

## Innovirology session 8.1 Basics of the CRISPR system

### Slajd 1:

CRISPR to bakteryjny system anti-wirusowy. Białko Cas9 CRISPR jest obecnie szeroko stosowane jako narzędzie do edytowania genomowego. W tej sesji wyśnimy podstawy działania CRISPR jako systemu anti-wirusowego. Pokazano jak CRISPR dostosowuje się do nowej infekcji wirusowej i adekwatnie zwalcza wirusy. W ostatniej części tej sesji zostanie przedyskutowany mechanizm unikania auto-agresji.

### Slajd 2:

Wirusy są bardzo licznie występującymi jednostkami na naszej planecie w liczbie przewyższającej co najmniej o jeden rząd liczebności swoich gospodarzy. Wynika z tego, że w naturalnym środowisku bakterie są stale zagrożone infekcją wirusową. Aby chronić się przed negatywnymi skutkami infekcji wirusowej, bakterie i archaea, podobnie do człowieka, wykształciły ewolucyjnie różne strategie obrony. Ten slajd podsumowuje strategie obronne dotychczas poznane: 1) blokowanie adsorpcji, 2) infekcja abortywna (poronna), 3) blokowanie wnikania, 4) system restrykcji i modyfikacji, i 5) system CRISPR.

System CRISPR został zidentyfikowany u około połowy bakterii i większości archaea. Istnieje wiele różnych typów CRISPR, spośród których oparty na Cas9 jest najbardziej popularny. Podstawowy mechanizm działania różnych rodzin tego systemu jest podobny. Różnice polegają na różnych genach Cas zasocjowanych z systemem CRISPR co jest podstawą klasyfikacji do kilku rodzin. Niektóre systemy są skierowane przeciwko DNA, a inne przeciwko RNA.

### Slajd 3:

Odkrycie CRISPR wiąże się z pierwszym opisem systemu klastrowych regularnie powtórzonych sekwencji palindromowych (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) odkrytego w genomach bakterii i archaea. Przez długi czas nie wzbudzały one zainteresowania, aż do 2005 roku kiedy jednocześnie kilka grup badawczych opisało 30 bp elementy (spacery) występujące pomiędzy palindromowymi powtórzeniami, które to odpowiadały dokładnie sekwencjom wirusowym. Od tego momentu zaproponowano, że układ CRISPR może być elementem anti-wirusowego systemu obronnego.

Ten slajd przedstawia typowy układ CRISPR. CRISPR może zawierać od 2 do kilkuset powtórzeń. W zależności od rodziny CRISPR, wielkość spacerów i sekwencji powtórzonych może być różna. W jednym genomie bakterii lub archaea może występować kilka systemów CRISPR. Każdy spacer jest unikalny i pasuje to poszczególnego wirusa lub pozachromosomalnego elementu. Geny Cas są kodowane najczęściej w pobliżu genów CRISPR.

### Slajd 4:

Pierwszy dowód na to, że CRISPR funkcjonuje jako przeciwwirusowy system obronny pochodzi z badań nad fagoopornymi szczepami bakteryjnymi w przemyśle mleczarskim. Naukowcy udowodnili, że jedyną różnicą pomiędzy szczepem wrażliwym i szczepem opornym na wirusa była obecność jednego dodatkowego spaceru w łańcuchu (sekwencji) CRISPR bakterii odpornej, w kolorze czerwonym

na tym slajdzie. Spacer był w 100% zgodny z regionem w genomie wirusa, na którego szczep uzyskał oporność. Region ten nazywany jest 'protospacerem'. Rola PAM zostanie wyjaśniona na ostatnim slajdzie. Dodanie nowego spaceru, pasującego do konkretnego wirusa zapewni oporność na danego wirusa. Jako że te adaptacje w systemie CRISPR zachodzą na poziomie genetycznym, oporność będzie przekazywana kolejnym pokoleniom. System CRISPR funkcjonuje jako adaptacyjny i dziedziczny system obronny.

Slajd 5:

Na tym slajdzie przedstawiona jest pierwsza faza mechanizmu obronnego CRISPR na przykładzie Cas9. Pierwszy etap systemu obronnego CRISPR nazywany jest fazą 'adaptacji'. Po zainfekowaniu wirusem, obce DNA jest rozpoznawane i rozcinane przez białka Cas. Niewielki odcinek genomu jest włączany do łańcucha (sekwencji) CRISPR jako nowy spacer. Nowe spacery są zazwyczaj dodawane do łańcucha CRISPR obok sekwencji wiodącej, co jest zaznaczone na slajdzie kolorem szarym. Łańcuch (sekwencja) CRISPR pozwala na przegląd wirusów uprzednio napotkanych przez daną bakterię. Sporadycznie spacery zostają usunięte z łańcucha (sekwencji) CRISPR na skutek rekombinacji, która może nastąpić w środku lub przy końcu łańcucha.

Slajd 6:

W drugiej fazie mechanizmu obronnego CRISPR, łańcuch (sekwencja) CRISPR jest transkrybowany na długą cząsteczkę RNA. Cas9 jest w stanie przetworzyć pre-CRISPR RNA. W innych typach CRISPR, RNA jest przetwarzane przez inne białka Cas. Rozcinanie pre-CRISPR RNA ma miejsce przy pomocy transaktywującego CRISPR-RNA (tracrRNA). TracrRNA ulega specyficznej hybrydyzacji z powtórzeniami z pre-CRISPR RNA, które jest wiązane przez Cas9. To zdarzenie indukuje kodowane przez gospodarza RNAazy, które przetwarzają pre-crRNA na krótkie sekwencje kierujące. W innych typach systemów CRISPR to cięcie może być przeprowadzane przez białka Cas. Sekwencja kierująca pozostaje związana z białkiem Cas.

W trzeciej fazie mechanizmu obronnego CRISPR, genom wirusowy zostaje zlokalizowany i wyeliminowany. Kompleks Cas9-RNA kierujące skanuje komórkowe DNA wykorzystując crRNA zawierające pojedyncze spacery jako sekwencje kierujące. W momencie kiedy znalezione zostanie idealne dopasowanie, DNA zostaje rozcięte, a infekcja wirusowa zatrzymana. Sekwencje o długości około 30bp zapewnia wystarczającą specyficzność, aby uchronić własny genom bakterii czy archea. Jednakże teoretycznie istnieje jedna pozycja z idealnie pasującym crRNA do bakteryjnego genomu. Jest to sam łańcuch (sekwencja) CRISPR. Dopasowanie z tym regionem mogłoby prowadzić do reakcji auto-immunologicznej. Aby tego uniknąć kluczowa jest sekwencja PAM.

Slajd 7:

Na tym slajdzie jest wyjaśniony mechanizm PAM. PAM jest motywem towarzyszącym protospacerowi. Składa się najczęściej z kilku par zasad. Jest zlokalizowany w genomie wirusa przy protospacerze (zaznaczony na czerwono). Z reguły nie znajduje się w sąsiedztwie spacerów w systemie CRISPR. Cięcie DNA przez kompleks crRNA-Cas jest aktywne jedynie w obecności PAM. Dlatego też, obecność PAM zapewnia skuteczną ochronę przez reakcją autoimmunologiczną.