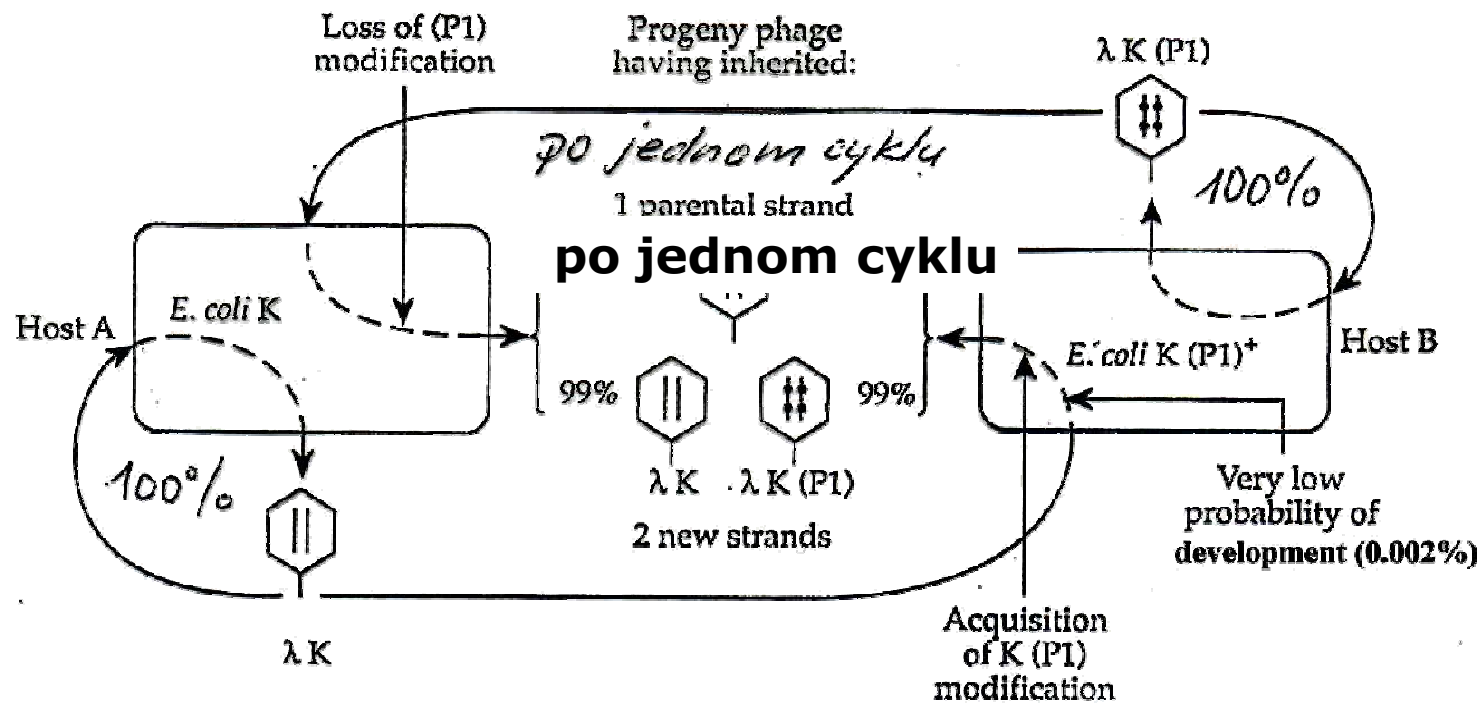


RESTRIKCE A MODIFIKACE FÁGOVÉ DNA

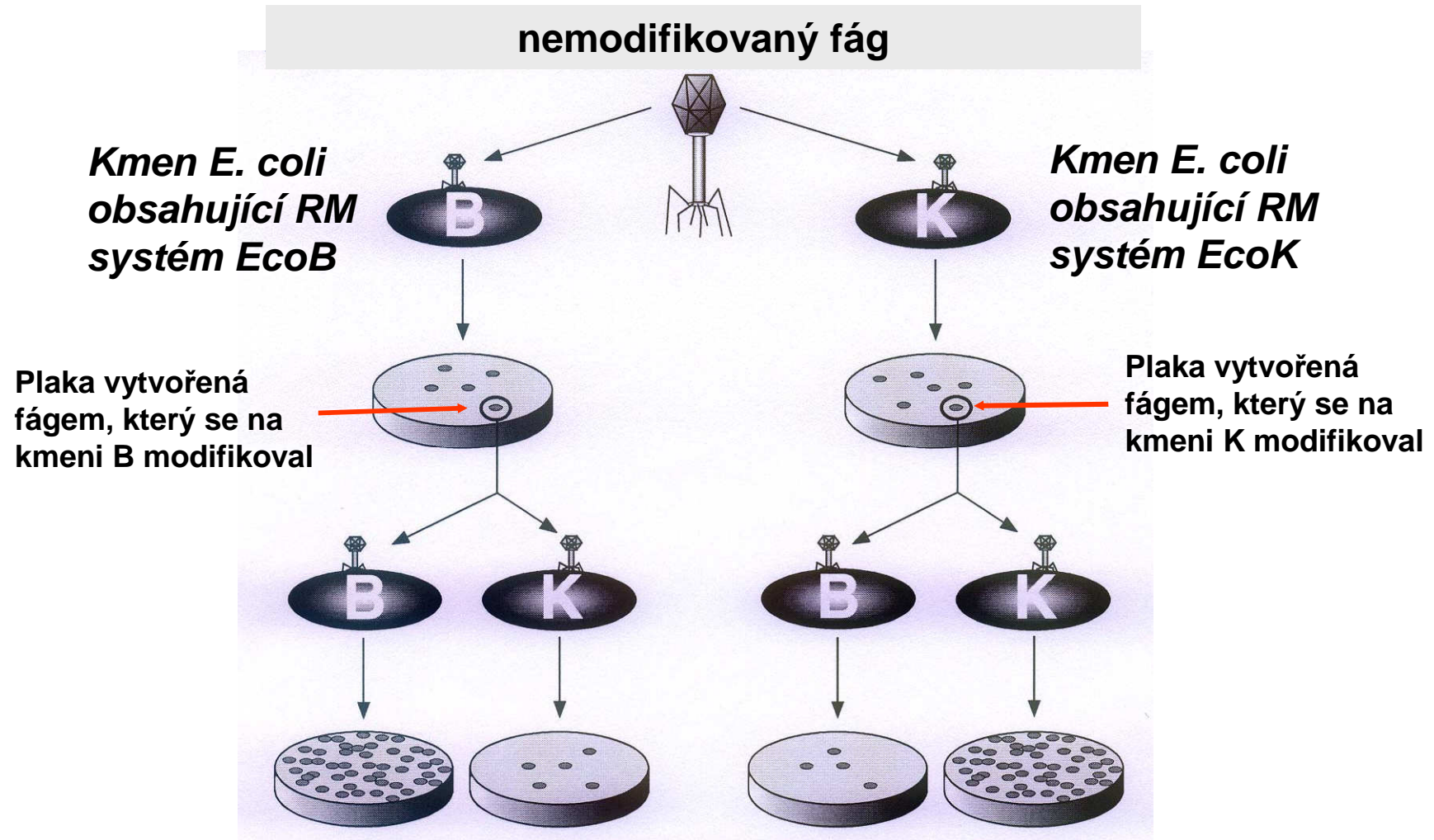


Kmeny *E. coli K* a *K(P1)* + mají vzájemně odlišnou hostitelskou specifitu (K a P1) = obsahují odlišné RM-systémy

Fágy po jednom růstovém cyklu na hostiteli získávají nové hostitelské spektrum.

Nejedná se o mutaci - změna se týká celé populace a není dědičná – epigenetická záležitost.

Experimentální důkaz přítomnosti a působení RM systémů



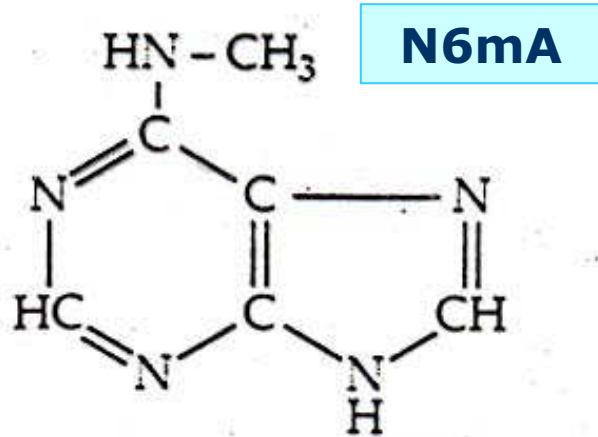
RESTRIKČNĚ-MODIFIKAČNÍ (RM) SYSTÉMY

- Složkami standardního restriktivně-modifikačního (RM) systému jsou sekvencně specifické enzymy:
 - **A. modifikační metyláza (metyltransferáza)**
 - **B. restriktivní endonukleáza**

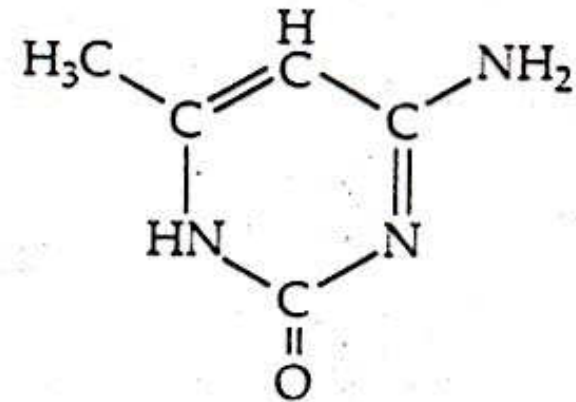
- Restriktivní a modifikační podléhá jen dsDNA:
 1. Při infekci fágem
 2. Při přenosech DNA transdukací a konjugací, omezeně transformací (při umělé tr.)

Monitrování příjmu exogenní DNA – „imunitní systém prokaryot“

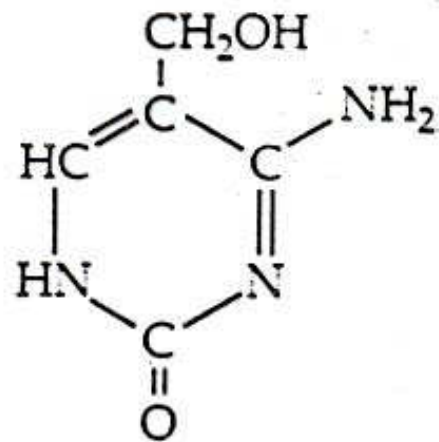
Metylované báze v DNA



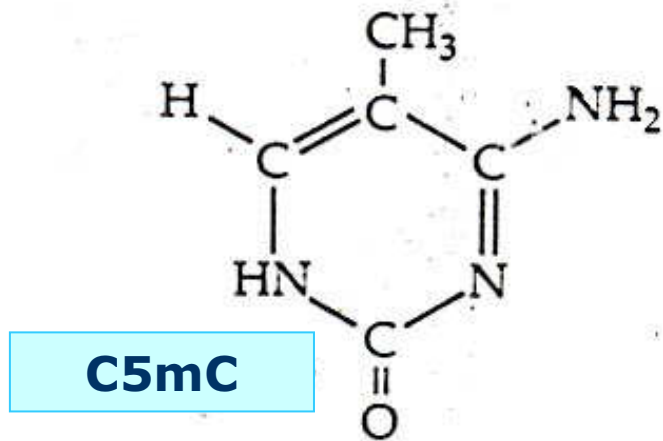
N6-methyl-adenine



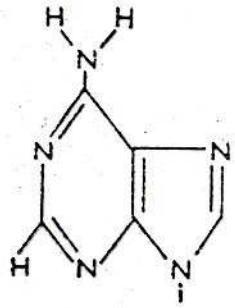
C4-methyl-cytosine



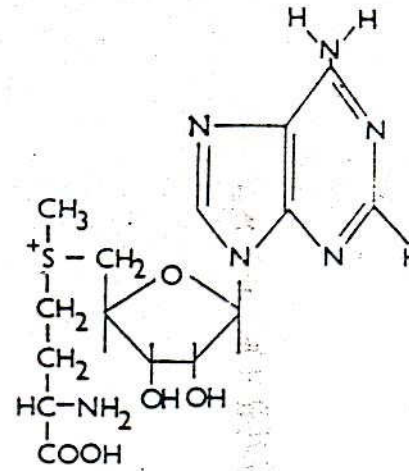
C5-OHmethyl-cytosine



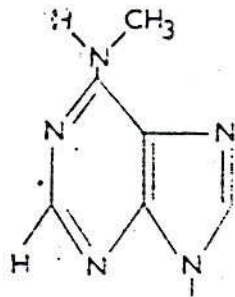
C5-methyl-cytosine



adenin

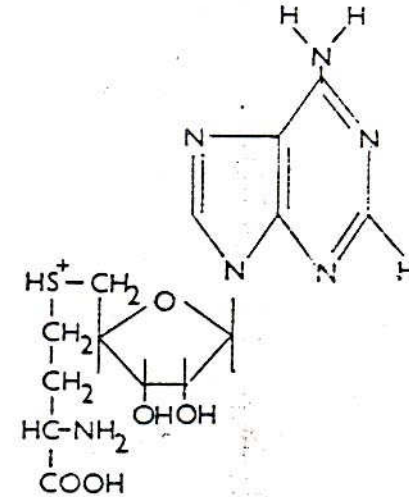


S-adenozylmetionin



6-metylaminoapurin

N6mA



S-adenozylhomocystein

Donor
metylové
skupiny:
SAM
(AdoMet)

SYSTÉMY RESTRIKCE A METYLACE

1. Hsd systémy (host specificity of DNA)

- třídy (typy) I, II, III, IV
restrikční a metylační aktivita

2. Systémy restrikce modifikované DNA

- Mar, Mrr (methylated-adenine), DpnI
- Mcr (methylated-cytosine)

3. Systémy metylující specifické sekvence DNA

- Dam (adenine-methylation)
- Dcm (cytosine-methylation)

Table 6.1 Characteristics of the four classes of Hsd systems.

Properties	Class I	Class II 95%	Class III ^a	Class IV ^a
R and M activities	Trimeric complex	Single enzymes	Trimeric complex	Single protein + 2nd methylase
Genetic organization	Two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdSM</i>	Usually two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i>	Two transcripts: <i>hsdR</i> , <i>hsdSM</i>	1-2 geny,
Recognition sequence	Non-symmetric, hyphenated	Usually palindromic	Non-symmetric	Palindromic, hyphenated
Requirements for restriction methylation	SAM ^b SAM, Mg ²⁺ , ATP	Mg ²⁺ SAM	SAM, ATP, Mg ⁺⁺ SAM, ATP, Mg ²⁺	Mg ²⁺
Location of cleavage site	Random, at least 10 ³ bases away from recognition site	Usually within the recognition sequence	24–26 bases 3' of recognition site	30 bases 3' of recognition site
Restriction versus methylation	Mutually exclusive	Separate	Simultaneous	protein štěpí jen modifikovanou DNA
Recycling of endonuclease	No	Yes	Yes	
Model systems	<i>EcoB</i> and <i>EcoK</i>	<i>EcoRI</i>	SP1	<i>Eco57I</i> + M- <i>Eco57I</i>

a, Only five Class III and one Class IV cases have been studied. b, SAM: S-adenosylmethionine.

Table 6.2 Recognition sequences of some restriction enzymes.

Enzyme	Name	Organism	Recognition sequence	Observations
Class I	<i>EcoK</i>	<i>E. coli</i> K12	AACN ₆ GTGC	Cleavage $\geq 10^3$ bases away
Class II	<i>EcoRI</i>	<i>E. coli</i> RY13	G/AATTC	Palindromic sequence
	M- <i>EcoRI</i>	<i>E. coli</i> RY13	GAA*TTC	Cognate methylase
	<i>RsrI</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	G/AATTC	Isoschizomer of <i>EcoRI</i>
	<i>AvaI</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	C/PyCGPuG	Palindromic degenerate sequence
	<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	GmeA/TC	<u>Necessitates me-DNA</u>
	<i>BamHI</i> <i>MboI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Moraxella bovis</i>	G/GATCC GATC	} Compatible enzymes
Class III	SP1	Phage P1	AGACC	Cleavage 24 bases from 3' end
Class IV	<i>Eco57I</i>	<i>E. coli</i> RFL57	CTGGAG	Cleavage 14 bases from 3' end

By convention, only the 5' to 3' strand is shown. N, nucleotide; Py, pyrimidine; Pu, purine; meA, methyl-
Ade; * represents the methylating site; / indicates the cleavage site.

GENY KÓDUJÍCÍ RM-SYSTÉMY JSOU NESENY NA RŮZNÝCH REPLIKONECH

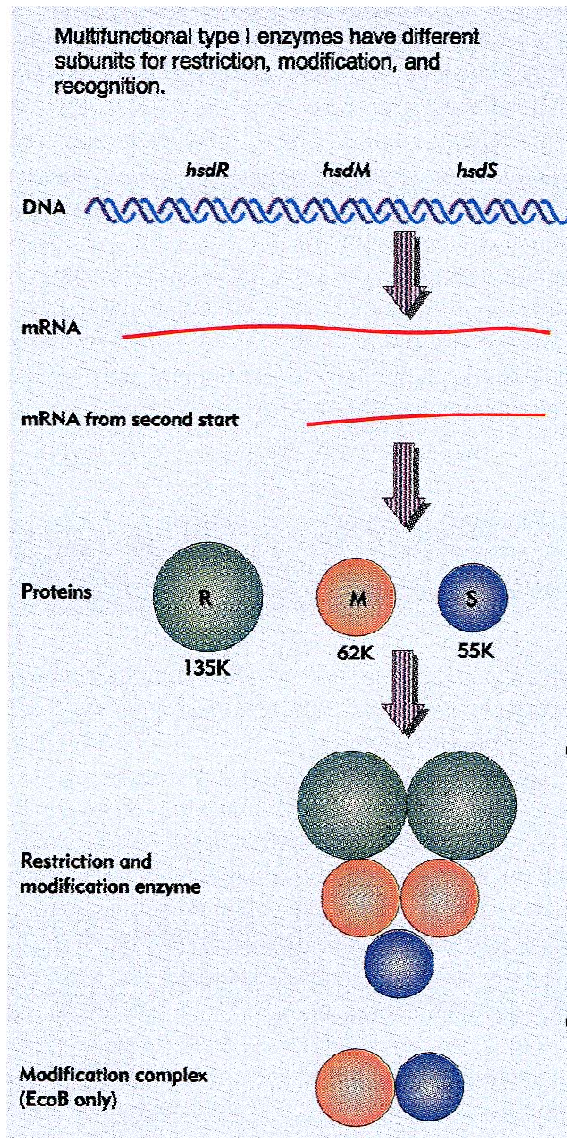
TABLE 2. Organization of Types I and III Restriction–Modification Systems

Group	Members	Recognition sequence	Cellular location of the R–M system
Type IA	<i>EcoK</i>	AAC(N) ₆ GTGC	Chromosomal
	<i>EcoB</i>	TGA(N) ₈ TGCT	Chromosomal
	<i>EcoD</i>	TTA(N) ₇ GTCPy	Chromosomal
	<i>StySB</i>	GAG(N) ₆ PuTAPyG	Chromosomal
	<i>StySP</i>	ACC(N) ₆ GTPuC	Chromosomal
	<i>StySQ</i>	ACC(N) ₆ PuTAPyG	Chromosomal
	<i>EcoDXX1</i>	ATCA(N) ₇ ATTC	Plasmid
Type IB	<i>EcoA</i>	GAG(N) ₇ GTCA	Chromosomal
	<i>EcoE</i>		Chromosomal
Type IC	<i>EcoR124</i>	GAAN ₆ PuTCG	<i>IncFIV</i> plasmid R124
	<i>EcoR124/3</i>	GAAN ₇ PuTCG	<i>IncFIV</i> plasmid R124/3
Type III	<i>EcoP1</i>	AGACC	Prophage P1
	<i>EcoP15</i>	CAGCAG	Plasmid 15B
	<i>HinfIII</i>	CGAAAT	Chromosomal

**lokalizace genů na chromozomu,
plazmidech, nebo profágách**

Přítomnost genů RM systémů na mobilních elementech

Mobilní element	Příklad RM systému
Plazmid	<p><i>paeR71 P. aeruginosa</i> <i>ecoRI E. coli</i> <i>ssoII Shigella sonnei</i> <i>bsp6I Bacillus sp.</i></p>
Bakteriofág/profág	<p><i>hindIII H. influenzae</i> <i>sau42I S. aureus</i> <i>ecoO1091 E. coli</i> <i>bsuMI B. subtilis</i></p>
Integrační kumulativní element/genomický ostrov	<p><i>Sth368I Streptococcus thermophilus</i> <i>hsdMS S. aureus</i></p>
Transpozon	<p><i>Rle39BI</i></p>
Integron	<p><i>xbaI Xanthomonas campestris</i> <i>M.Vch0211 Vibrio cholera</i> <i>hphI Vibrio metschnikovii</i> <i>CAA68 Lactococcus lactis</i></p>



PODJEDNOTKOVÉ SLOŽENÍ ENZYMOVÉHO KOMPLEXU TYPU I

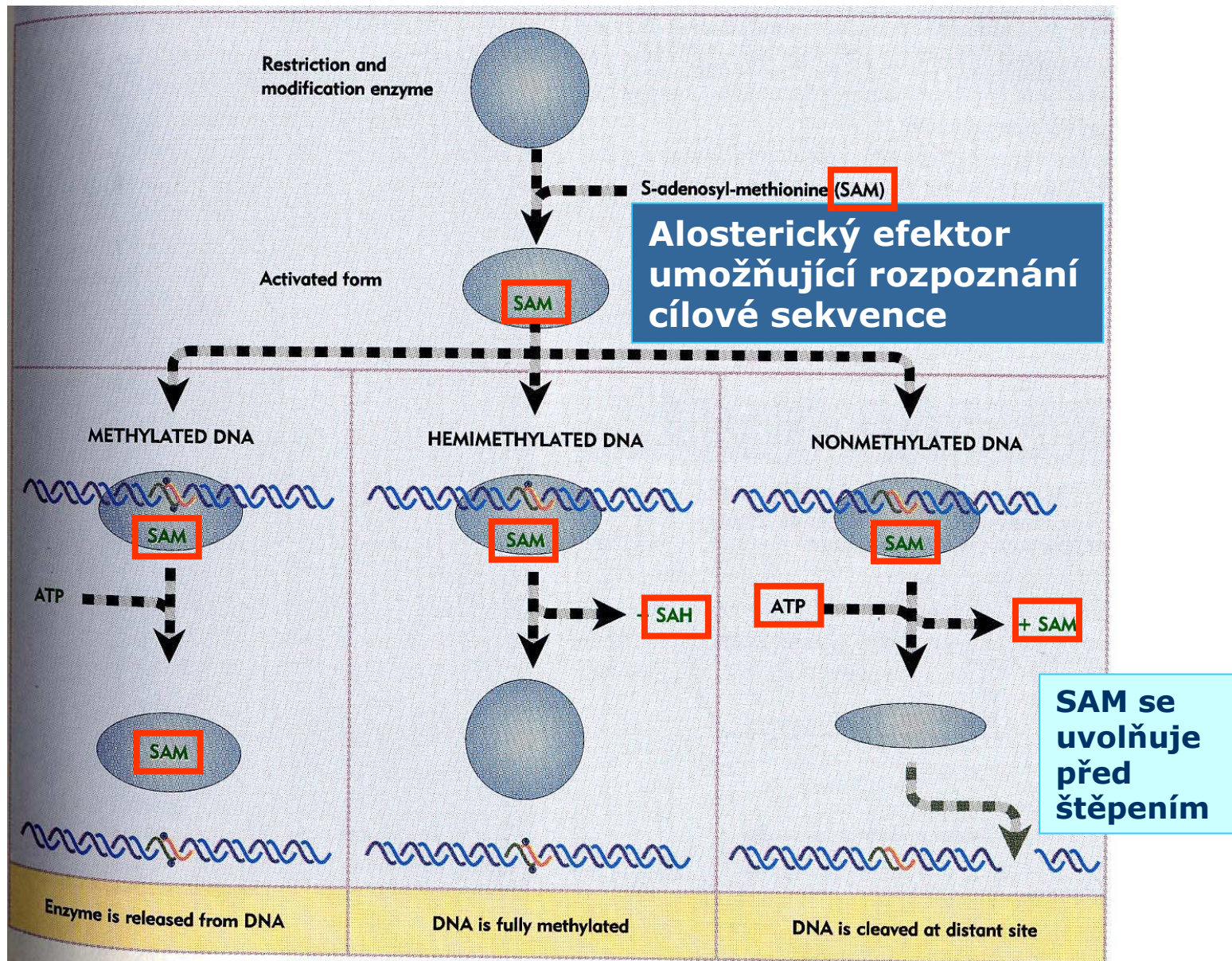
S = rozpoznání cílové sekvence

M = vazebné místo pro SAM a aktivní místo pro metylaci

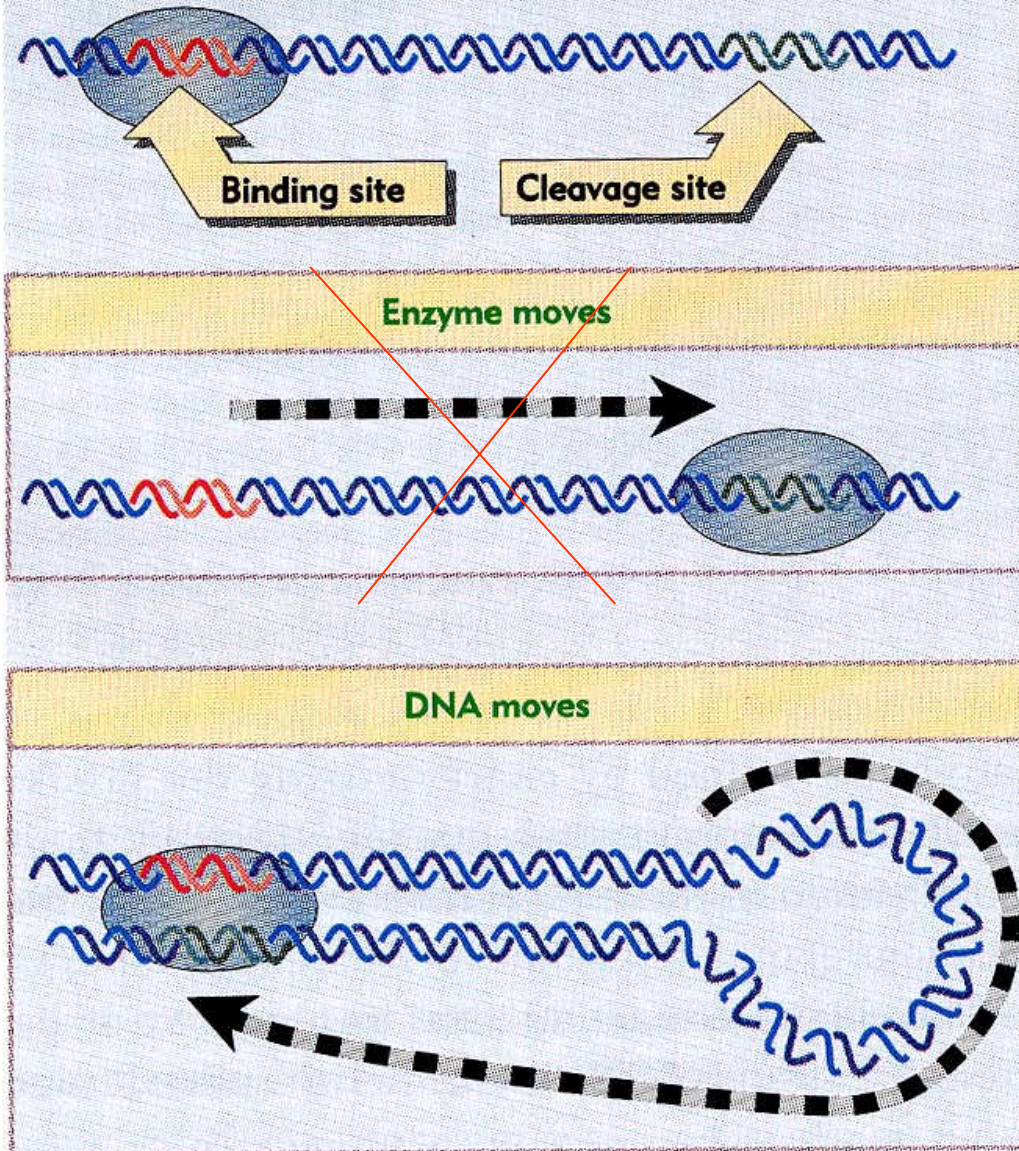
R = aktivní místo pro hydrolýzu ATP, pro translokaci DNA a pro štěpení

Multifunkční komplex

INTERAKCE ENZYMŮ RM SYSTÉMU TYPU I S CÍLOVOU SEKVENCÍ NA DNA



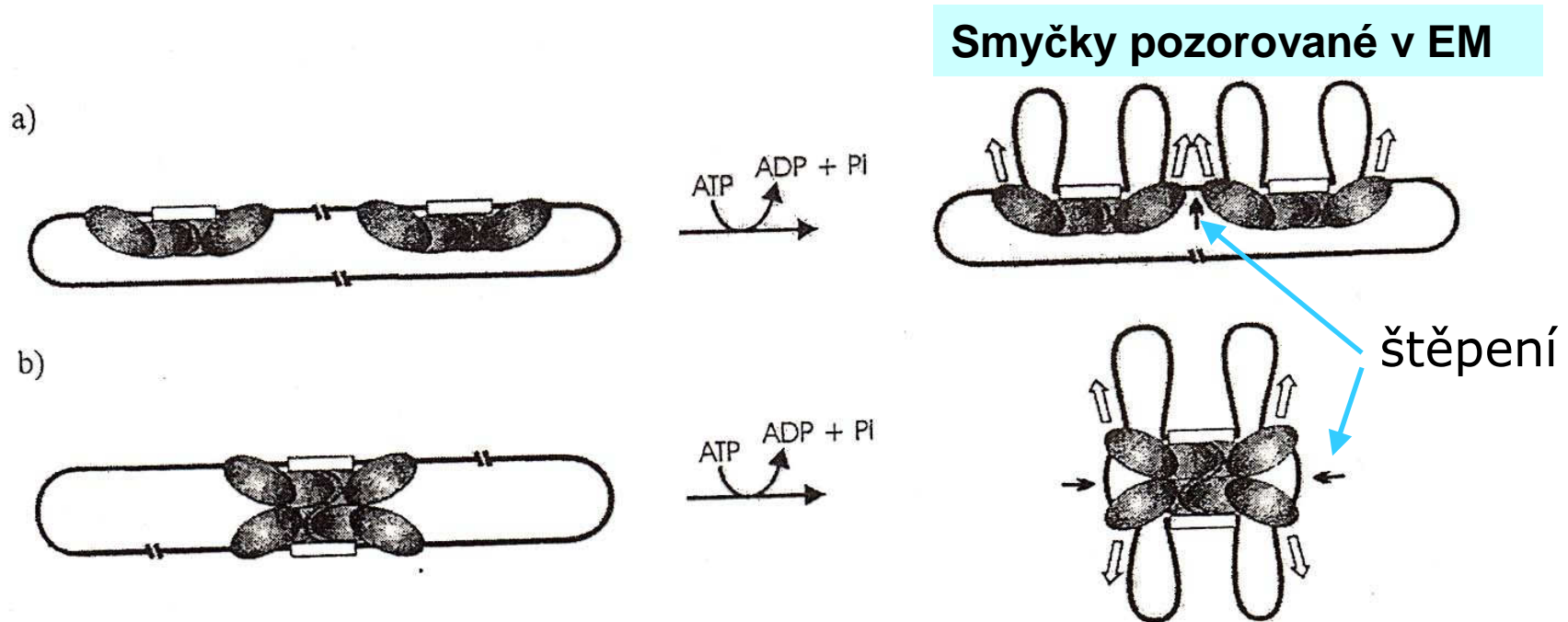
Does a type I enzyme move along DNA or does it remain at its target site, simultaneously pulling the DNA through the protein?



Interakce enzymového komplexu s rozpoznávacím místem

1. Vyhledání rozpoznávací sekvence
2. Podle stavu sekvence (M, NM, H-M) dochází k
 - a) uvolnění enzymu
 - b) restrikci
 - c) metylaci

MODELY TRANSLOKACE DNA ZPROSTŘEDKOVANÉ ENZYMY RM SYSTÉMŮ TYPU I

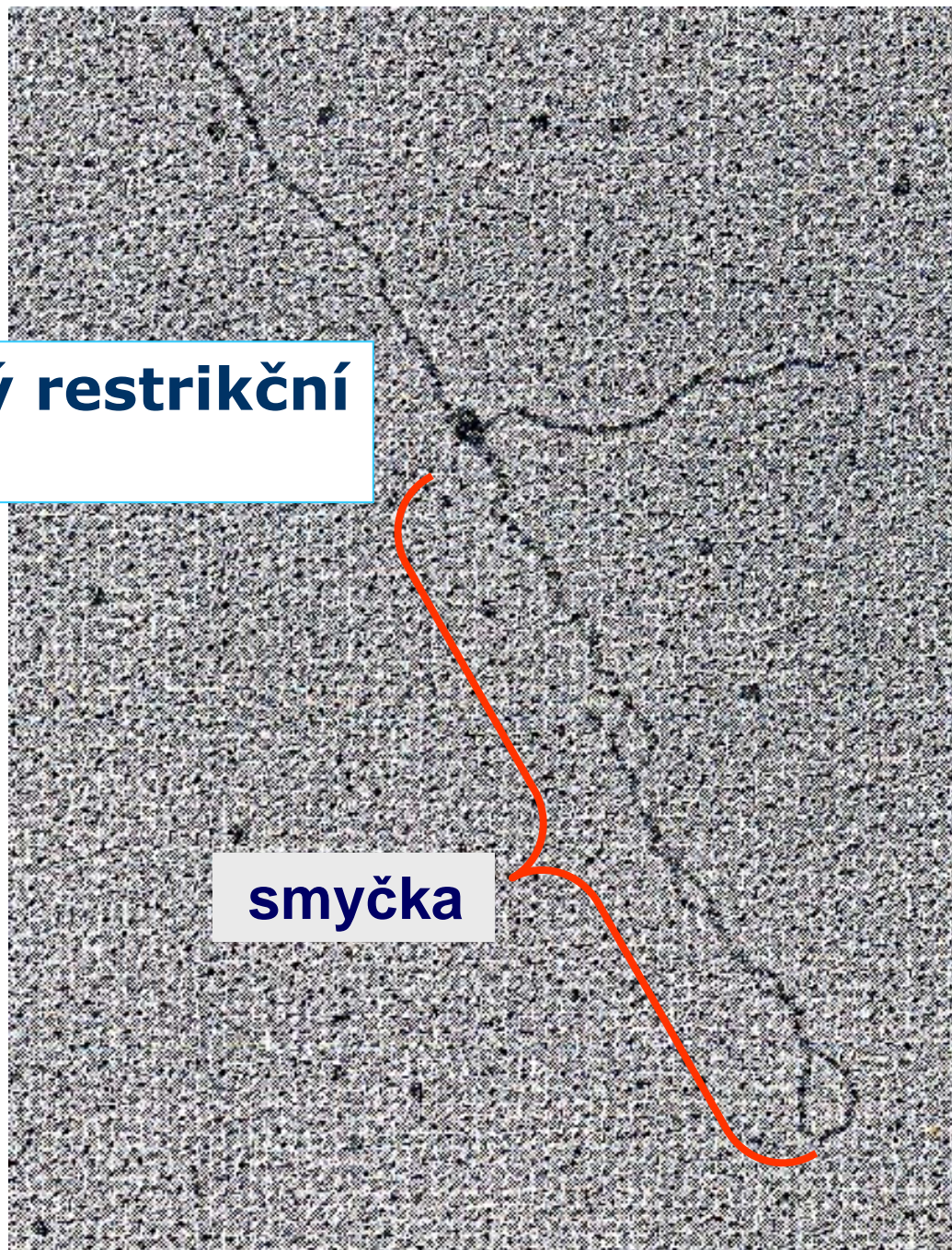


ATP-dependentní translokace DNA - ke štěpení dochází po kolizi DNA řetězců v místě navázaného enzymu

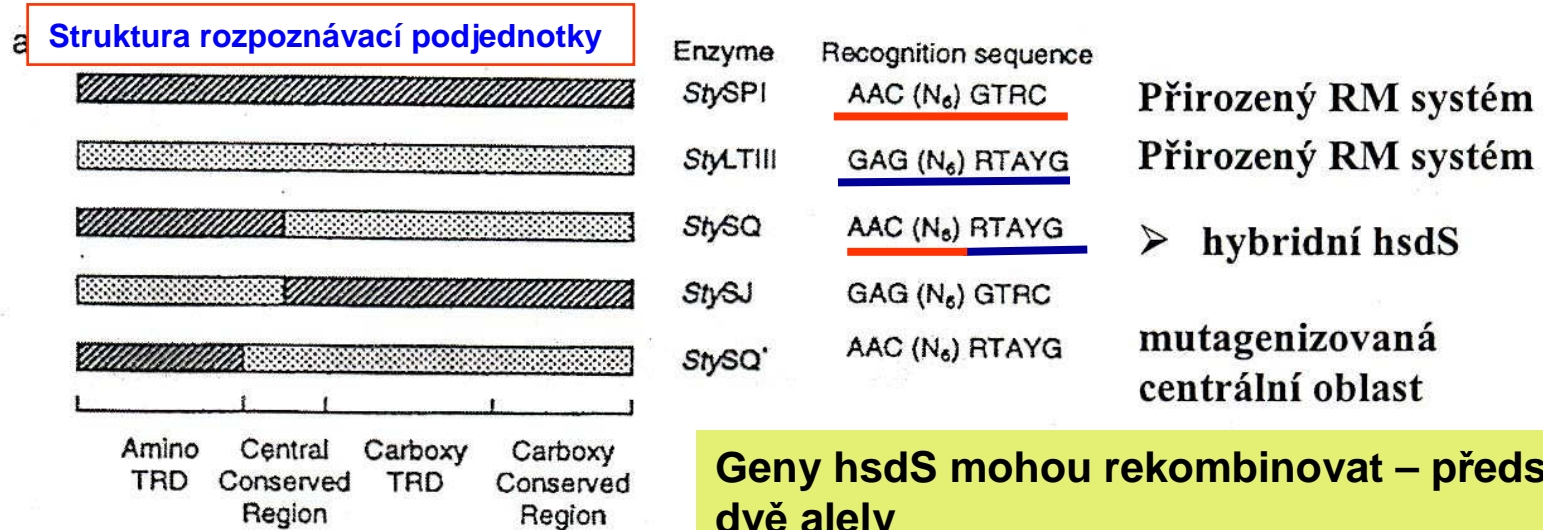
Pokud jsou místa nemodifikovaná, vytváří se rozpoznávací komplex, vázaný na rozpoznávací místo, a jím je DNA protahována (translokována) až k místu vzdálenému zhruba 1000 bp nebo více, kde pak proběhne štěpení.

Navázaný restriční enzym

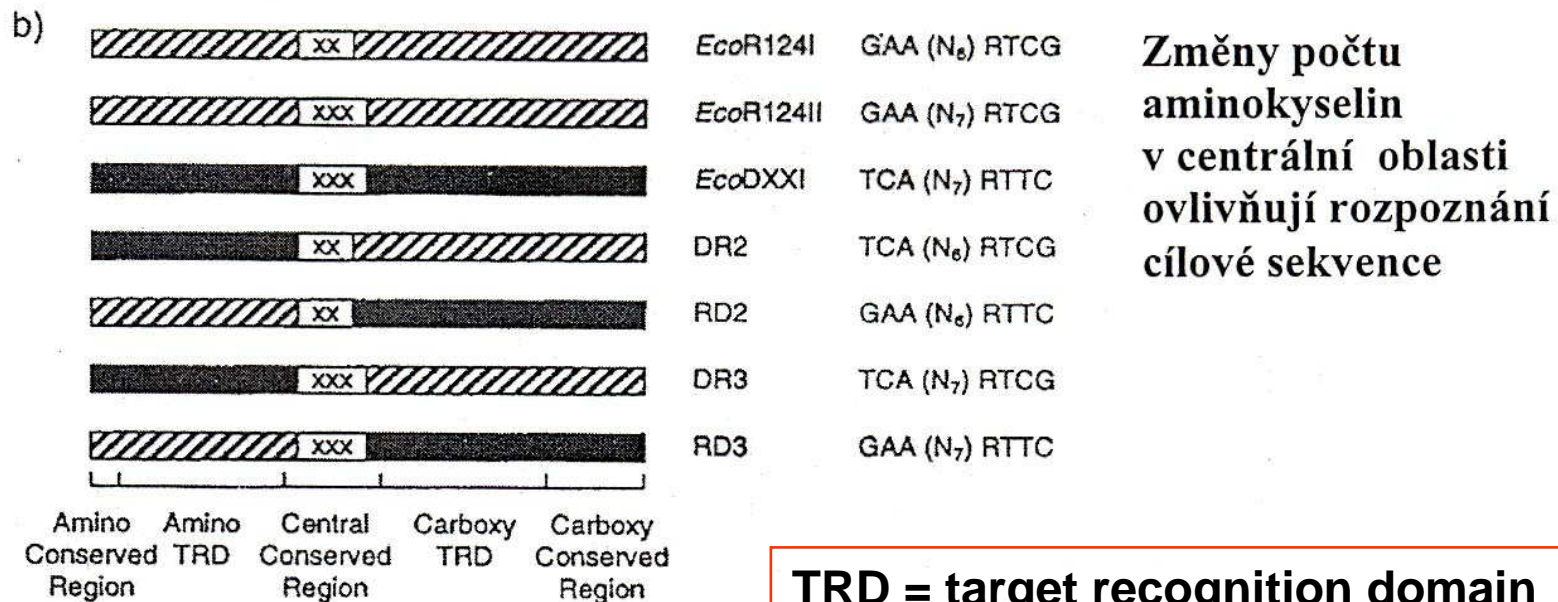
smyčka



Vytváření RM systémů typu I s novými sekvenčními specifitami



Geny hsdS mohou rekombinovat – představují dvě alely



TRD = target recognition domain

MUTACE V GENECH RM SYSTÉMU

Genotype <i>hsdS hsdR hsdM</i>	Phenotype r m	Protein-DNA interaction	Activity R M
+ + +	+ +		+ +
- + +	- -		- -
- + -	- -		- -
+ - +	- +		- +
- - +	- -		- -
+ - -	- -		- -
+ + -	+ -		<u>lethal</u>

$r^{+/-}/m^{-}$

Pro RM systém typu I je nezbytná funkční *hsdS* - její mutace vede k fenotypu $r^{-} m^{-}$.

$S^{-} \rightarrow M^{-}R^{-}$

Restriktivně-deficientní mutanty

r^{-}/m^{-}

r^{-}/m^{+}

RM SYSTÉMY, U NICHŽ JE ŠTĚPENA cizorodá MODIFIKOVANÁ DNA (**KMEN NETVOŘÍ METYLÁZU**)

- *E. coli* K12
- Mar = methyladenine restriction (GmeAC, GmeAG)
- Mrr = methyladenine recognition and restriction
- Mcr = methylcytosine restriction - modified cytosine restriction (GmeCG - C5, N4, HM-C5) - štěpení sekvence v několika místech (štěpí též neglukozylovanou fágovou DNA)

- *Diplocooccus (Streptococcus) pneumoniae*:
RM systém DpnI - štěpí **GmACT**
- (*Caulobacter, Neisseria, Acholeplasma, Streptomyces*)

Detekce restričního systému Mar

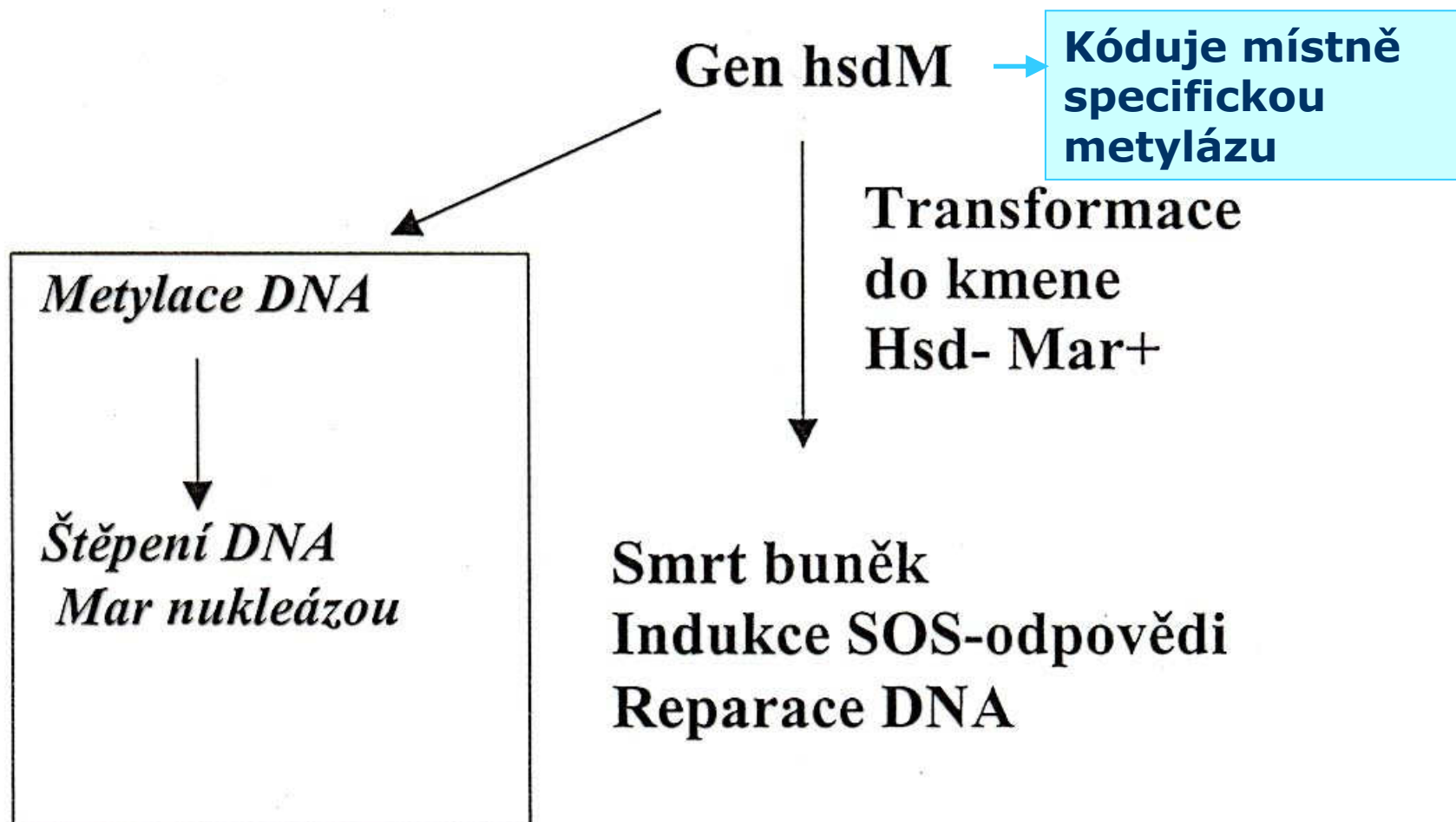


TABLE 3. Antirestriction Strategies

Strategy	Bacteriophage	Antirestriction gene, polypeptide, or base modification	Antirestriction target (R-M type)	Reference
Inhibition of endonuclease	T3, T7	<i>ocr</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I) <i>EcoP1</i> (type III)	Krüger et al., 1978 Krüger et al., 1982
	φNR2rH, φ1rH	20 kD	<i>BamN_x</i> (type II)	Makino et al., 1979 Makino et al., 1980
Protection of viral DNA by viral-encoded methylase	SPβ, φ3T, SPR	<i>M.BsuRI</i>	M.SPR	Warren, 1980 Noyer-Weidner et al., 1981
	T2, T4	T2,4 <i>dam</i>	Mutant <i>EcoP1</i> (type III)	Bächi et al., 1979 Hattman et al., 1985
Overproduction of host-encoded methylase	λ	<i>ral</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I)	Zabeau et al., 1980
Modified bases in viral genome	SP01, SP8, SP2G	5-Hydroxymethyluracil (for thymine)	Many type II systems	Hemphill and Whiteley, 1975
	φ25, φe, 2C PBS1, PBS2 T-even phages	Uracil (for thymine) Hydroxymethylcytosine (for cytosine)	<i>EcoB</i> (type I) <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> (type II)	Warren, 1980 Li et al., 1975 Revel and Georgopoulos, 1969 Takahashi et al., 1978
Metabolism of S-adenosyl-L-methionine (SAM)	P1	<i>darA</i> , <i>darB</i>	<i>EcoK</i> , <i>EcoB</i> (type I)	Krüger and Bickle, 1983
Underrepresentation of restriction sites in phage genome	φ1, φ29	No GGCC sites	<i>BsuRI</i> (type II)	Kawamura et al., 1981 Ito and Roberts, 1979

Mechanismy, kterými plazmidy a fágy unikají restrikci

1. Neobvyklé modifikace DNA

2. Nízká frekvence cílových míst

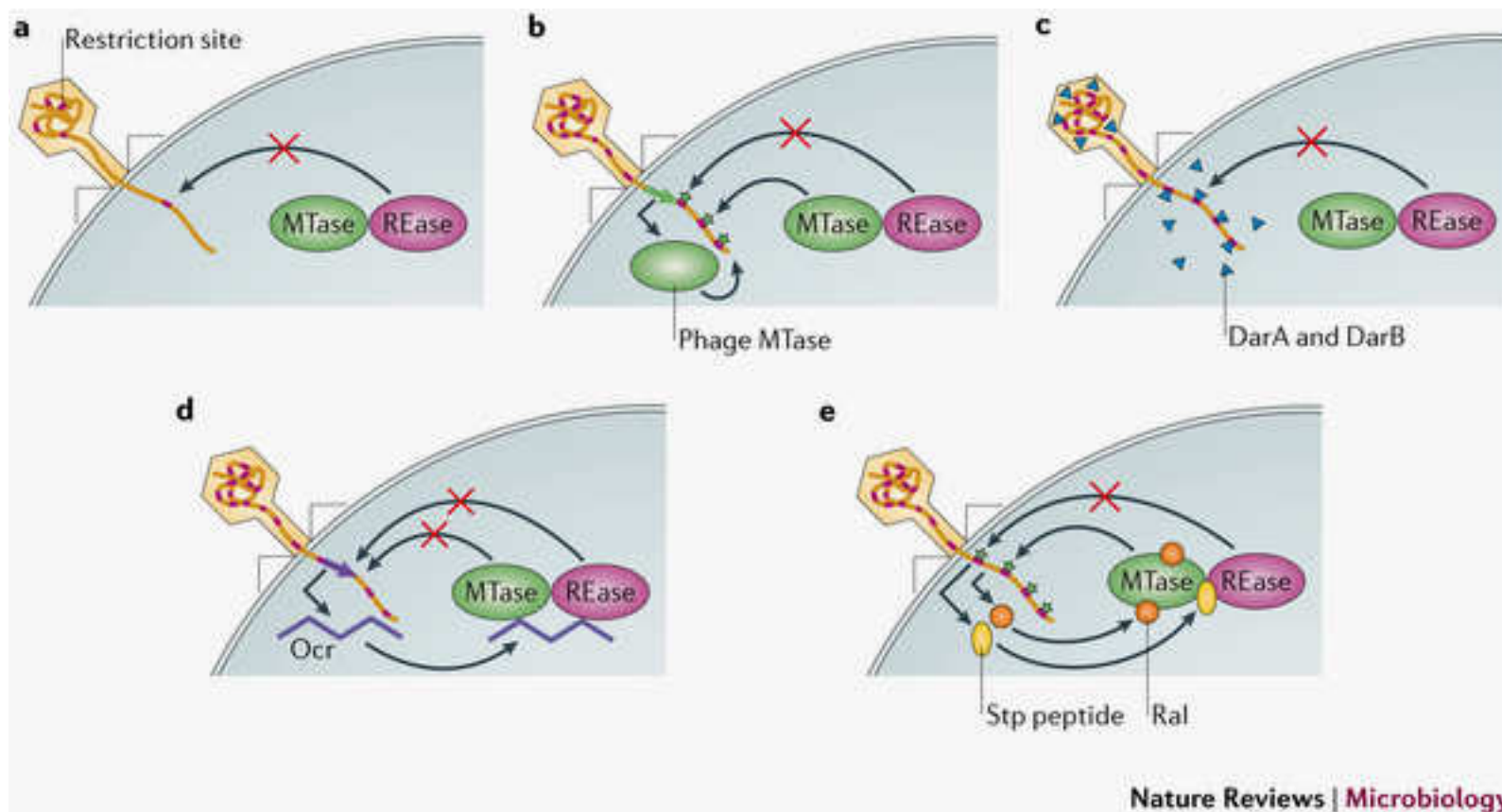
3. Tvorba proteinů, které interferují s jednou nebo více aktivitami RM systému

4. DNA vstupující do buňky ve formě ssDNA (konjugativní plazmidy nebo některé fágy), neuniká restrikci, ale stává se k nim citlivá po syntéze druhého vlákna.

Příklady antirestrikčních mechanismů

- **Fág MU – funkce MOM: konverze adeninu na A-(1-acetamido)adenin, který je necitlivý k EcoKI a EcoBI.**
- **Plazmidy: Ard (alleviation of restriction) - antirestrikční protein, zmírnění restrickce**
- **Fág lambda: Ral (restriction alleviation) - antirestrikční protein - zvýšení modifikační aktivity enzymů typu AI na NM DNA**
- **Fágy T3 a T7: (proteiny Ocr = overcoming restriction) inaktivace enzymů typu I (zábrana jejich vazby na DNA)**
- **Fág P1: Dar-proteiny (defense against restriction) ? - rozklad SAM**

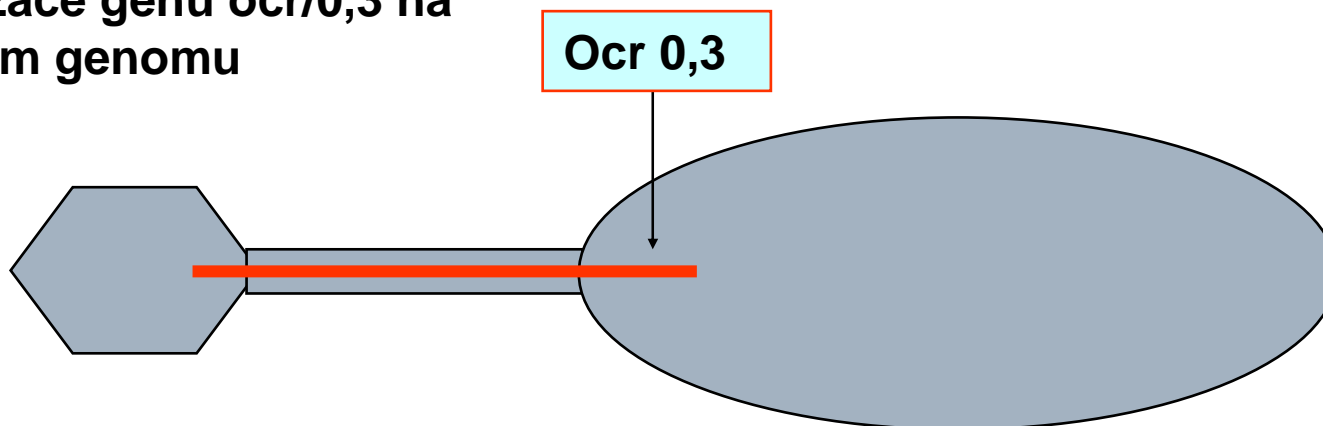
Pasivní a aktivní strategie fágů pro únik před působením RM systémů



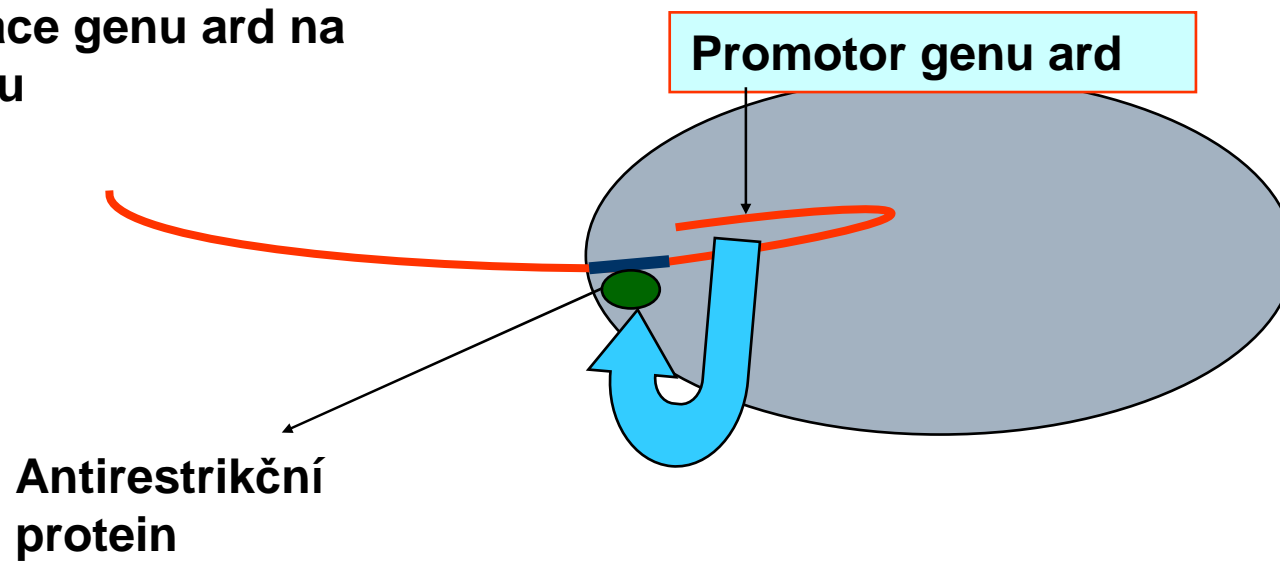
- a) Eliminace restrikčních míst nebo jejich velká vzdálenost od sebe
- b) Fág je modifikován metylázami hostitelské buňky, případně takové metylázy vytváří sám
- c) Fág při infekci koinjikuje do buňky proteiny, které se vážou na cílové rozpoznávací sekvence RE a tím je chrání (maskují).
- d) Fág vytváří protein, který imituje cílovou sekvenci, váže RE a tím ho inhibuje.
- e) Fágový protein navozuje aktivitu metylázy a tím urychluje obranu před RE. Peptid Stp fága T4 může inhibovat restrikci změnou struktury komplexu restriktáza-metyláza.

1. **"Loss" of restriction sites.** Some phage have many fewer recognition sites for certain restriction endonucleases than you would predict by random chance. For example, the phages T3 and T7 lack the 5-bp *EcoRII* recognition site CC(A or T)GG. This is thought to arise by selection for phage with mutations that prevent cleavage by restriction endonucleases commonly encountered in their hosts
2. **Modified bases.** Some phage have modified bases that prevent recognition by restriction endonucleases. For example, phages T2 and T4 have hydroxymethylcytosine instead of cytosine in their DNA.
3. **Self-methylation.** Some phage encode a methylase that can modify their DNA so that it is not cleaved by certain restriction endonucleases. For example, the *E. coli* phages T2, T4, and the *Myxococcus* phage Mx8 encode dAdenine methylases (*dam*). Certain plasmids also encode methylases that may provide protection against restriction endonucleases
4. **Activation of a host methylase.** Some phage encode a protein that stimulates the host's methylase to modify the phage DNA. For example, the Lambda Ral ("restriction alleviation") protein enhances methylation by the HsdM subunit of the *EcoK* and *EcoB* restriction systems]. Ral seems to act by stimulating the expression of the host *hsdS* and *hsdM* genes
5. **Degradation of host S-adenosylmethionine.** Some host restriction systems only recognize modified DNA (e.g. the McrA and McrB systems in *E. coli*). Phage T3 encodes a S-adenosylmethionine hydrolase activity that degrades the substrate required for methylation by host enzymes, thus avoiding modification of the phage DNA and subsequent cleavage by modification-dependent host endonucleases
6. **Inhibition of host restriction endonucleases.** Many conjugal plasmids produce antirestriction proteins (called Ard) that specifically inhibit Type I restriction endonucleases. The Ard proteins have a motif that is very similar to a motif found in the HsdS subunit, thus it is possible that the Ard proteins prevent proper assembly of the restriction endonuclease complex by binding to the other Hsd subunits. Phage T3 produces a protein called Ocr which inhibits host methylases, resulting in resistance to modification-dependent restriction systems
7. **DNA repair systems.** Activity of certain phage genes may allow repair of the double-stranded breaks produced by restriction endonucleases. For example, the lambda Gam and Red proteins may repair the cleaved DNA by recombination with another copy of the phage DNA

Lokalizace genu ocr/0,3 na fágovém genomu

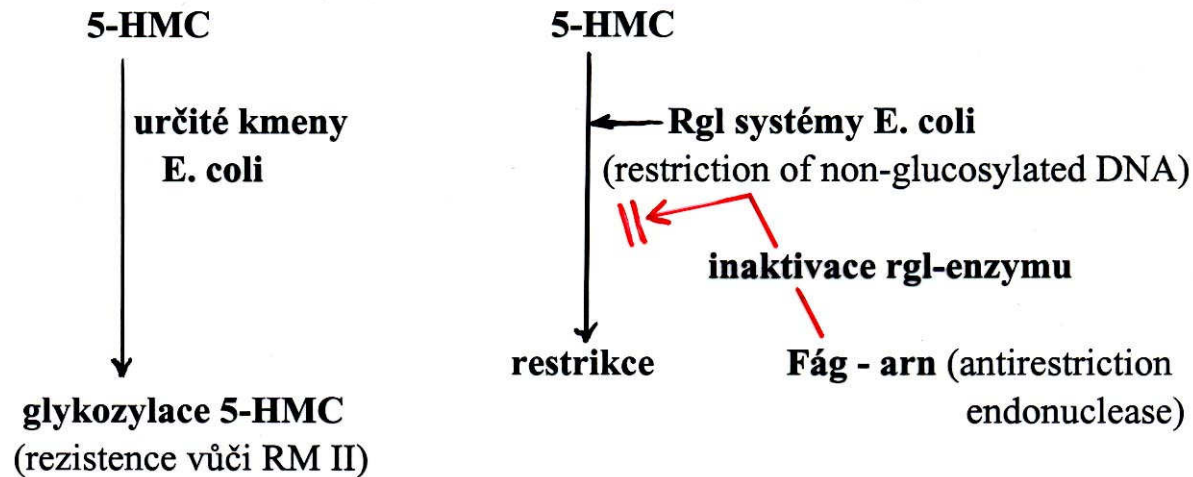


Lokalizace genu ard na plazmidu



Antirestrikční mechanismy T-sudých fágů

Fágová DNA



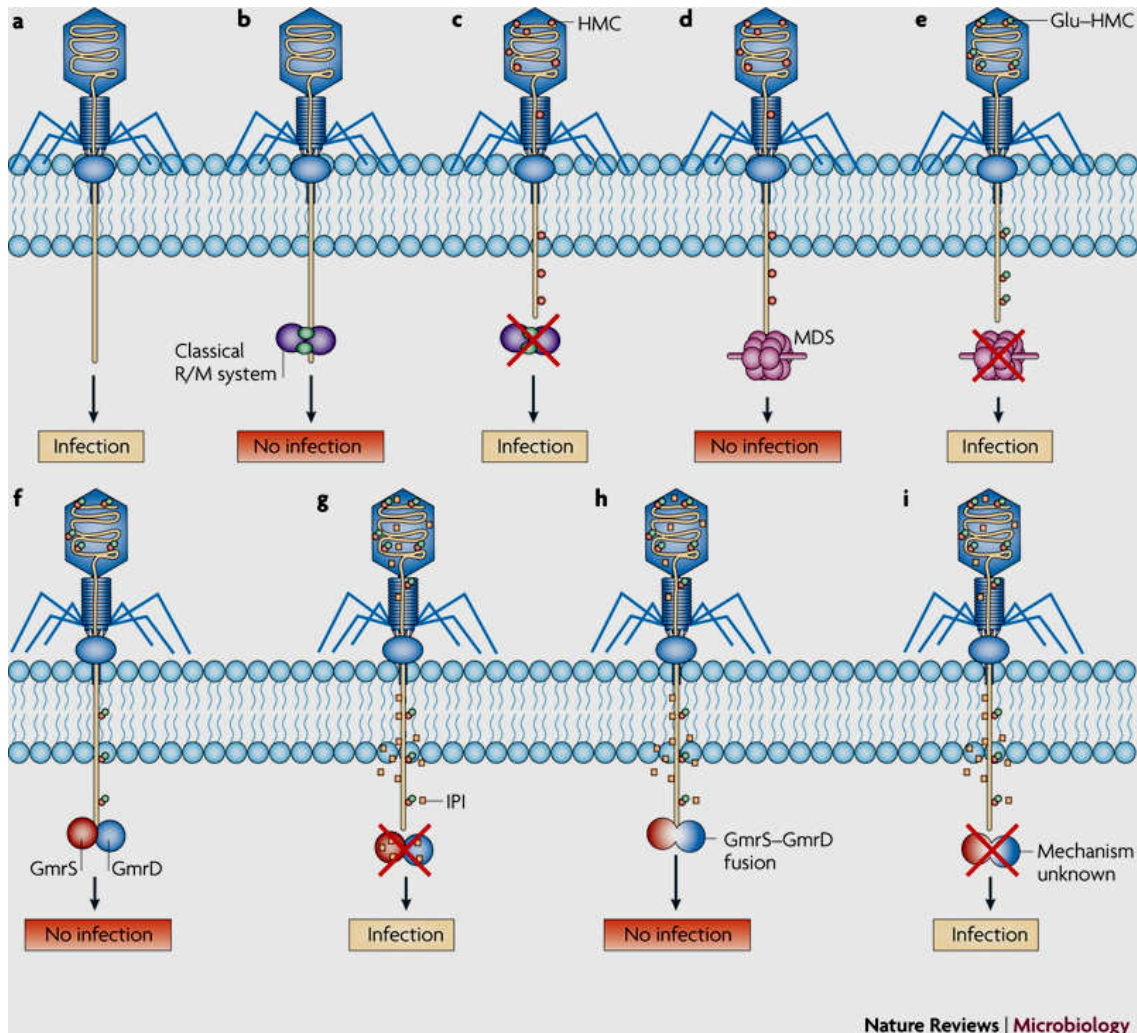
Reakce fága na restrikci

1. T4 → HMC
2. E. coli → rgl
3. T4 → arn
4. T4 → glukozylace HMC

Glukozylace HMC zbytků DNA T-sudých fágů je účinnou ochranou před většinou RE – a navíc slouží k identifikaci fágové DNA, takže enzymy kódované fágy mohou selektivně degradovat hostitelský chromozom

Strategie fága T4 pro překonání RM systémů a reakce E. coli

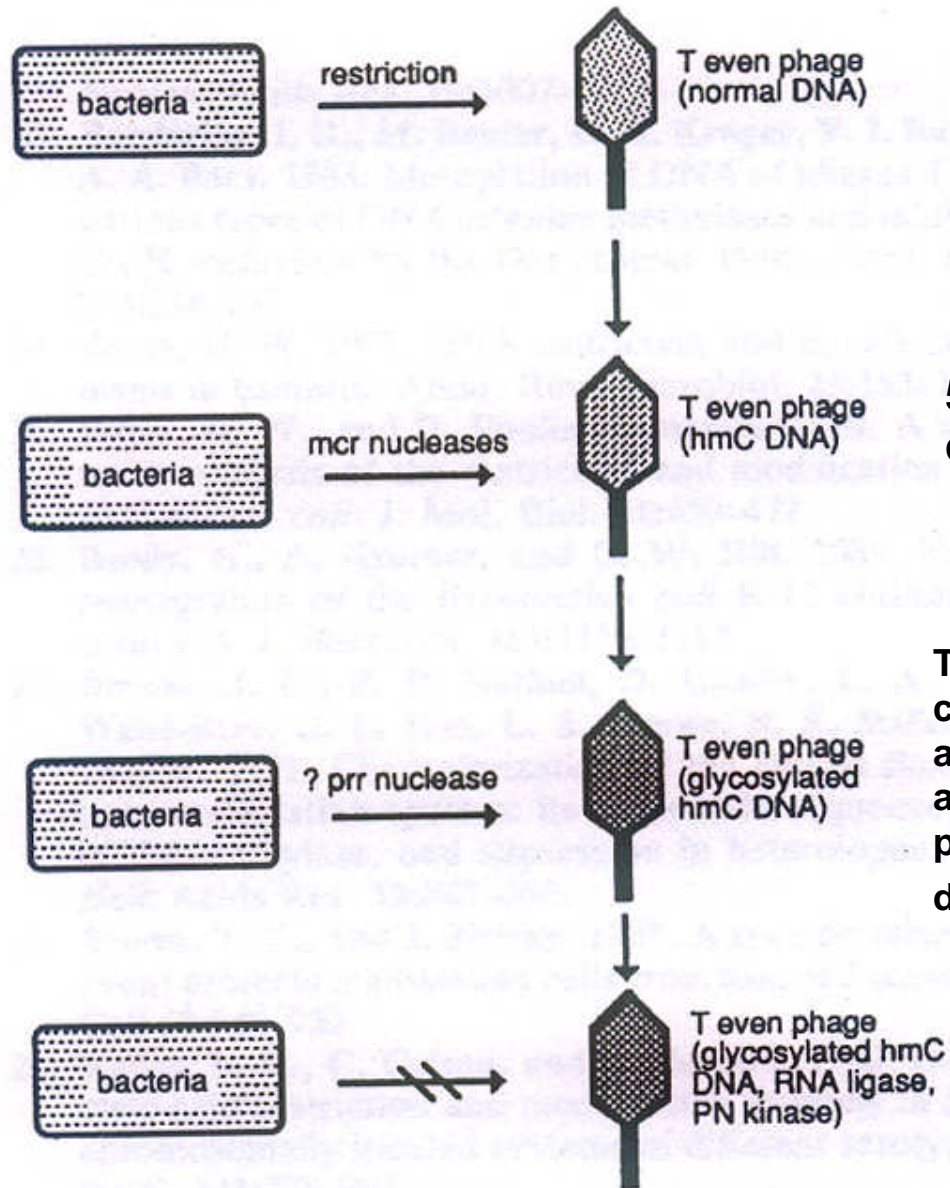
Evoluce interakcí mezi T-sudými fágy a hostiteli



- Fág infikující normálního hostitele
- Fág infikuje E. coli s RM systémem, RE štěpí
- Genom fága obsahuje HMC, RE neštěpí
- Některé kmeny E. coli mají RM systém štěpící DNA s HMC
- Fág glykozyluje HMC (na glu-HMC) a jeho DNA není štěpena MDS (modif.depend. syst.)
- Některé kmeny E. coli mají RM systém (Gmr) štěpící glu-HMC, ne však neglukozylovanou
- Některé fágy (like-T4) mají gen kódující IPI, který ruší působení Gmr
- Některé kmeny E. coli mají modifikovaný Gmr (fúze GmrS-GmrD), který ruší působení IPI
- Některé mutanty fága T4 překonávají GmrS-GmrD a úspěšně infikují E. coli

- a Phage T4 infecting a phage-sensitive host.
- b Phage T4 infecting a phage-resistant *E. coli* cell containing a R–M system. The phage genome is cut at specific sites by the restriction enzyme.
- c. The genome of phage T4 contains hydroxymethylcytosine (HMC) and can also be methylated, thereby avoiding specific endonucleases.
- d Some bacteria have acquired modification-dependent systems that can exclusively cleave HMC-containing DNA, thus preventing infection by HMC-containing phages.
- e Phage T4 acquired a resistance to MDSs through the glucosylation of HMC residues (glu–HMC).
- f A few *E. coli* strains have acquired a glucose-modified restriction (Gmr) system that targets and cleaves glu–HMC-modified phage T4 genomes, thereby blocking phage infection. This system is composed of two subunits (GmrS and GmrD) that specifically cut glu–HMC DNA but have no effect on unglucosylated DNA.
- g Some T4-like phages have a gene encoding internal protein I (IPI), a protein that hinders the Gmr system and allows these phages to successfully infect *E. coli* strains containing this system.
- h Some *E. coli* strains harbour a modified Gmr system in which a translational fusion of GmrS and GmrD is produced, rendering IPI ineffective.
- i Finally, phage T4 mutants can bypass the GmrS–GmrD fusion by a unknown mechanism, leading to a successful infection.

Evoluce interakcí mezi T-sudými fágy a hostiteli



**5-hydroxymethyl-
cytosin**

The ppr locus was originally described as coding a ribonuclease that is activated after phage T4 infection to cut within the anticodon of a specific tRNA, inactivating protein synthesis and thus blocking phage development.

glykozylace hmC

SYSTÉMY METYLACE DNA (E. COLI K12)

- V buňkách není přítomna RE rozpoznávající metylovanou sekvenci – nejedná se tudíž o standardní RM systém

- **1. Systém Dam (dam-metyláza)**
 - metylace A v GATC (donor met = SAM)
 - GATC - regulační funkce: **počátek replikace, promotory, reparace, transpozice**
- **sekvence GATC je rozpoznávána 15% RE typu II, je přítomna u 50% všech 4N-RM-systémů, není však cílovou sekvencí pro restriktázy v žádném z druhů enterobaktérií.**

- **2. DNA cytozin metylační - Dcm (E. coli K12)**
 - metylace cytozinu na C5 v sekvenci CC(A/T)GG (?funkce při reparaci na velmi krátké vzdálenosti)

VÝSKYT RM SYSTÉMU U ENTEROBAKTERIÍ (3 DRUHY)

- 30% kmenů (z 1000 studovaných) obsahuje RM systém**
- u 170 RM systémů bylo zjištěno jen 33 různých cílových sekvencí**
- nebyly zjištěny RM systémy rozpoznávající 4 bp-místa (včetně GATC) – účast na regulacích**

VÝZNAM RESTRIKCE

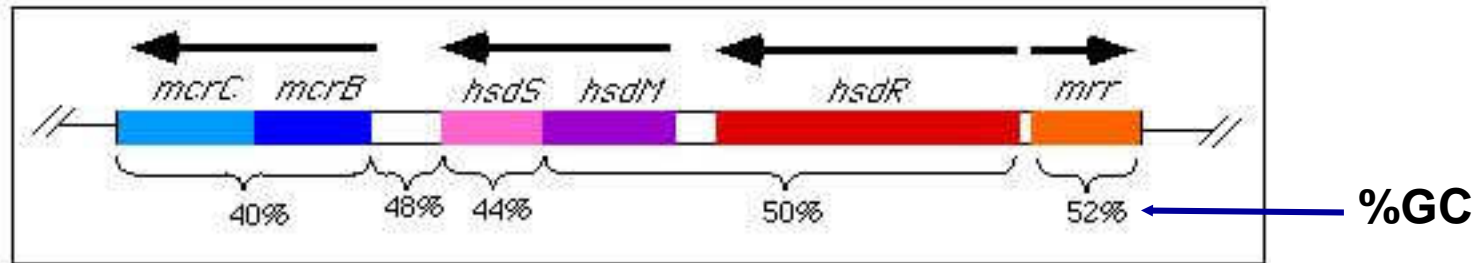
- **Ochrana integrity vlastní DNA**
 - obrana před bakteriofágy (typ II)
...dočasné působení –epigenetické změny, na úrovni populace nutná obměna
- **Systém napomáhající rekombinaci cizorodé DNA (typ I)**
 - štěpení DNA (náhodně) mimo rozpoznávací sekvenci umožní rekombinaci mnoha genů - analýza přenosu genů transdukcí a konjugací podporuje vliv RM systémů při vzniku mozaikových genomů (*E. coli*)
- **? „Selfish DNA“**
 - molekulární paraziti bakterií. RM systémy typu II se udržují prostřednictvím plazmidů, které je kódují (usmrcení bezplazmidových buněk)

RM systémy jako mechanismus postsegregačního zabíjení

Locus (plasmid)	Bacteria	Killer	Target	Anti-killer
<i>B. Restriction-modification systems</i>		restriktáza		metyláza
<i>paeR7I</i> (pMG7)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PaeR7I	5' CTCGAG in the chromosome	M.PaeR7I
<i>ecoRI</i> (RTF-1)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5' GAATTC in the chromosome	M.EcoRI
<i>ecoRII</i> (Fig. 6; RTF-2; N-3)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRII	5' CCWGG in the chromosome	M.EcoRII
<i>ecoRV</i> (pLG13)	<i>Escherichia coli</i>	EcoRV	5' GATATC in the chromosome	M.EcoRV
<i>ssoII</i> (Fig. 6; P4)	<i>Shigella sonnei</i>	SsoII	5' CCNGG in the chromosome	M.SsoII
<i>bsp6I</i> (pXH13)	<i>Bacillus</i> sp. strain RFL6	Bsp6I	5' GCNGC in the chromosome	M.Bsp6I

Odlišný obsah GC – indicie přenosu HGT

Oblast " immigration control region „ u *E. coli* – 14 kbp
 ("immigration island,, - značné rozdíly u různých kmenů



<u>R-M genes</u>	<u>Recognition sequence</u>
<i>hsdS_K hsdM_K hsdR_K</i>	AACNNNNNNGTGC
<i>hsdS_B hsdM_K hsdR_B</i>	TGANNNNNNNNGTGC
<i>hsdS_K hsdM_B hsdR_B</i>	AACNNNNNNGTGC

Gen *hsdS* může být nahrazen genem *hsdS* z jiného RM systému stejné třídy, nebo geny mohou vzájemně rekombinovat

VYUŽITÍ RM SYSTÉMŮ V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH

Transgenní linie myších buněk exprimující geny RM systémů

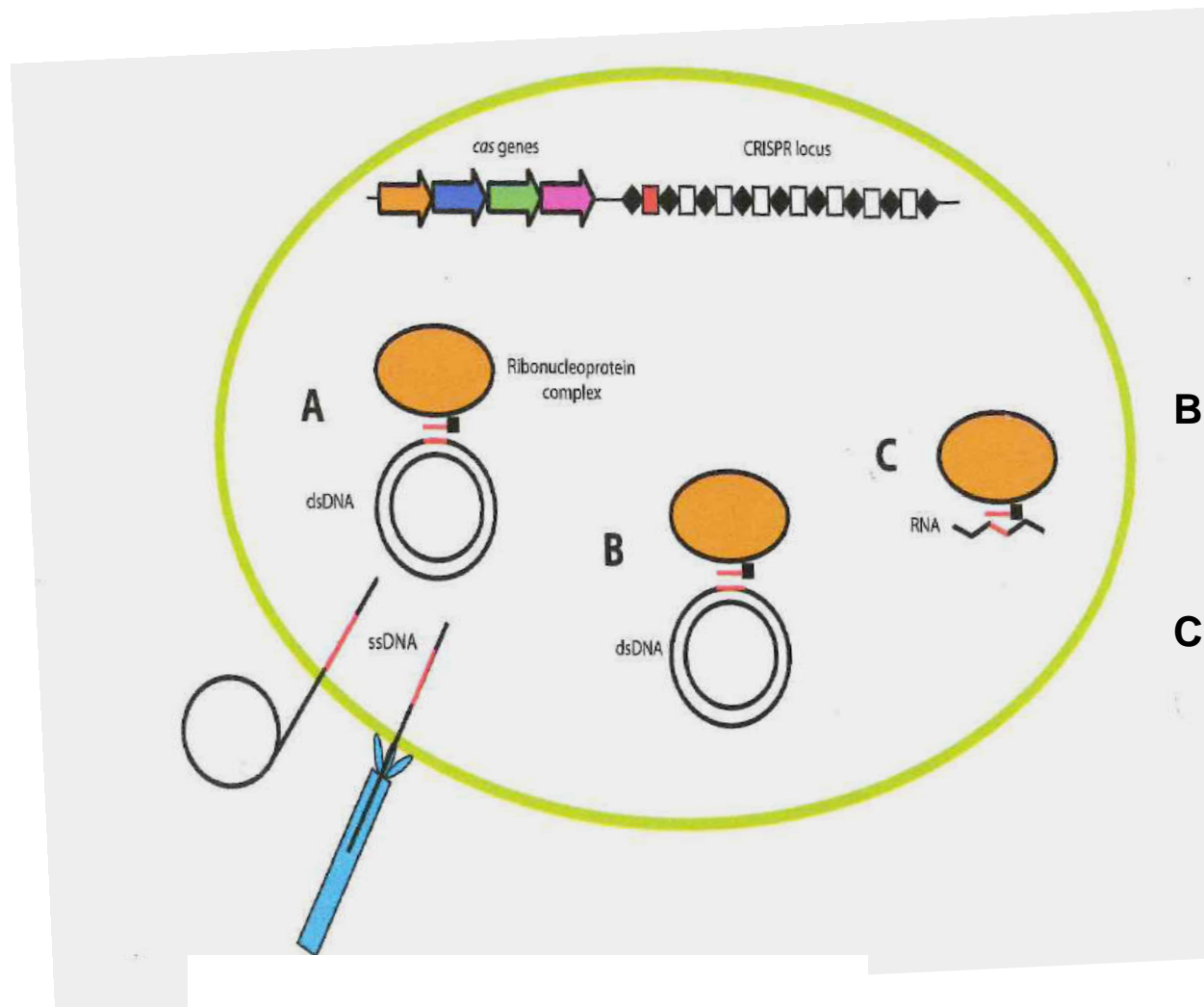
1. přenos a exprese genu M.PaeR7 (*Pseudomonas aeruginosa*) - **metyláza** CTCGmeAG
2. přenos a exprese genu R.PaeR7 - endonukleáza (**restriktáza**)
3. infekce buněk HSV1 adenoviry - očekávaná rezistence buněk - vytvoření organismu rezistentního k virům (nebo jen určitých tkání)

Další možnost: studium vlivu metylace na genovou expresi

CRISPR-Cas – systémy adaptivní odpovědi

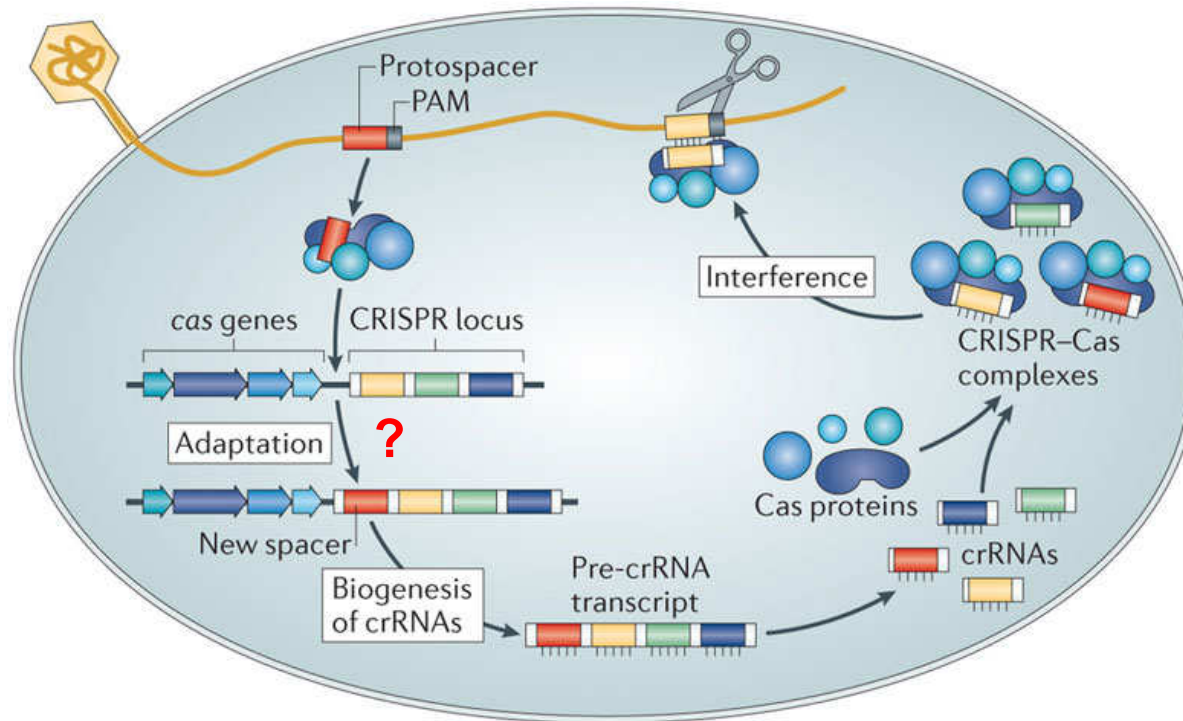
- Objev krátkých uspořádaných repeticí přerušovaných nerepetitivními krátkými sekvencemi (mezerníky) v r. 1987 u *E. coli* (Ishino et al.)
- Genetická struktura těchto lokusů včetně genů Cas popsána v r. 2002
- V r. 2005 popsána podobnost mezi sekvencemi mezerníků v CRISPR-ech a sekvencemi mobilních 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

Pravděpodobné působení systémů CRISPR-Cas na vstupující plazmidy



- A. Plazmid vstupující mechanismem přirozené transformace, konjugace nebo transdukce jako ssDNA. Po vytvoření dsDNA je tato štěpena, pokud obsahuje protospacer komplementární k crRNA.
- B. Plazmid vstupující ve formě dsDNA při umělé transformaci je přímo štěpen.
- C. Systémy CRISPR-Cas typu III štěpí molekuly RNA. Po transkripci genů na plazmidech jsou vytvořené RNA štěpeny a po několika generacích se plazmid z buňek ztrácí.

Působení CRISPR-Cas (3 hlavní typy, několik podtypů)

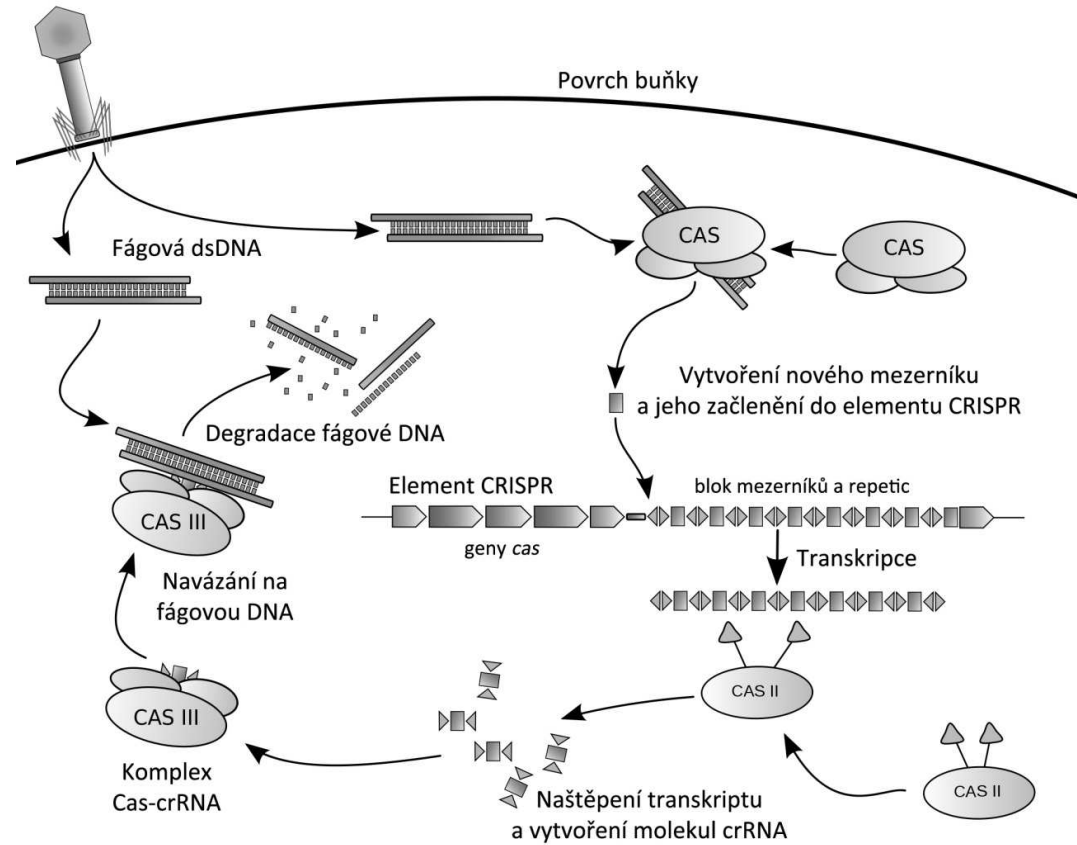


Nature Reviews | **Microbiology**

- Typ II: Lokusy CRISPR a proteiny Cas zasahují a sekvenčně-specificky štěpí vstupující DNA (fág, plazmid). Proces probíhá ve třech krocích:**
- **Adaptace (imunizace): získání (začlenění) spacerů (mezerníků)**
 - **Biogeneze CRISPR RNA (crRNA), přepisované z oblasti, kde se nachází sestava opakujících se CRISPRů**
 - **Interference: štěpení vstupující DNA**

Fungování systému CRISPR-Cas

CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats



Mechanismus působení systému CRISPR-Cas

Přímá opakování lokusu CRISPR jsou oddělena krátkými úseky nerepetitivní DNA nazývanými spacers, které jsou získávány ze vstupující DNA (plazmid nebo fág) procesem zvaným adaptace. Během tohoto kroku je tato sekvence také duplikována. Lokus CRISPR je transkribován jako dlouhá primární pre-crRNA, která je upravena za tvorby sady krátkých crRNA (proces nazývaná biogeneze crRNA). Každá crRNA obsahuje segment opakující se sekvence a celý spacer, a ve spojení s proteiny Cas vytváří komplexy CRISPR-Cas. Tyto komplexy působí jako hlídka při sledování vstupu fága nebo plazmidu, který obsahuje DNA komplementární k crRNA, a současně zajišťují imunitu proti těmto elementům. V případě rozpoznání fága nebo plazmidu nesoucího takovou komplementární cílovou sekvenci DNA tuto sekvenci specificky štěpí (proces označovaný jako interference).

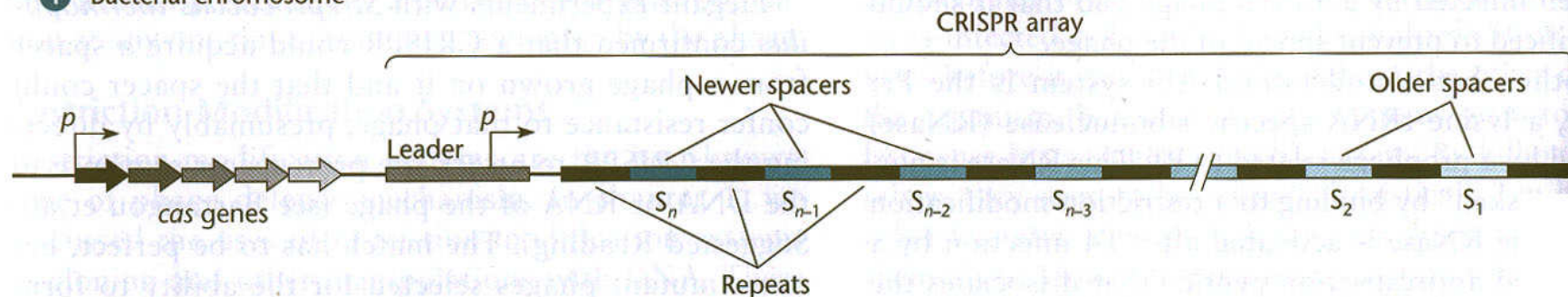
Nukleotidová sekvence spaceru musí být identická se sekvencí fágového genomu nebo plazmidu (tyto sekvence se označují jako protospacers), aby došlo k zablokování replikace těchto elementů.

U systémů CRISPR-Cas typu I a II je pro začlenění spaceru a interferenci vyžadována sekvence s konzervativním motivem sousedící s protospacerem označovaná jako „protospacer-adjacent motif – PAM“).

Obrana buněk proti cizorodé DNA prostřednictvím systému CRISPR-Cas

A CRISPR-associated elements

1 Bacterial chromosome



CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

CRISPR array: one to hundreds of repeats

Repeat: 21–47 bp (CAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG)

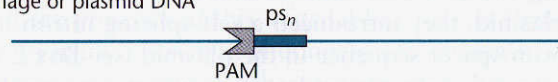
Spacer sample: ~30 bp (CTTTCGACAGCGCGGCGATACGCTCACGCA)_n

Leader: Several hundred noncoding base pairs

cas genes (*cascade*): *cas* complex for CRISPR-associated antivirus defense; acquisition of new spacers; immunity, e.g., processing pre-crRNAs

Typické uspořádání CRISPR. Série opakujících se sekvencí přerušovaných zhruba stejně velkými mezerami s_n až s_1 s odlišnými sekvencemi. Vedoucí sekvence (leader) obsahuje promotor (p), z něhož je CRISPR transkribován. Geny *cas* přidružené k CRISPR kódují produkty, které zprostředkují přijetí sekvencí (fága) a cíleně rozpoznávají sekvence prekursoru mezeru (protospaceru). Mezerníky (spacery) nejbliž vedoucí sekvence jsou ty, které byly přijaty jako poslední.

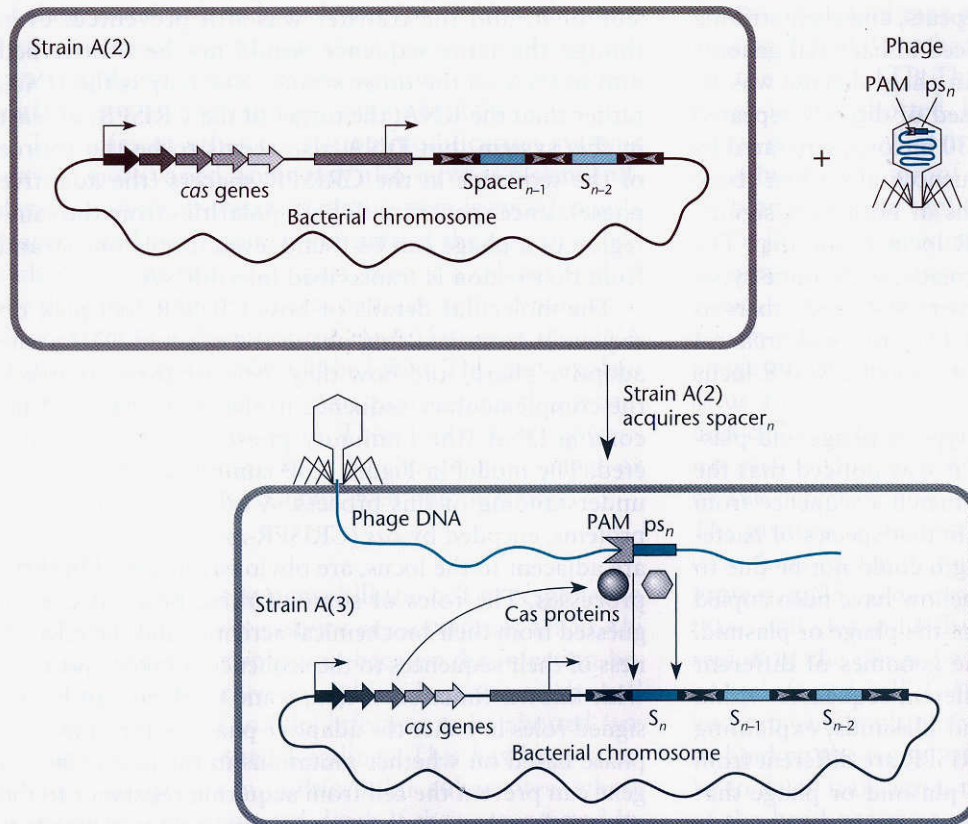
② Phage or plasmid DNA



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

ps_n : proto spacer (CTTTGCGAGACGCGCGGCGATACGCTCACGCA)_n

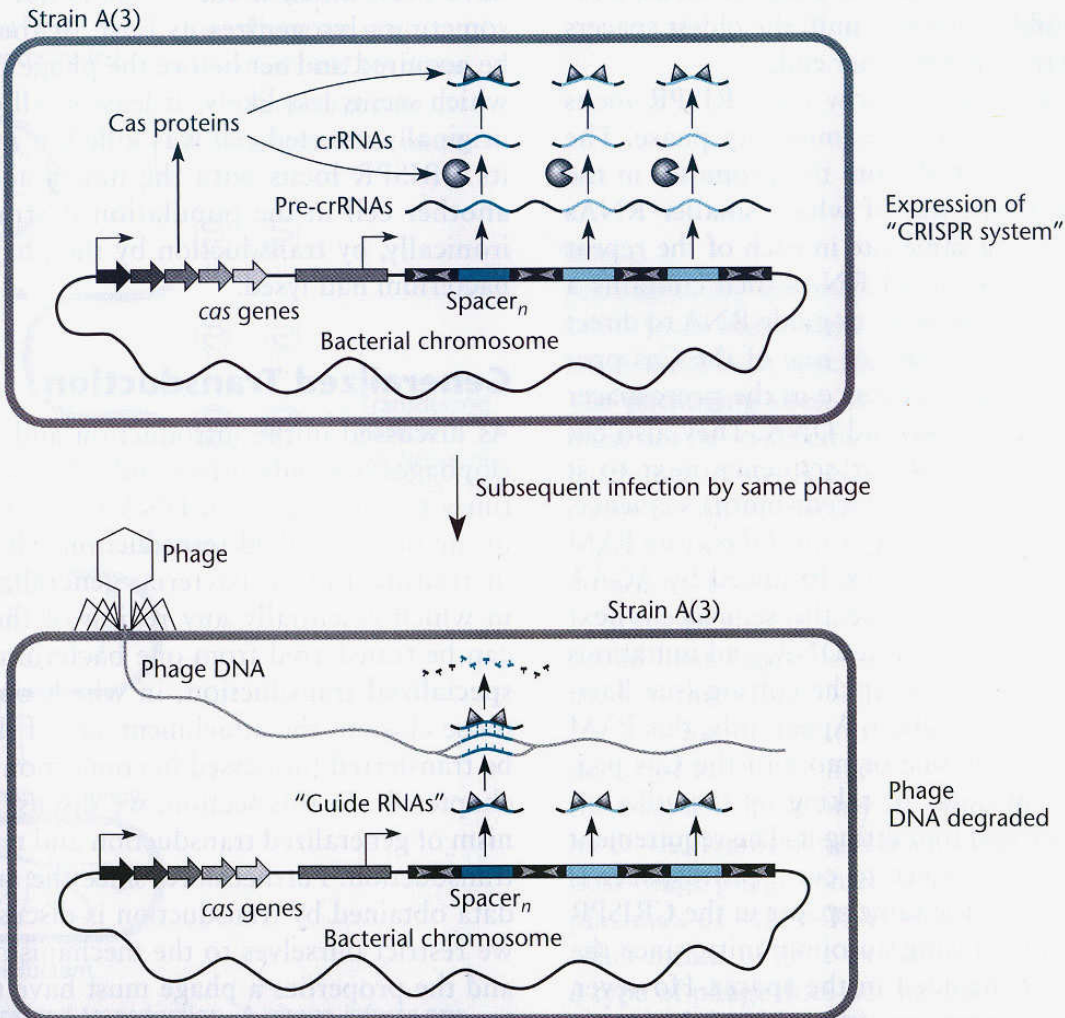
B Construction of CRISPR array: adaptive phase



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. Adaptivní fáze – vyčlenění sekvence prekurzoru mezerníku (protospaceru)
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

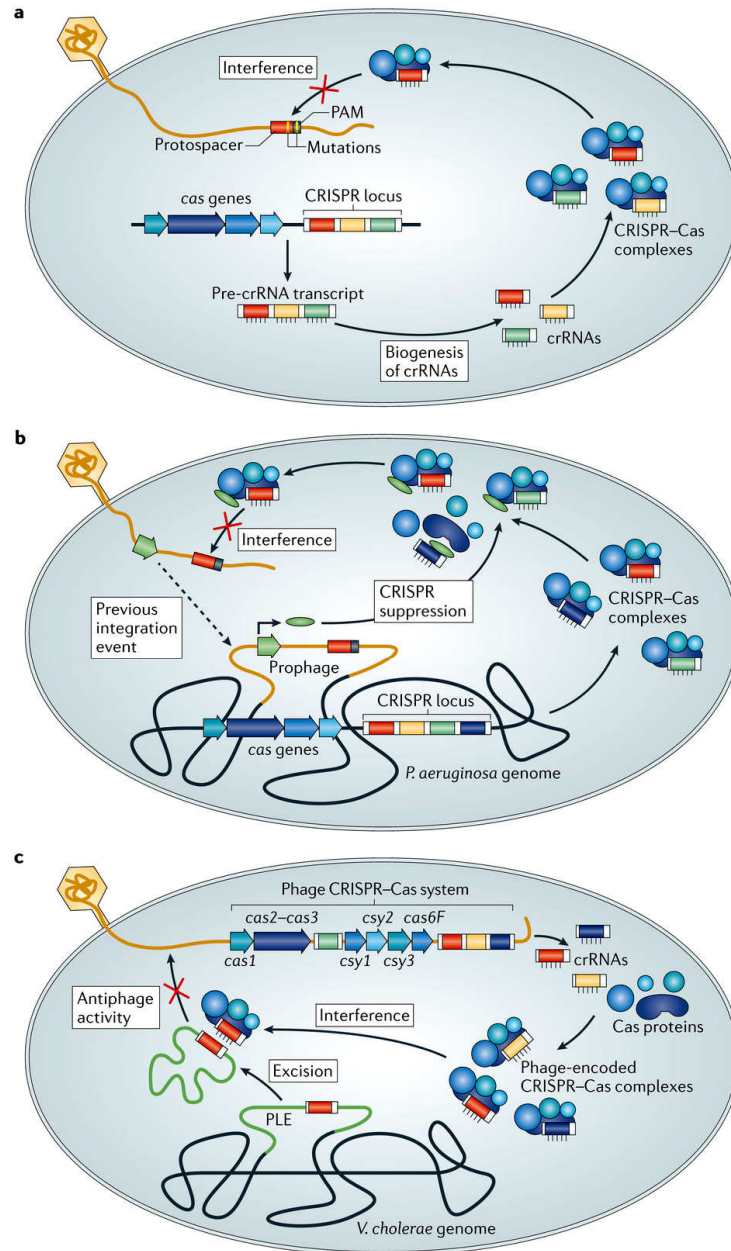


Imunitní fáze: Zacilení vstupující protospacerové sekvenční prekurzoru mezerníku na fágové DNA.

Sestava CRISPRů je přepsána do jedné dlouhé molekuly RNA, která je štěpena v repetitivních sekvencích za vzniku molekul „guide“ CRISPR RNA, 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.

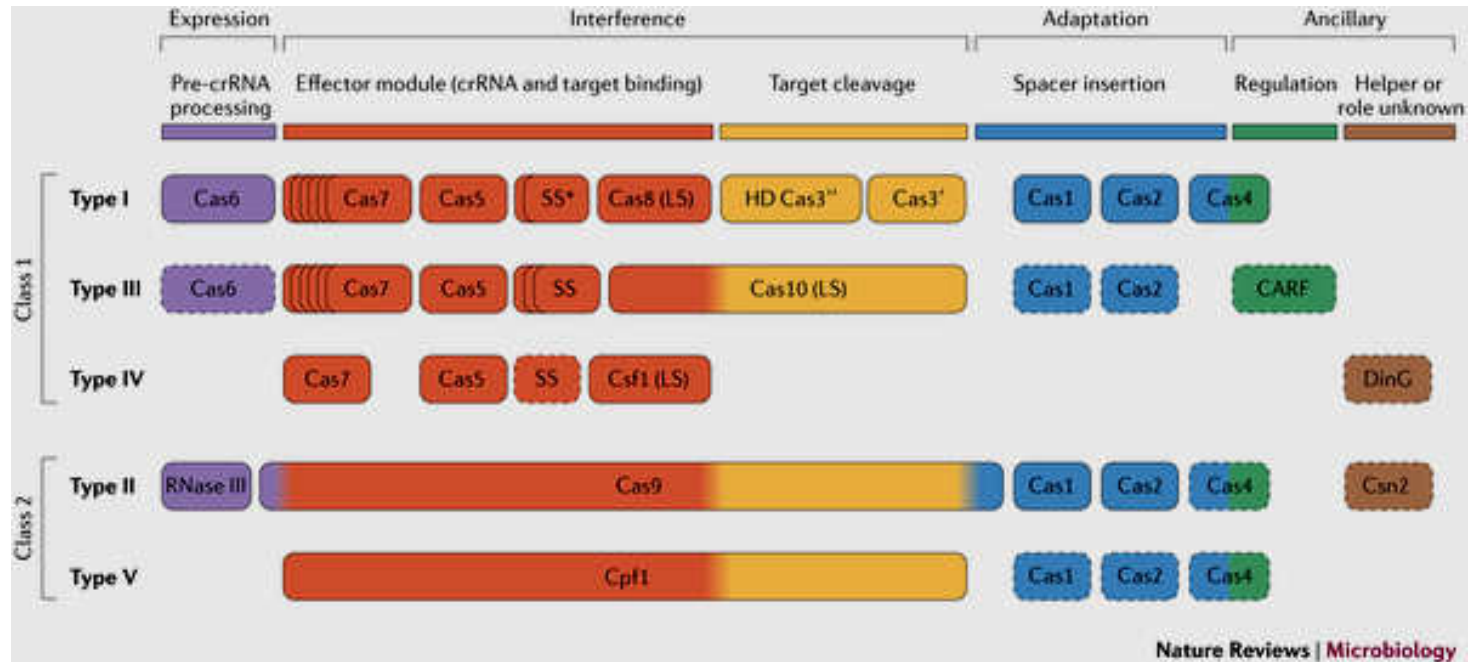
Šíření CRISPR – transformace, transdukce

Strategie fágů k překonání systémů CRISPR-Cas

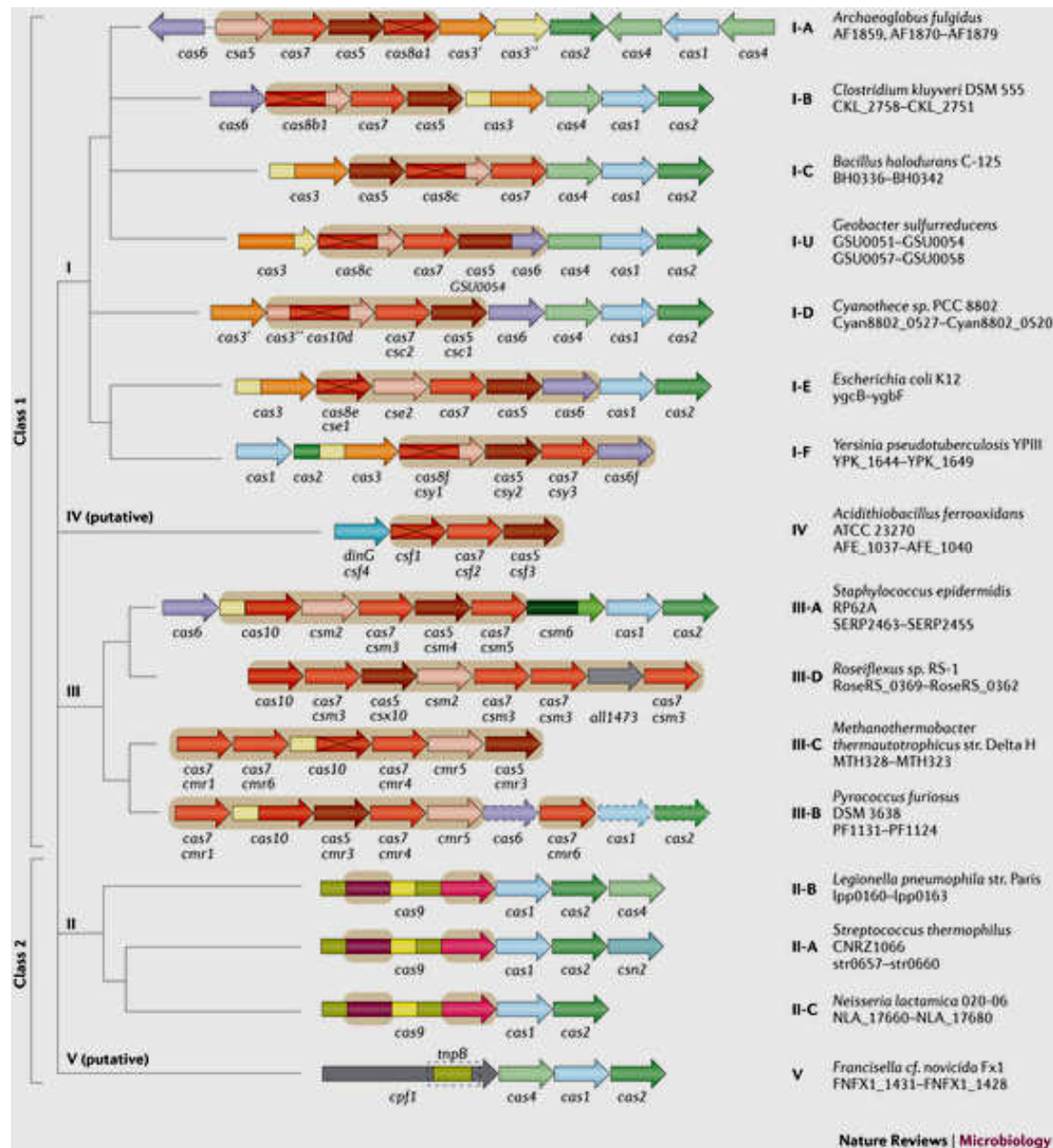


- Mutace ve fágových protospacerech nebo v sekvencích PAM navozují rezistenci k interferenci, neboť není splněn požadavek na komplementaritu mezi crRNA a cílovou DNA.
- systém u lyzogenů *Pseudomonas aeruginosa*. Fágem kódovaný anti-CRISPR protein blokuje interferenci zabráněním vytvoření nebo působením 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.
- 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.

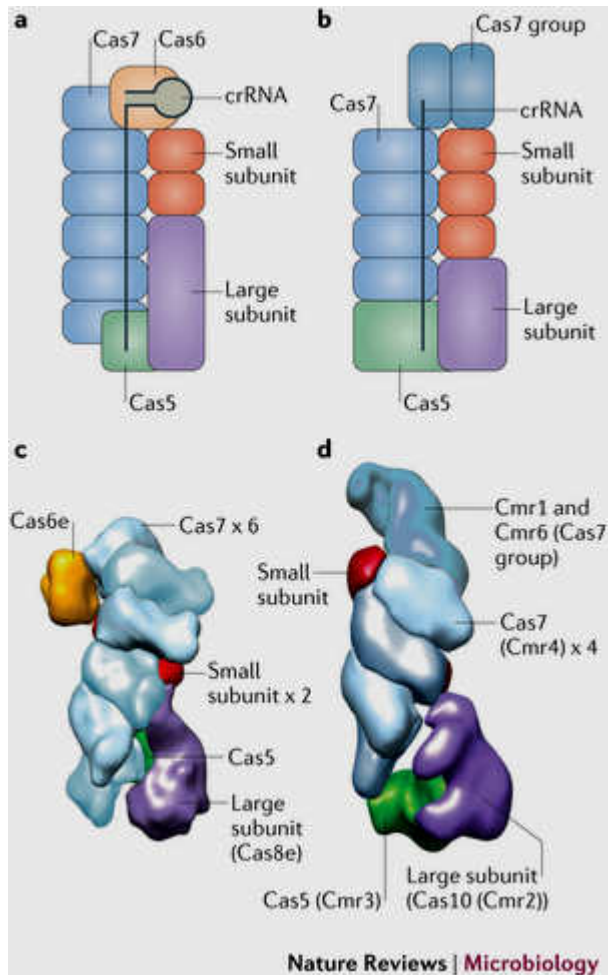
Klasifikace Cas proteinů podle jejich funkce



Uspořádání genomických lokusů u jednotlivých subtypů systémů CRISPR-Cas



Struktura multiproteinových crRNA-efektorových komplexů



Funkční aktivity komplexů:

- rozpoznání cílové sekvence na DNA
- helikáza: rozmotání dsDNA a duplexů RNA-DNA
- Endonukleáza štěpící cílovou DNA

