

УДК 577.2

МИКРОБНЫЙ АРСЕНАЛ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ. ГЛАВА I

Обзор

© 2021 А.Б. Исаев^{1*}, О.С. Мушарова^{1,2}, К.В. Северинов^{1,3*}

¹ Сколковский институт науки и технологий, 143028 Москва, Россия; электронная почта: tcft18@gmail.com

² Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; E-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 10.08.2020

После доработки 18.08.2020

Принята к публикации 12.09.2020

Бактериофаги или фаги представляют собой вирусы, которые инфицируют бактериальные клетки (в рамках этого обзора мы также рассмотрим вирусы, которые инфицируют архей). Постоянная угроза заражения фагами является одной из основных движущих сил эволюции бактериальных геномов. Чтобы противостоять инфекции, бактерии выработали многочисленные защитные стратегии, позволяющие избежать распознавания фагами или прямо препятствующии размножению фагов внутри клетки. Исследования бактериофагов и бактериальных систем защиты были исторически тесно переплетены с развитием методов классической молекулярной биологии и геномной инженерии. В настоящее время благодаря распространению фаговой терапии, широкому применению технологий CRISPR-Cas и развитию биоинформатических подходов, которые облегчают задачу обнаружения новых систем, исследования в области биологии фагов переживают возрождение. В настоящем обзоре описываются различные стратегии, используемые микробами для того, чтобы противостоять фаговой инфекции. Особое внимание уделено новым защитным системам, открытым в последние годы. Первая глава обзора посвящена защите связанной с поверхностью клетки, роли малых молекул, а также системам врожденного иммунитета, зависящим от модификации ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, взаимодействия бактериофагов с клетками-хозяевами, антивирусная защита, иммунные системы, CRISPR-Cas, рестрикция-модификация, BREX, DISARM, фосфоротиоат, системы Dnd.

DOI: 10.31857/S0320972521030076

ВВЕДЕНИЕ

Фаги встречаются в любой природной среде и считаются самыми распространенными биологическими существами на Земле [1–3]. Расчетное количество фаговых частиц может достигать примерно 10^{10} /литр в морской или пресной воде и 10^9 /грамм – в почве. Считается, что количество фагов превышает количество их микробных хозяев в 10 или более раз [4, 5]. Фаги играют важную экологическую роль, контролируя размер и разнообразие микробных популяций [6], а

индуцируемый фагами лизис клеток обеспечивает поступление питательных веществ в пищевые цепи [7]. Фаги значительно ускоряют латеральный перенос генов, и медицински значимые бактериальные признаки часто ассоциируются с профагами [8]. Гены клетки-хозяина могут быть включены в вирусный геном или упакованы в вирусный капсид при генерации транслицирующих частиц [9]. Кроме того, бактерии могут продуцировать фагоподобные частицы (Gene Transferring Agents), несущие ДНК хозяина [10]. Распространение плазмид также

Принятые сокращения: МТаза – метилтрансфераза (MTase); ЭР – эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза (REase, Restriction Endonuclease); BREX – система исключения бактериофагов (Bacteriophage Exclusion); CRISPR-Cas – кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins); DISARM – система защитных островков, ассоциированная с рестрикцией-модификацией (Defence Island System Associated with Restriction-Modification); Dnd – фенотип, ассоциированный с деградацией ДНК (DNA Degradation phenotype); DPD – 7-дезапурин в ДНК; ECM – внеклеточный матрикс (Extracellular Matrix); LPS – липополисахарид; OMV – везикула на основе внешней мембраны (Outer Membrane Vesicle); Pgl – система ограничения роста бактериофагов (Phage Growth Limitation); PLD – фосфолипаза D; PT – фосфоротиоат (phosphorothioate); pVip – прокариотический белок вайперин (prokaryotic Viperin); QS – определение кворума (Quorum Sensing); RBP – рецептор-связывающий белок (Receptor Binding Protein); R-M – рестрикция-модификация (Restriction-Modification); SAM – S-аденозилметионин (S-Adenosyl Methionine); Sie – исключение суперинфекции (Superinfection Exclusion); TA – токсин-антитоксин; TRD – домен, распознающий мишень (Target Recognition Domain).

* Адресат для корреспонденции.

облегчается при фаг-индуцированном лизисе клеток [11].

Теоретические выкладки и математические модели предполагают, что в любой системе репликаторов неизбежно возникают паразитические или эгоистичные элементы, поэтому для достижения их стабильного сосуществования необходимы стратегии противодействия [12–14]. Таким образом, наличие фагов и защитных систем клеток-хозяев можно рассматривать как фундаментальное свойство прокариотических клеток. Миллиарды лет совместной эволюции привели к развитию широкого круга стратегий нападения и защиты, используемых вирусами и их хозяевами. Гены, ассоциированные с защитой клеток от фагов, могут составлять до ~10% генома бактерии [15]. Традиционно, открытие систем защиты клеток от фагов было связано с отбором устойчивых к действию фага штаммов и описанием их специфических свойств. Недавнее увеличение доступности геномных данных и применение биоинформатических подходов значительно расширили эту область науки и позволили провести систематическое предсказание новых кластеров генов защиты от фагов. Популярный подход «вины по ассоциации» (guilt by association) основывается на факте, что функционально связанные гены часто совместно локализованы в геноме [16]. Используя ген с известной функцией в качестве «приманки», можно оценить вероятность обнаружения соседних генов вблизи от «приманки» в различных геномах и предсказать их возможные функциональные связи [17]. Применение этого подхода к известным системам защиты от фагов позволило ввести важное понятие защитных островков — геномных локусов, содержащих кластеры генов противовирусной защиты [18]. Отдельный геном может содержать несколько защитных островков. Часто они ассоциированы с мобильными генетическими элементами, которые вносят важный вклад в горизонтальный перенос генов защитных систем [19, 20]. Поскольку ~2/3 генов, обнаруженных в защитных островках, не были связаны с известными системами защиты, было предсказано существование множества новых типов противовирусных систем [18]. Недавно в результате проведения систематического анализа встречаемости всех rfam белковых доменов в островках защиты в микробном пангеноме были предсказаны примерно 300 семейств генов, которые преимущественно встречаются в ассоциации с известными защитными генами. Среди них гены, которые имели тенденцию образовывать консервативные кластеры, были предположены в качестве кандидатных защитных систем, и не-

которые такие кластеры были исследованы экспериментально. Это привело к валидации десятка новых типов противовирусных систем [21, 22]. Несмотря на то что в последние годы наше понимание обилия типов защитных систем значительно расширилось, можно ожидать, что была раскрыта всего лишь небольшая часть их реального разнообразия, поскольку подавляющая часть геномных данных рассматривается как «темная материя», а защитные островки, состоящие исключительно из генов с неизвестной функцией, не обнаруживаются с помощью современных методов [23]. Дальнейшее совершенствование алгоритмов, использование более точной классификации белковых доменов или применение методов глубокого обучения, уже доказавших свою полезность в прогнозировании функций генов [24–26], должно способствовать дальнейшему продвижению в этой области. В то же время обнаружение новых систем сопряжено с задачей характеристики их биохимических функций, и в настоящее время механизмы противовирусной защиты для большинства новых систем остаются невыясненными.

Общая схема защитных стратегий, действующих на различных стадиях жизненного цикла вируса, представлена на рис. 1. Устойчивость микроорганизмов к действию фагов может быть связана с активностью специфических иммунных систем, основной функцией которых является ингибирование размножения чужеродного генетического материала, или с мутациями и фазовыми вариациями в генах хозяина, которые необходимы для продуктивной вирусной инфекции. Устойчивость к действию фагов также может быть связана с малыми молекулами [27] или с активностью мобильных генетических элементов, препятствующих вирусной инфекции (таких как индуцированные фагами хромосомные островки (PICI, phage-inducible chromosomal islands) и индуцированные фагами элементы подобные хромосомным островкам (PLE, phage-inducible chromosomal island-like element)), которые в некотором смысле можно рассматривать как паразиты паразитов [28, 29]. Иммунные системы часто полагаются на распознавание специфических сайтов в чужеродной нуклеиновой кислоте или иным образом чувствуют фаговую инфекцию, чтобы инициировать ингибирующий ответ. Чтобы избежать токсического воздействия, связанного с несвоевременной активацией, используются различные механизмы дискриминации собственных и чужеродных молекул. Защитные системы можно подразделить на врожденный иммунитет (включая различные типы рестрикции-модифи-

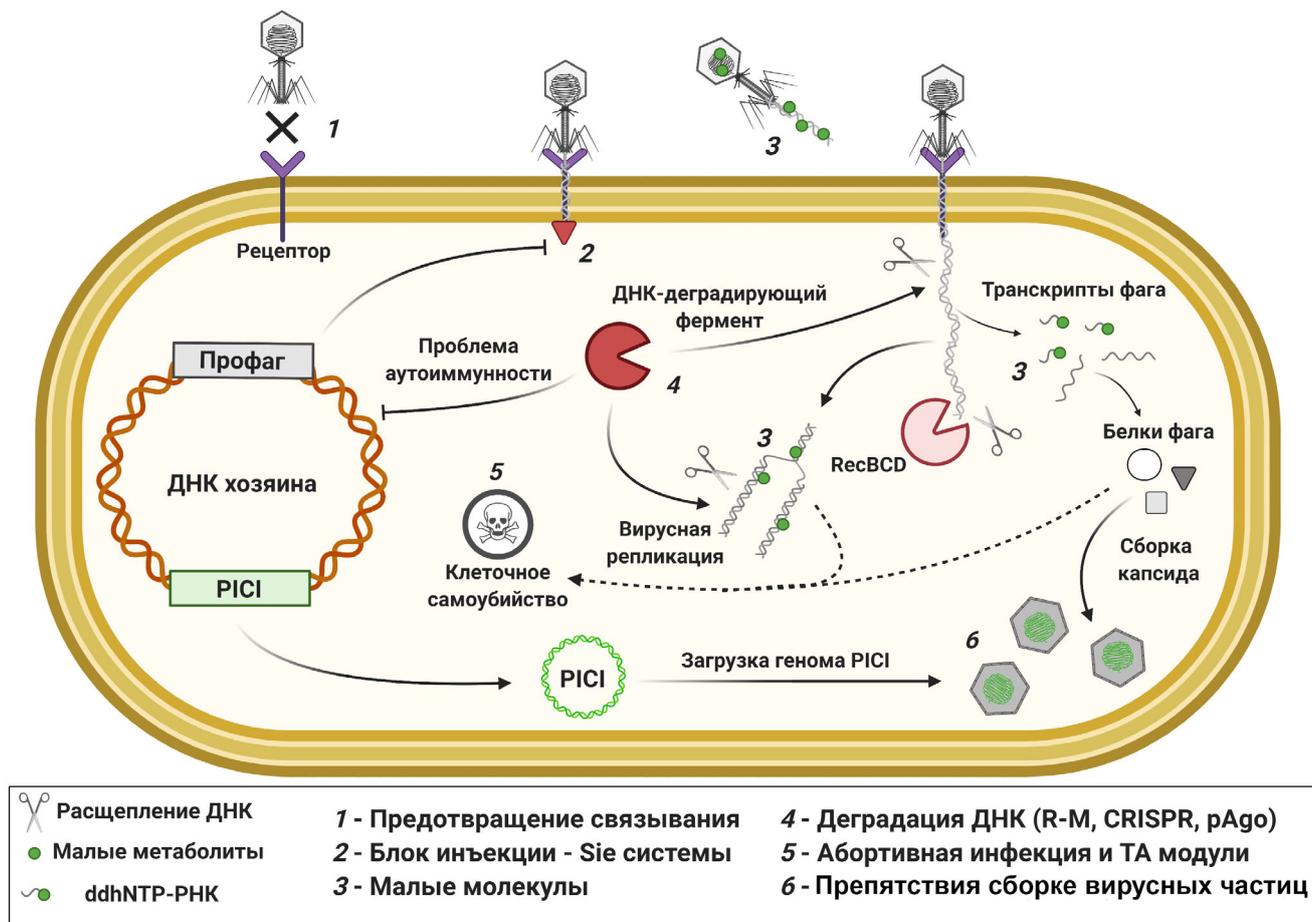


Рис. 1. Общая схема стратегий противовирусной защиты бактерий, действующих на различных стадиях жизненного цикла вирусов. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

кации (R-M), систему исключения бактериофагов (BREX), систему защитных островков, ассоциированных с рестриктией-модификацией (DISARM), токсин-антитоксин (ТА), abortивную инфекцию (Abi) и множество менее изученных систем) и CRISPR-Cas-опосредованный адаптивный иммунитет (кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки). Онлайн базы данных, посвященные прокариотическим иммунным системам, включают REBASE – собрание известных систем R-M [30], TASmania, специализирующаяся на системах ТА [31], CRISPRminer и CRISPRCasdb для систем CRISPR-Cas [32, 33] и PADS, содержащую аннотации генов, ассоциированных с различными типами защиты [34]. Таксономическое распределение белковых доменов, связанных с противовирусной защитой, также можно посмотреть в AnnoTree [35].

Поскольку геномы фагов кодируют лишь ограниченное число генов, они в большинстве

случаев используют аппарат бактериальной клетки для собственной транскрипции и трансляции [36] и часто полагаются на белки клетки-хозяина в качестве кофакторов, как в случае тиоредоксина, который необходим для активности ДНК-полимеразы фага T7 [37]. Во многих исследованиях была показана важность генов клетки-хозяина для эффективной вирусной инфекции, включая работы с KEIO-коллекцией нокаутов отдельных генов *Escherichia coli*, специфическим ингибированием конкретных генов при помощи dCas9 или мутагенеза путем вставки транспозонов [38–44]. Мутации в несущественных генах, необходимых для размножения фагов, являются широко распространенным способом приобретения устойчивости, впервые описанным в классических экспериментах Luria и Delbruck [45].

Практически для каждой известной стратегии микробной защиты фаги выработали средства преодоления, и описание кодируемых фа-

гами ингибиторов новых защитных систем остается лишь вопросом времени [25, 26, 46]. Было высказано предположение, что, подобно защитным островкам, анти-рестрикторные гены имеют тенденцию образовывать кластеры в геномах фагов или в мобильных генетических элементах. Существование таких островков «противо-защиты» должно способствовать открытию новых ингибиторов защиты хозяина [47]. Описание вирусных стратегий противодействия бактериальной защите выходит за рамки настоящего текста, и с этой темой можно ознакомиться в других обзорах [48–50].

Первая глава настоящего обзора будет посвящена микробным стратегиям, позволяющим избежать распознавания фагами, механизмам врожденного иммунитета, блокирующим ранние стадии инфекции, и системам, которые полагаются на модификацию ДНК с целью дискриминации собственного и чужеродного геномов. Вторая глава будет посвящена адаптивным системам иммунитета и защитным механизмам, активирующимся на поздних стадиях инфекции.

ПРОСТЕЙШИЙ ПУТЬ ЗАЩИТЫ – ОСТАТЬСЯ НЕЗАМЕЧЕННЫМ

Фаговая инфекция инициируется при распознавании специфических рецепторов на поверхности клетки фаговым рецептор-связывающим белком (RBP). В качестве рецепторов бактериофагов могут выступать различные типы молекул, которые располагаются на поверхности клеток, в том числе пили и жгутики, белки, липополисахариды (LPS) или углеводы. Взаимодействие между RBP фага и рецептором клетки-хозяина может рассматриваться как лимитирующая стадия инфекционного процесса, по крайней мере, с точки зрения определения спектра подходящих для инфицирования клеток-хозяев [51–53]. Для того, чтобы остаться незамеченными для фагов, прокариоты используют маскировку рецепторов, их модификации и мутации или продуцируют везикулы-ловушки (рис. 2).

Роль внеклеточного матрикса (ECM) и везикул внешней мембраны (OMV). Многие бактерии способны выделять высокомолекулярные поли-

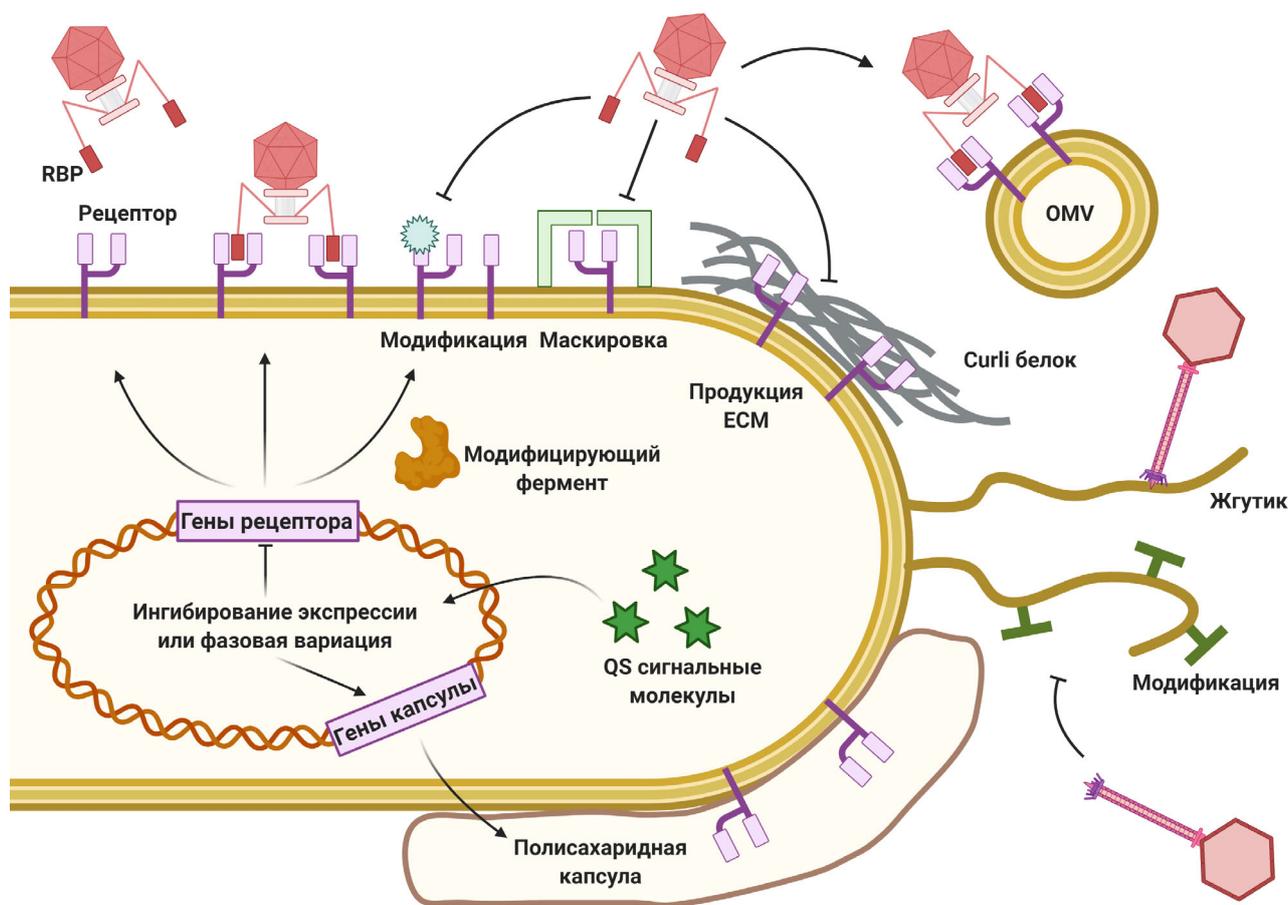


Рис. 2. Микробные стратегии, позволяющие предотвратить распознавание фагами

меры, формирующие ЕСМ, а пространственно-структурированные сообщества клеток, окруженные ЕСМ, образуют биопленки [54, 55]. Хотя подробности взаимодействий фагов и клеток-хозяев в биопленках полностью не выяснены [56], было показано, что микробные сообщества в биопленках более устойчивы к действию вирусов. Повышенное давление со стороны фагов даже может приводить к усиленному образованию биопленок, в которых поверхностные клеточные рецепторы становятся менее доступными для вирусов [57, 58]. Другим преимуществом пространственной организации является то, что в окружающей среде фаги могут воздействовать только на поверхностный слой клеток. Часто расположенные в этом слое клетки метаболически неактивны и таким образом не позволяют размножаться фагам, снижая при этом шансы атаки на нижележащие клетки [59]. Компоненты ЕСМ также могут выполнять функцию ловушек или «поглотителей», которые адсорбируют и иммобилизуют фаги еще до того, как последние достигнут поверхности клеток [60, 61]. Было показано, что белки *csgI*, являющиеся компонентами ЕСМ, ассоциированы с повышенной фагорезистентностью биопленок *E. coli*, в то время как секреция экзополисахарида альгината защищает клетки *Pseudomonas fluorescens* [62, 63]. Другим способом предотвращения адсорбции фагов является образование полисахаридной капсулы [64], например, повышенная продукция колановой кислоты ассоциируется с устойчивостью клеток *Escherichia* к различным фагам, и в результате фаговой инфекции может произойти отбор мукоидных клеток с мутациями в сигнальном пути RCS, контролирующем эту функцию [44, 65]. Роль ловушек также была показана для внеклеточных везикул, образуемых клетками *Vibrio* и *Escherichia*. Такие везикулы, содержащие поверхностные рецепторы, могут адсорбировать фаги, тем самым понижая их титр в окружающей среде [66, 67]. С другой стороны, для *Bacillus* было показано, что везикулы, переносящие рецепторы, могут встраиваться в мембрану других невосприимчивых клеток, делая их чувствительными к инфекции [68].

Изменения структуры рецепторов. Адсорбцию фагов часто можно рассматривать как двухэтапный процесс, в котором на первой стадии происходит обратимое связывание фага с экспонированными на поверхности клетки структурами (например, фаг T5 связывается с O-антигеном LPS на поверхности клеток *E. coli*, в то время как фаг SSP1 связывается с тейхоевой кислотой клеточной стенки *Bacillus subtilis*). Затем происходит необратимое прикрепление ко вторичному рецептору (например, к белкам

FhuA или YueB в случае T5 или SSP1 соответственно) [51]. Изменения первичных и вторичных поверхностных рецепторов являются распространенным способом приобретения резистентности к фагам [69]. Даже точечные мутации в генах белков-рецепторов могут влиять на эффективность взаимодействия с фаговыми RBP, как было показано, например в случае рецептора FhuA фага T5 или рецептора LamB фага λ [70, 71]. Мутации, затрагивающие пути биосинтеза, которые ответственны за синтез компонентов клеточной стенки (LPS — у грамотрицательных бактерий или тейхоевой кислоты — у грамположительных бактерий), могут приводить к изменению структуры этих молекул и таким образом оказывать влияние на процесс распознавания клеток фагами, нацеленными на эти рецепторы [72, 73]. Внеклеточные супраструктуры бактерий также могут служить в качестве рецепторов фагов, и известно, что мутации в генах, участвующих в образовании пилей или жгутиков, могут обеспечить защиту от фагов [74, 75].

Мутации рецепторов вряд ли можно рассматривать непосредственно как стратегию защиты, поскольку фаговая инфекция лишь отбирает в популяции ранее существовавшие резистентные клетки. В то же время специфические механизмы, контролирующие доступность рецепторов, также существуют. Молекулы на поверхности клетки вовлечены во многие важные для прокариот процессы, включая подвижность или транспорт питательных веществ, и их мутации могут быть связаны с издержками на поддержание жизнедеятельности клеток. Поэтому фазовые вариации (обратимое переключение экспрессии генов) или маскировка рецепторов могут быть более безопасной долгосрочной стратегией по сравнению с мутациями [76, 77]. Маскировка включает синтез молекул, которые связываются с рецепторами хозяина и физически блокируют взаимодействие с фаговыми RBP, как в случае связывания белка TraT с рецептором OmpA у *E. coli* [78]. Временные химические модификации рецепторов также могут препятствовать их распознаванию. В качестве примеров можно привести гликозилирование пилей у *Pseudomonas aeruginosa* или глюкозилирование O-антигена клеток *Salmonella enterica* [79, 80]. Транскриптомные исследования показали, что маскирующие изменения рецепторов могут быть частью общего ответа на стресс как в случае *Lactococcus lactis*, когда фаговая инфекция активирует гены, ответственные за D-аланилирование клеточной стенки [81]. Снижение уровня экспрессии рецепторов путем фазовой вариации может быть достигнуто рекомбинацией или предрасположенными изменениями в про-

моторных областях [82, 83], в то время как мутации в специфических «горячих точках» внутри генов могут привести к сдвигу открытой рамки считывания и образованию укороченной формы белка [84]. Системы, допускающие множественные инверсии, известны как шаффлоны, и также могут быть вовлечены в регуляцию экспрессии рецепторов [85], как в случае PtlV, кодируемого плазмидой IncI из *E. coli*, где для экспрессии белка может быть выбран один из семи вариантов его С-концевого участка [86]. Было показано, что распространенный симбионт кишечника человека *Bacteroides thetaiotaomicron* использует фазовую вариацию, по крайней мере в 19 локусах, контролируя продукцию различных типов капсул и экспрессию белков S-слоя [87]. Фазовые вариации допускают сосуществование микробных субпопуляций, экспрессирующих различные варианты генов, что позволяет им найти баланс в защите от фаговых инфекций и воздействия факторов окружающей среды.

Структура клеточной стенки архей сильно отличается от бактериальной, и процесс прикрепления вирусов к поверхности клеток архей изучен довольно слабо [88]. Недавно была впервые предложена структурная модель связывания археофага STIV с пили-подобной структурой клеток *Sulfolobus* [89]. Было показано, что мутации в генах, ассоциированных с поверхностными молекулами клеток *Sulfolobus*, обеспечивают резистентность клеток к SIRV2 [90]. Несмотря на отсутствие данных, можно ожидать, что механизмы, подобные описанным для бактериальных клеток, также предотвращают адсорбцию вирусов архей.

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ЗАЩИТА ОТ ФАГОВ

Непосредственное участие в защите. В многочисленных ранних исследованиях изучалось влияние различных химических соединений на эффективность вирусной инфекции [91–93]. Было показано, что некоторые соединения, включая синтезируемые бактериями антибиотики, могут влиять на производство фагового потомства в концентрациях, субингибиторных для роста бактерий [94–96]. Также было известно, что ДНК-специфичные красители и интеркалирующие агенты (например, пропидиум иодид или доксорубин) могут инактивировать фаговые частицы [97]. Однако лишь недавно была произведена переоценка роли малых молекул, продуцируемых бактериями, в их защите от фагов [27]. В результате проведения высокопроизводительного скрининга библиотек химических

соединений были выявлены молекулы, которые способны препятствовать инфицированию клеток *E. coli* фагом λ , при этом не влияя на рост бактерий. Противофаговая активность была также показана в биологически значимом контексте: добавление отработанной культуральной среды, собранной после роста штамма *Streptomyces peucetius*, продуцирующего доксорубин и даунорубин, приводило к ингибированию процесса инфицирования штамма *Streptomyces coelicolor*, чувствительного к действию фага. Далее авторы показали, что ~1/3 протестированных экстрактов клеток *Streptomyces* обладают противофаговой активностью в отношении природных изолятов актинофагов, что позволяет предположить, что химическая защита является широко распространенной защитной стратегией. В качестве активных компонентов большинства экстрактов были обнаружены антрациклины или другие ДНК-интеркалирующие агенты. Отдельные ДНК-интеркалирующие агенты способны инактивировать фаговые частицы до их контакта с клеткой путем провоцирования неконтролируемого выхода ДНК из капсида [98]. Однако было показано, что в случае дауномицина фаговая ДНК может проникнуть в клетки, хотя ранние стадии инфекции при этом были подавлены [27]. Результаты работы подняли ряд вопросов, касающихся механизмов ингибирования малыми молекулами, их специфичности и избегания токсичности для продуцирующих бактерий, а также возможности использования противовирусных метаболитов в качестве общественного ресурса в микробных популяциях.

Вайперины и нуклеотиды, обрывающие рост цепи. Интерферон-индуцированный противовирусный ответ высших эукариот, в том числе и человека, включает активацию фермента вайперина, ответственного за синтез рибонуклеотида ddhСТР, обрывающего синтез новых цепей РНК [99]. Предполагается, что обрыв цепи подавляет вирусную транскрипцию и ингибирует репликацию вирусов с РНК-геномами [100]. Гены вайперинов спорадически обнаруживались в геномах отдельных видов бактерий и архей. Недавнее исследование показало, что прокариотические вайперины (pVips) обеспечивают защиту от фаговой инфекции [101, 102]. В отличие от эукариотических гомологов, синтезирующих ddhСТР, pVip также продуцируют ddhУТР и ddhГТР. Гетерологичная экспрессия различных pVip в *E. coli* ингибировала инфекцию фагом T7 и транскрипцию, опосредованную РНК-полимеразой T7 [102]. Экспрессия pVip не влияла на транскрипцию хозяина и не оказывала токсичный эффект на клетки, что позволяет предположить более высокую чувствительность

вирусных РНК-полимераз к ингибированию с участием ddhNTP. Интересно, что экспрессия p*Vir* обеспечивала более высокий уровень защиты от фагов P1 и λ , которые используют хозяйскую РНК-полимеразу для транскрипции своих генов, подразумевая существование дополнительных защитных механизмов, ассоциированных с вайперинами. Гены p*Vir* в больших количествах обнаруживаются внутри защитных островков и часто находятся рядом с генами, кодирующими нуклеотидкиназы, которые могут образовывать NTP из NMP и таким образом повышать уровень NTP как субстратов для p*Vir*. Гены HicA-подобной РНКазы или белков, содержащих домен анкириновых повторов, предположительно участвующие в идентификации фаговой инфекции [102], также обнаруживались вблизи некоторых генов p*Vir*.

Регулирующая роль. Малые метаболиты также могут участвовать в защите бактерий от фагов в качестве сигнальных молекул или в качестве кофакторов иммунных белков. Примеры последнего будут описаны позднее, а здесь мы рассмотрим косвенную роль малых молекул в регуляции экспрессии генов, обеспечивающих защиту клеток. Феномен определения кворума (QS, Quorum Sensing) позволяет клеткам измерять плотность микробной популяции и может рассматриваться как система коммуникации, основанная на секреции малых молекул [103]. Популяции с высокой плотностью клеток более уязвимы к фаговым инфекциям, и QS-опосредованная активация защитных барьеров с увеличением плотности культуры полезна для выживания. Например, в селекционных экспериментах было показано, что QS-профицитная культура *P. aeruginosa* достигает более высокого уровня резистентности к фагам по сравнению с QS-дефицитными клетками [104]. Кроме их роли в образовании биопленок [105], QS-сигналы могут регулировать экспрессию генов фаговых рецепторов и иммунных систем. Например, обработка лактоном N-ацилглосерина приводит к снижению количества рецепторов фага λ в клетках *E. coli* [106]. А в случае клеток *Vibrio anguillarum* эта обработка вызывает секрецию внеклеточных протеаз и снижает количество рецепторов для фага KVP40 [107, 108]. Было показано, что QS-регуляция активирует экспрессию компонентов систем CRISPR-Cas в клетках *Serratia*, *Pseudomonas* и других бактерий [109, 110]. Для принятия решения о лизисе или лизогении многие фаги используют бактериальные QS-сигналы или кодируют собственные сигнальные системы, как это недавно было описано для системы arbitrium [111–114]. Можно предположить, что в случае фаговой инфек-

ции бактерии способны перехватывать молекулы межвирусной коммуникации или вырабатывать собственные специфические сигналы для мобилизации защитных барьеров в популяции.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОНИКНОВЕНИЯ ГЕНОМА ФАГА

Вслед за адсорбцией геном фага выходит из капсида и транспортируется внутрь клетки-хозяина [115]. Существует несколько механизмов, блокирующих эту стадию жизненного цикла вируса [116]. Как правило, такие системы кодируются профагами и лежат в основе феномена исключения суперинфекции (Sie), т.е. предотвращения вторичной инфекции гомоиммунными фагами после установления первичной инфекции (или лизогенизации) [117]. Мембранно-ассоциированные белки Sie могут блокировать вход фаговой ДНК в клетку путем воздействия на фаговый белок TMP (tape measure protein), как это имеет место в случае экспрессии липопротеина профагом TP-J 34 в клетках *Streptococcus thermophilus* [118, 119] или белка gp15 профагом HK97 в клетках *E. coli* [120, 121]. Известно, что белок Sp фага T4 ингибирует лизоцим этого же фага, который необходим для деградации пептидогликанового слоя клеточной стенки *E. coli* [122]. Предполагается, что клеточные белки хозяина, необходимые для транслокации фаговой ДНК, также могут являться мишенями для Sie, как в случае защиты, опосредованной белком Imm фага T4 [122, 123] или белком gp52 микобактериофага Fruitloop, который взаимодействует с белком Wag31 клетки-хозяина и ингибирует инфицирование клеток Wag31-зависимыми фагами [124]. Системы Sie с неизвестными мишенями были описаны в случае фага Tuc2009 *Lactococcus lactis* [125], фага P22 *S. enterica* [126], фага K139 *Vibrio cholerae* [127], фага P1 *E. coli* [128] и В3-подобных фагов клеток *P. aeruginosa* [129]. Несмотря на то что системы Sie рассматриваются в первую очередь как средства конкурентной борьбы между фагами [130], они способны принести пользу для клетки-хозяина и в конечном итоге могут стать неотъемлемой частью хромосомы, как в случае белка DicB, кодируемого криптоическим профагом Qin у *E. coli* [131].

ИММУННЫЕ СИСТЕМЫ, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ МОДИФИКАЦИИ ДНК

Как только геном фага попадает внутрь клетки, он становится мишенью для действия

различных ферментов, которые способны вызвать его деградацию. Например, комплекс нуклеазы/хеликазы RecBCD, который также участвует в репарации ДНК хозяина, распознает свободные концы ДНК, доступные на ранних стадиях инфицирования фагами с линейными ДНК геномами [132, 133]. Наиболее часто деградацию ДНК, попадающей в клетку, осуществляют системы врожденного и адаптивного иммунитета. Модификация ДНК клетки-хозяина, которая необходима для того, чтобы дифференцировать собственную ДНК и чужеродный генетический материал, является отличительным признаком систем рестрикции-модификации. Модификационный модуль этих систем ответственен за эпигенетическое мечение ДНК клетки-хозяина, и поэтому немеченая фаговая ДНК является объектом для эндонуклеазного расщепления в результате действия рестриционного модуля [134, 135]. Общий принцип механизма действия R-M представлен на рис. 3. Кроме классических систем R-M, множество недавно описанных защитных систем кодируют модификационный модуль, в то время как их механизмы рестрикции чужеродного генетического материала все еще не выяснены.

Классические системы R-M. Системы R-M были открыты в начале 1950-х годов в процессе изучения феномена модификации вирусами клетками-хозяевами [136, 137]. Они были хорошо изучены в первые годы молекулярной биологии, что привело к их широкому применению и появлению технологий рекомбинантной ДНК [138]. Более 300 тысяч известных или предполагаемых R-M-ферментов в настоящее время находятся в базе данных REBASE, а системы R-M были обнаружены в ~90% секвенированных геномов бактерий и архей [30]. Функциональные субъединицы систем R-M состоят из метилтрансферазы (МТазы, MTase), которая переносит метильную группу от молекулы-донора S-аденозилметионина (SAM) к цитозину или аденину в ДНК, и сопряженной эндонуклеазы рестрикции (ЭР, REase). Отдельные системы также кодируют транслоказу, которая использует энергию гидролиза АТФ для осуществления моторных функций, и субъединицу, которая содержит домены распознавания мишени (TRD), определяющие специфичность ЭР и МТазы к определенным последовательностям. В зависимости от состава субъединиц потребности в кофакторах и механизма действия системы R-M подразделяются на 4 типа. Однако эта классификация не отражает их эволюционного родства [139, 140]. Состав субъединиц для комплексов, ответственных за модификацию и рестрицию, примеры сайтов распознавания и пат-

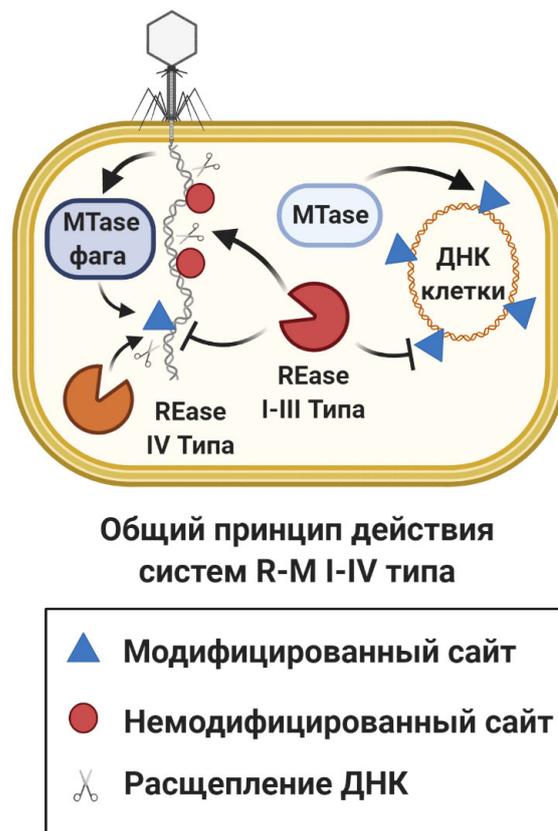


Рис. 3. Принцип действия классических систем рестрикции-модификации. Метилтрансфераза (МТаза, MTase) из систем типа I–III модифицирует специфические мотивы в ДНК клетки-хозяина, в то время как неметилированные участки в чужеродной ДНК подвергаются расщеплению эндонуклеазой рестрикции (ЭР, REase). ЭР IV-го типа существует без сопряженной МТазы и расщепляет ДНК, модифицированную вирусом

терны расщепления для систем R-M типов I–IV представлены на рис. 4.

R-M II-го типа наиболее изучена. Системы этого типа обычно состоят из отдельных белков МТазы и ЭР. МТаза является мономером, в то время как ЭР действует как гомодимер. Как правило, оба фермента распознают один и тот же палиндромный участок ДНК длиной 4–8 пар оснований. Расщепление ДНК происходит на обеих цепях ДНК в фиксированном положении внутри или в непосредственной близости от неметилированного сайта распознавания, и этот процесс зависит от наличия двухвалентных катионов, в большинстве случаев от Mg^{2+} [141, 142]. МТаза эффективно метилирует неметилированные и полуметилированные сайты, которые образуются после репликации полностью метилированной ДНК, в то время как ЭР обладает низким сродством к метилированным или полуметилированным сайтам [143]. Помимо описанного простого способа действия, харак-

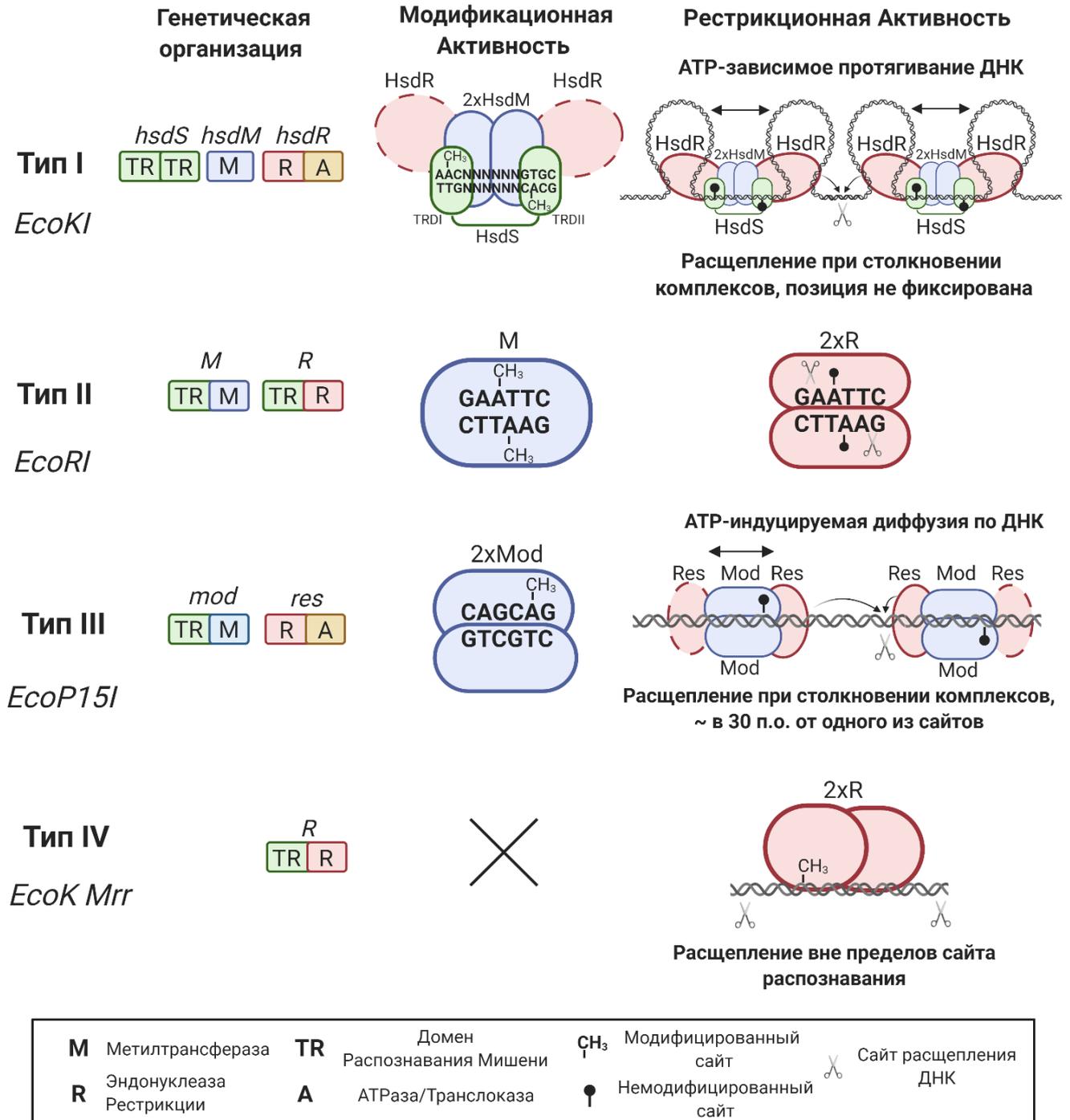


Рис. 4. Функциональные субъединицы, сайты распознавания, состав комплексов модификации и рестрикции для репрезентативных членов систем R-M типов I–IV. Системы R-M типа I модифицируют обе цепи двухчастных асимметричных участков ДНК. Для рестрикции необходимо взаимодействие между двумя комплексами, связанными с неметилованными участками ДНК, которое достигается благодаря АТФ-зависимой транслокации, при этом позиция сайта рестрикции не фиксирована. Системы R-M типа II обычно распознают палиндромные сайты, и обе цепи ДНК внутри или в непосредственной близости от неметилованных сайтов подвергаются расщеплению. Система R-M типа III модифицирует только одну цепь в асимметричном сайте распознавания, и расщепление происходит в фиксированной позиции относительно одного из сайтов, когда комплекс рестрикции, связанный с неметилованным сайтом, взаимодействует с другим комплексом, активированным в результате распознавания близлежащего неметилованного сайта в обратной ориентации. Система R-M типа IV не содержит метилтрансферазы и расщепляет молекулу ДНК после распознавания специфичных модифицированных сайтов. Пунктирной линией показано, что данная субъединица может быть необязательной для указанной активности

терного для подтипа IP, ферменты, принадлежащие к другим подтипам, могут обладать необычными свойствами [139]. Например, ферменты подтипов IA, IS и IL распознают асимметричные сайты в ДНК, в подтипах IS и IL полипептиды ЭР и МТазы слиты в один белок; в то время как ферменты подтипов IE и IF требуют связывания с двумя сайтами для расщепления. Ферменты подтипов IL и IG (например, MmeI и Eco571) распознают асимметричные сайты, которые метилированы только по одной цепи ДНК [144, 145]. Вторая цепь сайтов Eco571 подвергается метилированию с участием дополнительной метилтрансферазы [145]. В то же время все еще не выяснено, как в системах подтипа IL избегается расщепление неметилированных сайтов, образующихся после репликации ДНК. Избыточная экспрессия ЭР токсична для клетки, в то время как избыток МТазы может привести к метилированию геномов инфицирующих фагов и их защите от последующей рестрикции. Таким образом, для систем R-M необходима координированная регуляция экспрессии генов МТазы и ЭР, что достигается, например, в результате активности контролирующего С-белка [146, 147] или при связывании МТазы со своим промотором и/или его метилированием [148].

Системы R-M типа I кодируют МТазу (HsdM), ЭР (HsdR) и субъединицу, обеспечивающую их специфичность (HsdS). Наиболее хорошо изученным примером является рестриктаза EcoKI. Эти ферменты работают в виде комплексов HsdM₂-HsdS₁-HsdR₂, которые могут осуществлять как рестрикцию, так и метилирование, в то время как метилирование также может осуществляться комплексами HsdM₂-HsdS₁ или HsdM₂-HsdS₁-HsdR₁ [149–151]. Два участка ДНК, разделенные вырожденной последовательностью (~AACNNNNNGTGC для EcoKI), распознаются двумя TRD-доменами на субъединице HsdS, и обе цепи ДНК этих асимметричных участков подвергаются метилированию. Механистическая модель рестрикционной активности достаточно сложна. После распознавания неметилированного сайта рестрикционным комплексом активируется АТФ-зависимая моторная функция субъединицы HsdR, и комплекс протягивает через себя связанную молекулу ДНК в обоих направлениях, создавая петли [152]. Транслокация расходует ~3 молекулы АТФ на один нуклеотид [153]. Расщепление происходит при столкновении двух комплексов рестрикции, закрепленных на разных сайтах, или в случае, если дальнейшая транслокация ДНК осложнена (например, при столкновении с репликационной вилкой или в суперспирали-

зованных участках) [154]. Расщепление ДНК происходит в нефиксированной позиции между соседними участками распознавания [155]. Для R-M I-го типа необходим SAM, причем не только в качестве донора метильных групп, но и как кофактор комплекса рестрикции. Ферменты подтипа ISP представляют одиночные полипептиды, сочетающие в себе метилирующую и рестрикционную активности, при этом модификации подвергается только одна цепь ДНК [156, 157]. Чтобы снизить риск повреждения ДНК клетки-хозяина, может осуществляться дополнительный контроль активности комплексов I-го типа. Например, в результате ClpXP-опосредованного протеолитического расщепления субъединицы HsdR – феномен, известный как аллелиация рестрикции [158, 159]. Известно, что благодаря фазовой вариации TRD-доменов может происходить изменение специфичности ферментов I-го типа к сайтам распознавания [160].

Системы R-M типа III во многом похожи на системы I-го типа [161]. Они функционируют как мультибелковые комплексы, состоящие из субъединиц Mod и Res. Модификация ДНК происходит в результате действия гомодимера Mod₂, а комплексы Res₂-Mod₂ или Res₁-Mod₂ выступают в качестве АТФ- и SAM-зависимой эндонуклеазы рестрикции [162, 163]. Ферменты III-го типа распознают короткие непалиндромные последовательности и метилируют только одну цепь ДНК. Таким образом, подобно ситуации с ферментами подтипа ISP, половина из полуметилированных участков после репликации становится неметилированными. Чтобы предотвратить атаку комплекса рестрикции на ДНК клетки-хозяина, для осуществления расщепления требуется наличие двух сайтов в противоположной ориентации (голова к голове или хвост к хвосту), т.е. чтобы два неметилированных соседних участка были локализованы на различных цепях ДНК, что обычно не встречается в ДНК хозяина [164, 165]. Распознавание неметилированного участка ДНК приводит к инициации транслокационной активности субъединицы Res. Однако, в отличие от ферментов I-го типа, при этом расходуются меньше АТФ, и вместо двунаправленного протягивания ДНК через комплекс запускается одномерная диффузия вдоль цепи ДНК [166, 167]. Расщепление ДНК происходит в фиксированной позиции от одного из сайтов распознавания, когда подвижный активированный комплекс рестрикции взаимодействует с другим комплексом, остающимся связанным с неметилированным сайтом. Экспрессия субъединицы Mod также может регулироваться путем фазовой вариации [168].

Чтобы избежать расщепления рестриктазы клетки-хозяина, фаги могут включать в свой геном модифицированные основания [169]. В ответ на это у прокариот возникли системы R-M IV-го типа, специфические к модифицированным участкам ДНК [170, 171]. Тип IV – это разнообразная и мало изученная группа одиночных эндонуклеаз рестрикции, у которых отсутствуют сопряженные метилтрансферазы. Ферменты подтипа ПМ также распознают метилированные основания, и некоторыми авторами рассматриваются как ферменты типа IV [171]. ЭР типа IV обычно обладают широкой субстратной специфичностью, и их действие может быть направлено на метилцитозины (McrA), метил-аденины (Mrr) или ДНК с фосфоротиоатными связями (ScoMcrA) [172–174]. Некоторым ферментам из этой группы для расщепления требуется гидролиз АТР или ГТР и наличие более одного сайта рестрикции (McrBC или SauUSI) [175, 176]. Распространение этих белков и их экологическое значение, вероятно, все еще остается недооцененным.

Кроме их роли в защите от фагов и контроле горизонтального переноса генов, системы R-M оказывают влияние на другие биологические процессы [177]. Например, гены метилтрансфераз часто обнаруживаются без сопряженных генов рестриктаз, и считается, что такие орфанные ферменты участвуют в регуляции экспрессии или репликации генов. Наиболее изученными примерами являются Dam МТаза у *E. coli* и SsrM – у *Caulobacter crescentus* [178, 179]. Некоторые системы R-M могут рассматриваться как эгоистичные элементы типа токсин-антитоксин, поскольку потеря гена МТаза может привести к постсегрегационной гибели клетки, связанной с повреждением ДНК в результате действия рестриктазы [180]. Эволюционная и экологическая роль систем R-M также рассмотрена в ряде других обзоров [76, 181–183].

Система ограничения роста бактериофагов (Phage Growth Limitation, Pgl). Система Pgl может представлять уникальный пример обратной рестрикции-модификации, при которой модифицированная ДНК подвергается рестрикции, но в отличие от систем R-M типа IV, модификация генома фага осуществляется самой системой защиты клетки-хозяина. Система Pgl была впервые описана при выделении фага φC31 на газоне клеток *Streptomyces coelicolor* A(3)2 [184]. Позднее было показано, что потомство фага φC31 высвобождается из клеток Pgl+ после первого раунда инфекции, но последующие раунды инфицирования клеток-хозяев были подавлены [185]. Было предположено, что вышедшие из клеток Pgl+ фаги несут Pgl-специфичные модификации.

Система Pgl была обнаружена только у *Actinomyces*. Считается, что такое альтруистическое поведение может быть обеспечено многоклеточными бактериями, которые способны пожертвовать одним компартментом ради защиты всего организма. В то же время Pgl-фенотип может обеспечить конкурентное преимущество в борьбе с родственными Pgl-дефицитными клетками, так как клетки Pgl+ постоянно продуцируют модифицированные фаговые частицы, способные поражать другие клетки, но не действующие на Pgl+ хозяина [186]. Фенотип Pgl имеет и дополнительное преимущество: в случае классических систем R-M случайное метилирование генома фага часто приводит к появлению защищенного фагового потомства, которое будет способно уничтожить популяцию бактерий. Напротив, обратный механизм действия, характерный для Pgl, гарантирует, что в ходе инфекционного процесса не появятся фаги, которым удастся избежать рестрикции (рис. 5).

Система Pgl кодирует 4 компонента: PglX – аденин-метилтрансферазу, PglY – АТРазу, PglW – протеинкиназу и PglZ – щелочную фосфатазу (рис. 6, а) [187–189]. Для защиты необходимы все четыре белка, при этом активность первых трех компонентов была показана *in vitro* [190]. Делеция гена *pglZ* в присутствии функционального *pglX* невозможна. Поэтому было предположено, что белки, кодируемые этими генами, образуют пару токсин-антитоксин, а PglX играет ключевую роль в рестрикции, когда его активность не сдерживается белком PglZ [190]. До сих пор неизвестно, как система Pgl распознает фаговую инфекцию и как работает модуль рестрикции.

Системы исключения бактериофагов (Bacteriophage EXclusion, BREX). Глобальный анализ распространения гена *pglZ* в защитных островках показал, что он обнаруживается не только у *Actinomyces*, но также часто встречается в консервативных кластерах генов, отличных от Pgl-системы [18]. Было предположено, что *pglZ*-содержащие кластеры представляют новое суперсемейство систем защиты от фагов, которое было названо BREX [191]. Исходя из состава компонентов, системы BREX были классифицированы на 6 типов, и Pgl был отнесен к BREX типа II (рис. 6, а). Кроме наличия PglZ, общей чертой всех систем BREX является присутствие АТРазы и метилтрансферазы. В системах IV-го типа метилтрансфераза заменена на PAPS-редуктазу – фермент, участвующий в фосфоротиолировании ДНК [192]. Наиболее распространенным является BREX типа I, и системы этого типа были экспериментально изучены в клетках *B. subtilis*, *E. coli* и *V. Cholerae* (где BREX встреча-

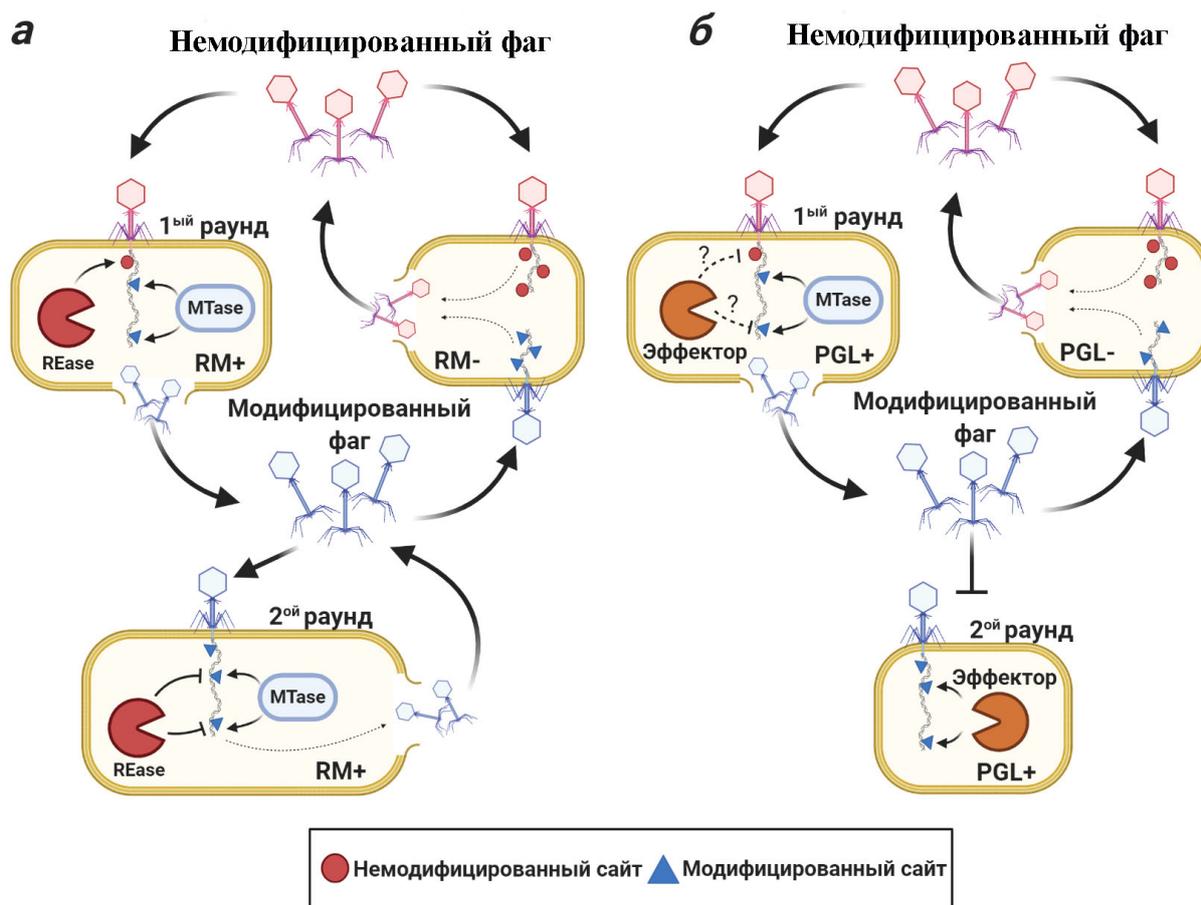


Рис. 5. *a* – Прямой механизм действия рестрикции-модификации: ошибочное метилирование фаговой ДНК во время инфекции клеток, обладающих классической системой R-M (RM+), приведет к образованию потомства фага, которое будет способно продолжить эффективное инфицирование клеток RM+. Модификации могут быть утрачены только после прохождения фага через R-M-дефицитные клетки (RM-). *б* – Обратный механизм действия системы рестрикции-модификации, который предполагается для системы Pgl: после первого раунда инфекции клетки Pgl+ продуцируют Pgl-модифицированные фаговые частицы, которые подвергаются рестрикции в клетках Pgl+ во время второго раунда инфекции. Pgl-модифицированный фаг может эффективно инфицировать клетки Pgl-

ется в SXT конъюгативных элементах) [191, 193, 194]. Активность BREX метилтрансферазы также была показана для клеток *Lactobacillus casei* [195]. Основными компонентами систем BREX типа I являются VrxX (PglX) – аденин-специфичная метилтрансфераза, VrxZ (PglZ) – щелочная фосфатаза, VrxC – АТРаза, VrxL – Lon-подобная протеаза и небольшой белок VrxB с неизвестной функцией. Эти предсказанные активности не были подтверждены *in vitro*, и функция отдельных крупных доменов белков BREX все еще не определена. Также могут присутствовать дополнительные небольшие белки, которые, как предполагается, играют регуляторную роль или необходимы для обеспечения защиты от определенных фагов (например, VrxA) [191, 193].

Было показано, что, подобно классическим системам R-M, системы BREX метилируют собственную ДНК клетки-хозяина, и наличие

BREX-специфических модификаций в геноме фага позволяет ему преодолеть защитную систему [193, 196]. Сайты системы BREX не являются палиндромами и метилируются только по одной цепи, что, подобно R-M системам типа III и подтипа ISP, может подразумевать требование наличия нескольких сайтов и их специфической ориентации для осуществления рестрикции. BREX действует на ранних стадиях фаговой инфекции и препятствует накоплению вирусной ДНК внутри клеток. Тем не менее механизмы рестрикции остаются невыясненными. Защита BREX системы *E. coli* подавляется ДНК-мимикрирующим белком Osg фага T7 [46], который является хорошо известным ингибитором систем R-M типа I [151, 197]. Этот результат, по-видимому, предполагает наличие общих механистических особенностей для систем BREX и мультисубъединичных комплексов систем R-M.

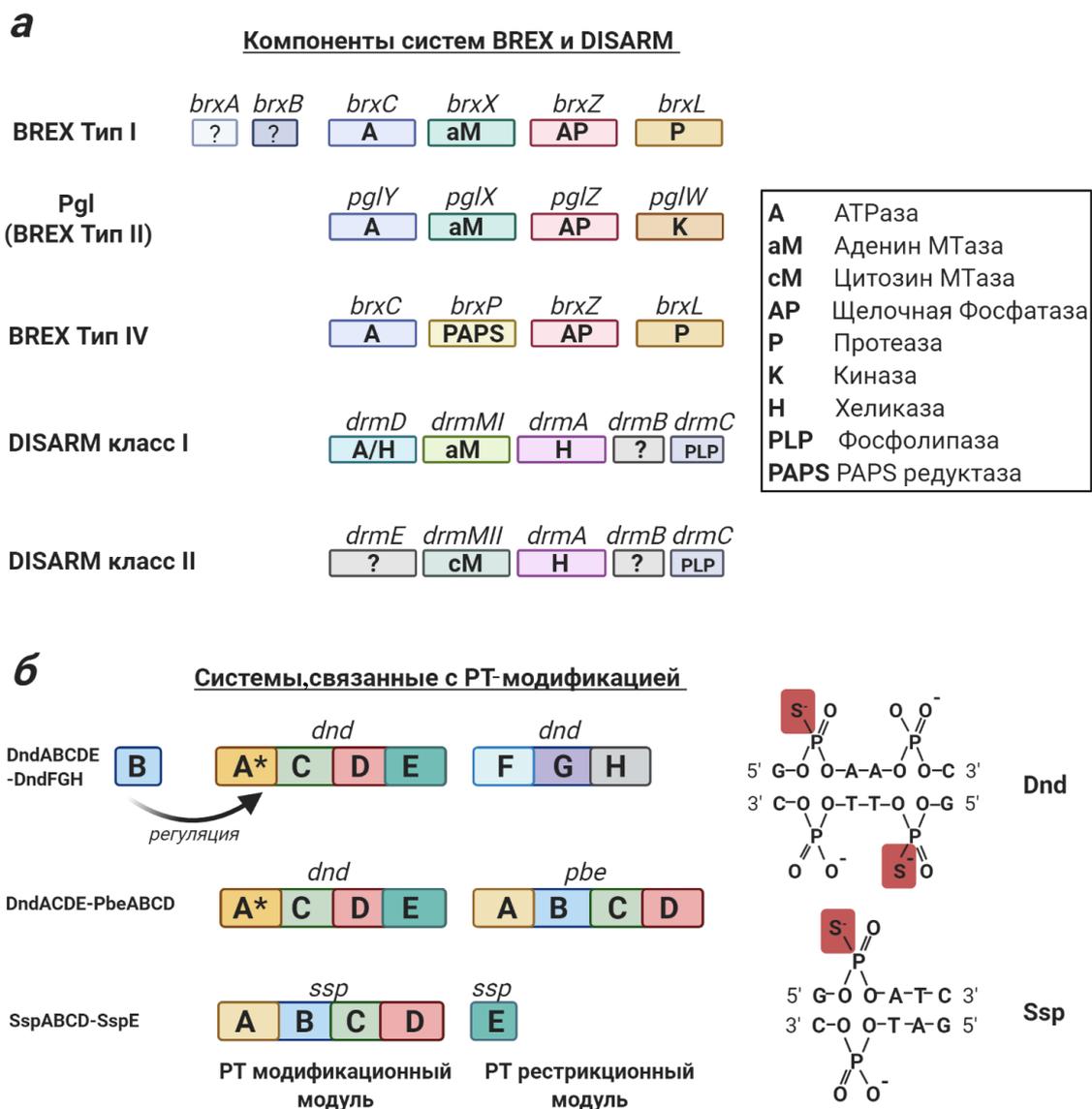


Рис. 6. *a* – Функциональные субъединицы, характерные для различных типов систем BREX и DISARM. Порядок расположения компонентов на схеме не всегда отражает действительную организацию генов в опероне. *б* – Системы, основанные на фосфоротиолировании сахаро-фосфатного остова ДНК. Из-за транзientного характера РТ-модификации лишь малая часть сайтов действительно является модифицированной в геноме, и мотивы Dnd систем могут оставаться полумодифицированными

Системы DISARM. Вслед за открытием BREX подробное изучение консервативных кластеров генов в защитных островках привело к предсказанию еще одной новой системы – DISARM (Defence Island System Associated with Restriction-Modification) [198]. Противовирусная активность DISARM была исследована на примере системы из *Bacillus paralicheniformis*. Она состоит из 5 компонентов: хеликазы DrmA, белка DrmB, содержащего домен DUF1998 с неустановленной функцией, белка DrmC, содержащего домен фосфолипазы D (PLD), белка DrmE и цитозин-специфичной метилтранс-

феразы DrmMII [198]. Этот состав характерен для DISARM класса 2, в то время как в более распространенных системах класса 1 белок DrmMII заменен на аденин-метилтрансферазу DrmMI, а белок DrmE – на SNF-2-подобную хеликазу DrmD (рис. 6, *a*). Домены PLD могут быть вовлечены в каталитическую активность нуклеаз [199]. Тем не менее DrmC не оказался необходимым для DISARM-опосредованной защиты от фагов. Экспрессии одного лишь белка DrmMII достаточно для метилирования симметричных сайтов (CCWGG) в ДНК хозяина, а делеция гена метилтрансферазы в присутствии

полного кластера DISARM является токсичной для клеток. Но в отличие от классического фенотипа R-M, фаг ϕ 3T с DISARM-специфичным метилированием был неспособен инфицировать клетки DISARM+, что позволяет предположить, что метилирование необходимо, но недостаточно для того, чтобы избежать рестрикции [198]. Подобно BREX, DISARM не влияет на адсорбцию фага и ингибирует ранние стадии инфекции по неизвестному механизму.

Системы DPD. Помимо метилирования ДНК, модификации на основе 7-деазагуанина также могут быть связаны с R-M-подобными защитными системами [200]. В синтезе 7-деазагуанина, который обычно выступает как предшественник модифицированных оснований в молекуле транспортной РНК, участвуют несколько ферментов. Некоторые прокариоты кодируют дополнительные кластеры генов биосинтеза, которые ответственны за включение 7-деазагуанина в ДНК [200]. Такие системы DPD (7-деазapurин в ДНК) могут содержать до 10 компонентов (DpdA-K) [200, 201]. R-M-подобная активность системы DPD была предположена на основе ингибирования трансформации немодифицированных плазмид в клетки *Salmonella montevideo*, несущих кластер *dpd* [200]. Однако активность системы DPD против фаговой инфекции до сих пор не показана, и возможный механизм рестрикции остается невыясненным. Дополнительные компоненты DPD систем включают хеликазы, PdgB-подобную НТразу и нуклеазу PLD, которые могут быть вовлечены в рестрикцию немодифицированной ДНК. Интересно, что аналогичные кластеры модификации 7-деазагуанина обнаружены в некоторых вирусных геномах (например, в фагах ϕ g или *Sajon*), где было показано, что данная модификация защищает фаговую ДНК от широкого спектра эндонуклеаз рестрикции [202, 203].

Системы, связанные с фосфоротиолированием ДНК (РТ). Рассмотренные ранее модификации затрагивали только азотистые основания, но сахаро-фосфатный остов ДНК также может подвергаться модификации. Замена атома кислорода в гидроксильной группе фосфатного остатка на атом серы, называемая фосфоротиолированием, приводит к появлению РТ-связи (фосфоротиоат) в ДНК, которая может быть ассоциирована с различными защитными системами бактерий и архей [204–206]. Эти системы кратко представлены на рис. 6, б.

Фосфоротиолирование (РТ-модификация) происходит в результате активности генов *dndABCDE* (Dnd – фенотип, связанный с деградацией ДНК), которые кодируют цистеиндесульфуразу (DndA), PAPS-редуктазу (DndC),

АТРазу/никирующую эндонуклеазу (DndD) и небольшой белок DndE, который связывается с никированной ДНК. При этом DndB регулирует транскрипцию оперона *dndBCDE* и таким образом определяет долю РТ-модифицированных сайтов в геноме [204, 207–209]. Пока еще определены не все стадии биохимического пути, задействованного в процесс фосфоротиолирования. Однако известно, что цистеин является донором атома серы, который переносится на DndC и затем энергозависимым образом встраивается в ДНК, предварительно никированную DndD [192, 210, 211]. Недавно было показано, что гены *dnd* также могут быть задействованы в РТ-модификации РНК [212]. Считается, что РТ-модификация важна для поддержания редокс-гомеостаза и контроля экспрессии генов [213], но у бактерий модификационный модуль Dnd часто сопровождается кластером генов рестрикции *dndFGH* [214]. *In vitro* активность компонентов DndFGH не была изучена, однако *in vivo* присутствие кластера *dndABCDE–FGH* ингибировало трансформацию немодифицированной ДНК, в то время как экспрессия DndFGH в штамме, не содержащем DndABCE, приводила к расщеплению собственной ДНК клетки [214–216]. Наиболее заметной чертой РТ-модификации, которая довольно сильно отличается от метилирования системами R-M, является тот факт, что модифицируется лишь небольшая доля доступных сайтов, и модификация каждого конкретного участка носит кратковременный характер. Это рождает вопросы о механизмах избегания рестрикции собственной ДНК [217, 218]. Наличие метилирования Dam влияет на распределение РТ-модифицированных сайтов, но не влияет на их общую плотность [219]. В связи с этим было предположено, что специфичность РТ-модификации определяется общей геометрией участка ДНК, а не его последовательностью [219].

РТ-модификация также была показана для архей, у которых функцию рестрикции вместо *dndFGH* выполняет кластер генов *pbeABCD* [205]. Было показано, что *dndCDEA–pbeABCD* из клеток *Haloterrigena jeotgali* обеспечивает противовирусную защиту, и рестрикционная активность зависит от функционально-активного модуля РТ-модификации, что отличается от поведения *dndFGH* [205]. В инфицированных *dndCDEA–pbeABCD* клетках не наблюдалось накопления вирусной ДНК, хотя при этом не было показано и её расщепления. Гены *pbeABCD* могут также обнаруживаться вне контекста *dndCDEA* или вблизи генов метилтрансфераз, что подразумевает возможность обмена модулями между различными защитными системами [205].

Недавно была открыта еще одна основанная на РТ-модификации защитная система — SspABCD-SspE [206]. Гены *sspABCD* не гомологичны генам *dndABCDE*, но они кодируют сходные функциональные домены и выполняют РТ-модификацию ДНК, в то время как SspE служит в качестве рестрикционного компонента, ингибируя фаговую инфекцию. *In vitro* было показано, что SspE обладает активностью НТРазы, которая стимулируется наличием РТ-модифицированных сайтов и неспецифической никазной эндонуклеазной активностью [206]. Отличительной особенностью SspABCD является модификация только одной цепи ДНК внутри непалиндромных участков узнавания.

Описание других стратегий защиты прокариотических клеток от вирусных инфекций, а также обсуждение взаимодействий между различными противовирусными системами будет продолжено во второй главе рукописи.

Финансирование. Выполнение данной работы происходило при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50560). А.И. также поддержан грантом Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90160), О.М. поддержана грантом Российского научного фонда (грант № 19-74-00118).

Вклад авторов. А.И. подготовил текст обзорной статьи, А.И. и О.М. подготовили рисунки, К.С. провел редактуру статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Анне Ершовой и Андрею Летарову за критические замечания к отдельным разделам статьи. Иллюстрации были подготовлены при помощи программы BioRender.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., and Heaphy, S. (2011) Phages in nature, *Bacteriophage*, **1**, 31-45.
- Díaz-Muñoz, S. L., and Koskella, B. (2014) Bacteriophage interactions in natural environments, in *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier, Vol. 89, pp. 135-183.
- Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., et al. (2019) Bacteriophages in natural and artificial environments, *Pathogens*, **8**, 100.
- Wommack, K. E., and Colwell, R. R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 69-114.
- Parikka, K. J., Le Romancer, M., Wauters, N., and Jacquet, S. (2017) Deciphering the virus-to-prokaryote ratio (VPR): insights into virus-host relationships in a variety of ecosystems, *Biol. Rev.*, **92**, 1081-1100.
- Rodriguez-Valera, F., Martin-Cuadrado, A.-B., Rodriguez-Brito, B., Pasic, L., Thingstad, T. F., et al. (2009) Explaining microbial population genomics through phage predation, *Nat. Preced.*, doi: 10.1038/npre.2009.3489.1.
- Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., and Sawaya, N. A. (2018) Phage puppet masters of the marine microbial realm, *Nat. Microbiol.*, **3**, 754-766.
- Brüssow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 560-602.
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., and Chen, J. (2019) Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical, *PLoS Pathog.*, **15**, e1007878.
- Lang, A. S., Westbye, A. B., and Beatty, J. T. (2017) The distribution, evolution, and roles of gene transfer agents in prokaryotic genetic exchange, *Annu. Rev. Virol.*, **4**, 87-104.
- Keen, E. C., Bliskovsky, V. V., Malagon, F., Baker, J. D., Prince, J. S., et al. (2017) Novel “superspreader” bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation, *MBio*, **8**, e02115-16.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I., and Katsnelson, M. I. (2017) Inevitability of the emergence and persistence of genetic parasites caused by evolutionary instability of parasite-free states, *Biol. Direct*, **12**, 1-12.
- Szathmáry, E., and Demeter, L. (1987) Group selection of early replicators and the origin of life, *J. Theor. Biol.*, **128**, 463-486.
- Krupovic, M., Dolja, V. V., and Koonin, E. V. (2019) Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 449-458.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Wolf, Y. I. (2017) Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 233-261.
- Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (2000) Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 609-613.
- Shmakov, S. A., Faure, G., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K. V., and Koonin, E. V. (2019) Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes, *Nat. Protoc.*, **14**, 3013-3031.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., and Koonin, E. V. (2011) Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems, *J. Bacteriol.*, **193**, 6039-56.
- Oliveira, P. H., Touchon, M., and Rocha, E. P. C. (2014) The interplay of restriction–modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10618-10631.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Krupovic, M. (2020) Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 119-131.
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., et al. (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome, *Science*, **359**, eaar4120.
- Gao, L., Altae-Tran, H., Böhning, F., Makarova, K. S., Segel, M., et al. (2020) Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes, *Science*, **369**, 1077-1084.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2019) Towards functional characterization of archaeal genomic dark matter, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 389-398.

24. Eraslan, G., Avsec, Ž., Gagneur, J., and Theis, F. J. (2019) Deep learning: new computational modelling techniques for genomics, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 389-403.
25. Eitzinger, S., Asif, A., Watters, K. E., Iavarone, A. T., Knott, G. J., et al. (2020) Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4698-4708.
26. Gussow, A. B., Park, A. E., Borges, A. L., Shmakov, S. A., Makarova, K. S., et al. (2020) Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families, *Nat. Commun.*, **11**, 1-12.
27. Kronheim, S., Daniel-Ivad, M., Duan, Z., Hwang, S., Wong, A. I., et al. (2018) A chemical defence against phage infection, *Nature*, **564**, 283-286.
28. Fillol-Salom, A., Miguel-Romero, L., Marina, A., Chen, J., and Penadés, J. R. (2020) Beyond the CRISPR-Cas safeguard: PICI-encoded innate immune systems protect bacteria from bacteriophage predation, *Curr. Opin. Microbiol.*, **56**, 52-58.
29. O'Hara, B. J., Barth, Z. K., McKitterick, A. C., and Seed, K. D. (2017) A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome, *PLoS Genet.*, **13**, 1-17.
30. Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015) REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D298-D299.
31. Akarsu, H., Bordes, P., Mansour, M., Bigot, D.-J., Genevaux, P., and Falquet, L. (2019) TASmania: a bacterial toxin-antitoxin systems database, *PLOS Comput. Biol.*, **15**, e1006946.
32. Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., et al. (2018) CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions, *Commun. Biol.*, **1**, 1-5.
33. Pourcel, C., Touchon, M., Villeriot, N., Vernadet, J.-P., Couvin, D., et al. (2020) CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D535-D544.
34. Zhang, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, Z., and Xiao, J. (2020) PADS Arsenal: A database of prokaryotic defense systems related genes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D590-D598.
35. Mandler, K., Chen, H., Parks, D. H., Lobb, B., Hug, L. A., and Doxey, A. C. (2019) Annotree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4442-4448.
36. Howard-Varona, C., Lindback, M. M., Bastien, G. E., Solonenko, N., Zayed, A. A., et al. (2020) Phage-specific metabolic reprogramming of virocells, *ISME J.*, **14**, 881-895.
37. Ghosh, S., Hamdan, S. M., Cook, T. E., and Richardson, C. C. (2008) Interactions of *Escherichia coli* thioredoxin, the processivity factor, with bacteriophage T7 DNA polymerase and helicase, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32077-32084.
38. Qimron, U., Marintcheva, B., Tabor, S., and Richardson, C. C. (2006) Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19039-19044.
39. Maynard, N. D., Birch, E. W., Sanghvi, J. C., Chen, L., Gutschow, M. V., and Covert, M. W. (2010) A forward-genetic screen and dynamic analysis of lambda phage host-dependencies reveals an extensive interaction network and a new anti-viral strategy, *PLoS Genet.*, **6**, e1001017.
40. Bohm, K., Porwollik, S., Chu, W., Dover, J. A., Gilcrease, E. B., et al. (2018) Genes affecting progression of bacteriophage P22 infection in *Salmonella* identified by transposon and single gene deletion screens, *Mol. Microbiol.*, **108**, 288-305.
41. Piya, D., Lessor, L., Koehler, B., Stonecipher, A., Cahill, J., and Gill, J. J. (2020) Genome-wide screens reveal *Escherichia coli* genes required for growth of T1-like phage LL5 and V5-like phage LL12, *Sci. Rep.*, **10**, 1-9.
42. Rousset, F., Cui, L., Siouve, E., Becavin, C., Depardieu, F., and Bikard, D. (2018) Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors, *PLoS Genet.*, **14**, e1007749.
43. Kortright, K. E., Chan, B. K., and Turner, P. E. (2020) High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 18670-18679.
44. Mutalik, V. K., Adler, B. A., Rishi, H. S., Piya, D., Zhong, C., et al. (2020) High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*, *PLoS Biol.*, **18**, e3000877.
45. Luria, S. E., and Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, **28**, 491.
46. Isaev, A., Drobiazko, A., Sierro, N., Gordeeva, J., Yosef, I., et al. (2020) Phage T7 DNA mimic protein Ocr is a potent inhibitor of BREX defence, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 5397-5406.
47. Pinilla-Redondo, R., Shehreen, S., Marino, N. D., Fagerlund, R. D., Brown, C. M., et al. (2020) Discovery of multiple anti-CRISPRs highlights anti-defense gene clustering in mobile genetic elements, *Nat. Commun.*, **11**, 1-11.
48. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 675-87.
49. Hwang, S., and Maxwell, K. L. (2019) Meet the anti-CRISPRs: widespread protein inhibitors of CRISPR-Cas systems, *Cris. J.*, **2**, 23-30.
50. Hampton, H. G., Watson, B. N. J., and Fineran, P. C. (2020) The arms race between bacteria and their phage foes, *Nature*, **577**, 327-336.
51. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., and Sauvageau, D. (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption, *FEMS Microbiol. Lett.*, **363**, fnw002.
52. Dowah, A. S. A., and Clokie, M. R. J. (2018) Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria, *Biophys. Rev.*, **10**, 535-542.
53. Stone, E., Campbell, K., Grant, I., and McAuliffe, O. (2019) Understanding and exploiting phage-host interactions, *Viruses*, **11**, 567.
54. Dragoš, A., and Kovács, Á. T. (2017) The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix, *Trends Microbiol.*, **25**, 257-266.
55. Hansen, M. F., Svenningsen, S. Lo, Røder, H. L., Middelboe, M., and Burmølle, M. (2019) Big impact of the tiny: bacteriophage-bacteria interactions in biofilms, *Trends Microbiol.*, **27**, 739-752.
56. Abedon, S. T. (2017) Phage "delay" towards enhancing bacterial escape from biofilms: a more comprehensive way of viewing resistance to bacteriophages, *AIMS Microbiol.*, **3**, 186.
57. Fernández, L., Rodríguez, A., and García, P. (2018) Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities, *ISME J.*, **12**, 1171-1179.
58. Henriksen, K., Rørbo, N., Rybtke, M. L., Martinet, M. G., Tolker-Nielsen, T., et al. (2019) *P. aeruginosa* flow-cell biofilms are enhanced by repeated phage treatments but can be eradicated by phage-ciprofloxacin combination, *Pathog. Dis.*, **77**, ftz011.
59. Hosseini-doust, Z., Tufenkji, N., and van de Ven, T. G. M. (2013) Formation of biofilms under phage predation: con-

- siderations concerning a biofilm increase, *Biofouling*, **29**, 457-468.
60. Bull, J. J., Christensen, K. A., Scott, C., Jack, B. R., Crandall, C. J., and Krone, S. M. (2018) Phage-bacterial dynamics with spatial structure: self organization around phage sinks can promote increased cell densities, *Antibiotics*, **7**, 8.
 61. Tan, D., Dahl, A., and Middelboe, M. (2015) Vibriophages differentially influence biofilm formation by *Vibrio anguillarum* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 4489-4497.
 62. Vidakovic, L., Singh, P. K., Hartmann, R., Nadell, C. D., and Drescher, K. (2018) Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection, *Nat. Microbiol.*, **3**, 26-31.
 63. Scanlan, P. D., and Buckling, A. (2012) Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *ISME J.*, **6**, 1148-1158.
 64. Wilkinson, B. J., and Holmes, K. M. (1979) *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption, *Infect. Immun.*, **23**, 549-552.
 65. Kim, M. S., Kim, Y. D., Hong, S. S., Park, K., Ko, K. S., and Myung, H. (2015) Phage-encoded colanic acid-degrading enzyme permits lytic phage infection of a capsule-forming resistant mutant *Escherichia coli* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 900-909.
 66. Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., et al. (2018) *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection, *J. Bacteriol.*, **200**, 1-9.
 67. Manning, A. J., and Kuehn, M. J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense, *BMC Microbiol.*, **11**, 258.
 68. Tzipilevich, E., Habusha, M., and Ben-Yehuda, S. (2017) Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors, *Cell*, **168**, 186-199.e12.
 69. Betts, A., Gifford, D. R., MacLean, R. C., and King, K. C. (2016) Parasite diversity drives rapid host dynamics and evolution of resistance in a bacteria-phage system, *Evolution (N.Y.)*, **70**, 969-978.
 70. Braun, V. (2009) FhuA (TonA), the career of a protein, *J. Bacteriol.*, **191**, 3431-3436.
 71. Chatterjee, S., and Rothenberg, E. (2012) Interaction of bacteriophage λ with its *E. coli* receptor, LamB, *Viruses*, **4**, 3162-3178.
 72. Kulikov, E. E., Golomidova, A. K., Prokhorov, N. S., Ivanov, P. A., and Letarov, A. V. (2019) High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies, *Sci. Rep.*, **9**, 1-10.
 73. Moller, A. G., Lindsay, J. A., and Read, T. D. (2019) Determinants of phage host range in *Staphylococcus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e00209-19.
 74. Wright, R. C. T., Friman, V.-P., Smith, M. C. M., and Brockhurst, M. A. (2018) Cross-resistance is modular in bacteria-phage interactions, *PLoS Biol.*, **16**, e2006057.
 75. Christen, M., Beusch, C., Bösch, Y., Cerletti, D., Flores-Tinoco, C. E., et al. (2016) Quantitative selection analysis of bacteriophage ϕ CbK susceptibility in *Caulobacter crescentus*, *J. Mol. Biol.*, **428**, 419-430.
 76. Bikard, D., and Marraffini, L. A. (2012) Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages, *Curr. Opin. Immunol.*, **24**, 15-20.
 77. Van Houte, S., Buckling, A., and Westra, E. R. (2016) Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 745-763.
 78. Riede, I., and Eschbach, M. L. (1986) Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **205**, 241-245.
 79. Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K. M., Davidson, A. R., and Burrows, L. L. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation, *Nat. Microbiol.*, **3**, 47-52.
 80. Kim, M., and Ryu, S. (2012) Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glycosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Mol. Microbiol.*, **86**, 411-425.
 81. Fallico, V., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and McAuliffe, O. (2011) Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, D-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation, *J. Virol.*, **85**, 12032-12042.
 82. Power, P. M., Sweetman, W. A., Gallacher, N. J., Woodhall, M. R., Kumar, G. A., et al. (2009) Simple sequence repeats in *Haemophilus influenzae*, *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 216-228.
 83. Turkington, C. J. R., Morozov, A., Clokie, M. R. J., and Bayliss, C. D. (2019) Phage-resistant phase-variant subpopulations mediate herd immunity against bacteriophage invasion of bacterial meta-populations, *Front. Microbiol.*, **10**, 1473.
 84. Seed, K. D., Faruque, S. M., Mekalanos, J. J., Calderwood, S. B., Qadri, F., and Camilli, A. (2012) Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1, *PLoS Pathog*, **8**, e1002917.
 85. Komano, T. (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons, *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 171-191.
 86. Brouwer, M. S. M., Jurburg, S. D., Harders, F., Kant, A., Mevius, D. J., et al. (2019) The shufflon of Inc11 plasmids is rearranged constantly during different growth conditions, *Plasmid*, **102**, 51-55.
 87. Porter, N. T., Hryckowian, A. J., Merrill, B. D., Fuentes, J. J., Gardner, J. O., et al. (2020) Phase-variable capsular polysaccharides and lipoproteins modify bacteriophage susceptibility in *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1170-1181.
 88. Quemina, E. R. J., and Quax, T. E. F. (2015) Archaeal viruses at the cell envelope: entry and egress, *Front. Microbiol.*, **6**, 552.
 89. Hartman, R., Eilers, B. J., Bollschweiler, D., Munson-McGee, J. H., Engelhardt, H., et al. (2019) The molecular mechanism of cellular attachment for an archaeal virus, *Structure*, **27**, 1634-1646.
 90. Deng, L., He, F., Bhoobalan-Chitty, Y., Martinez-Alvarez, L., Guo, Y., and Peng, X. (2014) Unveiling cell surface and type IV secretion proteins responsible for archaeal rudivirus entry, *J. Virol.*, **88**, 10264-10268.
 91. Asheshov, I. N., Strelitz, F., and Hall, E. A. (1949) Antibiotics active against bacterial viruses, *Br. J. Exp. Pathol.*, **30**, 175.
 92. Cohen, S. S. (1949) Growth requirements of bacterial viruses, *Bacteriol. Rev.*, **13**, 1.
 93. Putnam, F. W. (1953) Bacteriophages: nature and reproduction, in *Advances in Protein Chemistry*, Elsevier, Vol. 8, pp. 175-284.
 94. Neter, E. (1942) Effects of tyrothricin and actinomycin A upon bacteriophage and bacterial toxins and toxin-like substances, *J. Bacteriol.*, **43**.
 95. Jones, D. (1945) The effect of antibiotic substances upon bacteriophage, *J. Bacteriol.*, **50**, 341.
 96. Knezevic, P., and Sabo, V. A. (2019) Combining bacteriophages with other antibacterial agents to combat bacteria, in *Phage Therapy: A Practical Approach*, Springer, pp. 257-293.
 97. Morita, J., Tanaka, A., Komano, T., and Oki, T. (1979) Inactivation of phage ϕ X174 by anthracycline antibiotics, aclacinomycin A, doxorubicin and daunorubicin, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2629-2631.

98. Duan, Z. (2016) *Identification and Characterization of Novel Anti-Phage Compounds Using a High Throughput Approach*, Master Thesis, University of Toronto.
99. Rivera-Serrano, E. E., Gizzi, A. S., Arnold, J. J., Grove, T. L., Almo, S. C., and Cameron, C. E. (2020) Viperin reveals its true function, *Annu. Rev. Virol.*, **7**, 421-446.
100. Gizzi, A. S., Grove, T. L., Arnold, J. J., Jose, J., Jangra, R. K., et al. (2018) A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome, *Nature*, **558**, 610-614.
101. Fenwick, M. K., Li, Y., Cresswell, P., Modis, Y., and Ealick, S. E. (2017) Structural studies of viperin, an antiviral radical SAM enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 6806-6811.
102. Bernheim, A., Millman, A., Ofir, G., Meitav, G., Avraham, C., et al. (2021) Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules, *Nature*, **589**, 120-124.
103. Ng, W.-L., and Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures, *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 197-222.
104. Moreau, P., Diggle, S. P., and Friman, V. (2017) Bacterial cell-to-cell signaling promotes the evolution of resistance to parasitic bacteriophages, *Ecol. Evol.*, **7**, 1936-1941.
105. Srivastava, D., and Waters, C. M. (2012) A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP, *J. Bacteriol.*, **194**, 4485-4493.
106. Høyland-Kroghsbo, N. M., Mærkedahl, R. B., and Svenningsen, S. Lo (2013) A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism, *MBio*, **4**, e00362-12.
107. Tan, D., Svenningsen, S. Lo, and Middelboe, M. (2015) Quorum sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*, *MBio*, **6**, 1-10.
108. Castillo, D., Rørbo, N., Jørgensen, J., Lange, J., Tan, D., et al. (2019) Phage defense mechanisms and their genomic and phenotypic implications in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **95**, fiz004.
109. Patterson, A. G., Jackson, S. A., Taylor, C., Evans, G. B., Salmond, G. P. C., et al. (2016) Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems, *Mol. Cell*, **64**, 1102-1108.
110. Høyland-Kroghsbo, N. M., Paczkowski, J., Mukherjee, S., Broniewski, J., Westra, E., et al. (2017) Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 131-135.
111. Silpe, J. E., and Bassler, B. L. (2019) A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision, *Cell*, **176**, 268-280.
112. Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., et al. (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions, *Nature*, **541**, 488-493.
113. Stokar-Avihail, A., Tal, N., Erez, Z., Lopatina, A., and Sorek, R. (2019) Widespread utilization of peptide communication in phages infecting soil and pathogenic bacteria, *Cell Host Microbe*, **25**, 746-755.
114. Bernard, C., Li, Y., Lopez, P., and Bapteste, E. (2020) Beyond arbitrium: identification of a second communication system in *Bacillus* phage phi3T that may regulate host defense mechanisms, *ISME J.*, **15**, 545-549, doi: 10.1038/s41396-020-00795-9.
115. Grayson, P., and Molineux, I. J. (2007) Is phage DNA 'injected' into cells – biologists and physicists can agree, *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 401-409.
116. Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 317-327.
117. Abedon, S. T. (2015) Bacteriophage secondary infection, *Virol. Sin.*, **30**, 3-10.
118. Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J. C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., et al. (2013) X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target, *Mol. Microbiol.*, **89**, 152-65.
119. Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., et al. (2014) Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type, *Front. Microbiol.*, **5**, 98.
120. Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2012) The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein, *J. Bacteriol.*, **194**, 5012-5019.
121. Cumby, N., Reimer, K., Mengin-Lecreulx, D., Davidson, A. R., and Maxwell, K. L. (2015) The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of *E. coli* phage HK 97, *Mol. Microbiol.*, **96**, 437-447.
122. Lu, M. J., and Henning, U. (1994) Superinfection exclusion by T-even-type coliphages, *Trends Microbiol.*, **2**, 137-9.
123. Lu, M. J., and Henning, U. (1989) The immunity (imm) gene of *Escherichia coli* bacteriophage T4, *J. Virol.*, **63**, 3472-3478.
124. Ko, C., and Hatfull, G. F. (2018) Mycobacteriophage Fruitloop gp52 inactivates Wag31 (DivIVA) to prevent heterotypic superinfection, *Mol. Microbiol.*, **108**, 443-460.
125. Mahony, J., McGrath, S., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. (2008) Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6206-6215.
126. Hofer, B., Ruge, M., and Dreiseikelmann, B. (1995) The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product, *J. Bacteriol.*, **177**, 3080-3086.
127. Nesper, J., Blaß, J., Fountoulakis, M., and Reidl, J. (1999) Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration, *J. Bacteriol.*, **181**, 2902-2913.
128. Kliem, M., and Dreiseikelmann, B. (1989) The superimmunity gene sim of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion, *Virology*, **171**, 350-355.
129. Carballo-Ontiveros, M. A., Cazares, A., Vinuesa, P., Kameyama, L., and Guarneros, G. (2020) The concerted action of two B3-like prophage genes exclude superinfecting bacteriophages by blocking DNA entry into *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Virol.*, **94**, e00953-20, doi: 10.1128/JVI.00953-20.
130. Domingo-Calap, P., Mora-Quilis, L., and Sanjuán, R. (2020) Social bacteriophages, *Microorganisms*, **8**, 1-10.
131. Ragunathan, P. T., and Vanderpool, C. K. (2019) Cryptic-prophage-encoded small protein DicB protects *Escherichia coli* from phage infection by inhibiting inner membrane receptor proteins, *J. Bacteriol.*, **201**, e00475-19.
132. Dillingham, M. S., and Kowalczykowski, S. C. (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 642-671.
133. Cheng, K., Wilkinson, M., Chaban, Y., and Wigley, D. B. (2020) A conformational switch in response to Chi converts RecBCD from phage destruction to DNA repair, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 71-77.
134. Raleigh, E. A., and Brooks, J. E. (1998) Restriction modification systems: where they are and what they do, in *Bacterial Genomes*, Springer, doi: 10.1007/978-1-4615-6369-3_8.
135. Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., and Murray, N. E. (2014) Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3-19.

136. Bertani, G., and Weigle, J. J. (1953) Host controlled variation in bacterial viruses, *J. Bacteriol.*, **65**, 113.
137. Luria, S. E. (1953) Host-induced modifications of viruses, in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 18, pp. 237-244.
138. Berg, P., and Mertz, J. E. (2010) Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology, *Genetics*, **184**, 9-17.
139. Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., et al. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1805-12.
140. Bower, E. K. M., Cooper, L. P., Roberts, G. A., White, J. H., Luyten, Y., et al. (2018) A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction–modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction–modification enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 9067-9080.
141. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., and Wende, W. (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 685.
142. Pingoud, A., Wilson, G. G., and Wende, W. (2014) Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7489-7527.
143. Nelson, M., Raschke, E., and McClelland, M. (1993) Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3139.
144. Morgan, R. D., Bhatia, T. K., Lovasco, L., and Davis, T. B. (2008) MmI: a minimal Type II restriction–modification system that only modifies one DNA strand for host protection, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6558-6570.
145. Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimauskas, S., and Butkus, V. (1992) Purification and properties of the Eco57I restriction endonuclease and methylase – prototypes of a new class (type IV), *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6043-6049.
146. Sorokin, V., Severinov, K., and Gelfand, M. S. (2009) Systematic prediction of control proteins and their DNA binding sites, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 441-451.
147. Klimuk, E., Bogdanova, E., Nagornyykh, M., Rodic, A., Djordjevic, M., et al. (2018) Controller protein of restriction–modification system Kpn2I affects transcription of its gene by acting as a transcription elongation roadblock, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10810-10826.
148. Zakharova, M., Minakhin, L., Solonin, A., and Severinov, K. (2004) Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA, *J. Mol. Biol.*, **335**, 103-111.
149. Murray, N. E. (2000) Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 412-434.
150. Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., and Wilson, G. G. (2014) Type I restriction enzymes and their relatives, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 20-44.
151. Gao, Y., Cao, D., Zhu, J., Feng, H., Luo, X., et al. (2020) Structural insights into assembly, operation and inhibition of a type I restriction–modification system, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1107-1118.
152. Neaves, K. J., Cooper, L. P., White, J. H., Carnally, S. M., Dryden, D. T. F., et al. (2009) Atomic force microscopy of the EcoKI Type I DNA restriction enzyme bound to DNA shows enzyme dimerization and DNA looping, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2053-2063.
153. Bianco, P. R., and Hurley, E. M. (2005) The type I restriction endonuclease EcoRI24I, couples ATP hydrolysis to bidirectional DNA translocation, *J. Mol. Biol.*, **352**, 837-859.
154. Janscak, P., MacWilliams, M. P., Sandmeier, U., Nagaraja, V., and Bickle, T. A. (1999) DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes, *EMBO J.*, **18**, 2638-2647.
155. Studier, F. W., and Bandyopadhyay, P. K. (1988) Model for how type I restriction enzymes select cleavage sites in DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4677-4681.
156. Smith, R. M., Diffin, F. M., Savery, N. J., Josephsen, J., and Szczelkun, M. D. (2009) DNA cleavage and methylation specificity of the single polypeptide restriction–modification enzyme LlaGI, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7206-7218.
157. Chand, M. K., Carle, V., Anuvind, K. G., and Saikrishnan, K. (2020) DNA-mediated coupling of ATPase, translocase and nuclease activities of a Type ISP restriction–modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 2594-2603.
158. Makovets, S., Titheradge, A. J. B., and Murray, N. E. (1998) ClpX and ClpP are essential for the efficient acquisition of genes specifying type IA and IB restriction systems, *Mol. Microbiol.*, **28**, 25-35.
159. Simons, M., Diffin, F. M., and Szczelkun, M. D. (2014) ClpXP protease targets long-lived DNA translocation states of a helicase-like motor to cause restriction alleviation, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12082-12091.
160. Dybvig, K., Sitaraman, R., and French, C. T. (1998) A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13923-13928.
161. Rao, D. N., Dryden, D. T. F., and Bheemanaiik, S. (2014) Type III restriction–modification enzymes: a historical perspective, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 45-55.
162. Butterer, A., Pernstich, C., Smith, R. M., Sobott, F., Szczelkun, M. D., and Toth, J. (2014) Type III restriction endonucleases are heterotrimeric: comprising one helicase-nuclease subunit and a dimeric methyltransferase that binds only one specific DNA, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5139-5150.
163. Gupta, Y. K., Chan, S.-H., Xu, S., and Aggarwal, A. K. (2015) Structural basis of asymmetric DNA methylation and ATP-triggered long-range diffusion by EcoP15I, *Nat. Commun.*, **6**, 1-10.
164. Janscak, P., Sandmeier, U., Szczelkun, M. D., and Bickle, T. A. (2001) Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoPII and EcoP15I, *J. Mol. Biol.*, **306**, 417-431.
165. Van Aelst, K., Tyth, J., Ramanathan, S. P., Schwarz, F. W., Seidel, R., and Szczelkun, M. D. (2010) Type III restriction enzymes cleave DNA by long-range interaction between sites in both head-to-head and tail-to-tail inverted repeat, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 9123-9128.
166. Schwarz, F. W., Tóth, J., van Aelst, K., Cui, G., Clausing, S., et al. (2013) The helicase-like domains of type III restriction enzymes trigger long-range diffusion along DNA, *Science*, **340**, 353-356.
167. Ahmad, I., Kulkarni, M., Gopinath, A., and Saikrishnan, K. (2018) Single-site DNA cleavage by Type III restriction endonuclease requires a site-bound enzyme and a trans-acting enzyme that are ATPase-activated, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 6229-6237.
168. Srikhanta, Y. N., Fox, K. L., and Jennings, M. P. (2010) The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 196-206.
169. Weigle, P., and Raleigh, E. A. (2016) Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses, *Chem. Rev.*, **116**, 12655-12687.
170. Tock, M. R., and Dryden, D. T. (2005) The biology of restriction and anti-restriction, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 466-472.
171. Loenen, W. A. M., and Raleigh, E. A. (2014) The other face of restriction: modification-dependent enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 56-69.

172. Czapinska, H., Kowalska, M., Zagorskaitė, E., Manakova, E., Slyvka, A., et al. (2018) Activity and structure of EcoK_{McrA}, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 9829-9841.
173. Siwek, W., Czapinska, H., Bochtler, M., Bujnicki, J. M., and Skowronek, K. (2012) Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R. DpnI, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7563-7572.
174. Liu, G., Ou, H.-Y., Wang, T., Li, L., Tan, H., et al. (2010) Cleavage of phosphorothioated DNA and methylated DNA by the type IV restriction endonuclease ScoMcrA, *PLoS Genet.*, **6**, e1001253.
175. Sutherland, E., Coe, L., and Raleigh, E. A. (1992) McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease, *J. Mol. Biol.*, **225**, 327-348.
176. Xu, S., Corvaglia, A. R., Chan, S.-H., Zheng, Y., and Linder, P. (2011) A type IV modification-dependent restriction enzyme SauUSI from *Staphylococcus aureus* subsp. aureus USA300, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5597-5610.
177. Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 53-72.
178. Murphy, J., Mahony, J., Ainsworth, S., Nauta, A., and van Sinderen, D. (2013) Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7547-7555.
179. Adhikari, S., and Curtis, P. D. (2016) DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 575-591.
180. Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3742-3756.
181. Ershova, A. S., Rusinov, I. S., Spirin, S. A., Karyagina, A. S., and Alexeevski, A. V. (2015) Role of restriction-modification systems in prokaryotic evolution and ecology, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1373-1386.
182. Seib, K. L., Srikhanta, Y. N., Atack, J. M., and Jennings, M. P. (2020) Epigenetic regulation of virulence and immunoevasion by phase-variable restriction-modification systems in bacterial pathogens, *Annu. Rev. Microbiol.*, **74**, 655-671.
183. Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., and Westra, E. R. (2020) Evolutionary ecology and interplay of prokaryotic innate and adaptive immune systems, *Curr. Biol.*, **30**, R1189-R1202.
184. Lomovskaia, N. D., Mkrtumian, N. M., and Gostimskaya, N. L. (1970) Isolation and characterization of the actinophage of *Streptomyces coelicolor*, *Genetika*, **6**, 135.
185. Chinenova, T. A., Mkrtumian, N. M., and Lomovskaia, N. D. (1982) Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Genetika*, **18**, 1945-1952.
186. Chater, K. F. (1986) *Streptomyces* phages and their applications to *Streptomyces* genetics, in *The Bacteria*, Academic Press Orlando, vol. 9, pp. 119-158.
187. Bedford, D. J., Laity, C., and Buttner, M. J. (1995) Two genes involved in the phase-variable phi C31 resistance mechanism of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, **177**, 4681-9.
188. Laity, C., Chater, K. F., Lewis, C. G., and Buttner, M. J. (1993) Genetic analysis of the phi C31-specific phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.*, **7**, 329-36.
189. Sumbly, P., and Smith, M. C. M. (2002) Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Microbiol.*, **44**, 489-500.
190. Hoskisson, P. A., Sumbly, P., and Smith, M. C. M. (2015) The phage growth limitation system in *Streptomyces coelicolor* A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity, *Virology*, **477**, 100-109.
191. Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., et al. (2015) BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes, *EMBO J.*, **34**, 169-183.
192. Pu, T., Mei, Z., Zhang, W., Liang, W., Zhou, X., et al. (2020) An *in vitro* DNA phosphorothioate modification reaction, *Mol. Microbiol.*, **113**, 452-463.
193. Gordeeva, J., Morozova, N., Sierro, N., Isaev, A., Sinkunas, T., et al. (2019) BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 253-265.
194. LeGault, K., Hays, S. G., Angermeyer, A., McKitterick, A. C., Johura, F., et al. (2020) Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern virus-pathogen conflicts, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.16.423150.
195. Hui, W., Zhang, W., Kwok, L.-Y., Zhang, H., Kong, J., and Sun, T. (2019) Identification and functional analysis of the pglX gene of *Lactobacillus casei* Zhang bacteriophage exclusive (BREX) system, *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM-01001.
196. Atanasiu, C., Su, T. J., Sturrock, S. S., and Dryden, D. T. F. (2002) Interaction of the ocr gene 0.3 protein of bacteriophage T7 with Eco KI restriction/modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3936-3944.
197. Bandyopadhyay, P. K., Studier, F. W., Hamilton, D. L., and Yuan, R. (1985) Inhibition of the type I restriction-modification enzymes EcoB and EcoK by the gene 0.3 protein of bacteriophage T7, *J. Mol. Biol.*, **182**, 567-578.
198. Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., et al. (2018) DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities, *Nat. Microbiol.*, **3**, 90-98.
199. Mahankali, M., Alter, G., and Gomez-Cambronero, J. (2015) Mechanism of enzymatic reaction and protein-protein interactions of PLD from a 3D structural model, *Cell. Signal.*, **27**, 69-81.
200. Thiaville, J. J., Kellner, S. M., Yuan, Y., Hutinet, G., Thiaville, P. C., et al. (2016) Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1452-E1459.
201. Iyer, L. M., Zhang, D., Maxwell Burroughs, A., and Aravind, L. (2013) Computational identification of novel biochemical systems involved in oxidation, glycosylation and other complex modifications of bases in DNA, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7635-7655.
202. Hutinet, G., Kot, W., Cui, L., Hillebrand, R., Balamkundu, S., et al. (2019) 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems, *Nat. Commun.*, **10**, 1-12.
203. Kot, W., Olsen, N. S., Nielsen, T. K., Hutinet, G., de Crécy-Lagard, V., et al. (2020) Detection of preQ0 deazaguanine modifications in bacteriophage CAjan DNA using Nanopore sequencing reveals same hypermodification at two distinct DNA motifs, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10383-10396.
204. Wang, L., Jiang, S., Deng, Z., Dedon, P. C., and Chen, S. (2019) DNA phosphorothioate modification – a new multi-functional epigenetic system in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **43**, 109-122.
205. Xiong, L., Liu, S., Chen, S., Xiao, Y., Zhu, B., et al. (2019) A new type of DNA phosphorothioation-based antiviral system in archaea, *Nat. Commun.*, **10**, 1-11.
206. Xiong, X., Wu, G., Wei, Y., Liu, L., Zhang, Y., et al. (2020) SspABCD-SspE is a phosphorothioation-sensing bacterial defence system with broad anti-phage activities, *Nat. Microbiol.*, **5**, 917-928.
207. Zhou, X., He, X., Liang, J., Li, A., Xu, T., et al. (2005) A novel DNA modification by sulphur, *Mol. Microbiol.*, **57**, 1428-1438.

208. Wang, L., Chen, S., Xu, T., Taghizadeh, K., Wishnok, J. S., et al. (2007) Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 709-710.
209. He, W., Huang, T., Tang, Y., Liu, Y., Wu, X., et al. (2015) Regulation of DNA phosphorothioate modification in *Salmonella enterica* by DndB, *Sci. Rep.*, **5**, 12368.
210. You, D., Wang, L., Yao, F., Zhou, X., and Deng, Z. (2007) A Novel DNA Modification by sulfur: DndA is a NifS-like cysteine desulfurase capable of assembling DndC as an iron-sulfur cluster protein in *Streptomyces lividans*, *Biochemistry*, **46**, 6126-6133.
211. Yao, F., Xu, T., Zhou, X., Deng, Z., and You, D. (2009) Functional analysis of *spfD* gene involved in DNA phosphorothioation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *FEBS Lett.*, **583**, 729-733.
212. Wu, Y., Tang, Y., Dong, X., Zheng, Y. Y., Haruehanroengra, P., et al. (2020) RNA phosphorothioate modification in prokaryotes and eukaryotes, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1301-1305.
213. Tong, T., Chen, S., Wang, L., Tang, Y., Ryu, J. Y., et al. (2018) Occurrence, evolution, and functions of DNA phosphorothioate epigenetics in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115**, E2988-E2996.
214. Xu, T., Yao, F., Zhou, X., Deng, Z., and You, D. (2010) A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7133-41.
215. Cao, B., Cheng, Q., Gu, C., Yao, F., DeMott, M. S., et al. (2014) Pathological phenotypes and *in vivo* DNA cleavage by unrestrained activity of a phosphorothioate-based restriction system in *Salmonella*, *Mol. Microbiol.*, **93**, 776-785.
216. Gan, R., Wu, X., He, W., Liu, Z., Wu, S., et al. (2014) DNA phosphorothioate modifications influence the global transcriptional response and protect DNA from double-stranded breaks, *Sci. Rep.*, **4**, 6642.
217. Cao, B., Chen, C., DeMott, M. S., Cheng, Q., Clark, T. A., et al. (2014) Genomic mapping of phosphorothioates reveals partial modification of short consensus sequences, *Nat. Commun.*, **5**, 1-13.
218. Li, J., Chen, Y., Zheng, T., Kong, L., Zhu, S., et al. (2019) Quantitative mapping of DNA phosphorothioate reveals phosphorothioate heterogeneity of low modification frequency, *PLoS Genet.*, **15**, e1008026.
219. Wu, X., Cao, B., Aquino, P., Chiu, T.-P., Chen, C., et al. (2020) Epigenetic competition reveals density-dependent regulation and target site plasticity of phosphorothioate epigenetics in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14322-14330, doi: 10.1073/pnas.2002933117.

MICROBIAL ARSENAL OF ANTIVIRAL DEFENSES – PART I

Review

A. B. Isaev^{1*}, O. S. Musharova^{1,2}, and K. V. Severinov^{1,3*}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Moscow, Russia; E-mail: teft18@gmail.com

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; E-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Bacteriophages or phages are viruses that infect bacterial cells (for the scope of this review we will also consider viruses that infect Archaea). Constant threat of phage infection is a major force that shapes evolution of the microbial genomes. To withstand infection, bacteria had evolved numerous strategies to avoid recognition by phages or to directly interfere with phage propagation inside the cell. Classical molecular biology and genetic engineering have been deeply intertwined with the study of phages and host defenses. Nowadays, owing to the rise of phage therapy, broad application of CRISPR-Cas technologies, and development of bioinformatics approaches that facilitate discovery of new systems, phage biology experiences a revival. This review describes variety of strategies employed by microbes to counter phage infection, with a focus on novel systems discovered in recent years. First chapter covers defense associated with cell surface, role of small molecules, and innate immunity systems relying on DNA modification.

Keywords: bacteriophages, phage-host interactions, antiviral defence, immunity systems, CRISPR-Cas, restriction-modification, BREX, DISARM, Phosphorothioate, Dnd systems