

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (3) :251 - 257; 4 March 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140353

## 细菌 CRISPR-Cas 系统功能及其与噬菌体相互作用

傅强, 孙建和, 严亚贤\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240

**摘要:** 近来研究发现, 细菌 CRISPR-Cas 系统在宿主菌抵抗可移动基因元件 (mobile genetic elements, MGEs) 的过程中发挥重要作用。CRISPR-Cas 还参与宿主菌群体行为和毒力基因调控、DNA 修复和基因组进化过程。本文着重综述细菌 CRISPR-Cas 系统的结构、类型、作用机制及其适应性免疫之外的其他功能 (如对内源性基因表达的调控、促进基因组进化、DNA 修复等); 概述噬菌体抵抗 CRISPR-Cas 系统的机制, 并对噬菌体-宿主菌相互作用进行探讨和展望。

**关键词:** 细菌 CRISPR-Cas 系统, 噬菌体, 适应性免疫, 相互作用

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0251-07

细菌和古生菌在不断的进化中获得了编码抵抗噬菌体和其他生物侵袭的多种防御系统<sup>[1-2]</sup>。尽管许多诸如限制修饰系统和噬菌体感染限制系统的防御体系能发挥先天性免疫的功能, 但约有一半的细菌以及大部分的古生菌都拥有 CRISPR-Cas 系统赋予的适应性免疫功能。在过去几十年中, 原核生物中 CRISPR-Cas 适应性免疫系统的发现被认为是微生物学领域最激动人心的进展之一。

CRISPR 全名为成簇的规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), CRISPR 位点包含多个重复序列 (repeats), 长度一般为 20 - 50bp, 中间被通常与外源 DNA 片段匹配的各种间区 (spacer) 分隔开<sup>[3]</sup>。Cas 全称为 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated proteins), 由 CRISPR 序列邻近的 *cas* 基因编码, 具有核酸酶、解旋酶、聚合酶和 RNA 结合蛋白的特征性结构域<sup>[4]</sup>。CRISPR-Cas 系统通过将质粒和噬菌体等外源基因序列整合至 CRISPR 位点, 使宿主获

得针对可移动遗传元件 (mobile genetic elements, MGEs) 的抵抗能力<sup>[5]</sup>。与真核生物中的 RNA 干扰机制类似, CRISPR RNA 前体转录子 (pre-crRNA) 被加工成短的 CRISPR RNA (crRNA), crRNA 能识别并降解携带互补序列 (通常称为前间区) 的 MGEs<sup>[4]</sup>。尽管到目前为止, 所有已发现的 CRISPR-Cas 系统具有一些共同的基本特征, 但不同的系统具体作用机制存在很大的差异<sup>[4,6]</sup>。

自然环境中, 一些古生菌和细菌获得间区的情况时有发生, 而在实验室条件下, 利用不同宿主以及大量的外源 DNA 元件, 科研人员对 CRISPR 适应性免疫机制有了更多了解<sup>[6-8]</sup>。

### 1 CRISPR-Cas 系统的分类

不同的 CRISPR-Cas 系统其作用机制存在差异, 根据 Cas 蛋白类型和 CRISPR 位点构成, Makarova 等提出了一种新的分类方法, 以 Cas1 和 Cas2 基因

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272580, 30571384)

\* 通信作者。Tel: +86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

作者简介: 傅强 (1988 -), 男, 江西吉安人, 博士研究生, 研究方向为噬菌体与细菌互作。E-mail: fqiang9@126.com

收稿日期: 2014-07-08; 修回日期: 2014-09-26

为核心,将 CRISPR-Cas 系统分为 3 个主要及 11 个亚型类型<sup>[4]</sup>。Cas1 和 Cas2 基因在所有的 CRISPR-Cas 系统中均有存在并具有活性,且被认为在适应阶段参与了间隔的整合过程。

**I 型 CRISPR-Cas 系统:**典型的 I 型 CRISPR 位点含有 Cas3 基因,Cas3 基因除编码相关蛋白形成抗病毒 CRISPR 相关复合体 Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence) 外<sup>[9-10]</sup>,还能编码具有独立的解旋酶和 DNA 酶活性的大分子蛋白<sup>[11]</sup>,在干扰阶段发挥重要作用。大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) I 型 CRISPR-Cas 系统的作用机制已有报道<sup>[9-10]</sup>。

**II 型 CRISPR-Cas 系统:**II 型 CRISPR-Cas 系统以 Cas9 为标志蛋白,Cas9 是一种大分子多功能蛋白,有助于 crRNA 的产生,且能靶向并降解噬菌体和质粒 DNA<sup>[11]</sup>。Cas9 蛋白在 crRNA 的成熟和靶标 DNA 的剪切中发挥重要作用,并且反式编码小 RNA (trans-encoded small RNA, tracrRNA) 在其中扮演了导向的角色<sup>[12]</sup>。II 型 CRISPR-Cas 系统包括 II A 和 II B 两个亚型。目前嗜热链球菌 II 型 CRISPR-Cas 系统的功能研究较为清楚,该系统能有效抵抗噬菌体和质粒 DNA 侵袭<sup>[6,11]</sup>。

**III 型 CRISPR-Cas 系统:**III 型 CRISPR-Cas 系统同

样具有标志蛋白 Cas6,Cas6 参与 crRNA 加工过程。此外,III 型 CRISPR-Cas 系统还包含聚合酶和 RAMP (Repeat-associated mysterious protein) 蛋白,RAMP 具有 RNA 酶活性,并参与 crRNA 加工过程。III 型 CRISPR-Cas 系统又被分为 2 个亚型:III A 和 III B,III A 亚型 CRISPR 能靶向外源质粒,表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)的体内实验已有证实<sup>[13]</sup>,且该亚型编码的聚合酶样蛋白 HD 结构域可能参与了对外源 DNA 的剪切<sup>[4]</sup>,而极端嗜高温古生菌激烈火球菌(*P. furiosus*) III B 亚型 CRISPR 则主要针对 RNA<sup>[14]</sup>。

## 2 CRISPR-Cas 系统作用机制

CRISPR-Cas 系统包含两个主要元件:作为催化核心的 Cas 蛋白以及发挥“遗传记忆”功能的 CRISPR 位点<sup>[15]</sup>。CRISPR 序列中含有多个重复序列,这些重复序列被来源于 MGEs 的间隔序列分隔开来。Cas 基因通常毗邻 CRISPR 位点,但也可能位于基因组其他位置。不同的 CRISPR-Cas 系统在序列结构和 Cas 基因构成上各有差异<sup>[4]</sup>。尽管不同 CRISPR-Cas 系统作用机制各不相同,但 3 种类型的 CRISPR-Cas 系统通过 3 个不同阶段:适应、表达和干扰,从而介导针对外源 MGEs 的免疫(图 1.)。该

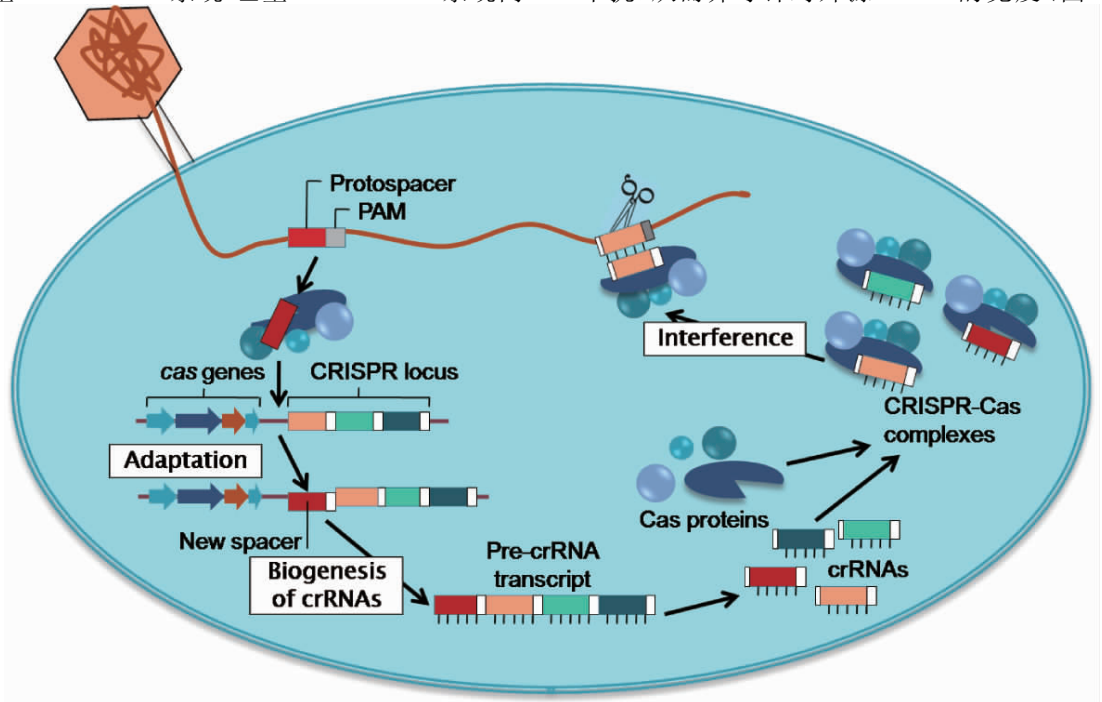


图 1. CRISPR-Cas 系统作用机制示意图<sup>[39]</sup>

过程又可以分为 2 个不同的、半独立的子系统: 即适应阶段包括的高度保守的“信息处理”系统, 以及表达和干扰阶段的“执行”系统。尽管参与信息处理过程的蛋白 (Cas1 和 Cas2) 高度保守, 但执行系统中涉及的蛋白在不同种细菌之间存在显著差异<sup>[16-18]</sup>。

在适应阶段, 来源于病毒或质粒的短 DNA 片段会被整合到 CRISPR 位点中<sup>[6,11]</sup>。噬菌体感染通常导致 CRISPR 位点间区的插入, 其长度约为 30bp, 且一般位于 CRISPR 位点前导序列一侧; 由于是内部插入, 细菌从同一噬菌体获得多个间区的可能性较小。每一次插入活动都伴随着重复序列的复制, 进而形成 1 个新的重复-间区单元, 这使得 CRISPR 位点中存在着此种质粒或噬菌体的序列信息, 这是细菌获得适应性免疫的结构基础<sup>[19]</sup>。侵入的 DNA 片段中前间区 (proto-spacers) 的选择通常由前间区邻近基序 (proto-spacer-adjacent motifs, PAMs) 决定。PAMs 通常只有几个碱基的长度, 且不同 CRISPR-Cas 系统均有差异<sup>[20-21]</sup>。

CRISPR 介导的免疫过程的第 2 阶段是表达阶段, 在此过程中, CRISPR 位点产生较长的初级转录产物, 即 CRISPR RNA (crRNA) 前体 (pre-crRNA), pre-crRNA 随后在 Cas 蛋白等核酸内切酶的作用下被加工成短的 crRNA<sup>[4]</sup>。第 3 个阶段是干扰阶段, 在此期间, 外源 DNA 或 RNA 通过前间区序列被 crRNA 靶向和剪切<sup>[20]</sup>。在大肠杆菌中, Cas3 蛋白的 HD 核酸内切酶结构域能有效催化剪切过程。

### 3 CRISPR-Cas 系统除免疫之外的其他功能

值得注意的是, 在 CRISPR-Cas 系统发挥适应性免疫功能的同时, 还具有其他功能。一些 CRISPR-Cas 系统如大肠杆菌 I-E 型系统, 由于其 Cas 基因被 H-NS (heat-stable nucleoid structuring protein, H-NS) 抑制蛋白沉默<sup>[22]</sup>, 在实验室条件下 CRISPR-Cas 并不被激活<sup>[7]</sup>。在此类菌株中, 只有缺失 H-NS 基因或者过表达 CRISPR-Cas 系统, 才具有抵抗外源 DNA 入侵的能力<sup>[7,9]</sup>。生物信息学分析的结果表明, 相对于其它快速进化的 CRISPR-Cas 系统<sup>[23]</sup>, I-E 型 CRISPR-Cas 系统的进化十分缓慢 (CRISPR 序列在  $10^3 - 10^5$  年间保持不变<sup>[24]</sup>)。重要的是, 这种缓慢的进化过程与病毒和质粒对宿主所施加的强

烈且不断变化的选择压力极为不符<sup>[25]</sup>。此外, 本课题组研究发现, 大肠杆菌菌株 MG1655 和 MC1061 等在溶原感染  $\Phi$ Min27 噬菌体后, 其 CRISPR 位点中间区序列并未发生变化, 暗示 CRISPR-Cas 可能并不发挥相应功能 (未发表资料)。因此, 存在于多种大肠杆菌基因组中的 I-E 型 CRISPR-Cas 系统可能具有除免疫之外的其他功能。

CRISPR-Cas 系统具有除免疫之外其他功能的发现也反映了 RNA 干扰领域的发展。尽管 RNA 干扰起初被认为只参与免疫过程, 但随后的研究证实其参与了多种细胞反应过程, 如基因调控和异染色质形成<sup>[26]</sup>。有研究表明, CRISPR-Cas 系统参与了 *P. aeruginosa* 生物膜形成的调节以及基因组进化过程<sup>[27]</sup>, 同时, CRISPR-Cas 系统也对单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的毒力有影响<sup>[28]</sup>。

#### 3.1 内源性基因调控

除了具有适应性免疫功能, CRISPR-Cas 系统还参与基因表达调控。CRISPR-Cas 系统可介导内源性基因调控, 从而影响细菌的群体行为和毒力。

通过部分匹配进行基因调控: 除 III-B 型系统剪切互补 RNA 外, 大部分的 CRISPR-Cas 系统剪切互补 DNA。因此, 如果 crRNA 与基因组序列互补, 由于核酸内切酶对基因组的剪切, 通常会导致细胞死亡<sup>[29]</sup>。然而, CRISPR-Cas 对基因组的剪切需要 crRNA 与基因组近乎一致的互补, 部分互补则无法进行剪切, 同时这也取决于错配的位置和碱基数量<sup>[30]</sup>。CRISPR-Cas 系统通过部分互补机制进行基因调控, 这一结论在 *P. aeruginosa* 调节运动性和生物膜形成的研究中得到证实<sup>[27,31]</sup>。溶原了 DMS3 噬菌体的铜绿假单胞菌丧失了运动性和生物膜形成能力, 但在 Cas 基因突变株中得到恢复<sup>[31]</sup>。

人类病原空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 编码 II 型 CRISPR-Cas 系统, 在缺失 CRISPR 位点的菌株中表达 Cas9 蛋白, 能增强细菌毒力<sup>[32]</sup>, 这表明 Cas9 蛋白能独立于 CRISPR 转录子发挥功能。此外, *C. jejuni* 的 Cas9 突变株在感染人源细胞时其运动能力增强, 而细胞毒性减弱<sup>[32]</sup>。

通过 RNA 剪切进行基因调控: 尽管大部分的 CRISPR-Cas 系统靶向 DNA, 但 III-B 型编码的 Cmr 复合体通过在体内和体外剪切互补 RNA 发挥作用<sup>[33]</sup>。III-B 型系统降解 RNA 的能力使其参与内源性基因调控成为可能。

### 3.2 基因组进化

除了调节内源性基因表达, CRISPR-Cas 系统还能通过自我靶向 (self-targeting) 对基因组进化产生积极影响。在 CRISPR-Cas 介导的基因组剪切之后, 会导致大规模的基因组重排过程。同时, 由于 CRISPR 序列的重复性, 有研究表明其可能在基因组重排过程中发挥作用。例如, 在大肠杆菌中, CRISPR 重复序列能引起含有 *rpoS* 基因 (应激反应  $\sigma$  因子) 的染色体区域发生复制, 从而提高细菌对高温的适应性<sup>[34]</sup>。基因组重排使得宿主适应能力增强, 这也从侧面反映出, CRISPR-Cas 与细菌基因组进化有关。

### 3.3 DNA 修复

CRISPR-Cas 不仅能造成微生物基因组损伤, 而且具有 DNA 修复的功能。例如, 大肠杆菌 I-E 型系统的 Cas1 蛋白能与 DNA 重组酶和修复酶相互作用。缺失 Cas1 或相关的 CRISPR 位点会提高宿主基因组对 DNA 损伤因子的敏感性, 以及造成染色体分离缺陷<sup>[35]</sup>。有趣的是, 尽管 CRISPR 序列起初被认为在复制分区中发挥功能, 但有研究认为, Cas 蛋白最初是作为新的 DNA 修复系统发挥功能的<sup>[36]</sup>。

## 4 噬菌体针对 CRISPR-Cas 系统的逃逸机制

细菌在与噬菌体长期的斗争过程中进化出了多种抵御噬菌体感染的机制, 包括抑制噬菌体结合细胞表面受体、剪切入侵的噬菌体 DNA 以及诱导细胞死亡以阻止噬菌体感染。尽管如此, 绝大部分细菌仍然受到噬菌体侵袭。由于具有较强的基因组适应力和快速增殖能力, 噬菌体也进化出了多种拮抗机制, 从而感染受到“良好保护”的细菌细胞<sup>[15]</sup>。噬菌体通过多种途径逃逸细菌 CRISPR-Cas 系统便是其中一个重要方面。

### 4.1 通过点突变逃逸

噬菌体可以通过前间区或 PAM 区域的单核苷酸替换来逃避 CRISPR 干扰机制。值得注意的是, 前间区中核苷酸突变的位置十分重要<sup>[20]</sup>。当缺失噬菌体基因组中前间区和/或 PAM 序列时, 噬菌体能逃避 CRISPR 免疫<sup>[20]</sup>。然而, 即便 CRISPR 干扰失败, 一些受感染的细菌也能通过直接从噬菌体基因组获得间区序列。在大肠杆菌 I-E 型 CRISPR-

Cas 系统中, 当最初的干扰过程失败时, 该系统能获得多个间区, 从而扩大了该细菌的抗噬菌体谱<sup>[37]</sup>。

### 4.2 通过 anti-CRISPR 基因逃逸

近期有研究报道, *P. aeruginosa* 的温和噬菌体中含有 5 种不同的 anti-CRISPR 基因 (抗 I-F 型 CRISPR-Cas 系统)<sup>[38]</sup>。通过这些噬菌体的基因组进行比对, 发现 anti-CRISPR 基因位于噬菌体衣壳相关编码基因附近。突变分析表明, anti-CRISPR 活性来源于噬菌体的一个小蛋白。由于 anti-CRISPR 蛋白并不影响 *cas* 基因表达以及 crRNAs 的合成, 推测该蛋白可能干扰核糖核酸蛋白 CRISPR-Cas 监测复合体的形成并影响其活性<sup>[39]</sup>。假设噬菌体 anti-CRISPR 活性源于一个蛋白, 该蛋白则可能会被包装进衣壳, 并与噬菌体基因组一起进入细菌细胞, 也有可能在其噬菌体进入细胞后立即产生该蛋白, 从而快速中和宿主的免疫系统<sup>[40]</sup>。生物信息学研究发现, 在 *P. aeruginosa* 毒力岛和可移动基因元件中有相似的 CRISPR-Cas 抑制基因存在<sup>[38]</sup>, 而毒力岛和可移动基因元件的形成大多与噬菌体有关, 表明了 anti-CRISPR 基因倾向于在噬菌体之间水平转移。

### 4.3 噬菌体编码的 CRISPR-Cas 系统

Seed 等发现霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 血清群 O1 噬菌体能编码自身的功能性 CRISPR-Cas 系统<sup>[41]</sup>。该 CRISPR 位点中的部分间区序列与宿主基因组中“噬菌体诱导的染色体岛样元件 (phage-inducible chromosomal island-like element, PLE) 序列一致。该 PLE 与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的毒力岛<sup>[41]</sup> (SaPI) 相类似, 编码一套抗噬菌体系统, 其具体功能尚不明确<sup>[42]</sup>。有趣的是, 与 SaPI 一样, *V. cholera* 的 PLE 在噬菌体感染过程中发生剪切, 从而激活抗噬菌体系统<sup>[43]</sup>。在噬菌体感染循环, 噬菌体 crRNA 和 Cas 蛋白生成后形成 CRISPR-Cas 干扰复合体, 靶向并抑制 PLE 编码的宿主抗病毒防御系统, 使得噬菌体能够完成裂解循环。因此噬菌体便可以劫持细菌 CRISPR-Cas 系统, 从而促进自身增殖<sup>[42]</sup>。

## 5 展望

综上所述, CRISPR-Cas 系统除发挥适应性免疫功能以外, 还具有多种其他的功能, 而其中最广泛的功能是 CRISPR-Cas 系统对内源性基因表达的调

控。然而对 CRISPR-Cas 介导的基因调控的预测, 需要对其所涉及的机制有更详尽的了解, 尤其是其对碱基配对的要求<sup>[15]</sup>。

尽管一些 CRISPR-Cas 系统具有除适应性免疫以外的其他功能, 但有些 CRISPR-Cas 系统专一地发挥防御功能。此外, 还有些 CRISPR-Cas 系统完全丧失了免疫相关功能。例如, 在实验室条件下, 大肠杆菌非工程菌株的 I-E 型 CRISPR-Cas 系统并不具有抵抗外源 DNA 入侵的能力<sup>[8]</sup>, 且大肠杆菌自然分离株的 CRISPR 序列进化缓慢, 这与 CRISPR-Cas 的防御功能并不相符<sup>[24]</sup>。在某些环境条件下, 大肠杆菌接受 MGEs 反而更有利, 以至于 CRISPR-Cas 系统可能丧失其适应性免疫功能<sup>[15]</sup>。事实上, 本实验室的研究发现, 溶原感染  $\Phi$ Min27 噬菌体的大肠杆菌, 其 CRISPR 位点中并未获得来源于噬菌体的前间区序列, 且与 *P. aeruginosa* DMS3 噬菌体溶原株 CRISPR 抑制其运动能力的情况不同, 大肠杆菌 MG1655  $\Phi$ Min27 溶原株的运动能力反而增强。这表明不同类型 CRISPR-Cas 系统作用机制可能有差异, 还可能发挥不同功能, 具体机制还有待进一步研究。

噬菌体与细菌的相互作用在自然界的生态系统中广泛存在, 尽管细菌进化形成多种机制抵御噬菌体感染, 但噬菌体仍能侵染大部分细菌, 造成裂解或溶原感染。目前大量的研究主要聚焦于 CRISPR-Cas 系统抵御裂解性噬菌体的转录、识别和调控机制, 同时对于 RNA 介导的 Cas9 系统在人和鼠细胞系、细菌以及斑马鱼基因敲除中的应用研究较多<sup>[44]</sup>, 但对 CRISPR 系统与溶原性噬菌体的互作关系报道甚少, 大肠杆菌 CRISPR 免疫系统对编码志贺毒素噬菌体 (Stx 噬菌体) 溶原感染及超感染的影响以及相互作用的机制尚不清楚, 因而阻碍了高致病性 STEC (产志贺毒素大肠杆菌) 的有效防控。Stx 噬菌体突破宿主菌 CRISPR-Cas 免疫系统导致多重溶原的分子机制是本课题组研究的方向之一。此外, 探明噬菌体-宿主复杂的动态相互作用关系对食品和生物技术行业有着积极影响, 对噬菌体-细菌共进化关系的研究也有助于新兴的“噬菌体疗法”的应用。可以推测, 噬菌体-宿主相互作用关系将会是未来研究的热点。

## 参考文献

[1] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage

resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (5): 317-327.

- [2] Westra ER, Swarts DC, Staals RHJ, Jore MM, Brouns SJJ, van der Oost J. The CRISPRs, they are a-Changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annual Review of Genetics*, 2012, 46: 311-339.
- [3] Nunez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21 (6): 528-534.
- [4] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9 (6): 467-477.
- [5] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482 (7385): 331-338.
- [6] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315 (5819): 1709-1712.
- [7] Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, Datsenko KA, Djordjevic M, Wanner BL, Severinov K. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2010, 77 (6): 1367-1379.
- [8] Westra ER, Pul U, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, Wurm R, Raine A, Mescher M, van Heereveld L, Mastop M, Wagner EGH, Schnetz K, van der Oost J, Wagner R, Brouns SJJ. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, 2010, 77 (6): 1380-1393.
- [9] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321 (5891): 960-964.
- [10] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou KH, Doudna JA. Sequence-and Structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329 (5997): 1355-1358.
- [11] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadan AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial

- immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468 (7320) : 67-71.
- [12] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirezada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471 (7340) : 602-607.
- [13] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 2008, 322 (5909) : 1843-1845.
- [14] Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, 139 (5) : 945-956.
- [15] Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12 (5) : 317-326.
- [16] Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biological Chemistry*, 2011, 392 (4) : 277-289.
- [17] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64 : 475-493.
- [18] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327 (5962) : 167-170.
- [19] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11 (3) : 181-190.
- [20] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonte J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-Encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (4) : 1390-1400.
- [21] Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology-Sgm*, 2009, 155 : 733-740.
- [22] Pul U, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E-coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, 2010, 75 (6) : 1495-1512.
- [23] Andersson AF, Banfield JF. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, 2008, 320 (5879) : 1047-1050.
- [24] Touchon M, Charpentier S, Clermont O, Rocha EPC, Denamur E, Branger C. CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of immunity-associated diversifying selection. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (10) : 2460-2467.
- [25] Touchon M, Charpentier S, Pognard D, Picard B, Arlet G, Rocha EPC, Denamur E, Branger C. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. *Microbiology-Sgm*, 2012, 158 : 2997-3004.
- [26] Ketting RF. The many faces of RNAi. *Developmental Cell*, 2011, 20 (2) : 148-161.
- [27] Zegans ME, Wagner JC, Cady KC, Murphy DM, Hammond JH, O' Toole GA. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (1) : 210-219.
- [28] Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, Loh E, Gripenland J, Tiensuu T, Vaitkevicius K, Barthelemy M, Vergassola M, Nahori MA, Soubigou G, Regnault B, Coppee JY, Lecuit M, Johansson J, Cossart P. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 2009, 459 (7249) : 950-956.
- [29] Edgar R, Qimron U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lambda lysogenization, lysogens and prophage induction. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (23) : 6291-6294.
- [30] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337 (6096) : 816-821.
- [31] Cady KC, O' Toole GA. Non-identity-mediated CRISPR-bacteriophage interaction mediated via the Csy and Cas3 proteins. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (14) : 3433-3445.
- [32] Louwen R, Horst-Kreft D, de Boer AG, van der Graaf L, de Knecht G, Hamersma M, Heikema AP, Timms AR, Jacobs BC, Wagenaar JA, Endtz HP, van der Oost J, Wells JM, Nieuwenhuis EES, van Vliet AHM, Willemsen PTJ, van Baarlen P, van Belkum A. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 32 (2) : 207-226.
- [33] Zhang J, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brugger K, Graham S, Reimann J, Cannone G, Liu H, Albers SV, Naismith JH, Spagnolo L, White MF. Structure and

- mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Molecular Cell*, 2012, 45 (3) : 303-313.
- [34] Riehle MM, Bennett AF, Long AD. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (2) : 525-530.
- [35] Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B, Gagarinova A, Pogoutse O, Brown G, Binkowski A, Phanse S, Joachimiak A, Koonin EV, Savchenko A, Emili A, Greenblatt J, Edwards AM, Yakunin AF. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular Microbiology*, 2011, 79 (2) : 484-502.
- [36] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (2) : 482-496.
- [37] Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*, 2012, 4 (10) : 2291-2311.
- [38] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 2013, 493 (7432) : 429-4181.
- [39] Samson JE, Magadan AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11 (10) : 675-687.
- [40] Wiedenheft B. In defense of phage: viral suppressors of CRISPR-mediated adaptive immunity in bacteria. *RNA Biology*, 2013, 10 (5) : 886-890.
- [41] Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 2013, 494 (7438) : 489-491.
- [42] Villion M, Moineau S. Virology: Phages hijack a host's defence. *Nature*, 2013, 494 (7438) : 433-434.
- [43] Ram G, Chen J, Kumar K, Ross HF, Ubeda C, Damle PK, Lane KD, Penades JR, Christie GE, Novick RP. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (40) : 16300-16305.
- [44] Charpentier E, Doudna JA. BIOTECHNOLOGY Rewriting a genome. *Nature*, 2013, 495 (7439) : 50-51.

# The functional aspects of bacterial CRISPR-cas systems and interactions between phages and its bacterial hosts – A review

Qiang Fu, Jianhe Sun, Yaxian Yan\*

Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** The roles of CRISPR-Cas systems in bacterial host protection against mobile genetic elements (MGEs) are now well known, but there is mounting evidence that these systems modulate other processes, such as the genetic regulation of group behavior and virulence, DNA repair and genome evolution. Here, we reviewed the structure, types and mechanism of interference of CRISPR-Cas system as well as the additional functions of CRISPR-Cas beyond adaptive immunity. Furthermore, we discussed the mechanisms for phages to overcome bacterial CRISPR-Cas system, and the prospective evolution of interactions between phage and host.

**Keywords:** CRISPR-Cas Systems, phage, adaptive immunity, interaction

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31272580,30571384)

\* Corresponding author. Tel: +86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: 8 July 2014/ Revised: 26 September 2014