

УДК 577.2

## МИКРОБНЫЙ АРСЕНАЛ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ. ГЛАВА II

### Обзор

© 2021 А.Б. Исаев<sup>1\*</sup>, О.С. Мушарова<sup>1,2</sup>, К.В. Северинов<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, 143028 Москва, Россия; электронная почта: [tcft18@gmail.com](mailto:tcft18@gmail.com)

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>3</sup> Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA; e-mail: [severik@waksman.rutgers.edu](mailto:severik@waksman.rutgers.edu)

Поступила в редакцию 30.08.2020

После доработки 29.01.2021

Принята к публикации 29.01.2021

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 препятствующие 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. Вторая глава посвящена системам адаптивного иммунитета, механизмам abortивной инфекции, защитным системам, связанным с мобильными генетическими элементами, и новым системам, которые были открыты в последние годы с помощью метагеномного майнинга.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бактериофаги, иммунные системы, CRISPR-Cas, abortивная инфекция, токсин-антитоксин, PIC1, прокариотический белок Argonaute, CBASS.

DOI: 10.31857/S0320972521040060

### ВВЕДЕНИЕ

В первой главе обзора были рассмотрены стратегии, позволяющие клеткам-хозяевам избегать распознавания фагами, механизмы врождённого иммунитета, блокирующие ранние стадии инфекции, а также системы защиты, использующие химические модификации для различения собственных и чужеродных молекул ДНК. В этой главе мы продолжим описание

разнообразия микробных противовирусных систем.

### CRISPR-Cas СИСТЕМЫ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

В отличие от систем врождённого иммунитета, основанных на модификации ДНК, в которых распознавание мишени зависит от взаимо-

Принятые сокращения: CRISPR-Cas – кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins); PAM – мотив, смежный с протоспейсером (Protospacer Adjacent Motif); HEPN – нуклеотид-связывающий домен, характерный для высших эукариот и прокариот (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain); R-M – рестрикция-модификация (Restriction-Modification); MGE – мобильный генетический элемент; pAgo – прокариотический белок Argonaute (Prokaryotic Argonaute); Abi – abortивная инфекция; TA – токсин-антитоксин; RTase – обратная транскриптаза; CBASS – антифаговая сигнальная система на основе циклических олигонуклеотидов (Cyclic-Oligonucleotide-Based Anti-Phage Signalling System); cGAMP – циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (Cyclic Guanosine Monophosphate-Adenosine Monophosphate); CD-NTase – cGAS/DncV-подобная нуклеотидил-трансфераза (cGAS/DncV-like Nucleotidyl Transferase); Cap – белок, ассоциированный с CD-NTase (CD-NTase associated protein); DUF – домен с неизвестной функцией (Domain of Unknown Function); PIC1 – индуцированные фагами хромосомные островки (Phage-Inducible Chromosomal Islands); PLE – фаго-индуцируемый хромосомный островкоподобный элемент (Phage-inducible Chromosomal Island-like Element); SaPI – островок патогенности *Staphylococcus aureus*; DRT – обратные транскриптазы, ассоциированные с защитой (Defence-associated RTase); MOI – множественность заражения; STING – стимулятор генов интерферона (Stimulator of Interferon Genes); TIR – Toll/интерлейкин-1 рецептор (Toll/interleukin-1 receptor).

\* Адресат для корреспонденции.

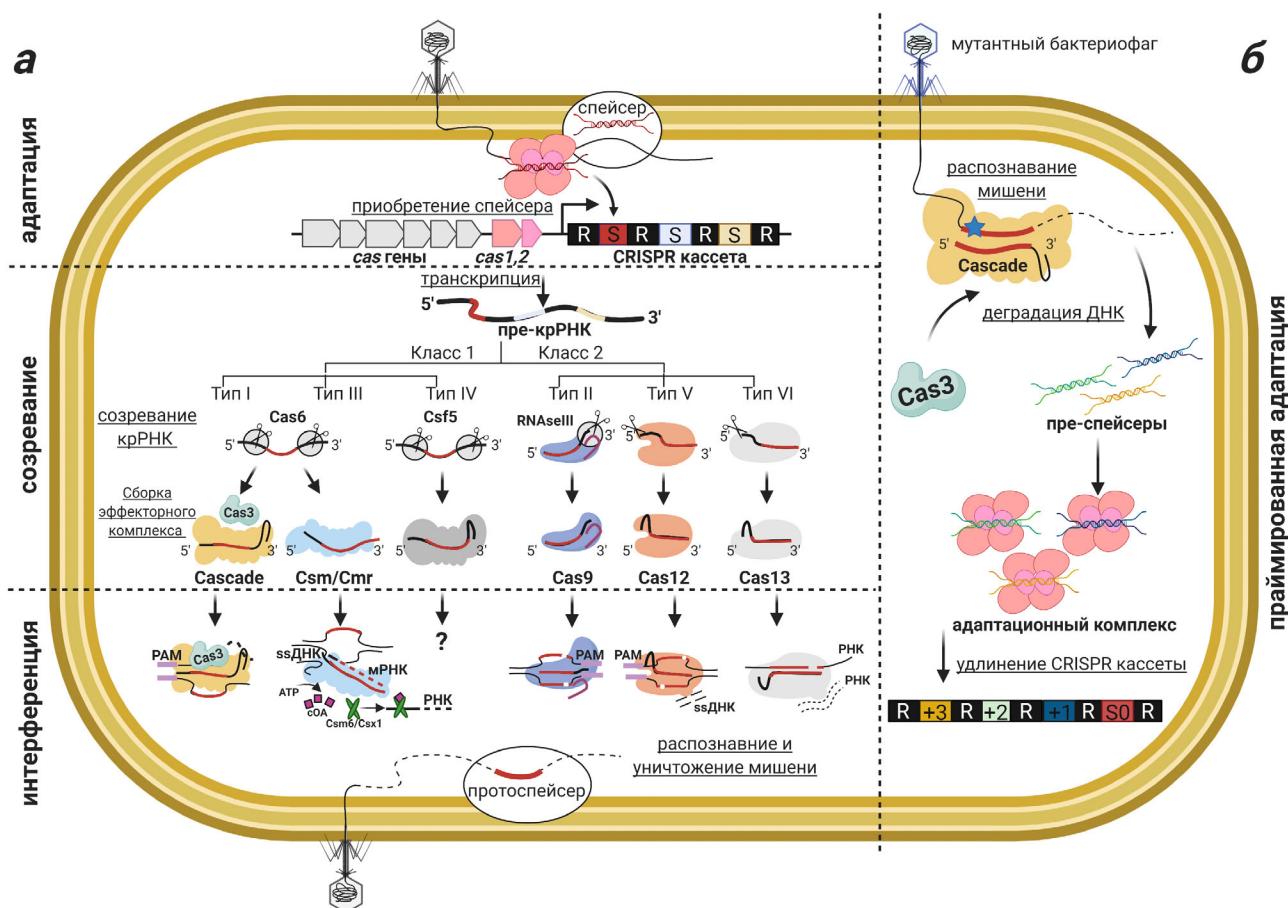
действия защитных белков с заранее определенной последовательностью в геноме фага, у прокариот также имеются системы адаптивного иммунитета CRISPR-Cas (кластеризованные регулярно прерываемые повторы и ассоциированные с ними белки (Clustered Regularly Interspaced Repeats and CRISPR-associated proteins)). В этом случае распознавание нуклеиновой кислоты осуществляется за счёт отжига комплементарной молекулы РНК, и система может приобретать и хранить информацию для интерференции с новыми последовательностями. Способность сохранять информацию о предыдущих инфекциях является общей чертой, характерной для систем CRISPR-Cas и иммунной системы высших эукариот, в том числе и человека. В отличие от иммунитета млекопитающих, CRISPR-Cas-опосредованный адаптивный иммунитет передаётся по наследству. Система CRISPR-Cas состоит из CRISPR-кассет (количество кассет в геномах прокариот варьируется от одной до нескольких десятков) и ассоциированных с ними генов *cas* [1–3]. CRISPR-кассета представляет собой кластер из коротких повторяющихся фрагментов геномной ДНК, разделённых уникальными спейсерными последовательностями, по крайней мере некоторые из которых происходят из чужеродной ДНК. Перед CRISPR-кассетой находится АТ-богатая лидерная область [1]. Гены *cas* кодируют белковые компоненты эффекторного комплекса систем CRISPR-Cas. Системы CRISPR-Cas участвуют в двух различных процессах: адаптации и интерференции. CRISPR-адаптация — это процесс интеграции новых спейсеров в CRISPR-кассету.

В ходе процесса CRISPR-адаптации происходит удлинение кассеты на последовательность одного нового спейсера и одного повтора. Белки адапционного комплекса гомологичны во всех системах CRISPR-Cas. Транскрипция CRISPR-кассет приводит к образованию пре-крРНК, которая затем процессируется с образованием коротких крРНК. В результате процессинга каждая крРНК содержит спейсер, окружённый частичными повторами. Связанная с белками Cas, крРНК образует эффекторный комплекс, способный специфически распознавать протоспейсер, т.е. последовательность ДНК или РНК, комплементарную спейсерной части крРНК. Вслед за распознаванием протоспейсера происходит деградация молекулы-мишени, содержащей протоспейсер. Процесс распознавания мишени и её деградации называется CRISPR-интерференцией (рис. 1, а).

**Разнообразие механизмов CRISPR-интерференции.** Классификация систем CRISPR-Cas основана на белковом составе эффекторных комплексов. На настоящий момент системы CRISPR-Cas можно разделить на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа [4]. Системы класса I (типы I, III и IV) используют мульти-субъединичные эффекторы, в то время как эффекторы класса 2 (типы II, V и VI) являются белками, образованными одной субъединицей (таблица). Различные типы систем CRISPR-Cas можно отличить друг от друга по наличию специфических «сигнатурных белков», участвующих в деградации молекулы ДНК (белки Cas3, Csf1, Cas10, Cas9, Cpf1 и C2c2 для типов I, IV, III, II, V и VI соответственно [4]).

Разнообразие механизмов интерференции и классификация систем CRISPR-Cas

Класс	Тип	Подтипы	Специфич- ный белок	Процессинг пре-крРНК	Мишень	Различение собственной и чужеродной НК	Эффекторы
Класс I	I	A, B, C, D, E, F1, F2, F3, G	Cas3	Cas6	ДНК	PAM	Cascade, крРНК, Cas3
	III	A, B, C, D, E, F	Cas10	Cas6, Cas10, Csm2, Csm5 (III-A)	ДНК, РНК	CRISPR повтор	Cmr/Csm, крРНК, Cas10
	IV	A1, A2, A3, B, C, D, E	Csf1	Csf5	ДНК?	?	Csf1, Csf3, Csf5, Csf2, крРНК
Класс II	II	A, B, C1, C2	Cas9	РНКазы III	ДНК	PAM	Cas9, крРНК, тракрРНК
	V	A, B1, B2, E, V-C, V-D, V-F1, V-F2, V-F3, V-G, V-H, V-I, V-U1, V-U2, V-U3, V-U4, V-U5	Cpf1	Cpf1	ДНК	PAM	Cpf1, крРНК, тракрРНК
	VI	A, B1, B2, C, D	C2c2	Cas13	РНК	?	C2c2, крРНК



**Рис. 1.** Механизм адаптивного иммунитета CRISPR-Cas у прокариот. *а* – Фрагменты, происходящие из чужеродной ДНК, могут быть встроены в CRISPR-касету в процессе CRISPR-адаптации. CRISPR-касета удлиняется на один новый спейсер и один повтор. Транскрипция CRISPR-кассет приводит к образованию пре-крРНК, которая затем расщепляется с образованием коротких крРНК, и при этом каждая крРНК содержит спейсер, расположенный между частичными повторами. Гены *cas* кодируют белковые компоненты эффекторного и адаптационного комплексов. Эффекторный комплекс состоит из крРНК, связанной с белками Cas, и взаимодействует с протоспейсером, т.е. последовательностью ДНК, комплементарной последовательности спейсера крРНК. Распознавание протоспейсера эффекторным комплексом CRISPR приводит к деградации молекулы ДНК-мишени. Белковый состав модуля интерференции бывает различным, и он используется как основной критерий в классификации систем CRISPR-Cas. Системы CRISPR-Cas подразделяют на два класса, шесть типов и несколько подтипов. Два класса отличаются друг от друга по составу интерференционного комплекса: системы CRISPR-Cas класса 1 являются мульти-субъединичными, а системы класса 2 содержат только один белок. *б* – В процессе праймированной адаптации новые спейсеры предпочтительно отбираются из ДНК, таргетируемой эффекторным комплексом. (С цветными вариантами рис. 1–7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>.)

Системы CRISPR-Cas класса I включают три типа: I, III и IV. Подробно изучены эффекторные комплексы систем типа I и III. Сходство архитектуры эффекторных комплексов указывает на общее происхождение этих систем [5]. Эффектор типа I представлен большим мульти-субъединичным белковым комплексом, называемым Cascade, который содержит субъединицы белка RAMP (Repeat-Associated Mysterious Protein) в стехиометрии Cse1<sub>1</sub>/Cse2<sub>2</sub>/Cas7<sub>6</sub>/Cas5<sub>1</sub>/Cas6<sub>1</sub>. Cascade связывает процессорную крРНК длиной 61 нуклеотид с 32-нуклеотидным спейсером [6–9]. Отжиг крРНК, свя-

занной с Cascade, с комплементарным протоспейсером приводит к локальному плавлению дцДНК-мишени и образованию R-петли – гетеродуплекса между спейсером крРНК и целевой цепью протоспейсера ДНК, в то время как нетаргетная нить ДНК протоспейсера вытесняется и остаётся в однонитевой форме. Обязательным условием распознавания мишени является наличие короткого, состоящего из двух-трех нуклеотидов мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM, Protospacer Adjacent Motif), расположенному на 3'-конце цепи-мишени, то есть после протоспейсера. Наличие PAM приво-

дит к тому, что системы CRISPR-Cas не атакуют собственный геном, так как PAM никогда не находится вблизи спейсеров в локусах CRISPR. После формирования R-петли нуклеаза/хеликаза Cas3 рекрутируется к комплексу [10]. Сначала Cas3 вносит одноцепочечный разрыв в нетаргетную цепь протоспейсера на 11–15 нуклеотидов ниже PAM, а затем начинает раскручивать и расщеплять ДНК в направлении 3'→5'.

В системах типа III эффектор обладает сходной с Cascade структурой [11, 12]. Однако эффектор типа III распознает не дцДНК, а последовательности РНК, комплементарные спейсерам крРНК [13, 14]. Распознавание транскрибированной РНК-мишени стимулирует неспецифическую ДНК-азную активность сигнатурного HD (гистидин-аспартат) домена нуклеазы Cas10, что приводит к *in situ* деградации ДНК в транскрипционном пузыре [15–20]. В то же время активируется Palm-домен Cas10, ответственный за синтез вторичных мессенджеров (вариантов циклического олигоаденилата (сОА)), который может активировать вспомогательные рибонуклеазы (например, Csm6/Csx1), неспецифично разрушающие транскрипты клеточного и вирусного происхождения [21–23]. Системы типа III не используют PAM для предотвращения аутоиммунной реакции, так как эффекторный комплекс не способен таргетировать CRISPR-кассету или крРНК. Однако, чтобы избежать риска расщепления собственной ДНК в случае транскрипции CRISPR-касеты с противоположной цепи, крРНК включает тэг (метку) – последовательность из 8 нуклеотидов CRISPR-повтора, которая ингибирует активность Cas10 [17]. Если последовательность мишени комплементарна спейсеру и тэгу крРНК, то интерференция не происходит.

Точный механизм CRISPR-иммунитета в системах типа IV пока полностью не изучен. Сигнатурным белком таких систем является Csf1. CRISPR-Cas типа IV были обнаружены локализованными на плаزمиде или в геноме профагов, что указывает на возможность переноса аппарата CRISPR-Cas на мобильные генетические элементы (MGE) и обратно [24, 25]. Сигнатурные гены CRISPR-Cas типа IV не сопровождаются генами адаптационного модуля *cas1*, *cas2* [26]. Это приводит к предположению, что белки типа IV могут принимать участие во внутриклеточных процессах, не связанных с адаптивным иммунитетом [27, 28].

Системы CRISPR-Cas класса II включают три типа: тип II, тип V и тип VI. В системах типа II мономерный белок Cas9 в комплексе с крРНК отвечает как за распознавание, так и за деградацию таргетной дцДНК. Cas9 обладает

двумя нуклеазными доменами (RuvC и HNH) и способен вносить двухцепочечные разрывы [29, 30]. Он представляет систему с минимальным интерференционным комплексом, и поэтому стал предпочтительным инструментом при проведении работ по редактированию генома с использованием CRISPR-Cas [31–33]. Системы типа V характеризуются наличием эффекторного белка Cpf1. Cpf1 содержит домен нуклеазы RuvC, аналогичный Cas9, в то время как домен HNH отсутствует [34]. Эффектор типа V способен разрушать таргетную двуцепочечную ДНК PAM-специфическим образом [34, 35], в то время как связывание Cpf1 с мишенями также приводит к проявлению его неспецифической активности в отношении одноцепочечной ДНК [36]. Большинство систем типа V содержат эффектор Cpf1, тогда как в подтипе V-F он заменён на Cas14. На настоящий момент Cas14 является самым маленьким по размеру из всех известных CRISPR-эффекторов. Cas14a представляет собой CRISPR-эндонуклеазу, таргетирующую оцДНК, и для его активации не требуется PAM [37]. Некоторые эффекторы подтипа V-U демонстрируют филогенетическое сходство с транспозазами TnpB [37, 38]. Система CRISPR-Cas типа VI была предсказана методами биоинформатического анализа в 2015 г. [39]. Вскоре был описан эффекторный белок C2c2 из подтипа VI-A. У *Leptotrichia shahii* локус VI-A содержит только 3 гена (*cas1*, *cas2*, *c2c2*) и CRISPR-кассету. Нуклеаза C2c2, связанная с крРНК, образует эффекторный комплекс, который способен расщеплять молекулы одноцепочечной РНК. В отличие от всех известных CRISPR-нуклеаз, C2c2 расщепляет РНК за счёт активности домена HEPN (Higher Eukaryotes и Prokaryotes Nucleotide-binding, нуклеотид-связывающий домен высших эукариот и прокариот). Мутация в каталитическом центре домена HEPN приводит к потере активности эффекторного комплекса, хотя при этом сохраняется РНК-связывающая активность мутантного белка [40]. Благодаря способности связываться с молекулами РНК заранее определенным образом, нуклеаза C2c2 может быть использована как эффективный инструмент редактирования РНК и регуляции экспрессии генов.

Особый интерес представляет причина разнообразия эффекторов CRISPR и их филогенетические связи. Структуры эффекторных комплексов систем типа I и III весьма сходны. Принято считать, что эффекторный комплекс системы типа III является более древним. При этом гены *cas* не всегда ассоциированы с CRISPR-кассетой и модулем адаптации *cas1–cas2* [41]. В MGE, называемых каспозонами, были обна-

ружены автономные гомологи Cas1. Белки Cas9 и Cpf1, характерные для типов II и V соответственно, подобны белку, кодируемому транспозоном TnpB, и содержат домен эндонуклеазы RuvC [42]. У белка Cas13 (система типа VI) есть РНК-азные домены HEPN. Таким образом, системы CRISPR-Cas могли эволюционировать в результате заимствования генов модулей интерференции и адаптации от каспозонов, в то время как эффекторные нуклеазы могут происходить из геномов клеток или мобильных генетических элементов.

**CRISPR-адаптация.** Наиболее консервативными белковыми компонентами систем CRISPR-Cas являются Cas1 и Cas2, чье участие необходимо на стадии приобретения спейсеров [43]. Как правило, гены *cas1* и *cas2* локализуются вблизи друг от друга, а кодируемые ими белки образуют стабильный комплекс [44, 45]. Делеция *cas1* и *cas2* не влияет на CRISPR-интерференцию и созревание крРНК в системах типов I [46–49], II [50, 51] и III [52]. Cas1 является эндонуклеазой [53, 54], которая также способна разрушать структуры Холлидея. *In vitro* Cas1 может способствовать интеграции и рекомбинации ДНК [55]. Также *in vitro* Cas2 проявляет нуклеазную активность как в отношении РНК, так и ДНК [56, 57]. Однако для процесса CRISPR-адаптации *in vivo* требуется только нуклеазная активность белка Cas1 [44]. Для адаптации *in vivo* также важна способность собирать стабильный комплекс Cas1–Cas2. Мутации, которые нарушают образование комплекса *in vitro*, препятствуют приобретению спейсеров *in vivo* [44]. Во время процесса встраивания нового спейсера комплекс Cas1–Cas2 вносит однонитевой разрыв точно в месте соединения лидерного участка и повтора в CRISPR-кассете, катализируя нуклеофильную атаку 3'-ОН-конца встраиваемого спейсера на 5'-конец первого повтора. Точно также другая цепь надрезается на стыке первого повтора и спейсера, и 5'-конец повтора присоединяется к 3'-концу нового спейсера. В результате встроенный спейсер окружен одноцепочечными повторяющимися последовательностями, которые позднее достраиваются благодаря активности репарационных белков клетки-хозяина [58]. Подобные промежуточные структуры также обнаруживаются в процессе интеграции мобильных элементов с участием транспозазы, и это позволяет предположить, что реакции приобретения спейсера и интеграции транспозонов механически похожи друг на друга [59–62].

Способность адаптационного комплекса Cas1–Cas2 приобретать новые спейсеры, независимо от активности эффекторных комплек-

сов CRISPR, известна как процесс наивной адаптации. Во время этого процесса новые спейсеры могут быть получены как из внехромосомной ДНК, так и из генома клетки-хозяина, и только 50% новых спейсеров содержат консенсусный PAM. Наивная адаптация необходима для последующего распознавания и уничтожения впервые проникшего в клетку инфекционного агента, и, по-видимому, является универсальной особенностью всех систем CRISPR-Cas. Известно, что этот процесс хотя бы частично зависит от активности комплексов RecBCD клетки-хозяина [63]. RecBCD осуществляет процессинг остановленных репликационных вилок, и предполагается, что образующиеся при этом фрагменты ДНК могут быть использованы комплексом Cas1–Cas2 для вставки в CRISPR-кассету. Отсутствие RecBCD приводит к снижению эффективности процесса наивной адаптации, но не останавливает её. Следовательно, комплекс Cas1–Cas2 может использовать другие источники спейсеров. Вопрос об участии других белков клетки-хозяина в процессе CRISPR-адаптации и регуляции этого процесса стал изучаться только недавно [64–67]. Например, было показано, что ДНК-полимераза I необходима как для наивной, так и для праймированной адаптации (предположительно, для заполнения одноцепочечных повторов, возникающих при встраивании спейсеров) [68]. Dorman и Bhriain [65] предположили, что отрицательная суперспирализация может влиять на различные стадии взаимодействия белков CRISPR с ДНК, включая адаптацию, экспрессию генов *cas* и локусов CRISPR и фактически интерференцию.

Наличие PAM позволяет различать геном хозяина, содержащий спейсер в составе CRISPR-касеты, и протоспейсер в составе молекулы-мишени. Однако мутации PAM или seed-последовательности могут защитить вирусы от их распознавания и деградации эффекторным комплексом [30, 69–72]. Следовательно, система CRISPR-Cas должна обновлять свою «память», чтобы избежать заражения мутировавшими бактериофагами. Для достижения этой цели некоторые типы систем CRISPR-Cas используют праймированную адаптацию – высокоэффективный процесс получения новых спейсеров из уже известных ранее встречавшихся фагов, фрагменты генома которых были сохранены в CRISPR-кассете в качестве иммунологической памяти. Праймированная адаптация была показана для систем CRISPR-Cas I-E [48], I-F [49, 73], I-B [74, 75], I-C [76], I-U [77] и II-A [78]. Праймированная адаптация приводит к высокоэффективному накоплению новых спейсеров,

локализованных в *cis*-положении к «праймирующему» протоспейсеру, распознаваемому крРНК в составе эффекторного комплекса [79]. Наблюдаемая эффективность праймированной адаптации (измеряемая как количество удлиненных CRISPR-кассет в популяции) очень низка в том случае, если праймирующий протоспейсер полностью совпадает с крРНК и содержит PAM, способный к консенсусной интерференции (AAG или ATG — в случае системы I-E из *Escherichia coli*) [48, 80]. Эффективность праймированной адаптации стимулируется наличием мутаций PAM или протоспейсера, которые снижают эффективность интерференции [30, 70, 73]. Тем не менее для праймированной адаптации необходим функциональный белок Cas3, что позволяет предположить существование функциональной связи между CRISPR-интерференцией и праймированной адаптацией [71, 81]. Недавнее исследование *in vitro* предполагает, что Cascade, Cas1–Cas2 и Cas3 образуют единый праймирующий комплекс, активность которого приводит к эффективному отбору новых спейсеров [82]. Чтобы объяснить такую связь, были предложены две альтернативные модели. Согласно одной модели, эффекторы, связавшиеся с протоспейсерами с определенными PAM, принимают специфическую конформацию, что приводит к привлечению адаптационного комплекса Cas1–Cas2, а также белка Cas3 и последующему направленному сканированию мишени, и отбору новых спейсеров [83]. Напротив, комплексы, которые были сформированы на мишенях с подходящими для интерференции PAM, не задействуют Cas1–Cas2, приводя только к интерференции [84]. Вторая модель постулирует, что очевидная разница между эффективностью процесса праймированной адаптации с различными мишенями является следствием деградации неоптимальных мишеней [81, 85]. Поскольку большинство MGE способны реплицироваться и имеют собственные механизмы поддержания числа копий, конкуренция между ослабленной CRISPR-интерференцией и подобными системами может привести к ситуации, когда фрагменты геномов MGE присутствуют в клетке в течение достаточно длительного времени, что, предположительно, позволяет произойти более медленной реакции адаптации [86].

### ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ С УЧАСТИЕМ БЕЛКА Argonaute

У эукариот белки Argonaute (Ago) играют ключевую роль в процессе РНК-интерференции, вовлеченном в регуляцию экспрессии генов

и защиту от вирусов. Члены этого семейства белков также широко распространены у бактерий и архей [87, 88]. Функции прокариотических белков Argonaute (pAgo) пока ещё до конца не установлены, но эти белки также способны участвовать в подавлении чужеродного генетического материала [89, 90]. Чтобы распознать мишени в виде нуклеиновых кислот, белки pAgo используют молекулы-гиды, но, в отличие от CRISPR-Cas и эукариотических Ago, гидом часто служит короткая одноцепочечная ДНК [91], хотя также есть примеры РНК-гидов [92]. 5'-Конец гида загружается в домен MID белка pAgo, в то время как 3'-конец взаимодействует с доменом PAZ [93]. В экспериментах *in vitro* с белками pAgo из различных организмов было показано, что распознавание комплементарной мишени приводит к её нуклеолитическому расщеплению каталитическим доменом PIWI. В основном pAgo таргетируют молекулы ДНК [94, 95], хотя *in vitro* некоторые из них могут также расщеплять РНК [96–98]. Пока неясно, может ли таргетирование РНК быть важным для активности pAgo *in vivo*. Тем не менее потенциально существуют все возможные комбинации pAgo-опосредованных взаимодействий ДНК/РНК гида/мишени [89, 93, 99]. *In vivo* присутствие pAgo влияет на поддержание плазмид и ингибирует трансформацию [92, 100]. Хотя считается, что pAgo также участвуют в противовирусной защите, экспериментально было получено лишь одно доказательство с pAgo из *Clostridium butyricum*, чья гетерологичная экспрессия в клетках *E. coli* приводила к понижению титра фага M13 с хроническим жизненным циклом и литического фага P1vir. Однако механизмы pAgo защиты определены не были [90]. Основываясь на архитектуре доменов, белки pAgo делятся на классы, и, что неожиданно, некоторые белки содержат каталитически неактивный домен PIWI [89, 101]. Функции таких белков, если они существуют, ещё предстоит определить.

Одним из основных вопросов, связанных с pAgo-интерференцией, является механизм образования и источник молекул-гидов, а также вопрос, каким образом клетки избегают аутоиммунного ответа. Секвенирование ДНК-гидов, связанных с pAgo *in vivo*, показало, что они в основном происходят из активно реплицирующихся или многокопийных элементов, включая плазмиды и транспозоны [90, 100]. Для различных белков pAgo была показана гид-независимая нуклеазная активность, приводящая к расщеплению ДНК [102, 103]. Неспецифичное по отношению к нуклеотидной последовательности измельчение плазмид может привести к образованию пула фрагментов ДНК различного раз-

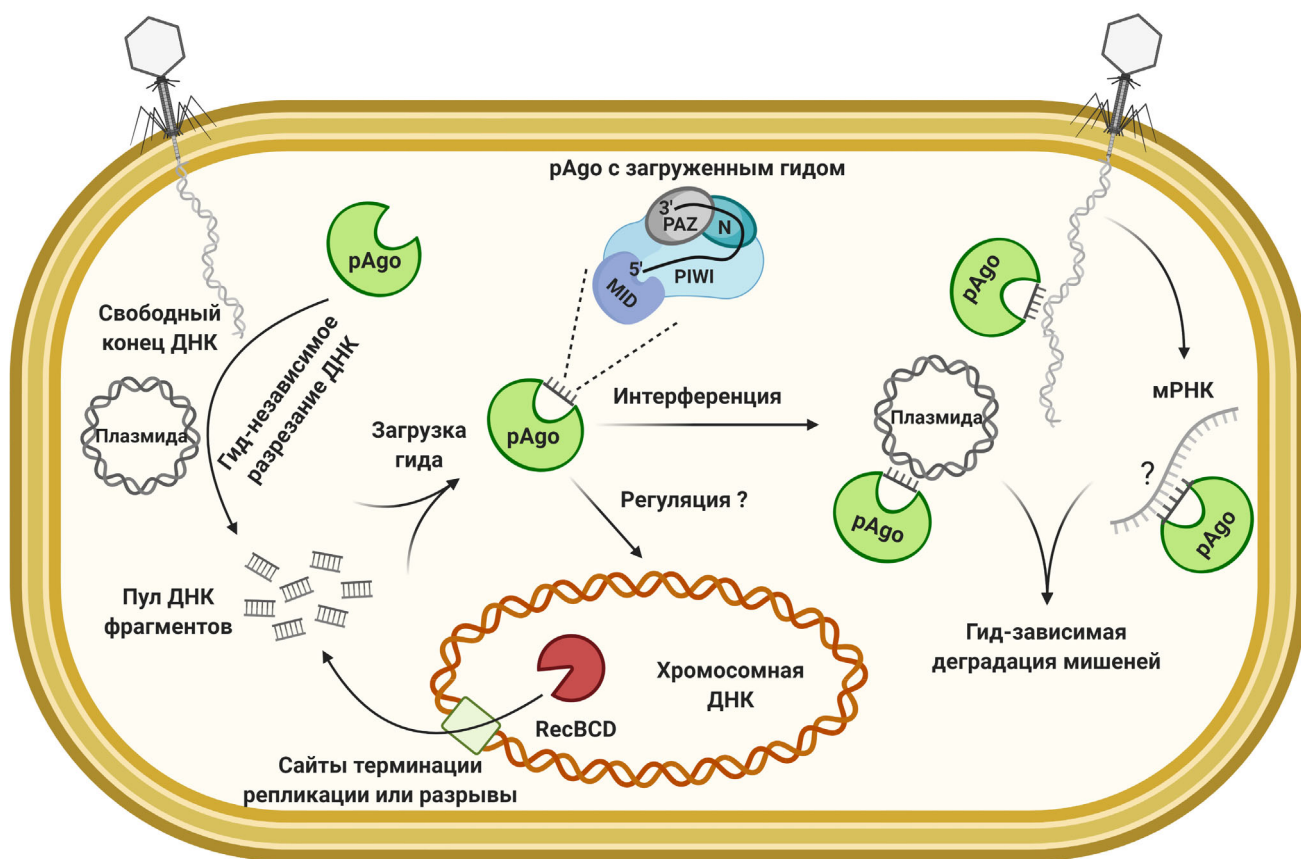


Рис. 2. Модель механизма действия pAgo и схематическое изображение белка с загруженным гидом

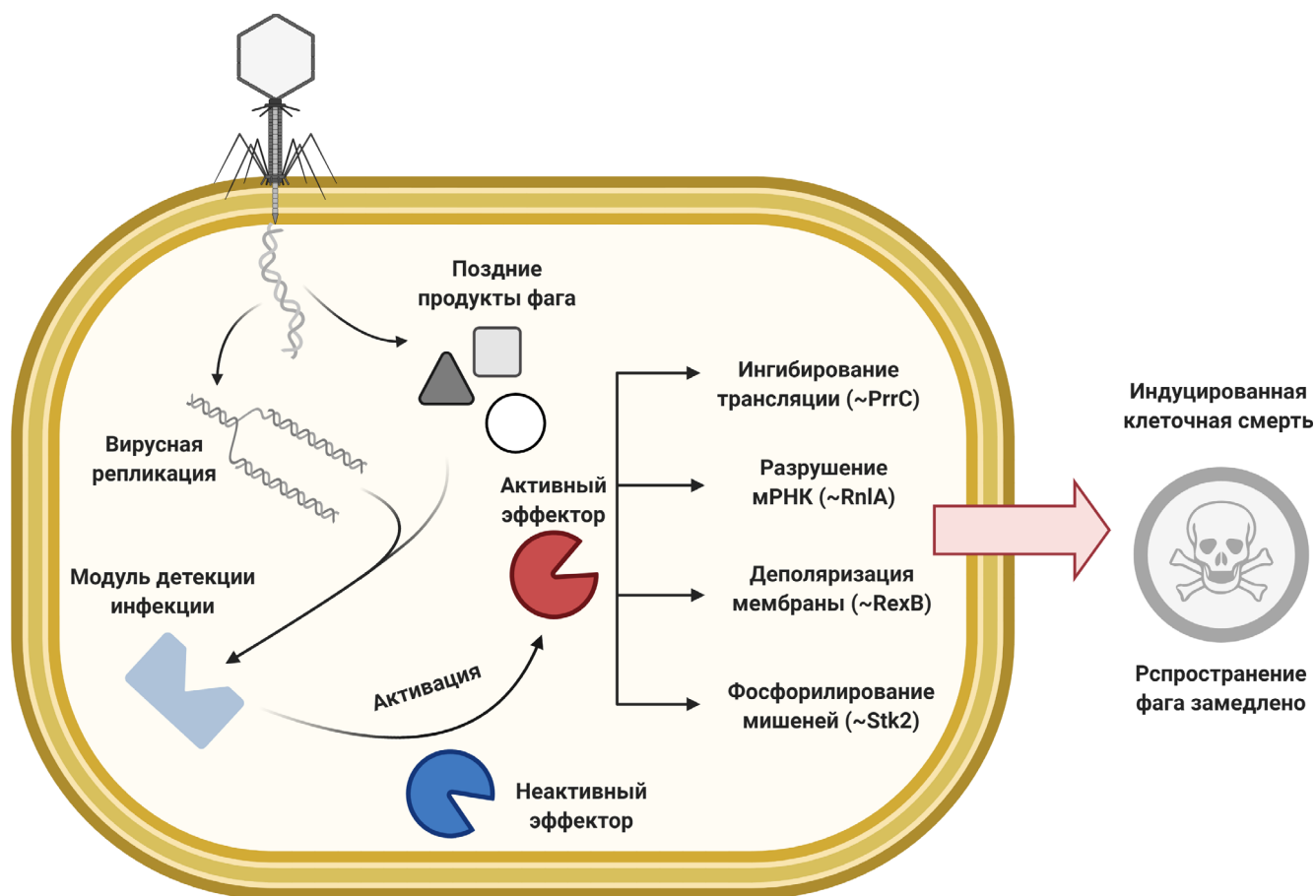
мера, и некоторые из них могут далее загружаться в качестве молекул-гидов и активировать более эффективную и зависимую от последовательности деградацию комплементарных мишеней [103]. Для генерации гидов белки pAgo могут таргетировать свободные концы ДНК или интермедиаты процесса репликации, которые более часто присутствуют в экзогенной ДНК. Подобно CRISPR-Cas, процесс генерации гидов может зависеть от RecBCD комплексов [90]. Было показано, что, как и в случае *C. butyricum*, pAgo из *Thermus thermophilus* связывается с гидами, происходящими из областей терминации репликации, и, предположительно, вместе с ДНК-гиразой участвует в контроле репликации клетки-хозяина путём разделения сцепленных хромосом [104]. Компактизация ДНК, характерная, например, для геномов архей, также может быть важна для различения собственного и чужеродного генетического материала белками pAgo [102]. Считается, что РНК-гиды, связанные с pAgo из *Rhodobacter sphaeroides*, были неспецифично отобраны из фрагментов деградированных транскриптов. Тем не менее белок сохраняет свою специфичность в отношении чуже-

родной ДНК [92]. Текущая модель механизма действия pAgo показана на рис. 2.

Описанный способ интерференции может быть не очень эффективным против быстро действующих литических фагов. Можно предположить, что защитные механизмы с участием pAgo приспособлены для контроля над менее опасными мобильными элементами или могут быть ассоциированы с другими защитными системами, чтобы усилить защиту от вирусной инфекции. В поддержку последнего предположения выступает тот факт, что гены pAgo внутри защитных островков часто встречаются поблизости от генов нуклеаз или белков Cas [88, 101, 105].

### ИНДУЦИРОВАННАЯ КЛЕТочНАЯ СМЕРТЬ ИЛИ ОСТАНОВКА КЛЕТочНОГО ЦИКЛА – СИСТЕМА АБОРТИВНОЙ ИНФЕКЦИИ И ТОКСИН-АНТИТОКСИН

В этом разделе мы рассмотрим abortивную инфекцию (Abi) в широком смысле – как клеточный ответ на инфекцию, который приводит



**Рис. 3.** Общий принцип abortивного ответа на инфекцию. Показаны примеры эффекторов с различными механизмами действия

к прекращению метаболизма (бактериостатический эффект) или гибели клеток (бактерицидный эффект) до завершения жизненного цикла вируса, что предотвращает образование активных фаговых частиц или снижает выход фагового потомства [106, 107]. Чисто механически системы *Abi* очень разнообразны. Как правило, они состоят из двух модулей (рис. 3). Один из них обнаруживает фаговую инфекцию и передаёт сигнал. При получении этого сигнала второй (эффекторный) модуль останавливает метаболизм клетки и/или вызывает её самоубийство [107, 108]. Принято считать, что индуцированное состояние подавленного метаболизма даёт больше времени другим защитным механизмам для борьбы с инфекцией. Также считается, что некоторые системы *Abi* могут быть «последним средством защиты», т.е. они активируют суицидальный ответ на поздних стадиях вирусной инфекции, в случае если фаг избежал действия других иммунных механизмов. Стратегия самоуничтожения инфицированной клетки останавливает распространение инфекции на

уровне сообщества и таким образом приносит пользу клональной популяции [109, 110]. Некоторые системы, чьё действие фенотипически напоминает *Abi*-ответ, могут непосредственно интерферировать с вирусной инфекцией, но сами по себе не вызывают активную гибель клеток. Однако их действие может сопровождаться лизисом клеток, вызванным произведёнными вирусом токсичными компонентами.

**Системы *Abi*.** Разнообразие кодируемых плазмидами систем с механизмом *Abi* исторически исследовалось на грамположительных *Lactococcus* [106, 111]. Из 23 описанных систем, обозначаемых как *AbiA*–*AbiZ*, механизм действия был определен лишь в нескольких случаях. Например, белок *AbiZ* взаимодействует с холином и лизином фага  $\phi 31$ , вызывая преждевременный лизис клетки [112]; *AbiK* проявляет безматричную ДНК-полимеризационную активность [113]. Считается, что *AbiA*, *AbiK*, и *AbiF* ингибируют репликацию [106, 114], а активность *AbiB* и *AbiQ* связана с деградацией мРНК [115, 116]; *AbiD1* может вмешиваться в



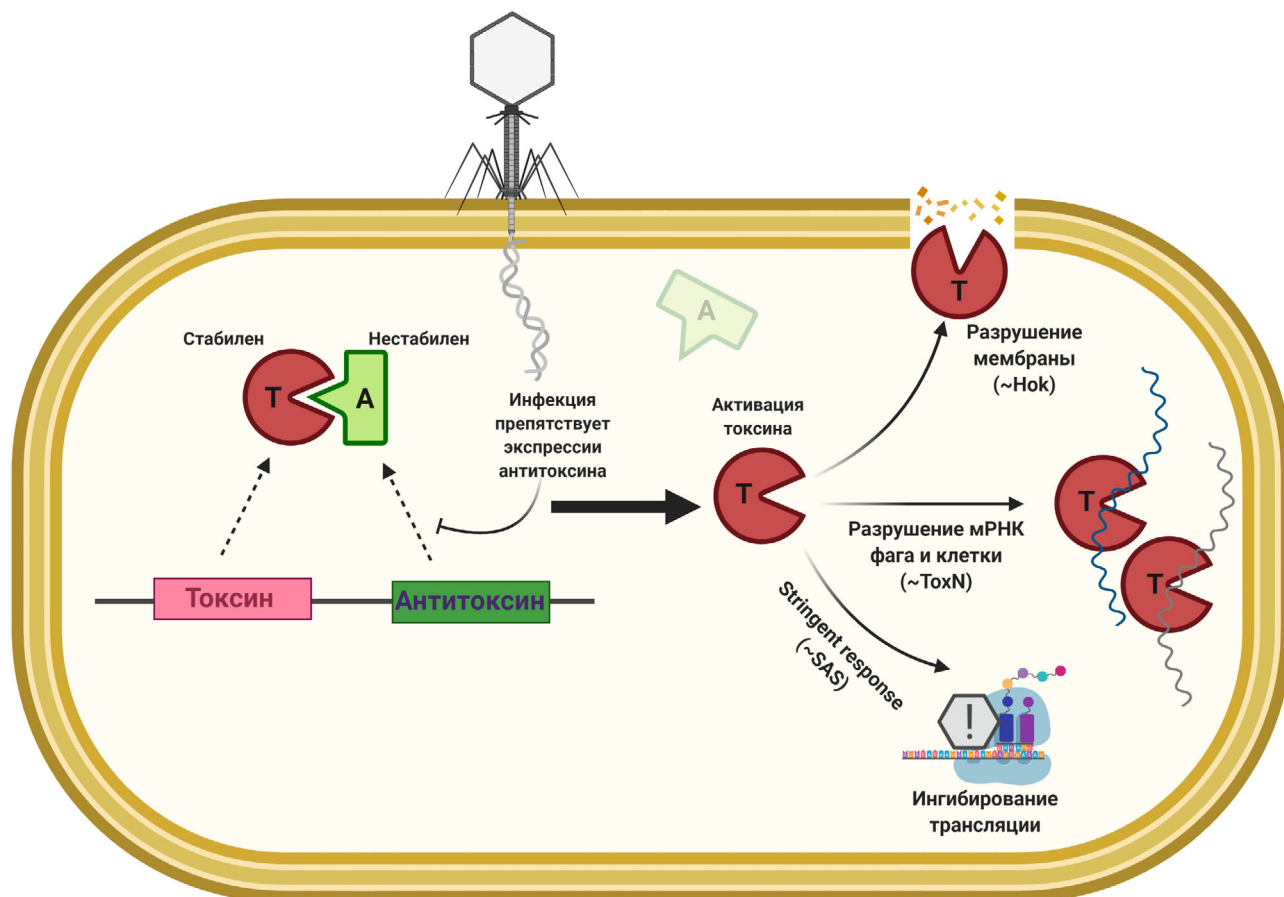
процесс упаковки вирусной ДНК, ингибируя нуклеазу, разрешающую конкатамеры вирусных геномов [117]. В то же время предполагается, что AbiT и AbiV влияют на экспрессию поздних фаговых белков [118, 119]. Для большинства этих систем неясно, как распознается фаговая инфекция. В клетках *Staphylococcus* была обнаружена система Abi с сенсорным модулем, основанным на фосфорилировании белков [120]. Фосфорилирование, как эффективный способ усиления сигнала, часто используется в эукариотических противовирусных системах. Серинтреониновая киназа Stk2 стафилококков активируется белком PacK фага φNM1 и фосфорилирует различные белки клетки-хозяина, вызывая ингибирование основных метаболических путей [120].

Множество механизмов Abi было также описано на примере граммотрицательной бактерии *E. coli* [121]. Так, белки Lit и PrrC, кодируемые крипточескими профагами, действуют специфично против фага T4. Протеаза Lit активируется в результате взаимодействия с консервативным пептидом Gol капсидного белка T4 и останавливает процесс трансляции, расщепляя фактор элонгации трансляции EF-Tu [122]. РНКазы PrrC также ингибируют трансляцию, расщепляя tРНК<sup>Lys</sup>. PrrC взаимодействует с комплексом рестрикции *EscrpI* системы рестрикции-модификации (R-M) типа I, и активируется только при ингибировании комплекса рестрикции, вызванном кодируемым T4 пептидом Stp [123]. В качестве другого интересного примера можно привести белок PifA, кодируемый F-плазмидой, который обеспечивает защиту клеток от фага T7 [124]. Этот мембраносвязанный белок активируется белками gp10 или gp1.2 фага T7 и, нарушая целостность мембраны, вызывает утечку из инфицированной клетки АТФ и других малых молекул [124, 125]. Система RexAB, кодируемая профагом λ, также повышает проницаемость мембраны [126, 127]. Считается, что RexA распознает ДНК-белковые интермедиаты вирусных репликационных комплексов и стимулирует связанный с мембраной RexB, который образует ионный канал, что приводит к потере мембранного потенциала и ингибированию энергозависимых процессов [127].

**Защитные системы на основе взаимодействия токсин-антитоксин (ТА).** Системы токсин-антитоксин представляют собой эгоистичные элементы, состоящие из стабильной субъединицы токсина и нестабильного антитоксина. В условиях стресса деградация антитоксина приводит к повышению активности токсина и остановке клеточного роста [128, 129]. Модули ТА принимают участие в ответе на стресс, формировании

биоплёнок и вносят вклад в антибиотикорезистентность (хотя последнее вызывает споры [129]), но также могут быть вовлечены в Abi противовирусную защиту, поскольку фаговая инфекция часто влияет на метаболизм хозяина таким образом, что может вызывать потерю антитоксина (рис. 4). Модули ТА часто находятся внутри защитных островков, и между системами ТА и Abi существует значительный обмен доменами [130]. Фактически нельзя провести чёткую границу между Abi- и ТА-системами, поскольку Abi – это стратегия защиты, а ТА – организационный/механистический принцип. Скорее, некоторые системы Abi можно рассматривать как основанные на механизме ТА, например, даже некоторые системы Abi, которые обсуждались в предыдущем разделе, можно рассматривать в качестве отдельных токсинов, в то время как PrrC/*EscrpI* можно рассматривать как настоящую пару токсин-антитоксин. В зависимости от природы взаимодействия токсина и антитоксина системы ТА подразделяются на 6 типов. Например, антитоксин может являться молекулой РНК, которая напрямую ингибирует токсичный белок (тип III) или регулирует уровень трансляции мРНК токсина (тип I). В других типах систем ТА антитоксин может быть белком, который ингибирует токсин через белок-белковые взаимодействия (тип II) или компенсирует воздействие токсина на другие мишени (тип IV) [129, 131].

Примером ответа Abi на основе модулей ТА могут служить системы ToxIN и RnlAB. ToxIN, который исходно был идентифицирован как AbiQ в клетках *Lactococcus*, широко распространён в геномах бактерий и функционирует как система ТА типа III, в которой РНК-азная активность токсина ToxN блокируется в результате взаимодействия с РНК-антитоксином ToxI [116, 132, 133]. Система RnlAB из клеток *E. coli* представляет ТА-модуль типа II, и она защищает клетки от инфицирования фагом T4 [134]. Токсин RnlA является стабильной РНКазой. Антитоксин RnlB быстро разрушается протеазами клетки-хозяина. Таким образом, если фаговая инфекция препятствует непрерывной экспрессии генов, то предотвращение синтеза RnlB способствует проявлению токсичной активности RnlA, что приводит к распаду внутриклеточной мРНК [134]. Гомологи RnlAB были также обнаружены в плазмидах *E. coli*, и эта система получила название LsoAB [135]. В качестве антитоксина для обеих систем может выступать белок Dmd, кодируемый фагом T4 [134, 135]. Многие системы ТА обладают обратимым действием и не вызывают гибели клеток. Тем не менее временное прекращение роста может



**Рис. 4.** Общий принцип abortивной инфекции, основанный на активности модулей ТА. Приведено несколько примеров эффекторов токсинов. (Stringent response – характерный клеточный ответ на стрессовые условия, связанный с синтезом сигнальных молекул алармонов, SAS – Small Alarmone Synthetase)

обеспечить устойчивость к фагам. *AbiE*, система ТА типа IV, является примером: токсин *AbiEii*, транскрибируемый с промотора *abiE*, не взаимодействует напрямую с антитоксином *AbiEi*. Вместо этого *AbiEi* связывается с промоторной областью и ингибирует транскрипцию всего ТА-оперона [136]. Токсин *AbiEii* принадлежит к суперсемейству  $\beta$ -подобных ДНК-полимераз и проявляет нуклеотидилтрансферазную активность [136]. Недавно было показано, что *MenT<sub>3</sub>*, являющийся гомологом *AbiEii* в клетках *Mycobacterium tuberculosis*, может переносить пиримидины на акцепторную ветвь специфических тРНК [137]. В согласии с этим повышенная экспрессия токсина *AbiE* в клетках *Serratia* вызывает прекращение роста клеток и снижение уровня тРНК [138]. У *E. coli* система *MazEF* типа II препятствует размножению фага P1 [139], а ТА-система *hok/sok* типа I снижает размножение фага T4 [140]. Последняя система основана на холиноподобной активности токсина *Нок*, в то время как антиток-

син *sok* является антисмысловой РНК, вызывающей ингибирование синтеза *Нок* путём связывания с его мРНК [141]. В целом, роль ТА-систем в защите от фагов плохо охарактеризована, и этот вопрос остаётся противоречивым [142, 143]. Однако, основываясь на обилии систем ТА и их участии в *Abi*-ответе у модельных бактерий, можно ожидать, что защита от фагов на основе ТА широко распространена среди бактерий [130, 142, 144].

**Ретроны как защитные системы.** Ретроны – это генетические элементы, которые кодируют обратную транскриптазу (RTase) и некодирующую РНК (нкРНК), которая используется обратной транскриптазой для образования ковалентных гибридов РНК/ДНК [145]. До недавнего времени функциональная роль ретронов оставалась неизвестной, пока ряд работ не продемонстрировал, что ретроны могут являться частью трехкомпонентных систем ТА, участвующих в защите от фагов посредством *Abi* [146–149]. В нормальных условиях комплекс

обратной транскриптазы с гибридом РНК/ДНК неактивен, в то время как фаговая инфекция вызывает его активацию и передачу сигнала сопряженным эффекторам-токсинам (рис. 5). Антифаговая активность была продемонстрирована для нескольких ретронов, при этом мутации, влияющие на вторичную структуру нкРНК и сайт ветвления или каталитический мотив RTase, устраняли защиту [146, 149]. Внутри защитных островков было обнаружено ~2000 систем, содержащих ретроны, при этом RTase могут быть слиты или находиться в непосредственной близости от АТФаз, рибозилтрансфераз и эндонуклеаз, выступающих в качестве эффекторных белков [146, 149]. Ретрон Ec48 из клеток *E. coli* «охраняет» фермент RecBCD, который является одним из ключевых барьеров на пути проникновения чужеродной ДНК. Ингибирование RecB вирусными белками (например, Gam фага λ или gp5.9 фага T7) активирует ретрон и высвобождает ак-

тивность сопряженного с системой закоренного в мембране эффектора, что вызывает преждевременный лизис клеток [146]. Для ретрона Sen2 из клеток *Salmonella enterica* было показано, что нарушение структуры ДНК части ретрона вызывает активацию токсина RsaT [147, 148]. Деградация или метилирование молекул ДНК, ассоциированных с кодируемыми фагом эндонуклеазой RecE или метилтрансферазой Dam, приводят к активации ответа, в то время как отдельные белки, кодируемые профагами, могут выступать в качестве блокаторов активации ретронов [147].

**Антифаговые сигнальные системы на основе циклических олигонуклеотидов (CBASS).** Недавно было описано широко распространённое семейство систем, которые вызывают активацию Аби-ответа путём синтеза циклических олигонуклеотидов – CBASS (Cyclic-Oligonucleotide-Based Anti-Phage Signalling System) [107, 150, 151]. CBASS-системы включают cGAS/DncV-

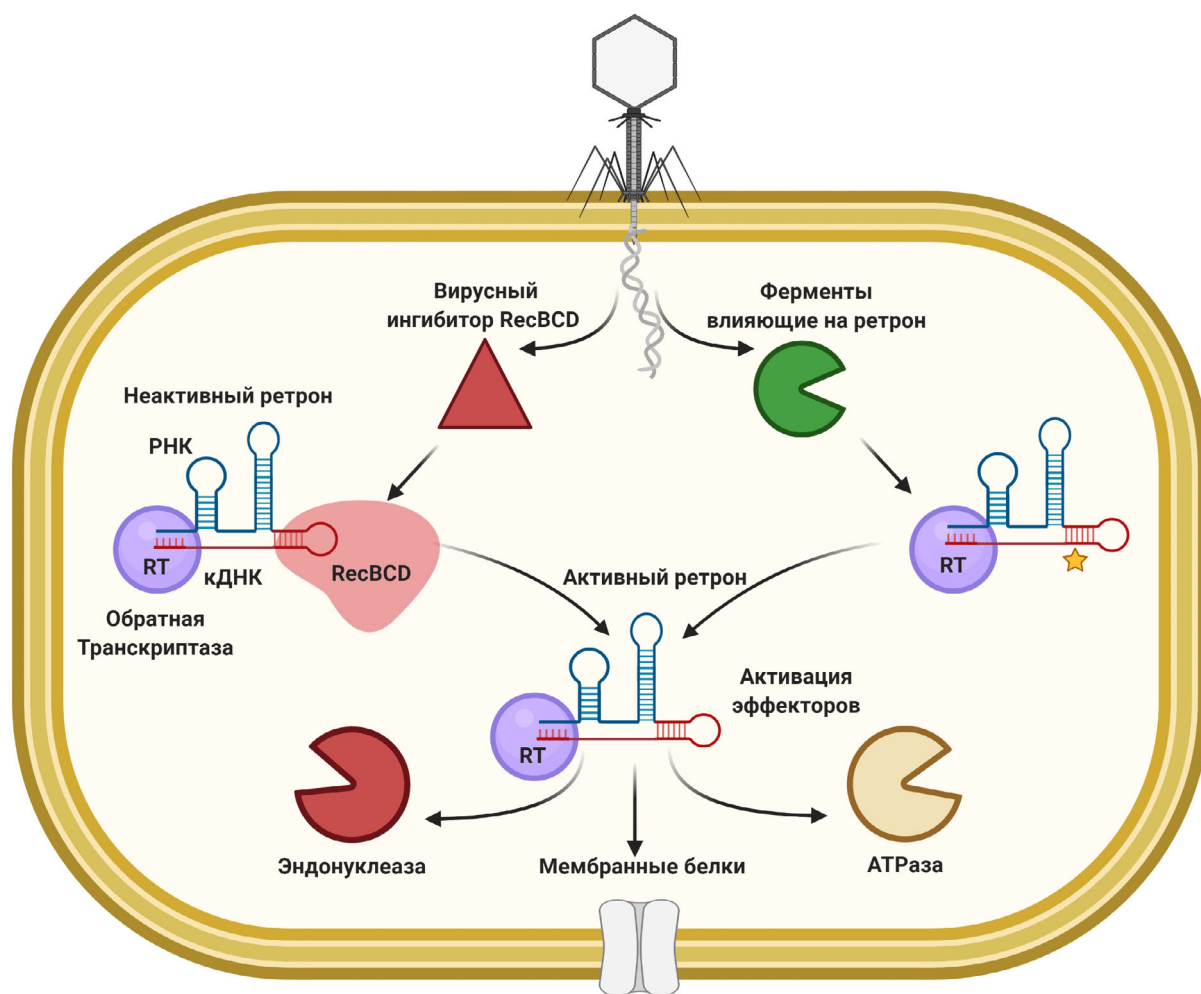


Рис. 5. Общий принцип действия abortивной инфекции на основе ретронов

подобные нуклеотидил-трансферазы (CD-NTase), и фаговая инфекция активирует их, запуская синтез вторичного мессенджера (циклический GMP-AMP (сGAMP), циклический триаденилат (сAAA) и др.), который далее передаёт сигнал к различным эффекторам, индуцирующим программируемую гибель клетки (рис. 6) [150–153]. Эти системы обеспечивают ещё одну связь между иммунной защитой эукариот и прокариот, поскольку у животных циклическая GMP-AMP-синтаза (сGAS) участвует в противовирусном и воспалительном ответе через сигнальный путь сGAS-STING, активируемый присутствием ДНК в цитозоле [154]. Гены олигонуклеотид циклаз из семейства CD-NTase обнаруживаются примерно в 10% геномов прокариот, и более половины из них включены в состав защитных островков. Разнообразие систем CBASS можно классифицировать в зависимости от состава оперона, типа эффектора или продуцируемой сигнальной молекулы [153]. Системы типа I содержат только CD-NTase и эффектор, в то время как другие системы также несут вспомогательные компоненты: гены с убиквитин-ассоциированными доменами в типе II, гены NORMA и Trip13-подобных доменов в типе III или домены модификации нуклеотидов в редко встречающихся CBASS типа IV [153]. Первой экспериментально исследованной системой была CBASS типа II из *Vibrio cholerae* [151, 155, 156]. Ядро этой системы состоит из двух компонентов: сGAS фермента DncV и фосфолипазы CapV (Cap – белок, ассоциированный с CD-NTase), реагирующей на сGAMP. Этим двум компонентам вполне достаточно для обеспечения защиты от фага P1, однако для защиты от других фагов требуются два вспомогательных белка, несущих домены E1, E2 и JAB, типичные для ферментов убиквитинирования [151]. Сенсорный механизм до сих пор не определен, но было показано, что после заражения фагом клетки продуцируют сGAMP, который вызывает активацию фосфолипазы CapV, разрушающей клеточную мембрану до завершения жизненного цикла вируса. Кроме фосфолипазы, среди известных эффекторов систем CBASS присутствуют эндонуклеазы или белки, несущие трансмембранные домены [153, 157]. Интересна группа эффекторов CBASS, содержащих домен, гомологичный эукариотическому домену STING (Stimulator of Interferon Genes; стимулятор генов интерферона). У бактерий распознавание циклических олигонуклеотидов с помощью STING приводит к активации сопряжённого домена TIR (Toll/interleukin-1 рецептор) в составе эффектора и последующей деградации NAD<sup>+</sup> [158]. Сравнительный анализ

структур STING-доменов многоклеточных животных и бактерий позволяет понять его переход от непосредственной эффекторной роли в CBASS к регуляторным функциям в иммунитете высших животных [158].

Многие бактериальные белки CD-NTase неактивны в условиях *in vitro* [152]. Недавно было показано, что для их активности *in vivo* требуются вспомогательные белки [159]. У эукариот белки с доменом NORMA связываются со специфическими закрывающими мотивами в белках-мишенях и собираются в сигнальные комплексы [160]. В CBASS типа III из *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* белки с доменом NORMA активируют CD-NTase, что приводит к продукции вторичного мессенджера циклического триаденилата, который, в свою очередь, активирует неспецифическую эндонуклеазную активность эффектора NucC, обеспечивая защиту от фагов по Abi-механизму [159, 161]. В отсутствие инфекции активность этой системы подавляется Trip13-подобной АТФазой, которая, предположительно, приводит к диссоциации комплекса CD-NTase с NORMA. Считается, что распознавание специфических мотивов в фаговых белках вызывает конформационные изменения в домене NORMA и активирует CD-NTase этого белкового комплекса. Интересно, что эффектор NucC может быть обнаружен как вспомогательная эндонуклеаза в системах CRISPR-Cas типа III, которые также полагаются на сигналинг, связанный с циклическим олигоаденилатом [21, 22, 161]. Другим эффектором CBASS, который может реагировать на различные типы циклических олигонуклеотидов, является белок CapIV из *Enterobacter cloacae* [162], который стал первым описанным членом целого семейства белков. Белки CapIV распознают вторичные мессенджеры через различные домены SAVED, состоящие из 2-х CRISPR-родственных субъединиц CARF, которые индуцируют олигомеризацию и способствуют проявлению активности эффекторной эндонуклеазы, ранее известной как DUF4297 [162].

Несмотря на то, что в последние годы было описано большое разнообразие бактериальных CD-NTase и сопряжённых с ними эффекторов, остаётся много вопросов. Как эти системы чувствуют фаговую инфекцию? Каковы функции вспомогательных белков? Все ли CBASS-системы участвуют в защите от фагов или некоторые из них могут выполнять другие функции? Каковы издержки экспрессии генов CBASS, и есть ли дополнительные механизмы, ограничивающие их возможную токсичность в отношении самой клетки, как в случае негативной регуляции Trip13-подобной АТФазы?

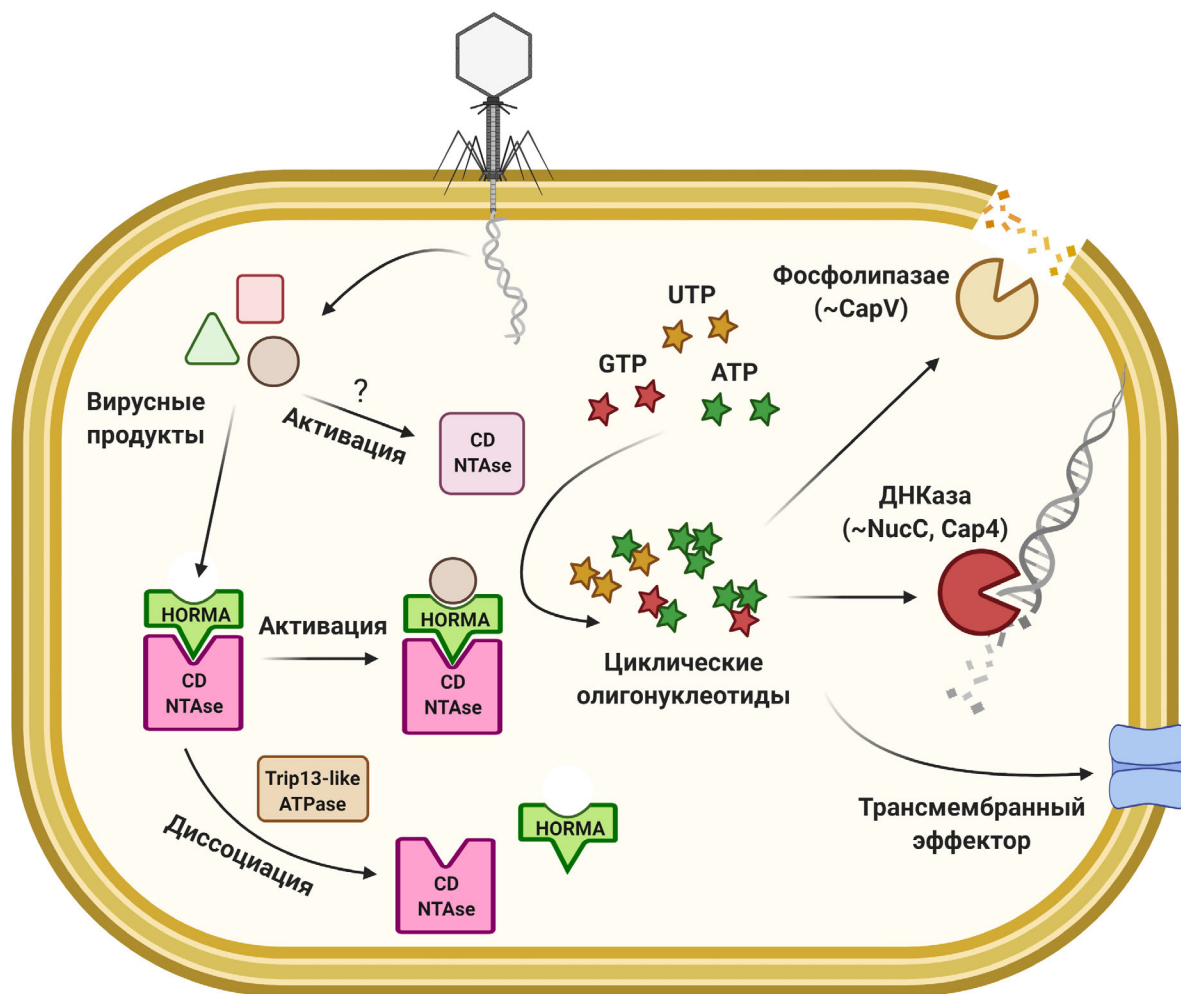


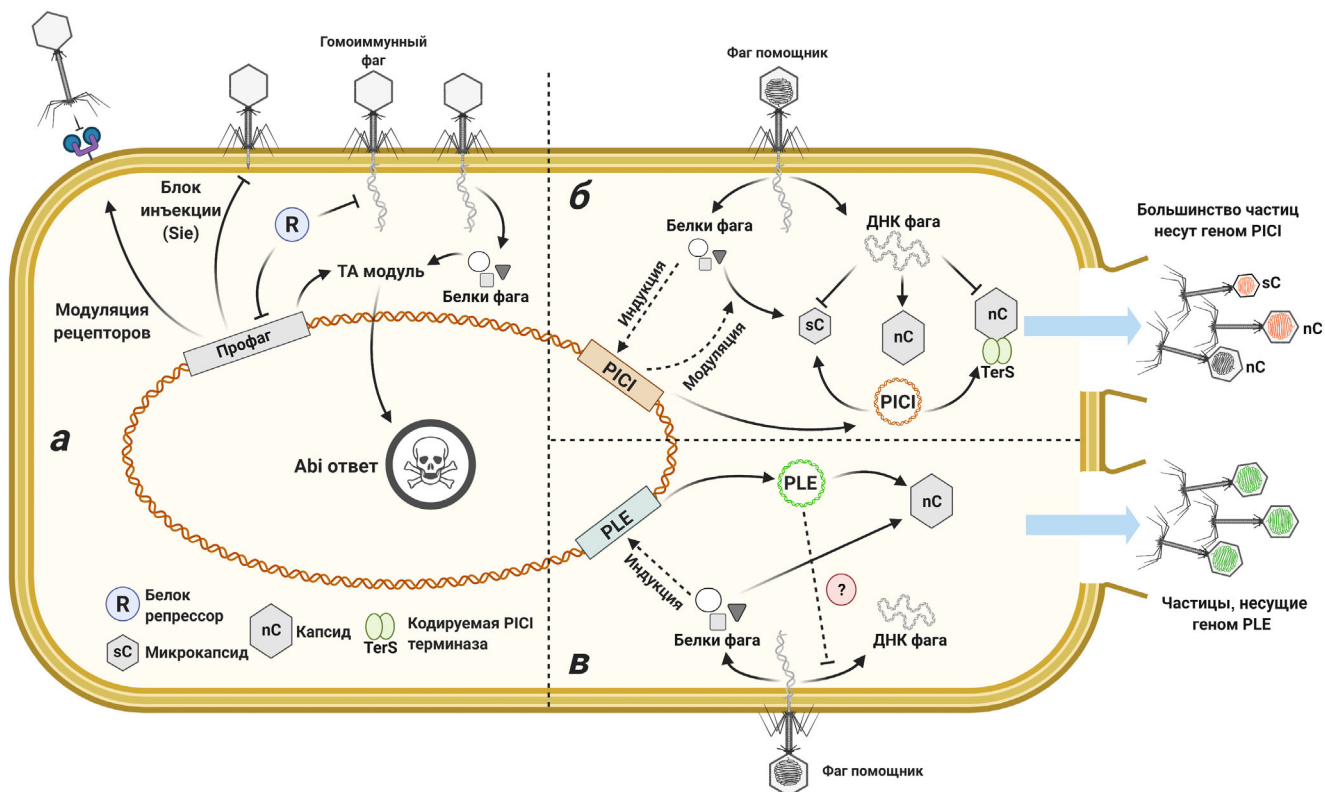
Рис. 6. Модель CBASS-опосредованного иммунного ответа

### ЗАЩИТА, ОПОСРЕДОВАННАЯ ПРОФАГАМИ

Умеренные фаги могут встраивать свои геномы в хромосому клетки-хозяина с образованием профагов [163]. Большинство известных бактерий несут профаги, и взаимодействие профага с хозяином можно рассматривать как мутуалистическое: поскольку выживание профагов зависит от клетки-хозяина, для профага выгодно исключить вторичное инфицирование лизогенизированной клетки [164]. Действительно, профаги часто несут гены, ассоциированные с противовирусной защитой (рис. 7, а) [165–168]. Самый простой способ подавления инфицирования гомоиммунными фагами – экспрессия репрессорного белка – фактора транскрипции, который регулирует переключение между литической и лизогенной жизненными стратегиями фага. Так как белки-репрессоры постоянно присутствуют в лизогенной клетке для подавления

экспрессии литических генов профага, вторичная литическая инфекция фагом, регулируемым тем же или подобным репрессором, будет подавлена [169]. Хотя защита, ассоциированная с репрессорами, действует в узком диапазоне, систематические исследования профагов в клетках *P. aeruginosa* и *Mycobacterium smegmatis* обнаружили многочисленные защитные гены, которые обеспечивают гетеротипическую защиту [165, 166].

Гены, которые не являются необходимыми для выживания профага, но в то же время способствуют повышению устойчивости клетки-хозяина, были названы как «мороны» (т.е. добавляющие больше («more on») к фенотипу). Мороны могут влиять на многие процессы внутри клетки-хозяина, включая подвижность клеток, устойчивость к антибиотикам, метаболизм и защиту от фагов [170, 171]. Некоторые системы ТА, кодируемые профагами, и белки Sie (исключительные суперинфекции), которые можно рассмат-



**Рис. 7.** Защита, ассоциированная с профагами и мобильными генетическими элементами (MGE). *a* – Кодированные профагами защитные системы. *б* – Модель индукции PICI и интерференции. *в* – Модель индукции элементов, подобных хромосомным островкам (PLE) и интерференции

ривать в качестве моронов, уже обсуждались. Мороны могут также оказывать влияние на клеточную поверхность, препятствуя распознаванию рецепторов. Например, фаги D3 и ф297 клеток *P. aeruginosa* могут изменять конформацию субъединиц O-антигена в липополисахариде (LPS), кодируя собственную полимеразу O-антигена [172–174], в то время как некоторые профаги клеток *Shigella* и *E. coli* могут блокировать дальнейший рост цепи O-антигена за счёт ацетилирования или глюкозилирования [175, 176].

Профаги микобактерий кодируют различные системы исключения повторной инфекции. Например, фаги Sbash и CarolAnn несут предполагаемые TA-модули с мембраносвязанными эффекторами [177, 178]. Было показано, что другие микобактериофаги кодируют эндонуклеазы рестрикции, мембранные белки Sie или синтазы гуанозинпентафосфата (p)ppGpp, способные защитить клетку-хозяина [166]. Система, кодирующая (p)ppGpp синтазу и её сопряжённый ингибитор, была первоначально найдена у фага Phrann (белки gr29 и gr30), а позже было показано, что подобные системы широко распространены у профагов и представляют новое семейство модулей TA, основанных на пере-

даче сигнала молекулами алармонов [166, 179]. Токсичный компонент – фермент SAS (Small Alarmone Synthetase), который синтезирует ppGpp или ppApp – сигнальные молекулы, характерные для ответа клетки на стрессовые условия, связанные с аминокислотным голоданием (stringent response) – что вызывает прекращение роста [180]. Антитоксины напрямую связываются с синтазой или разрушают сигнальный алармон [179]. Другая система Abi, широко распространённая в профагах грамотрицательных бактерий, состоит из эффектора BstA, который локализуется совместно с реплицирующейся ДНК фагов-мишеней и интерферирует с процессом репликации по неопределённому механизму [181]. Эта система представляет собой интересный пример предотвращения аутоиммунного ответа при активации профагов: BstA инактивируется за счёт связывания со специфическим анти-BstA локусом (aba) в геноме фага и, таким образом, не предотвращает развитие литической инфекции.

Мороны могут сильно отличаться друг от друга даже между близкородственными штаммами. Недавнее исследование P2- и P4-подобных профагов выявило беспрецедентное разно-

образе компактных защитных систем в специфических локусах их геномов [182]. Помимо известных противовирусных систем, в этих горячих точках были зарегистрированы множественные кластеры генов, которые несут предсказанные защитные домены (TIR, SIR2, нуклеазы, АТРазы) или домены с неустановленной функцией. Защитная активность была подтверждена для 14 новых систем. Например, предполагается, что система PARIS, состоящая из АТРазы и белка DUF4435, обеспечивает abortивный ответ на инфекцию, запускаемый антирестрикционным белком Ocs фага T7, который ингибирует защитные системы хозяина R-M и BREX [182–184]. Идентификация горячих точек разнообразия в других профагах может представлять собой ценный и простой инструмент для обнаружения новых систем защиты от фагов.

### ПАЗИТЫ ФАГОВ. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПИРАТСТВО PICI И PLE

Мобильные генетические элементы могут случайным образом переноситься фагами в процессе генерализованной трансдукции. Но некоторые MGE приобрели способность контролировать механизмы упаковки фаговой ДНК в капсиды, чтобы использовать их для загрузки собственных геномов – явление, которое иногда называют молекулярным пиратством [185–188]. Индуцируемые фагами хромосомные островки (PICI, Phage Inducible Chromosomal Islands) широко распространены в геномах грамположительных и грамотрицательных бактерий. Их индукция из хромосомы зависит от инфицирования фагами-помощниками, и, с точки зрения хозяина, может рассматриваться как вариант Аби-ответа [189, 190]. Заражённая клетка в конечном итоге лизирует, но выход потомства суперинфицирующего литического фага снижается, и большинство высвобождаемых частиц несут геном PICI вместо генома фага [191]. Поскольку элементы PICI не проходят литический цикл самостоятельно и ограничивают распространение фагов-помощников, их присутствие может быть полезным для популяции бактерий.

**PICI.** Наиболее изученной группой структур PICI, которая была обнаружена у *Staphylococcus*, является SaPI (островки патогенности *Staphylococcus aureus*). Эти хромосомные островки имеют размер менее 15 т.п.н., они кодируют интегразу, эксцизионный белок и репликационные компоненты. Экспрессия этих генов находится под строгим контролем главного репрессора StI. SaPI часто несут дополнитель-

ные гены, включая токсины и факторы вирулентности, и их присутствие может влиять на патогенность клетки-хозяина [185, 192]. Жизненный цикл SaPI связан с инфицированием фагом-помощником, и обнаружение специфических белков фагов-помощников снимает репрессию, обусловленную действием StI [193, 194]. После активации SaPI могут мешать репродукции фага-помощника при помощи нескольких различных механизмов (рис. 7, б). Они способствуют сборке миниатюрных капсидов, способных загружать геном SaPI, но исключают более крупный геном фага-помощника [195]. SaPI также могут препятствовать упаковке вирусного генома, ингибируя малую субъединицу терминазы TerS, в то время как загрузка собственного генома SaPI обеспечивается SaPI-кодируемой терминазой [195]. Наконец, кодируемые SaPI белки могут связываться с вирусными факторами транскрипции, нарушая экспрессию поздних генов [196]. Хотя эти механизмы были описаны в случае стафилококковых SaPI, PICI широко распространены среди бактерий [190, 197], и они могут использовать сходные механизмы для поддержания их паразитического образа существования. Например, PmCI172 из клеток *Pasteurella multocida* способствует формированию капсидов небольшого размера, когда клетка инфицирована Mu-подобным фагом-помощником, в то же время EcCICFT073 из клеток *E. coli* кодирует белок Rpp, который вызывает репрограммирование белка TerS фага λ для упаковки генома PICI [190, 198].

**PLE.** Другой тип сателлитных MGE, специфичных для *V. cholera* и препятствующих распространению фага ICP1, называется PLE – фаго-индуцируемый элемент, подобный хромосомным островкам (Phage-inducible Chromosomal Island-like Element) [199]. Аналогично структурам PICI, PLE распознает белки фага-помощника ICP1, чтобы запустить процесс вырезания из генома клетки, и использует ферменты и структурные компоненты ICP1. Однако геномная организация PLE имеет свои особенности, и, в отличие от PICI, которые лишь подавляют процесс размножения фагов-помощников, при индукции PLE вовсе не происходит формирования инфекционных частиц ICP1 (рис. 7, в) [199–202]. Было показано, что в клетках, несущих PLE, репликация ICP1 в значительной степени ингибируется. Также было показано, что отдельные PLE модулируют экспрессию вирусных генов [202, 203]. Дополнительным механизмом, который может способствовать подавлению ICP1, является продукция кодируемого PLE белка LidI, который нарушает систему интерференции лизиса ICP1 и ускоряет лизис

клеток [204]. Следует отметить, что ICP1, в свою очередь, кодирует систему CRISPR-Cas, нацеленную на PLE [205].

### СИСТЕМЫ С ВЕРОЯТНЫМИ НОВЫМИ МЕХАНИЗМАМИ

Выявление кластеров консервативных генов, обнаруженных внутри защитных островков доступных прокариотических геномов, позволило предсказать множество новых типов систем защиты [149, 206–208]. Недавно была проведена системная проверка этих предсказаний. Процесс включал клонирование 28 кандидатных систем из различных бактерий и их экспрессию в суррогатных хозяевах: граммотрицательной *E. coli* или грамположительной *Bacillus subtilis* с последующим скринингом против коллекции фагов различных семейств. В этой работе были подтверждены 10 новых систем, которые были названы в честь мифологических божеств-покровителей [207]. Активность систем Druantia, Kiwa и Zorua была валидирована в клетках *E. coli*, а активность систем Gabija, Nachiman, Lamassu, Thoeris, Septu, Shedu и Wadjet была продемонстрирована в клетках *B. subtilis*. Было показано, что множество белковых доменов, не типичных для уже изученных защитных систем, участвуют в противовирусной защите, и это предполагает новые механизмы действия для обнаруженных систем.

Система Zorua активна против фагов как с оцДНК, так и с дцДНК геномами. Эта система кодирует белки ZorA и ZorB, гомологичные компонентам MotAB, формирующим протонные каналы жгутикового мотора бактерий [209]. В системах Zorua типа I белок ZorAB может сопровождаться предсказанной малой нуклеазой ZorE. В системах типа II – хеликазой/АТРзой ZorC и Pfam00691-содержащим белком ZorD. Инфицирование фагом культуры, несущей систему Zorua, провоцирует преждевременный лизис клеток, предположительно, в результате Abi-ответа, опосредованного ZorAB эффектором, приводящим к деполяризации мембраны. Эта точка зрения была далее поддержана данными о том, что мутации аминокислотных остатков, для которых было предсказано участие в протонном транспорте, приводят к снижению защитной функции системы Zorua [207].

Другая исследованная система (Thoeris) состоит из белка ThsA с доменами SIR2 и SLOG и белка ThsB, несущего домен TIR [207, 210]. Недавно были опубликованы структуры обоих белков [211]. Мутации в NAD-связывающем кармане домена SIR2 белка ThsA приводили к потере

активности этого белка *in vitro* и потере устойчивости клеток к фагу *in vivo*, проводя связь между защитными свойствами системы Thoeris и гидролизом NAD<sup>+</sup> [207, 211]. Домен TIR может служить передатчиком сигнала в иммунных путях эукариот [212], также он был выявлен в других прокариотических системах (например, CBASS). В системе Thoeris фаговая инфекция активирует домен TIR белка ThsA, что приводит к синтезу изомера циклической ADP-рибозы. Далее сигнал передается на белок ThsB, что приводит к abortивному ответу на инфекцию, связанному с расщеплением NAD<sup>+</sup> [210]. Множественные копии гена *thsB* могут быть ассоциированы с одним и тем же геном *thsA*, при этом диверсификация доменов TIR обеспечивает защиту от более широкого спектра инфицирующих фагов [210].

Было показано, что система Wadjet не активна против фагов, но подавляет трансформацию плазмид [207]. Система Wadjet состоит из четырех компонентов: белков JetABC, гомологичных белкам поддержания структуры хромосомы (SMC), которые участвуют в сегрегации геномов плазмид или клетки-хозяина, и белка JetD с предполагаемым доменом топоизомеразы VI [207, 213]. Феномен подавления поддержания плазмид, связанный с неканоническими белками SMC, был описан у *M. smegmatis*, где модуляция статуса суперспирализации плазмиды нарушала её сегрегацию в дочерние клетки [214]. Можно предположить, что Wadjet действует аналогичным образом для ограничения распространения чужеродных внехромосомных генетических элементов.

В другом недавнем исследовании применялась аналогичная логика экспериментальной проверки систем-кандидатов, но использовался другой алгоритм предсказания защитных генов. Вместо проведения оценки обилия белковых доменов все последовательности, встречающиеся на расстоянии 10 генов от известных защитных систем, были проанализированы на предмет частоты их локализации в пределах защитных островков. Всего было предсказано более 7000 генов-кандидатов, вовлеченных в защиту от фагов, многие из которых содержали неаннотированные домены или домены с неизвестными функциями. В результате для дальнейших исследований было отобрано 48 предсказанных систем. Противовирусная активность 29 новых систем была подтверждена с помощью гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* [149].

Исследование независимо обнаружило связь ретронов с защитой от фагов. Кроме того, было показано, что обратные транскриптазы, не связанные ретронами, также участвуют в защите, и 6 групп RTase были объединены под общим наз-



ванием DRT (defence-associated RTase – обратные транскриптазы, ассоциированные с защитой). Некоторые DRT ассоциированы со вспомогательными белками, тогда как DRT типа I сливаются с доменом нитриказы, который часто вовлечён в метаболизм малых молекул [215]. Мутации предсказанных каталитических аминокислотных остатков RTase или нитриказы приводили к инактивации системы. Транскриптомный анализ определил, что DRT разных типов не мешают экспрессии ранних вирусных генов, в то время как система типа I влияет на накопление поздних вирусных транскриптов. Механизм защиты DRT остаётся невыясненным.

Более детально была изучена система RADAR (Restriction by Adenosine Deaminase Acting on RNA; рестрикция с участием аденозиндеаминазы, воздействующей на РНК). Ядро этой системы образовано АТРазой RdrA и аденозиндеаминазой RdrB, которые могут сопровождаться вспомогательными белками (SLATT или Csx27, которые также участвуют в защите CRISPR типа VI). Анализ транскриптома инфицированных фагами клеток выявил замены А на G в секвенированных ридах, в соответствии с предсказанным RdrB-опосредованным образованием инозина в РНК клетки-хозяина и вирусной РНК. Было показано, что предпочтительными мишенями для редактирования являются вторичные структуры РНК типа шпильки. Инфицирование культуры клеток RADAR+ фагами при высокой множественности инфекции (MOI) приводит к остановке клеточного цикла, что предполагает защитный ответ через механизм Abi. Такое поведение было приписано редактированию транспортно-матричной РНК (тмРНК) хозяина, которая высвобождает рибосомы, «застывшие» на мРНК в процессе трансляции. Кроме того, было показано, что экспрессия определенных ДНК-связывающих белков фага T2 запускает редактирование РНК в неинфицированной культуре клеток, что позволяет предположить механизм активации ответа RADAR [149].

NTPase из суперсемейства STAND участвуют в путях передачи сигнала в процессе программированной гибели клеток эукариот [216], однако роль этих белков в клетках прокариот на протяжении долго времени оставалась невыясненной. В обсуждаемой работе было показано, что несколько STAND NTPase проявляют активность в противофаговой защите, и 5 типов таких систем были объединены под общим названием AVAST (AntiViral ATPases/NTPases из суперсемейства STAND). Было обнаружено, что домены NTPase слиты с различными предполагаемыми эффекторными доменами (такими, как нуклеаза, протеаза или SIR2), и было пред-

положено, что они действуют через механизм Abi. Мутационный анализ подтвердил значимость АТРазы и предполагаемых эффекторов защитной системы AVAST [149].

Функциональные домены других новых систем включают нуклеазы (например, было показано, что DUF4297 из системы Lamassu является нуклеазой, участвующей также в CBASS), хеликазы, SIR2, ДНК-связывающие белки, фосфатазы и АТРазы, а также множество неаннотированных доменов [149, 207, 208, 217]. Например, крупная система Druantia состоит в основном из генов с неизвестными функциями. Эти открытия существенно расширили наши представления о многообразии биохимических активностей, которые могут быть задействованы при защите клеток от вирусов, и должны проложить путь для дальнейших экспериментальных исследований новых механизмов защиты.

## ВЫВОДЫ

Взаимодействие вирусов со своими хозяевами – это динамичный процесс, который приводит к созданию множества стратегий нападения и защиты. Гены прокариот, связанные с устойчивостью к фагам, являются одними из наиболее быстро эволюционирующих, и высокая скорость обновления прокариотических адаптаций, сопровождаемая вирусными контрadaptациями, часто описывается в терминах гипотезы Красной Королевы – каждая из сторон, принимающих участие в этой гонке вооружений, обязана приобретать новые адаптации лишь для сохранения «статуса кво» [218, 219]. Долгосрочные эволюционные исследования показывают, что скорость накопления мутаций выше в том случае, когда фаг эволюционирует вместе с клеткой-хозяином, по сравнению с ситуацией, когда фаг эволюционирует, в то время как клетка-хозяин сохраняет свой генотип [220, 221]. Одним из примеров, на котором можно оценить динамику этих взаимодействий, является конфронтация элементов PLE клеток *V. cholerae* с фагом ICP1. Используя образцы *V. cholerae*, собранные начиная с 1940-х годов, можно проследить историю этого соревнования: 5 различных типов PLE последовательно сменяли друг друга, предположительно, избегая защиты со стороны системы CRISPR-Cas, кодируемой фагом ICP1 [199, 205].

Лишь в последние годы мы начали осознавать реальное обилие защитных систем и разнообразие их механизмов действия. Это сразу ставит вопрос о том, как наличие нескольких защитных систем у отдельной бактерии влияет на

её выживаемость и устойчивость к фагам? Некоторые защитные системы являются высоко специфичными, в то время как другие могут воздействовать на несколько фагов как, например, некоторые системы Abi, которые улавливают общие нарушения метаболизма хозяина, или системы, основанные на распознавании ДНК, которые могут адаптироваться или мутировать для взаимодействия с новыми последовательностями [3, 222]. Защитные системы оказывают действие на различные стадии жизненного цикла вирусов, и, в целом, можно обозначить три основных линии защиты: системы, которые влияют на поверхность клетки, чтобы предотвратить адсорбцию фага и проникновение его генома; системы, которые разрушают генетический материал фага и системы, которые индуцируют клеточную смерть или остановку клеточного цикла в том случае, если фаг избежал действия первых двух линий защиты. Можно предположить, что одновременное присутствие различных защитных систем в одной клетке повышает шансы клетки на выживание и расширяет круг таргетируемых паразитов. Известно даже, что некоторые защитные системы действуют совместно. Например, деградация ДНК системами R-M типа I приводит к образованию пула фрагментов ДНК, которые могут быть использованы как предшественники спейсеров для системы CRISPR-Cas [64, 223, 224], или системы Abi, такие как PrrC и ретрон Ec48, использующие «охранную» стратегию и активируемые только в том случае, если фаг вмешивается в функции других защитных систем [146]. В то же время наличие защитных систем требует от клетки-хозяина определенных расходов: при отсутствии фаговой инфекции экспрессия защитных генов требует траты энергии, а их неспецифическая активность часто бывает опасна для самой клетки [110, 219, 225]. Таким образом, баланс между преимуществами, которые дают системы противовирусной защиты, и сопутствующими затратами определяет количество защитных систем в геноме и распространенность конкретных систем защиты. В условиях низкого давления со стороны фагов защитные системы могут быть утрачены, и их сохранению в популяции способствуют активный горизонтальный перенос генов (HGT), подавление экспрессии и фазовые вариации [226, 227].

Новые открытия позволили выделить дополнительные особенности систем защиты, ранее не столь очевидные.

— Между различными защитными системами может происходить обмен функциональ-

ми модулями, и сходные белковые домены могут быть вовлечены в различные типы защиты [208]. Например, модуль модификации системы Dnd может быть ассоциирован с эффекторами DndFGH или PblABCDE, нуклеаза NucC может быть ассоциирована с CBASS или CRISPR-Cas типа III, а домены TIR обнаруживаются в CBASS и Thoeris и т.д. [161, 210, 228].

— Наличие защитных систем характерно не только для прокариотических геномов. Так, MGE различного вида широко используют системы защиты в конфликтах между собой или для подавления клетки-хозяина [205, 226]. Например, недавно при метагеномном исследовании гигантских фагов было обнаружено множество локусов CRISPR со спейсерами, нацеленными на другие фаги [229].

— Было показано, что белки, характерные для систем иммунитета эукариот, выполняют аналогичные функции у прокариот, например, cGAS, pAgo, STING, TIR, STAND [105, 149, 151, 158, 210]. Недавняя работа Burroughs и Arravind [208] расширяет этот список, показывая, что гомологи Wnt, YEATS, TPR-S и других доменов встречаются в прокариотических островках защиты. Филогенетический анализ этих доменов указывает на прокариотическое происхождение, и это позволяет предположить, что некоторые иммунные механизмы возникли ещё до ответвления эукариот и были унаследованы последними.

**Финансирование.** Выполнение данной работы проходило при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-50560). АИ поддержан грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-34-90160), ОМ поддержана грантом Российского научного фонда (№ 19-74-00118). Оплата открытого доступа английской версии статьи: Сколковский Институт Науки и Технологий.

**Вклад авторов.** ОМ и АИ написали раздел CRISPR-Cas, АИ подготовил остальную часть статьи, АИ и ОМ подготовили рисунки, КС отредактировал текст.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Андрею Кульбачинскому за критическое прочтение раздела, посвящённого белку pAgo.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jansen, R., Embden, J. D. A., van Gastra, W., and Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol. Microbiol.*, **43**, 1565-1575.
- Mojica, F. J. M., and Garrett, R. A. (2013) Discovery and seminal developments in the CRISPR field, In *CRISPR-Cas Systems*, Springer, pp. 1-31.
- Nussenzweig, P. M., and Marraffini, L. A. (2020) Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria, *Annu. Rev. Genet.*, **54**, 93-120.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67-83.
- Jackson, R. N., and Wiedenheft, B. (2015) A conserved structural chassis for mounting versatile CRISPR RNA-guided immune responses, *Mol. Cell*, **58**, 722-728.
- Liu, T. Y., and Doudna, J. A. (2020) Chemistry of Class I CRISPR-Cas effectors: binding, editing, and regulation, *J. Biol. Chem.*, **295**, 14473-14487.
- Reeks, J., Graham, S., Anderson, L., Liu, H., White, M. F., and Naismith, J. H. (2013) Structure of the archaeal Cascade subunit Csa5: relating the small subunits of CRISPR effector complexes, *RNA Biol.*, **10**, 762-769.
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., et al. (2011) Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 529-536.
- Wiedenheft, B., Lander, G. C., Zhou, K., Jore, M. M., Brouns, S.J. J., et al. (2011) Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system, *Nature*, **477**, 486-489.
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Waghmare, S. P., Dickman, M. J., Barrangou, R., et al. (2013) *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*, *EMBO J.*, **32**, 385-394.
- Benda, C., Ebert, J., Scheltema, R. A., Schiller, H. B., Baumgärtner, M., et al. (2014) Structural model of a CRISPR RNA-silencing complex reveals the RNA-target cleavage activity in Cmr4, *Mol. Cell*, **56**, 43-54.
- Rouillon, C., Zhou, M., Zhang, J., Politis, A., Beilstein-Edmands, V., et al. (2013) Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade, *Mol. Cell*, **52**, 124-134.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., et al. (2009) RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex, *Cell*, **139**, 945-956.
- Zhang, J., Kasciukovic, T., and White, M. F. (2012) The CRISPR associated protein Cas4 Is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster, *PLoS One*, **7**, e47232.
- Elmore, J. R., Sheppard, N. F., Ramia, N., Deighan, T., Li, H., et al. (2016) Bipartite recognition of target RNAs activates DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas system, *Genes Dev.*, **30**, 447-459.
- Estrella, M. A., Kuo, F.-T., and Bailey, S. (2016) RNA-activated DNA cleavage by the type III-B CRISPR-Cas effector complex, *Genes Dev.*, **30**, 460-470.
- Kazlauskienė, M., Tamulaitis, G., Kostiuk, G., Venclovas, Č., and Siksnys, V. (2016) Spatiotemporal control of type III-A CRISPR-Cas immunity: coupling DNA degradation with the target RNA recognition, *Mol. Cell*, **62**, 295-306.
- Samai, P., Pyenson, N., Jiang, W., Goldberg, G. W., Hatoum-Aslan, A., and Marraffini, L. A. (2015) Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity, *Cell*, **161**, 1164-1174.
- Liu, T., Pan, S., Li, Y., Peng, N., and She, Q. (2017) Type III CRISPR-Cas system: introduction and its application for genetic manipulations, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **26**, 1-14.
- Goldberg, G. W., Jiang, W., Bikard, D., and Marraffini, L. A. (2014) Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting, *Nature*, **514**, 633-637.
- Kazlauskienė, M., Kostiuk, G., Venclovas, Č., Tamulaitis, G., and Siksnys, V. (2017) A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems, *Science*, **357**, 605-609.
- Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., et al. (2017) Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers, *Nature*, **548**, 543-548.
- You, L., Ma, J., Wang, J., Artamonova, D., Wang, M., et al. (2019) Structure studies of the CRISPR-Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference, *Cell*, **176**, 239-253.
- Koonin, E. V. and Makarova, K. S. (2017) Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back, *Genome Biol. Evol.*, **9**, 2812-2825.
- Özcan, A., Pausch, P., Linden, A., Wulf, A., Schühle, K., et al. (2019) Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*, *Nat. Microbiol.*, **4**, 89-96.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., et al. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 722-736.
- Koonin, E. V. and Makarova, K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **374**, 20180087.
- Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Russel, J., Garrett, R. A., Randau, L., et al. (2020) Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 2000-2012.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2579-E2586.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 1262-1278.
- Mali, P., Esvelt, K. M., and Church, G. M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nat. Methods*, **10**, 957-963.
- Sander, J. D., and Joung, J. K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 347-355.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., et al. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, **163**, 759-771.
- Yamano, T., Zetsche, B., Ishitani, R., Zhang, F., Nishimasu, H., and Nureki, O. (2017) Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1, *Mol. Cell*, **67**, 633-645.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., et al. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity, *Science*, **360**, 436-439.

37. Harrington, L. B., Burstein, D., Chen, J. S., Paez-Espino, D., Ma, E., et al. (2018) Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, *Science*, **362**, 839-842.
38. Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., and Koonin, E. V (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 6091-6105.
39. Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., et al. (2015) Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems, *Mol. Cell*, **60**, 385-397.
40. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., et al. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, *Science*, **353**, aaf5573, doi: 10.1126/science.aaf5573.
41. Koonin, E. V, and Krupovic, M. (2015) Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems, *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 184-192.
42. Koonin, E. V, Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67-78.
43. Makarova, K. S., and Koonin, E. V (2013) Evolution and classification of CRISPR-Cas systems and cas protein families, in *CRISPR-Cas System*, Springer, pp. 61-91.
44. Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., and Doudna, J. A. (2014) Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 528.
45. Nuñez, J. K., Harrington, L. B., Kranzusch, P. J., Engelman, A. N., and Doudna, J. A. (2015) Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nature*, **527**, 535-538.
46. Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., et al. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, **321**, 960-964.
47. Yosef, I., Goren, M. G., and Qimron, U. (2012) Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5569-5576.
48. Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., and Semenova, E. (2012) Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system, *Nat. Commun.*, **3**, 1-7.
49. Vorontsova, D., Datsenko, K. A., Medvedeva, S., Bondy-Denomy, J., Savitskaya, E. E., et al. (2015) Foreign DNA acquisition by the IF CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10848-10860.
50. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., et al. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, **471**, 602-607.
51. Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011) The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9275-9282.
52. Hatoum-Aslan, A., Maniv, I., Samai, P., and Marraffini, L. A. (2014) Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system, *J. Bacteriol.*, **196**, 310-317.
53. Babu, M., Beloglazova, N., Flick, R., Graham, C., Skarina, T., et al. (2011) A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair, *Mol. Microbiol.*, **79**, 484-502.
54. Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S. M., Ma, W., and Doudna, J. A. (2009) Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense, *Structure*, **17**, 904-912.
55. Beloglazova, N., Lemak, S., Flick, R., and Yakunin, A. F. (2015) Analysis of nuclease activity of Cas1 proteins against complex DNA substrates, in *CRISPR*, Springer, pp. 251-264.
56. Nam, K. H., Ding, F., Haitjema, C., Huang, Q., DeLisa, M. P., and Ke, A. (2012) Double-stranded endonuclease activity in *Bacillus halodurans* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated Cas2 protein, *J. Biol. Chem.*, **287**, 35943-35952.
57. Dixit, B., Ghosh, K. K., Fernandes, G., Kumar, P., Gogoi, P., and Kumar, M. (2016) Dual nuclease activity of a Cas2 protein in CRISPR-Cas subtype I-B of *Leptospira interrogans*, *FEBS Lett.*, **590**, 1002-1016.
58. Savitskaya, E. E., Musharova, O. S., and Severinov, K. V (2016) Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 653-661.
59. Mizuuchi, K., and Adzuma, K. (1991) Inversion of the phosphate chirality at the target site of Mu DNA strand transfer: evidence for a one-step transesterification mechanism, *Cell*, **66**, 129-140.
60. Krupovic, M., Makarova, K. S., Forterre, P., Prangishvili, D., and Koonin, E. V (2014) Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity, *BMC Biol.*, **12**, 36.
61. Béguin, P., Charpin, N., Koonin, E. V., Forterre, P., and Krupovic, M. (2016) Casposon integration shows strong target site preference and recapitulates protospacer integration by CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10367-10376.
62. Rollie, C., Graham, S., Rouillon, C., and White, M. F. (2018) Pre-spacer processing and specific integration in a type IA CRISPR system, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1007-1020.
63. Levy, A., Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., et al. (2015) CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA, *Nature*, **520**, 505-510.
64. Weissman, J. L., Stoltzfus, A., Westra, E. R., and Johnson, P. L. F. (2020) Avoidance of Self during CRISPR Immunization, *Trends Microbiol.*, **28**, 543-553, doi: 10.1016/j.tim.2020.02.005.
65. Dorman, C. J., and Bhriain, N. N. (2020) CRISPR-Cas, DNA supercoiling, and nucleoid-associated proteins, *Trends Microbiol.*, **28**, 19-27.
66. Kurilovich, E., Shiriaeva, A., Metlitskaya, A., Morozova, N., Ivancic-Bace, I., et al. (2019) Genome maintenance proteins modulate autoimmunity mediated primed adaptation by the *Escherichia coli* type IE CRISPR-cas system, *Genes (Basel)*, **10**, 872.
67. Radović, M., Killelea, T., Savitskaya, E., Wettstein, L., Bolt, E. L., and Ivančić-Baće, I. (2018) CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10173-10183.
68. Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J., and Bolt, E. L. (2015) Different genome stability proteins underpin primed and naive adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10821-10830.
69. Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., et al. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*, *J. Bacteriol.*, **190**, 1390-1400.
70. Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., et al. (2011) Interference by

- clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10098-10103.
71. Fineran, P. C., Gerritzen, M. J. H., Suárez-Diez, M., Künne, T., Boekhorst, J., et al. (2014) Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E1629-E1638.
  72. Westra, E. R., Semenova, E., Datsenko, K. A., Jackson, R. N., Wiedenheft, B., et al. (2013) Type IE CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition, *PLoS Genet.*, **9**, e1003742.
  73. Richter, C., Dy, R. L., McKenzie, R. E., Watson, B. N. J., Taylor, C., et al. (2014) Priming in the Type IF CRISPR-Cas system triggers strand-independent spacer acquisition, bi-directionally from the primed protospacer, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8516-8526.
  74. Garrett, S., Shiimori, M., Watts, E. A., Clark, L., Graveley, B. R., and Terns, M. P. (2020) Primed CRISPR DNA uptake in *Pyrococcus furiosus*, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6120-6135.
  75. Li, M., Wang, R., and Xiang, H. (2014) *Haloarcula hispanica* CRISPR authenticates PAM of a target sequence to prime discriminative adaptation, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7226-7235.
  76. Rao, C., Chin, D., and Ensminger, A. W. (2017) Priming in a permissive type IC CRISPR-Cas system reveals distinct dynamics of spacer acquisition and loss, *RNA*, **23**, 1525-1538.
  77. Almendros, C., Nobrega, F. L., McKenzie, R. E., and Brouns, S. J. J. (2019) Cas4-Cas1 fusions drive efficient PAM selection and control CRISPR adaptation, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5223-5230.
  78. Nussenzweig, P. M., McGinn, J., and Marraffini, L. A. (2019) Cas9 cleavage of viral genomes primes the acquisition of new immunological memories, *Cell Host Microbe*, **26**, 515-526.
  79. Savitskaya, E., Semenova, E., Dedkov, V., Metlitskaya, A., and Severinov, K. (2013) High-throughput analysis of type IE CRISPR/Cas spacer acquisition in *E. coli*, *RNA Biol.*, **10**, 716-725.
  80. Xue, C., Seetharam, A. S., Musharova, O., Severinov, K., Brouns, S. J., et al. (2015) CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10831-10847.
  81. Künne, T., Kieper, S. N., Bannenberg, J. W., Vogel, A. I. M., Mielliet, W. R., et al. (2016) Cas3-derived target DNA degradation fragments fuel primed CRISPR adaptation, *Mol. Cell*, **63**, 852-864.
  82. Dillard, K. E., Brown, M. W., Johnson, N. V., Xiao, Y., Dolan, A., et al. (2018) Assembly and translocation of a CRISPR-Cas primed acquisition complex, *Cell*, **175**, 934-946.
  83. Redding, S., Sternberg, S. H., Marshall, M., Gibb, B., Bhat, P., et al. (2015) Surveillance and processing of foreign DNA by the *Escherichia coli* CRISPR-Cas system, *Cell*, **163**, 854-865.
  84. Sashital, D. G., Wiedenheft, B., and Doudna, J. A. (2012) Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system, *Mol. Cell*, **46**, 606-615.
  85. Semenova, E., Savitskaya, E., Musharova, O., Strotskaya, A., Vorontsova, D., et al. (2016) Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type IE CRISPR-Cas interfering complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7626-7631.
  86. Severinov, K., Ispolatov, I., and Semenova, E. (2016) The influence of copy-number of targeted extrachromosomal genetic elements on the outcome of CRISPR-Cas defense, *Front. Mol. Biosci.*, **3**, 45.
  87. Shabalina, S., and Koonin, E. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference, *Trends Ecol. Evol.*, **23**, 578-587.
  88. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., van der Oost, J., and Koonin, E. V. (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements., *Biol. Direct*, **4**, 29.
  89. Willkomm, S., Makarova, K. S., and Grohmann, D. (2018) DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids, *FEMS Microbiol. Rev.*, **42**, 376-387.
  90. Kuzmenko, A., Oguienko, A., Esyunina, D., Yudin, D., Petrova, M., et al. (2020) DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease, *Nature*, **587**, 632-637, doi: 10.1038/s41586-020-2605-1.
  91. Wang, Y., Juraneck, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex, *Nature*, **456**, 921-926.
  92. Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D. K., and Aravin, A. A. (2013) Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA, *Mol. Cell*, **51**, 594-605.
  93. Lisitskaya, L., Aravin, A. A., and Kulbachinskiy, A. (2018) DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins, *Nat. Commun.*, **9**, 1-12.
  94. Swarts, D. C., Hegge, J. W., Hinojo, I., Shiimori, M., Ellis, M. A., et al. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5120-5129.
  95. Kuzmenko, A., Yudin, D., Ryazansky, S., Kulbachinskiy, A., and Aravin, A. A. (2019) Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnothrix rosea*, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5822-5836.
  96. Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., et al. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage, *Mol. Cell*, **19**, 405-419.
  97. Wang, Y., Juraneck, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G. S., et al. (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes, *Nature*, **461**, 754-761.
  98. Kaya, E., Doxzen, K. W., Knoll, K. R., Wilson, R. C., Strutt, S. C., et al. (2016) A bacterial Argonaute with non-canonical guide RNA specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 4057-4062.
  99. Willkomm, S., Zander, A., Gust, A., and Grohmann, D. (2015) A prokaryotic twist on argonaute function, *Life*, **5**, 538-553.
  100. Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., et al. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute, *Nature*, **507**, 258-261.
  101. Ryazansky, S., Kulbachinskiy, A., and Aravin, A. A. (2018) The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins, *MBio*, **9**, e01935-18, doi: 10.1128/mBio.01935-18.
  102. Zander, A., Willkomm, S., Ofer, S., Van Wolferen, M., Egert, L., et al. (2017) Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*, *Nat. Microbiol.*, **2**, 1-10.
  103. Swarts, D. C., Szczepaniak, M., Sheng, G., Chandradoss, S. D., Zhu, Y., et al. (2017) Autonomous generation and loading of DNA guides by bacterial Argonaute, *Mol. Cell*, **65**, 985-998.
  104. Jolly, S. M., Gainetdinov, I., Jouravleva, K., Zhang, H., Strittmatter, L., et al. (2020) *Thermus thermophilus* Argonaute functions in the completion of DNA replication, *Cell*, **182**, 1545-1559.

105. Koonin, E. V. (2017) Evolution of RNA- and DNA-guided antiviral defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence, *Biol. Direct*, **12**, 1-14.
106. Chopin, M.-C., Chopin, A., and Bidnenko, E. (2005) Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 473-9.
107. Lopatina, A., Tal, N., and Sorek, R. (2020) Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy, *Annu. Rev. Virol.*, **7**, 371-384.
108. Labrie, S. J., Samson, J. E., and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 317-327.
109. Fukuyo, M., Sasaki, A., and Kobayashi, I. (2012) Success of a suicidal defense strategy against infection in a structured habitat, *Sci. Rep.*, **2**, 238.
110. Van Houte, S., Buckling, A., and Westra, E. R. (2016) Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 745-763.
111. Barrangou, R., and Horvath, P. (2011) Lactic acid bacteria defenses against phages, in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, Springer, pp. 459-478.
112. Durmaz, E., and Klaenhammer, T. R. (2007) Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, **189**, 1417-1425.
113. Wang, C., Villion, M., Semper, C., Coros, C., Moineau, S., and Zimmerly, S. (2011) A reverse transcriptase-related protein mediates phage resistance and polymerizes untemplated DNA *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7620-7629.
114. Tangney, M., and Fitzgerald, G. F. (2002) Effectiveness of the lactococcal abortive infection systems *AbiA*, *AbiE*, *AbiF* and *AbiG* against P335 type phages, *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 67-72.
115. Parreira, R., Ehrlich, S. D., and Chopin, M. (1996) Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant *AbiB*, *Mol. Microbiol.*, **19**, 221-230.
116. Samson, J. E., Spinelli, S., Cambillau, C., and Moineau, S. (2013) Structure and activity of *AbiQ*, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system, *Mol. Microbiol.*, **87**, 756-768.
117. Bidnenko, E., Ehrlich, D., and Chopin, M.-C. (1995) Phage operon involved in sensitivity to the *Lactococcus lactis* abortive infection mechanism *AbiD1*, *J. Bacteriol.*, **177**, 3824-3829.
118. Bouchard, J. D., Dion, E., Bissonnette, F., and Moineau, S. (2002) Characterization of the two-component abortive phage infection mechanism *AbiT* from *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, **184**, 6325-6332.
119. Haaber, J., Samson, J. E., Labrie, S. J., Campanacci, V., Cambillau, C., et al. (2010) Lactococcal abortive infection protein *AbiV* interacts directly with the phage protein *SaV* and prevents translation of phage proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7085-7092.
120. Depardieu, F., Didier, J.-P., Bernheim, A., Sherlock, A., Molina, H., et al. (2016) A eukaryotic-like serine/threonine kinase protects staphylococci against phages, *Cell Host Microbe*, **20**, 471-481.
121. Snyder, L. (1995) Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol. Microbiol.*, **15**, 415-20.
122. Yu, Y. T., and Snyder, L. (1994) Translation elongation factor *Tu* cleaved by a phage-exclusion system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 802-806.
123. Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L., and Kaufmann, G. (1990) The optional *E. coli* *prf* locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease, *EMBO J.*, **9**, 1383-1389.
124. Cheng, X., Wang, W., and Molineux, I. J. (2004) F exclusion of bacteriophage T7 occurs at the cell membrane, *Virology*, **326**, 340-352.
125. Schmitt, C. K., Kemp, P., and Molineux, I. J. (1991) Genes 1.2 and 10 of bacteriophages T3 and T7 determine the permeability lesions observed in infected cells of *Escherichia coli* expressing the F plasmid gene *pifA*, *J. Bacteriol.*, **173**, 6507-6514.
126. Toothman, P., and Herskowitz, I. (1980) Rex-dependent exclusion of lambdoid phages II. Determinants of sensitivity to exclusion, *Virology*, **102**, 147-160.
127. Parma, D. H., Snyder, M., Sobolevski, S., Nawroz, M., Brody, E., and Gold, L. (1992) The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death, *Genes Dev.*, **6**, 497-510.
128. Yamaguchi, Y., Park, J.-H., and Inouye, M. (2011) Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea, *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 61-79.
129. Page, R., and Peti, W. (2016) Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence, *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 208-214.
130. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2013) Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4360-4377.
131. Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., and Gerdes, K. (2018) Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology, *Mol. Cell*, **70**, 768-784.
132. Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., and Salmond, G. P. C. (2009) The phage abortive infection system, *ToxIN*, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 894-899.
133. Short, F. L., Akusobi, C., Broadhurst, W. R., and Salmond, G. P. C. (2018) The bacterial Type III toxin-antitoxin system, *ToxIN*, is a dynamic protein-RNA complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity, *Sci. Rep.*, **8**, 1-10.
134. Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., and Yonesaki, T. (2011) *Escherichia coli* *rnlA* and *rnlB* compose a novel toxin-antitoxin system, *Genetics*, **187**, 123-130.
135. Otsuka, Y., and Yonesaki, T. (2012) *Dmd* of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* *LsoA* and *RnlA* toxins, *Mol. Microbiol.*, **83**, 669-681.
136. Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., and Fineran, P. C. (2014) A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a type IV toxin-antitoxin mechanism, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4590-4605.
137. Cai, Y., Usher, B., Gutierrez, C., Tolcan, A., Mansour, M., Fineran, P. C., et al. (2020) A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems, *Sci. Adv.*, **6**, eabb6651.
138. Hampton, H. G., Smith, L. M., Ferguson, S., Meaden, S., Jackson, S. A., and Fineran, P. C. (2020) Functional genomics reveals the toxin-antitoxin repertoire and *AbiE* activity in *Serratia*, *Microb. Genom.*, **6**, mgen000458, doi: 10.1099/mgen.0.000458.
139. Hazan, R., and Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* *mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1, *Mol. Genet. Genomics*, **272**, 227-234.
140. Pecota, D. C., and Wood, T. K. (1996) Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1, *J. Bacteriol.*, **178**, 2044-2050.
141. Hayes, F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest, *Science*, **301**, 1496-1499.
142. 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.

143. Song, S., and Wood, T. K. (2018) Post-segregational killing and phage inhibition are not mediated by cell death through toxin/antitoxin systems, *Front. Microbiol.*, **9**, 814.
144. Sberro, H., Fremin, B. J., Zlitni, S., Edfors, F., Greenfield, N., et al. (2019) Large-scale analyses of human microbiomes reveal thousands of small, novel genes, *Cell*, **178**, 1245-1259.e14.
145. Simon, A. J., Ellington, A. D., and Finkelstein, I. J. (2019) Retrons and their applications in genome engineering, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 11007-11019.
146. Millman, A., Bernheim, A., Stokar-Avihail, A., Fedorenko, T., Voichek, M., et al. (2020) Bacterial retrons function in anti-phage defense, *Cell*, **183**, 1551-1561.e12, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.065.
147. Bobonis, J., Mitosch, K., Mateus, A., Kritikos, G., Elfenbein, J. R., et al. (2020) Phage proteins block and trigger retron toxin/antitoxin systems, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.22.160242.
148. Bobonis, J., Mateus, A., Pfalz, B., Garcia-Santamarina, S., Galardini, M., et al. (2020) Bacterial retrons encode tripartite toxin/antitoxin systems, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.06.22.160168.
149. 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.
150. Burroughs, A. M., Zhang, D., Schäffer, D. E., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2015) Comparative genomic analyses reveal a vast, novel network of nucleotide-centric systems in biological conflicts, immunity and signaling, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 10633-10654.
151. Cohen, D., Melamed, S., Millman, A., Shulman, G., Oppenheimer-Shaanan, Y., et al. (2019) Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection, *Nature*, **574**, 691-695.
152. Whiteley, A. T., Eaglesham, J. B., de Oliveira Mann, C. C., Morehouse, B. R., Lowey, B., et al. (2019) Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals, *Nature*, **567**, 194-199.
153. Millman, A., Melamed, S., Amitai, G., and Sorek, R. (2020) Diversity and classification of cyclic-oligonucleotide-based anti-phage signalling systems, *Nat. Microbiol.*, **5**, 1608-1615, doi: 10.1038/s41564-020-0777-y.
154. Ablasser, A., and Chen, Z. J. (2019) cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation, *Science*, **363**, eaat8657, doi: 10.1126/science.aat8657.
155. Davies, B. W., Bogard, R. W., Young, T. S., and Mekalanos, J. J. (2012) Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence, *Cell*, **149**, 358-370.
156. Severin, G. B., Ramliden, M. S., Hawver, L. A., Wang, K., Pell, M. E., et al. (2018) Direct activation of a phospholipase by cyclic GMP-AMP in El Tor *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E6048-E6055.
157. Yoon, S. H., and Waters, C. M. (2021) The ever-expanding world of bacterial cyclic oligonucleotide second messengers, *Curr. Opin. Microbiol.*, **60**, 96-103.
158. Morehouse, B. R., Govande, A. A., Millman, A., Keszei, A. F. A., Lowey, B., et al. (2020) STING cyclic dinucleotide sensing originated in bacteria, *Nature*, **586**, 429-433.
159. Ye, Q., Lau, R. K., Mathews, I. T., Birkholz, E. A., Watrous, J. D., et al. (2020) HORMA domain proteins and a Trip13-like ATPase regulate bacterial cGAS-like enzymes to mediate bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, **77**, 709-722.e7.
160. Rosenberg, S. C., and Corbett, K. D. (2015) The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling, *J. Cell Biol.*, **211**, 745-755.
161. Lau, R. K., Ye, Q., Birkholz, E. A., Berg, K. R., Patel, L., et al. (2020) Structure and mechanism of a cyclic trinucleotide-activated bacterial endonuclease mediating bacteriophage immunity, *Mol. Cell*, **77**, 723-733.e6.
162. Lowey, B., Whiteley, A. T., Keszei, A. F. A., Morehouse, B. R., Mathews, I. T., et al. (2020) CBASS immunity uses CARF-related effectors to sense 3'-5'- and 2'-5'-linked cyclic oligonucleotide signals and protect bacteria from phage infection, *Cell*, **182**, 38-49.
163. Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, **49**, 277-300.
164. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., and Brüssow, H. (2003) Prophage genomics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 238-276.
165. Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., et al. (2016) Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms, *ISME J.*, **10**, 2854-2866.
166. Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., et al. (2017) Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence, *Nat. Microbiol.*, **2**, 1-13.
167. Roux, S., Krupovic, M., Daly, R. A., Borges, A. L., Nayfach, S., et al. (2019) Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes, *Nat. Microbiol.*, **4**, 1895-1906.
168. Benler, S., and Koonin, E. V. (2020) Phage lysis-lysogeny switches and programmed cell death: danse macabre, *BioEssays*, **42**, e2000114, doi: 10.1002/bies.202000114.
169. Waldor, M. K., and Friedman, D. I. (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 459-465.
170. Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., and Hendrix, R. W. (2000) Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages, *J. Mol. Biol.*, **299**, 27-51.
171. Taylor, V. L., Fitzpatrick, A. D., Islam, Z., and Maxwell, K. L. (2019) The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence, in *Advances in Virus Research*, Elsevier, Vol. 103, pp. 1-31.
172. Newton, G. J., Daniels, C., Burrows, L. L., Kropinski, A. M., Clarke, A. J., and Lam, J. S. (2001) Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3, *Mol. Microbiol.*, **39**, 1237-1247.
173. Krylov, S. V., Kropinski, A. M., Shaburova, O. V., Miroshnikov, K. A., Chesnokova, E. N., and Krylov, V. N. (2013) New temperate *Pseudomonas aeruginosa* phage, phi297: specific features of genome structure, *Russ. J. Genet.*, **49**, 806-818.
174. Taylor, V. L., Hoage, J. F. J., Thrane, S. W., Huszczyński, S. M., Jelsbak, L., and Lam, J. S. (2016) A bacteriophage-acquired O-antigen polymerase (Wzyβ) from *P. aeruginosa* serotype O16 performs a varied mechanism compared to its cognate Wzyα, *Front. Microbiol.*, **7**, 393.
175. Lehane, A. M., Korres, H., and Verma, N. K. (2005) Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues, *Biochem. J.*, **389**, 137-143.
176. Perry, L. L., SanMiguel, P., Minocha, U., Terekhov, A. I., Shroyer, M. L., et al. (2009) Sequence analysis of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage ΦV10 and identification of a phage-encoded immunity protein that modifies the O157 antigen, *FEMS Microbiol. Lett.*, **292**, 182-186.
177. Gentile, G. M., Wetzels, K. S., Dedrick, R. M., Montgomery, M. T., Garlena, R. A., et al. (2019) More evidence of collusion: a new prophage-mediated viral defense

- system encoded by mycobacteriophage sbash, *MBio*, **10**, e00196-19, doi: 10.1128/mBio.00196-19.
178. Montgomery, M. T., Guerrero Bustamante, C. A., Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., and Hatfull, G. F. (2019) Yet more evidence of collusion: a new viral defense system encoded by gordonia phage carolann, *MBio*, **10**, 1-18.
  179. Jimmy, S., Saha, C. K., Kurata, T., Stavropoulos, C., Oliveira, S. R. A., et al. (2020) A widespread toxin–anti-toxin system exploiting growth control via alarmone signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 10500-10510.
  180. Ferullo, D. J., and Lovett, S. T. (2008) The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*, *PLoS Genet.*, **4**, e1000300.
  181. Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., et al. (2020) Prophage-encoded phage defence proteins with cognate self-immunity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.13.199331.
  182. Rousset, F., Dowding, J., Bernheim, A., Rocha, E., and Bikard, D. (2021) Prophage-encoded hotspots of bacterial immune systems, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.01.21.427644.
  183. 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 EcoKI restriction/modification enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3936-3944.
  184. 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.
  185. Penadés, J. R., and Christie, G. E. (2015) The phage-inducible chromosomal islands: a family of highly evolved molecular parasites, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 181-201.
  186. Christie, G. E., and Dokland, T. (2012) Pirates of the Caudovirales, *Virology*, **434**, 210-221.
  187. Dokland, T. (2019) Molecular piracy: redirection of bacteriophage capsid assembly by mobile genetic elements, *Viruses*, **11**, 1003.
  188. 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.
  189. Novick, R. P., Christie, G. E., and Penadés, J. R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 541-551.
  190. Fillol-Salom, A., Martínez-Rubio, R., Abdulrahman, R. F., Chen, J., Davies, R., and Penadés, J. R. (2018) Phage-inducible chromosomal islands are ubiquitous within the bacterial universe, *ISME J.*, **12**, 2114-2128.
  191. Mitarai, N. (2020) How pirate phage interferes with helper phage: comparison of the two distinct strategies, *J. Theor. Biol.*, **486**, 110096.
  192. Novick, R. P. (2019) Pathogenicity islands and their role in staphylococcal biology, *Microbiol. Spectr.*, **7**, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0062-2019.
  193. Tormo-Más, M. Á., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S. M., Campoy, S., Lasa, Í., et al. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands, *Nature*, **465**, 779-782.
  194. Mir-Sanchis, I., Martínez-Rubio, R., Martí, M., Chen, J., Lasa, Í., et al. (2012) Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision, *Mol. Microbiol.*, **85**, 833-845.
  195. Ram, G., Chen, J., Kumar, K., Ross, H. F., Ubeda, C., et al. (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16300-5.
  196. Ram, G., Chen, J., Ross, H. F., and Novick, R. P. (2014) Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14536-14541.
  197. Martínez-Rubio, R., Quiles-Puchalt, N., Martí, M., Humphrey, S., Ram, G., et al. (2017) Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci, *ISME J.*, **11**, 1029-1042.
  198. Fillol-Salom, A., Bacarizo, J., Alqasmi, M., Ciges-Tomas, J. R., Martínez-Rubio, R., et al. (2019) Hijacking the hijackers: *Escherichia coli* pathogenicity islands redirect helper phage packaging for their own benefit, *Mol. Cell*, **75**, 1020-1030.
  199. 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.
  200. McKitterick, A. C., and Seed, K. D. (2018) Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread, *Nat. Commun.*, **9**, 1-8.
  201. McKitterick, A. C., Hays, S. G., Johura, F. T., Alam, M., and Seed, K. D. (2019) Viral satellites exploit phage proteins to escape degradation of the bacterial host chromosome, *Cell Host Microbe*, **26**, 504-514.e4.
  202. Barth, Z. K., Silvas, T. V., Angermeyer, A., and Seed, K. D. (2020) Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 249-263.
  203. Barth, Z. K., Netter, Z., Angermeyer, A., Bhardwaj, P., and Seed, K. D. (2020) A family of viral satellites manipulates invading virus gene expression and can affect cholera toxin mobilization, *mSystems*, **5**, e00358-20, doi: 10.1128/mSystems.00358-20.
  204. Hays, S. G., and Seed, K. D. (2020) Dominant *Vibrio cholerae* phage exhibits lysis inhibition sensitive to disruption by a defensive phage satellite, *Elife*, **9**, e53200.
  205. McKitterick, A. C., LeGault, K. N., Angermeyer, A., Alam, M., and Seed, K. D. (2019) Competition between mobile genetic elements drives optimization of a phage-encoded CRISPR-Cas system: insights from a natural arms race, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **374**, 20180089.
  206. 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**, 6039-6056.
  207. 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, doi: 10.1126/science.aar4120.
  208. Burroughs, A. M., and Aravind, L. (2020) Identification of uncharacterized components of prokaryotic immune systems and their diverse eukaryotic reformulations, *J. Bacteriol.*, **202**, e00365-20, doi: 10.1128/JB.00365-20.
  209. Santiveri, M., Roa-Eguiara, A., Kuhne, C., Wadhwa, N., Berg, H. C., et al. (2020) Structure and function of stator units of the bacterial flagellar motor, *Cell*, **183**, 244-257.
  210. Ofir, G., Herbst, E., Baroz, M., Cohen, D., Millman, A., et al. (2021) Antiviral activity of bacterial TIR domains via signaling molecules that trigger cell death, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.01.06.425286.
  211. Ka, D., Oh, H., Park, E., Kim, J., and Bae, E. (2020) Structural and functional evidence of bacterial antiphage protection by Thoeris defense system via NAD<sup>+</sup> degradation, *Nat. Commun.*, **11**, 2816, doi: 10.1038/s41467-020-16703-w.
  212. Bayless, A. M., and Nishimura, M. T. (2020) Enzymatic functions for Toll/Interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system, *Front. Genet.*, **11**, 539.
  213. Badrinarayanan, A., Le, T. B. K., and Laub, M. T. (2015) Bacterial chromosome organization and segregation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **31**, 171-199.



214. Panas, M. W., Jain, P., Yang, H., Mitra, S., Biswas, D., et al. (2014) Noncanonical SMC protein in *Mycobacterium smegmatis* restricts maintenance of *Mycobacterium fortuitum* plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 13264-13271.
215. Pace, H. C., and Brenner, C. (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function, *Genome Biol.*, **2**, 1-9.
216. Mekhedov, S. L., Makarova, K. S., and Koonin, E. V. (2017) The complex domain architecture of SAMD9 family proteins, predicted STAND-like NTPases, suggests new links to inflammation and apoptosis, *Biol. Direct*, **12**, 13.
217. Forsberg, K. J., and Malik, H. S. (2018) Microbial genomics: the expanding universe of bacterial defense systems, *Curr. Biol.*, **28**, R361-R364.
218. Van, V., and Van Valen, L. (1973) *A New Evolutionary Law*, The University of Chicago, Illinois.
219. Stern, A., and Sorek, R. (2011) The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes, *Bioessays*, **33**, 43-51.
220. Paterson, S., Vogwill, T., Buckling, A., Benmayer, R., Spiers, A. J., et al. (2010) Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution, *Nature*, **464**, 275-278.
221. Ignacio-Espinoza, J. C., Ahlgren, N. A., and Fuhrman, J. A. (2020) Long-term stability and Red Queen-like strain dynamics in marine viruses, *Nat. Microbiol.*, **5**, 265-271.
222. Furuta, Y., Kawai, M., Uchiyama, I., and Kobayashi, I. (2011) Domain movement within a gene: a novel evolutionary mechanism for protein diversification, *PLoS One*, **6**, e18819.
223. Dupuis, M.-È., Villion, M., Magadán, A. H., and Moineau, S. (2013) CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance, *Nat. Commun.*, **4**, 1-7.
224. Hynes, A. P., Villion, M., and Moineau, S. (2014) Adaptation in bacterial CRISPR-Cas immunity can be driven by defective phages, *Nat. Commun.*, **5**, 1-6.
225. Bernheim, A., and Sorek, R. (2020) The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 113-119.
226. 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.
227. 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.
228. 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.
229. Al-Shayeb, B., Sachdeva, R., Chen, L.-X., Ward, F., Munk, P., et al. (2020) Clades of huge phages from across Earth's ecosystems, *Nature*, **578**, 425-431.

## MICROBIAL ARSENAL OF ANTIVIRAL DEFENSES. PART II

### Review

A. B. Isaev<sup>1\*</sup>, O. S. Musharova<sup>1,2</sup>, and K. V. Severinov<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Moscow, Russia; E-mail: tef18@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia

<sup>3</sup> 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). The constant threat of phage infection is a major force that shapes evolution of 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 had 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. In the first part defense associated with cell surface, roles of small molecules, and innate immunity systems relying on DNA modification were discussed. The second part focuses on adaptive immunity systems, abortive infection mechanisms, defenses associated with mobile genetic elements, and novel systems discovered in recent years through metagenomic mining.

**Keywords:** bacteriophages, immunity systems, CRISPR-Cas, Abortive infection, Toxin-Antitoxin, PICI, prokaryotic Argonaute, CBASS