

Sistemi CRISPR-CAS : un sistema di resistenza ai fagi

Dalla ricerca di base sulle interazioni batteriofagi/ batteri alle applicazioni per l'editing genomico al

Premio Nobel per la Chimica 2020

Jennifer Doudna

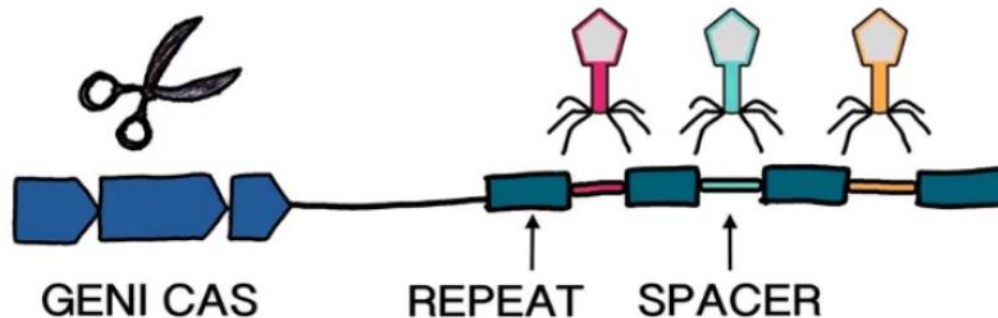


Emmanuelle Charpentier

Le regioni CRISPR sono essenzialmente delle banche di memoria di sequenze fagiche ostili.

Sono quindi regioni presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)

Un locus CRISPR è costituito dalla ripetizione di diversi frammenti fagici (SPACERS) alternate con sequenze ripetute identiche (REPEATS). Il sistema CRISPR conferisce resistenza ai fagi che contengono nel proprio genoma una sequenza identica o strettamente correlata a quella contenuta nei CRISPR.



CRISPR

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



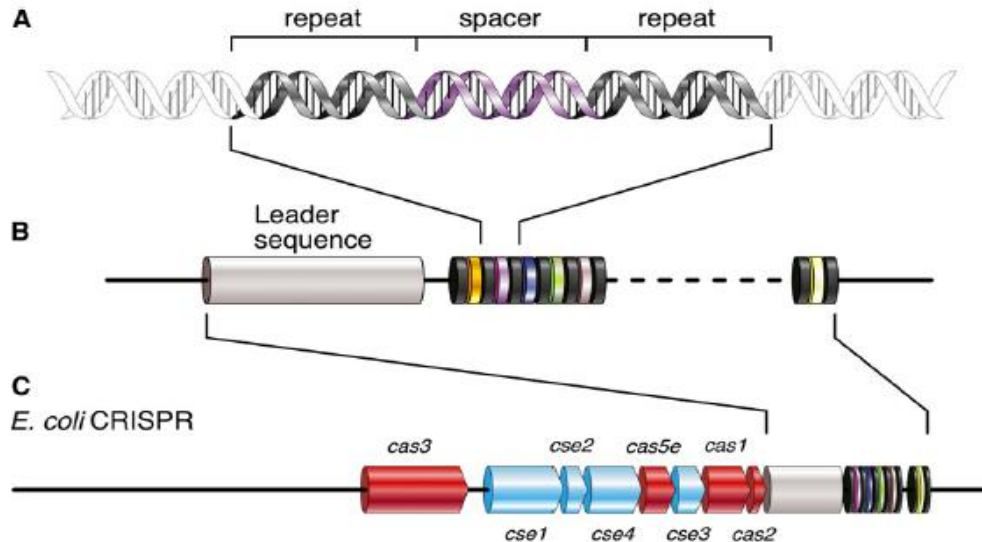
Le regioni CRISPR sono essenzialmente delle banche di memoria di sequenze fagiche ostili.

Una CRISPR è costituita dalla ripetizione di diversi frammenti variabili di origine fagica (oppure plasmidica o ?) (SPACERS) alternate con sequenze ripetute identiche (REPEATS).

Il sistema CRISPR conferisce resistenza ai fagi che contengono nel proprio genoma una sequenza identica o strettamente correlata a quella contenuta nei CRISPR.

Sono quindi regioni presenti nel genoma della gran parte dei batteri (70% nei Batteri, 90% degli Archea)

Elementi caratteristici di un locus CRISPR



In genere si ritrova un locus CRISPR per genoma anche se non è raro trovare genomi con diversi CRISPR loci.

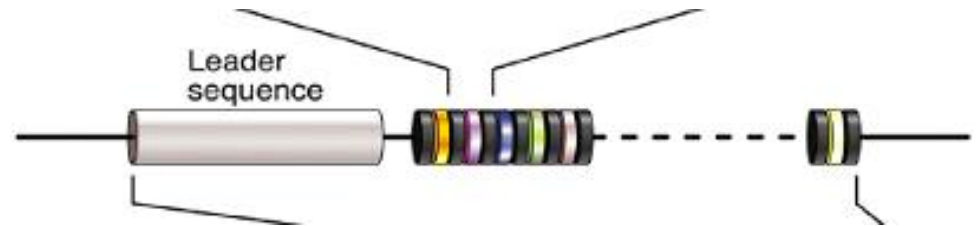
Un locus CRISPR è caratterizzato dall'allineamento di sequenze ripetute **REPEATS** praticamente identiche all'interno di un locus separate da sequenze **SPACERS** di lunghezza identica ma di contenuto in basi molto diverso.

I **REPEATS** variano in lunghezza da specie a specie dalle 21 alle 47 basi (con una media di 32 basi) mentre la lunghezza degli **SPACERS** varia tra i 20 e 72 bp per ogni specie.

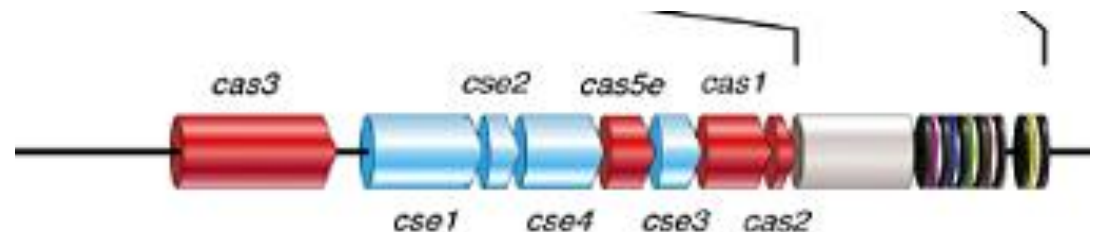
I **REPEATS** sono caratterizzati dalla capacità di formare un'ansa (sono sequenze parzialmente palindromiche). Il numero di unità ripetute di **SPACERS/REPEATS** per ogni locus è di circa 25 (con oscillazioni da 1 a 300!)

Oltre ai REPEATS and SPACERS il locus CRISPR è caratterizzato:

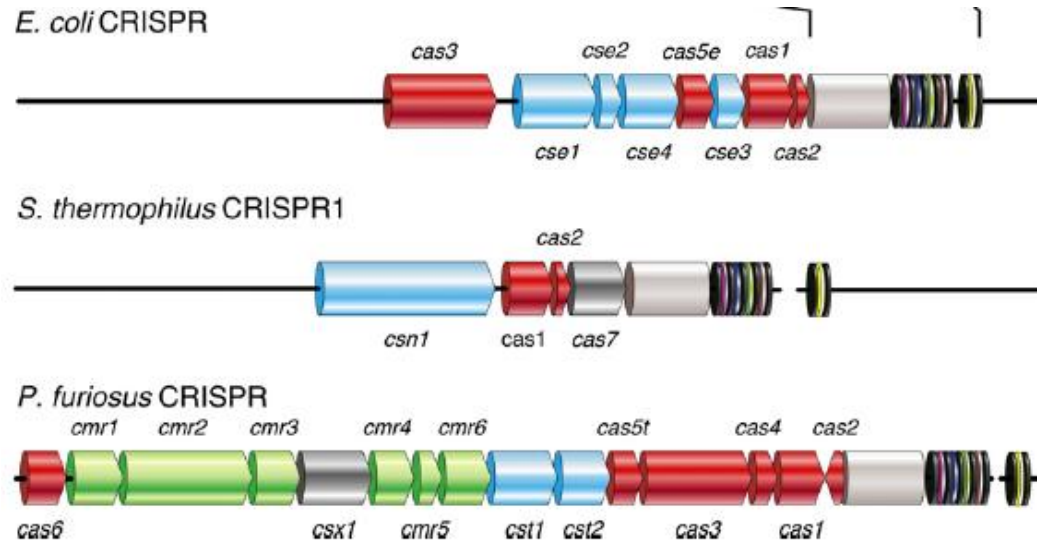
- dalla presenza di una regione definita LEADER lunga diverse centinaia di basi e non codificante posizionata sempre e solo ad una estremità del locus.



- dalle proteine associate ai CRISPR (CAS) che sono codificate da geni localizzati a monte delle sequenze CRISPR



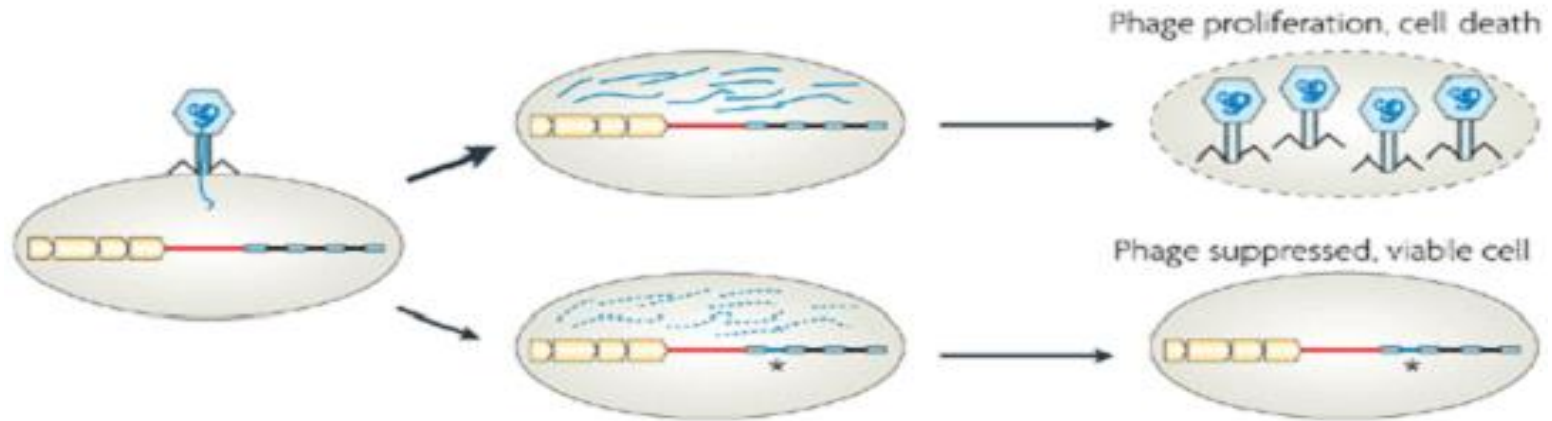
Le proteine CAS (CRISPR Associated Proteins)



I loci CRISPR sono caratterizzati dalla presenza di una serie di proteine CAS che variano in numero e disposizione da locus a locus.

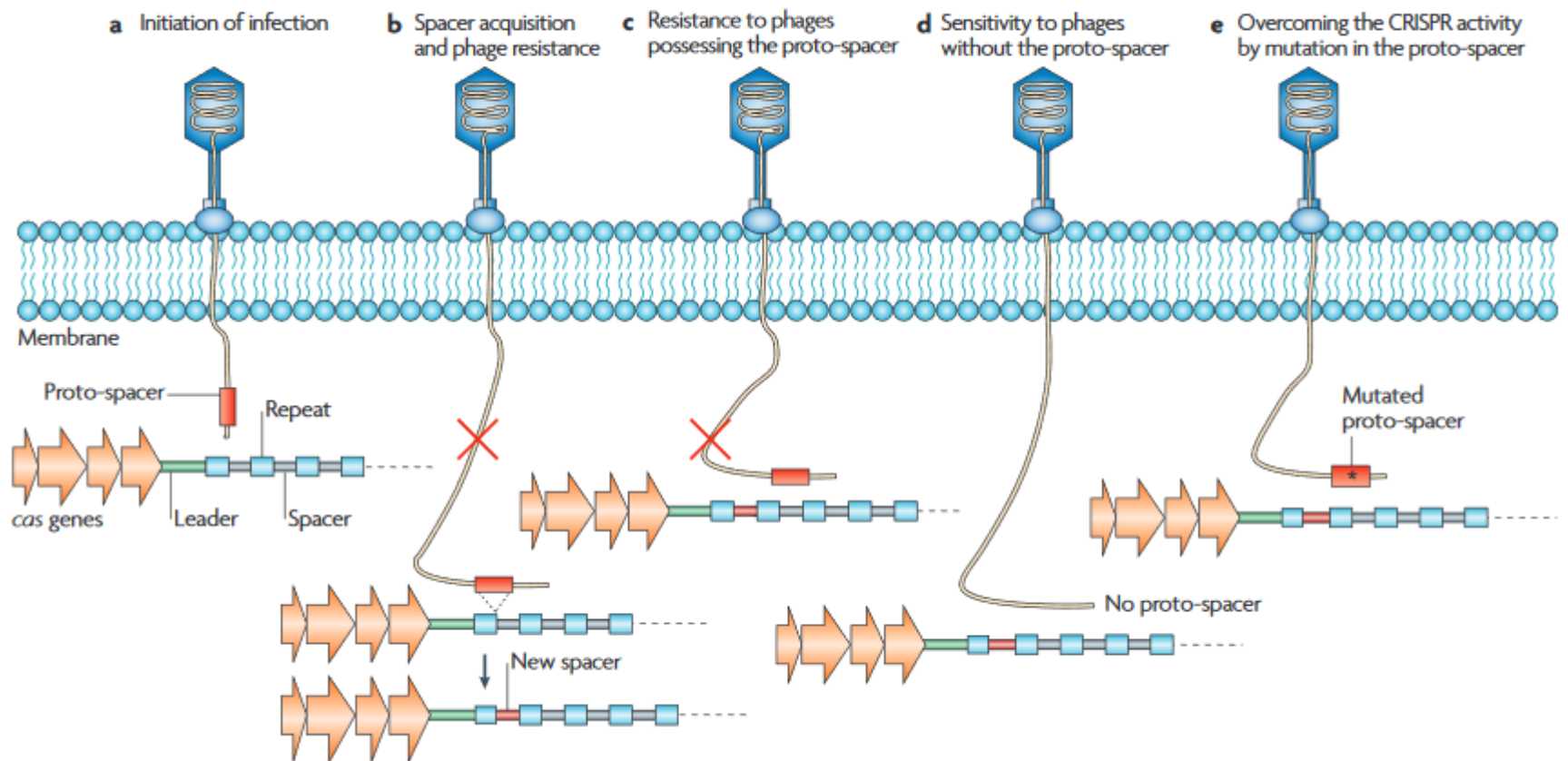
L'analisi comparativa di diversi loci ha permesso di identificare diversi tipi di proteine CAS che costituiscono il core del sistema anche se spesso non sono tutte presenti.

Come fanno le regioni CRISPR ad acquisire le regioni di DNA (SPACERS) che si intervallano tra le sequenze ripetute (REPEATS)?



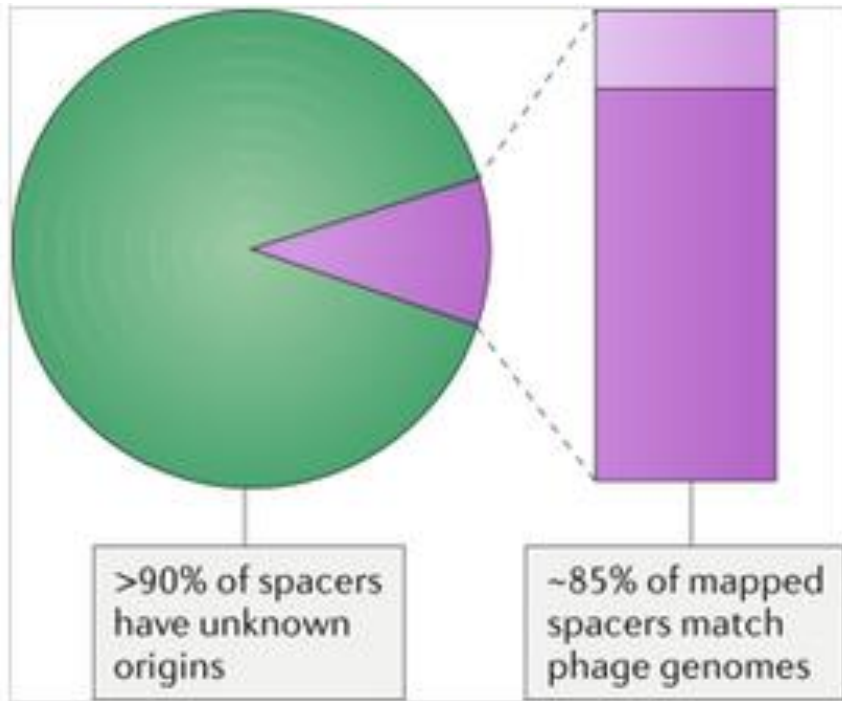
In seguito all'attacco da parte di un fago, gli acidi nucleici del fago si moltiplicano nella cellula e vengono prodotte nuove particelle fagiche secondo un classico ciclo litico portando a morte le cellule sensibili.

Un piccolo numero di batteri riesce ad acquisire gli "spaziatori fagici" (SPACERS) che permetteranno la sopravvivenza della cellula batterica tramite una degradazione CRISPR-mediata del DNA o mRNA fagico



The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) mode of action. a | Phage DNA enters the bacterial cell and the lytic cycle of the phage initiates. Most bacterial cells will undergo lysis on completion of the phage lytic cycle. b | A small portion of phage-infected cells (approximately 1×10^{-6}) will survive the infection. The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) locus of such a phage-insensitive mutant contains an additional repeat (duplicated from the CRISPR locus) and a new spacer (which is 30 nucleotides long in *Streptococcus thermophilus*) that has been acquired from the infecting phage genome. c | The newly acquired repeat-spacer unit is responsible for the phage resistance of these phage-insensitive mutants. Any incoming phage genome carrying a proto-spacer with 100% nucleotide identity to the new spacer-repeat unit will be inactivated and the phage infection process will be blocked. d | These so-called phage-insensitive mutants are still sensitive to phages that do not possess this specific proto-spacer in their genomes. e | Phage mutants carrying a single point mutation or a deletion in their proto-spacer (or in the motif next to the proto-spacer) can bypass the CRISPR activity and successfully complete their lytic cycles. cas genes, CRISPR-associated genes.

Il mondo oscuro delle sequenze spacers dei CRISPR

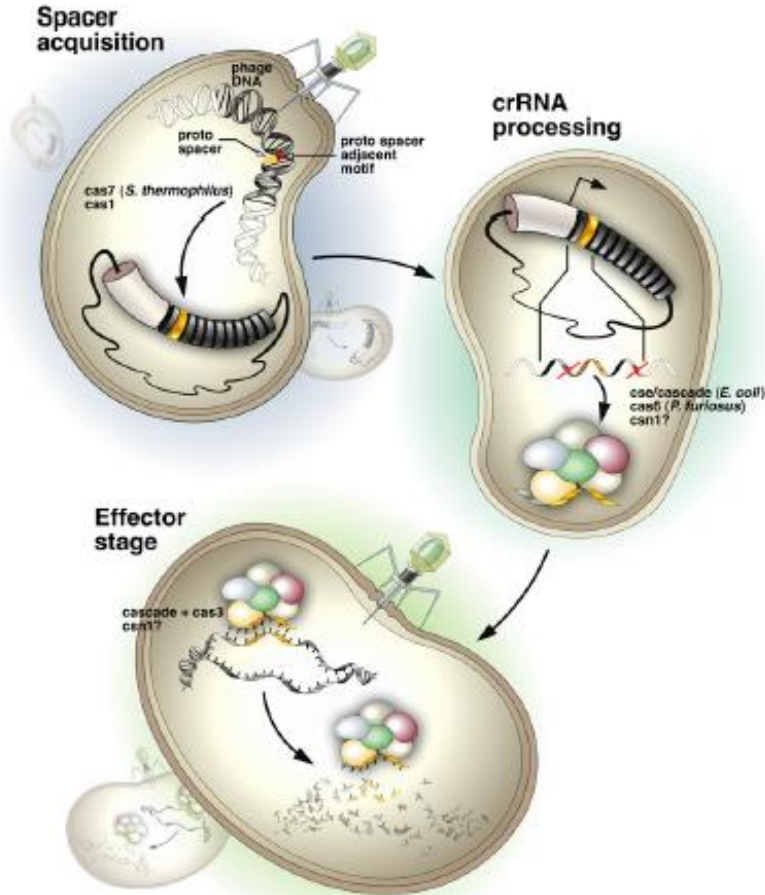


Origine degli spacers:
oltre 90% degli spacers è di
origine sconosciuta

Tra quel 10 % conosciuto
sono per 85% di origine
fagica.

Da dove vengono allora?
L'ipotesi più semplice è che
si tratti di fagi o MGE
ancora sconosciuti

Le 3 fasi del processo di acquisizione dell'immunità

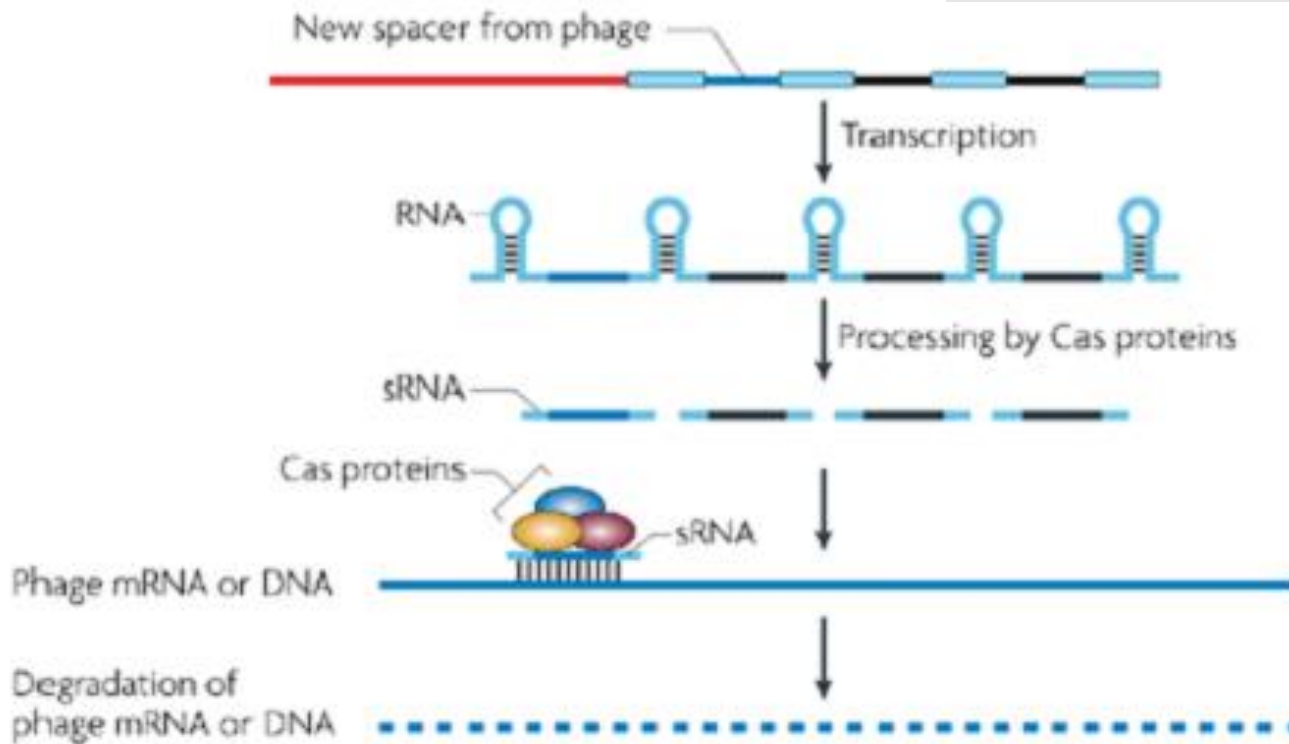


Adattamento: Acquisizione degli SPACERS: durante l'infezione fagica segmenti di acidi nucleici dell'elemento invasore vengono incorporati a valle della sequenza leader del CRISPR.

Espressione: Nella fase di processamento il locus è trascritto e processato in crRNA maturo contenente una sequenza REPEAT con un segnale di 8 nt ed un singola sequenza spacer.

Interferenza: Durante la fase effettrice i crRNA complessati alle proteine CAS portano alla degradazione il DNA complementare

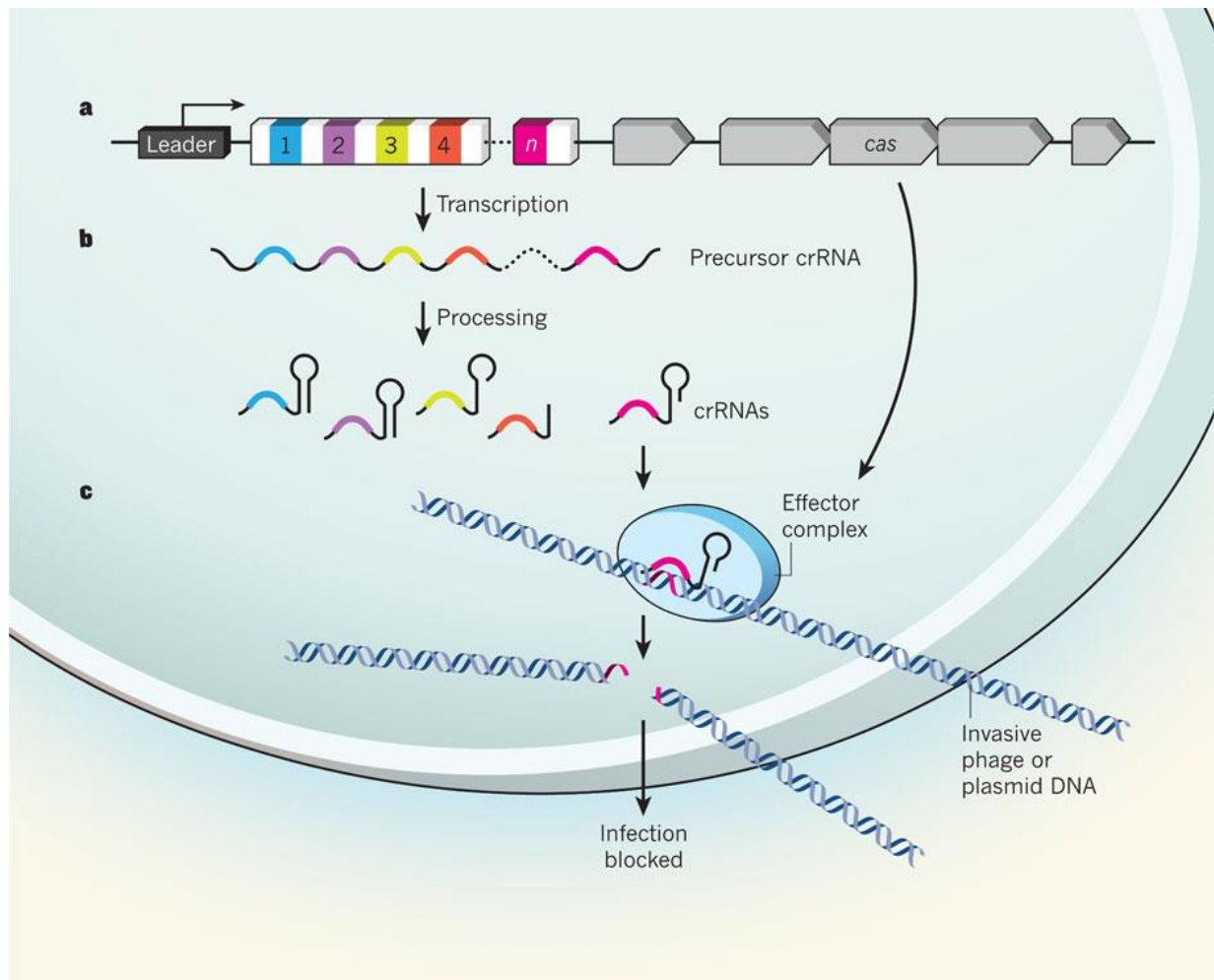
Come funziona il sistema??



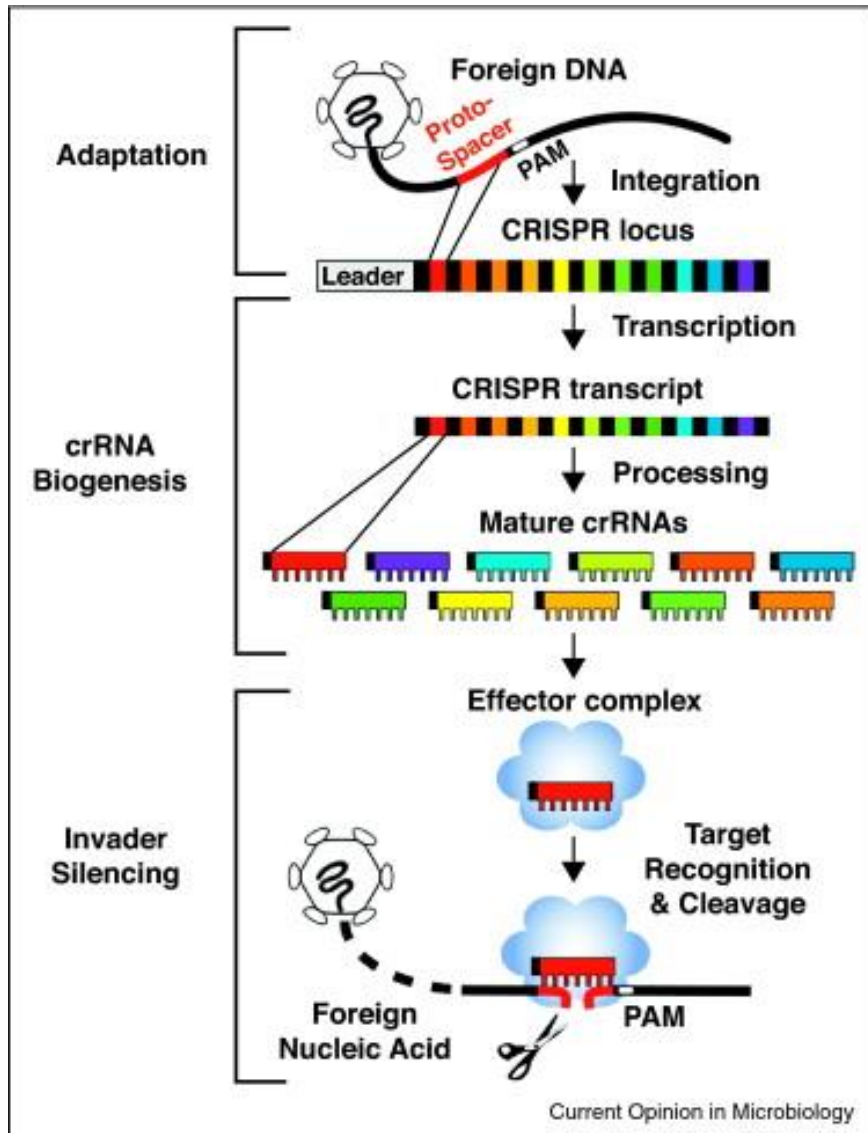
Modello semplificato : la serie di SPACERS-REPEATS è trascritta in un lungo RNA ed i REPEATS assumono una struttura secondaria.

Le proteine Cas riconoscono la struttura secondaria e tagliano l'RNA in modo da produrre dei sRNAs ognuno dei quali contiene una sequenza SPACERS e 2 mezzi REPEATS. Gli sRNA complessandosi alle proteine CAS si appaiano al DNA fagico provocandone la degradazione.

Questo processo è mediato da 1 o più proteine CAS



Il sistema CRISPR-Cas per la difesa da DNA invasore



CrRNA = CRISPR RNA

Nella fase di adattamento un piccolo frammento di DNA estraneo definito **protospacer** viene acquisito dall'elemento invasore all'interno del locus CRISPR in posizione adiacente al leader.

In seguito a questo processo di acquisizione di sequenze SPACERS dal DNA di elementi invasori, il locus CRISPR risulta costituito da brevi tratti di sequenze ripetute separate da sequenze diverse (in colore).

Successivamente i trascritti del locus CRISPR sono processati per rilasciare dei piccoli crRNA ognuno in grado di riconoscere una sequenza specifica. I crRNA maturi contengono tipicamente alcuni nucleotidi delle sequenze ripetute che sono il segnale di riconoscimento dei crRNA

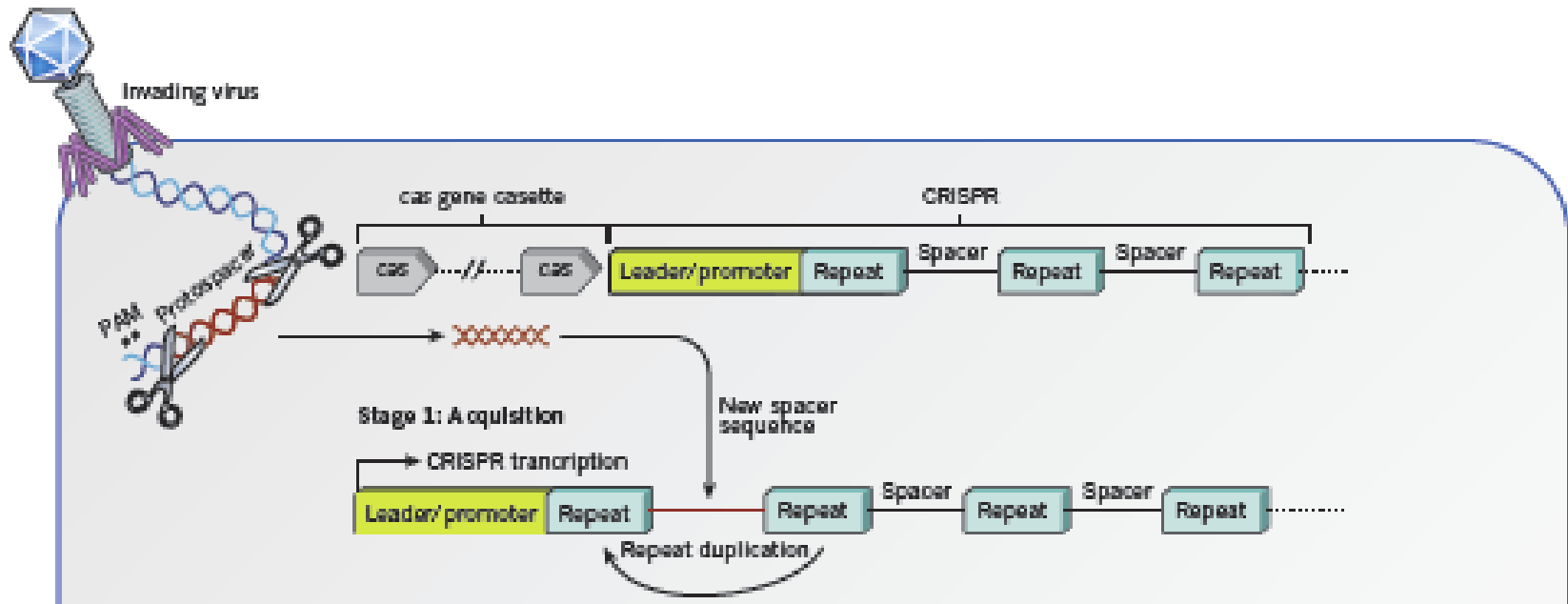
Nella fase di silenziamento il complesso crRNA-CAS riconosce il DNA (o RNA) estraneo tramite appaiamento con i piccoli crRNA.

I sistemi Cmr e Csn colpiscono il taglio dell'RNA target o DNA.

I **PAM Protospacers Adjacent Motif** sono localizzati vicino alle sequenze del DNA "invasore" selezionato per l'integrazione nei CRISPR forniscono ulteriori segnali per il riconoscimento delle sequenze "invasori"

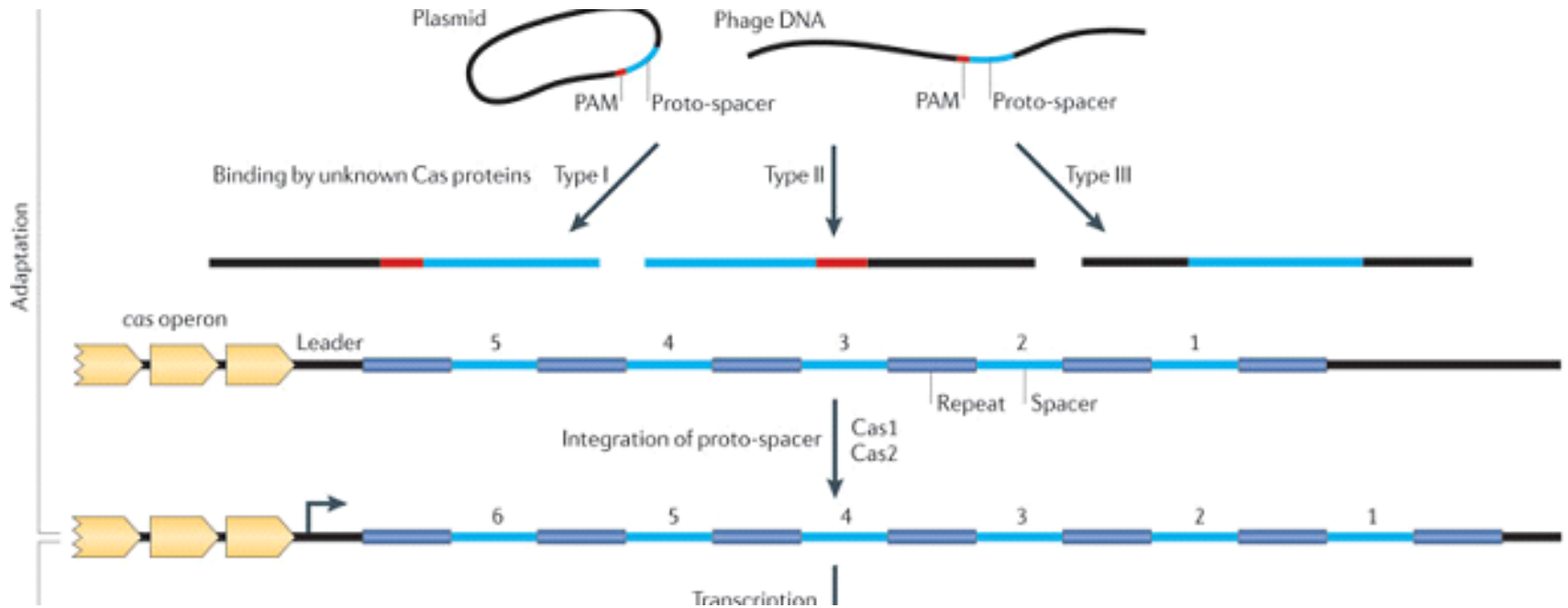
Diversità nei meccanismi CRISPR.

1. I processi iniziali sono in comune



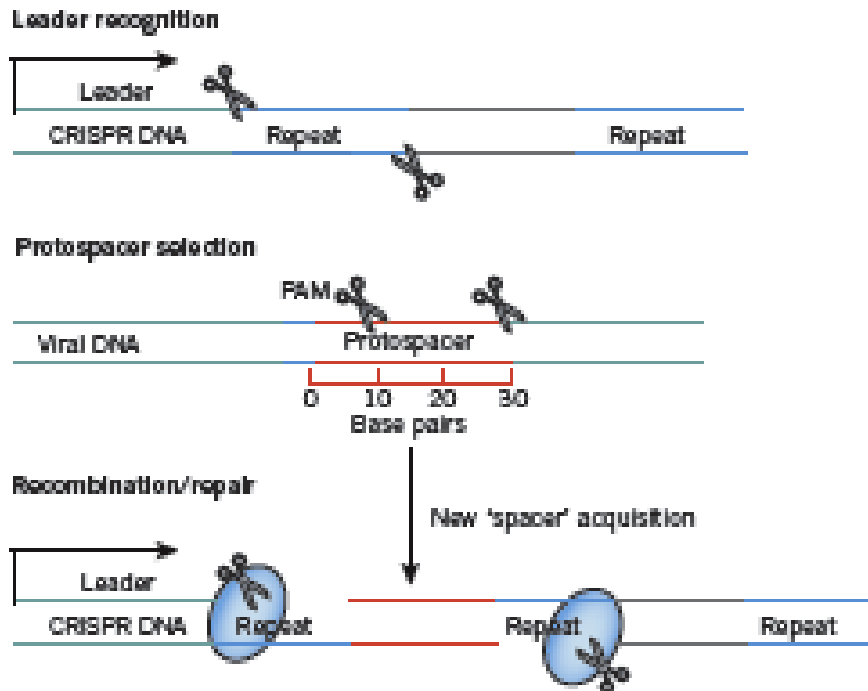
La leader sequence potrebbe contenere un elemento di riconoscimento in grado di reclutare l'apparato di integrazione. Si può anche ipotizzare che l'integrazione avvenga tramite una sola elica di DNA divenuta disponibile in seguito al processo di trascrizione. Il meccanismo di trascrizione/integrazione potrebbe associare la fase di integrazione a quella di trascrizione e garantire che gli spacers dei fagi più recenti siano quelli trascritti per primi

Fase 1: Adattamento



Nei CRISPR di tipo I e di tipo II il riconoscimento dei PROTOPACERS negli acidi nucleici "invasori" dipende proprio dai motivi PAM.

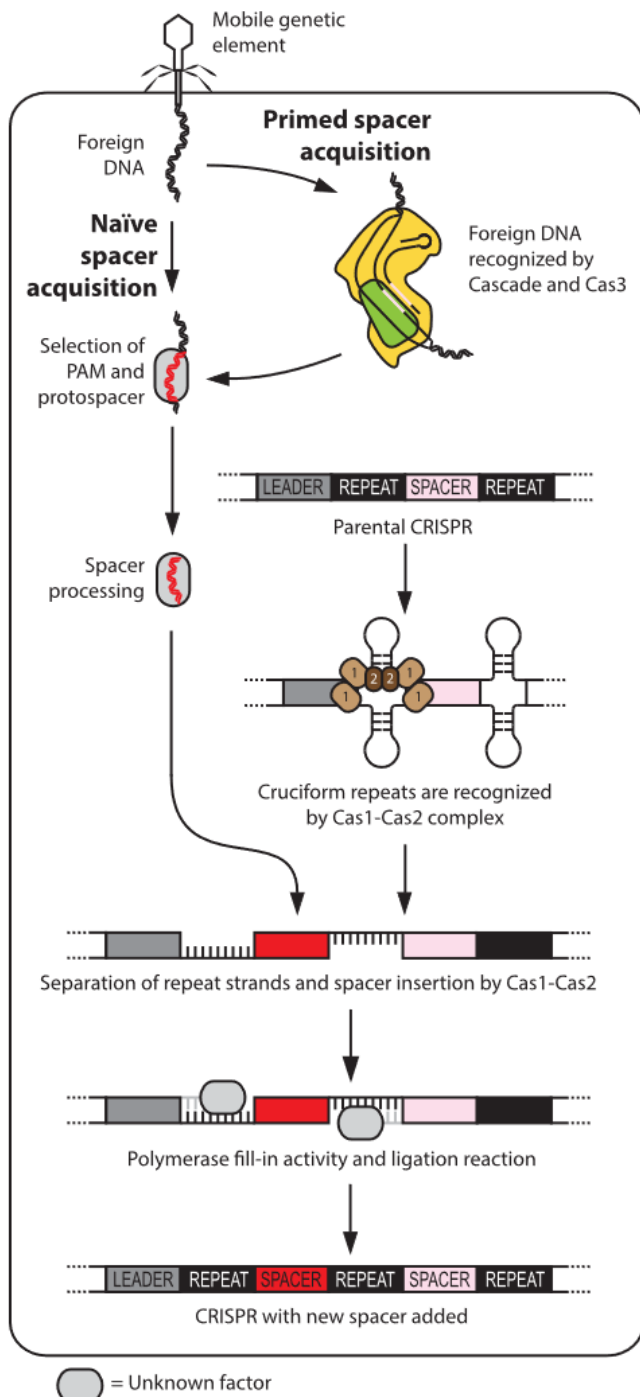
Dopo il riconoscimento iniziale il protospacers viene incorporato grazie alle proteine Cas1 e Cas2 per formare gli spacers.



La fase di adattamento avviene tramite integrazione di frammenti di acido nucleico estraneo vicino alla sequenza Leader. I Protospacers non sono scelti a caso ma vengono selezionati tra le regioni che fiancheggiano le sequenze PAM (Protospacers Adjacent Motifs).

In seguito ad un taglio coordinato del DNA esogeno avviene l'inserimento della sequenza di PROTOPACER nella locus CRISPR attraverso un meccanismo che duplica la REPEAT SEQUENCE mantenendo l'architettura del locus (Repeat-Spacer-Repeat).

Il meccanismo non è stato ancora bene definito ma coinvolge la proteina CAS1 e altri fattori implicati nei processi di riparo e di ricombinazione generale



La fase di adattamento conferisce la **MEMORIA GENETICA** ed è un prerequisite per le fasi successive di espressione e di interferenza che neutralizzano gli acidi nucleici re-invasivi. La capacità di inserire nuovi spacers è stata riprodotta e testata sperimentalmente in vari sistemi CRISPR - CAS.

Esistono due tipi di meccanismi di acquisizione degli spacer: **NAÏVE** quando un invader incontra per la prima volta la cellula batterica e **primed** (già istruito) quando già esiste un precedente ricordo del **INVADER** nelle sequenze CRISPR

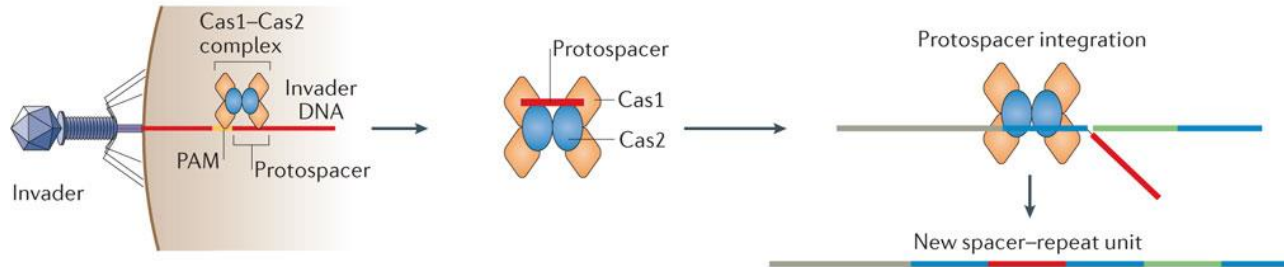
Fig. 2. Model of the adaptation in the Type I-E system. There are two types of spacer acquisition, naïve and primed. Both require the presence of a PAM and are dependent on the Cas1–Cas2 complex. The Cas1–Cas2 complex recognizes the CRISPR and likely prepares it for spacer integration. Naïve spacer acquisition occurs when there is no previous information about the target in the CRISPR. Primed spacer acquisition requires a spacer in the CRISPR locus that matches the target DNA and the presence of Cas3 and the Cascade complex. Primed acquisition results in insertion of more spacers from same mobile genetic element. PAM = Protospacer Adjacent Motif.

Fase di Adattamento

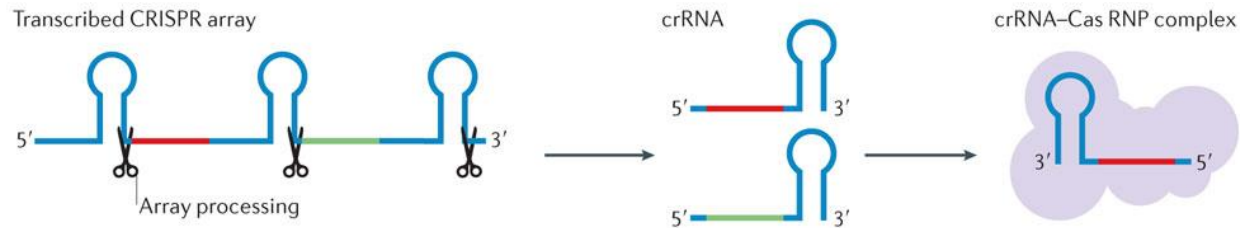
a Locus organization



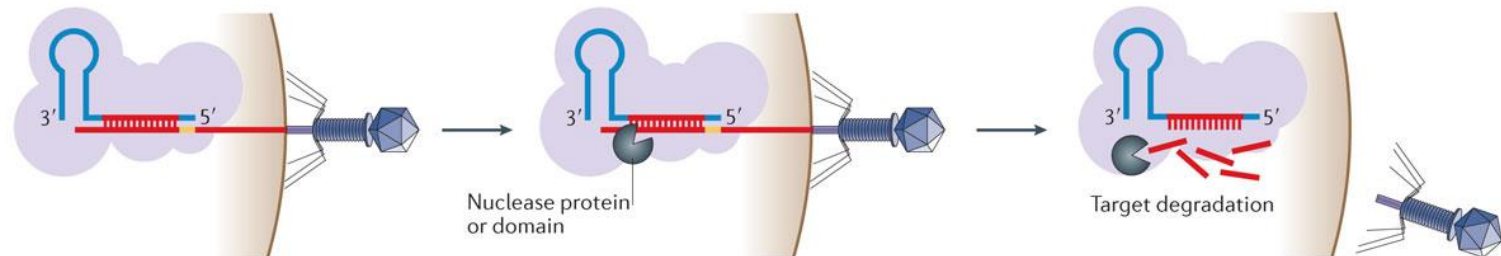
b Adaptation



c Expression and maturation



d Interference



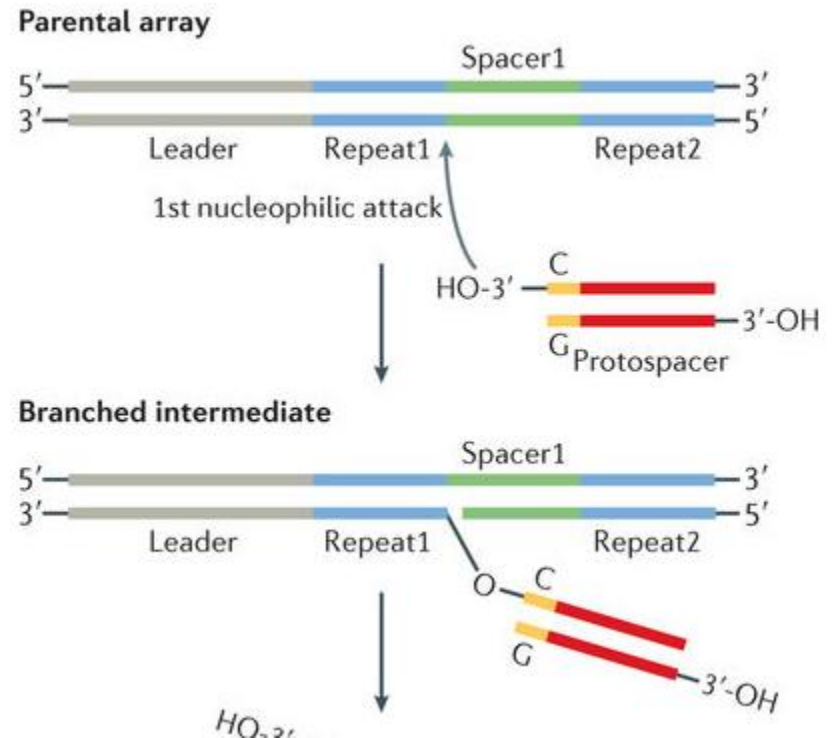
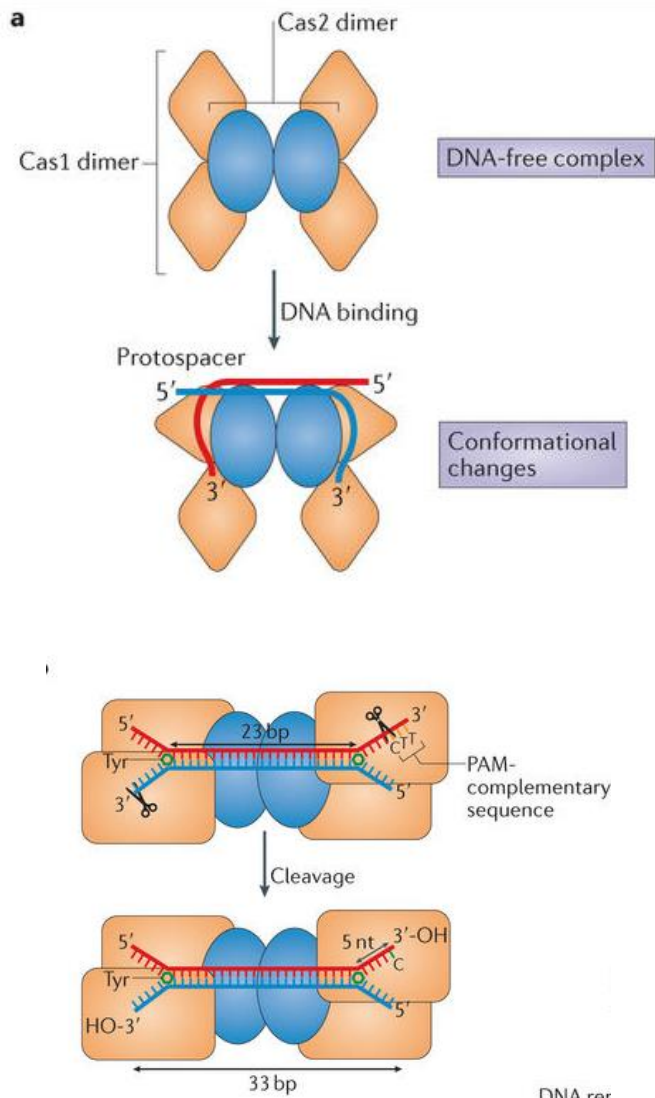
La fase di adattamento CRISPR-Cas è un processo complesso nel quale un protospacer deve essere recuperato dal DNA "invasore" e inserito nella sequenza CRISPR.

Il processo si divide in più tappe

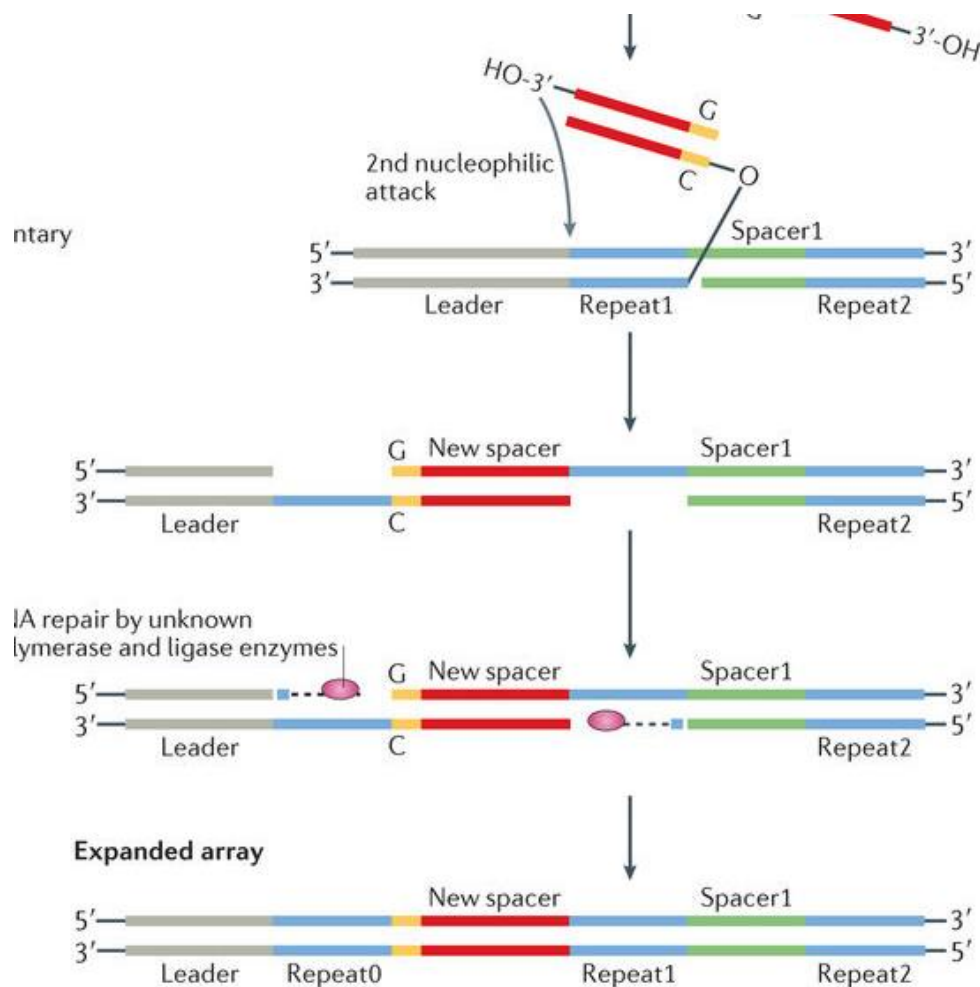
1. Riconoscimento
2. Taglio
3. Inserimento.

I componenti di questo processo sono le proteine Cas1 (endonucleasi) e Cas2 (attività di taglio RNA e DNA), la sequenza leader e il primo repeat CRISPR.

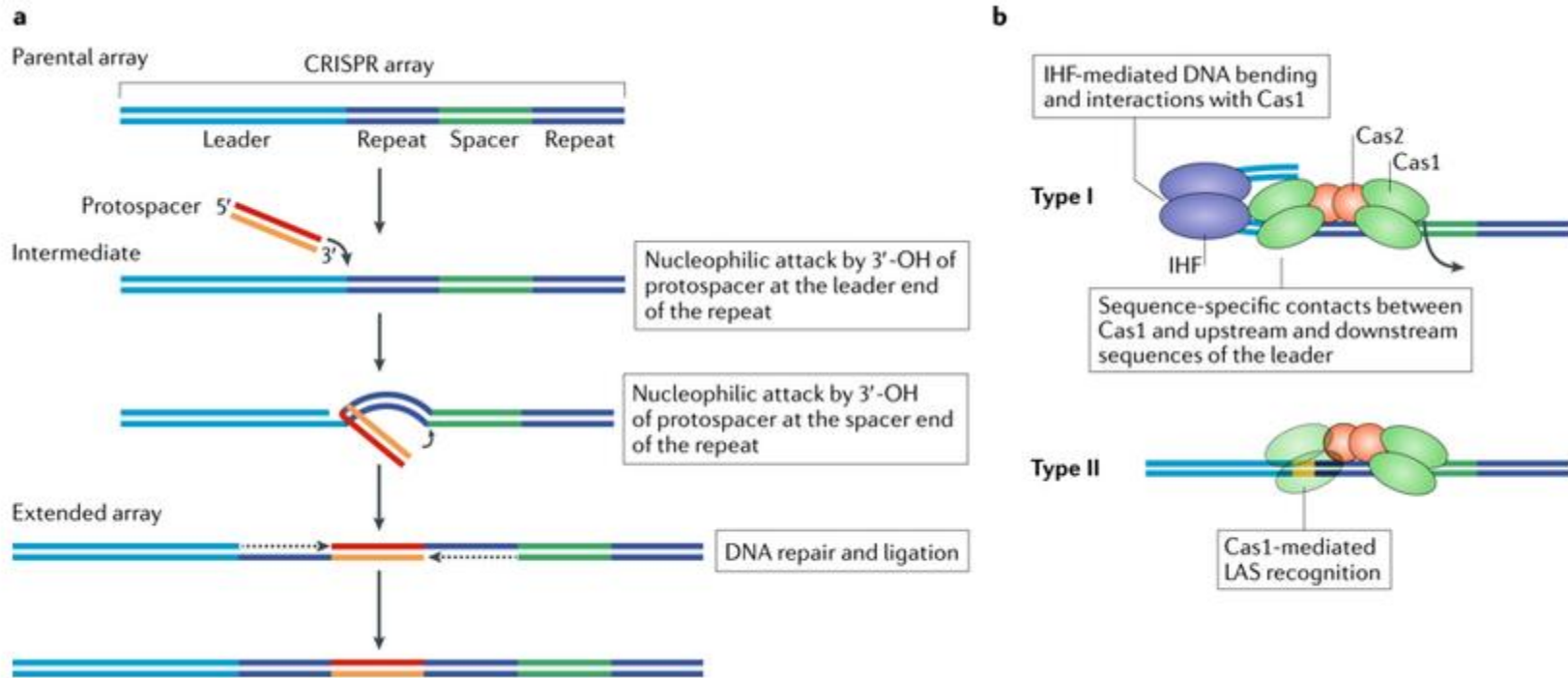
Le funzioni endonucleasiche di Cas2 non sono direttamente richieste mentre è importante che formi complesso con Cas1



Il complesso Cas1/2 costituito da 2 dimeri di Cas1 e un dimero di Cas2 si comporterebbe come un integrasi



A model for protospacer integration into the CRISPR array. The protospacer 3'-OH group carries out a nucleophilic attack on the 5' end of the first repeat, thus initiating spacer acquisition by forming a branched intermediate in which a single strand of the protospacer is ligated to a single strand of the CRISPR array. The 3'-OH group on the other protospacer strand generates a second nucleophilic attack on the 5' end of the opposing DNA strand of the repeat, which is juxtaposed to the leader sequence. The product of this reaction is an expanded CRISPR array with a new spacer and a duplicated repeat. The ssDNA gaps that are produced at the repeat sequences are filled and repaired by uncharacterized enzymes.



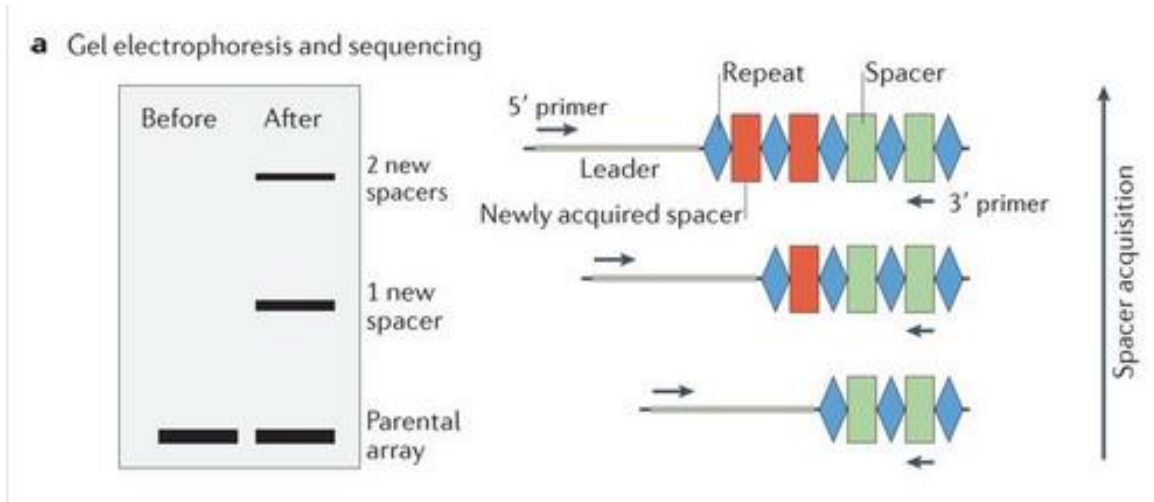
The array is preceded by an AT-rich leader sequence. Integration of new spacers begins with a concerted cleavage–ligation reaction that occurs preferentially at the leader end of the first repeat, whereby the terminal 3'-OH of the protospacer carries out a nucleophilic attack. Next, the repeat DNA is bent, and a second cleavage–ligation reaction takes place at the spacer side of the repeat. The product of this reaction is an intermediate in which the 3' ends of a double-stranded (dsDNA) protospacer are ligated to single-stranded DNA (ssDNA) repeat sequences. The ssDNA repeats are presumably filled by DNA polymerase and ligated to complete the spacer integration process. **b** | Two mechanisms for preferential spacer acquisition at the leader end of the CRISPR array. In the type I system, integration host factor (IHF) binds to a conserved binding site in the leader and induces DNA bending, which enables the Cas1–Cas2 complex to perform the first cleavage–ligation reaction. Cas1–Cas2 makes specific contacts with upstream and downstream sequences in the leader, as well as with IHF.

Le region i CRISPR evolvono rapidamente e sono spesso ipervariabili anche tra ceppi correlati.

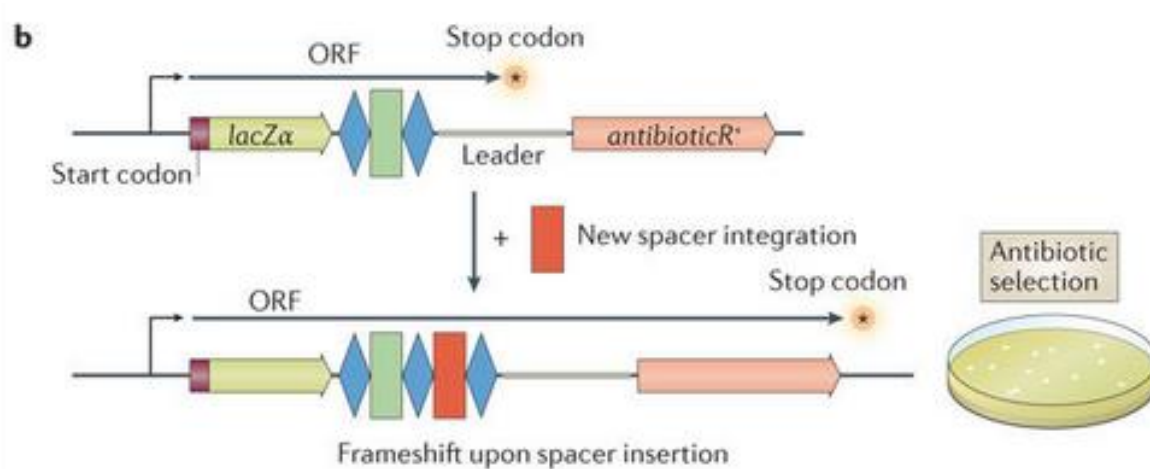
I nuovi spacers sono inseriti sempre all'estremità 5' vicini alla sequenza leader e costituiscono regioni più variabili rispetto ai "vecchi" spacers localizzati al 3'. Si osservano frequentemente delezioni di unità spacer-repeat necessarie per prevenire un ingrandimento eccessivo del locus : non è chiaro se avvengano per ricombinazione omologa o per un processo attivo.

Generalmente i CRISPR loci sono diversi tra le diverse specie batteriche anche se si possono trovare dei repeats simili tra specie diverse ad indicare eventi possibile HGT mediato da megaplasmidi che possono contenere loci CRISPR

Come si fa a capire sperimentalmente se vengono inseriti nuovi spacers

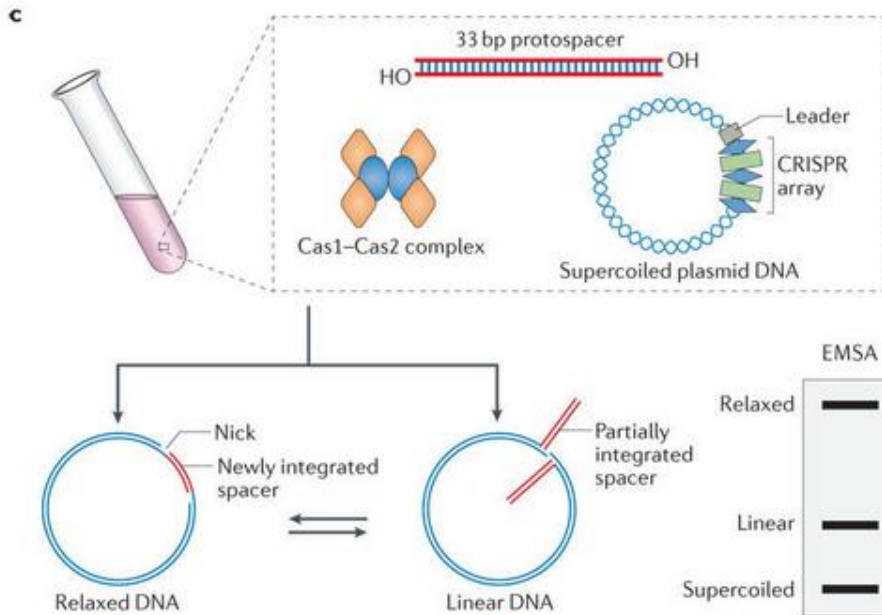


The first approach takes advantage of the fact that new spacers are preferentially added juxtaposed to a regulatory 'leader' sequence that is found directly upstream of the CRISPR array. Each adaptation event entails the expansion of the array by one repeat and one spacer, together sized about 60 nucleotides; hence, PCR amplification with primers that anneal to the leader and a parental spacer can provide data on new spacer integration, either through the use of gel electrophoresis or by direct sequencing¹. This technique is compatible with various genetic backgrounds that include native or partial repertoires of *cas* genes, as well as manipulated leader and repeat sequences. The biochemical intermediates of spacer integration can also be examined using this approach, by Southern blotting of the PCR-amplified CRISPR array.



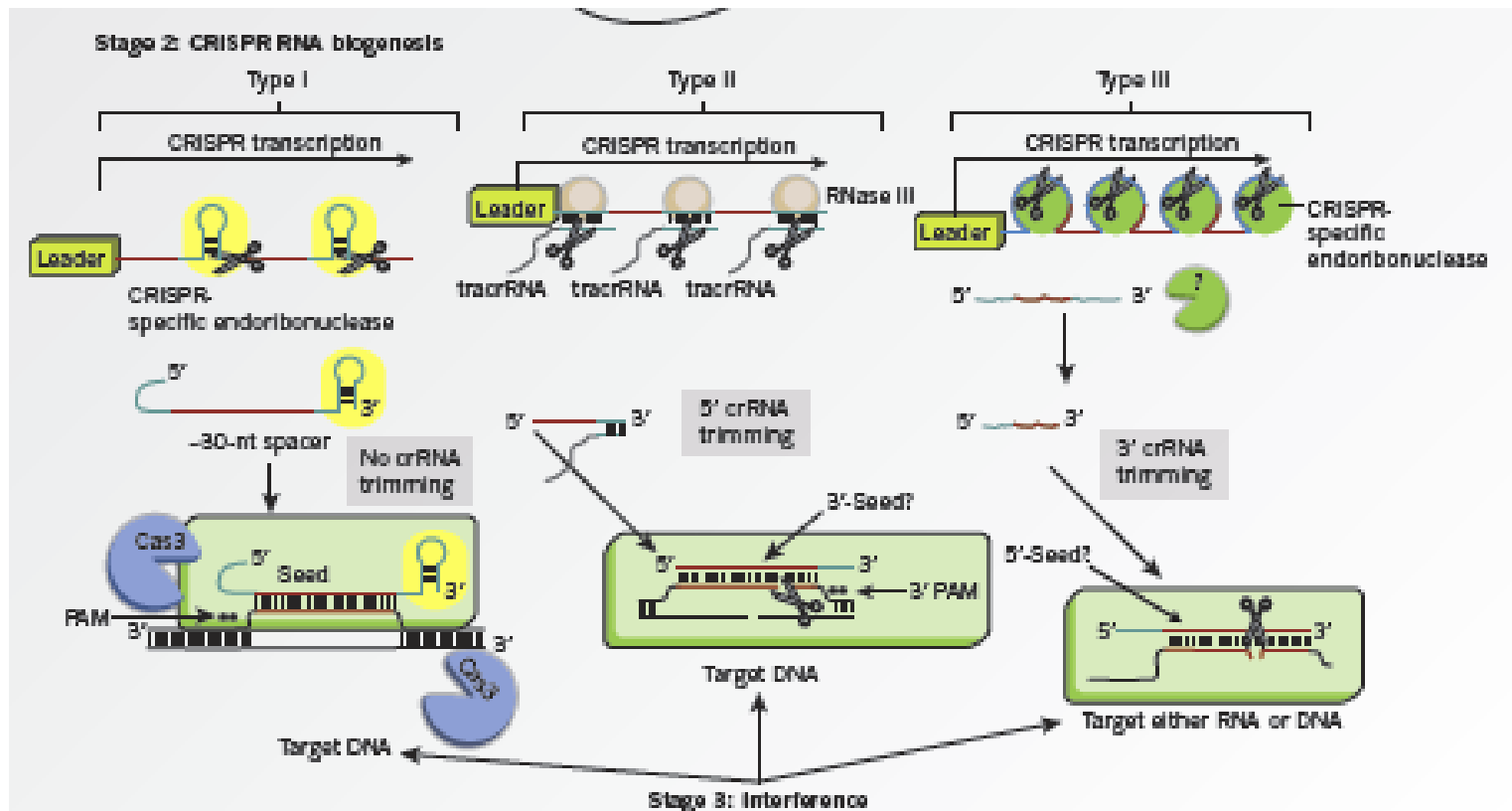
Creazione di una fusione con un codone di stop.

The second approach relies on a viability-based assay for clones that have incorporated new spacers into a CRISPR array that is genetically fused to an out-of-frame antibiotic-resistance gene²⁶ (*antibioticR⁺*; see the figure, part **b**). When a new spacer is integrated into the CRISPR array, the coding frame is repaired and the antibiotic-resistance gene is expressed, so that the survival of a clone following exposure to antibiotics denotes successful spacer integration. This system therefore provides antibiotic-based selection for spacer acquisition events and enables high-sensitivity detection of newly incorporated spacers without the need for the overexpression of Cas proteins.



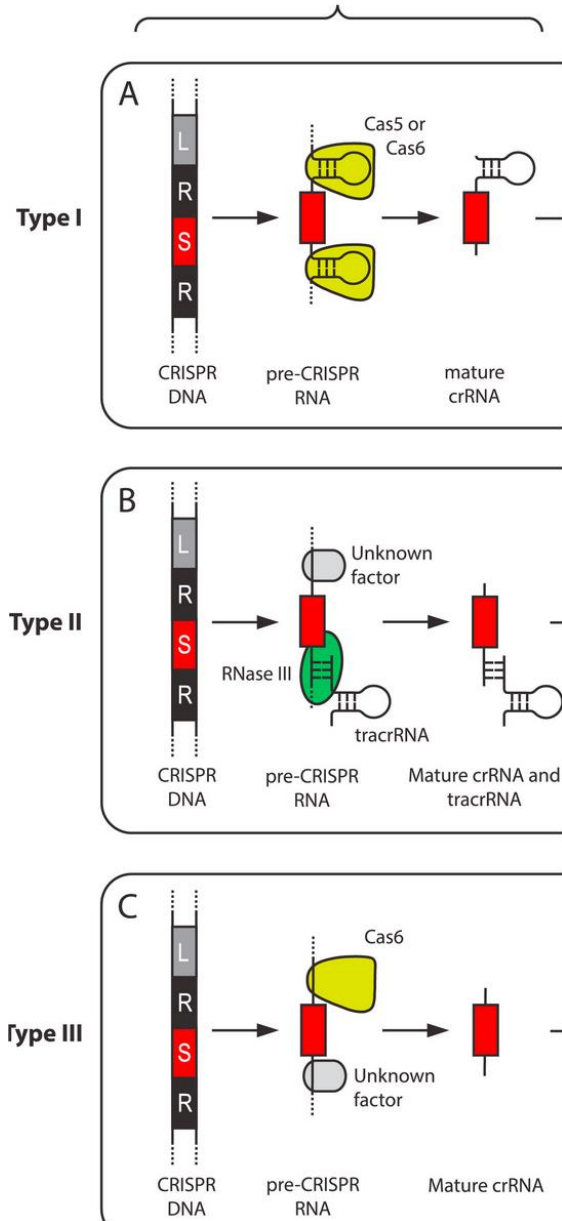
The third approach is to assay spacer acquisition *in vitro*. In this approach, isotopically labelled protospacers are mixed *in vitro* with purified Cas1 and Cas2, which form a protein complex (Cas1–Cas2) that is essential for spacer acquisition, and a CRISPR array-containing plasmid that is an acceptor for spacer integration²⁹. The integration of spacers into the CRISPR array results in a relaxation of supercoiled plasmid DNA or the production of linear DNA, both of which can be observed through an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) as mobility shifts on the gel (see the figure, part c). This assay demonstrated that the chemical steps of spacer integration are reminiscent of the activity of retroviral integrases. Alternatively, *in vitro* assays have been used to study the reverse reaction of spacer integration: disintegration. These assays expose short labelled branched DNA intermediates of spacer integration to the acquisition machinery, thus producing reaction products that can be observed on a gel as a measure of activity. This assay was used to study the sequence specificity of the integration site in the CRISPR array³³.

2. La diversità nella fase delle strategie per la generazione dei crRNA maturi



Espressione: punti in comune e diversità tra i 3 sistemi

CRISPR RNA expression

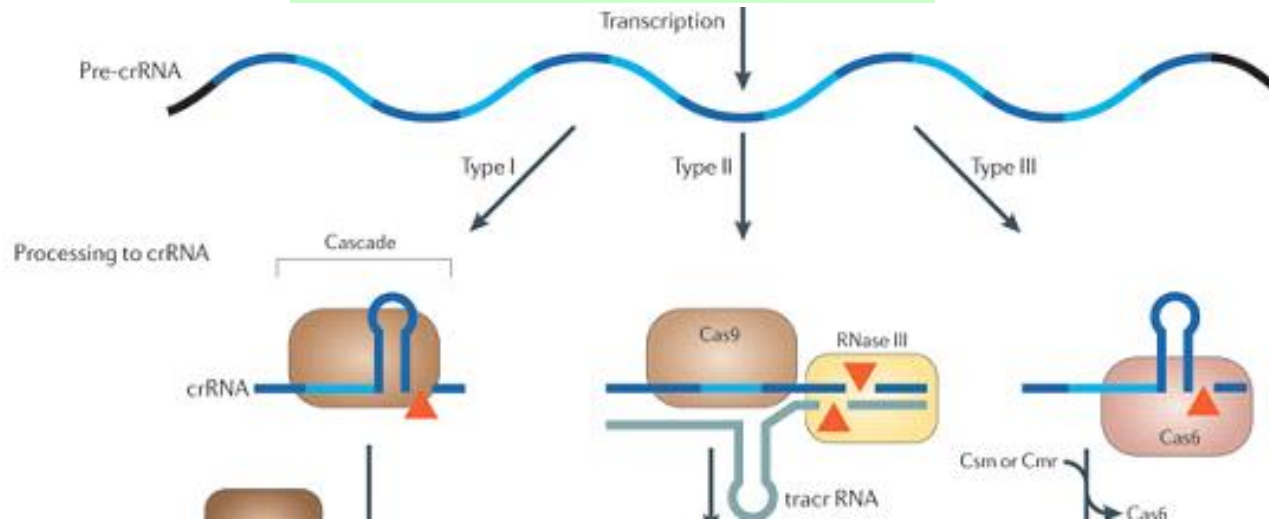


La trascrizione dei loci CRISPR -CAS, per generare un complesso RNA- proteina, presenta alcune omologie alcuni punti in comune in tutti e tre tipi. Tutti i sistemi trascrivono il locus CRISPR, processano RNA con le Cas ribonuclease e formano un complesso CRISPR-ribonucleoproteico crRNP. In alcune specie la trascrizione inizia nella sequenza leader che contiene elementi importanti per la trascrizione.

Come risultato si genera un lungo trascritto precrRNA che contiene una serie di strutture secondarie ad ansa se nel CRISPR sono contenute repeat palindromiche. I pre-CR è poi processato in un unità più piccole corrispondenti ad un singolo spacer fiancheggiato da repeat parziali.

Nei sistemi di Tipo I e Tipo III (che ora costituiscono i sistemi CRISPR Cas classe 1) sia lo stadio di maturazione che di espressione che di interferenza sono eseguiti da un complesso multiproteico definito Cascade (**C**CRISPR **A**Ssociated **C**omplex for **A**ntiviral **D**Efence) nel Tipo I o Csm complex o il Cmr complex nel Tipo III mentre nei sistemi appartenenti alla classe 2 (ovvero tipo II, V e VI, questi processi sono portati avanti da un unico polipeptide (Cas) che richiede la trans-attivazione da parte di uno sRNAnc (tracrRNA)

Fase 2: Espressione



Durante la fase di espressione il locus CRISPR contenente gli spacers viene espresso dando luogo ad un lungo trascritto definito pre-crRNA (pre-CRISPR RNA).

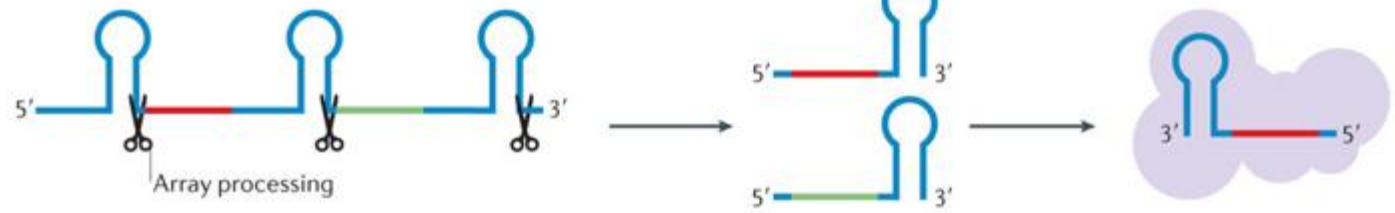
Nel tipo I il complesso di proteine CRISPR associate (CASCADE) si lega al pre- crRNA che viene poi tagliato dalle subunità Cas6e e Cas6f dando luogo a piccoli crRNA costituiti da una tipica sequenza di 8 nucleotidi all'estremità 5' e dalla restante porzione del repeat che forma poi una struttura ad ansa al 3'

Nel tipo II un *trans encoded RNA* si lega al segmento repeat del pre crRNA e questo appaiamento RNA-RNA viene riconosciuto dalla RNase III dell'ospite in presenza delle proteine Cas.

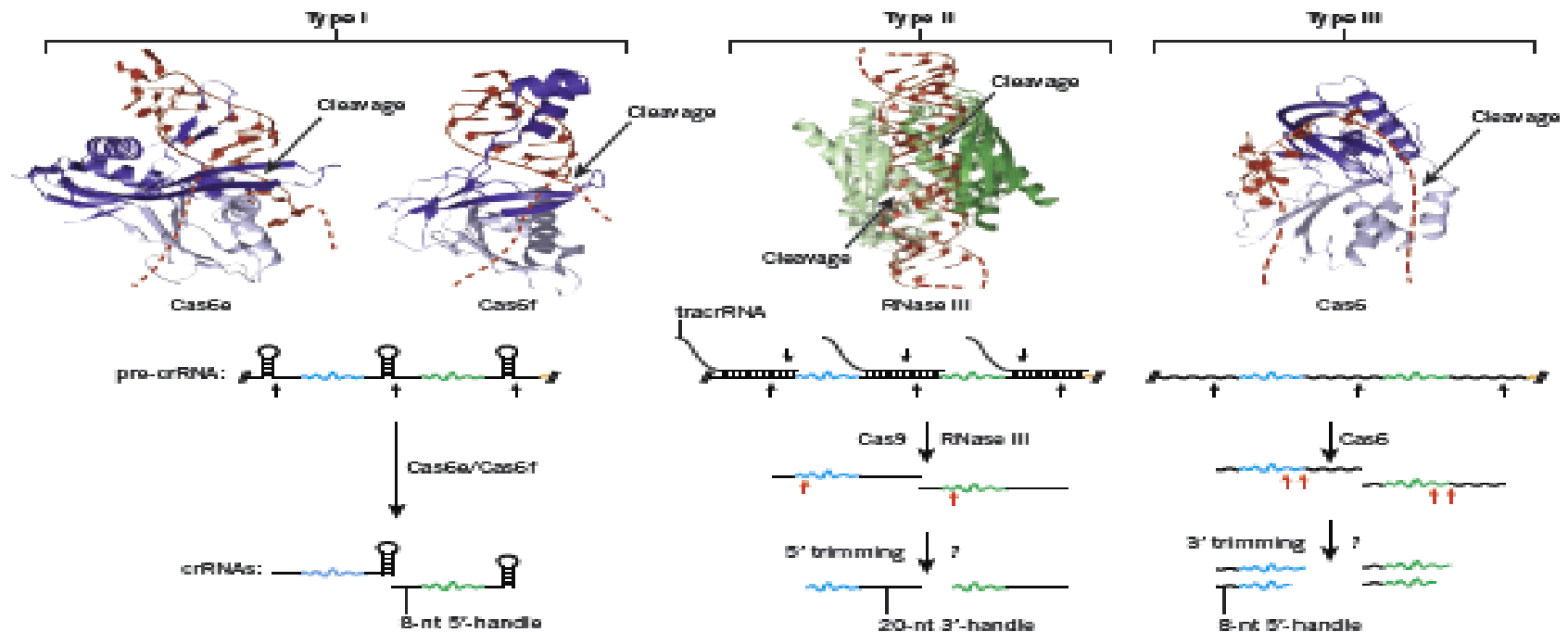
Nel tipo III vien maturato dal Cas6 e poi trasferito a altri complessi proteici Csm e Cmr

c Expression and maturation

Transcribed CRISPR array



Il processamento del crRNA.

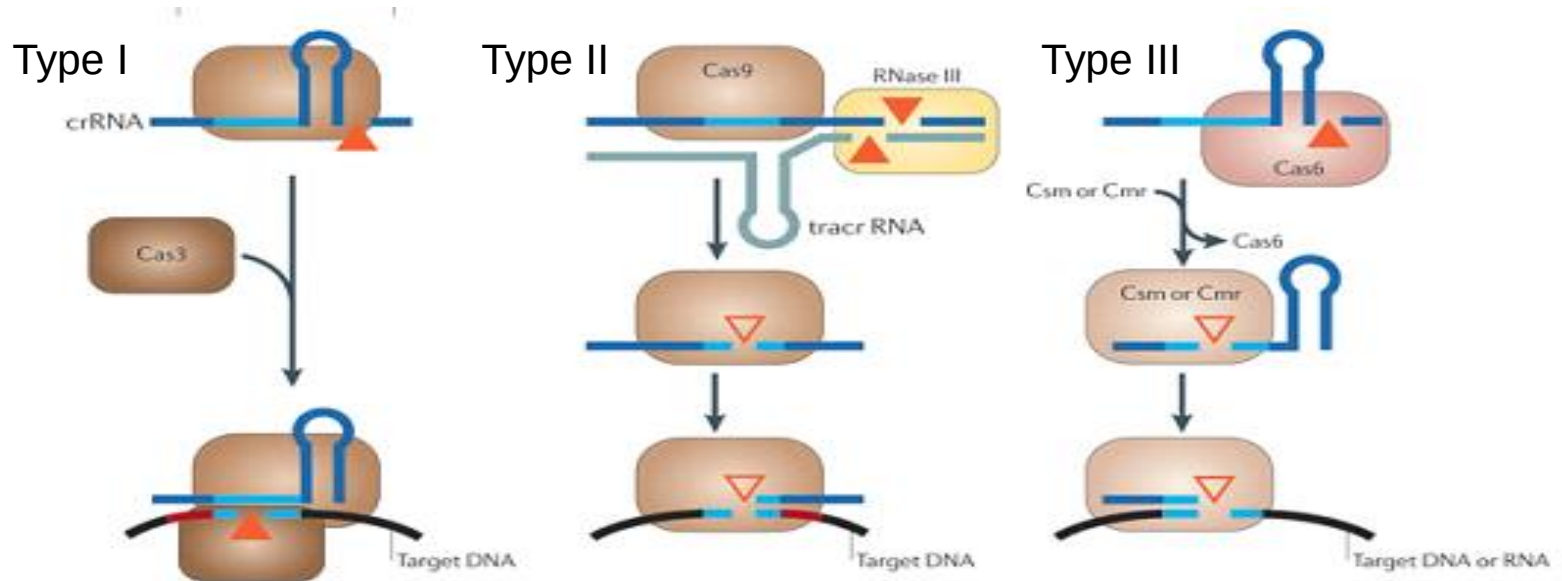


Tipo I Cas6e e C6f riconoscono l'ansa maggiore della struttura stem-loop del crRNA tramite interazioni elettrostatiche. Il taglio avviene nella giunzione tra RNA DS -SS, lasciando 8 basi come maniglia al 5'

Tipo II. Interviene un tracrRNA (trans acting antisense RNA) codificato sull'altra elica con una complementarità di sequenza con le sequenze REPEAT del CRISPR RNA per formare un duplex che è riconosciuto e tagliato da RNase III in associazione a Cas9. Questo intermedio è successivamente processato al 5' dando luogo a cr RNA di circa 40 nucleotidi con una maniglia di circa 20nt al 3'

Tipo III. Troviamo che Cas6 è in grado di tagliare precrRNA 8 nucleotidi a monte della giunzione spacer/repeat. Un ulteriore maturazione avviene con un processamento al 3'.

Fase 3: Interferenza

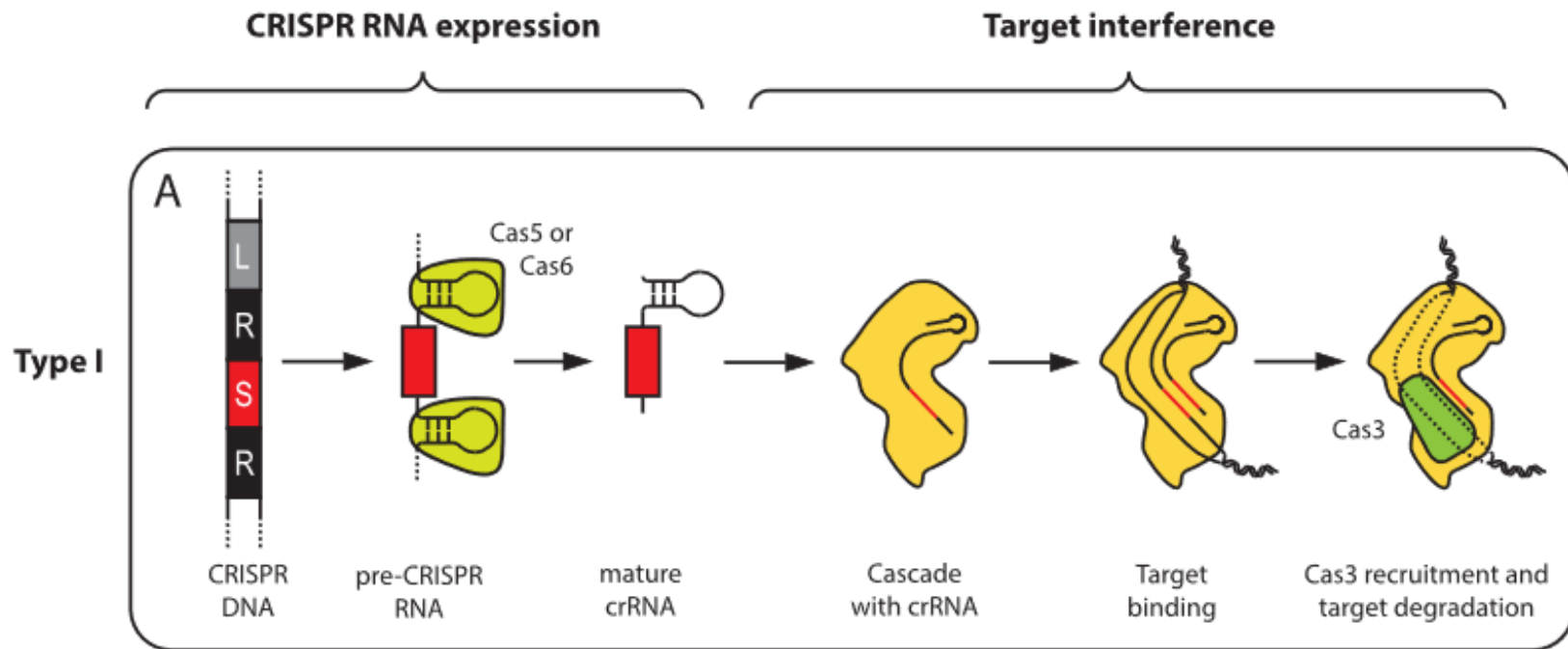


Durante la fase di interferenza l'acido nucleico "invasore" viene tagliato ma con strategie diverse.

Nel Tipo I il crRNA guida il complesso Cascade verso le regioni bersaglio che contengono il DNA complementare che verrà poi tagliato probabilmente dal Cas3. Un ruolo importante per il riconoscimento viene svolto dalle PAM.

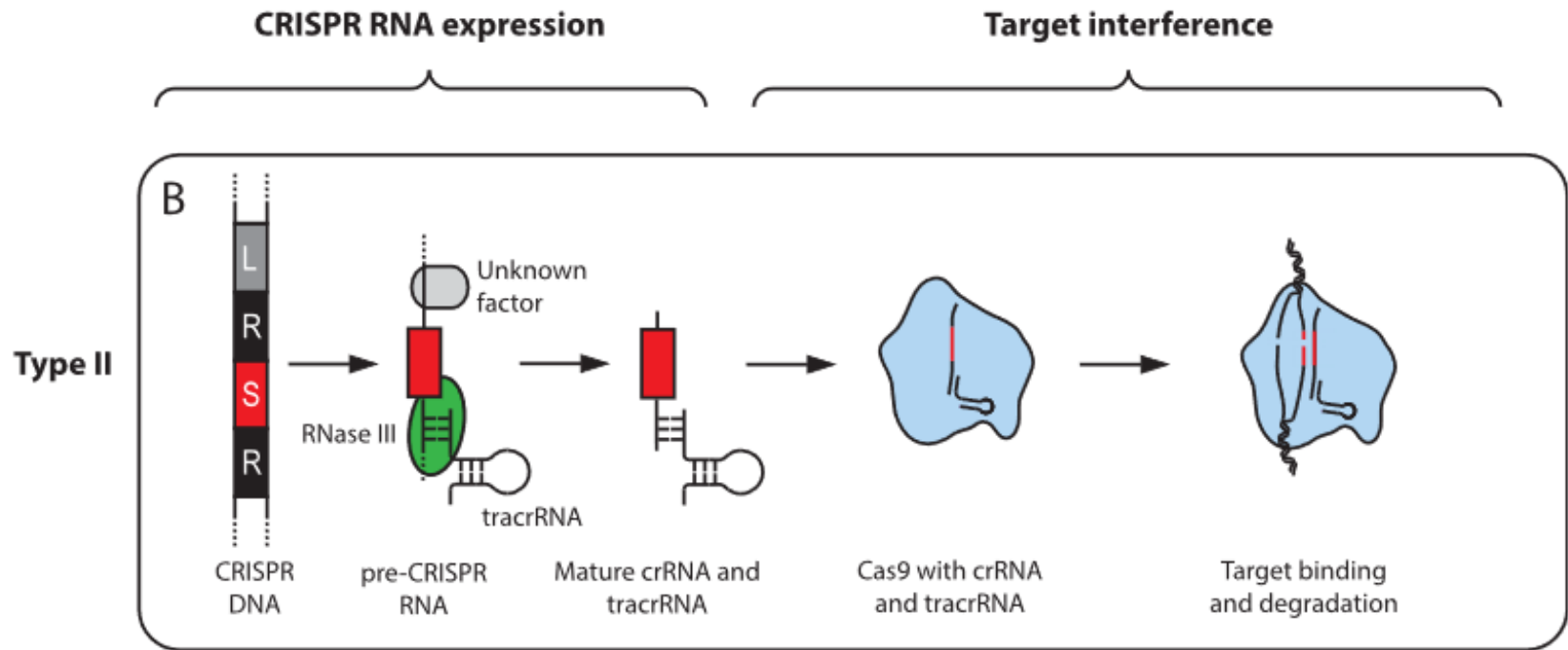
Nel Tipo II Cas9 contenente crRNA punta direttamente il DNA bersaglio con l'aiuto delle PAM.

Nel Tipo III si può avere il riconoscimento sia del DNA che dell'RNA da parte di 2 diversi complessi (Csn o Cmr) ed il successivo taglio da parte di enzimi non ancora identificati

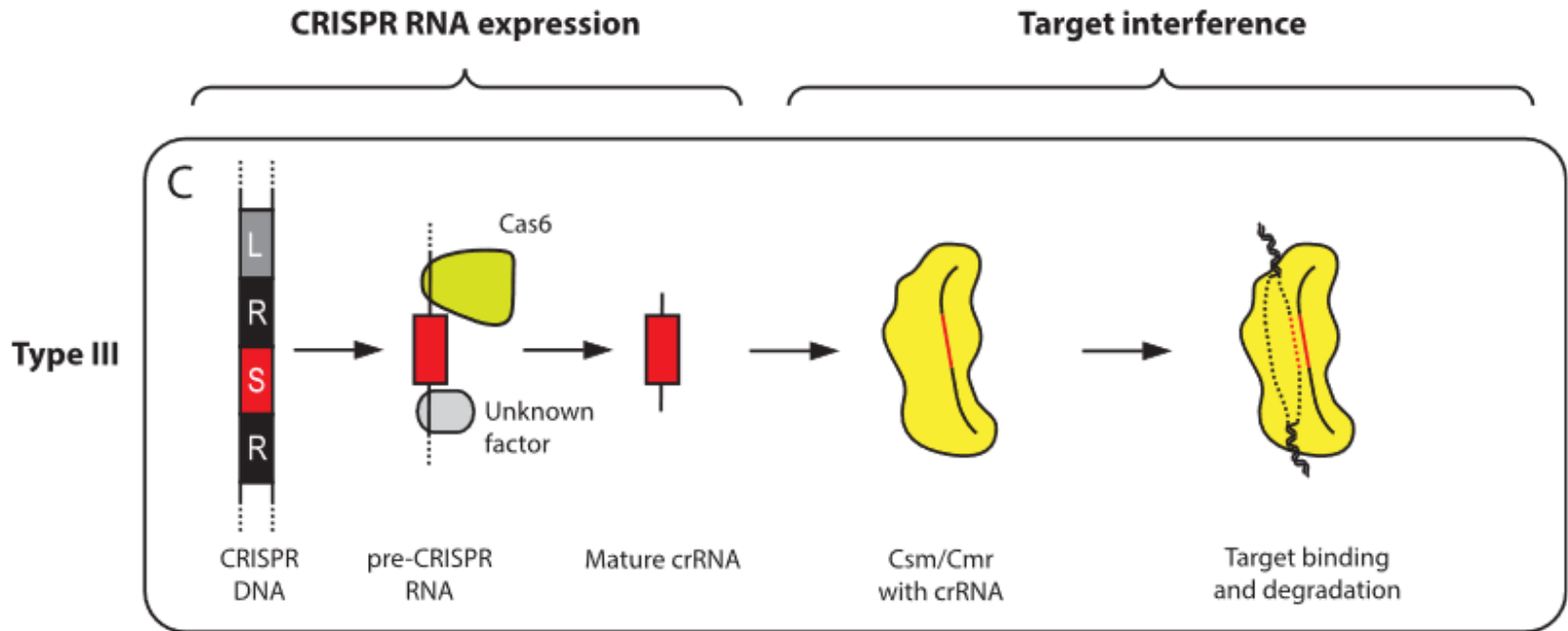


Cas6 e il crRNA sono componenti chiave del complesso Cascade che è un grande complesso multiproteico a forma di dorso di cavallo. Cas5 e 6 legano crRNA.

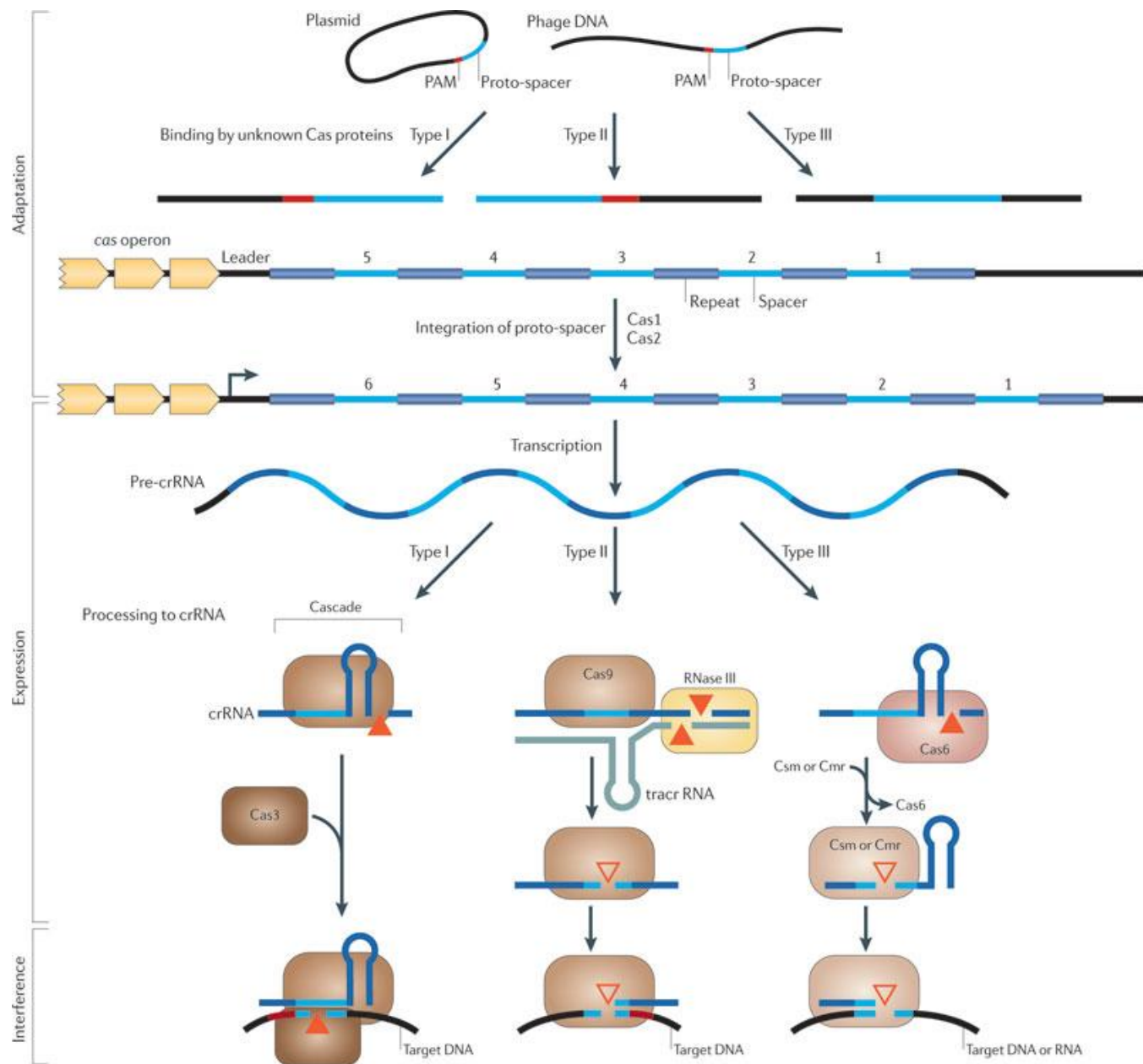
Per l'interferenza è necessaria Cas3 che viene reclutato in seguito al riconoscimento tra crRNA e target in modo da provocarne la degradazione.



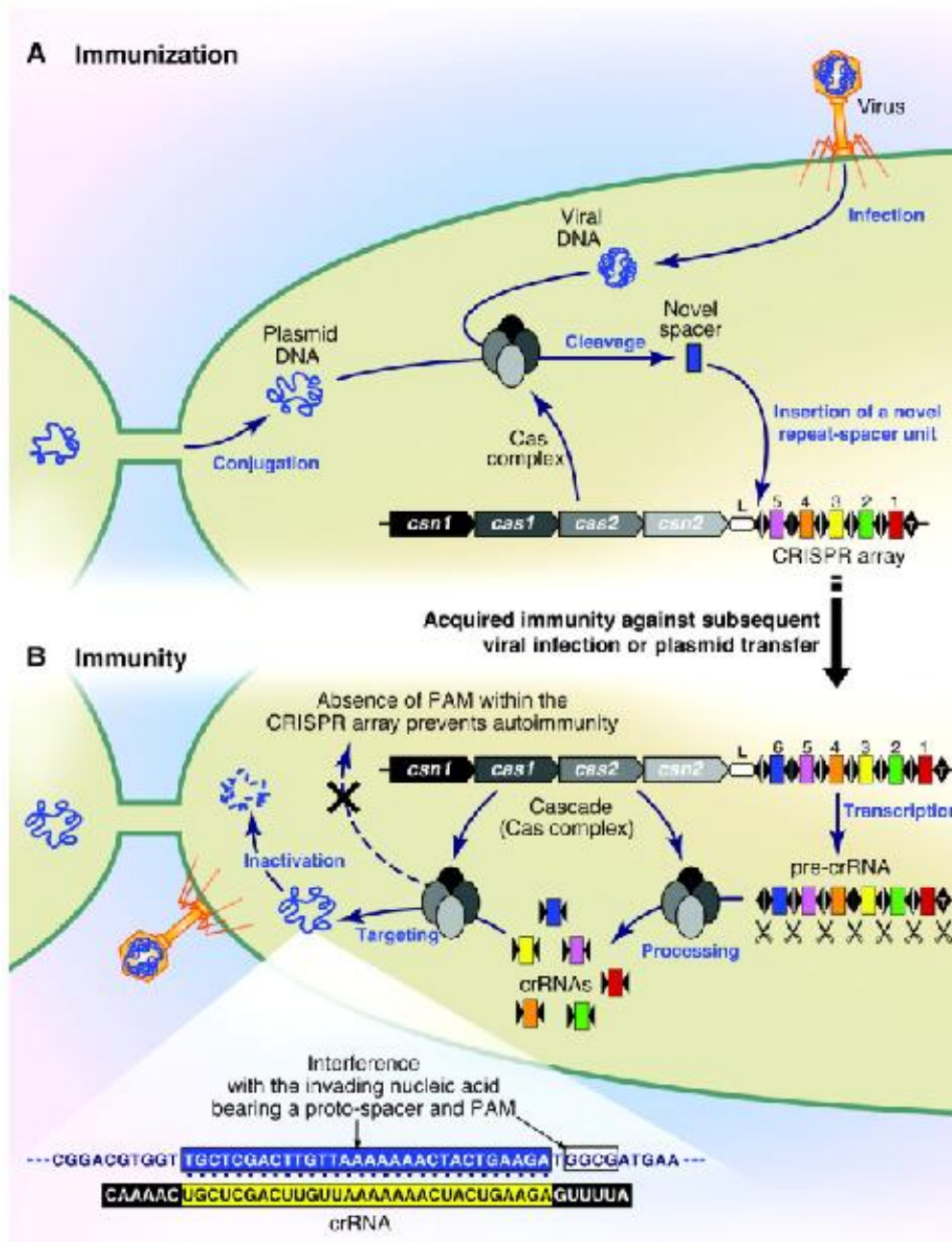
I sistemi di tipo II usano una diversa strategia per la generazione del crRNA in quanto il processamento è dipendente dalla RNasiIII dell'ospite e da un trans encoded sRNA (tracrRNA) che si lega al precrRNA. E' richiesta la proteina Cas9 che porta legato il tracrRNA e crRNA per effettuare il riconoscimento e degradazione



La maturazione del RNA coinvolge Cas6. In seguito tramite un complesso proteico Csm /Csr costituito da diverse proteine si ha il riconoscimento e la degradazione



Ruolo delle CAS protein



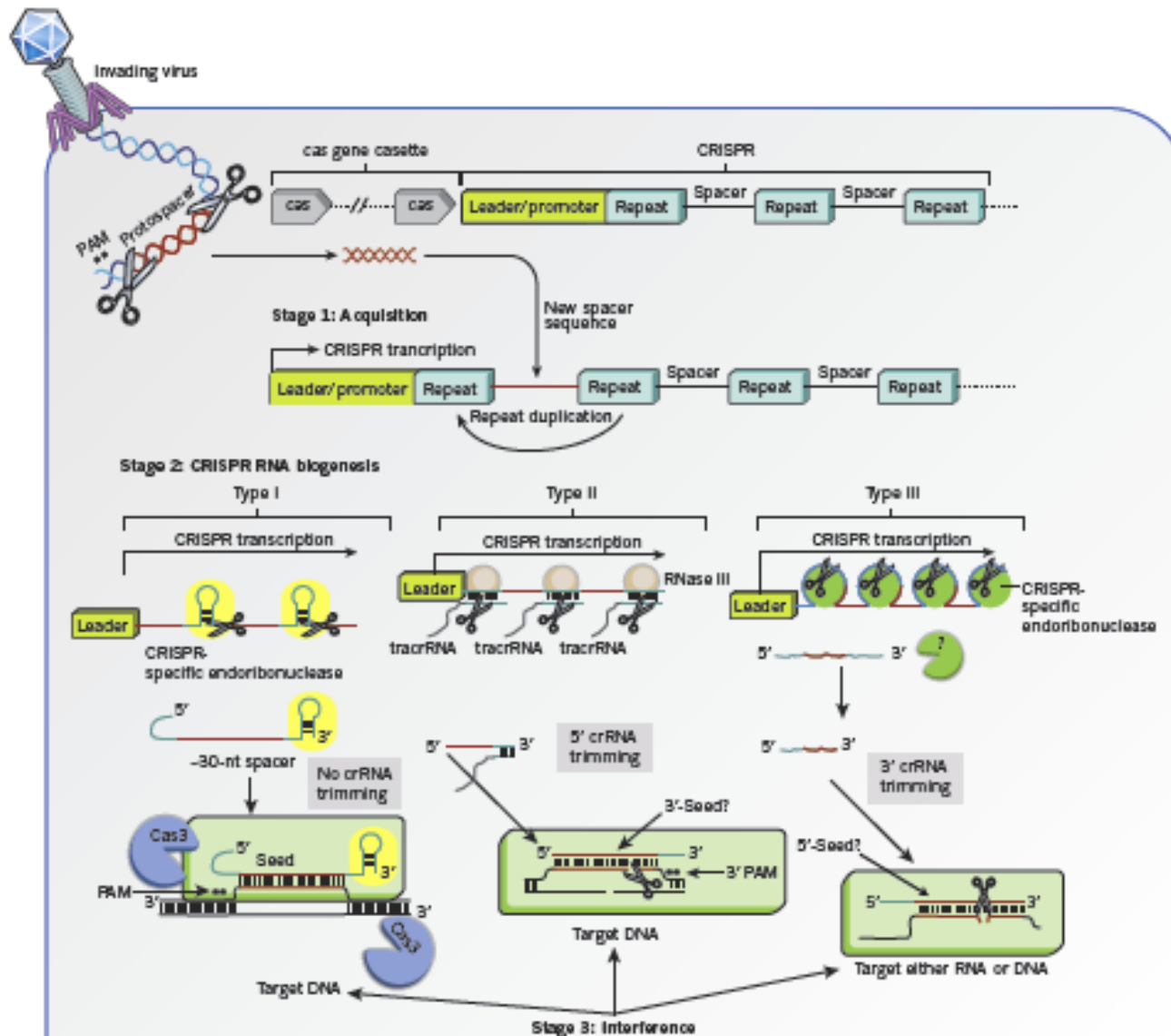
Le proteine CAS sono coinvolte **nell'acquisizione di nuovi spacers** ma contribuiscono a conferire resistenza all'elemento genetico invasivo che può essere un fago o un plasmide

Nella fase di immunità ritroviamo le proteine CAS che **sono essenziali per il processamento del** trascritto pre crRNA.

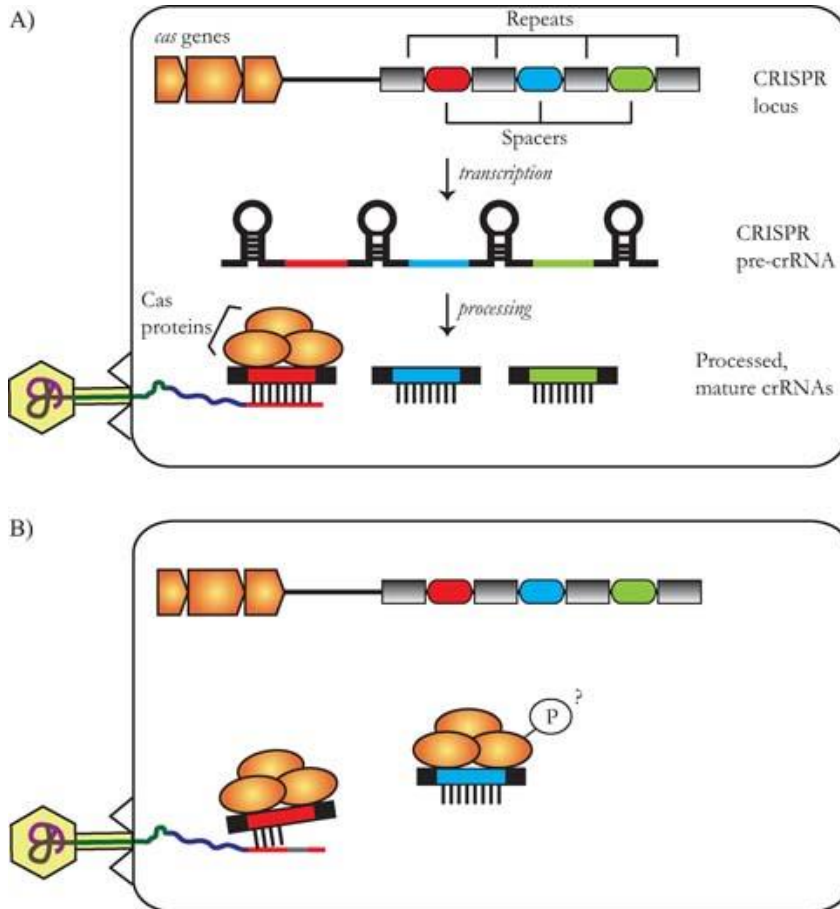
Infine nella fase di interferenza il Complesso CAS **può indirizzare i crRNA verso il target.**

Nell'appaiamento svolge un ruolo importante la sequenza PAM

Visione d'insieme del processo di immunità CRISPR mediato.



The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes



Mechanism of action: transcription from the repeat-spacer CRISPR locus generates a long non-coding RNA, with repeats that may sometimes assume a secondary structure. Cleavage of the repeat sequences by the Cas proteins generates crRNAs that target the phage DNA or RNA, and interfere with phage infection.

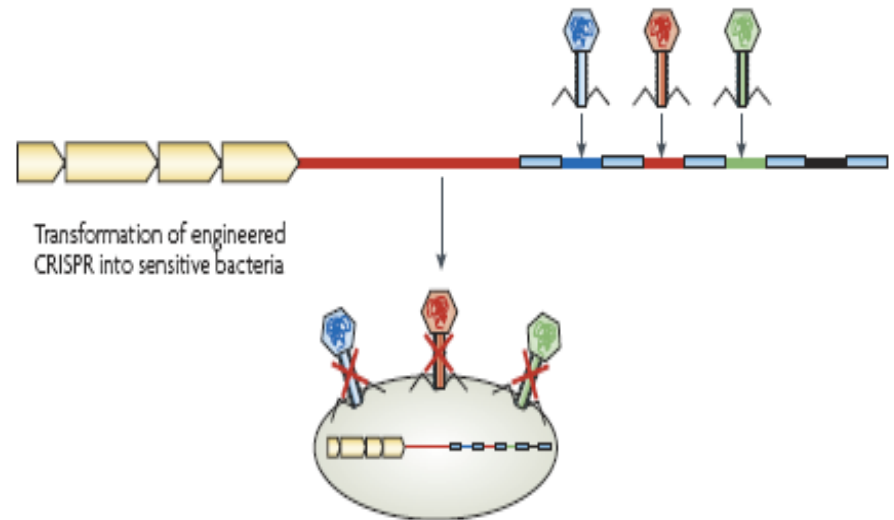
I fagi possono evadere il interferenza CRISPR con mutazioni o ricombinazioni nella sequenza protospacer. Oppure potrebbero fosforilare le CAS

2. Costruzione di ceppi fago-resistenti

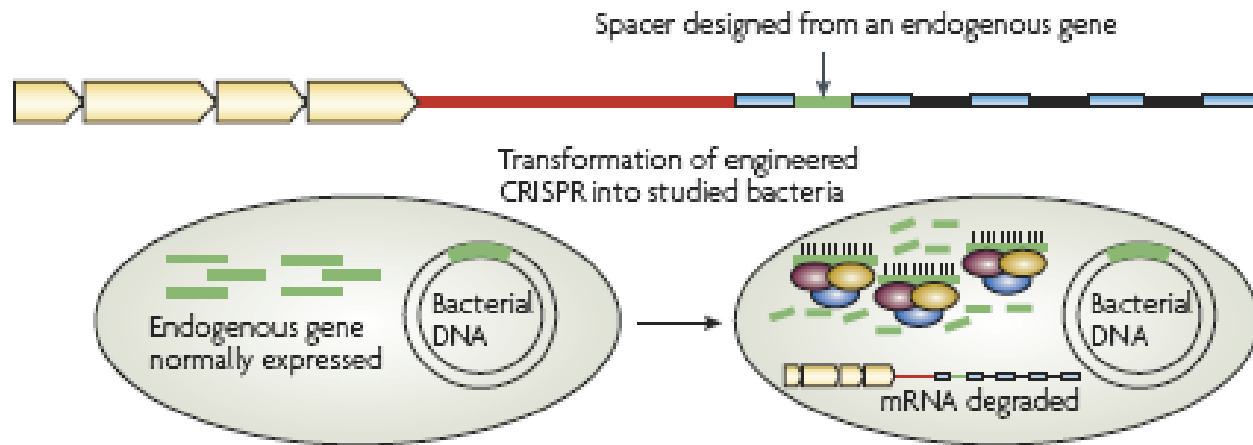
Per molte industrie che utilizzano batteri quali l'industria alimentare e del vino i fagi costituiscono un serio problema che provoca danni ingenti.

Ingegnerizzando i loci CRISPR tramite l'aggiunta in vitro di spacers con sequenze fagiche e poi trasformando questi loci si può indurre resistenza a diversi fagi in batteri sensibili.

Con questa tecnica si può indurre l'immunità nei batteri da utilizzare come starter



3. Silenziamento selettivo di geni

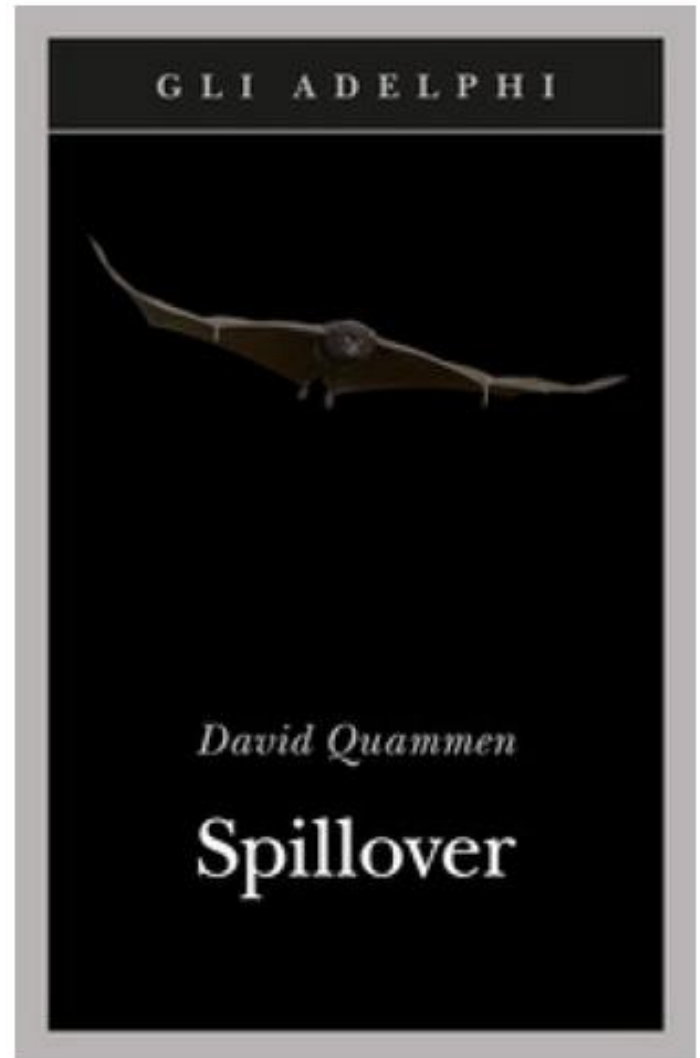


Tenendo conto delle analogie tra il sistema CRISPR ed il sistema di RNA interference degli eucarioti si può introdurre una determinata sequenza all'interno di un locus CRISPR e poi di silenziare il relativo mRNA tramite il sistema CRISPR/CAS.

Si potrebbero costruire dei plasmidi ricombinanti contenenti vari loci CRISPR con spacers idonei per il silenziamento di più geni diversi



Le scoperte correlate al sistema
CRISPR-CAS (2017)



L'origine delle pandemie da virus e
batteri degli animali (2012)

Applicazioni del sistema CRISPR –CAS: 1. Gene therapy

L'applicazione più nota riguarda la dimostrazione che crRNA e tracrRNA possono essere guidati da single guide RNA (sgRNA) verso il target

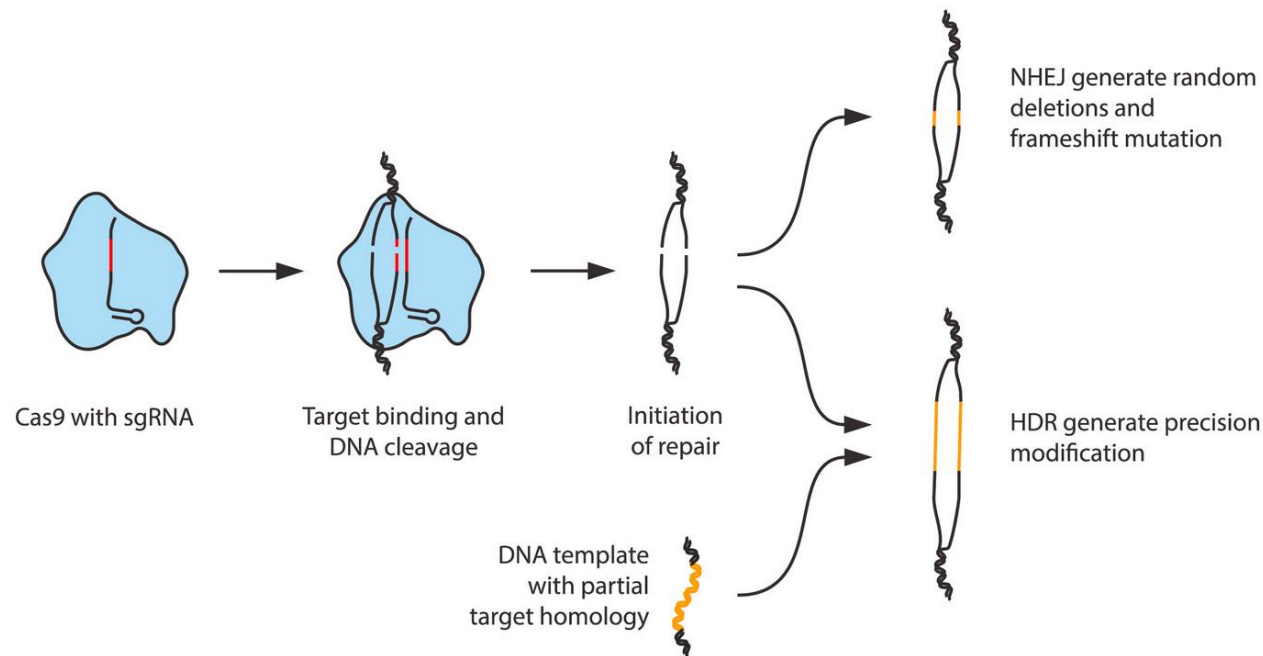


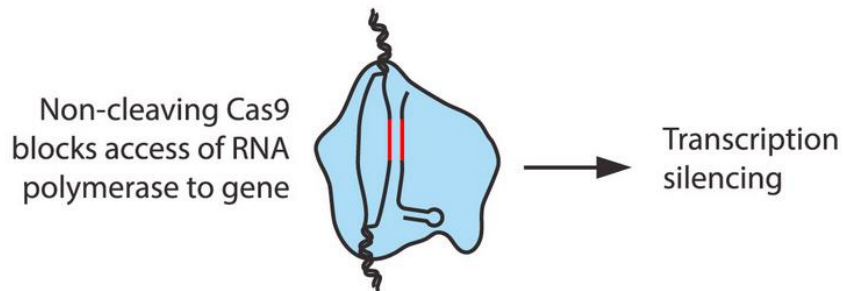
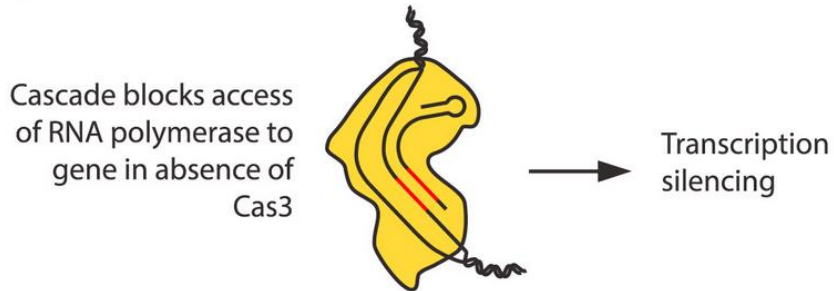
Fig. 5. Examples of basic CRISPR applications. (A) The sgRNA directs Cas9 cleavage of the corresponding target to initiate gene editing. In eukaryotic cells, two main pathways repair DNA damage: Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homology Directed Repair (HDR). NHEJ removes bases, often causing a frameshift and inactivation of the gene. HDR can be used to make specific changes to the target region by providing a designed repair template that becomes inserted in the damaged region. (B)

A differenza di Cas3, che progressivamente degrada il target, Cas9 produce un singolo taglio nel DNA a doppia elica. In seguito i sistemi di riparo dell'ospite forniscono due strategie per indurre alterazioni.

In un caso NHEJ (Non -Homologous End Joining) unisce le estremità ma nel processo può eliminare alcune basi. Nel secondo meccanismo HDR (Homology Directed Repair (HDR) l'allele danneggiato può essere riparato utilizzando frammento con omologia con il target

2. Gene regulation

B



Sia il complesso Cascade che una Cas9 nucleasi difettiva possono essere utilizzati per interferire con il legame della RNA polimerasi o con la fase di allungamento.

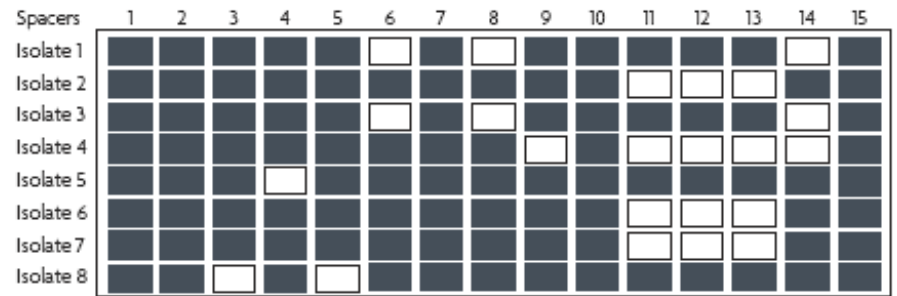
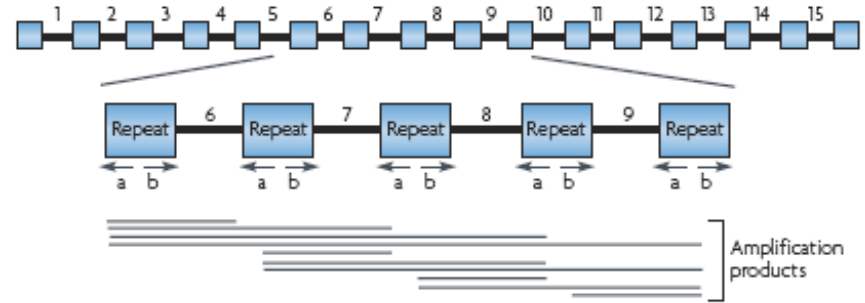
CRISPR–Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated proteins) systems act in three stages: adaptation, expression and interference. In type I and type II CRISPR–Cas systems, but not in type III systems, the selection of proto-spacers in invading nucleic acid probably depends on a proto-spacer-adjacent motif (PAM)^{22, 30, 31}, but how the PAM or the nucleic acid is recognized is still unclear. After the initial recognition step, Cas1 and Cas2 most probably incorporate the proto-spacers into the CRISPR locus to form spacers. During the expression stage, the CRISPR locus containing the spacers is expressed, producing a long primary CRISPR transcript (the pre-crRNA). The CRISPR-associated complex for antiviral defence (Cascade) complex binds the pre-crRNA, which is then cleaved by the Cas6e or Cas6f subunits (in subtype I-E or I-F, respectively), resulting in crRNAs with a typical 8-nucleotide repeat fragment on the 5' end and the remainder of the repeat fragment, which generally forms a hairpin structure, on the 3' flank. Type II systems use a trans-encoded small RNA (tracrRNA) that pairs with the repeat fragment of the pre-crRNA, followed by cleavage within the repeats by the housekeeping RNase III in the presence of Cas9 (formerly known as Csn1 or Csx12). Subsequent maturation might occur by cleavage at a fixed distance within the spacers²⁵, probably catalysed by Cas9. In type III systems, Cas6 is responsible for the processing step, but the crRNAs seem to be transferred to a distinct Cas complex (called Csm in subtype III-A systems and Cmr in subtype III-B systems). In subtype III-B systems, the 3' end of the crRNA is trimmed further²⁸. During the interference step, the invading nucleic acid is cleaved. In type I systems, the crRNA guides the Cascade complex to targets that contain the complementary DNA, and the Cas3 subunit is probably responsible for cleaving the invading DNA²¹. The PAM probably also plays an important part in target recognition in type I systems. In type II and type III systems, no Cas3 orthologue is involved ([Table 2](#)). In type II systems, Cas9 loaded with crRNA probably directly targets invading DNA, in a process that requires the PAM²⁶. The two subtypes of CRISPR–Cas type III systems target either DNA (subtype III-A systems³¹) or RNA (subtype III-B systems²⁸). In type III systems, a chromosomal CRISPR locus and an invading DNA fragment are distinguished by either base pairing to the 5' repeat fragment of the mature crRNA (resulting in no interference) or no base pairing (resulting in interference)³⁰. Filled triangles represent experimentally characterized nucleases, and unfilled triangles represent nucleases that have not yet been identified.

Applicazioni dei CRISPR

1. SPOLIGOTYPING.

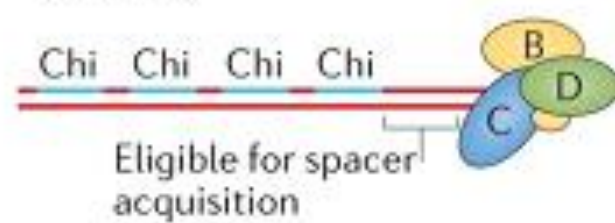
Prima ancora di capire quale fosse il ruolo funzionale dei CRISPR ,questi loci vennero utilizzati per la classificazione dei ceppi di *M.tuberculosis* .

Questa tecnica si basa sull'utilizzazione di oligo disegnati sulla base dei repeat in modo da amplificare le regioni CRISPR. I probes che riconoscono spacer noti vengono poi fissati su una membrana ed ibridati con i diversi prodotti di amplificazione. La presenza / assenza di ibridazione permette di raggruppare i diversi ceppi. Utilizzata per tipizzare *Corynebacterium diphtheriae* e recentemente *Lactobacillus*

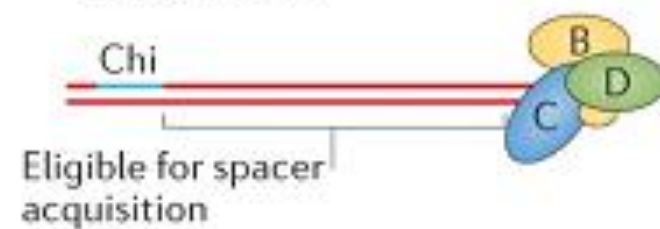


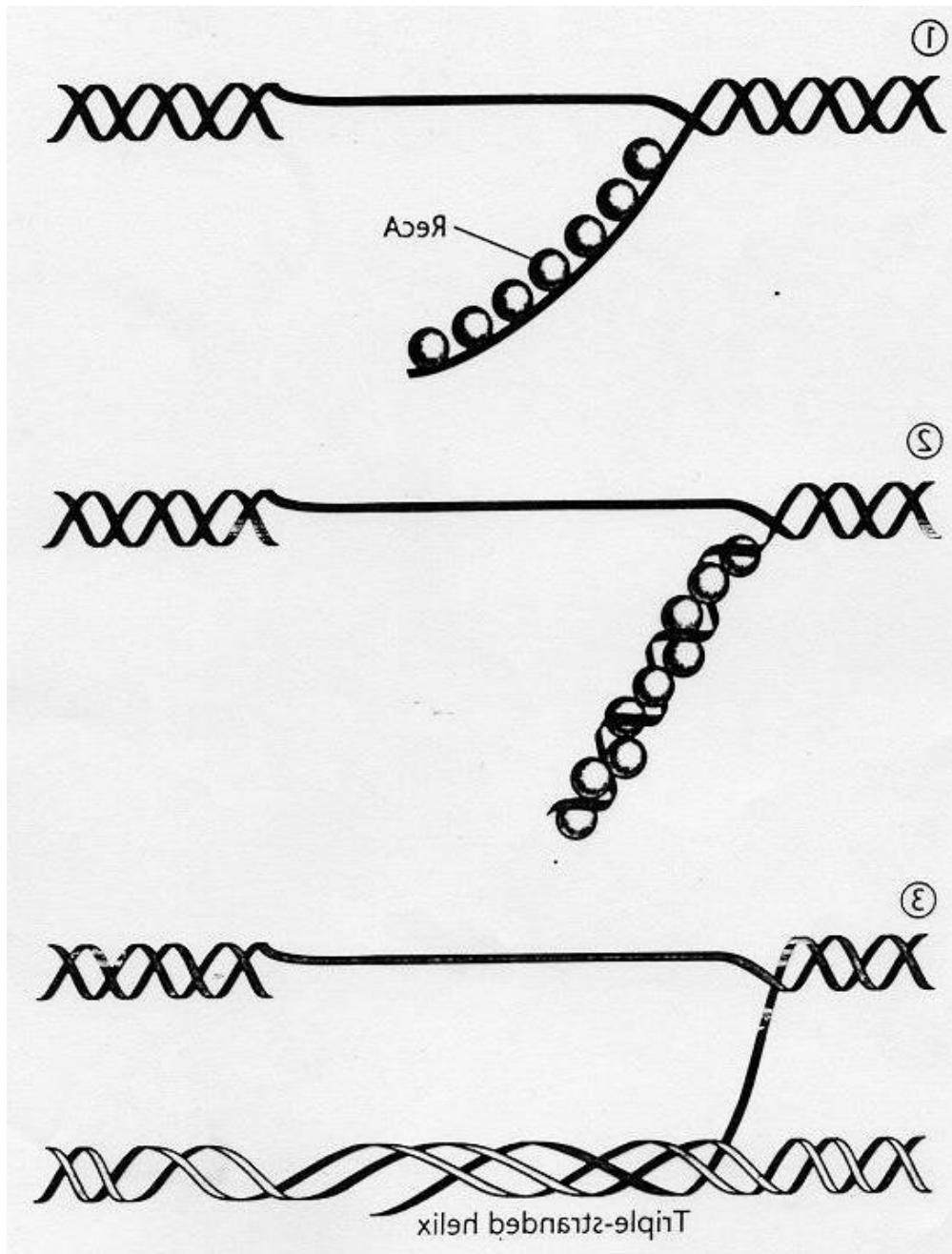
b

Self DNA



Foreign DNA





RecA si lega al DNA a singolo filamento formando un complesso RecA-ssDNA che può invadere una molecola di DNA a doppia elica formando il complesso

ssDNA-RecA-dsDNA

Per questo è necessario il complesso costituito dalle proteine

RecB - RecC - RecD

Il Complesso RecBCD è un complesso multifunzionale

- dotato di attività nuclesica su DNA ss e ds
- dotato di attività elicasica
- dotato di attività ATPasica (idrolizza ATP)

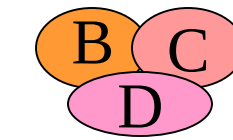
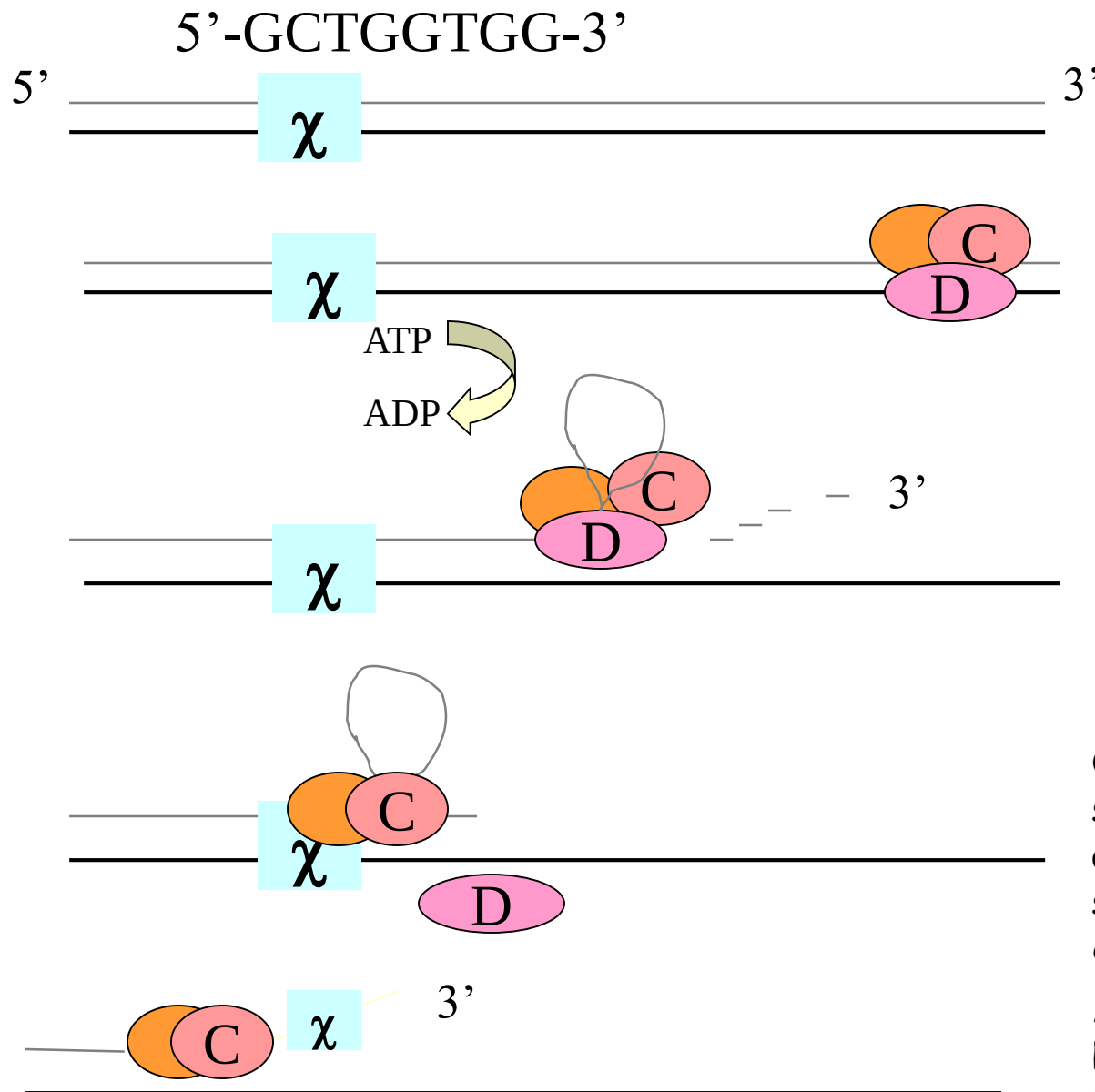
Le sequenze Chi(χ)

E.coli contiene un numero molto elevato di sequenze chi(χ)

Sequenza specifica di basi (5' GCTGGTGG 3')

Nel cromosoma di *E.coli* è presente

una sequenza Chi circa ogni 5 kb

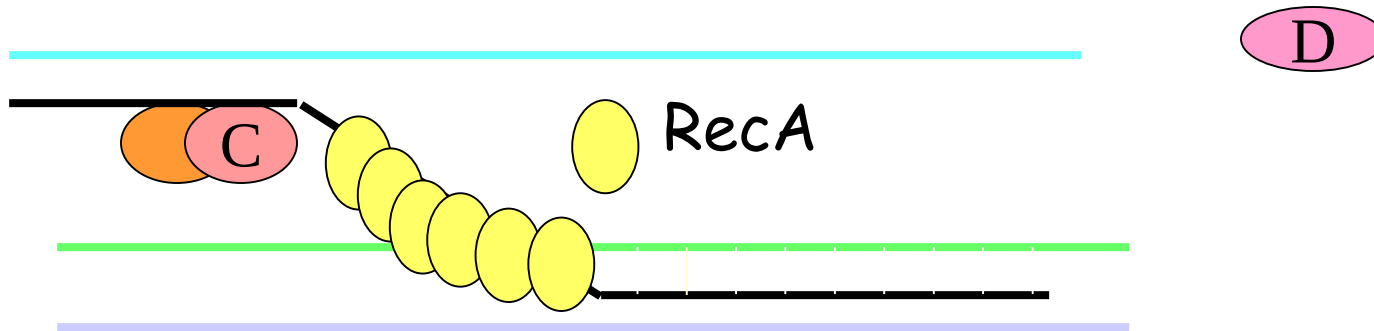


Il complesso RecBCD si lega
Al DNAs

RecBCD usa ATP per
muoversi sul DNAs e
degrada 3'-5' (ExoV)
Grazie alla sua attività
elicasica svolge il DNA più
rapidamente di quanto lo
degradi

Quando il complesso arriva al
sito X la subunità D dotata di
attività esonucleasica si
stacca mentre l'elicasa
continua a svolgere il DNA

A questo punto se è presente
RecA, ATP e una molecola di
DNA complementare può
avvenire ricombinazione



Grazie a questo processamento mediato dal complesso RecBCD si può creare una regione di DNA a singolo filamento.

RecA sarà in grado di riconoscere e legarsi a questo filamento di ssDNA

Si potrà avere il processo di ricombinazione per invasione di una regione omologa di dsDNA da parte del complesso RecA-ssDNA

Oltre al sistema RecBCD svolge un ruolo importante nella selezione del DNA fagico da inserire :

- i sistemi di restrizione e modificazione dell'ospite che possono degradare il DNA fagico
- la presenza nella popolazione di particelle fagiche difettive che non sono in grado di dare il via immediatamente ad un ciclo litico e vengono quindi frammentate