



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva LAVRENČIČ

PROTEINI ANTI-CRISPR V BIOTEHNOLOGIJI

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Eva LAVRENČIČ

PROTEINI ANTI-CRISPR V BIOTEHNOLOGIJI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

ANTI-CRISPR PROTEINS IN BIOTECHNOLOGY

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Uroša Petroviča.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Uroš PETROVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 11. 9. 2019

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 601.4:577.2:602.3:576.347:579.6(043.2)
KG	anti-CRISPR, Acr, bakteriofagi, CRISPR/Cas, biotehnologija, mikrobiologija
AV	LAVRENČIČ, Eva
SA	PETROVIČ, Uroš (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2019
IN	PROTEINI ANTI-CRISPR V BIOTEHNOLOGIJI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 22 str., 2 pregl., 2 sl., 51 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za zaščito proti virusom in drugim genetskim elementom so bakterije in arheje razvile sistem CRISPR/Cas, ki je edini znani primer pridobljene imunosti pri prokariontih. V evolucijskem boju za preživetje so virusi razvili proteine anti-CRISPR, ki preprečijo delovanje sistema CRISPR/Cas. Proteini anti-CRISPR so majhni proteini, ki so strukturno zelo raznoliki in imajo različne mehanizme delovanja. Proteini lahko preprečijo vstavitve zaporedja virusne DNA v bakterijski lokus CRISPR, izražanje genov <i>cas</i> , vezavo ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno DNA ali cepitev virusne DNA. V diplomskem delu sem predstavila strukturo in mehanizem delovanja proteinov anti-CRISPR, njihov evolucijski razvoj, metode, ki jih uporabljamo za odkrivanje novih inhibitorjev CRISPR/Cas aktivnosti in njihovo uporabo v biotehnologiji. Proteini anti-CRISPR nam v kombinaciji s sistemom CRISPR/Cas omogočajo časovno-prostorski nadzor izražanja genov, izboljšanje varnosti uporabe genske terapije in onesposodobitev endonukleazne aktivnosti za zmanjšanje možnosti pojava izventarčnih mutacij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 601.4:577.2:602.3:576.347:579.6(043.2)

CX anti-CRISPR, Acr, bacteriophages, CRISPR/Cas, biotechnology, microbiology

AU LAVRENČIČ, Eva

AA PETROVIČ, Uroš (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2019

TI ANTI-CRISPR PROTEINS IN BIOTECHNOLOGY

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 22 p., 2 tab., 2 fig., 51 ref.

LA sl

AL sl/en

AB CRISPR/Cas is the prokaryotic adaptive immune system that protects bacteria and archaea against viruses and other mobile genetic elements. In the evolutionary arms race, viruses have evolved anti-CRISPR proteins that inhibit the CRISPR/Cas system. Anti-CRISPR proteins are small proteins with very diverse structures and mechanisms of action. Anti-CRISPR proteins can prevent the integration of the viral DNA sequence in the CRISPR locus, silence the expression of *cas* genes, prevent target binding of the ribonucleoprotein complex to the viral DNA, or prevent the nuclease activity of Cas endonuclease. Here, the structure, mechanisms of action, evolutionary origin, and methods for discovery of new anti-CRISPR proteins are described along with the development of anti-CRISPR based biotechnological tools. Anti-CRISPR proteins enable the spatiotemporal control of CRISPR/Cas activity and improve the safety of CRISPR/Cas applications by reducing the off-target effects.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
2 DELOVANJE CRISPR/Cas IN INHIBICIJA S PROTEINI Acr	2
2.1 VIRUSNA INHIBICIJA CRISPR/Cas	3
2.2 ODKRITJE PRVIH PROTEINOV Acr	3
3 LASTNOSTI PROTEINOV Acr	4
3.1 DELITEV	4
3.2 STRUKTURA	6
3.3 MEHANIZEM DELOVANJA	6
3.3.1 Preprečitev vgraditve novega vmesnika v genom (faza adaptacije)	7
3.3.2 Preprečitev izražanja genov <i>cas</i> in zorenja crRNA	7
3.3.3 Preprečitev prepoznavne tarčne DNA in cepitve	8
3.4 EVOLUCIJSKI RAZVOJ	9
3.5 ALI OBSTAJA ANTI-ANTI-CRISPR?	10
4 ODKRIVANJE NOVIH PROTEINOV Acr	11
4.1 FUNKCIONALNI TESTI	11
4.2 UPORABA BIOINFORMATSKIH PRISTOPOV	12
4.2.1 Iskanje z Acr povezavih proteinov (Aca) (metoda »guilt-by association«)	12
4.2.2 Vmesniki, ki ciljajo lastni genski zapis in povezani geni <i>acr</i>	12
4.2.3 Nepopolni sistem CRISPR/Cas	13
4.3 ISKANJE V METAGENOMSKIH KNJIŽNICAH	13
4.4 PROTEINSKI INŽENIRING	13
4.5 METODE ZA DOLOČITEV ANTI-CRISPR AKTIVNOSTI	14
5 UPORABA V BIOTEHNOLOGIJI	14
5.1 ZMANJŠANJE MOŽNOSTI POJAVA IZVENTARČNIH MUTACIJ	16

5.2	TKIVNO SPECIFIČNO NADZOROVANJE CRISPR/Cas AKTIVNOSTI	16
5.3	NADZOR UPORABE dCas9	16
5.4	KONTROLA IN INHIBICIJA TEHNIKE GENSKEGA PORIVA V OKOLJU	17
5.5	BAKTERIOFAGNO ZDRAVLJENJE	17
5.6	SELEKCIJA GENSKO SPREMENJENIH VIRUSOV	17
5.7	UČINKOVITEJŠA NASPROTNA SELEKCIJA (ANGL. »COUNTER SELECTION«)	18
6	ZAKLJUČEK	18
7	VIRI	19

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Proteini Acr z znano strukturo in mehanizmom delovanja	5
Preglednica 2: Metode za določitev anti-CRISPR aktivnosti	14

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Prikaz delovanja sistema bakterijske obrambe CRISPR/Cas (Oost in sod., 2014)	2
Slika 2: Metode odkrivanja novih proteinov Acr (Stanley in Maxwell, 2018)	11

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Aca	Z anti-CRISPR asociiran
Cas3	S CRISPR povezan protein 3
Cas9	S CRISPR povezan protein 9 (angl. CRISPR associated protein 9)
Cascade	Kompleks, ki se veže na tarčno DNA in jo cepi; značilen je za CRISPR/Cas tipa I (angl. CRISPR-associated complex for antiviral defense)
CRISPR	Gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	Deaktiviran Cas9 (angl. dead Cas9)
Domena HNH	Nukleazna domena na Cas9
Domena PI	Domena na Cas9, ki prepozna zaporedje PAM
Domena RuvC	Nukleazna domena na Cas9
Družina proteinov HTH	Družina proteinov s strukturo vijačnica-zavoj-vijačnica (angl. Helix-Turn-Helix)
Gen <i>acr</i>	Gen, ki vsebuje zapis za protein anti-CRISPR (protein Acr)
GFP	Zeleni fluorescenčni protein (angl. Green Fluorescent Protein)
NCBI	Nacionalni center za biotehnoške informacije
NLS	Jedro lokalizacijsko zaporedje (angl. nuclear localization sequence)
PAM	Zaporedje, ki se nahaja zraven protovmesnika (angl. protospacer adjacent motif)
pre-crRNA	Prekurzorska CRISPR RNA
Protein Acr	Protein Anti-CRISPR
Regija UTR	Neprevajajoča se regija
sgRNA	Enojna vodeča RNA (angl. single guide RNA)
Sindrom FXS	Sindrom krhkega kromosoma X
tracrRNA	Transaktivirajoča CRISPR RNA
TXTL	Brezcelični sistem za transkripcijo in translacijo (angl. cell-free transcription-translation system)

1 UVOD

Virusi so genetski elementi, ki se razmnožujejo le znotraj živih celic. Navadno so sestavljeni iz dednega materiala v obliki DNA ali RNA, ki je obdan s proteinsko ovojnico. Okužijo lahko tako evkariontske kot prokariontske organizme. Diplomsko delo se osredotoča na viruse, ki okužijo bakterije, imenovane bakteriofagi.

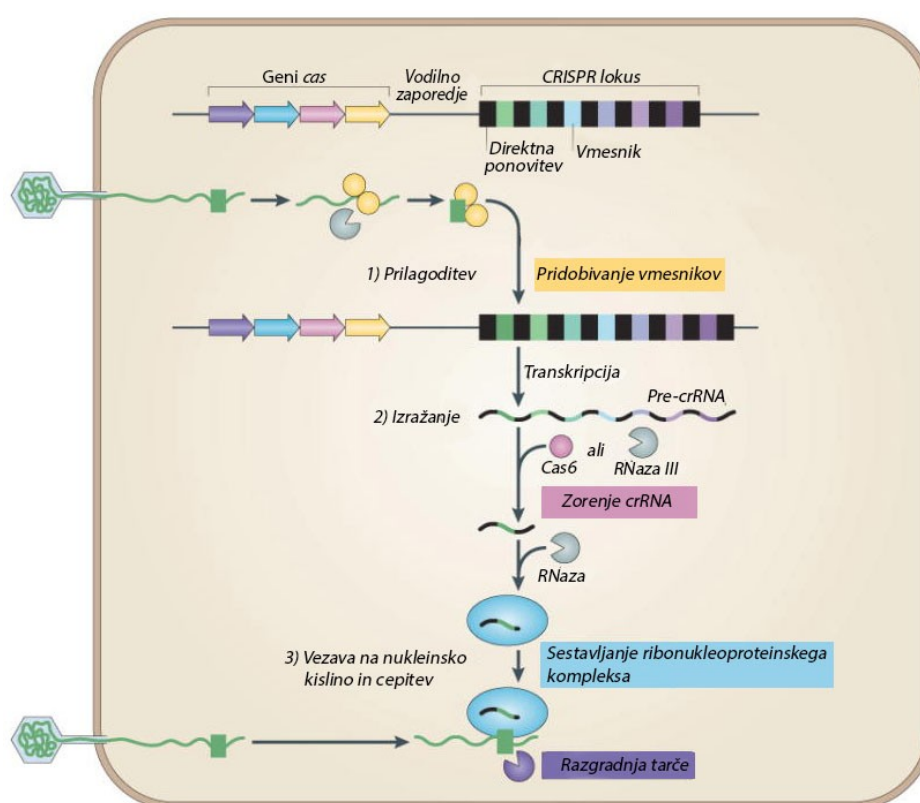
Ocenjujejo, da je na svetu prisotnih kar 10^{31} delcev bakteriofagov (Rooks, 2010). Že od samega nastanka med bakterijami in bakteriofagi poteka evolucijski boj za preživetje. Hipoteza Rdeče kraljice pravi, da se morajo organizmi nenehno razvijati in prilagajati okolju, da bi ostali konkurenčni in preživeli ter prenesli svoj genetski material na naslednjo generacijo (Trasanidou in sod., 2019). Evolucijski boj za preživetje med bakterijami in bakteriofagi je pripeljal do razvoja obrambnih sistemov bakterij za obrambo pred virusi in posledično tudi pojava virusnih mehanizmov, ki delujejo kot antagonisti proti bakterijski obrambi. Bakterije so razvile raznolike mehanizme prirojene imunosti za obrambo pred virusi. Mednje sodijo blokiranje receptorjev, ki jih prepoznajo virusi, preprečitev vnosa virusne DNA, razrez virusne nukleinske kisline z restrikcijskimi encimi ter programirana celična smrt (Labrie in sod., 2010). Vendar so se virusi sposobni zelo hitro prilagoditi zaradi visoke frekvence mutacij in kratkega generacijskega časa. Tako so se pod selekcijskim pritiskom v procesu koevolucije razvili številni virusni mehanizmi, ki inhibirajo delovanje bakterijske obrambe. Virus lahko med drugim mutirajo receptorski protein, izločajo proteine, ki razgradijo bakterijski zunajcelični matriks, mutirajo prepoznavna mesta za restrikcijske encime, metilirajo DNA ali pa izločajo encime, ki blokirajo bakterijske restrikcijske encime (Labrie in sod., 2010).

V neprestani tekmi za prevlado in obstanek so bakterije in arheje razvile sistem CRISPR (gruča enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev, angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), ki je doslej edini znani primer pridobljene imunosti pri prokariontih. Sistem CRISPR najdemo v 90 % do zdaj sekvenciranih genomov arhej in 50 % sekvenciranih genomov bakterij. Njegov namen je obramba pred virusi in drugimi mobilnimi genetskimi elementi, kot so plazmidi in transpozoni. S pomočjo majhnih, nekodirajočih RNA molekul sistem CRISPR/Cas prepozna tujo nukleinsko kislino. Nukleaza nato povzroči dvojni zlom nukleinske kisline ter tako obvaruje gostiteljsko celico. Specifičen, prilagodljiv in dedni sistem CRISPR/Cas zagotavlja prokariontom zelo učinkovit sistem obrambe.

Bondy in sodelavci so leta 2013 prvi poročali o odkritju majhnih, a raznolikih virusnih proteinov anti-CRISPR (proteini Acr), ki inhibirajo delovanje sistema CRISPR/Cas. V diplomskem delu bom predstavila zgradbo in mehanizem delovanja proteinov Acr, načine odkrivanja novih proteinov Acr ter njihovo uporabo v biotehnologiji.

2 DELOVANJE CRISPR/Cas IN INHIBICIJA S PROTEINI Acr

Sistemi CRISPR/Cas, ki jih najdemo le v arhejah in bakterijah, delujejo na osnovi imunskega spomina. Lokus CRISPR je sestavljen iz: (1) direktnih ponovitev, (2) variabilnih vmesnih zaporedij (vmesnikov), (3) vodilnega zaporedja in (4) genov *cas*. Poznamo 2 razreda sistemov CRISPR/Cas, ki jih naprej delimo še na 6 tipov in 19 podtipov. Sistemi CRISPR/Cas razreda 1 (tipi I, III in IV) tvorijo večproteinski kompleks Cascade za cepitev tuje DNA, medtem ko imajo sistemi razreda 2 (tipi II, V in VI) en sam nukleazni protein (Zhu in sod., 2018). Kljub razlikam v zgradbi in delovanju je mehanizem delovanja vseh tipov sistema CRISPR/Cas podoben in ga lahko razdelimo na 3 faze: (1) prilagoditev in pridobivanje novih vmesnikov, (2) izražanje genov *cas* in zorenje crRNA (CRISPR RNA) in (3) vezava ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno DNA in cepitev (Slika 1) (Oost in sod., 2014).



Slika 1: Prikaz delovanja sistema bakterijske obrambe CRISPR/Cas (Oost in sod., 2014)

Za uporabo v genskem inženiringu se večinoma uporabljajo tehnologije, ki izhajajo iz CRISPR/Cas tipa II, saj je za nukleazno aktivnost potreben le en sam protein, Cas9. Najpogosteje uporabljan in raziskan je Cas9 ortolog, izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (sev SF370), ki ima CRISPR/Cas tipa II-A. Pogosto se za urejanje človeških genomov uporablja tudi Cas9 iz bakterije *Neisseria meningitidis* (CRISPR/Cas tipa II-C), saj je manjši (lažja dostava z virusi) in povzroča manj izventarčnih učinkov (Makarova in sod., 2015; Pawluk in sod., 2016a).

2.1 VIRUSNA INHIBICIJA CRISPR/Cas

Raznolikost sistemov CRISPR/Cas in njihova prilagodljivost, ki je dosežena z vgrajevanjem novih vmesnikov, zagotavlja bakterijam učinkovit način obrambe pred bakteriofagi. Vendar so virusi razvili mehanizme, s katerimi inhibirajo delovanje CRISPR/Cas. Sprva sta bila edina znana načina virusne prilagoditve mutacija oziroma modifikacija DNA. Virusni kovalentno spremenijo DNA, na primer z zamenjavo citozina s 5-hidroksimetilcitozinom (HMC) ali glukozil-hidroksimetil-citozinom (glc-HMC), in s tem otežijo, da bi bakterije prepoznale virusno DNA. Podobno strategijo virusi uporabljajo za obrambo pred bakterijskimi restriktivnimi encimi. Čeprav kovalentna sprememba DNA oslabi učinkovitost CRISPR/Cas, pa ne zagotavlja popolne zaščite (Bryson in sod., 2015). Bolj učinkovito je kopičenje točkovnih mutacij v tarčnih regijah (protovmesniki, angl. protospacer), ki so prepoznane s strani CRISPR, oziroma izbris protovmesnikov. Prav tako lahko virusi mutirajo zaporedje PAM (angl. protospacer adjacent motif) in s tem preprečijo, da bi Cas nukleaza prepoznala virusno DNA kot tujo in jo cepila. Vendar samo mutacije niso dovolj za preživetje na dolgi rok (van Houte in sod., 2016). Bakterije lahko namreč uporabljajo različne CRISPR (pod)tipe, ki prepoznavajo različna zaporedja PAM. Najbolj pomembno za prilagoditev pa je stalno dodajanje novih vmesnikov (Fineran in sod., 2014).

2.2 ODKRITJE PRVIH PROTEINOV Acr

Ker so se modifikacije, mutacije in delecije virusne DNA izkazali kot nezadostni za učinkovito obrambo pred bakterijskim sistemom CRISPR/Cas, so znanstveniki predvidevali, da obstajajo tudi drugi mehanizmi za inaktivacijo CRISPR/Cas (Makarova in sod., 2015; Pawluk in sod., 2016a). Prvi so o proteinih, ki neposredno inhibirajo delovanje CRISPR/Cas, poročali leta 2013 s kanadske Univerze v Torontu. Bondy-Denomy in sod. (2013) so med raziskovanjem vpliva profagov na fenotip bakterijskega seva *Pseudomonas aeruginosa* PA14 s sistemom CRISPR tipa I-F odkrili pet različnih proteinov Acr (AcrIF1-5) v genomih profagov. Bakterijo so izpostavili 44 različnim lizogenim bakteriofagom, za katere je značilno, da svojo DNA vgradijo v genom gostitelja. Vgrajeno virusno DNA v bakterijski genom imenujemo profag. Čeprav je večina genov virusa v lizogeni fazi utišanih, pa vseeno pride do izražanja nekaterih virusnih genov.

Bondy-Denomy in sod. (2013) so opazili, da se lahko virusi v bakterijah, ki so bile predhodno okužene z lizogenimi virusi JBD24, MP29 in JBD30, uspešno razmnožujejo in tvorijo plake v bakterijskih kulturah. Odkritje jih je presenetilo, saj so imeli uporabljeni sevi *P. aeruginosa* aktiven sistem CRISPR/Cas, ki je lahko prepoznal tarčna zaporedja na virusih, ki so jih uporabili v poskusu. Da bi ugotovili, zakaj postanejo bakterije, okužene z določenimi lizogenimi virusi, neodporne proti novim virusom, so poravnali in primerjali genome sorodnih profagov. Našli so 10 kandidatnih genov, ki so se nahajali le v profagih, ki so inhibirali delovanje CRISPR/Cas, ne pa tudi v ostalih virusih. Z dodatnimi testiranjem, s

katerimi so pokazali, da je prisotnost testiranega proteina nujna za supresijo bakterijske imunosti, so našli 5 virusnih proteinov z anti-CRISPR delovanjem. Prisotnost proteinov Acr ni vplivala na koncentracijo crRNA oziroma transkripcijo genov *cas*, iz česar so sklepali, da proteini Acr verjetno inhibirajo delovanje zadnje faze, v kateri pride do vezave ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno DNA in cepitve virusnega genoma. Ker so odkriti proteini inhibirali delovanje CRISPR/Cas tipa I-F, so jih poimenovali AcrIF1, AcrIF2, AcrIF3, AcrIF4 in AcrIF5. Nukleotidna zaporedja genov *acr* so se izkazala za zelo raznolika, prav tako pa so odkrite gene našli le v zelo sorodnih vrstah virusov.

3 LASTNOSTI PROTEINOV Acr

3.1 DELITEV

Proteine Acr v osnovi delimo glede na razred in tip CRISPR/Cas, ki ga inhibirajo. Da bi se izognili zmedu v literaturi in uporabi več imen za isti protein, so uvedli enoten sistem poimenovanja. Okrajšavi Acr sledi tip CRISPR/Cas, ki ga le-ta protein inhibira. Dodamo še zaporedno številko odkritja družine, v katero sodijo po strukturi podobni si proteini. Če želimo izpostaviti, v kateri bakteriji je protein Acr aktiven, pa zapišemo okrajšano ime bakterije kot podpisan indeks (Pawluk in sod., 2016b; Bondy-Denomy in sod., 2018). Protein AcrI-F1_{Pae} so torej našli v bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* in spada v prvo odkrito družino proteinov Acr, ki inhibira delovanje CRISPR/Cas tipa I-F.

Do danes poznamo proteine Acr iz 45 družin (Trasanidou in sod., 2019). Znani proteini Acr lahko inhibirajo sisteme CRISPR/Cas podtipov I-C, I-D, I-E, I-F, II-A, II-C, V-A in VI-B (Trasanidou in sod., 2019), kar pomeni, da poznamo inhibitorje le 8 od 19 znanih tipov CRISPR/Cas. Kljub temu lahko na podlagi že obstoječih raziskav sklepamo, da obstajajo tudi inhibitorji preostalih CRISPR/Cas (pod)tipov.

Število novo odkritih genov *acr* hitro narašča. Da bi omogočili pregleden in organiziran dostop do že znanih proteinov Acr, so Dong in sod. (2018) iz znanstvene literature zbrali podatke o odkritih proteinih Acr in jih vnesli v bazo podatkov Anti-CRISPRdb, ki je prosto dostopna na spletu. V bazi podatkov so pregledno predstavljeni znani proteini Acr, njihova nukleotidna in aminokislinska zaporedja, označene so kodirajoče regije in organizmi, v katerih so proteine Acr odkrili. Prav tako lahko dostopamo do podatkov o 3-D strukturi (Protein Data Bank) in interakcijah z drugimi proteini (Database of Interacting Proteins), če so le-te določene. Čeprav zbrani podatki omogočajo pregled nad znanimi proteini Acr in so za raziskovalce zelo pomembni, pa baza podatkov trenutno vsebuje le 485 zaporedij proteinov Acr iz 23 družin, saj je bila nazadnje osvežena leta 2017. Ker se podatki v bazo vnašajo ročno, bi bilo potrebno vzpostaviti učinkovit sistem osveževanja in vnašanja novih podatkov.

Preglednica 1: Proteini Acr z znano strukturo in mehanizmom delovanja

Družina	Struktura	Mehanizem delovanja	Viri
AcrID1	Kompakten dimerni $\alpha\beta$ sendvič protein; vsak monomer je sestavljen iz 5 antiparalelnih β -ploskev in dveh α -vijačnic na isti strani β -ploskev ($\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\beta_5\alpha_1\alpha_2$)	Kot dimer se poveže s proteinom Cas10d, ki je del kompleksa Cascade → posnema DNA in prepreči vezavo na tarčno DNA	(He in sod., 2018)
AcrIE1	Podolgovata dimerna struktura; vsak monomer je sestavljen iz 3 α -vijačnic in 1 antiparalelne β -ploskve ($\alpha_1\alpha_2\alpha_3\beta_1$)	Vezava na nukleazo Cas3 → prepreči cepitev DNA	(Pawluk in sod., 2014, 2017)
AcrIF1	4 antiparalelne β -ploskve in 2 α -vijačnici ($\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_1\alpha_2$)	2-3 molekule se vežejo na Cas7f protein, ki je del kompleksa Csy → prepreči vezavo na DNA	(Bondy-Denomy in sod., 2013; Chowdhury in sod., 2017)
AcrIF2	4 antiparalelne β -ploskve in po 2- α vijačnici na vsaki strani ($\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_3\alpha_4$)	Vezava med Cas8f in Cas7f podenoti v kompleksu Csy → posnema DNA in prepreči vezavo na tarčno DNA	(Bondy-Denomy in sod., 2013; Chowdhury in sod., 2017)
AcrIF3	Dimer; vsak monomer iz 6 α -vijačnic ($\alpha_1\alpha_2\alpha_3\alpha_4\alpha_5\alpha_6$)	Vezava na Cas3 protein in preprečitev sestave kompleksa Csy → prepreči tako adaptacijo kot vezavo kompleksa Csy na tarčno DNA	(Bondy-Denomy in sod., 2013; Vorontsova in sod., 2015; Wang in sod., 2016)
AcrIF10	4 β -ploskve in 3- α vijačnice ($\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_1\alpha_2\alpha_3$)	Vezava med Cas8f in Cas7f podenoti v kompleksu Csy → posnema DNA in prepreči vezavo na tarčno DNA	(Pawluk in sod., 2016b; Guo in sod., 2017)
AcrIIA1	Pseudosimetričen dimer; vsak monomer sestavljen iz več α vijačnic	Vezava na DNA kot domnevni transkripcijski faktor → možna vezava na promotor tracrRNA in pre-crRNA in inhibicija transkripcije	(Rauch in sod., 2017; Ka in sod., 2018)
AcrIIA2	4 β -ploskve in po 2- α vijačnici na vsaki strani ($\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_3\alpha_4$)	Vezava v bližino PI in HNH domen Cas9 proteina → blokira PAM prepoznavo, vezavo na DNA in cepitev DNA	(Rauch in sod., 2017; Liu in sod., 2019)
AcrIIA4	3 antiparalelne β -ploskve, obdane s 3- α vijačnicami ($\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\alpha_2$)	Vezava na PAM prepoznavno regijo in nukleazno RuvC domeno na Cas9 → prepreči prepoznavo in cepitev DNA	(Rauch in sod., 2017; Kim in sod., 2018)
AcrIIC1	Sveženj 5 β -ploskev z 2- α vijačnicama ($\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_1\alpha_2\beta_4\beta_5$)	Vezava v HNH nukleazno domeno na Cas9 → prepreči cepitev DNA	(Pawluk in sod., 2016a; Harrington in sod., 2017)
AcrIIC2	Dimer; vsak monomer iz 6 β -ploskev, ki tvorijo polovičen β -sodček, obdan z dvema α -vijačnicama ($\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\beta_5\beta_6\alpha_2$)	Vezava na Cas9 → oteži interakcijo Cas9 s crRNA in blokira vezavo Cas9 na DNA	(Pawluk in sod., 2016a; Zhu in sod., 2019)
AcrIIC3	4 antiparalelne β -ploskve in po 3- α vijačnice na vsaki strani ($\alpha_1\alpha_2\alpha_3\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_4\alpha_5\alpha_6$)	Vezava v HNH domeno na Cas9 → inducira dimerizacijo Cas9 in tako prepreči vezavo Cas9 na DNA	(Pawluk in sod., 2016a; Zhu in sod., 2019)

3.2 STRUKTURA

Proteini Acr so strukturno zelo raznoliki, saj ne vsebujejo skupnih domen ali motivov (Zhu in sod., 2018). Njihova skupna značilnost je le relativna majhnost, saj jih večinoma sestavlja od 50 do 150 aminokislin. Največji poznani protein Acr je AcrVA2, ki so ga odkrili v profagu bakterije *Moraxella bovoculi*, in je sestavljen iz 322 aminokislin (Trasanidou in sod., 2019).

Do sedaj so določili strukturo in mehanizem delovanja le proteinom iz 12 družin (Preglednica 1). Dodatna ovira pri razumevanju zgradbe in delovanja preučevanih proteinov je tudi pomanjkanje natančno določenih struktur, saj je večina objavljenih proteinskih struktur v javno dostopnih bazah podatkov Uniprot in Protein Data Bank slabo določena. Da bi bolje razumeli njihovo strukturo in delovanje, bodo torej potrebne še nadaljnje raziskave in sistematična strukturna analiza.

Glede na raznolikost poznanih struktur lahko sklepamo, da so se razvili po več samostojnih evolucijskih poteh. Kljub temu pa imajo geni *acr* pogosto podobno genomsko okolico. Na 3' genomskega segmentu v bližini genov *acr* se namreč nahajajo visoko ohranjeni geni *aca* (z anti-CRISPR asociirani geni), katerih domnevna funkcija je uravnavanje transkripcije genov *acr*. Proteini Aca izhajajo iz družine proteinov, za katere je značilna struktura vijačnica-zavojevijačnica (HTH) in jih lahko najdemo le v bakteriofagih, ki vsebujejo gene *acr*. Medtem ko imajo različni geni *acr* lahko le nekaj odstotno podobnost, pa so si lahko geni *aca*, ki izvirajo iz bakterij iz raznolikih rodov in z različnimi tipi CRISPR/Cas, kar 95 % identični (Pawluk in sod., 2016a; Borges in sod., 2017).

3.3 MEHANIZEM DELOVANJA

Glavna naloga proteinov Acr je neposredna in specifična inhibicija delovanja CRISPR/Cas. Poleg strukturne raznolikosti imajo proteini Acr tudi zelo različne mehanizme delovanja. Večina proteinov Acr je specifičnih za določen CRISPR/Cas (pod)tip. Vendar obstaja tudi nekaj proteinov Acr, ki lahko inhibirajo različne CRISPR/Cas (pod)tipove. Za AcrF6, ki so ga sprva odkrili kot inhibitorja CRISPR/Cas tipa I-F v bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, se je izkazalo, da lahko inhibira tudi CRISPR/Cas tip I-E (Bondy-Denomy in sod., 2013). Prav tako dejstvo, da protein Acr inhibira določen tip CRISPR/Cas v eni bakteriji, ne pomeni, da bo deloval tudi v drugi bakteriji. S primerjavo struktur in zaporedij ni mogoče napovedati, če bo preiskovani protein Acr inhibiral želeni sistem CRISPR (Rauch in sod., 2017; Kim in sod., 2018).

Zaenkrat poznamo mehanizme delovanja le nekaj proteinov Acr. Proteini Acr se vežejo na proteine Cas ali pa delujejo kot transkripcijski faktorji. Prav zaradi njihove raznolikosti ne moremo predvideti mehanizma delovanja, ne da bi izvedli eksperimentalne študije. Proteini Acr lahko proces delovanja CRISPR/Cas zmotijo v vseh treh fazah, torej v fazi prilagoditve

(preprečitev vgraditve novih vmesnikov), izražanja (represija transkripcije crRNA, genov *cas*, inhibicija zorenja crRNA), večina poznanih proteinov Acr pa prepreči vezavo ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno zaporedje oziroma cepitev DNA.

3.3.1 Preprečitev vgraditve novega vmesnika v genom (faza prilagoditve)

Ob vstopu nepoznane nukleinske kisline bakterije vgradijo nov vmesnik v lokus CRISPR s pomočjo encimskega kompleksa, ki ga sestavlja več molekul Cas1 in Cas2. Cas1 je encim, ki je odgovoren za cepitev in integracijo tuje DNA, medtem ko Cas2 predstavlja strukturno oporo (Fagerlund in sod., 2019). Poznan ni noben primer proteina Acr, ki bi se vezal na Cas1 oziroma Cas2 in tako preprečil njegovo delovanje. Vendar je posebnost CRISPR/Cas tipa I-F ta, da je v kompleks Cas1-Cas2 vključen tudi Cas3, torej encim, katerega naloga je sicer razvitje in cepitev tarčne DNA. Na Cas3 se lahko veže AcrIF3, dimer, katerega monomer je sestavljen iz 6 α -vijačnic. AcrIF3 z vezavo na Cas3 prepreči vzpostavitev encimskega kompleksa, ki je potreben za uspešno vgraditev novega vmesnika v genom (Bondy-Denomy in sod., 2013; Vorontsova in sod., 2015; Wang in sod., 2016).

AcrIF3 je zaenkrat edini protein Acr, za katerega so pokazali, da ima sposobnost preprečitve vgraditve novega vmesnika v lokus CRISPR. Vendar je verjetno glavna funkcija vezave AcrIF3 na Cas3 inhibicija sestave kompleksa Csy in s tem preprečitev cepitve virusne DNA. Preprečitev cepitve DNA je namreč bolj učinkovit mehanizem, saj lahko virus tako okuži tudi bakterije, ki že imajo vgrajen vmesnik, specifičen za ta virus.

3.3.2 Preprečitev izražanja genov *cas* in zorenja crRNA

Naslednji možen način delovanja proteinov Acr je utišanje s CRISPR/Cas povezanih genov, torej preprečitev transkripcije crRNA (CRISPR RNA), tracrRNA (transaktivirajoča RNA) in ostalih genov *cas*. AcrIIA1 je psevdosimetričen dimer, katerega monomer je sestavljen iz več α -vijačnic. Ker so ugotovili, da ima AcrIIA1 visoko afiniteto do vezave na DNA, sklepajo, da bi lahko deloval kot transkripcijski faktor. Predvidevajo, da se veže na promotor tracrRNA oziroma pre-crRNA (prekurzorska CRISPR RNA) ter tako prepreči transkripcijo RNA molekul, ki so nujne za vzpostavitev ribonukleoproteinskega kompleksa in prepoznavo tarčne DNA (Rauch in sod., 2017; Ka in sod., 2018). Mehanizem delovanja AcrIIA1 sicer še ni eksperimentalno dokazan.

Čeprav se stopnja transkripcije lokusa CRISPR poveča ob okužbi, pa se lokus CRISPR prepisuje tudi, ko bakterija ni okužena (Oost in sod., 2014). Ob vstopu virusa v bakterijo se v gostiteljski celici torej že nahajajo s CRISPR povezane RNA in proteini. Tako mora virus z AcrIIA1 vsebovati tudi zapis za dodaten protein Acr, ki bo lahko inhibiral delovanje že prisotnih proteinov Cas.

3.3.3 Preprečitev prepoznavne tarčne DNA in cepitve

Največ proteinov Acr prepreči sestavo ribonukleoproteinskih kompleksov in njihovo vezavo na tarčno DNA, ali pa preprečijo cepitev nukleinske kisline z vezavo v nukleazne domene proteinov Cas.

Najbolj pogost mehanizem je preprečitev vezave s CRISPR povezanih proteinov na tarčno zaporedje. Prva odkrita proteina s to funkcijo sta bila AcrIF1 in AcrIF2. Obe molekuli se vežeta na kompleks Csy ter tako preprečita vezavo kompleksa na tarčno DNA. Medtem ko se 2 do 3 molekule AcrIF1 vežejo na podenoto Cas7f v kompleksu Csy, pa se AcrIF2 veže na heterodimer Cas8f:Cas7f. Podoben mehanizem delovanja ima tudi AcrIF10, ki se prav tako veže med Cas8f in Cas7f podenoti v kompleksu Csy. AcrIF1, AcrIF2 in AcrIF3 imajo tudi zelo podobno strukturo, saj so vsi sestavljeni iz kombinacije α -vijačnic in β -ploskev. Razlikujejo se le po številu α -vijačnic. Podoben mehanizem delovanja in struktura torej nakazujeta, da imajo molekule skupni evolucijski izvor (Chowdhury in sod., 2017).

Pomemben mejnik so bili odkritje in določitev strukture in mehanizma delovanja proteina AcrIIA4, ki inhibira delovanje Cas9, najpogosteje uporabljenega proteina v genskem inženiringu (Pawluk in sod., 2016a). S preučevanjem kristalne strukture so odkrili, da ima AcrIIA4 na površini negativen naboj in tako oponaša DNA ter se veže na mesto, ki je tipično odgovorno za prepoznavo zaporedja PAM NGG na virusni DNA (Dong in sod., 2017; Rauch in sod., 2017; Shin in sod., 2017; Yang in Patel, 2017). AcrIIA4 torej prepreči, da bi se kompleks Cas9:crRNA/tracrRNA vezal na DNA. Na podoben način deluje tudi AcrIIA2, ki prav tako prepreči prepoznavo zaporedja PAM na tarčni DNA. Drugačen način inhibicije vezave Cas9 na DNA pa imata AcrIIC2 in AcrIIC3. AcrIIC2 se veže na motiv BH na Cas9 in tako oteži interakcijo Cas9 s crRNA. AcrIIC3 pa se veže v domeno HNH in REC reženj na Cas9 in tako sproži dimerizacijo molekul Cas9 (Zhu in sod., 2019).

Drugi možen način, s katerim proteini Acr preprečijo razgradnjo virusne DNA, pa je inhibicija nukleazne aktivnosti nukleaze Cas. AcrIE1 se veže na nukleazo Cas3, ki je del kompleksa Cascade, značilnega za CRISPR/Cas tipa I (Pawluk in sod., 2017). Pri proteinih Acr tipa II pogosto opazimo, da inhibirajo vezavo na DNA in cepitev s pomočjo kombinacije dveh mehanizmov. AcrIIA2, AcrIIA4 in AcrIIC3 poleg preprečitve vezave nukleaze Cas9 na tarčno DNA inhibirajo tudi nukleazno aktivnost Cas9, saj se vežejo v bližino nukleazne domene HNH oziroma RuvC (Kim in sod., 2018; Liu in sod., 2019; Zhu in sod., 2019). Cepitev DNA prepreči tudi AcrIIC1, ki se veže v nukleazno domeno HNH (Harrington in sod., 2017).

3.4 EVOLUCIJSKI RAZVOJ

Vprašanje, zakaj so proteini Acr tako zelo raznoliki, ostaja odprto. Borges in sod. (2017) navajajo dve različni hipotezi, ki bi lahko pojasnili raznolikost proteinov. Prva hipoteza pravi, da so virusi zaradi raznolikosti bakterijskih tipov CRISPR/Cas morali razviti različne mehanizme obrambe. Različni proteini Acr torej predstavljajo prednost, specifično za določeno ekološko nišo. Verjetna je tudi druga hipoteza, ki trdi, da raznolikost struktur in mehanizmov delovanja proteinov Acr zmanjša možnost, da bi bakterija razvila učinkovite anti-anti-CRISPR mehanizme. Skozi evolucijo je torej prišlo do selekcije raznolikih proteinov Acr, ki vsak na svoj način prispevajo k imunosti.

Glede na dejstvo, da večina proteinov Acr ne vsebuje podobnih domen oziroma motivov, lahko torej sklepamo, da nimajo skupnega evolucijskega izvora (Borges in sod., 2017). Nekateri znanstveniki predvidevajo, da so geni *acr* nastali *de novo*. Majhni proteini Acr naj bi nastali naključno, skozi generacije mutacij ali vstavitvev nukleotidov. Slej ko prej naj bi torej prišlo do nastanka proteina, ki bi predstavljal selekcijsko prednost (Pawluk in sod., 2018). Vendar obstaja tudi druga hipoteza, ki predvideva, da so se nekateri proteini Acr razvili iz drugih bakterijskih oziroma virusnih inhibitorjev nukleaz. Cas9 nukleazni domeni HNH in RuvC sta namreč prisotni tudi v drugih bakterijskih proteinih, ki imajo endonukleazno aktivnost. Čeprav so po strukturi drugačni, poznamo številne primere virusnih inhibitorjev bakterijskih restrikcijskih encimov. Skozi evolucijo bi se lahko torej te inhibitorne molekule preoblikovale v proteine Acr (Stanley in Maxwell, 2018; Trasanidou in sod., 2019). Na vprašanje, kako so proteini Acr nastali, sicer ne moremo odgovoriti, a lahko vseeno zaključimo, da so se razvili iz različnih virov ter po raznolikih evolucijskih poteh.

Glede na to, da so raziskave *in vivo* CRISPR/Cas aktivnosti pokazale, da lahko bakterija viruse, ki jo napadejo, uniči v le dveh minutah (Trasanidou in sod., 2019), lahko sklepamo, da geni *acr* virusom zagotavljajo imunost na nivoju populacije in ne posameznika. Potrebno je namreč preseči kritično koncentracijo proteinov Acr za učinkovito inhibicijo bakterijske obrambe. Prva skupina virusov, ki bo okužila bakterijo, najbrž ne bo uspela zaključiti življenjskega cikla in se razmnožiti, saj se bo bakterija uspešno obranila. Vendar bodo virusi, ki vsebujejo gene *acr*, hkrati tudi omogočili proizvodnjo proteinov Acr ter tako pripravili ugoden teren za naslednjo skupino virusov, ki bodo nato uspešno okužili imunosupresirano bakterijo (Borges in sod., 2018). Kot pri mnogih drugih primerih iz narave lahko vidimo, da je za preživetje populacije nujno sodelovanje med posameznimi organizmi.

Čeprav se večina raziskav osredotoča na proteine Acr iz bakteriofagov, so gene *acr* odkrili tudi v virusih, katerih gostitelji so arheje. Sistemi CRISPR/Cas bakterij in arhej so si zelo podobni. Glede na to, da vsebuje kar 90 % poznanih genomov arhej zapis za CRISPR/Cas, so se morali virusi prilagoditi tudi na obrambo arhej. He in sod. (2018) so prvi odkrili gen *acrI-DI* v genskem zapisu dveh litičnih virusih, SIRV2 in SIRV3.

3.5 ALI OBSTAJA ANTI-ANTI-CRISPR?

Znano evlucijsko dejstvo je, da se morajo organizmi nenehno prilagajati in razvijati nove načine obrambe, če želijo ostati konkurenčni v boju proti parazitom. Koevolucija virusov in bakterij je proces, ki se nenehno odvija. Predvidevamo, da obstajajo vsaj štirje možni mehanizmi, ki omogočajo bakterijam, da onemogočijo delovanje virusnih proteinov Acr in tako ohranijo aktivnost CRISPR/Cas.

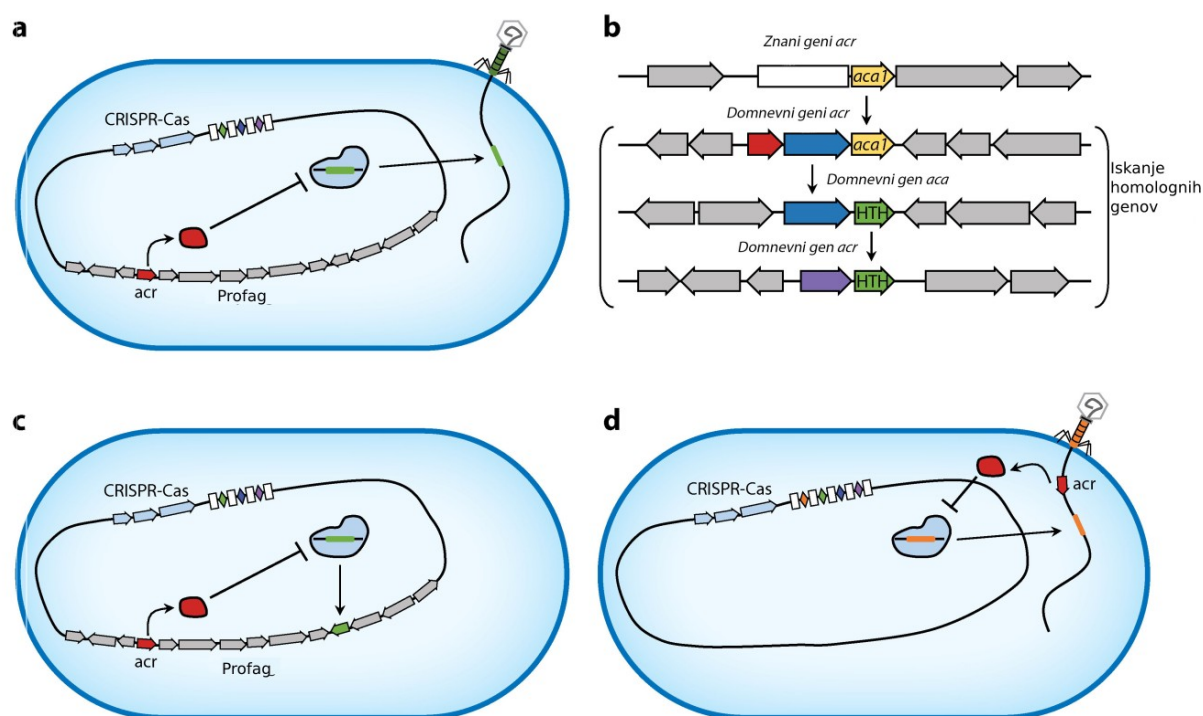
Ker so proteini Acr večinoma specifični glede na (pod)tip CRISPR/Cas, lahko bakterija v svojem genomu vsebuje zapis za različne sisteme CRISPR/Cas. 6 % bakterij naj bi imelo v svojih genomih zapis za več kot en (pod)tip CRISPR/Cas (Stanley in Maxwell, 2018). Kot primer lahko navedemo bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*, ki se lahko pred virusi obrani s pomočjo CRISPR/Cas tipa I-E in I-F (Pawluk in sod., 2016b; Trasanidou in sod., 2019). A virusi se lahko ponovno prilagodijo tako, da v svojem genomu nosijo zapis za več genov *acr* ali pa razvijejo proteine Acr, ki lahko inhibirajo več različnih sistemov CRISPR/Cas.

Večina proteinov Acr se veže na specifično mesto na proteinih Cas. Bakterije lahko torej mutirajo vezavna mesta na proteinih Cas in tako preprečijo vezavo proteinov Acr. Pawluk in sod. (2014) so pokazali, da nekateri proteini Acr ne inhibirajo sorodnih sistemov CRISPR/Cas enako učinkovito, čeprav so si proteini Cas, ki jih virusne molekule inhibirajo, zelo podobni. Vendar raziskave, ki bi sistematično raziskale vpliv mutacij v proteinih Cas, še ne obstajajo (Borges in sod., 2017). Poleg tega bakterije ne morejo vedno mutirati mest interakcije proteinov Cas in Acr, saj se proteini Acr pogosto vežejo v aktivna mesta domen, ki so nujna za aktivnost proteinov Cas, na primer v nukleazni domeni HNH in RuvC na Cas9, ki vršita nukleazno aktivnost pri sistemih CRISPR/Cas tipa II.

Bakterije lahko tudi povišajo izražanje genov *cas*. Če se v celici nahaja več kopij proteinov Cas, proteini Acr ne morejo preprečiti aktivnosti vseh molekul Cas. Zanimivo bi bilo raziskati, ali lahko prisotnost proteinov Acr v bakteriji inducira čezmerno izražanje genov *cas*. Čeprav bi bila lahko višja raven sinteze proteinov Cas učinkovit način za ohranitev bakterijske imunosti, pa je znano, da čezmerno izražanje genov lahko predstavlja veliko breme za celico in ima citotoksičen učinek (Borges in sod., 2017).

Verjetno obstajajo tudi proteini oziroma druge molekule, ki neposredno inhibirajo delovanje proteinov Acr, tako imenovani anti-anti-CRISPR. Ti anti-Acr bi se lahko vezali na proteine Acr in tako preprečili njihovo vezavo na proteine Cas oziroma sprožili razgradnjo proteinov Acr. Prav tako bi lahko delovali kot transkripcijski faktorji in inhibirali izražanje proteinov Acr z vezavo na promotorje genov *aca* oziroma *acr* (Borges in sod., 2017).

4 ODKRIVANJE NOVIH PROTEINOV Acr



Slika 2: Metode odkrivanja novih proteinov Acr (Stanley in Maxwell, 2018)

4.1 FUNKCIONALNI TESTI

S funkcionalnimi testi preverjamo, ali so virusi sposobni okužiti bakterijo in v njej zaključiti svoj življenjski cikel. Najenostavnejša je metoda štetja plakov, pri kateri ustrezno redčitev bakteriofagov naneseemo na bakterijsko kulturo v petrijevki. Virus, ki so uspešno okužili bakterijo in se v njej namnožili, sprožijo lizo celice in okužijo tudi sosednje bakterije. Na mestih, kjer se nahajajo okužene bakterije, se pojavijo plaki, ki jih lahko vidimo s prostim očesom ali pa pod optičnim mikroskopom. Če opazimo plake po inkubaciji virusov z bakterijami, ki imajo delujoč sistem CRISPR/Cas, lahko torej sklepamo, da je prišlo do inhibicije bakterijskih obrambnih mehanizmov. Z nadaljnjimi raziskavami lahko nato preverimo, kateri mehanizem je odgovoren za opaženi pojav.

Z uporabo funkcionalnih testov so Bondy-Denomy in sod. (2013) odkrili prvih pet proteinov Acr v bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*. Testirali so sposobnost virusov, da tvorijo plake v bakterijskih kulturah, ki so bile okužene z različnimi profagi (Slika 2a). Opazili so, da lahko virusi tvorijo plake v nekaterih bakterijah, ki imajo v genomu profage. Primerjali so, kako se genomi lizogenih bakteriofagov, ki so povzročili dovzetnost bakterij za okužbo z virusi, razlikujejo od genomov sorodnih virusov, ki niso inhibirali bakterijske obrambe. Tako so odkrili pet različnih proteinov, ki inhibirajo delovanje sistema CRISPR/Cas.

Hynes in sod. (2017) so na podoben način odkrili protein AcrIIA5. Njihov pristop se razlikuje le v tem, da so za poskuse uporabili bakterijo *Streptococcus thermophilus*, katere genom ni vseboval profagov. Testirali so torej, ali imajo litični virusi, s katerimi so okužili bakterijo, zapis za proteine Acr in s tem sposobnost, da se izognejo uničenju s strani bakterij (Slika 1d).

Če želimo uporabiti zgoraj opisani metodi, moramo poznati sorodne viruse, ki niso sposobni utišati bakterijske imunosti, da lahko s poravnavo genomov najdemo kandidatne gene. Če sorodnih virusov ne poznamo, lahko uporabimo metodo, pri kateri opazujemo izgubo genov *acr* v virusih, ki jih gojimo v bakterijah brez aktivnega sistema CRISPR/Cas. Geni *acr* so pomožni geni, kar pomeni, da niso nujni za dopolnitev življenjskega cikla v virusu, če gostitelj ne vsebuje sistema CRISPR/Cas. He in sod. (2018) so opazili, da se virus SIRV2 lahko uspešno razmnožuje v arheji *Sulfolobus islandicus* LAL14/1, čeprav le-ta vsebuje funkcionalen sistem CRISPR/Cas. Virus SIRV2 so nato gojili v arheji, ki nima CRISPR/Cas in našli mutanta, ki ni mogel več okužiti arheje z aktivnim sistemom CRISPR/Cas. Prišlo je namreč do izbrisa 4 kbp dolgega genomskega odseka, ki je med drugim vseboval tudi zapis za protein AcrID1. Slabost te metode je, da je zelo zamudna, prav tako pa kot ostali funkcionalni testi ne omogoča uporabe visoko zmogljivih pregledovalnih metod.

4.2 UPORABA BIOINFORMATSKIH PRISTOPOV

4.2.1 Iskanje z Acr povezavih proteinov (Aca) (metoda »guilt-by association«)

Ker večina proteinov Acr nima skupnih domen ali motivov, v bazah podatkov ne moremo poiskati še neodkritih proteinov Acr na podlagi že znanih genov *acr*. Čeprav so proteini Acr zelo raznoliki, se v bližini večine genov *acr* nahajajo visoko ohranjeni z Acr asociirani geni (*aca*) (Slika 2b). Poznamo 7 družin genov *aca*, za vse pa je značilna struktura vijačnica-zavojevijačnica (HTH). Z iskanjem genov, ki so homologni že znanim genom *aca*, lahko najdemo organizme, v katerih se verjetno nahajajo tudi geni *acr*. Geni *acr* se navadno nahajajo v bližini genov *aca* v smeri proti 5' koncu in so manjši od 200 aminokislin (Pawluk in sod., 2016b, 2016a; Borges in sod., 2017). Metoda, imenovana »guilt by association«, se je izkazala za zelo učinkovito, saj so z njo odkrili kar 26 od 45 znanih družin proteinov Acr. Vseeno pa moramo za iskanje novih genov *acr* uporabiti tudi druge metode, saj niso vsi asociirani z (že znanimi) geni *aca*.

4.2.2 Vmesniki, ki ciljajo lastni genski zapis in povezani geni *acr*

Kar 18 % organizmov, ki imajo sistem CRISPR/Cas, naj bi v lokusu CRISPR vsebovalo vmesnike, ki so identični odseku njihove lastne DNA. Bakterije morajo torej najti način, da preprečijo dvoveržno cepitev lastne DNA, ki bi bila zanje usodna. Možne rešitve so lahko mutacija zaporedja PAM, mutacija vmesnika ali tarčnega zaporedja ter izguba oziroma inaktivacija CRISPR/Cas (Stern in sod., 2010). Rauch in sod. (2017) so v NCBI bazi podatkov poiskali CRISPR vmesnike, ki ciljajo na lastni genski zapis in so potencialno

smrtonosni za bakterijo. Pregledali so, ali genomi bakterij, ki so jih našli na ta način, vsebujejo potencialne gene *acr* (Slika 2c). Medtem ko je le 6 % genomov bakterij vrste *Neisseria meningitidis* vsebovalo potencialne gene *acr*, pa je pri bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* in *Listeria monocytogenes* delež genomov s potencialnimi geni *acr* presegal 80 %.

4.2.3 Nepopolni sistem CRISPR/Cas

Čeprav najdemo sistem CRISPR/Cas pri kar 90 % arhej in 50 % bakterij, pa obstaja vprašanje, koliko od teh sistemov je dejansko aktivnih in zmožnih, da uničijo tuje nukleinske kisline (Borges in sod., 2017). Z bioinformatičnimi pristopi so ugotovili, da je kar 12 % bakterijskih CRISPR/Cas nepopolnih ali pa da vsebujejo mutacije, ki verjetno negativno vplivajo na učinkovitost obrambnega mehanizma (Makarova in sod., 2015). Če ima bakterija v svojem genomu gen *acr*, ki inhibira delovanje sistema CRISPR/Cas, s CRISPR povezani geni ne predstavljajo več selekcijske prednosti, saj sistem ni več aktiven. Ker selekcijskega pritiska za ohranitev teh genov ni več, se v njih nakopičijo mutacije oziroma izgube odsekov DNA. Ker torej obstaja velika verjetnost, da bakterije z nepopolnim CRISPR/Cas vsebujejo tudi gene *acr*, lahko z analizo genomov teh bakterij najdemo nove potencialne gene *acr*.

4.3 ISKANJE V METAGENOMSKIH KNJIŽNICAH

Uribe in sod. (2019) so razvili visokozmogljivo pregledovalno metodo, s pomočjo katere lahko najdemo gene *acr*, ki so prisotni v organizmih, katerih genski zapis se nahaja v testiranem vzorcu, ki smo ga vzeli iz okolja. Izolirano DNA razrežemo na manjše dele in jo vstavimo v plazmid, s katerim transformiramo bakterije. Ogrodje plazmida vsebuje selekcijski gen (na primer gen za odpornost na antibiotike) in protovmesnik. Bakterije bodo tako obdržale le plazmide, ki vsebujejo zapis za gene *acr*. Z gojenjem bakterij na gojišču, ki vsebuje antibiotike, izberemo tiste bakterije, ki so plazmid obdržale. Bakterijski plazmid nato izoliramo, določimo zaporedje in odkrijemo potencialne gene *acr*.

4.4 PROTEINSKI INŽENIRING

V naravi lahko najdemo le omejeno število proteinov Acr. S spreminjanjem strukture proteinov lahko dobimo proteine z višjo stabilnostjo, močjo inhibicije in širšim spektrom delovanja. Z metodami usmerjene evolucije, kot sta naključna mutagenaza in rekombinacija zaporedij proteinov, pridobimo nove oblike že znanih proteinov, katerih natančne strukture in mehanizma delovanja sicer ne poznamo. Vendar zaradi pomanjkanja načinov za selekcijo proteinov Acr z zelenimi lastnostmi v velikem merilu te metode žal niso učinkovite.

Lažje izvedljiva je selekcija *in silico* načrtovanih proteinov. Kadar poznamo strukturo, položaj aktivnih mest in mehanizem delovanja proteinov Acr, lahko z racionalnim načrtovanjem spremenimo aminokislino v aktivnem mestu in z računalniškimi simulacijami

predvidimo lastnosti novega proteina. Tako bi lahko z mutacijo proteina Acr tipa I pridobili inhibitorje sorodnega tipa III, ki jih zaenkrat še ne poznamo.

4.5 METODE ZA DOLOČITEV ANTI-CRISPR AKTIVNOSTI

Najdene potencialne proteine Acr moramo nato testirati, da se prepričamo o njihovi aktivnosti. Za to je potreben razvoj metod, ki nam omogočajo hitro, enostavno in kvantitativno testiranje aktivnosti proteinov Acr v velikem merilu. Pogosto uporabljane metode so navedene v preglednici 2.

Preglednica 2: Metode za določitev anti-CRISPR aktivnosti

Metoda	Opis metode	Prednosti	Slabosti	Vir
Test cepitve DNA <i>in vitro</i>	In vitro sistem vsebuje Cas9 + sgRNA + dsDNA z zaporedjem PAM in protovmesnikom → po inkubaciji ločimo necepljeno in cepljeno DNA z elektroforezo	Enostavna metoda	Kvalitativni rezultati	(Dong in sod., 2017)
Funkcionalni testi	Inkubacija bakterije s sistemom CRISPR/Cas in virusi → metoda štetja plakov	Testiranje <i>in vivo</i> , najboljši približek nativnega okolja	Nizka zmogljivost	(Bondy-Denomy in sod., 2013)
<i>In vivo</i> test aktivacije gena z dCas9	dCas9, spojen z aktivacijsko domeno v odsotnosti proteinov Acr inducira izražanje reporterskega gena → v prisotnosti proteina Acr je vezava dCas9 na tarčni promotor inhibirana → reporterski gen se ne izraža	Možnost kvantifikacije aktivnosti	Kompleksna metoda	(Nakamura in sod., 2019)
TXTL (brezcelični sistem za transkripcijo in translacijo)	Izražanje Cas9 + sgRNA + GFP s protovmesnikom + protein Acr v pufru → izražanje reporterskega gena (GFP) sorazmerna s CRISPR aktivnostjo	Visoka zmogljivost, kvantitativna	Drugačno okolje kot v živih celicah	(Marshall in sod., 2018)
Test učinkovitosti transformacije	Testiranje uspešnosti transformacije bakterije s plazmidom, ki vsebuje potencialni gen <i>acr</i> , protovmesnik in gen za odpornost na antibiotik → selekcija bakterij, ki so sprejele plazmid na gojišču z dodanim antibiotikom	Visoka zmogljivost	Kvalitativni rezultati	(Uribe in sod., 2019)

5 UPORABA V BIOTEHNOLOGIJI

Tehnologija CRISPR velja za eno ključnih odkritij na področju biotehnologije v zadnjih letih, saj nam omogoča enostavno, učinkovito in poceni spreminjanje genskega zapisa. Odkritje proteinov Acr prinaša številne možnosti za nadzor delovanja CRISPR/Cas. Proteine Acr v kombinaciji s sistemom CRISPR/Cas lahko potencialno uporabimo na različnih področjih biotehnologije, pri čemer velja omeniti predvsem možnost časovno-prostorskega nadzora

izražanja genov, izboljšanje varnosti uporabe genske terapije in deaktivacijo endonukleazne aktivnosti za zmanjšanje možnosti pojava izventarčnih mutacij.

Najpogosteje se za genski inženiring uporablja prilagojen sistem CRISPS/Cas tipa II, saj je nukleoproteinski kompleks, ki je odgovoren za cepitev DNA, sestavljen le iz proteina Cas9, crRNA in tracrRNA. Da bi bil sistem še preprostejši, nadomestimo crRNA in tracrRNA z eno samo molekulo sgRNA (enojna vodeča RNA) (Pawluk in sod., 2016a; Nakamura in sod., 2019). Najbolj raziskan protein Cas9 je bil izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), ki vsebuje CRISPR/Cas podtipa II-A. Znanih je 10 družin proteinov Acr, ki lahko inhibirajo delovanje CRISPR/Cas podtipa II-A in 5 družin inhibitorjev sorodnega CRISPR/Cas podtipa II-C (Trasanidou in sod., 2019). Izmed njih so najbolj raziskani AcrIIA2, AcrIIA3, AcrIIA4 in AcrIIC1.

Najbolj učinkovita za inhibicijo SpyCas9 sta se izkazala AcrIIA2 in AcrIIA4. AcrIIA2 deluje bolje v kvasovkah, medtem ko se AcrIIA4 bolje obnese v sesalskih celicah (Li in sod., 2018; Nakamura in sod., 2019). Tako AcrIIA2 kot AcrIIA4 preprečita vezavo Cas9 na tarčno zaporedje. Po drugi strani pa AcrIIC1 inhibira delovanje Cas9, tako da se veže v nukleazno domeno HNH na Cas9 in onemogoči njegovo nukleazno aktivnost (Harrington in sod., 2017). Čeprav tudi AcrIIA3 učinkovito inhibira CRISPR/Cas, pa se je izkazalo, da je toksičen za bakterije in kvasovke (Rauch in sod., 2017; Nakamura in sod., 2019). Mehanizem toksičnosti ni poznan, citotoksičen učinek drugih proteinov Acr pa zaenkrat še ni bil opažen.

Uporaba proteinov Acr ima številne prednosti pred uporabo drugih metod za inhibicijo Cas9, kot so na primer uporaba deaktiviranega Cas9 (dCas9) (Nakamura in sod., 2019), kemijska indukcija aktivnosti Cas9 (Zetsche in sod., 2015) ali pa aktivacija s svetlobo (Polstein in Gersbach, 2015). Prvič, proteini Acr so izraženi kot samostojni proteini in ne potrebujejo fuzije s Cas9 oziroma dCas9. Iz tega sledi, da lahko nadzorujemo čas in stopnjo izražanja ter celično lokacijo proteinov ločeno od nukleaze. Drugič, proteini Acr so relativno majhni, saj večinoma vsebujejo le 50 do 150 aminokislin. Ker so tako majhni, lahko z difuzijo potujejo skozi jedrne pore in torej ne potrebujejo dodatnega jedrnega lokalizacijskega zaporedja (NLS), ki bi vplivala na njihovo aktivnost. Prav tako je njihova sinteza hitra in učinkovita. Tretjič, za dodatno spremembo aktivnosti jih lahko spojimo s proteinskimi domenami, kot so na primer fluorescentni proteini ali (de)aktivacijske domene. Četrtoč, stopnjo njihove aktivnosti lahko enostavno nadziramo s spreminjanjem koncentracije proteinov Acr (Basgall in sod., 2018). Poleg tega se je izkazalo, da lahko proteini Acr inhibirajo tudi sistem CRISPR/Cas, izražen v drugih celicah, kot so kvasovke (Li in sod., 2018) in sesalske celične linije, vključno z dobro poznano človeško celično linijo HEK293T in induciranimi pluripotentnimi celicami (Liu in sod., 2018; Nakamura in sod., 2019).

5.1 ZMANJŠANJE MOŽNOSTI POJAVA IZVENTARČNIH MUTACIJ

Veliko omejitev pri uporabi tehnike CRISPR/Cas predstavlja možnost pojavljanja izventarčnih mutacij. Za cepitev DNA namreč ni potrebno popolno ujemanje med crRNA in protovmesnikom. Ker se verjetnost izventarčnih mutacij poveča, če je sistem CRISPR aktiven dalj časa (Dong in sod., 2018), je ena izmed možnosti za rešitev težave časovna omejitev delovanja nukleazne aktivnosti. Proteine Acr lahko uporabimo kot izklopno stikalo, ki ob specifičnem signalu ustavi aktivnost nukleaze Cas. Poleg tega lahko z izražanjem genov *acr* zaščitimo celico pred namernim ali nenamernim spreminjanjem (Nakamura, 2019). Proteini Acr predstavljajo dodatno varovalo, ki zmanjša pojavljanje izventarčnih mutacij. Vendar obstajajo tudi druge metode, kot sta povezava z nukleazami FokI in sprememba strukture sgRNA oziroma Cas9 (Kimberland in sod., 2018), ki so bolj učinkovite.

5.2 TKIVNO SPECIFIČNO NADZOROVANJE CRISPR/Cas AKTIVNOSTI

Preciznost in tkivna specifičnost sta še posebej pomembni pri uporabi CRISPR/Cas za namene genske terapije, saj napačna lokacija in predolgo izražanje povzročata izventarčne učinke. Z uporabo proteinov Acr lahko dosežemo časovno, prostorsko in pogojno nadzorovanje delovanje CRISPR/Cas. S specifičnimi regulatornimi elementi in induktorji lahko dosežemo specifičnost genskega inženiringa na nivoju tkiva, celičnega cikla ali razvojne stopnje. Kljub vsemu pa bodo pred uporabo v klinične namene potrebne še dodatne študije, ki bodo ovrednotile potencialni toksični učinek prisotnosti proteinov Acr v človeškem telesu.

Hoffmann in sod. (2019) so zasnovali z miRNA reguliran protein AcrIIA4 in dosegli celično specifično urejanje genoma v hepatocitih in kardiomiocitih. Cas9 so izrazili v vseh celicah. V 3'UTR regijo gena *acrIIA4* so vstavili tarčna mesta za miR-122 in miR-1, ki sta specifično izraženi v jetrih oziroma srčnih mišičnih celicah. V teh celicah je bilo torej izražanje proteinov Acr utišano in Cas9 je bil aktiven. Sistem je hiter, učinkovit in natančen.

5.3 NADZOR UPORABE dCas9

Z mutacijama D10A in H840A protein Cas9 izgubi nukleazno aktivnost in tako postane deaktivirani Cas9 (dCas9). dCas9 se še vedno veže na tarčno DNA, a je ne cepi. dCas9 lahko spojimo s pomožnimi oziroma regulatornimi molekulami ter tako dosežemo specifično aktivacijo oziroma represijo genov, epigenetsko modifikacijo DNA ali pa vizualizacijo specifičnih delov DNA (Stanley in Maxwell, 2018). Z uporabo AcrIIA4, ki prepreči tvorbo stabilne R zanke in tako inhibira vezavo dCas9 na tarčno DNA, lahko torej nadzorujemo vezavo dCas9 na DNA (Pawluk in sod., 2016a).

Liu in sod. (2018) so uspešno uporabili dCas9 za zdravljenje sindroma krhkega kromosoma X (FXS), ki ga povzroča utišanje gena *fmr1* zaradi hipermetilacije ponovitev CGG v regiji 5'

UTR gena *FMRI*. dCas9 so spojili z demetilacijsko domeno in ga testirali v človeški celični liniji. Demetilacija CGG ponovitev je aktivirala gen *FMRI*, kar kaže, da bi bila lahko to učinkovita terapija. Da bi preprečili izventarčne učinke in epigenetske spremembe v drugih regijah genoma, so delovanje dCas9 po 2 tednih utišali z indukcijo gena *acrIIA4*.

5.4 KONTROLA IN INHIBICIJA TEHNIKE GENSKEGA PORIVA V OKOLJU

Tehnika genskega poriva je tehnika, ki se uporablja v genskem inženirstvu, in omogoča, da se želeni gen pri vrstah, ki se razmnožujejo spolno, prenese na naslednjo generacijo v več kot 50 % primerov (Hammond in sod., 2017). Tehnika genskega poriva se je izkazala za učinkovit način za kontrolo insektov, ki so prenašalci bolezni (Hammond in sod., 2016). Največji zadržki glede uporabe tehnike so na področjih razvoja odpornosti proti genskemu porivu v naravni populaciji z akumulacijo mutacij na tarčnem mestu (Hammond in sod., 2017), biovarnosti in mnenja javnosti (Basgall in sod., 2018). Poleg tega ne moremo predvideti, kakšne bodo posledice izginotja določene vrste za ravnovesje v ekosistemu.

Da bi inhibirali delovanje tehnike genskega poriva, lahko uporabimo proteine Acr, ki inhibirajo delovanje nukleaze Cas9. Basgall in sod. (2018) so uporabili AcrIIA2 in AcrIIA4 in uspešno inhibirali genski poriv v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*.

5.5 BAKTERIOFAGNO ZDRAVLJENJE

Vedno večja razširjenost bakterij, ki so odporne proti antibiotikom, je zaskrbljujoča in kliče po razvoju alternativnih metod zdravljenja bakterijskih okužb. Alternativno metodo predstavlja terapija z bakteriofagi. Veliko težavo pri zdravljenju z bakteriofagi predstavlja pridobitev bakterijske odpornosti proti bakteriofagom, saj bakterije v lokus CRISPR lahko vgradijo vmesnik, specifičen za uporabljen virus. Iskanje novih bakteriofagov je zamudno, saj so le-ti visoko specifični. Da ne bi bilo potrebno iskati novih bakteriofagov, bi lahko v viruse vključili gene *acr* in tako uporabili znane viruse za terapijo.

5.6 SELEKCIJA GENSKO SPREMENJENIH VIRUSOV

Kljub temu da ogromno orodij za genski inženiring, kot so CRISPR/Cas, restriksijski encimi in sistemi rekombinacije, izhaja iz raziskav na področju virusov, pa je razvitih le nekaj orodij za gensko spreminjanje virusov (Hupfeld in sod., 2018). Predvsem je problem pomanjkanje selekcijskih označevalcev. Ena izmed rešitev je uporaba gena *acr* kot selekcijskega označevalca. Če uporabljamo metode genskega inženiringa, ki temeljijo na homologi rekombinaciji, lahko zraven genetskega elementa, ki ga želimo vstaviti v virusni genom, vključimo tudi gen *acr*. Selekcijo uspešno spremenjenih virusov nato izvedemo v bakteriji z aktivnim sistemom CRISPR/Cas. Preživeli bodo torej le virusi, pri katerih je prišlo do homologne rekombinacije in so tako v svoj genom vgradili gen *acr*. Izbrani virusni mutanti

bodo koristni za prihodnje funkcionalne študije, vključno z iskanjem novih proteinov Acr (Mayo-Muñoz in sod., 2018).

5.7 UČINKOVITEJŠA NASPROTNA SELEKCIJA (ANGL. »COUNTER SELECTION«)

Metoda nasprotne selekcije, pri kateri uporabljamo CRISPR/Cas9, se uporablja za selekcijo gensko spremenjenih prokariontskih celic. Potem ko smo uporabili metodo genskega inženiringa, induciramo izražanje Cas9 in sgRNA, ki je homologna divjemu tipu nukleotidnega zaporedja. Cas9 tako cepi divji tip DNA in povzroči smrt vseh bakterij, v katerih ni prišlo do mutacije. Problem pri opisanem načinu selekcije predstavlja možnost, da kljub odsotnosti induktorja pride do izražanja CRISPR/Cas9, še preden je prišlo do mutacije bakterijske DNA. Z uporabo proteinov Acr lahko tako zagotovimo dodatno varovalo, ki bo preprečilo prezgodnjo izražanje Cas9.

6 ZAKLJUČEK

Koevolucija virusov in bakterij je konstanten proces, v katerem se morata tako parazit kot gostitelj nenehno razvijati in prilagajati, če želita ostati konkurenčna. Alica je v knjigi Lewisa Carrolla V ogledalu skoraj v trenutku izgubila izpred oči Rdečo kraljico, ko se je po dolgem dirjanju na mestu utrudila in sedla na tla. Ne virusi ne bakterije si ne morejo privoščiti počitka. Poznavanje interakcij in molekularnih mehanizmov v bitki med virusi in bakterijami nam hkrati tudi omogoča, da bolje razumemo mehanizme med virusi in njihovimi gostitelji. Ker so virusi tudi pomembni človeški patogeni, bi boljše razumevanje virusnih mehanizmov lahko privedlo do novih in bolj učinkovitih metod zdravljenja.

Za odkrivanje novih tipov proteinov Acr se je kot najbolj učinkovit sistem izkazala uporaba bioinformatičnih pristopov. Odkrivamo vedno več molekul z anti-CRISPR delovanjem, vendar jih je za dejansko uporabo potrebno testirati in izbrati tiste z največjo oziroma želeno aktivnostjo, specifičnostjo in nizko potencialno stopnjo citotoksičnosti. Razviti moramo torej enostavne in učinkovite metode, ki nam bodo omogočile testiranje odkritih proteinov v velikem merilu. Potrebno je tudi preveriti, ali imajo proteini Acr še druga tarčna mesta v celicah.

Uporaba za raziskovalne namene ima vsekakor velik potencial. Kaj pa klinične aplikacije? Na tem področju nas čaka še veliko dela, saj moramo raziskati mehanizme, toksičnost in morebitne stranske učinke uporabe proteinov Acr tako v človeških celičnih linijah kot v kliničnih študijah. Konec koncev je naš glavni cilj razvoj terapij, ki bodo specifične, učinkovite in predvsem varne.

7 VIRI

- Basgall E.M., Goetting S.C., Goeckel M.E., Giersch R.M., Roggenkamp E., Schrock M.N., Halloran M., Finnigan G.C. 2018. Gene drive inhibition by the anti-CRISPR proteins AcrIIA2 and AcrIIA4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 164, 4: 464-474
- Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K.L., Davidson A.R. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493, 7432: 429-432
- Bondy-Denomy J., Davidson A.R., Doudna J.A., Fineran P.C., Maxwell K.L., Moineau S., Peng X., Sontheimer E.J., Wiedenheft B. 2018. A Unified Resource for Tracking Anti-CRISPR Names. *The CRISPR Journal*, 1, 5: 304-305
- Borges A.L., Davidson A.R., Bondy-Denomy J. 2017. The Discovery, Mechanisms, and Evolutionary Impact of Anti-CRISPRs. *Annual Review of Virology*, 4, 1: 37-59
- Borges A.L., Zhang J.Y., Rollins M.F., Osuna B.A., Wiedenheft B., Bondy-Denomy J. 2018. Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. *Cell*, 174, 4: 917-925
- Bryson A.L., Hwang Y., Sherrill-Mix S., Wu G.D., Lewis J.D., Black L., Clark T.A., Bushman F.D. 2015. Covalent Modification of Bacteriophage T4 DNA Inhibits CRISPR-Cas9. *mBio*, 6, 3: doi: 10.1128/mBio.00648-15: 9 str.
- Chowdhury S., Carter J., Rollins M.F., Golden S.M., Jackson R.N., Hoffmann C., Nosaka L., Bondy-Denomy J., Maxwell K.L., Davidson A.R., Fischer E.R., Lander G.C., Wiedenheft B. 2017. Structure Reveals Mechanisms of Viral Suppressors that Intercept a CRISPR RNA-Guided Surveillance Complex. *Cell*, 169, 1: 47-57
- Dong C., Hao G.-F., Hua H.-L., Liu S., Labena A.A., Chai G., Huang J., Rao N., Guo F.-B. 2018. Anti-CRISPRdb: a comprehensive online resource for anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*, 46, D1: 393-398
- Dong D., Guo M., Wang S., Zhu Y., Wang S., Xiong Z., Yang J., Xu Z., Huang Z. 2017. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 546, 7658: 436-439
- Fagerlund R.D., Ferguson T.J., Maxwell H.W.R., Opel-Reading H.K., Krause K.L., Fineran P.C. 2019. Reconstitution of CRISPR adaptation in vitro and its detection by PCR. *Methods in Enzymology*, 616: 411-433
- Fineran P.C., Gerritzen M.J.H., Suarez-Diez M., Kunne T., Boekhorst J., van Hijum S.A.F.T., Staals R.H.J., Brouns S.J.J. 2014. Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 16: 1629-1638
- Guo T.W., Bartesaghi A., Yang H., Falconieri V., Rao P., Merk A., Eng E.T., Raczkowski A.M., Fox T., Earl L.A., Patel D.J., Subramaniam S. 2017. Cryo-EM Structures Reveal Mechanism and Inhibition of DNA Targeting by a CRISPR-Cas Surveillance Complex. *Cell*, 171, 2: 414-426
- Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A., Windbichler N., Crisanti A., Nolan T. 2016. A

- CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34, 1: 78-83
- Hammond A.M., Kyrou K., Bruttini M., North A., Galizi R., Karlsson X., Kranjc N., Carpi F.M., D'Aurizio R., Crisanti A., Nolan T. 2017. The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. *PLOS Genetics*, 13, 10: doi: 10.1371/journal.pgen.1007039: 16 str.
- Harrington L.B., Doxzen K.W., Ma E., Liu J.-J., Knott G.J., Edraki A., Garcia B., Amrani N., Chen J.S., Cofsky J.C., Kranzusch P.J., Sontheimer E.J., Davidson A.R., Maxwell K.L., Doudna J.A. 2017. A Broad-Spectrum Inhibitor of CRISPR-Cas9. *Cell*, 170, 6: 1224-1233
- He F., Bhoobalan-Chitty Y., Van L.B., Kjeldsen A.L., Dedola M., Makarova K.S., Koonin E. V., Brodersen D.E., Peng X. 2018. Anti-CRISPR proteins encoded by archaeal lytic viruses inhibit subtype I-D immunity. *Nature Microbiology*, 3, 4: 461-469
- Hoffmann M.D., Aschenbrenner S., Grosse S., Rapti K., Domenger C., Fakhiri J., Mastel M., Börner K., Eils R., Grimm D., Niopek D. 2019. Cell-specific CRISPR-Cas9 activation by microRNA-dependent expression of anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*, 47, 13: doi: 10.1093/nar/gkz271: 15 str.
- Hupfeld M., Trasanidou D., Ramazzini L., Klumpp J., Loessner M.J., Kilcher S. 2018. A functional type II-A CRISPR-Cas system from *Listeria* enables efficient genome editing of large non-integrating bacteriophage. *Nucleic Acids Research*, 46, 13: 6920-6933
- Hynes A.P., Rousseau G.M., Lemay M.-L., Horvath P., Romero D.A., Fremaux C., Moineau S. 2017. An anti-CRISPR from a virulent streptococcal phage inhibits *Streptococcus pyogenes* Cas9. *Nature Microbiology*, 2, 10: 1374-1380
- Ka D., An S.Y., Suh J.-Y., Bae E. 2018. Crystal structure of an anti-CRISPR protein, AcrIIA1. *Nucleic Acids Research*, 46, 1: 485-492
- Kim I., Jeong M., Ka D., Han M., Kim N.-K., Bae E., Suh J.-Y. 2018. Solution structure and dynamics of anti-CRISPR AcrIIA4, the Cas9 inhibitor. *Scientific Reports*, 8, 1: doi: 10.1038/s41598-018-22177-0: 9 str.
- Kimberland M.L., Hou W., Alfonso-Pecchio A., Wilson S., Rao Y., Zhang S., Lu Q. 2018. Strategies for controlling CRISPR/Cas9 off-target effects and biological variations in mammalian genome editing experiments. *Journal of Biotechnology*, 284: 91-101
- Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 5: 317-327
- Li J., Xu Z., Chupalov A., Marchisio M.A. 2018. Anti-CRISPR-based biosensors in the yeast *S. cerevisiae*. *Journal of Biological Engineering*, 12, 11: doi: 10.1186/s13036-018-0101-z: 14 str.
- Liu L., Yin M., Wang M., Wang Y. 2019. Phage AcrIIA2 DNA Mimicry: Structural Basis of the CRISPR and Anti-CRISPR Arms Race. *Molecular Cell*, 73, 3: 611-620
- Liu X.S., Wu H., Krzisch M., Wu X., Graef J., Muffat J., Hnisz D., Li C.H., Yuan B., Xu C., Li Y., Vershkov D., Cacace A., Young R.A., Jaenisch R. 2018. Rescue of Fragile X

- Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell*, 172, 5: 979-992
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E. V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 11: 722-736
- Marshall R., Maxwell C.S., Collins S.P., Jacobsen T., Luo M.L., Begemann M.B., Gray B.N., January E., Singer A., He Y., Beisel C.L., Noireaux V. 2018. Rapid and Scalable Characterization of CRISPR Technologies Using an *E. coli* Cell-Free Transcription-Translation System. *Molecular Cell*, 69, 1: 146-157
- Mayo-Muñoz D., He F., Jørgensen J.B., Madsen P.K., Bhoobalan-Chitty Y., Peng X. 2018. Anti-CRISPR-Based and CRISPR-Based Genome Editing of *Sulfolobus islandicus* Rod-Shaped Virus 2. *Viruses*, 10, 12: doi: 10.3390/v10120695: 17 str.
- Nakamura M., Srinivasan P., Chavez M., Carter M.A., Dominguez A.A., La Russa M., Lau M.B., Abbott T.R., Xu X., Zhao D., Gao Y., Kipniss N.H., Smolke C.D., Bondy-Denomy J., Qi L.S. 2019. Anti-CRISPR-mediated control of gene editing and synthetic circuits in eukaryotic cells. *Nature Communications*, 10, 1: doi: 10.1038/s41467-018-08158-x: 11 str.
- Pawluk A., Bondy-Denomy J., Cheung V.H.W., Maxwell K.L., Davidson A.R. 2014. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 5, 2: doi: 10.1128/mBio.00896-14: 7 str.
- Pawluk A., Amrani N., Zhang Y., Garcia B., Hidalgo-Reyes Y., Lee J., Edraki A., Shah M., Sontheimer E.J., Maxwell K.L., Davidson A.R. 2016a. Naturally Occurring Off-Switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 167, 7: 1829-1838
- Pawluk A., Staals R.H.J., Taylor C., Watson B.N.J., Saha S., Fineran P.C., Maxwell K.L., Davidson A.R. 2016b. Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nature Microbiology*, 1, 8: doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.85: 6 str.
- Pawluk A., Shah M., Mejdani M., Calmettes C., Moraes T.F., Davidson A.R., Maxwell K.L. 2017. Disabling a Type I-E CRISPR-Cas Nuclease with a Bacteriophage-Encoded Anti-CRISPR Protein. *mBio*, 8, 6: doi: 10.1128/mBio.01751-17: 12 str.
- Pawluk A., Davidson A.R., Maxwell K.L. 2018. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 1: 12-17
- Polstein L.R., Gersbach C.A. 2015. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nature Chemical Biology*, 11, 3: 198-200
- Rauch B.J., Silvis M.R., Hultquist J.F., Waters C.S., McGregor M.J., Krogan N.J., Bondy-Denomy J. 2017. Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins. *Cell*, 168, 1-2: doi: 10.1016/j.cell.2016.12.009: 20 str.

- Shin J., Jiang F., Liu J.-J., Bray N.L., Rauch B.J., Baik S.H., Nogales E., Bondy-Denomy J., Corn J.E., Doudna J.A. 2017. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Science Advances*, 3, 7: doi: 10.1126/sciadv.1701620: 10 str.
- Smargon A.A., Cox D.B.T., Pyzocha N.K., Zheng K., Slaymaker I.M., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.A., Essletzbichler P., Shmakov S., Makarova K.S., Koonin E. V., Zhang F. 2017. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Molecular Cell*, 65, 4: 618-630
- Stanley S.Y., Maxwell K.L. 2018. Phage-Encoded Anti-CRISPR Defenses. *Annual Review of Genetics*, 52, 1: 445-464
- Stern A., Keren L., Wurtzel O., Amitai G., Sorek R. 2010. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends in Genetics*, 26, 8: 335-40
- Trasanidou D., Gerós A.S., Mohanraju P., Nieuwenweg A.C., Nobrega F.L., Staals R.H.J. 2019. Keeping CRISPR in check: diverse mechanisms of phage-encoded anti-CRISPRs. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 9: doi: 10.1093/femsle/fnz098: 14 str.
- Uribe R. V., van der Helm E., Misiakou M.-A., Lee S.-W., Kol S., Sommer M.O.A. 2019. Discovery and Characterization of Cas9 Inhibitors Disseminated across Seven Bacterial Phyla. *Cell Host & Microbe*, 25, 2: 233-241
- van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 7: 479-492
- van Houte S., Ekroth A.K.E., Broniewski J.M., Chabas H., Ashby B., Bondy-Denomy J., Gandon S., Boots M., Paterson S., Buckling A., Westra E.R. 2016. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature*, 532, 7599: 385-388
- Vorontsova D., Datsenko K.A., Medvedeva S., Bondy-Denomy J., Savitskaya E.E., Pougach K., Logacheva M., Wiedenheft B., Davidson A.R., Severinov K., Semenova E. 2015. Foreign DNA acquisition by the I-F CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery. *Nucleic Acids Research*, 43, 22: 10848-18060
- Wang J., Ma J., Cheng Z., Meng X., You L., Wang M., Zhang X., Wang Y. 2016. A CRISPR evolutionary arms race: structural insights into viral anti-CRISPR/Cas responses. *Cell Research*, 26, 10: 1165-1168
- Yang H., Patel D.J. 2017. Inhibition Mechanism of an Anti-CRISPR Suppressor AcrIIA4 Targeting SpyCas9. *Molecular Cell*, 67, 1: 117-127
- Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. 2015. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology*, 33, 2: 139-142
- Zhu Y., Zhang F., Huang Z. 2018. Structural insights into the inactivation of CRISPR-Cas systems by diverse anti-CRISPR proteins. *BMC Biology*, 16, 32: doi: 10.1186/s12915-018-0504-9: 11 str.
- Zhu Y., Gao A., Zhan Q., Wang Y., Feng H., Liu S., Gao G., Serganov A., Gao P. 2019. Diverse Mechanisms of CRISPR-Cas9 Inhibition by Type IIC Anti-CRISPR Proteins. *Molecular Cell*, 74, 2: 296-309