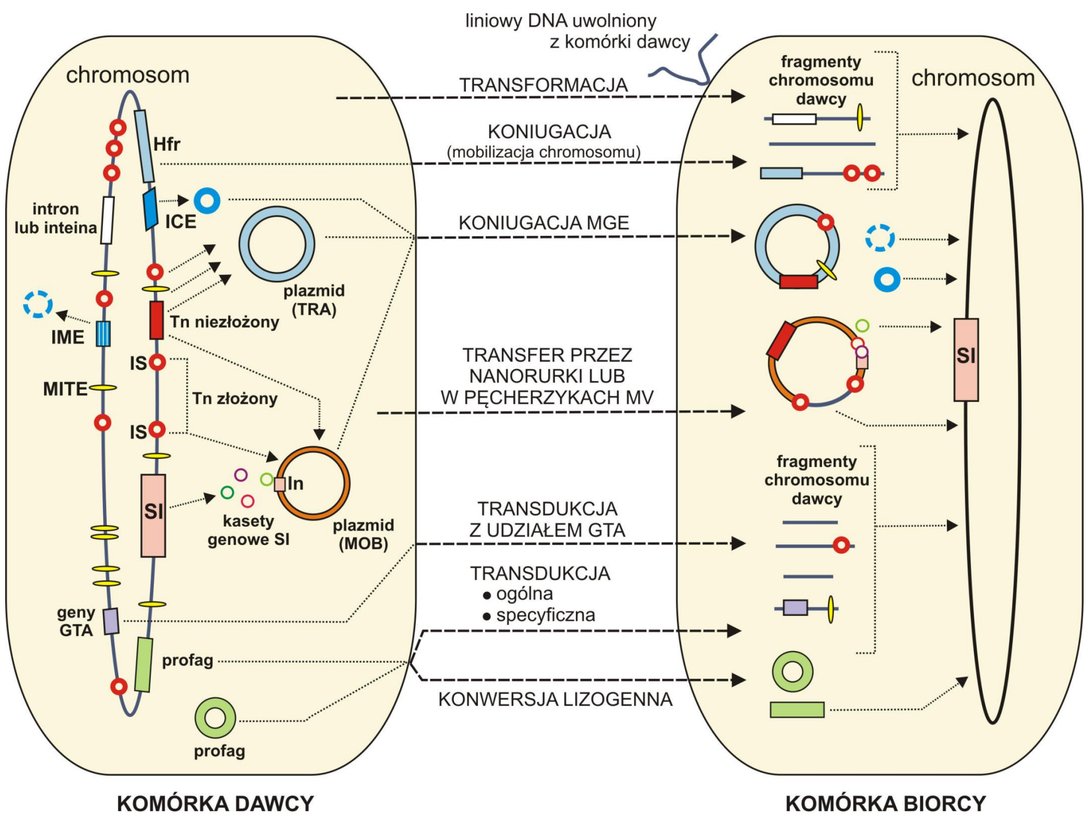
W poszukiwaniu ewolucyjnych początków systemów CRISPR-Cas

Paulina Smaruj
Zakład Genetyki Bakterii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Dariusz Bartosik

Ruchome elementy genetyczne

Ruchome elementy genetyczne (MGEs, *mobile genetic elements*) to mobilne segmenty DNA. Transfer danego elementu może zachodzić między genomami różnych mikroorganizmów (mobilność międzykomórkowa) bądź w obrębie genomu jednej komórki (mobilność wewnątrzkomórkowa). Niektóre MGE łączą obie strategie transferu, co zapewnia im rozpowszechnienie w genomach jak największej liczby gospodarzy [1].



Ryc.1. Ruchome elementy genetyczne oraz mechanizmy horyzontalnego transferu genów (HGT).
Hfr–plazmid koniugacyjny zintegrowany z genomem, ICE–koniugacyjny element integrujący, IME–mobilizowalny element integracyjny z DNA, In–integron, MV-pcherzyk bonowy, IS-sekwencja insercyjna, MITE–nieautonomiczny element transpozycyjny, MOB–plazmid mobilizowalny, SI–superintegron, Tn–transpozon, TRA–plazmid koniugacyjny. Rycina z [2], za zgodą prof. dr hab. Dariusza Bartosika.

CRISPR-Cas – obrona przed egzogennym DNA

„Pamięć genetyczna" jest zjawiskiem powszechnym u bakterii i archeonów. Jest ona determinowana przez systemy genetyczne składające się z: (i) krótkich zgrupowanych sekwencji powtórzonych o strukturze palindromu – CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repreats*) oraz (ii) powiązanych z nimi białek Cas (*CRISPR-associated proteins*). Funkcja obronna systemów CRISPR-Cas polega na zależnej od sekwencji degradacji obcego kwasu nukleinowego. Specyficzność działania odpowiedzi obronnej zapewniają unikatowe sekwencje rozdzielające DNA (znajdujące się między powtórzeniami sekwencji w *loci* CRISPR), które pochodzą od wirusów lub plazmidów [3].

Jak odkryto kaspozony?

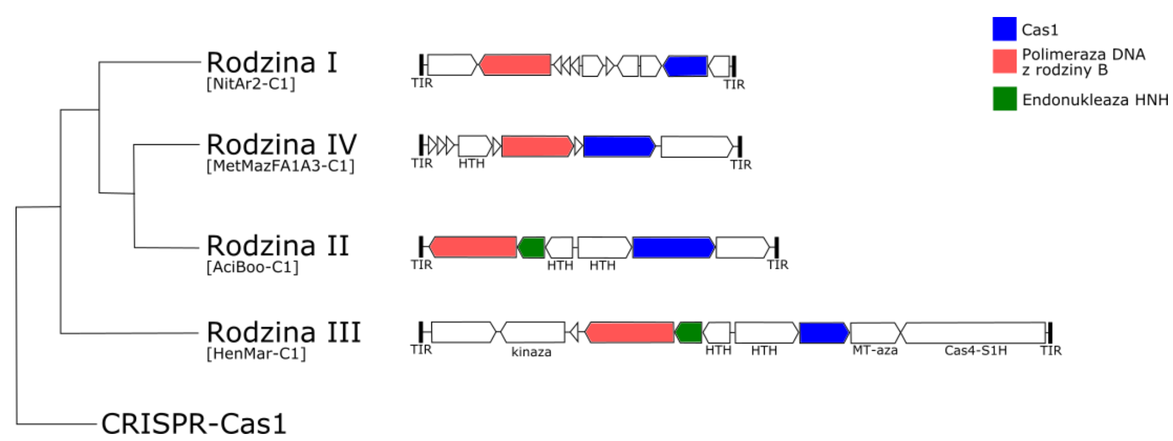
1	**Identyfikacja genów *cas* niepowiązanych z *loci* CRISPR (Cas1-solo)**[4] Grupa I – u przedstawicieli *Methanomicrobiales* Grupa II – u *Methanomicrobia*, kilku przedstawicieli *Thaumarchaeota* oraz u *Aciduliprofundum boonei*
2	**Identyfikacja genów Cas1-solo grupy II występujących w bliskim sąsiedztwie genów polimerazy DNA z rodziny B (PolB).** A także genów nukleazy HNH i białek zawierających dwie domeny HTH (*helix–turn–helix*) [4].
3	**Określenie współwystępowania genów *cas1* i *polB* w genomach prokariotycznych.** Identyfikacja 19 wysp genomowych (od ~8 kb do ~20 kb)[5] spełniających założone kryteria.
4	**Wyspy *cas1-polB* – zintegrowane ruchome elementy genetyczne** [6]. Na końcach prawie wszystkich wysp *cas1-polB* zidentyfikowano odwrócone sekwencje powtórzone (TIR), a obok nich krótsze sekwencje, prawdopodobnie stanowiące powieloną sekwencję docelową integracji. Jednoczenie żadna z wysp nie zawierała konserwowanych genów transpozaz ani integraz.
5	**Cas1-solo – kaspozaza.** Jedyny gen występujący we wszystkich zidentyfikowanych elementach koduje enzym Cas1. Krupovic [6] uznała analizowane wyspy za nowe, przypominające transpozony ruchome elementy genetyczne. Nazwała je kaspozonami (*casposons*), a białka Cas1, warunkujące mobilność, kaspozazami.

Klasyfikacja kaspozonów

Na podstawie wyników analiz filogenetycznych, analiz z zakresu genomiki porównawczej oraz dystrybucji kaspozonów, wyróżniono 4 rodziny tych elementów[5].

Rodzina	I	II	III	IV
Domena	*Archaea*		*Bacteria*	*Archaea*
Typ	*Thaumarchaeota*	*Euryarcheota*	wiele	*Euryarcheota*
Cechy charakterystyczne	najbardziej kompaktowa struktura genetyczną [6]; polimeraza typu B nie jest blisko spokrewniona z polimerazami kodowanymi w pozostałych trzech rodzinach kazopozonów [5]	występuje translacyjna fuzja C-końca kaspozazy (białko Cas1) z białkiem zawierającym domenę HTH, co nie jest spotykane w innych kaspozonach [6]	struktura genetyczna jest względnie zróżnicowana i niejednorodna; występują liczne dodatkowe geny, np. metylotransfe-razy, endonukleazy HNH [6]	ich występowanie jest ograniczone do jednego gatunku euryarcheonu - *Methanosarcina mazei*, grupa opisana w 2016 roku, wszystkie elementy z rodziny 4 integrują w to samo miejsce docelowe [37]

Systemy CRISPR-Cas pochodzą od kaspozonów?



Ryc. 2. Relacje filogenetyczne pomiędzy endonukleazami rodziny Cas1, powiązanymi z systemami CRISPR-Cas oraz kodowanymi w obrębie kaspozonów. Przedstawiono przykładową organizacją genetyczną elementów poszczególnych rodzin kaspozonów.
TIR–odwrócone sekwencje powtórzone, Cas1–kaspozaza, HTH–białko posiadające domenę HTH (helix-turn-helix), Mtaza–metylotransferaza, Cas4–endonukleaza z rodziny Cas4, S1H–helikaza z superrodziny 1. Rycina z podstawie [6,7], modyfikowana.

Po przeprowadzeniu analiz filogenetycznych, pojawiły się hipotezy, zakładające, że systemy CRISPR-Cas wywodzą się od kaspozonów [5], a flankujące je sekwencje TIR dały początek sekwencjom powtórzonym (*CRISPR repeats*). Wskazują na to liczne podobieństwa: odwrócone sekwencje powtórzone (TIRs) większości kaspozonów mają długość ok. 50 bp (sekwencje powtórzone CRISPR-Cas mają długość w granicach 20-50 bp), część z nich ma strukturę palindromu i są postulowanym miejscem wiązania białka Cas1 [8].

Konkluzje

1. **Odkrycie nowych elementów genetycznych – kaspozonów (w 2014 roku [6]) – wzbudziło duże zainteresowanie wśród badaczy. Należy jednak zaznaczyć, że elementy te wyróżniono wyłącznie na podstawie wyników analiz bioinformatycznych sekwencji, a mobilność wysp *cas1-polB* nie była została potwierdzona eksperymentalnie.**

2. **Analizy porównawcze genomów wielu szczepów archeona *Methanosarcina mazei* pozwoliły na zaobserwowanie śladów niedawnej mobilności kaspozonów. Dowodzi to, że przynajmniej część z nich ma właściwości charakterystyczne dla funkcjonalnych transpozonów [9].**

3. **Systemy CRISPR-Cas to złożone układy genetyczne, które powstały w następstwie wyniku kilku następujących po sobie zdarzeń ewolucyjnych. Najnowsze analizy [10] wskazują, że kaspozony dały początek systemom CRISPR-Cas.**

Bibliografia:
1. Frost, L., Leplae, R., Summers, A. *et al.* Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 722–732 (2005).
2. Mikrobiologia, red. Jadwiga Baj, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, ISBN 978-83-01-20036-7, wydanie I.
3. Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, van der Oost J. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. Annu Rev Genet 2012, 46:311-339.
4. Krupovic M, Makarova KS, Forterre P, Prangishvili D, Koonin EV. Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. BMC Biol. 2014 May 19;12:36.
5. Krupovic M, Béguin P, Koonin EV. Casposons: mobile genetic elements that gave rise to the CRISPR-Cas adaptation machinery. Curr Opin Microbiol. 2017 Aug;38:36-43.
6. Krupovic M, Makarova KS, Forterre P, Prangishvili D, Koonin EV. Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. BMC Biol. 2014 May 19;12:36.
7. Krupovic M, Shmakov S, Makarova KS, Forterre P, Koonin EV. Recent Mobility of Casposons, Self-Synthesizing Transposons at the Origin of the CRISPR-Cas Immunity. Genome Biol Evol. 2016 Jan 13;8(2):375-86.
8. Koonin, E., Krupovic, M. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat Rev Genet* 16, 184–192 (2015).
9. Krupovic, M., Shmakov, S., Makarova, K. S., Forterre, P., & Koonin, E. V. (2016). Recent Mobility of Casposons, Self-Synthesizing Transposons at the Origin of the CRISPR-Cas Immunity. *Genome biology and evolution*, *8*(2), 375–386.
10. Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *374*(1772), 20180087.