



## 专论与综述

## anti-CRISPR 的起源、发展和应用

裴晨辰<sup>1,2,3</sup> 李英俊<sup>\*1,2,3</sup>

1 华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070

2 华中农业大学深圳营养与健康研究院 广东 深圳 518000

3 中国农业科学院深圳农业基因组研究所 岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心 农业农村部农业基因数据分析重点实验室 广东 深圳 518120

**摘要:** 细菌和古菌等微生物与病毒(噬菌体)之间的生存之战是一场“军备竞赛”。细菌和古菌已经进化出多种先天和适应性的免疫系统来抵御噬菌体的入侵。噬菌体则利用不同的对抗策略来躲避这些噬菌体防御机制。CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-Associated)系统就是细菌和古菌广泛编码的一种抵御噬菌体等外源遗传元件的获得性免疫系统,与此同时,噬菌体也进化出特异性的 anti-CRISPR 来抵抗 CRISPR-Cas 系统的免疫。本文系统综述了 anti-CRISPR 的发现过程、分类和作用机制,并展望了其潜在的应用。

**关键词:** CRISPR-Cas, anti-CRISPRs, 获得性免疫, 核酸切割

## Origin, development, and application of anti-CRISPR

PEI Chenchen<sup>1,2,3</sup> LI Yingjun<sup>\*1,2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

2 Shenzhen Institute of Nutrition and Health, Huazhong Agricultural University, Shenzhen, Guangdong 518000, China

3 Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen, Guangdong 518120, China

**Abstract:** The battle for survival between microbes such as bacteria and archaea and viruses (bacteriophages) is an arms race. Bacteria and archaea have evolved innate and adaptive immune systems to protect themselves from viruses. Viruses use different counter-defense strategies to evade these phage defense mechanisms. The CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated) system is an adaptive immune system that is widely encoded by bacteria and archaea to resist foreign genetic elements such as viruses. At the same time, viruses also evolved specific anti-CRISPR to resist the immunity of the CRISPR-Cas system. In this paper, the discovery process, classification and mechanism of anti-CRISPR

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31801035); Cooperation Fund of Huazhong Agricultural University-Agricultural Genomics Institute at Shenzhen (CAAS) (SZYJY2021002)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-27-87281267; E-mail: yingjun@mail.hzau.edu.cn

**Received:** 29-05-2021; **Accepted:** 30-07-2021; **Published online:** 18-08-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(31801035); 华中农业大学-中国农业科学院深圳农业基因组研究所合作基金(SZYJY2021002)

**\*通信作者:** Tel: 027-87281267; E-mail: yingjun@mail.hzau.edu.cn

**收稿日期:** 2021-05-29; **接受日期:** 2021-07-30; **网络首发日期:** 2021-08-18

have been systematically reviewed, and their potential applications have prospected.

**Keywords:** CRISPR-Cas, anti-CRISPRs, adaptive immunity, nucleic acid cleavage

外源移动遗传元件例如噬菌体、质粒等的入侵促使细菌、古菌等原核生物进化出一系列包括先天性和获得性的防御系统<sup>[1]</sup>。CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-Associated)系统是细菌和古菌中广泛存在的一种抵御外源遗传物质入侵的获得性免疫系统,其由一段小的向导 RNA 引导 CRISPR 核酸蛋白复合体(Ribonucleoprotein Complex, RNP)对靶标核酸进行特异性降解<sup>[2]</sup>。在细菌、古菌等微生物与噬菌体“军备竞赛”的长期进化中,为对抗细菌和古菌编码的 CRISPR-Cas 系统,噬菌体等移动遗传元件也进化出多种 anti-CRISPR 策略,如编码 anti-CRISPR 蛋白(anti-CRISPR Protein, Acr)以逃逸 CRISPR-Cas 系统的免疫监管,这些 Acr 蛋白在不同阶段抑制 CRISPR-Cas 系统的活性<sup>[3]</sup>。本文主要介绍了目前报道的 anti-CRISPR 的发现、分类、特点以及作用机制,并对其潜在应用进行讨论与展望。

## 1 CRISPR-Cas 与 anti-CRISPR

### 1.1 CRISPR-Cas 系统

CRISPR-Cas 系统是微生物为免受噬菌体和外来遗传元件入侵进化而来的获得性免疫系统,在约 45% 的细菌和 87% 的古细菌基因组中都发现了 CRISPR-Cas 系统的存在<sup>[4]</sup>。CRISPR-Cas 系统由 CRISPR 簇和其侧翼的 *cas* 基因(CRISPR Associated Genes)组成,CRISPR 簇包括高度保守的、短的、部分回文的重复(Repeat)序列和序列不同但长度相似的间隔(Spacer)序列,*cas* 基因编码的 Cas 蛋白则在 CRISPR-Cas 系统免疫过程中发挥不同功能<sup>[5]</sup>。基于 *cas* 基因的同源性和 CRISPR 簇的结构,CRISPR-Cas 系统被分为 2 个大类 6 个分型:Class 1 类 CRISPR-Cas 系统(I、III 和 IV 型)中,效应蛋白复合体由多个蛋白亚基和 crRNA 组成;而 Class 2 类 CRISPR-Cas 系统(II、V 和 VI 型)的效应复合

体则由一个大的效应蛋白和 crRNA 组成,行使对靶标核酸的靶向切割功能<sup>[6-7]</sup>。

CRISPR-Cas 系统的免疫过程可分为 3 个阶段:Spacer 的获取(Spacer Acquisition)、crRNA 的加工与组装(crRNA Biogenesis)和 Target 的干涉(Interference),如图 1 所示。在 Spacer 获取阶段,相关 Cas 蛋白从外源遗传元件上捕获小的 DNA 片段,并将它们整合到 CRISPR 簇中作为新的 Spacer,对入侵的外源核酸形成记忆<sup>[8]</sup>。crRNA 的加工与组装过程起始于 CRISPR 簇被转录成前体 crRNA (pre-crRNA),接着被特定的核酸酶加工成成熟的 crRNA,在这个过程中,Cas 蛋白也开始表达,并对 crRNA 进行识别与结合<sup>[8-9]</sup>。最后的干涉阶段,crRNA 介导 CRISPR 核酸蛋白复合体捕获能够与 crRNA 的 Spacer 序列碱基互补配对的外源靶标核酸进行识别和切割<sup>[9]</sup>。

值得一提的是,III 型 CRISPR-Cas 系统展示出靶标 RNA 切割和由靶标 RNA 激活的 DNA 切割活性,同时还能产生环腺苷酸(Cyclic Oligonucleotide, cOA)激活 CARF (CRISPR-Associated Rossmann Fold)结构域的核酸酶非特异性地切割 RNA,是目前报道的唯一具有三重核酸切割活性的 CRISPR-Cas 系统<sup>[10-14]</sup>。冰岛硫化叶菌编码 3 套 CRISPR-Cas 系统,包括 1 个 I-A 型和 2 个 III-B 型(CRISPR-Cas10,分别命名为 Cmr- $\alpha$  和 Cmr- $\beta$ )<sup>[15]</sup>,作者所在团队对冰岛硫化叶菌 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的核酸干涉机制进行了系统的研究发现,Cmr- $\alpha$  系统中 Cmr2 $\alpha$ -6 $\alpha$  形成一个稳定的核心复合体,Cmr1 $\alpha$  则在 RNP 复合体中发挥捕获靶标 RNA 的作用,可以极大地增强核心复合体的核酸切割活性<sup>[16]</sup>;同时,位于 crRNA 远端的种子序列是 Cmr- $\alpha$  系统中 Cmr1 $\alpha$  捕获靶标 RNA 所必需的<sup>[17]</sup>;Cmr- $\alpha$  效应复合体能够切割与其 crRNA 互补的靶标 RNA,靶标 RNA 还能激活 Cmr- $\alpha$  复合体对 ssDNA 的切割活性,

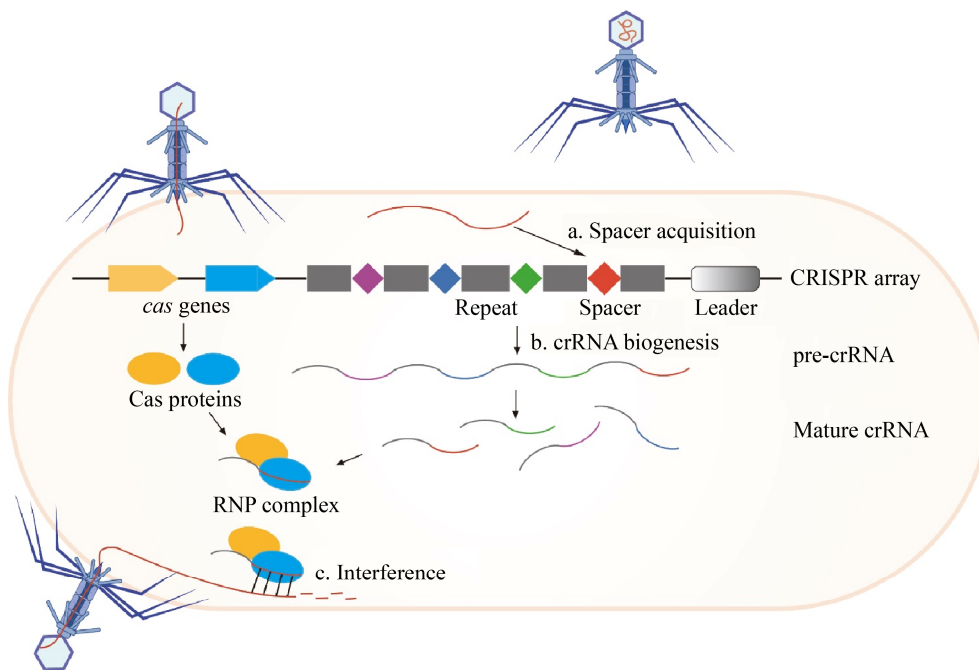


图 1 CRISPR-Cas 系统的免疫机制

Figure 1 The immune mechanism of the CRISPR-Cas system

注: a: Spacer 获取; b: crRNA 的加工与组装; c: Target 的干涉

Note: a: Spacer acquisition; b: crRNA biogenesis; c: Interference

从而介导大量的靶标 DNA 降解<sup>[10]</sup>。III 型 CRISPR-Cas 系统核酸干涉机制的解析,拓宽了大家对原核生物免疫系统的认知,并推动了 III 型 CRISPR-Cas 系统的应用技术开发。

## 1.2 anti-CRISPR 的发现

噬菌体与宿主共进化过程中,可以通过在宿主 CRISPR-Cas 系统靶标核酸 Protospacer 的种子序列区域产生突变来降低 RNP 复合体与靶标核酸的结合亲和力,进而逃避宿主 CRISPR-Cas 系统介导的免疫<sup>[18]</sup>。由于宿主 CRISPR-Cas 系统具有不断获取新 Spacer 的适应能力,噬菌体还进化出了积极主动的反防御系统,它们以与核酸序列无关的方式使 CRISPR-Cas 效应复合体失活<sup>[19]</sup>。科学家们最先在铜绿假单胞菌的噬菌体中发现了 anti-CRISPR 现象,尽管这些噬菌体携带有与宿主 I-F 型 CRISPR-Cas 系统 Spacer 序列匹配的靶标核酸,它们依然能侵染宿主菌并传播;Bondy-Denomy 等在这些噬菌体的基因组中发现了编码 5 个 Acr 蛋白(AcrIF1、

AcrIF2、AcrIF3、AcrIF4 和 AcrIF5)的基因,能帮助噬菌体逃避 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的免疫活性<sup>[20]</sup>。随后,在同一组噬菌体 AcrIF 蛋白编码基因的周围还找到编码另外 4 个 Acr 蛋白 AcrIE1、AcrIE2、AcrIE3、AcrIE4 的基因,它们可以帮助噬菌体逃避铜绿假单胞菌的 I-E 型 CRISPR-Cas 系统介导的免疫<sup>[21]</sup>。这 9 个最先发现的 Acr 蛋白家族没有任何相似的结构域,但这些编码 Acr 蛋白的基因在噬菌体基因组上的布局却具有共同点。这些能够编码 Acr 蛋白的噬菌体还编码一个转录调节因子,称为 Aca1 (anti-CRISPR Associated 1,由 *aca1* 基因编码)<sup>[20]</sup>。利用生物信息学方法检索 *aca1* 附近基因编码的蛋白质,又发现并验证了 1 个新的 anti-CRISPR 相关转录调节因子 Aca2 和 5 个新的 I-F 型 Acr 蛋白(AcrIF6、AcrIF7、AcrIF8、AcrIF9 和 AcrIF10),这些 Acr 蛋白在变形杆菌门中广泛存在<sup>[22]</sup>。由此,基因同时性(Gene Synteny)成为鉴定序列高度差异但编码在同一 *aca* 基因附近的新型

Acr 蛋白的主要策略,促使了编码相关蛋白 Aca2-7 基因的发现<sup>[22-24]</sup>。

自 2013 年发现第一个 Acr 蛋白以来,已发现多种病毒和质粒等移动遗传元件编码的 Acr 蛋白可以抵御 CRISPR-Cas 系统的免疫。Acr 蛋白在序列上相似性低,因此不能通过氨基酸序列同源比去预测新的 Acr 蛋白。目前预测和挖掘 Acr 蛋白的策略主要有 3 种:(1) 在序列保守的 anti-CRISPR 相关蛋白 Aca 周围预测<sup>[25]</sup>;(2) 在携带内源 CRISPR-Cas 系统自靶向(Self-Targeting)的宿主菌基因组上筛选<sup>[26]</sup>;(3) 在能够抵御宿主菌 CRISPR-Cas 免疫活性的噬菌体基因组上鉴定<sup>[27]</sup>。此外,也有研究者通过高通量筛选平台,筛选到一个合成的抗 SpCas9 小分子<sup>[28]</sup>,这也提示我们可以通过类似的筛选策略

筛选天然和合成的 CRISPR-Cas 系统抑制分子以开发利用。

### 1.3 anti-CRISPR 的分类

目前共报道了 82 种能够分别抑制 I、II、III、V 和 VI 型 CRISPR-Cas 系统免疫活性的 Acr 蛋白<sup>[29]</sup>,如表 1 所示,针对 IV 型 CRISPR-Cas 系统的 Acr 蛋白还未见报道。研究表明,这些 Acr 蛋白大部分都是通过与 CRISPR-Cas 系统的复合体或是 Cas 蛋白相互作用而抑制其免疫活性。

除了 Acr 蛋白之外,目前还报道了 2 种特殊的噬菌体 anti-CRISPR 策略可以抵御宿主 CRISPR-Cas 系统的免疫干涉,一种是巨噬菌体通过形成拟核结构抵御 I 型 CRISPR-Cas 系统的免疫<sup>[64-65]</sup>,另一种是由噬菌体衍生的多肽来抑制 CRISPR-Cas9 的免疫活性(图 2)。

表 1 anti-CRISPR 蛋白

Table 1 anti-CRISPR proteins

名称 Name	起源物种 The origin of species	编码氨基酸数量 Number of encoded amino acids	抑制 CRISPR-Cas 系统 Subtype inhibited	抑制阶段 Stage inhibited	靶标 Target	参考文献 References
AcrIB1	<i>Leptotrichia buccalis</i> DSM1135	193	I-B	Unknown	Not determined	[30]
AcrIC1	<i>Moraxella bovoculi</i> prophage	190	I-C	DNA 切割 DNA cleavage	Cas3	[31]
AcrIC3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	I-C	DNA 切割 DNA cleavage	Cas3	[31]
AcrIC4	<i>P. aeruginosa</i>	57	I-C	DNA 结合或其上游步骤 DNA binding or steps upstream of it	Not determined	[31]
AcrIC5	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	60	I-C	DNA 结合或其上游步骤 DNA binding or steps upstream of it	Not determined	[31]
AcrIC6	<i>Pseudomonas</i> sp. S-6-2	144	I-C/I-E	unknown	Not determined	[31]
AcrIC7	<i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6	94	I-C/I-E	DNA 结合或其上游步骤 DNA binding or steps upstream of it	Not determined	[31]
AcrIC8	<i>P. aeruginosa</i>	80	I-C/I-E	DNA 结合或其上游步骤 DNA binding or steps upstream of it	Not determined	[31]
AcrIC9	<i>Rhodobacter</i> RcapNL phage	79	I-C	Unknown	Not determined	[32]
AcrIC10	<i>Xanthomonas</i>	94	I-C	Unknown	Not determined	[32]

(待续)

(续表 1)						
AcrID1	<i>Sulfolobus islandicus</i> rudivirus 3	104	I-D	DNA 结合 DNA binding	Cas10d	[33]
AcrIE1	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD5	100	I-E	DNA 切割 DNA cleavage	Cas3	[34]
AcrIE2	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD88a	84	I-E	Unknown	Not determined	[21]
AcrIE3	<i>P. aeruginosa</i> phage DMS3	68	I-E	Unknown	Not determined	[21]
AcrIE4	<i>P. aeruginosa</i> phage D3112	52	I-E	Unknown	Not determined	[21]
AcrIE4-F7	<i>Pseudomonas citronellolis</i> prophage	119	I-E/I-F	Unknown	Not determined	[24]
AcrIE5	<i>Pseudomonas otitidis</i> prophage	65	I-E	Unknown	Not determined	[24]
AcrIE6	<i>P. aeruginosa</i> prophage	79	I-E	Unknown	Not determined	[24]
AcrIE7	<i>P. aeruginosa</i> prophage	106	I-E	Unknown	Not determined	[24]
AcrIE8	<i>Klebsiella michiganensis</i>	63	I-E	Unknown	Not determined	[25]
AcrIE9	<i>Pseudomonas pharmacofabriceae</i>	75	I-E	Unknown	Not determined	[31]
AcrIF1	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD30	78	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cas7	[35]
AcrIF2/ (AcrIC2)	<i>P. aeruginosa</i> phage D3112	90	I-F/I-C	DNA 结合 DNA binding	Cas3, Cas8	[35]
AcrIF3	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD5	139	I-F	DNA 切割、引物获取 DNA cleavage, primer acquisition	Cas3	[35-36]
AcrIF4	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD26	100	I-F	Unknown	Cas8f	[20,22,35]
AcrIF5	<i>P. aeruginosa</i> phage JBD5	79	I-F	Unknown	ND	[20,22]
AcrIF6	<i>P. aeruginosa</i> prophage	100	I-E/I-F	DNA 切割 DNA cleavage	Cascade	[37]
AcrIF7	<i>P. aeruginosa</i> prophage	67	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cas8	[22]
AcrIF8	<i>Pectobacterium</i> phage ZF40	92	I-F	DNA 切割、DNA 结合 DNA cleavage, DNA binding	Cascade (Cas7)	[37]
AcrIF9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> mobile element	68	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cascade	[37]
AcrIF10	<i>Shewanella xiamenensis</i> prophage	97	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cascade	[22]
AcrIF11	<i>P. aeruginosa</i> prophage	132	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cas8	[24]
AcrIF12	<i>P. aeruginosa</i> mobile element	124	I-F	Unknown	Not determined	[24]
AcrIF13	<i>Moraxella catarrhalis</i> prophage	115	I-F	Unknown	Not determined	[24]
AcrIF14	<i>Moraxella</i> phage Mcat5	124	I-F	DNA 结合 DNA binding	Cas7	[24]
AcrIF15	<i>K. michiganensis</i>	69	I-F	DNA 结合之前 Before DNA binding	Not determined	[25]
(待续)						

(续表 1)

AcrIF16	<i>Pectobacterium parmentieri</i>	171	I-F	DNA 结合之后 After DNA binding	Not determined [25]
AcrIF17.1	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	116	I-F	DNA 结合之后 After DNA binding	Not determined [25]
AcrIF17.2	<i>Citrobacter koseri</i>	112	I-F	DNA 结合之后 After DNA binding	Not determined [25]
AcrIF18	<i>Serratia marcescens</i>	69	I-F/I-E	DNA 结合之前 Before DNA binding	Not determined [25]
AcrIF19	<i>P. carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	93	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIF20	<i>P. carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	121	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIF21	<i>P. carotovorum</i> ( <i>Erwinia carotovora</i> )	162	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIF22	<i>P. parmentieri</i>	88	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIF23	<i>P. aeruginosa</i>	228	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIF24	<i>P. aeruginosa</i>	159	I-F	Unknown	Not determined [25]
AcrIIA1	<i>Listeria monocytogenes</i> prophage J0161a	149	II-A	核酸装载 Nucleic acid loading	Cas9 [38]
AcrIIA2	<i>L. monocytogenes</i> prophage J0161a	123	II-A	DNA 结合 DNA binding	Cas9 [39]
AcrIIA3	<i>L. monocytogenes</i> prophage SLCC2482	125	II-A	Unknown	Not determined [40]
AcrIIA4	<i>L. monocytogenes</i> prophage J0161b	87	II-A	DNA 结合 DNA binding	Cas9 [39,41]
AcrIIA5	<i>Streptococcus thermophilus</i> phage D4276	140	II-A	DNA 切割 DNA cleavage	Cas9 [42-43]
AcrIIA6	<i>S. thermophilus</i> phage D1811	183	II-A	DNA 结合 DNA binding	Cas9 [44]
AcrIIA7	Metagenomic libraries from human gut	103	II-A	Unknown	Cas9 [45]
AcrIIA8	<i>M. libraries</i> from human gut	105	II-A	Unknown	Cas9 [45]
AcrIIA9	<i>M. libraries</i> from human gut	141	II-A	Unknown	Cas9 [45]
AcrIIA10	<i>M. libraries</i> from human gut	109	II-A	Unknown	Cas9 [45]
AcrIIA11	<i>Lachnospiraceae</i> phage	182	II-A	DNA 切割 DNA cleavage	Cas9 [46]
AcrIIA12	<i>L. monocytogenes</i> R2-502	83	II-A	Unknown	Not determined [47]
AcrIIA13	<i>Staphylococcus schleiferi</i> strain 5909-02	131	II-A	DNA 结合 DNA binding	Cascade [26]
AcrIIA14	<i>Staphylococcus simulans</i> strain 19	159	II-A	DNA 切割 DNA cleavage	Cas9 [26]
AcrIIA15	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> strain 104N	170	II-A	DNA 结合、sgRNA 装载 DNA binding, sgRNA loading	Cas9 [26]

(待续)

(续表 1)

AcrIIA16	<i>L. monocytogenes</i>	202	II-A	可能参与调节 sgRNA 水平 或其装载 May involve manipulation of sgRNA levels or loading	sgRNA, Cas9	[48-49]
AcrIIA17	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	100	II-A	可能参与调节 sgRNA 水平 或其装载 May involve manipulation of sgRNA levels or loading	Cas9	[48]
AcrIIA18	<i>Streptococcus macedonicus</i>	182	II-A	DNA 结合或上游阶段 DNA binding or steps upstream of it	Cas9	[48]
AcrIIA19	<i>S. simulans</i>	124	II-A	可能参与调节 sgRNA 水平 或其装载 May involve manipulation of sgRNA levels or loading	Cas9	[48]
AcrIIA20	<i>Streptococcus iniae</i> UEL-Si1	64	II-A	DNA 结合 DNA binding	Cas9-sgRNA	[49]
AcrIIA21	<i>Streptococcus agalactiae</i> DK-NI-014	108	II-A	Unknown	Not determined	[49]
AcrIIA22	<i>Clostridium</i> sp.	54	II-A	Unknown	Not determined	[50]
AcrIIA23	ND	ND	II-A	Unknown	Not determined	[51]
AcrIIC1	<i>Neisseria meningitidis</i>	85	II-C	DNA 切割 DNA cleavage	Cas9	[52]
AcrIIC2	<i>N. meningitidis</i> prophage	123	II-C	引导核酸装载 Guided nucleic acid loading	Cas9	[53-54]
AcrIIC3	<i>N. meningitidis</i> prophage	116	II-C	DNA 结合 DNA binding	Cas9	[52,54-55]
AcrIIC4	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> prophage	88	II-C	DNA 结合 DNA binding	Cas9	[56]
AcrIIC5	<i>Simonsiella muelleri</i> prophage	130	II-C	DNA 结合 DNA binding	Cas9	[56]
AcrIIIB1	<i>Sulfolobus</i> virus SIRV2 gp48	249	III-B	结合 Cmr 效应复合物 Bind Cmr effector complexes	Cmr effector complexes	[57]
AcrIII-1	<i>S. islandicus</i> rod-shaped virus 1	138	III	降解效应因子 Degradation effect factor	CA4 signal molecule	[58]
AcrVA1	<i>M. bovoculi</i> prophage	170	V-A	gRNA 切割 gRNA cleavage	Cas12a-gRNA	[59-60]
AcrVA2	<i>M. bovoculi</i> prophage	322	V-A	Unknown	Cas12a	[24]
AcrVA3	<i>M. bovoculi</i> prophage	168	V-A	Unknown	Cas12a	[24]
AcrVA4	<i>M. bovoculi</i> mobile element	234	V-A	crRNA 结合, DNA 识别, DNA 切割 crRNA binding, DNA recognition, DNA cleavage	Cas12a	[59-61]
AcrVA5	<i>M. bovoculi</i> mobile element	92	V-A	DNA 结合 DNA binding	Cas12a	[59,62]
AcrVIA1	<i>Listeria seeligeri</i> phage 46	229	VI-A	DNA 结合 DNA binding	Cas13a	[27]
Csx27	<i>Bergeyella zoohelcum</i> ATCC 43767	219	VI-B	Unknown	Cas13b	[63]

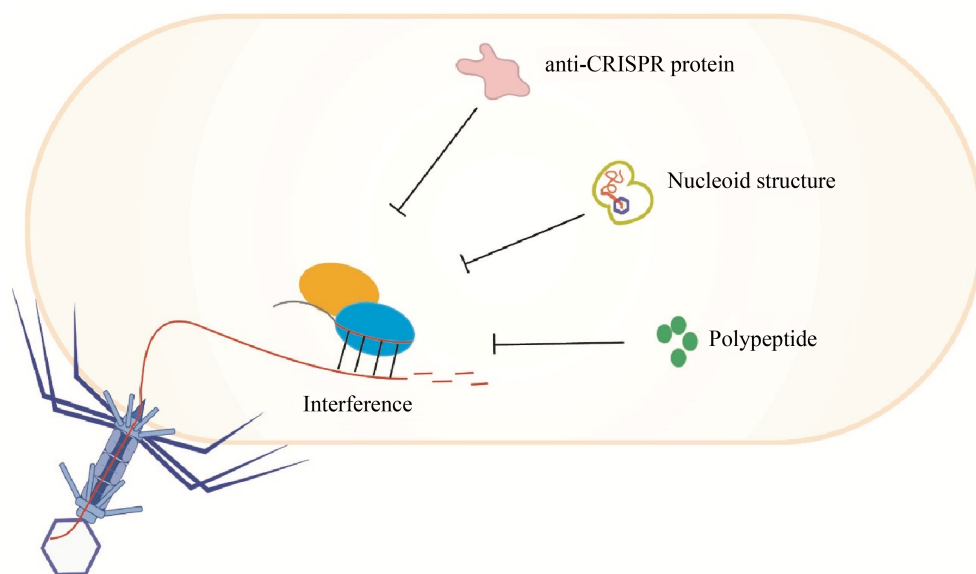


图2 anti-CRISPR 的分类

Figure 2 Classification of anti-CRISPR

Mendoza 等发现铜绿假单胞菌的巨型噬菌体  $\Phi$ KZ 能够抵御宿主菌体内除 Cas13a 外包括 Cas3、Cas9、Cas12a 等多种 CRISPR-Cas 系统的免疫活性，他们认为假单胞菌巨型噬菌体通过在其基因组周围形成拟核样的蛋白质屏障，从而规避 CRISPR-Cas 系统 DNA 核酸酶的靶向攻击<sup>[65]</sup>。同样，Malone 等也发现沙雷氏菌的巨型噬菌体 PCH45 在感染宿主后能够形成由蛋白质外壳包裹的拟核结构，使得噬菌体的基因组 DNA 不能被 I 型 CRISPR-Cas 系统靶向干涉，但是 III-A 型 CRISPR-Cas 系统仍然可以通过靶向噬菌体释放到细胞质中的 mRNA 来阻止其大量增殖<sup>[64]</sup>。

噬菌体 M13 衣壳蛋白 G8P 的一个肽段 G8P<sub>PD</sub> (Periplasmic Domain of G8P) 可以抑制酿脓链球菌 CRISPR-Cas 系统中 CRISPR-Cas9 的免疫活性，该间质结构域的胞浆周结构域能够与 Cas9 结合，阻止其装载 sgRNA 形成效应复合体，从而帮助噬菌体逃避 CRISPR-Cas9 的免疫反应<sup>[66]</sup>。该多肽抑制 CRISPR-Cas 系统活性的作用机制与一些 Acr 蛋白相似。

## 2 anti-CRISPR 蛋白的作用机制

已报道的 Acr 蛋白，分别以阻止 crRNA 装载、阻止靶标 DNA/RNA 的识别与结合、阻止靶标核酸的切割以及通过降解信号分子等方式发挥抵御 CRISPR-Cas 系统免疫活性的功能(图 3)。

### 2.1 阻止 crRNA 装载

AcrIIC2 是第一个报道的在核酸装载步骤抑制 CRISPR-Cas 系统免疫活性的 anti-CRISPR 蛋白。AcrIIC2 通过与 Cas9 蛋白的 BH 结构域结合，阻止 Cas9 蛋白与 crRNA 结合形成效应复合体，进而保护靶标 DNA 不被降解<sup>[54]</sup>。同样，有研究显示 AcrIIA16、17 和 19 可能也是通过与 ApoCas9 蛋白的相互作用干扰了 sgRNA 的装载与稳定，从而抑制 II-A 型 CRISPR-Cas 系统的活性<sup>[48]</sup>。

### 2.2 阻止靶标 DNA/RNA 的识别与结合

目前发现的 anti-CRISPR 蛋白中，阻止 CRISPR-Cas 效应复合体识别和结合靶标核酸是其抑制 CRISPR-Cas 系统免疫活性的常见作用方式，例如，I-D 型 CRISPR-Cas 系统效应复合体的大亚基 Cas10d 被 AcrID1 蛋白以二聚体的形式约束，阻止了其与外源 DNA 的结合<sup>[33]</sup>。在 I-F 型



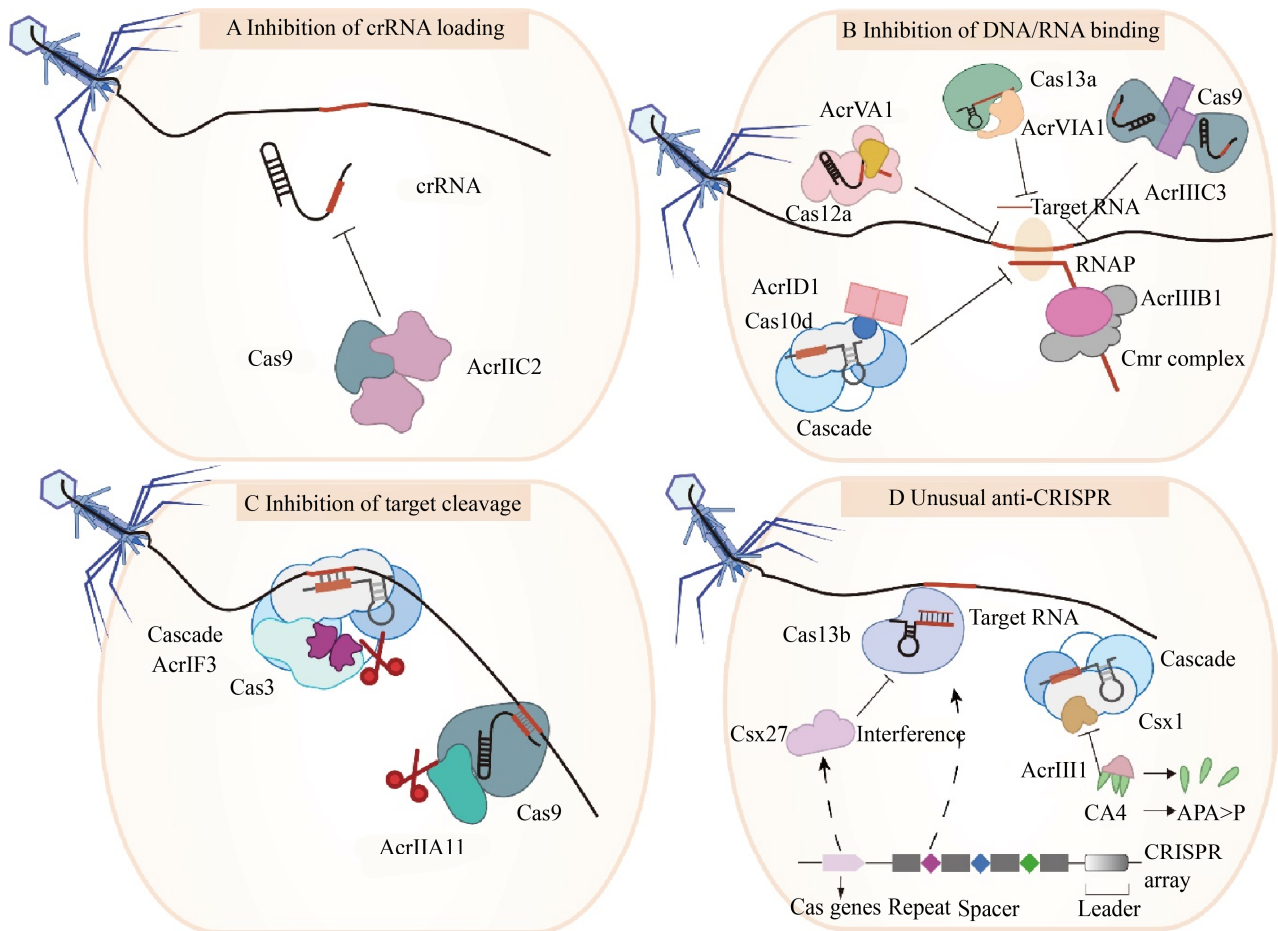


图3 Acr 蛋白作用机制示例

Figure 3 Mechanism of action of anti-CRISPR protein

注: A: 抑制 crRNA 装载; B: 抑制靶标 DNA/RNA 结合; C: 抑制靶标切割; D: 特殊的 anti-CRISPR

Note: A: Inhibition of crRNA loading; B: Inhibition of target DNA/RNA binding; C: Inhibition of target cleavage; D: Unusual anti-CRISPR

CRISPR-Cas 系统的 Acr 蛋白中, AcrIF1 和 AcrIF2 分别与 Csy3 亚基多聚体和 Csy1-Csy2 异二聚体相互作用,以此阻断 CRISPR-Cas 效应复合体与靶标 DNA 的结合,进而抑制 CRISPR-Cas 对靶标核酸的降解<sup>[35]</sup>。AcrIIB1 是第一个报道的可以直接抑制 III 型 CRISPR-Cas 系统核酸干涉活性的 Acr 蛋白,其由冰岛硫化叶菌病毒 SIRV2 编码,能抑制 III-B 型 CRISPR-Cas 系统对病毒中/晚期基因的靶向免疫<sup>[57]</sup>。研究表明, AcrIIB1 可能通过结合和干扰 III-B 型 CRISPR-Cas (Cmr)效应复合体产生激活糖核酸酶 Csx1 的信号分子来实现对 CRISPR 系统免

疫活性的抑制<sup>[57]</sup>。

在 Class 2 类 CRISPR-Cas 系统中, II-A 型 CRISPR-Cas 系统是目前发现 Acr 蛋白最多的 CRISPR 亚型,其中, AcrIIA4 通过模拟 PAM (Protospacer Adjacent Motif) 序列的结构阻止 CRISPR-Cas9 效应复合体识别 PAM 进而结合靶标 DNA<sup>[39]</sup>,同时, sgRNA 是 Cas9 蛋白结合 AcrIIA4 必需的,sgRNA 与 Cas9 蛋白结合进而形成 AcrIIA4 蛋白的结合位点<sup>[39]</sup>。AcrIIA20 同样是在 Cas9 与 sgRNA 组装之后直接与 Cas9-sgRNA 复合体结合进而阻止靶标 dsDNA 的降解,并且 AcrIIA20 与

Cas9-sgRNA 复合体的结合会阻碍 AcrIIA2 蛋白的结合,说明这 2 个 Acr 蛋白是通过结合 Cas9-sgRNA 复合体的同一位点来抑制其核酸免疫活性<sup>[49]</sup>。

V 型 CRISPR-Cas 防御系统中, AcrVA1 通过模拟 PAM 序列并切割结合在 Cas12a 蛋白  $\alpha 2$  螺旋中的 crRNA,使 crRNA 断裂无法与靶标核酸匹配,强有力地抑制了 CRISPR-Cas12a 的活性<sup>[24,60]</sup>;而 AcrVA5 则作为一种乙酰转移酶作用于 Cas12a 蛋白,使其难以捕获靶标 dsDNA 进而发挥免疫功能<sup>[62]</sup>。同样,在 VI 型 CRISPR-Cas 系统中, AcrVIA1 与 Cas13a 蛋白结合进而阻止 Cas13a-crRNA 复合体识别和结合靶标 RNA,达到保护靶标 ssRNA 的目的<sup>[27]</sup>。

### 2.3 阻止靶标 DNA/RNA 的切割

Acr 蛋白抵御 CRISPR-Cas 系统免疫的第 3 种常见方式是直接抑制 CRISPR-Cas 效应复合体对外源靶标核酸的切割。AcrIF3 是第一个被发现能抑制 CRISPR-Cas 效应复合体核酸酶活性的 Acr 蛋白, AcrIF3 以二聚体的形式结合到 Cas3 蛋白的关键结构域 HD、Linker 和 CTD 中<sup>[67]</sup>。AcrIF3 二聚体和 Cas3 之间广泛的相互作用覆盖了 Cas3 蛋白的一个表面,以 ADP 形式锁定 Cas3,有效阻止了 CRISPR-Cas 效应复合体招募 Cas3 进行靶标 DNA 切割<sup>[35-36]</sup>。此外,抑制 Cas3 靶向 DNA 降解也会抑制新 Spacer 的获取<sup>[67]</sup>。

相同地, AcrIIA11 可以特异性地与 Cas9 蛋白的一个保守结构域结合,并通过 Cas9 蛋白的引导和自身构象的变化结合 dsDNA,进而抑制 Cas9 蛋白的切割活性<sup>[46]</sup>。这种直接作用于 Cas 蛋白的保守结构是细菌和噬菌体等移动遗传元件在长期“军备竞赛”中进化的结果,可以在一定程度上防止 CRISPR-Cas 系统通过修饰和突变摆脱 Acr 蛋白的抑制。

### 2.4 特殊的 Acr 蛋白

AcrIII-1 不影响 III 型 CRISPR-Cas 效应复合体的结构和功能,却可以帮助病毒逃逸 III 型 CRISPR-Cas

系统的免疫干扰<sup>[58]</sup>。AcrIII-1 可以特异性地结合 III 型 CRISPR-Cas 效应复合体在捕获靶标 RNA 之后产生的信号分子环腺苷酸 CA<sub>4</sub>,并迅速降解 CA<sub>4</sub> 信号分子,进而能够抑制 III 型 CRISPR-Cas 系统的免疫<sup>[58]</sup>。AcrIII-1 具有很宽的宿主谱,在细菌和古菌中均广泛分布,这可能与并非直接作用于 CRISPR-Cas 效应复合体而是通过靶向降解信号分子 CA<sub>4</sub> 间接发挥抑制作用有关<sup>[58]</sup>。这也间接说明了环核苷酸信号分子在宿主和噬菌体“军备竞赛”中的关键作用。

值得一提的是, VI-B 型 CRISPR-Cas 系统中有一种特殊的 Cas 蛋白 Csx27 能够削弱 Cas13b-crRNA 效应复合体对靶向干涉 RNA 的活性<sup>[63]</sup>。Csx27 是目前 CRISPR-Cas 系统基因簇中发现的唯一对 CRISPR-Cas 系统免疫活性进行负调节的元件,这可能也是微生物宿主防御的重要调控机制之一<sup>[63]</sup>。

## 3 anti-CRISPR 蛋白的应用

CRISPR-Cas 系统目前已被广泛应用于基因编辑、基因调控、分子检测和示踪成像等<sup>[68-77]</sup>。鉴于 Acr 蛋白具有调节 CRISPR-Cas 系统免疫活性的功能,因此可以在 CRISPR-Cas 系统不同的应用场景利用 Acr 蛋白开发成不同的工具<sup>[3]</sup>。

### 3.1 在基因编辑中的应用

在 CRISPR-Cas 基因编辑技术的应用中,尽管 CRISPR-Cas 核酸酶具有较高的特异性,但是利用其做基因组编辑时的脱靶效应仍然为 CRISPR-Cas 技术的广泛应用带来了阻碍<sup>[78-79]</sup>。Acr 蛋白因其对 CRISPR-Cas 系统核酸切割活性的抑制作用,可以用于 CRISPR-Cas 基因编辑过程的控制,例如,结构分析和生化实验证明了 AcrIIA4 蛋白不仅可以阻断 CRISPR-Cas9 效应复合体对靶标 DNA 的识别,还可以通过质粒在细胞中表达或以蛋白的形式传递到细胞内,调节基因编辑的效果,减少 Cas9 的脱靶突变率<sup>[80]</sup>。同时,由于 II 型 CRISPR-Cas 系统的 Acr 蛋白具有阻止 CRISPR-Cas 效应复合体结合 DNA 的能力,因此它们也可以用于控制 dCas9

的活性,以降低脱靶效应<sup>[81]</sup>。最近有研究报道,经过预先设计了 Acr 蛋白分子的细胞会对基因编辑产生抗性,从而提供了一种方法来产生“写保护”细胞,防止未来的基因编辑,除此之外还进一步证明了 anti-CRISPR 可以用于控制基于 CRISPR-Cas 的基因调控环路<sup>[82]</sup>。

### 3.2 在基因沉默和激活中的应用

近年来,CRISPR 沉默(CRISPR Interference, CRISPRi)技术已经被广泛应用于基因表达的调控<sup>[83]</sup>。dCas9 (dead Cas9)是 Cas9 的一种无酶活性突变体,其缺少内切核酸酶活性,可以实现任何基因或多个基因的靶向而不引入不可逆的 DNA 损伤突变<sup>[84]</sup>。dCas9 蛋白具有可以将修饰酶和其他蛋白招募到 DNA 靶点的能力<sup>[84]</sup>,例如 dCas9 可以靶向增强子、内含子和其他非编码元件来调节这些元件在转录水平上的调控能力<sup>[70]</sup>。

在具有活性的 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的细胞中共表达 AcrIF3 和靶向启动子的 crRNA 时,I-F 型 CRISPR 效应复合体可以特异性结合启动子阻碍 RNA 聚合酶的转录,但 AcrIF3 会抑制核酸酶 Cas3 对靶标启动子核酸的降解,从而实现转录水平的抑制<sup>[35,85]</sup>。

同样,dCas9 可以被用于基因表达激活,这种方法被称为 CRISPRa (CRISPR activation)<sup>[86]</sup>。CRISPRa 是将 dCas9 与转录激活域(最常见的是 VP64)进行融合,融合了转录激活域的 CRISPR-dCas9 效应复合体在 sgRNA 引导下即可实现对目标基因的表达激活<sup>[87-88]</sup>。因此,可以利用 Acr 蛋白抑制 CRISPR-Cas9 的活性从而发挥类似于 dCas9 的功能,实现基因表达激活或抑制。

### 3.3 在噬菌体治疗中的应用

随着多重耐药细菌的出现,人们对可替代抗生素的噬菌体疗法重新产生了兴趣。在利用噬菌体进行耐药菌防治时,一些耐药菌如铜绿假单胞菌和艰难梭状芽孢杆菌等编码有活性的 CRISPR-Cas 系统,这可能会阻碍噬菌体对宿主细菌的侵染和增

殖,降低噬菌体治疗的疗效<sup>[89-90]</sup>。因此,在噬菌体治疗中利用 Acr 蛋白帮助噬菌体规避 CRISPR-Cas 系统的免疫干扰,可能是提高噬菌体治疗耐药细菌疗效的有效途径之一。

## 4 展望

目前大家对噬菌体 anti-CRISPR 策略的认识主要还集中在其编码的各种 Acr 蛋白,而且这些已经报道的 Acr 蛋白主要作用于与 CRISPR-Cas 应用技术密切相关的核酸干涉这一步,而对更多潜在的 anti-CRISPR 作用机制,例如对宿主 CRISPR-Cas 系统适应和调控阶段的反制和抵御作用知之甚少,我们认为这在挖掘和解析新的 anti-CRISPR 及其作用机制时需要更多的关注。

在 anti-CRISPR 的应用方面,研究者们关注最多的是利用其实现 CRISPR-Cas 应用工具的精准控制,我们认为人工筛选天然或合成 anti-CRISPR 分子可以提供更多选择,尤其是在细胞基因编辑工作中,小分子化合物可能相比蛋白类抑制物更具有应用优势。此外,鉴于多数 Acr 蛋白具有与 CRISPR-Cas 效应复合体特异结合的特性,还可以利用 Acr 蛋白开发细胞中 CRISPR-Cas 复合体定性和定量检测技术。

目前在原核生物中有 2 种策略来利用 CRISPR-Cas 系统实现基因组编辑,即引入一个完整的外源 CRISPR-Cas 系统或者通过表达一个自靶向的 crRNA 利用宿主自身编码的内源 CRISPR-Cas 系统<sup>[91-92]</sup>。例如,通过构建一个携带人工 mini-CRISPR 和不含有靶标序列的 DNA 供体片段的基因编辑质粒,即可以利用嗜热古菌编码的内源 I-A 型和 III-B 型 CRISPR-Cas 系统实现高效的基因组编辑<sup>[92]</sup>。然而一些细菌和古菌自身编码 Acr 蛋白导致无法利用内源 CRISPR-Cas 系统实现有效的基因组编辑,因此可以通过敲除 Acr 编码基因或抑制其活性来帮助这些原核生物开发基于 CRISPR-Cas 系统的基因组编辑技术。

原核生物和噬菌体之间“军备竞赛”是不断进化的结果,这使得原核生物能够进化出新的策略来对抗噬菌体,比如 anti-anti-CRISPR。例如,细菌 AcrIIA1 的 N 端结构域的同源物抑制噬菌体 anti-CRISPR 的表达<sup>[93]</sup>;在 I-C 型 CRISPR-Cas 系统中, Cas3 和 Cas8 蛋白的融合可以绕过 AcrIC3 对 CRISPR-Cas 效应复合体免疫活性的抑制<sup>[31]</sup>;我们的合作研究也发现冰岛硫化叶菌 III-B 型 CRISPR-Cas (Cmr- $\beta$ )系统与其他 III 型 CRISPR 效应复合体不同, Cmr- $\beta$  复合体中心结构中的每个亚基均被 Cmr7 蛋白形成的二聚体覆盖<sup>[94]</sup>,这可能也是宿主进化出的一种 anti-anti-CRISPR 策略;此外,也有研究表明 Aca 蛋白可以抑制 Acr 的转录<sup>[23]</sup>,这类 Aca 蛋白似乎对噬菌体是不利的。

综上所述, anti-CRISPR 和 anti-anti-CRISPR 的发现和鉴定帮助人们对原核生物和噬菌体之间的“军备竞赛”有了新的了解,并为 CRISPR-Cas 应用技术开发中实现精准控制提供了新的策略。同时,研究病原微生物与宿主之间的相互作用机制,也为医疗健康领域尤其是感染性疾病的防治提供了理论指导。

## REFERENCES

- [1] Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes[J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 327-336
- [2] Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The biology of CRISPR-cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259
- [3] Marino ND, Pinilla-Redondo R, Csörgő B, Bondy-Denomy J. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(5): 471-479
- [4] Li YJ, Peng N. Endogenous CRISPR-cas system-based genome editing and antimicrobials: review and prospects[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2471
- [5] Jansen R, Embden JDAV, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575
- [6] Nussenzweig PM, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-cas immunity in bacteria[J]. *Annual Review of Genetics*, 2020, 54: 93-120
- [7] Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2016, 371(1707): 20150496
- [8] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes[J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 55-61
- [9] Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(2): 67-76
- [10] Han WY, Li YJ, Deng L, Feng MX, Peng WF, Hallström S, Zhang J, Peng N, Liang YX, White MF, et al. A type III-B CRISPR-Cas effector complex mediating massive target DNA destruction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): 1983-1993
- [11] Han WY, Pan SF, López-Méndez B, Montoya G, She QX. Allosteric regulation of Csx1, a type IIIB-associated CARF domain ribonuclease by RNAs carrying a tetraadenylate tail[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(18): 10740-10750
- [12] Kazlauskienė M, Kostiuk G, Venclovas Č, Tamulaitis G, Siksnys V. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2017, 357(6351): 605-609
- [13] Niewoehner O, Garcia-Doval C, Rostøl JT, Berk C, Schwede F, Bigler L, Hall J, Marraffini LA, Jinek M. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers[J]. *Nature*, 2017, 548(7669): 543-548
- [14] Han WY, Stella S, Zhang Y, Guo T, Sulek K, Peng-Lundgren L, Montoya G, She QX. A type III-B Cmr effector complex catalyzes the synthesis of cyclic oligoadenylate second messengers by cooperative substrate binding[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10319-10330
- [15] Deng L, Garrett RA, Shah SA, Peng X, She QX. A novel interference mechanism by a type IIIB CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1088-1099
- [16] Li YJ, Zhang Y, Lin JZ, Pan SF, Han WY, Peng N, Liang YX, She QX. Cmr1 enables efficient RNA and DNA interference of a III-B CRISPR-Cas system by binding to target RNA and crRNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(19): 11305-11314
- [17] Pan SF, Li Q, Deng L, Jiang SP, Jin XX, Peng N, Liang YX, She QX, Li YJ. A seed motif for target RNA capture enables efficient immune defence by a type III-B CRISPR-Cas system[J]. *RNA Biology*, 2019, 16(9): 1166-1178
- [18] Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, Semenova A, Westra ER, Wanner B, van der Oost J, Brouns SJJ, Severinov K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(25): 10098-10103
- [19] Maxwell KL. The anti-CRISPR story: a battle for survival[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 8-14
- [20] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas

- bacterial immune system[J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 429-432
- [21] Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung VHW, Maxwell KL, Davidson AR. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2014, 5(2): e00896
- [22] Pawluk A, Staals RHJ, Taylor C, Watson BNJ, Saha S, Fineran PC, Maxwell KL, Davidson AR. Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(8): 1-6
- [23] Birkholz N, Fagerlund RD, Smith LM, Jackson SA, Fineran PC. The autoregulator Aca2 mediates anti-CRISPR repression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(18): 9658-9665
- [24] Marino ND, Zhang JY, Borges AL, Sousa AA, Leon LM, Rauch BJ, Walton RT, Berry JD, Joung JK, Kleinstiver BP, et al. Discovery of widespread type I and type V CRISPR-Cas inhibitors[J]. *Science*, 2018, 362(6411): 240-242
- [25] Pinilla-Redondo R, Shehreen S, Marino ND, Fagerlund RD, Brown CM, Sørensen SJ, Fineran PC, Bondy-Denomy J. Discovery of multiple anti-CRISPRs highlights anti-defense gene clustering in mobile genetic elements[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5652
- [26] Watters KE, Shivram H, Fellmann C, Lew KJ, McMahon B, Doudna JA. Potent CRISPR-Cas9 inhibitors from *Staphylococcus* genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(12): 6531-6539
- [27] Meeske AJ, Jia N, Cassel AK, Kozlova A, Liao JQ, Wiedmann M, Patel DJ, Marraffini LA. A phage-encoded anti-CRISPR enables complete evasion of type VI-A CRISPR-Cas immunity[J]. *Science*, 2020, 369(6499): 54-59
- [28] Maji B, Gangopadhyay SA, Lee M, Shi MC, Wu P, Heler R, Mok B, Lim D, Siriwardena SU, Paul B, et al. A high-throughput platform to identify small-molecule inhibitors of CRISPR-Cas9[J]. *Cell*, 2019, 177(4): 1067-1079.e19
- [29] Jia N, Patel DJ. Structure-based functional mechanisms and biotechnology applications of anti-CRISPR proteins[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(8): 563-579
- [30] Yu LF, Marchisio MA. Types I and V anti-CRISPR proteins: from phage defense to eukaryotic synthetic gene circuits[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 575393
- [31] León LM, Park AE, Borges AL, Zhang JY, Bondy-Denomy J. Mobile element warfare via CRISPR and anti-CRISPR in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(4): 2114-2125
- [32] Gussow AB, Park AE, Borges AL, Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Bondy-Denomy J, Koonin EV. Machine-learning approach expands the repertoire of anti-CRISPR protein families[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3784
- [33] He F, Bhoobalan-Chitty Y, Van LB, Kjeldsen AL, Dedola M, Makarova KS, Koonin EV, Brodersen DE, Peng X. Anti-CRISPR proteins encoded by archaeal lytic viruses inhibit subtype I-D immunity[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(4): 461-469
- [34] Pawluk A, Shah M, Mejdani M, Calmettes C, Moraes TF, Davidson AR, Maxwell KL. Disabling a type I-E CRISPR-cas nuclease with a bacteriophage-encoded anti-CRISPR protein[J]. *mBio*, 2017, 8(6): e01751-e01717
- [35] Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du MJ, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL, Davidson AR. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins[J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 136-139
- [36] Wang XF, Yao DQ, Xu JG, Li A, Xu JP, Fu PH, Zhou Y, Zhu YQ. Structural basis of Cas3 inhibition by the bacteriophage protein AcrF<sub>3</sub>[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(9): 868-870
- [37] Zhang KM, Wang S, Li SS, Zhu YW, Pintilie GD, Mou TC, Schmid MF, Huang ZW, Chiu W. Inhibition mechanisms of AcrF<sub>9</sub>, AcrF<sub>8</sub>, and AcrF<sub>6</sub> against type I-F CRISPR-Cas complex revealed by cryo-EM[J]. *PNAS*, 2020, 117(13): 7176-7182
- [38] Osuna BA, Karambelkar S, Mahendra C, Christie KA, Garcia B, Davidson AR, Kleinstiver BP, Kilcher S, Bondy-Denomy J. *Listeria* phages induce Cas9 degradation to protect lysogenic genomes[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 31-40.e9
- [39] Dong D, Guo MH, Wang SH, Zhu YW, Wang S, Xiong Z, Yang JZ, Xu ZL, Huang ZW. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein[J]. *Nature*, 2017, 546(7658): 436-439
- [40] Rauch BJ, Silvis MR, Hultquist JF, Waters CS, McGregor MJ, Krogan NJ, Bondy-Denomy J. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 150-158.e10
- [41] Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, Börner K, Fakhiri J, Schmela C, Dietz L, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 924-927
- [42] Hynes AP, Rousseau GM, Lemay ML, Horvath P, Romero DA, Fremaux C, Moineau S. An anti-CRISPR from a virulent streptococcal phage inhibits *Streptococcus pyogenes* Cas9[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(10): 1374-1380
- [43] Song GX, Zhang F, Zhang XW, Gao X, Zhu XX, Fan DD, Tian Y. AcrIIA5 inhibits a broad range of Cas9 orthologs by preventing DNA target cleavage[J]. *Cell Reports*, 2019, 29(9): 2579-2589
- [44] Fuchsbaue O, Swuec P, Zimmerger C, Amigues B, Levesque S, Agudelo D, Düringer A, Chaves-Sanjuan A, Spinelli S, Rousseau GM, et al. Cas9 allosteric inhibition by the anti-CRISPR protein AcrIIA6[J]. *Molecular Cell*, 2019,

- 76(6): 922-937
- [45] Uribe RV, van der Helm E, Misiakou MA, Lee SW, Kol S, Sommer MOA. Discovery and characterization of Cas9 inhibitors disseminated across seven bacterial *Phyla*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 233-241
- [46] Forsberg KJ, Bhatt IV, Schmidtke DT, Stoddard BL, Kaiser BK, Malik HS. Functional metagenomics-guided discovery of potent Cas9 inhibitors in the human microbiome[J]. *eLife*, 2019, 8: e46540
- [47] Wiegand T, Karambelkar S, Bondy-Denomy J, Wiedenheft B. Structures and strategies of anti-CRISPR-mediated immune suppression[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2020, 74: 21-37
- [48] Mahendra C, Christie KA, Osuna BA, Pinilla-Redondo R, Kleinstiver BP, Bondy-Denomy J. Broad-spectrum anti-CRISPR proteins facilitate horizontal gene transfer[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(4): 620-629
- [49] Eitzinger S, Asif A, Watters KE, Iavarone AT, Knott GJ, Doudna JA, Minhas FUAA. Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(9): 4698-4708
- [50] Forsberg KJ, Schmidtke DT, Werther R, Hausman D, Stoddard BL, Kaiser BK, Malik HS. AcrIIA22 is a novel anti-CRISPR that impairs SpyCas9 activity by relieving DNA torsion of target plasmids[EB/OL]. *bioRxiv*, (2020-09-29). <https://doi.org/10.1101/2020.09.28.317578>
- [51] Varble A, Campisi E, Euler CW, Fyodorova J, Rostøl JT, Fischetti VA, Marraffini LA. Integration of prophages into CRISPR loci remodels viral immunity in *Streptococcus pyogenes*[EB/OL]. *bioRxiv*, (2020-10-09) <https://doi.org/10.1101/2020.10.09.333658>
- [52] Harrington LB, Doxzen KW, Ma EB, Liu JJ, Knott GJ, Edraki A, Garcia B, Amrani N, Chen JS, Cofsky JC, et al. A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-cas9[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1224-1233
- [53] Thavalingam A, Cheng Z, Garcia B, Huang X, Shah M, Sun W, Wang M, Harrington L, Hwang S, Hidalgo-Reyes Y, et al. Inhibition of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex assembly by anti-CRISPR AcrIIC<sub>2</sub>[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2806
- [54] Zhu YL, Gao A, Zhan Q, Wang Y, Feng H, Liu SQ, Gao GX, Serganov A, Gao P. Diverse mechanisms of CRISPR-Cas9 inhibition by type IIC anti-CRISPR proteins[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(2): 296-309
- [55] Kim Y, Lee SJ, Yoon HJ, Kim NK, Lee BJ, Suh JY. Anti-CRISPR AcrIIC<sub>3</sub> discriminates between Cas9 orthologs via targeting the variable surface of the HNH nuclease domain[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(23): 4661-4674
- [56] Lee J, Mir A, Edraki A, Garcia B, Amrani N, Lou HE, Gainetdinov I, Pawluk A, Ibraheim R, Gao XD, et al. Potent Cas9 inhibition in bacterial and human cells by AcrIIC<sub>4</sub> and AcrIIC<sub>5</sub> anti-CRISPR proteins[J]. *mBio*, 2018, 9(6): e02321-18
- [57] Bhoobalan-Chitty Y, Johansen TB, Di Cianni N, Peng X. Inhibition of type III CRISPR-cas immunity by an archaeal virus-encoded anti-CRISPR protein[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 448-458
- [58] Athukoralage JS, McMahon SA, Zhang CY, Grischow S, Graham S, Krupovic M, Whitaker RJ, Gloster TM, White MF. An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 572-575
- [59] Knott GJ, Thornton BW, Lobba MJ, Liu JJ, Al-Shayeb B, Watters KE, Doudna JA. Broad-spectrum enzymatic inhibition of CRISPR-Cas12a[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(4): 315-321
- [60] Zhang H, Li Z, Daczkowski CM, Gabel C, Mesecar AD, Chang LF. Structural basis for the inhibition of CRISPR-Cas12a by anti-CRISPR proteins[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(6): 815-826
- [61] Peng RC, Li ZT, Xu Y, He SS, Peng Q, Wu LN, Wu Y, Qi JX, Wang PY, Shi Y, et al. Structural insight into multistage inhibition of CRISPR-Cas12a by AcrVA4[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(38): 18928-18936
- [62] Dong LY, Guan XY, Li NN, Zhang F, Zhu YW, Ren K, Yu L, Zhou FX, Han ZF, Gao N, et al. An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(4): 308-314
- [63] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng KJ, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 618-630
- [64] Malone LM, Warring SL, Jackson SA, Warnecke C, Gardner PP, Gumy LF, Fineran PC. A jumbo phage that forms a nucleus-like structure evades CRISPR-Cas DNA targeting but is vulnerable to type III RNA-based immunity[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(1): 48-55
- [65] Mendoza SD, Nieweglowska ES, Govindarajan S, Leon LM, Berry JD, Tiwari A, Chaikerasitak V, Pogliano J, Agard DA, Bondy-Denomy J. A bacteriophage nucleus-like compartment shields DNA from CRISPR nucleases[J]. *Nature*, 2020, 577(7789): 244-248
- [66] Cui YR, Wang SJ, Chen J, Li J, Chen WZ, Wang SY, Meng B, Zhu W, Zhang ZH, Yang B, et al. Allosteric inhibition of CRISPR-Cas9 by bacteriophage-derived peptides[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 1-15
- [67] Wang JY, Ma J, Cheng Z, Meng X, You LL, Wang M, Zhang XZ, Wang YL. A CRISPR evolutionary arms race: Structural insights into viral anti-CRISPR/Cas responses[J]. *Cell Research*, 2016, 26(10): 1165-1168
- [68] Chen BH, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/cas system[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491

- [69] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [70] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu ZR, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451
- [71] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, Doudna JA. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection[J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-273
- [72] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442
- [73] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, Kellner MJ, Tan AL, Paul LM, Parham LA, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448
- [74] Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, Ye SH, Boehm CK, Kosoko-Thoroddsen TSF, Kehe J, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282
- [75] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladhia A, Joung J, Kirchgatterer P, Cox DBT, Zhang F. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing[J]. *Science*, 2019, 365(6451): 382-386
- [76] Grünwald J, Zhou RH, Garcia SP, Iyer S, Lareau CA, Aryee MJ, Joung JK. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-437
- [77] Zhou CY, Sun YD, Yan R, Liu YJ, Zuo EW, Gu C, Han LX, Wei Y, Hu XD, Zeng R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis[J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-278
- [78] Kim D, Bae SS, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim JI, Kim JS. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 237-243
- [79] Newton MD, Taylor BJ, Driessen RPC, Roos L, Cvetesic N, Allyjaun S, Lenhard B, Cuomo ME, Rueda DS. DNA stretching induces Cas9 off-target activity[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(3): 185-192
- [80] Shin J, Jiang FG, Liu JJ, Bray NL, Rauch BJ, Baik SH, Nogales E, Bondy-Denomy J, Corn JE, Doudna JA. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1701620
- [81] Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu XB, Graef J, Muffat J, Hnisz D, Li CH, Yuan BB, Xu CY, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene[J]. *Cell*, 2018, 172(5): 979-992
- [82] Nakamura M, Srinivasan P, Chavez M, Carter MA, Dominguez AA, La Russa M, Lau MB, Abbott TR, Xu XS, Zhao DH, et al. Anti-CRISPR-mediated control of gene editing and synthetic circuits in eukaryotic cells[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 194
- [83] Sha YY, Qiu YB, Zhu YF, Sun T, Luo ZS, Gao J, Feng XH, Li S, Xu H. CRISPRi-based dynamic regulation of hydrolase for the synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid with variable molecular weights[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(9): 2450-2459
- [84] Moradpour M, Abdulah SNA. CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 32-44
- [85] Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 12-17
- [86] Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(2): 406-416
- [87] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu YF, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 977-979
- [88] Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang LH, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 833-838
- [89] Boudry P, Semenova E, Monot M, Datsenko KA, Lopatina A, Sekulovic O, Ospina-Bedoya M, Fortier LC, Severinov K, Dupuy B, et al. Function of the CRISPR-cas system of the human pathogen *Clostridium difficile*[J]. *mBio*, 2015, 6(5): e01112-e01115
- [90] Van Belkum A, Soriaga LB, LaFave MC, Akella S, Veyrieras JB, Barbu EM, Shortridge D, Blanc B, Hannum G, Zambardi G, et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2015, 6(6): e01796-e01715
- [91] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [92] Li YJ, Pan SF, Zhang Y, Ren M, Feng MX, Peng N, Chen LM, Liang YX, She QX. Harnessing type I and type III CRISPR-Cas systems for genome editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(4): e34
- [93] Osuna BA, Karambelkar S, Mahendra C, Sarbach A, Johnson MC, Kilcher S, Bondy-Denomy J. Critical anti-CRISPR locus repression by a bi-functional Cas9 inhibitor[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 23-30
- [94] Sofos N, Feng MX, Stella S, Pape T, Fuglsang A, Lin JZ, Huang QH, Li YJ, She QX, Montoya G. Structures of the cmr- $\beta$  complex reveal the regulation of the immunity mechanism of type III-B CRISPR-cas[J]. *Molecular Cell*, 2020, 79(5): 741-757