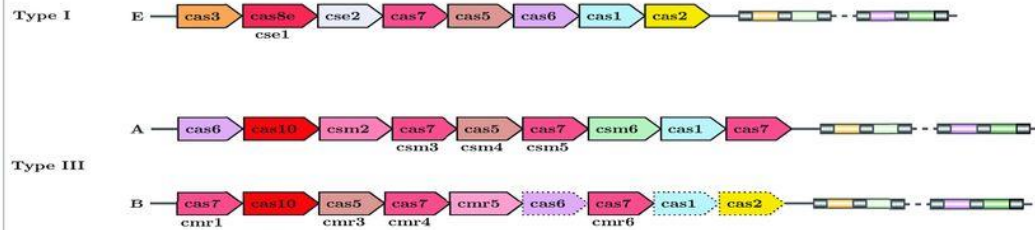
crRNA – typ IIA –
RNase III štěpí dsRNA,
tvořenou trans-crRNA



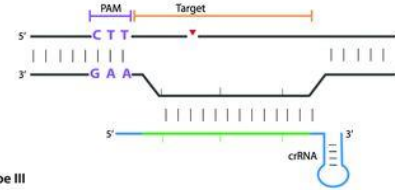
crRNA – typ IIB – TSS –
transcription start site v
repetitivních sekvencích



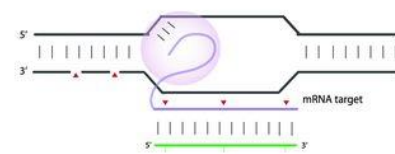
Class 1



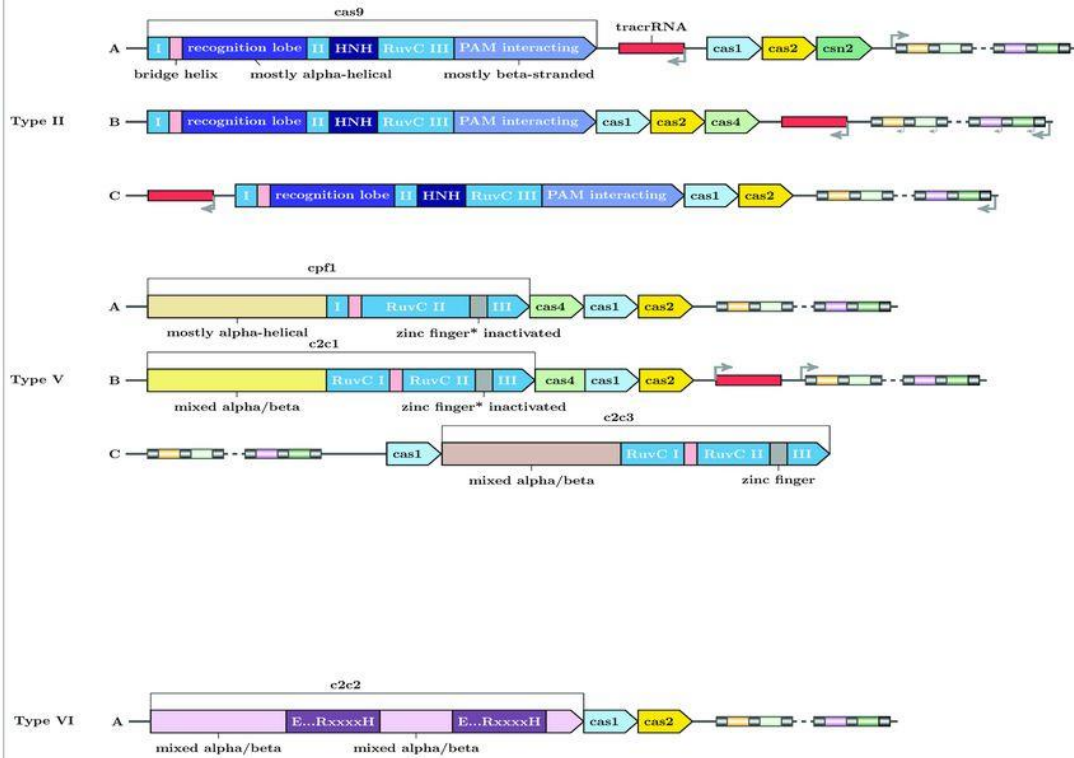
Type I-E



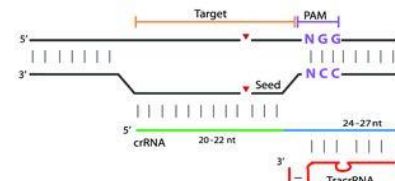
Type III



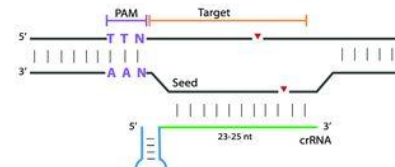
Class 2



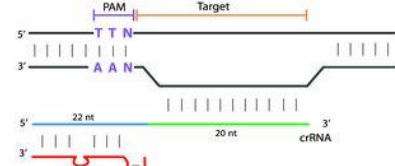
Type II-A



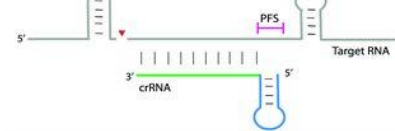
Type V-A



Type V-B



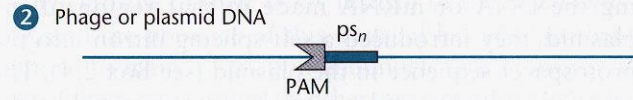
Type VI



Interference CRISPR-Cas systémů

- Rozdíly v závislosti na typu CRISPR-Cas
- dsDNA (černě), cílová RNA (šedě), crRNA repetice (modře), spacer (zeleně), tracrRNA (červeně)

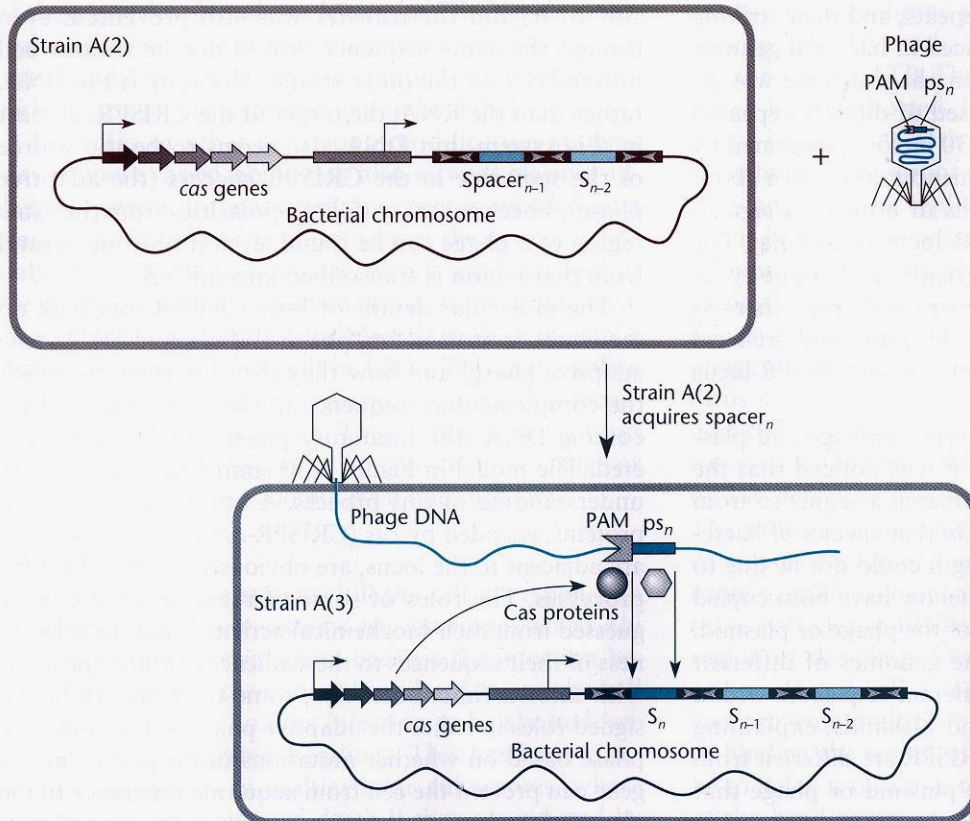
Fungování systému CRISPR-Cas - shrnutí



PAM: protospacer-adjacent motif (example) (CT/AT)

ps_n : proto spacer (CTTTCGCAGACGCGCGGCGATACGCTCACGCA)_n

B Construction of CRISPR array: adaptive phase

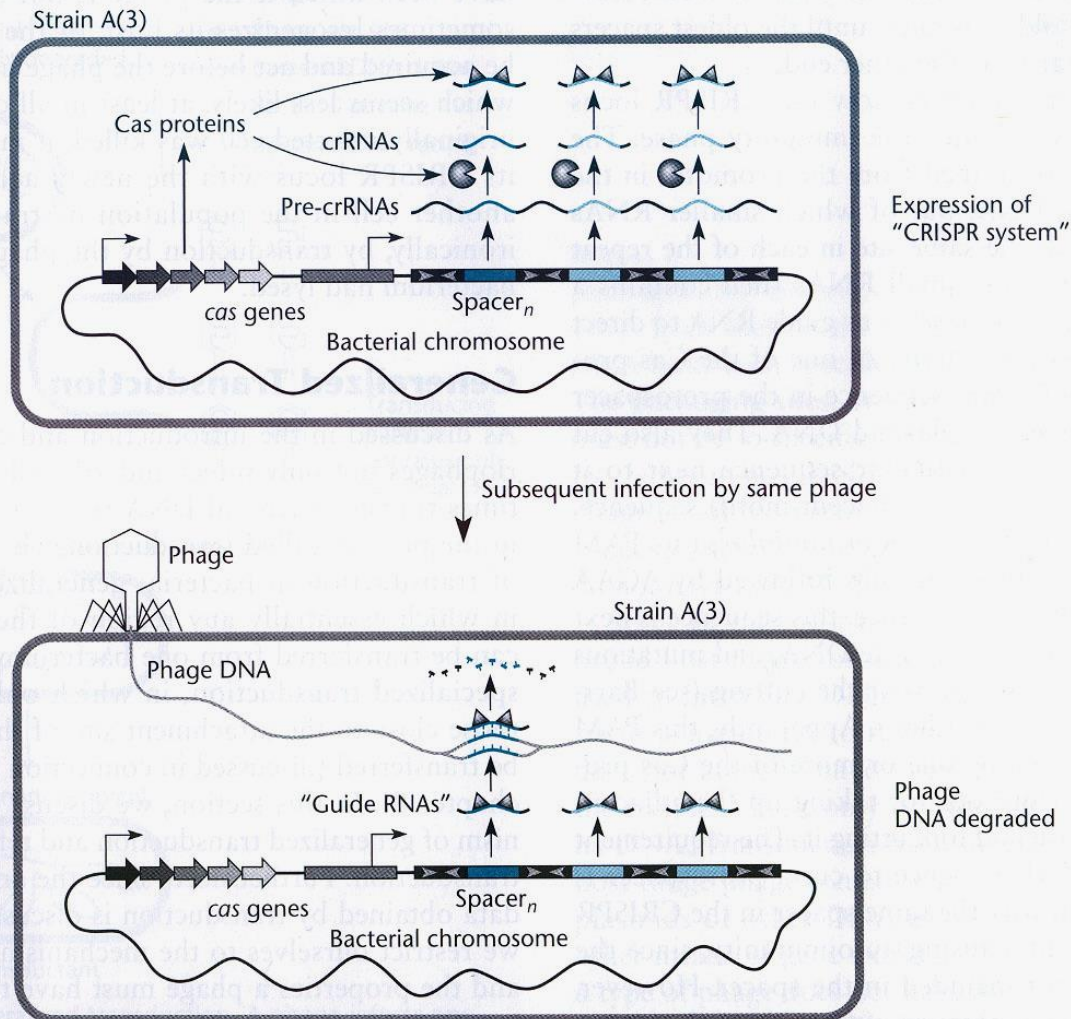


2. Prekurzor mezerníku (protospacer) (ps_n) z fága nebo plazmidu vyznačující se stejnou sekvencí jakou má některý z mezerníků (spacerů) (s_n) v CRISPR. V sousedství prekurzoru mezerníku (protospaceru) se nachází sekvence PAM (protospacer-adjacent motif), která identifikuje protospacer jako sekvenci, která má být CRISPRem přijata.

B. Fáze adaptace – vyčlenění sekvence prekurzoru mezerníku (protospaceru) – začlenění nového mezerníku do CRISPR lokusu

Jeden nebo více Cas proteinů rozpozná sekvenci PAM na vstupující fágové DNA a začlení přilehlou sekvenci ps_n jako nový mezerník s_n do CRISPRové oblasti, na její konec nejbližší vedoucí sekvence. Všechny ostatní CRISPRy se posunou doprava, přičemž ten poslední vpravo je odstraněn.

C Roles of CRISPR functions in defense: immunity phase



Imunitní fáze:

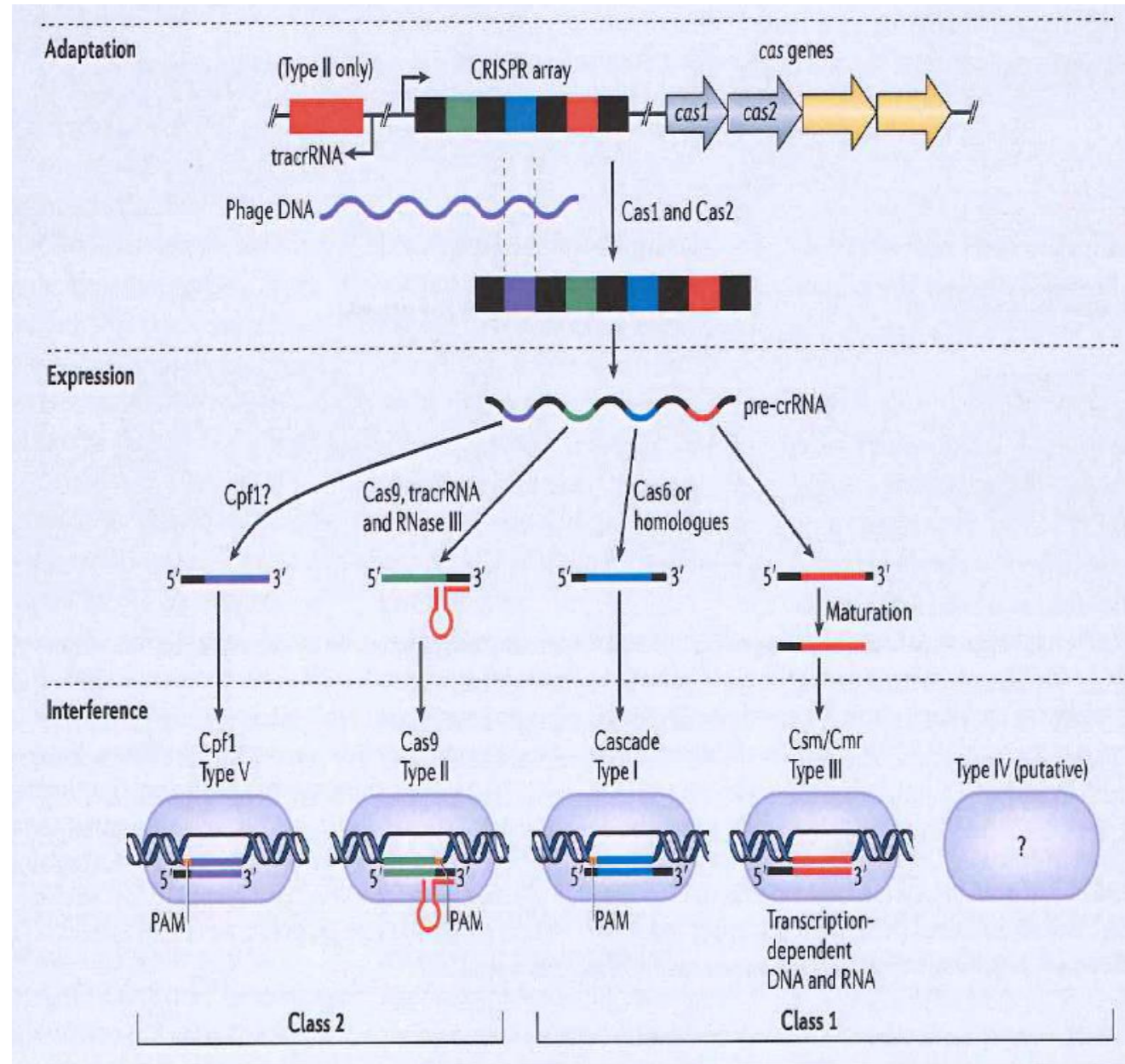
Zacílení vstupující protospacerové sekvence prekurzoru mezerníku na fágové DNA.

Sestava mezerníků včetně repetitivních oblastí (CRISPR lokus) je přepsána do jedné dlouhé molekuly RNA (pre-crRNA), která je štěpena v repetitivních sekvencích za vzniku molekul crRNA, z nichž každá obsahuje sekvenci jednoho mezerníku.

Když buňku infikuje stejný typ fága, dojde k párování crRNA obsahující sekvenci s_n s identickou sekvencí prekurzoru mezerníku (protospaceru) ps_n ve vstupující fágové DNA a jeden nebo více Cas proteinů v ní štěpí protospacery, čímž fága inaktivují.

Šíření CRISPR – transformace, **transdukce**

Fungování systému CRISPR-Cas - shrnutí

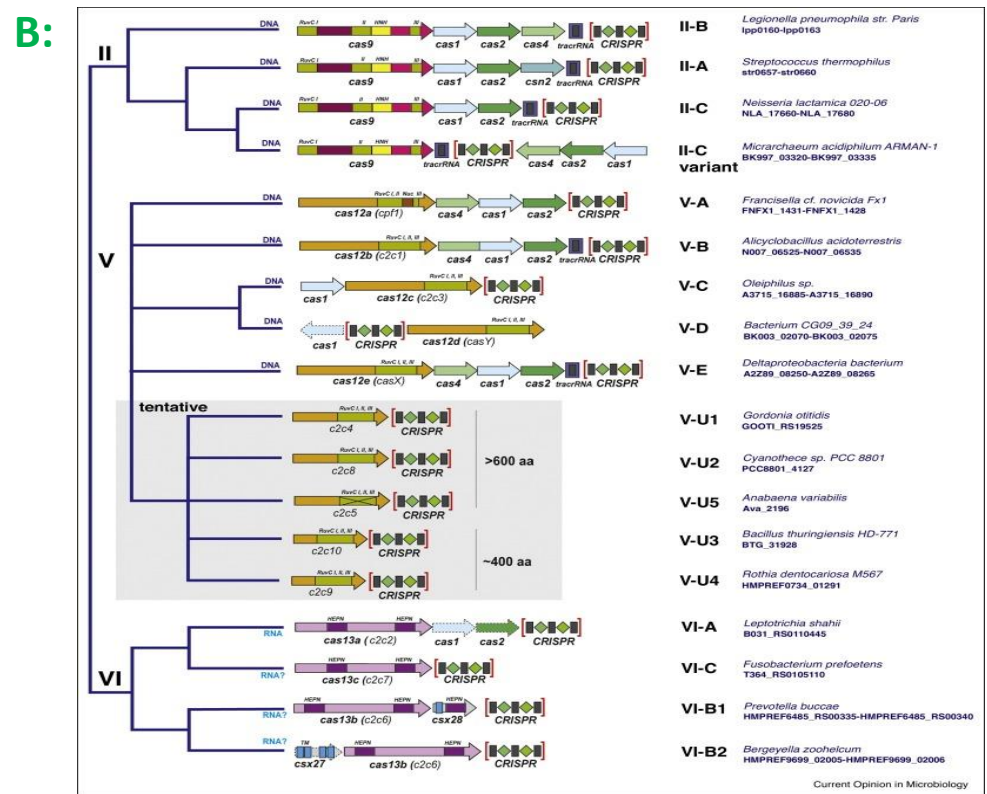
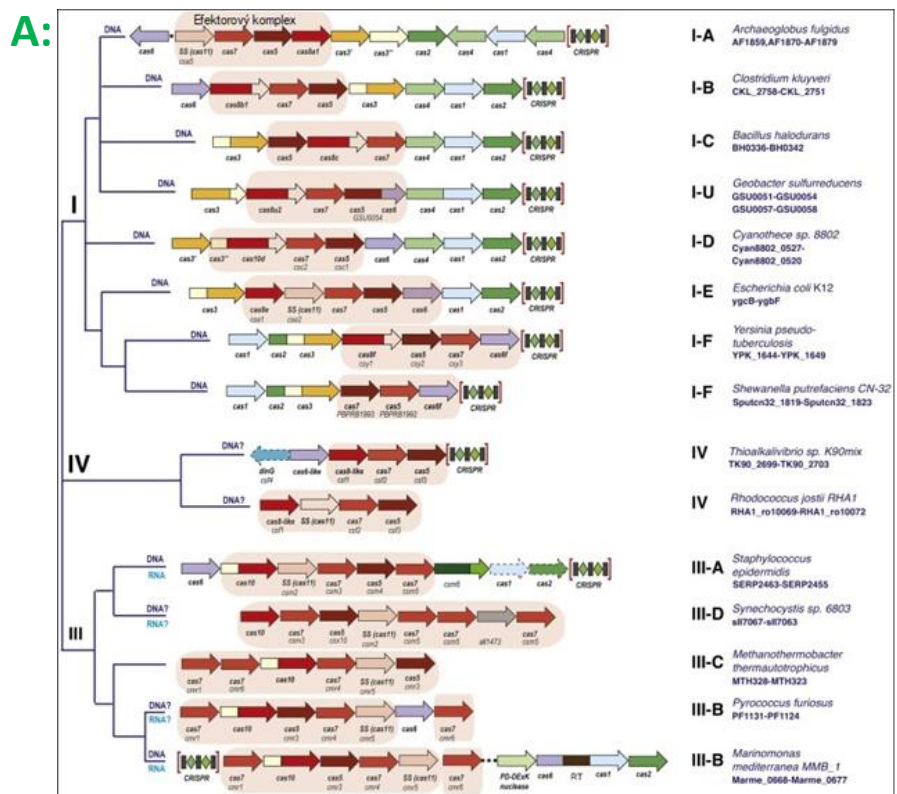
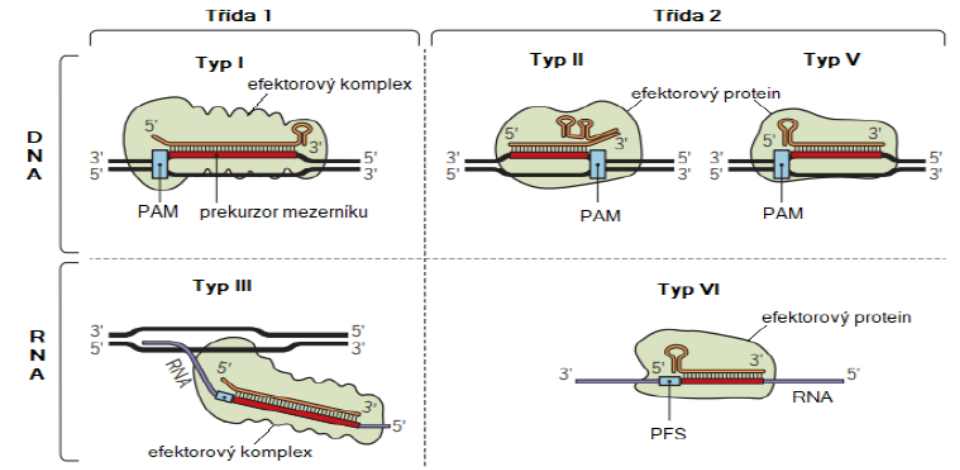


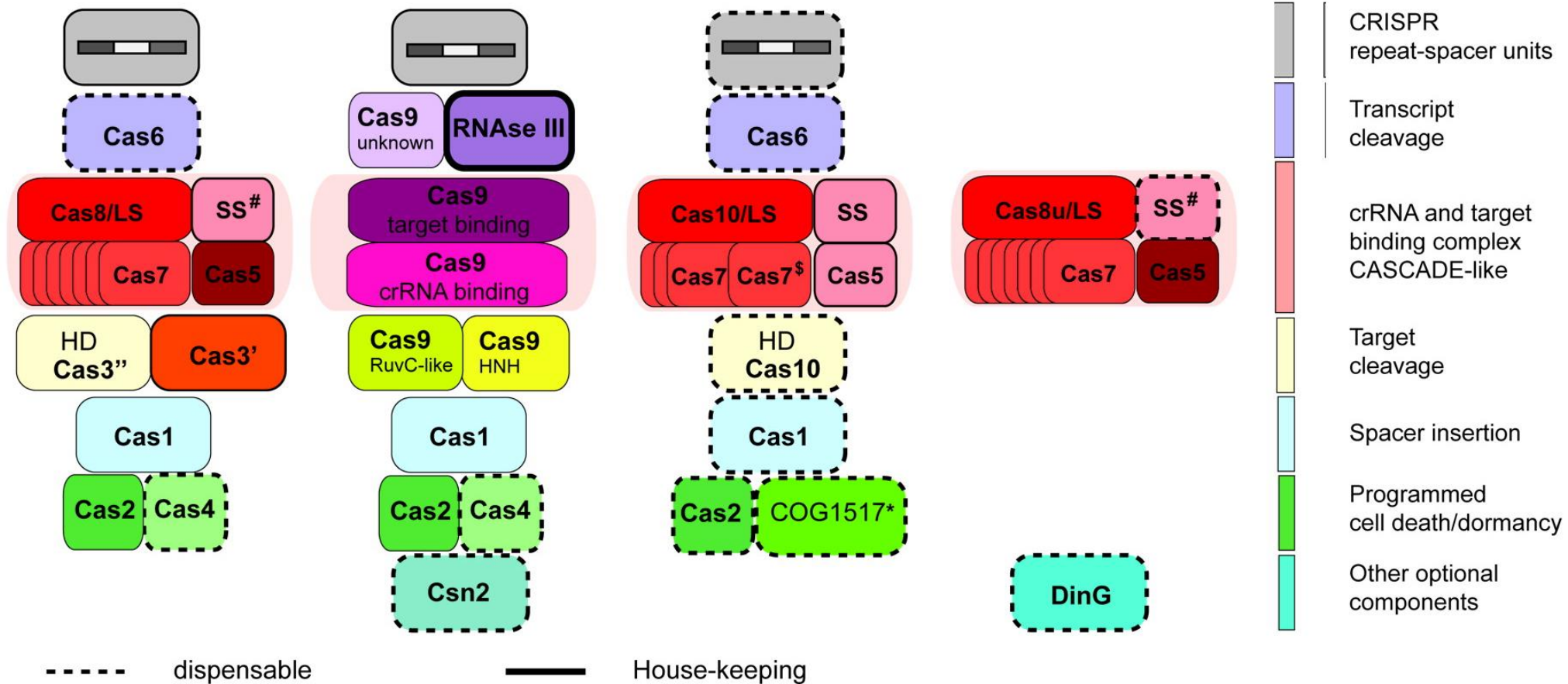
Klasifikace CRISPR-Cas systémů

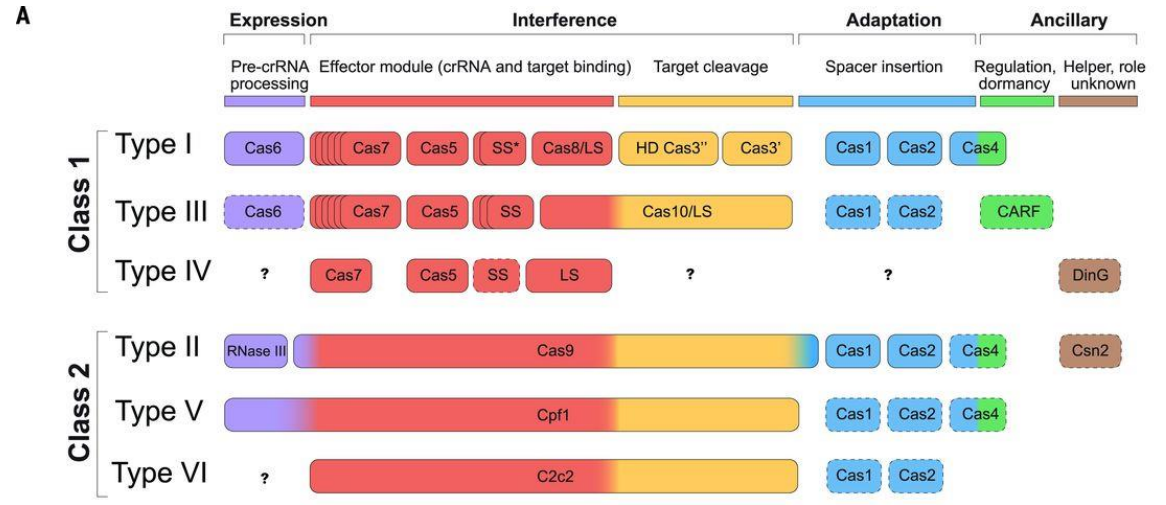
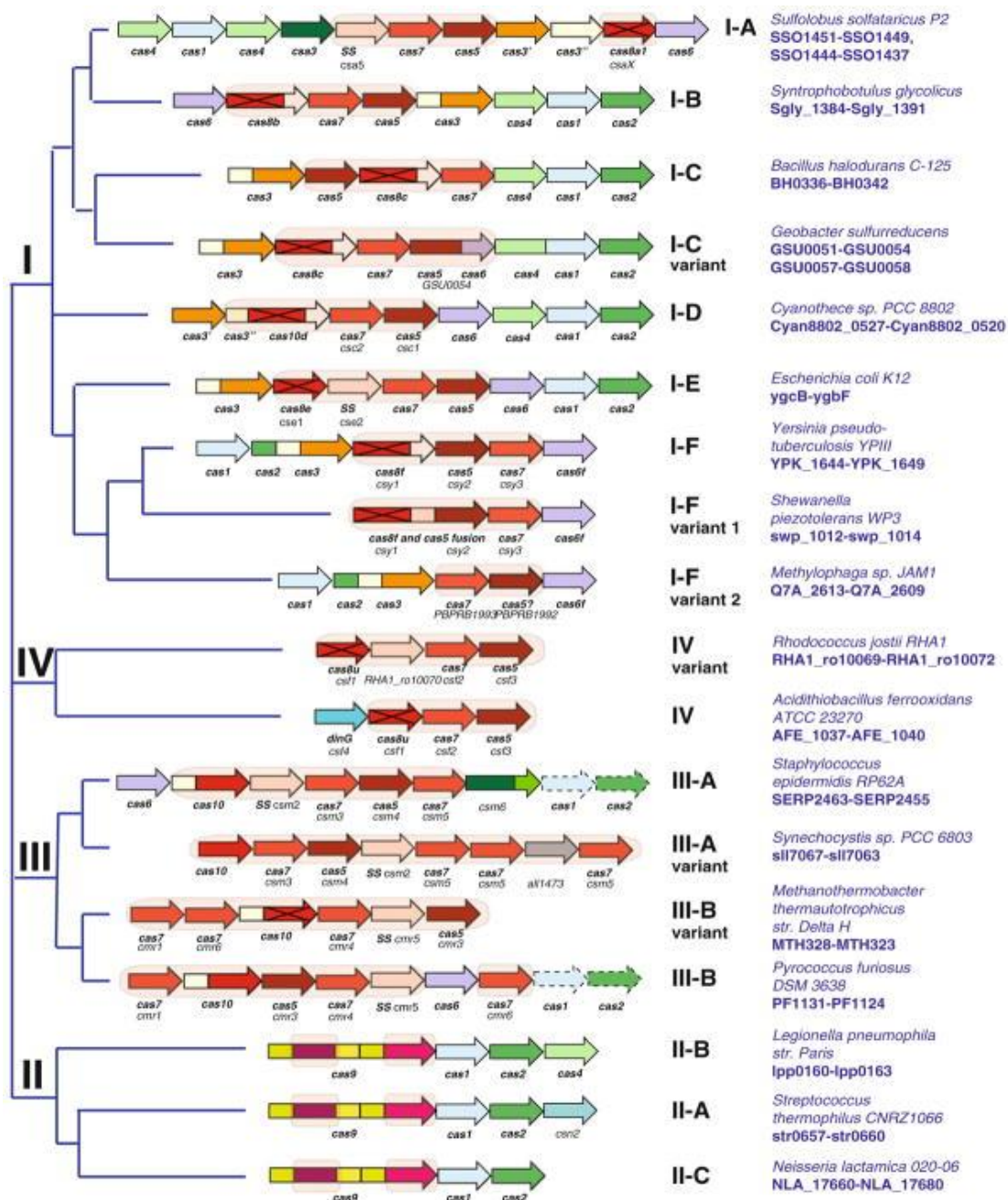
CRISPR-Cas systémy:

I. a II. třídy – na základě struktury efektorového komplexu

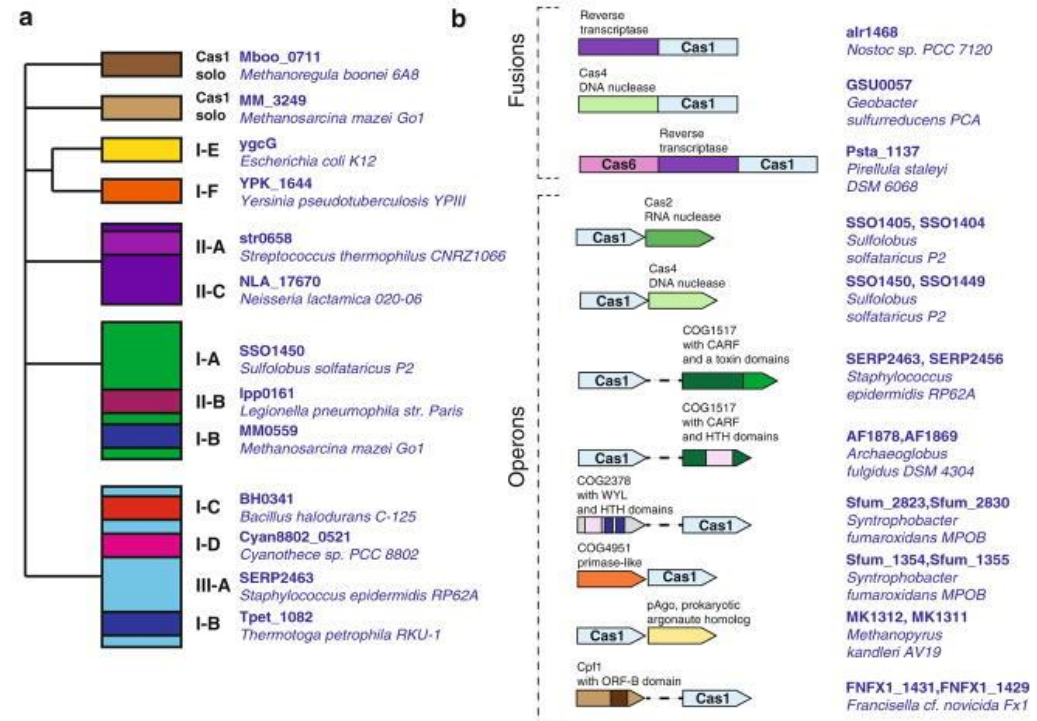
- A. I. Třída – zahrnuje multiproteinový efektorový komplex tvořený několika *cas* geny a je tvořena subtypy I, III a IV
- B. II. Třída – efektorový komplex tvoří pouze jeden protein, tvořen subtypy II, V a VI



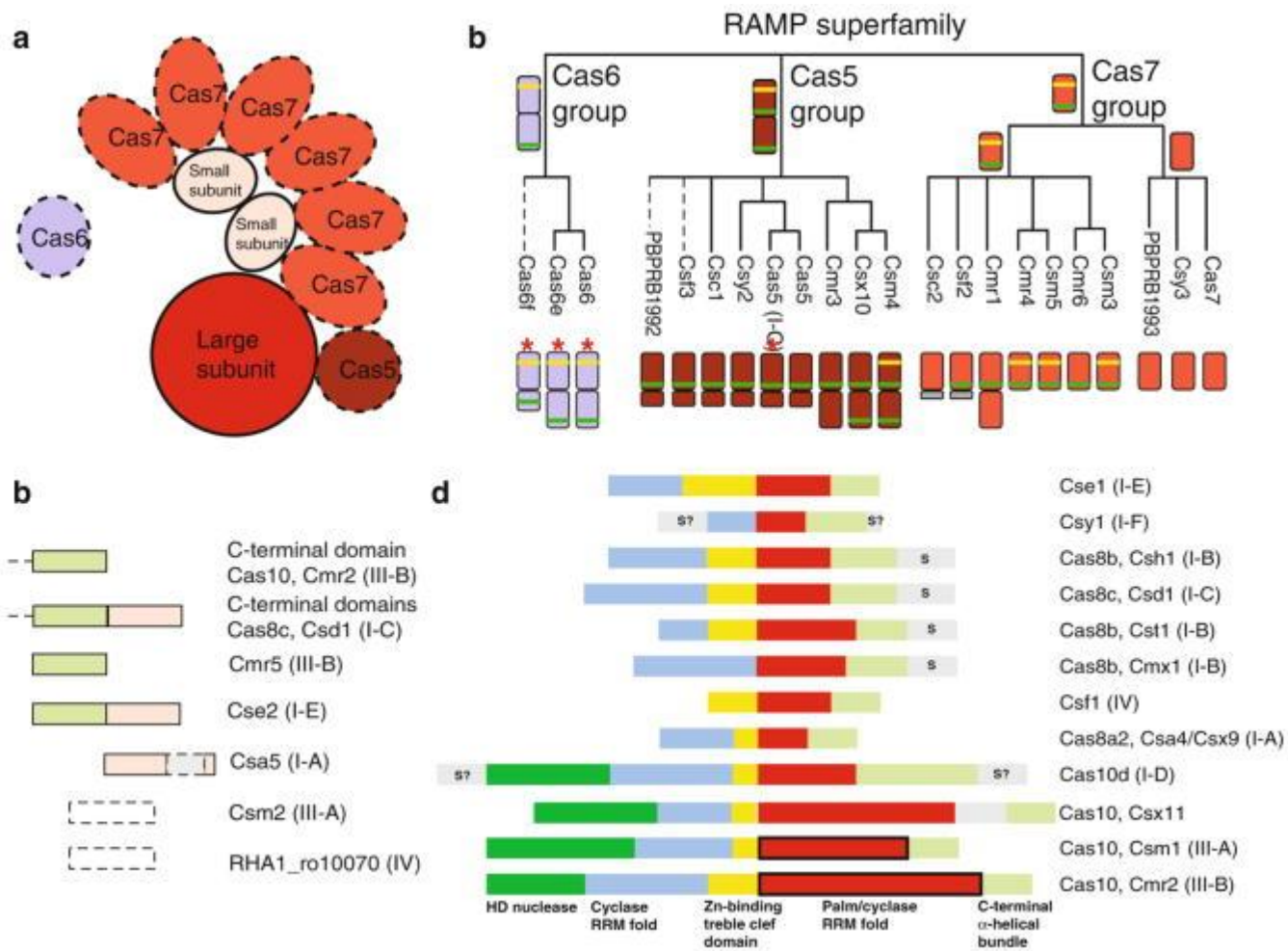




Fylogenetická analýza Cas1



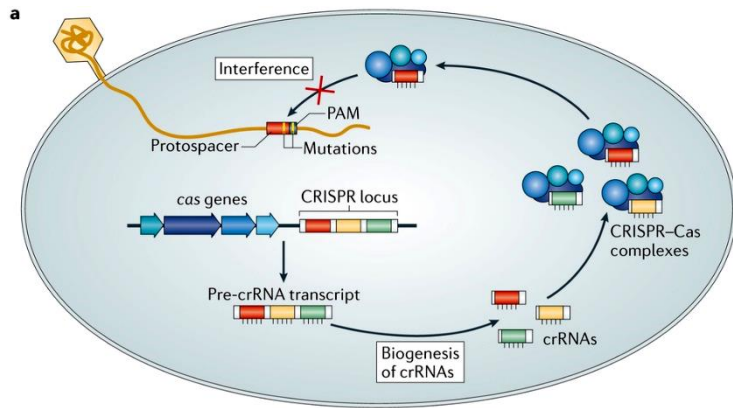
Organizace efektorového komplexu různých typů CRISPR-Cas systémů



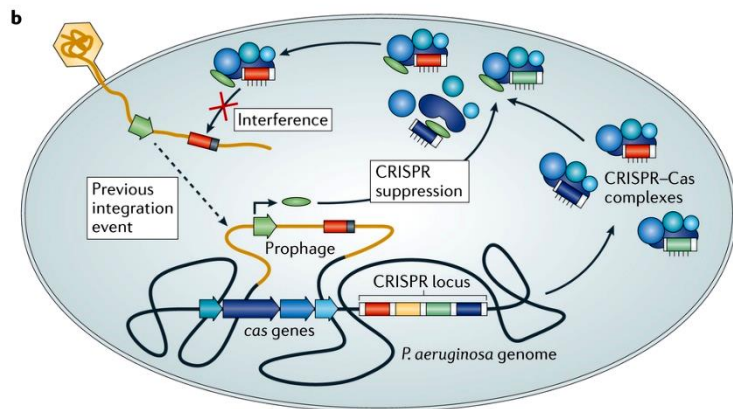
RAMP module - RAMP—repeat-associated mysterious proteins—skupina proteinů obsahující RNA rozpoznávací motiv (RRM doména)

- genový komplex asociovaný s CRISPR-Cas systémem, není fylogeneticky příbuzný s Cas1 a Cas2

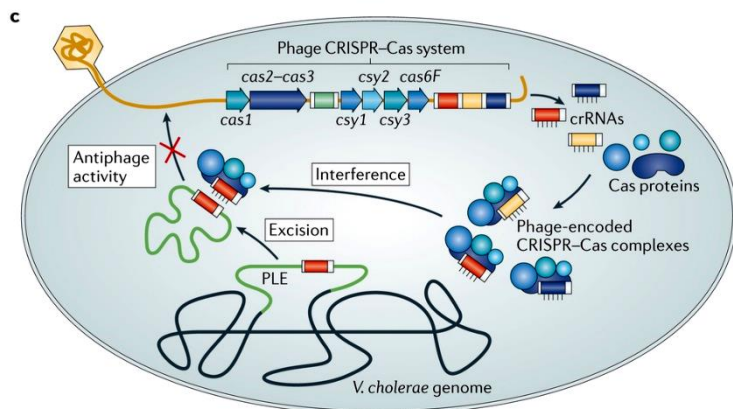
Strategie fágů k překonání systémů CRISPR-Cas



a) Mutace ve fágových protospacerech nebo v sekvencích PAM navozují rezistenci k interferenci, neboť není splněn požadavek na komplementaritu mezi crRNA a cílovou DNA.



b) systém u lyzogenů *Pseudomonas aeruginosa*. Fágem kódovaný anti-CRISPR protein (●) blokuje interferenci zabráněním vytvoření nebo působením komplexů CRISPR-Cas. ? Tento protein může být zabalen do kapsidy a pak koinjikován při následné infekci, nebo může být vytvářen bezprostředně po injekci fágové DNA do buňky.



c) Systém CRISPR-Cas u fágů *Vibrio cholerae*. Po vstupu fágové DNA do buňky jsou exprimovány virové crRNA a cílí na dosud necharakterizovaný antifágový systém *V. cholerae*. Tento systém je lokalizován v lokusu podobajícím se fágem indukovatelnému chromozomovému ostrovu (PICI), označovanému jako PICI-like element (PLE). Spacery ve fágovém CRISPR lokusu jsou komplementární k sekvenci PLE, a působení mechanismu CRISPR je schopno specificky zacílit na tento genetický element a inaktivovat ho.

Evoluce CRISPR-Cas systémů

Endonukleáza Cas1 – ne vždy součástí CRISPR lokusu, některé geny podobné transpozonomům s terminálně obrácenými repeticemi – casozony, Cas1 – casonáza – součástí DNA polymeráza B – **replikativní transpozony**

A. Integrace CRISPR mezníku

vedoucí sekvence repetice mezník repetice
nutné pro integraci

HO-3' 3'-OH
mezníkový prekurzor

První nukleofilní atak na hranici vedoucí sekvence a repetice nebo tRNA a TSD segmentu

HO-3' O

Druhý atak na hranici repetice nebo TSD segmentu

O 3'-OH

5' 3' 5' 3'
3' 5' 3' 5'

Oboustranná integrace

Oprava DNA

B. Integrace casozonu

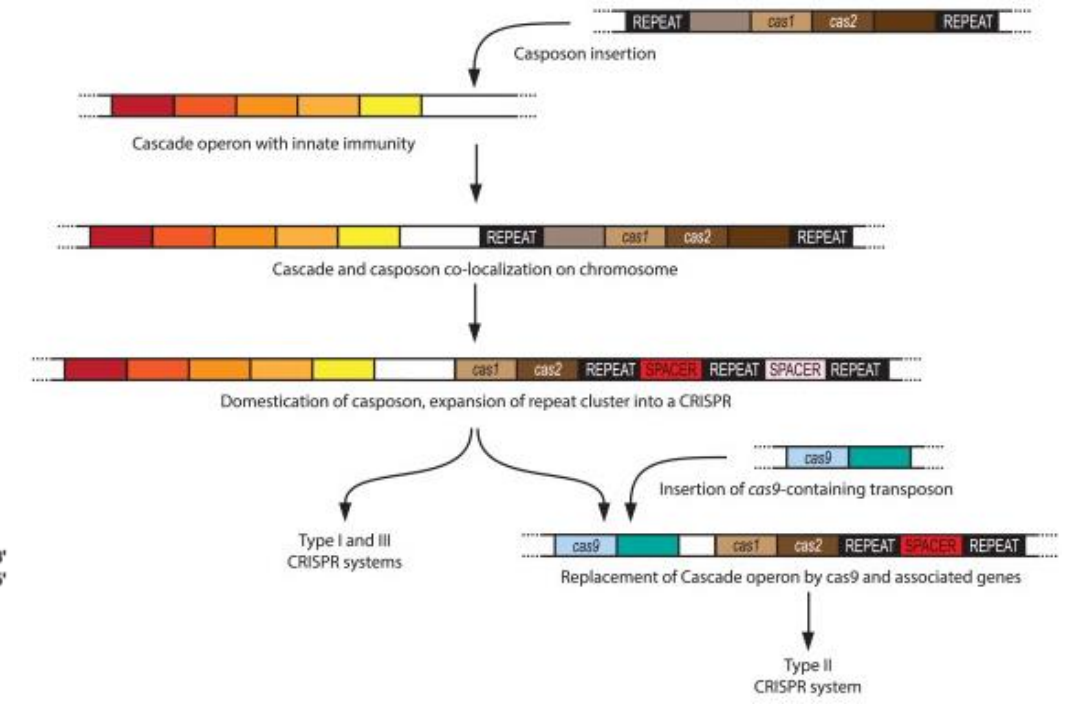
tRNA TSD segment
nutné pro integraci

HO-3' TIR 3'-OH
casozon

HO-3' O

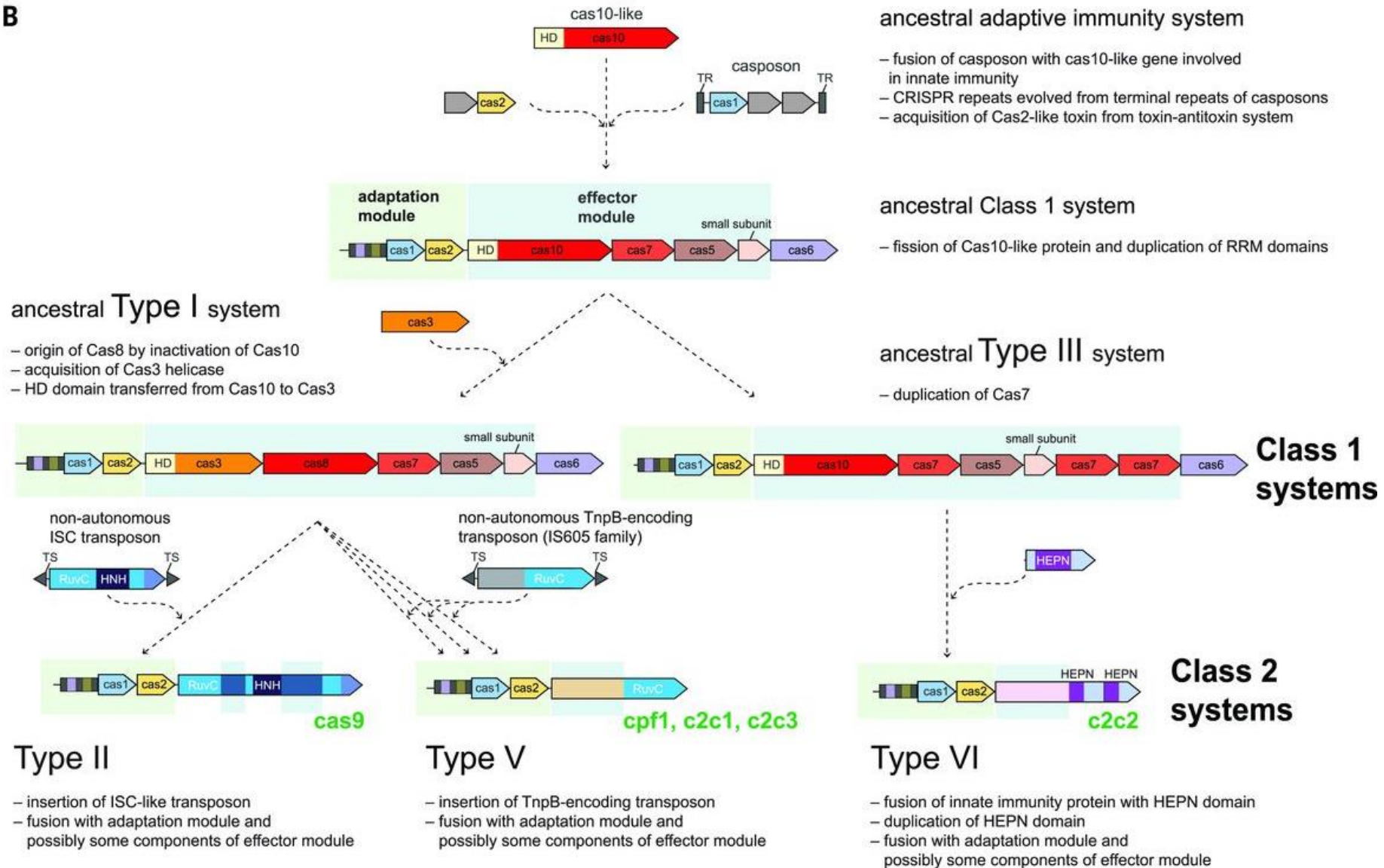
O 3'-OH

5' 3' 5' 3'
3' 5' 3' 5'



Evolve CRISPR-Cas systémů

B



Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*

