



UPPSALA
UNIVERSITET

mRNasers roll i typ II TA-system

En litteraturstudie om hur mRNaser med Lon styr bakterier in i och ut ur persistens

Junmei Hu Frisk

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Persistens är en av de faktorer som leder till misslyckad antibiotikabehandling. Persistenta bakterier är toleranta mot antibiotika så länge de befinner sig i vilostadium. De representerar en liten fraktion av bakteriepopulationen. Den persistenta populationen är egentligen känslig för antibiotika, men undgår antibiotikans dödande effekt så länge den kan inaktivera cellulära aktiviteter.

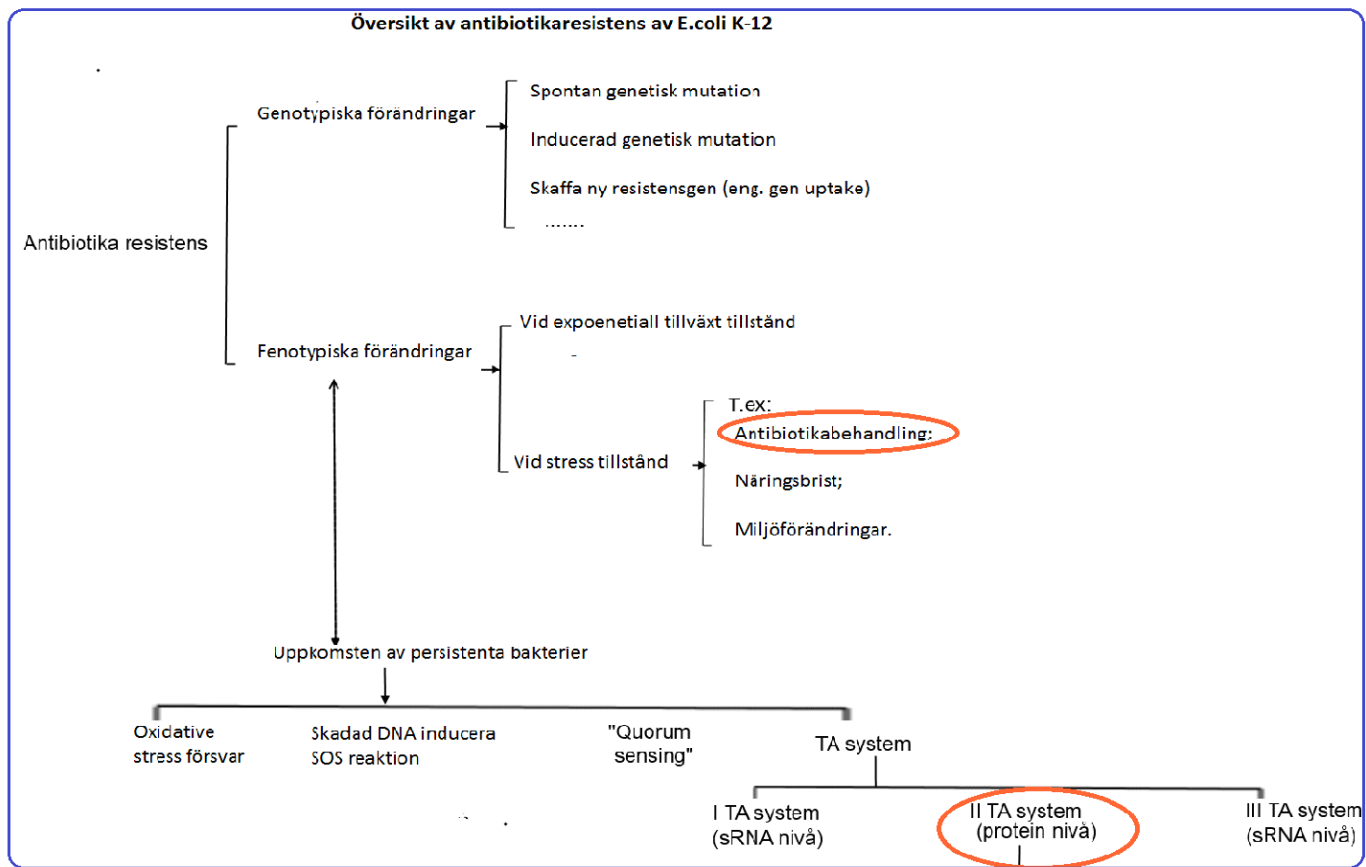
Flera bakomliggande mekanismer bidrar till uppkomst av persistens, men typ II TA-system är den mekanism som har störst påverkan på persistens och samtidigt stor potential för att bidra till utvecklandet av nya mediciner med typ II TA-system som mål. Ett typiskt II TA-system innefattar ett par proteiner, ett toxin och ett antitoxin. Varje par proteiner äger ett stabilt toxin och ett motsvarande instabilt antitoxin. Typ II TA-system har som uppgift att skydda och hjälpa bakterier att besegra olika typer av stress, till exempel en antibiotikabehandling. *E.coli* är en populär modellorganism som har enklare II TA-system. Särskilt mRNaser av II TA-systemen är intensivt studerade. Därför fokuserar jag i arbetet huvudsakligen på mRNaser av II TA-systemet hos *E.coli K-12* under stresstillstånd, men andra organismers TA-system tas upp som jämförelse. *E.coli K-12* har tio stycken välkarakteriserade mRNaser som kodas från II TA-loci. mRNaser har distinkta fysiologiska egenskaper, t.ex. att antitoxiner har kortare livstid än toxiner och en känslig C-terminal. Alla tio mRNaser bidrar till utveckling av persistens. Alla antitoxiner kan degraderas av det cellulära proteaset Lon. Lons aktivitet är beroende av signalöverföring och signalöverföringen är aktiverad av olika stressfaktorer. Interaktionen mellan mRNaser och Lon bildar ett snabbt, dynamiskt och sofistikerat system. Förståelsen för de molekylära mekanismer som ligger bakom persistens kan leda till utveckling av nya strategier för att bekämpa persistens. Det är därför ett viktigt och akut forskningsämne.

Inledning

Bakterier kan skaffa sig antibiotikaresistens antingen genom genotypiska förändringar eller fenotypiska förändringar (Niepa *et al.* 2012). Vid genotypiska förändringar förvärvas nya gener i form av spontan eller inducerad genetisk mutation, eller av horisontell genöverföring. Exempel på fenotypiska förändringar är när bakterier går in i persistens eller bildar biofilm. Persistenta bakterier går in i ett vilande tillstånd, där deras cellulära aktiviteter är mycket långsamma eller helt avstannade. Genom att antibiotika verkar bäst på växande celler, skyddas bakteriecellen. Persistens sker vid exponentiellt växande tillstånd men även vid stress från omgivningen (figur 1). De persistenta bakterierna har en utmärkt överlevnadsförmåga.

Persistens har väckt ett enormt intresse inom forskningen, särskilt uppkomsten av persistens under antibiotikastress. Kint *et al.* (2012) sammanfattade fyra troliga mekanismer som orsakade persistens: (1) bakterier inducerar försvarsmekanismer vid oxidativ stress; (2) antibiotikumet skadar DNA och bakterier aktiverar en SOS-respons; (3) "Quorum sensing" kan leda till persistens; (4) toxin/antitoxin (TA)-systemet är den mest intressanta mekanismen. Typ II TA-system som verkar på proteinnivå är en del av TA-systemet. Elva mRNaser ingår i typ II TA-systemet hos *E.coli*. Tio av dessa mRNaser är huvudfokus i detta arbete.

Forskning inom typ II TA-systemet är relativt nytt. Dagens forskning inom II TA-system pågår intensivt och resultaten uppdateras ständigt. En del av forskningsresultaten i uppsatsen är kontroversiella. Jag försöker presentera information som de flesta artiklarna är överens om idag, men måste reservera mig för framtida uppdateringar.



Figur 1: **Översikt av antibiotikaresistens hos *E.coli* K-12.** Både genotypiska och fenotypiska förändringar kan orsaka antibiotikaresistens. Persistens bidrar till resistens, men persistens är inte synonymt med resistens. Bakterier kan bli persistenta vid olika biologiska tillstånd: normalt tillväxttillstånd eller induktion av stress från miljömässiga faktorer. TA-system är en av mekanismerna för att gå in i persistens. II TA-system verkar på proteinnivå. Reglering av II TA-systemet utförs av mRNaser och Lon. Alla antitoxiner från mRNaser kan degraderas av Lon, sedan frigörs toxiner. Toxiner kan inhibera translation genom att klyva mRNA vid ribosomalt A-läge eller andra specifika RNA-lägen (egen figur).

Uppsatsens disposition

För att beskriva huvudämnet mRNaser förklaras först översiktligt och stegvis persistenta bakterier, persistenta bakteriers kliniska betydelse och typ II TA-system. Därefter presenteras mRNasers och Lons biologiska karakteristik, deras stokasticitet och möjlighet till återupplivning. Här förklaras också vilka biologiska förutsättningar som möjliggör att mRNaser och Lon kan styra bakterier in i och ut ur det vilande tillståndet.

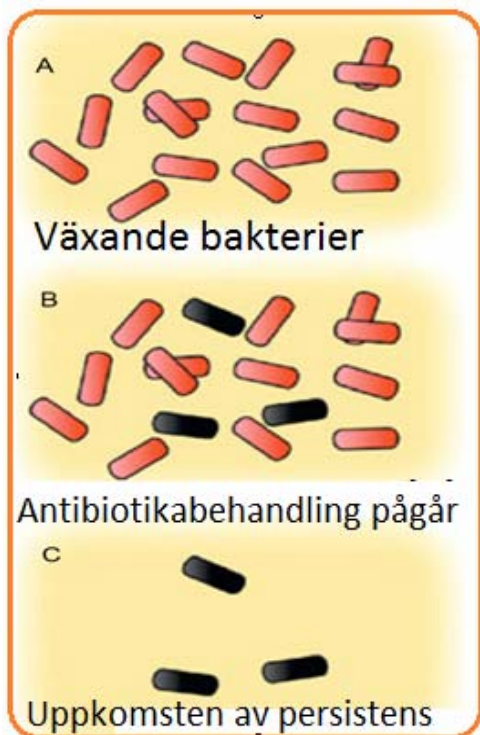
Uppsatsens syfte

Syftet med arbetet är att förstå de molekylära mekanismer som finns bakom mRNaser under stress. Fokus kommer att ligga på två viktiga komponenter: det cellulära proteaset (Lon) och 10 mRNaser (se tabell 2, s.7), samt deras interaktion. I diskussionsdelen sammanfattas mRNaser och deras potential i användning för framtida medicinsk utveckling.

Persistenta bakterier ur ett historiskt perspektiv

1944 upptäckte Joseph Bigger (citerad i Maisonneuve *et al.* 2013) att en av en miljon stafylokocker (*Staphylococcus*) kan överleva penicillinbehandling, och att de överlevande bakterierna kan återhämta populationen om behandlingen upphör, se figur 2. Den nya

populationen är känslig för penicillin, precis som den ursprungliga. Bigger definierade de överlevande bakterierna som ”persister” (persistenta bakterier). Persistenta bakterier är



Figur 2: **Uppkomsten av persistens efter en antibiotikabehandling från en genetiskt homogen population.** A. En homogen population av antibiotikakänsliga bakterier (röd). B. Vid antibiotikabehandlingen går bakterierna in i persistens (ett slags motståndskraftigt vilotillstånd) (svart). C. Efter behandlingen överlever bara persistenta bakterier (svarta). (Omarbetad efter Kint *et al.* 2012)

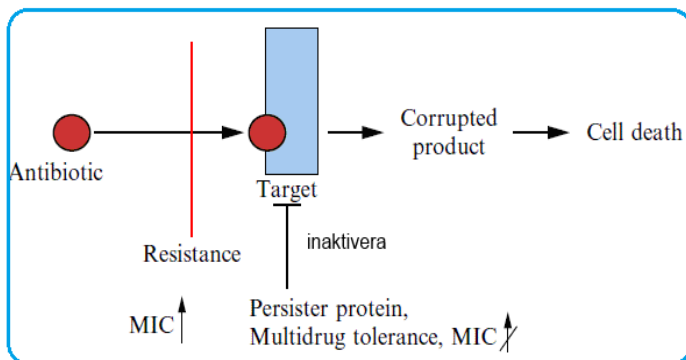
genetiskt identiska med bakterier av vildtyp. De utgör en liten och tillfällig population, vilket gör isolering utmanande. Sedan denna upptäckt har mekanismen bakom persistens varit en gåta i många decennier. Men med hjälp av transkriptomanalys gjordes ett genombrott om persistens 2004 (Keren *et al.* 2004). Keren *et al.* behandlade en population av växande bakterier med ett β -laktamantibiotikum och samlade därefter in de överlevande bakterierna (persistenta bakterierna). Detta kallas den första transkriptomanalysen på persistens. 2006 tillämpades GFP-teknik (grön fluorescentprotein-teknik) för att spåra persistenta celler (Shah *et al.* 2006). Bakterier konstruerades för att uttrycka ett instabilt GFP-protein under styrning av en ribosomal promotor. En växande bakterie förblir GFP positiv (grön färg) medan en vilande bakterie inte ger grön färg på grund av nedbrytning av GFP. Kombinationen av transkriptomanalysen och GFP-tekniken har underlättat forskningen, dessutom har samhällets uppmärksamhet kring resistenta bakterier ökat. Idag är persistenta bakterier ett intensivt forskningsområde.

Persistenta bakterier och antibiotikaresistans

Vid genomiska analyser visade sig ett stort antal toxin- och antitoxin-gener finnas hos frilevande bakterier (Gerdes & Wagner 2007). Enligt experiment, bioinformatik och

biokemisk analys, har man upptäckt minst 19st kända typ II TA-system¹ hos *Escherichia coli* K-12 (Yamaguchi och Inouye 2011, se tabel1). Typ II TA-system har spritt sig brett inom bakterier. Många forskningsartiklar har bevisat att II TA-system är en väsentlig faktor som styr bakterier in i persistens (Fasani *et al.* 2013, Keren *et al.* 2004, Kim *et al.* 2013, Maisonneuve *et al.* 2011, Maisonneuve *et al.* 2013). Persistens ökar bakteriers tolerans mot antibiotika och bidrar till svårbehandlade bakteriella infektioner, till exempel infektioner av bakterierna *Pseudomonas aeruginosa* och *Mycobacterium tuberculosis* (MT). Infektionen av MT orsakar 1,6 miljoner dödsfall globalt varje år (Fasani *et al.* 2013). Persistenta bakterier är ett allvarligt hot mot människors hälsa.

Antibiotika är för närvarande den vanligaste och effektivaste behandlingsstrategin mot bakteriella infektioner. Antibiotika inhiberar olika metaboliska, transkriptionella och translationella aktiviteter i cellen, och således fungerar antibiotika bara mot växande celler. Penicillin blockerar till exempel cellväggssyntes genom att inhibera transglykosylaser och transpeptidaser. Antibiotikumet kloramfenikol hämmar proteinsyntes genom att binda till bakteriers stora ribosomala subenhet. Persistenta bakterier är vilande: olika aktiviteter i cellen är blockerade eller inaktiverade (figur 3), vilket leder till att de är mindre känsliga för antibiotika. Därmed har persistenta bakterier en stor klinisk betydelse i dagens samhälle.



Figur 3: **Antibiotika versus persistens.** Antibiotika fungerar på celler genom att förstöra olika cellulära aktiviteter medan persistensgener inaktiverar de cellulära aktiviteterna. Persistensgenerna förhindrar därigenom antibiotika från att binda till sitt mål. MIC: minsta hämmande koncentration av ämnet, från eng. minimum inhibitory concentration. (Omarbetad efter Keren *et al.* 2012)

Vad är typ II TA-system?

TA-systemet klassificeras som antingen typ I TA (sRNA), typ II TA (protein) eller typ III TA (sRNA) enligt toxinets/antitoxinets funktion (Fozo *et al.* 2008, Gerdes & Wagner 2007) (figur 1 och tabel 1). Hos typ I TA-loci, är det antitoxinens små antisens RNA som blockerar translation av målgenen genom basparning (Fozo *et al.* 2008). I typ II TA-loci är antitoxinet ett instabilt protein som binder till det mer stabila toxinet och hämmar dess aktivitet. Typ III TA kallas också ToxIN Abi-system (abi: från eng. abortive infection. Det betyder att om en bakteriecell blir infekterad av viral komponent, kan cellen främja celledöd för att begränsa spridning av virala komponenter inom bakteriepopulationen). Små RNA fungerar som ett antitoxin och neutraliserar toxin-proteinet ToxN (Fineran *et al.* 2008).

¹ De flesta artiklar berättar om 36st toxiner hos *E.coli*. Det är en luddig beskrivning. Där ingår typ I och typ II TA-system (Yamaguchi och Inouye 2011). Yamaguchi och Inouye sammanfattade 19st II TA-system i en tabell, så det finns minst 19st II TA-system. Det är möjligt ytterligare II TA-system kan komma att hittas.

Tabell 1: Generell skillnad mellan typ I, typ II och typ III TA system.

TA system	Antitoxin	Toxin
Typ I	sRNA	RNA
Typ II	protein	protein
Typ III	sRNA	protein

II TA-system finns hos bakterier och arkéer, och ingen homolog har hittats hos människor (Brzozowska & Zielenkiewicz 2013). Det ger hopp om nya säkra mediciner. Om patogenen har ett homologt protein i människor, så kan det proteinet inte utan betydande svårigheter användas som måltavla för mediciner. II TA-systemet ger oss en sådan gynnsam förutsättning.

RNA endonukleaser

Yamaguchi och Inouye sammanställde en lista på 19 st II TA-system enligt toxiners cellulära mål (Yamaguchi och Inouye 2011), se tabell 2. Kända cellulära mål för toxiner hos *E.coli* inkluderar DNA-replikation, mRNA, tRNA, ribosomer och cytoskelettproteiner (Yamaguchi och Inouye 2011). Bland de cellulära målen för antitoxiner är mRNA vanligast och 11 antitoxiner inhiberar cellulära aktiviteter genom att interferera med mRNA. ”The term messenger RNase was coined ... to denote RNases that catalyze the degradation of mRNA.” (citerat från Schoenberg och Cunningham 1999). Dessa 11 mRNaser indelas i två grupper efter hur de klyver mRNA: Ribosom-oberoende mRNaser (MazF, ChpBK, MqsR, YhaV, HicA och RNLA) och ribosom-beroende mRNaser (RelE, YoeB, YafO, YafQ, HigB) (Maisonneuve *et al* 2011, Yamaguchi och Inouye 2011). En systematisk funktionsjämförelse av mRNaser utfördes av Maisonneuve *et al.* (2011 & 2013) baserad på 10 mRNaser (tabell 3). Detta arbete utgår från deras experiment och bara dessa 10 mRNaser diskuteras i arbetet.

De tio välundersökta mRNaserna är av typ II TA-loci hos *E.coli*, se tabell 3 (Maisonneuve *et al.* 2011 & 2013). Varje TA-lokus kallas en TA-kassett. I en TA-kassett följer toxingenen ofta tätt efter antitoxingenen. Avståndet mellan två geners läsram är mycket kort, till exempel är det 1bp avstånd mellan två gener av *mqsR* och *ygiT* (Kasari *et al.* 2010). Detta förhållande betyder möjligtvis att de två genernas translation är kopplad.

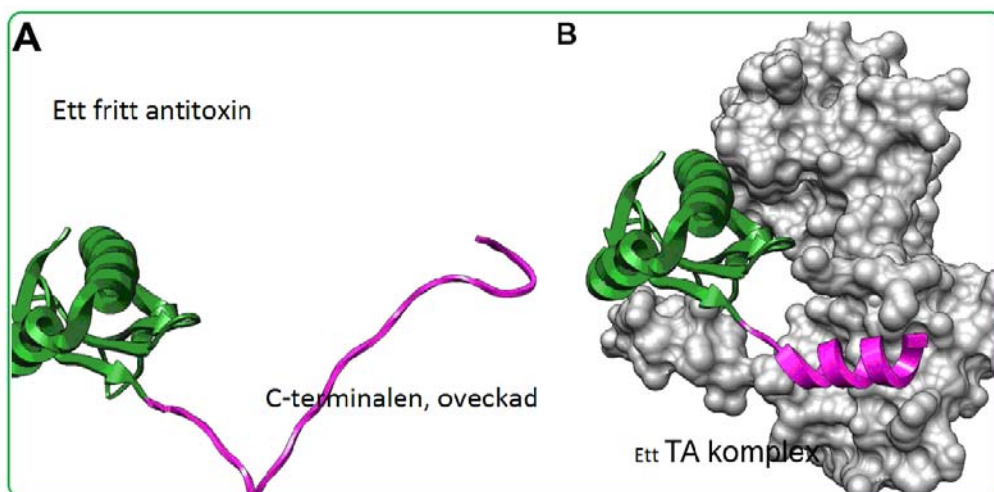
Tabell 2: Typ II toxin-antitoxin system hos *E.coli K-12* (omarbetad efter Yamaguchi och Inouye 2011).

Operon	Protein	Toxin or antitoxin	Amino acids	Molecular mass (kDa)	pI value
Ribosome-independent RNA interferases					
mazEmazF	MazE	Antitoxin	82	9.4	4.6
	MazF	Toxin	111	12.1	8.4
chpBlchpBK	ChpBl	Antitoxin	83	9.3	4.5
	ChpBK	Toxin	116	12.5	5.4
hlcAhlcB	HlcA	Toxin	58	6.8	11.0
	HlcB	Antitoxin	145	16.1	4.8
prlFyhaV	PrIF	Antitoxin	111	12.4	4.9
	YhaV	Toxin	154	17.8	9.6
mqsRmqsA	MqsR	Toxin	98	11.2	9.1
	MqsA	Antitoxin	131	14.7	9.3
rnlArnIB	RnlA	Toxin	357	40.1	6.4
	RnlB	Antitoxin	123	13.7	4.4
Ribosome-dependent RNA interferases					
relBreIE	RelB	Antitoxin	79	9.1	4.7
	RelE	Toxin	95	11.2	10.0
yefM yoeB	YefM	Antitoxin	83	9.3	4.9
	YoeB	Toxin	84	10.2	8.5
yafN yafO	YafN	Antitoxin	97	11.2	5.5
	YafO	Toxin	132	15.5	7.5
dinJ yafQ	DinJ	Antitoxin	86	9.4	5.1
	YafQ	Toxin	92	10.8	9.9
higB higA	HigB	Toxin	104	12.1	10.4
	HigA	Antitoxin	138	15.0	4.5
Inhibitor of ribosome subunit association					
ratA yjfF	RatA	Toxin	158	17.7	8.8
	YjfF	Antitoxin (putative)	96	10.8	9.5
Inhibitors of cell division					
yeeUcbtA	YeeU	Antitoxin	122	13.7	5.6
	CbtA	Toxin	124	13.9	8.2
yafW ykfI	YafW	Antitoxin	105	11.9	6.3
	YkfI	Toxin	113	12.9	9.6
yjfZ yjpF	YjfZ	Antitoxin	105	11.7	6.0
	YjpF	Toxin	109	12.3	7.4
Inhibitor of phospholipid synthesis					
gnsA ymcE	GnsA	Toxin	57	6.6	5.1
	YmcE	Antitoxin	76	8.7	6.3
Unknown (involved with persistence)					
hipB hipA	HipB	Antitoxin	88	10.0	6.7
	HipA	Toxin	440	49.3	8.3
Unknown					
yjhX yjhQ	YjhQ	Antitoxin	181	19.9	6.3
	YjhX	Toxin	85	9.7	11.0
ydaS ydaT	YdaS	Toxin	98	11.0	8.7
	YdaT	Antitoxin	140	15.7	7.8

Tabell 3: Antitoxiner och proteas av *E. coli* K-12

Nr	TA familj	antitoxin	porteas	referens
1	RelBE	RelB	Lon	Christensen et al.2001
2	YoeB/YefM	YefM	Lon	Christensen et al.2004
3	HigAB	HigA	Lon	Iwona & Urszula 2013
4	Yhav/PrIF	PrIF	Lon	Schmidt et al. 2007
5	YafNO	YafN	Lon	Mikkel et al. 2009
6	YafQ/dinJ	dinJ	Lon & ClpXP	Iwona & Urszula 2013
			lon när bakterier är under "Stringent control"	
7	MazEF	MazE	ClpXP när bakterier är normal växande	Iwona & Urszula 2013
8	ChpAB	ChpA	Lon	Masuda et al 1993
9	MqsAR	MqsA	Lon	Breann et al 2009
10	HicAB	HicB	Lon	Jorgensen et al. 2009
11	HipAB	HigA	Lon	Iwona & Urszula 2013

Alla mRNaser leder till en snabb nedbrytning av mRNA och ett stopp av translationen. Translationsstopp sker antingen genom att mRNaser klyver mRNA från ribosomalt A-läge eller att mRNaser klyver ett särskilt läge på RNA (Maisonneuve *et al.* 2011). Toxin och motsvarande antitoxin reglerar operon på flera olika sätt. Antitoxin kan självständigt reglera TA-operonet (Maisonneuve *et al.* 2011). TA-komplex reglerar gener genom bindning till operonet, dessutom starkare än vad antitoxin kan göra. Toxinet i komplexet fungerar både som "corepressor" och "derepressor" villkorligt. Övergången mellan dessa två tillstånd styrs av koncentration av toxin och antitoxin. Varje mRNAs har utvecklat denna typ av kontroll oberoende av varandra (Gerdes & Maisonneuve 2012).

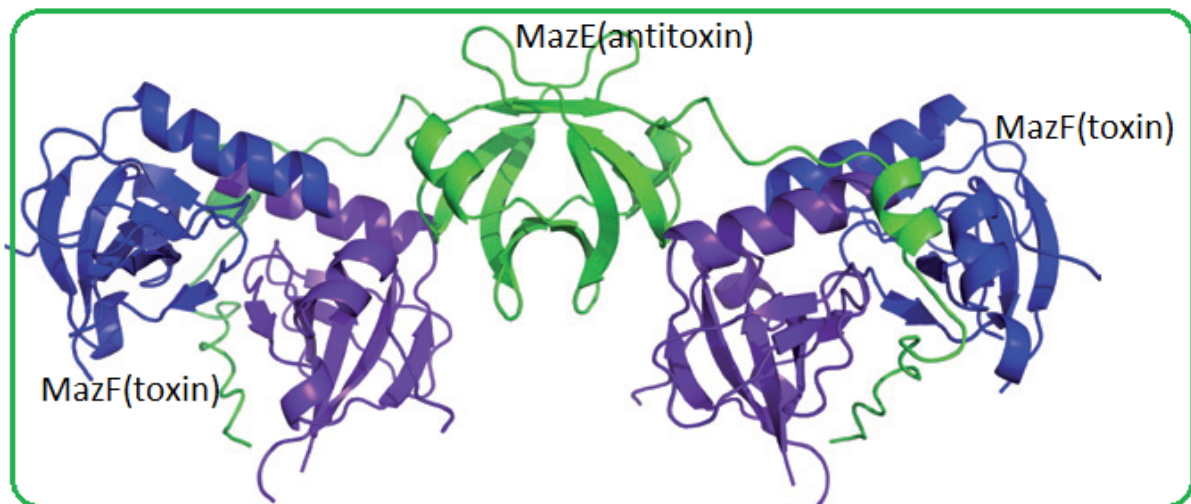


Figur 4: **En generell bild på toxin and antitoxin.** A: Fritt antitoxin utgör en C-terminal (lila) och en N-terminal (grön). C-terminalen är oveckad, så den är känslig för nedbrytning av cellulärt proteas (Lon). B: När antitoxinet bildar komplex med toxinet (grå färg), skyddas C-terminalen från degradation (Omarbetad efter Brzozowska & Zielenkiewicz 2013).

Antitoxiner syntetiseras snabbare än toxiner och är ofta närvarande i överskott, men har mindre termodynamisk stabilitet (Brzozowska & Zielenkiewicz 2013). Antitoxinerna är ofta starka syror, och har två distinkta domäner: en C-terminal (lila färg i figur 4A) och en N-terminal (grön färg i figur 4). C-terminalen är oveckad. Detta möjliggör konformationsförändring när antitoxinerna binder till toxiner. Det första steget av proteinnedbrytning är att veckla ut proteinet. Således är fria antitoxiner mycket känsliga för cellulära proteaser på grund av sin öppna C-terminal. N-terminaldomänen används för DNA-

bindningen och ansvarar för autoreglering av operonet. Många kända antitoxiner innehåller ett "helix-turn-helix"(HTH) eller ett "ribbon-helix-helix"(RHH) DNA-bindningsmotiv (Madl *et al.* 2006, Gerdes & Maisonneuve 2012). Toxiner är ofta positivt laddade och stabila. Ett toxin och ett motsvarande antitoxin bildar ett stabilt komplex (Brzowska & Zielenkiewicz 2013, Keren *et al.* 2004, Maisonneuve *et al.* 2011). I komplexet är C-terminalen av antitoxinet veckat och tätpackat, så att antitoxinet är skyddat för cellulära proteaser (figur 4B). Protein-protein-interaktion i TA-komplexet skyddar antitoxinet från att brytas ner av cellulära proteaser (Kamada *et al.* 2003).

De flesta artiklarna beskriver att förhållandet mellan toxin och antitoxin i ett TA-komplex är 1:1 (Brzowska & Zielenkiewicz 2013, Keren *et al.* 2004, Maisonneuve *et al.* 2011). Men Zhang *et al.* diskuterar att två MazE (antitoxin) kan binda fyra MazF (toxiner) i ett TA-komplex, se figur 5. Förhållandet mellan antitoxin och toxin är alltså 1:2 i ett MazEF komplex, och detta är ett bevis på att MazE är ett mer effektivt neutraliseringsmedel (Zhang *et al.* 2003, Yamaguchi och Inouye 2011).



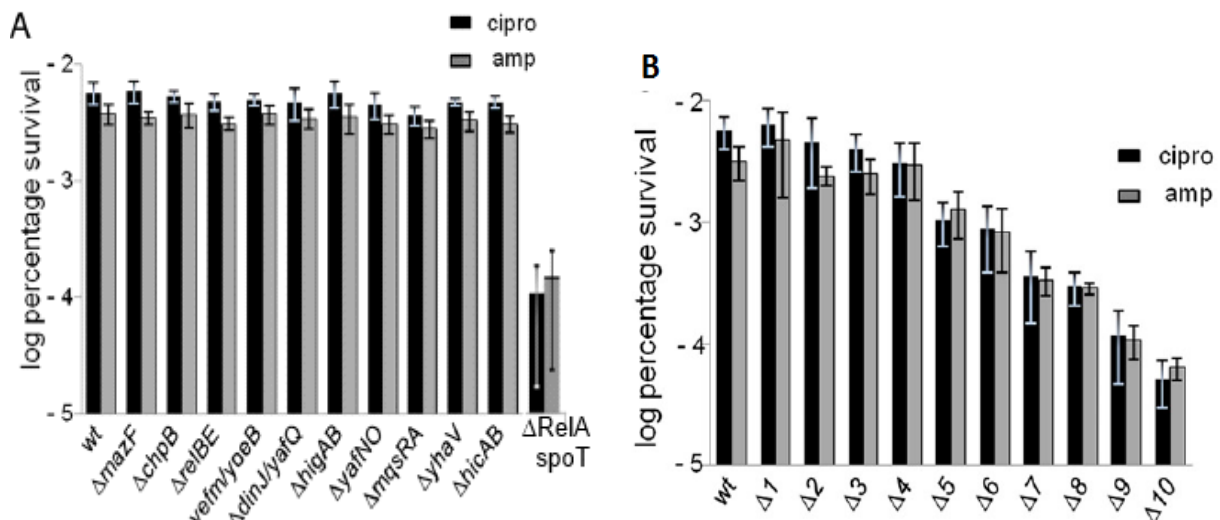
Figur 5: **MazEF-komplex**. MazE (antitoxin) visas i grön färg; MazF (toxin) visas i blå och lila färg (Omarbetad efter Yamaguchi och Inouye 2011).

Toxin har oftast längre livstid än antitoxin. Donegan *et al.* (2010) rapporterar att halveringstiden av toxinet MazE är mellan 30 och 60 minuter, och motsvarande antitoxins halveringstid är 18 minuter (*Staphylococcus aureus*). Sayed *et al.* (2012) undersökte halveringstiden hos TA-paret: *SprA1*(toxin) och *PepA1*(antitoxin) av *S. aureus*. *SprA1* och *PepA1* har > 3 timmars respektive 10 minuters halveringstid. Antitoxin i ett TA-komplex är i en dynamisk rörelse hos en växande population. Nya känsliga antitoxiner syntetiseras snabbt. De kan antingen bli degraderade på en gång eller binda motsvarande toxiner under sin livstid, därefter dissociera och degraderas. Betydligt kortare halveringstid av antitoxiner medför att förhållandet [A]:[T] ändras snabbt efter stressrespons.

II TA-systemet existerar i både plasmider och kromosomer, särskilt finns de på patogenicitetsö, men en del TA-par befinner sig i transposoner (mobil genetisk gensekvens som flyttas omkring i genomet) hos vissa bakterier (Baum 1994, Makarova *et al.* 2009). Hittills har det inte upptäckts något II TA-system i transposoner hos *E.coli K-12*, men det finns hos andra mikroorganismer. Två sådana exempel är genen för *relBE* som ligger i *Tn5401* hos *Bacillus thuringiensis* (Baum 1994) och *AbrB* super (TA) familjen som finns i transposoner hos bakterier och arkéer (Makarova *et al.* 2009). TA-loci som befinner sig i

mobila genetiska element ger förmodligen konsekvensen att II TA-system ofta flyttas och sprids. Detta gäller både då det mobila genetiska elementet är i plasmiden och i kromosomen. En sådan egenskap bidrar troligen till ökad överlevnadsgrad och en snabb utveckling av persistens. TA-loci kan också spridas horisontellt mellan arter. RelBE är ett TA-system i transposoner, som även har spritt sig brett inom bakterier. AbrB-kopplade TA-par finns både i arkéer och i bakterier (Makarova *et al.* 2009).

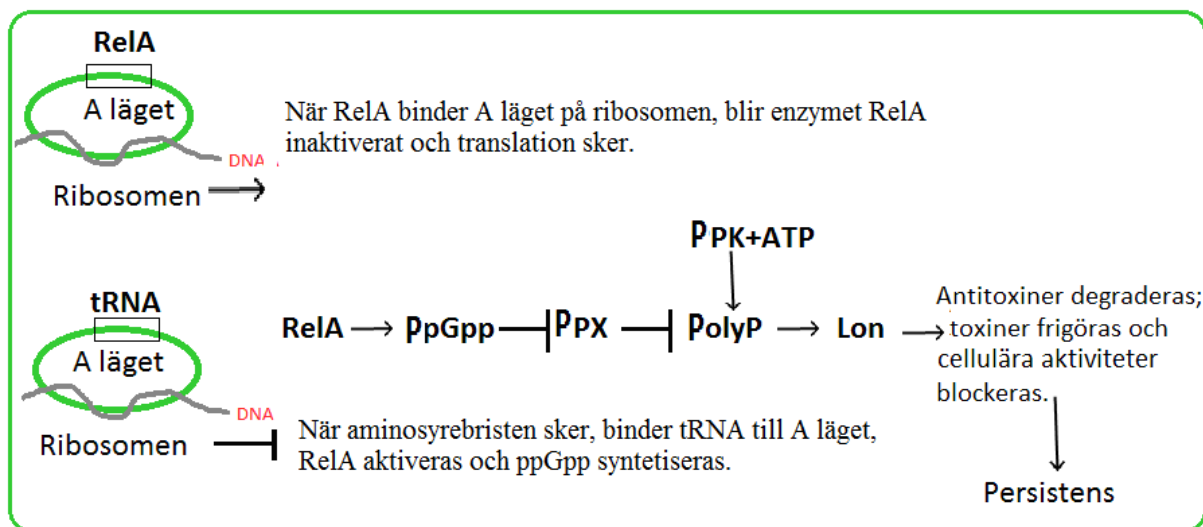
De tio mRNaserna har flera biologiska funktioner. I *E.coli K-12* degraderas antitoxiner av Lon (long form filament) proteas, och fria toxiner leder några bakterier att gå in i persistens. Maisonneuve *et al.* (2011) använde sig av bakterier som fått sin *Lon*-gen borttagen, med resultatet att bakterierna blev 250 gånger mindre persistenta efter behandling med antibiotikumet ciprofloxain. Att fakultativt ta bort en gen från II TA-loci gav ingen effekt på uppkomsten av persistens (figur 6A). Det tyder på att de tio mRNaserna är oberoende av varandra. Att ta bort alla TA-loci minskade förekomsten av persistenta bakterier med 100 till 200 gånger (figur 6B), vilket tyder på att mRNaser arbetar kumulativt med samma mål (persistens). Resultat från detta experiment bevisade generellt att mRNaser från II TA-loci av *E.coli K-12* bidrar parallellt till persistens, och de är överflödiga och oberoende varandra.



Figur 6: **Överlevnadsförmåga hos olika varianter av *E.coli*.** Olika genmodifierade bakterier behandlades med 1 μ g/ml ciprofloxain (svart färg) eller 100 μ g/ml ampicillin (grå färg). Överlevnadsförmågan hos de muterade bakterierna jämfördes med vildtypbakteriernas (WT). (A) De bakterier som har muterade *RelA* och *SpoT*-gener har den lägsta överlevnadsgraden; vildtyp överlever bättre; radering av en enda mRNA (mazF, chpB, relBE, yefM, yoeB, higBA, dinJ, yafQ, yafNO, mqsRA, yhaV och hicAB) påverkar inte bakteriers överlevnad. (B) Ökad deletion av TA lokus. $\Delta 1$ = mutant med chpB; $\Delta 2$ = $\Delta 1$ + mutant med $\Delta mazF$; $\Delta 3$ = $\Delta 2$ + mutant med $\Delta relBE$; $\Delta 4$ = $\Delta 3$ + mutant med $\Delta yefM yoeB$; $\Delta 5$ = $\Delta 4$ + mutant med $\Delta dinJ yafQ$; $\Delta 6$ = $\Delta 5$ + mutant med $\Delta higBA$; $\Delta 7$ = $\Delta 6$ + mutant med $\Delta prfY yhaV$; $\Delta 8$ = $\Delta 7$ + mutant med $\Delta yafNO$; $\Delta 9$ = $\Delta 8$ + mutant med $\Delta mqsRA$; $\Delta 10$ = $\Delta 9$ + mutant med $\Delta hicAB$ (Omarbetad efter Maisonneuve *et al.* 2011)

Cellulär proteolytisk aktivitet i II TA-system av *E. coli*

Lon spelar en väsentlig roll i att degradera alla antitoxiner i *E.coli K-12* (Brzozowska och Zielenkiweicz 2013, Maisonneuve *et al.* 2011, Maisonneuve *et al.* 2013, Schmidl Oliver *et al.* 2007). Guanodin tetrafosfat (ppGpp) och guanodin pentaosfat ((p)ppGpp) krävs för att aktivera Lonaktivitet hos *E.coli*. Här följer en kort genomgång av några viktiga kända intermediärer (figur 7) som är inblandade i den kaskadreaktionen av *E.coli K-12*. Därefter beskrivs processen av reglering mRNaser.



Figur 7: Översiktsskiss över II TA-system som induceras av stress hos *E.coli* K-12. Lon-protelys styr alla mRNAsers aktiviteter genom degradering. När enzymet RelA binder till ribosomen, blir RelA inaktiverad. När cellen drabbas av aminosyrabrist, binder oladdat tRNA A-läget och RelA frigörs. Signalen från "Stringent Control" leder till att Rel A dissocierar från ribosomen och syntetiserar signalmolekylen (p)ppGpp. I sin tur ökar polyP-koncentrationen. PolyP är en aktiverare av Lon-protelys. Aktiverad Lon bryter ner antitoxiner så att fria toxiner inhiberar cellulära aktiviteter. Inhibition av cellulära processer leder till att bakterier blir mindre känsliga för antibiotika. (egen figur)

Aktivering av Lon startas av RelA. RelA är ett enzym på ribosomen som känner aminosyrebristen via "Stringent control" i cellen (Snyder & Champness 1997). Om det är aminosyrabrist i cellen lämnar RelA sin position på ribosomen, blir aktiverad och börjar syntetisera (p)ppGpp. PpGpp och pppGpp är två ovanliga nukleotider som har likande struktur och funktion, och tillsammans kallas (p)ppGpp. De fungerar som en global transkriptionsregulator av gener och styr en kaskadefekt hos bakterier (Snyder & Champness 1997, Jun & Jianping 2009). SpoT-proteinet syntetiserar och degraderar (p)ppGpp vid olika förhållanden. I normalt tillstånd (tillväxtfas) degraderar SpoT (p)ppGpp, så att aktiviteten av SpoT och RelA håller nivån av (p)ppGpp i jämvikt i cellen (Snyder & Champness 1997). Om aminosyrabrist uppstår i cellen, kommer SpoTs degraderingsaktivitet att inhiberas av SpoT1, men SpoT kan fortfarande syntetisera (p)ppGpp, vilket medför en ökad koncentration av (p)ppGpp (Maisonneuve *et al.* 2011). En höjd halt av (p)ppGpp är bakteriers adaptiva respons till stress från omgivningen. Denna höjda koncentration leder i sin tur till förhöjd koncentration av polyfosfat (polyP). PolyP är en linjär polymer som består av tio till hundratals fosfatmolekyler. Polyfosfatkinas (PPK) polymeriserar ett fosfat för varje ATP till polyP. Endo- och exo-polyfosfater (PPX) degraderar polyP till oorganiskt fosfat. Koncentrationen av polyP balanseras av PPK och PPX i en cell. Lon är ett specifikt ATP-beroende värmechocksprotein som ansvarar för ungefär 50 % av degraderingen av defekta proteiner i *E.coli* (Gottesman 1996, Snyder & Champness 1997). Lon degraderar alla antitoxiner som kodas från II TA-loci (Brzozowska och Zielenkiweicz 2013, Maisonneuve *et al.* 2011, Maisonneuve *et al.* 2013, Schmidl *et al.* 2007). Lon består av en ATPas-domän och en proteolytisk domän.

Under bakteriers tillväxtfas, påbörjar fria RelA och SpoT syntetisering av (p)ppGpp (Snyder & Champness 1997). Den förhöjda koncentrationen av (p)ppGpp leder till ackumulering av polyP via en inhiberande effekt av PPX som verkar proteolytiskt på polyP. PolyP är hittills

den enda kända aktiveraren av Lon (Kuroda *et al.* 1997 & Maisonneuve *et al.* 2011). PolyP fungerar som en direkt signalmolekyl som styr Lon till degradering av antitoxin, vilket i sin tur leder till att toxiner frigörs (se figur 8) (Kuroda *et al.* 1997).

TA-system är en kombination av en kaskadeffekt och en stokasticitet

Den biologiska processen för aktivering av Lon är väl beskriven (Maisonneuve *et al.* 2013, Snyder & Champness 1997). Aktivering av enzymet RelA sätter igång en kaskadeffekt som aktiverar polyP och sedan Lon, degraderar antitoxiner och får bakterierna att gå in i persistens. Persistenta bakteriers genom är identiska med vildtypsbakterier. Med samma genetiska förutsättning, kan i princip hela vildtypspopulationen gå in i ett vilande tillstånd. Om det sker, kommer hela populationen att överleva en antibiotikabehandling och de flesta antibiotika blir därmed ineffektiva. Men det sker inte, bara en liten andel av population blir persistenta. Vilka processer skulle kunna ligga bakom denna fenotypiska variation? Det kanske inte finns några allmängiltiga svar. Dagens forskare förklarar detta fenomen som en stokastisk induktion (Maisonneuve 2013, G. Wagner, muntligen). Ett stokastisk-system är icke-deterministiska (det vill säga, "random"). Så genetiskt identiska bakterier går slumpmässigt in i ett vilande tillstånd.

Persistenta bakterier är ett resultat av en kaskadeffekt och en stokastisk induktion.

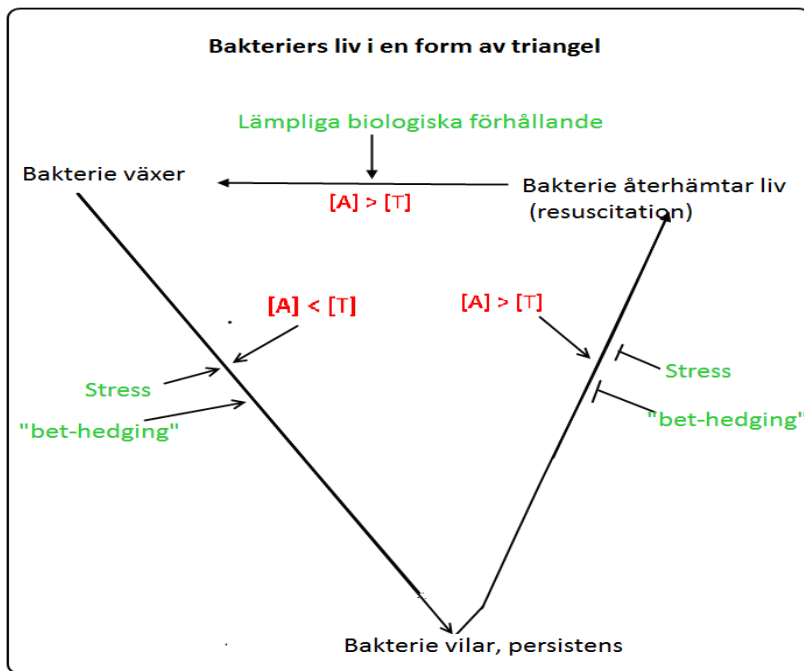
Uppkomsten av persistenta bakterier kan beskrivas som ett lotterispel: Många köper Triss och alla köpare har förutsättning att vinna; men bara några få vinner, slumpmässigt.

Återupplivning från persistens

Lon inhiberar cellulära aktiviteter genom degradering av antitoxiner och dessa har känsliga C-terminaler samt kort livstid. Detta ger förutsättning för att styra bakterier in i samt ut ur persistens. Men hur återupplivar bakterier sig från den persistenta fenotypen när den dåliga tiden är över? Från II TA-systemets struktur och mekanismer krävs minst två cellulära aktiviteter: inaktivering av Lon och en hög koncentration av antitoxiner.

Gerdes & Maisonneuve (2012) beskrev hur koncentrationen av antitoxiner stiger strax efter en avslutad antibiotikabehandling. Den cellulära translationen i persistens är extremt låg. Låg global translation antas gynna ett lågt [A]:[T]-förhållande. Det låga [A]:[T]-tillståndet frigör transkription av TA-loci, som i sin tur ger en hög TA-transkription. Antitoxin syntetiseras snabbare än toxin, vilket således ger en högre antitoxinnivå än toxinnivå i cellen.

Lon-medierad nedbrytning pågår i långsam takt på grund av avtagande aktivitet av RelA under återupplivningsprocessen. Enligt Snyder och Champness (1997), minskar (p)ppGpp-nivån när stresstillståndet är över. Eftersom RelA syntetiserar (p)ppGpp efter aminosyrabrist, så bromsas eller helt avstannas RelAs syntesaktivitet om näringsbristen eller andra stressfaktorer försvinner. Under en sådan situation blir nedbrytningsaktiviteten av SpoT dominant i cellerna och (p)ppGpp avtar på grund av låg halt av Lon. Dessutom är Lonaktiviteten ATP-beroende. Om cellens metaboliska aktivitet är väldigt låg, bör ATP-tillförseln vara väldigt långsam. Syntesen av antitoxiner är snabbare än Lons degraderingsaktivitet. Ökad antitoxinhalt och minskad Lonaktivitet säkerställer en snabb syntes och ansamling av antitoxin i cellerna, så toxinaktiviteterna upphör och bakterier kan återgå till en växande fenotyp (figur 8).



Figur 8: **En bakteries liv kan delas in i 3 faser.** Fas1: bakterier växer vid lämpliga biologiska förhållande, t.ex. näring, pH, temperatur. Fas2: bakterier kommer in i ett vilande tillstånd när koncentrationen av toxiner är högre än antitoxin (toxiner neutraliseras av antitoxiner). Fas3: bakterier återhämtar sig om koncentrationen av antitoxiner är högre än toxiner. Innanför triangeln visas bakteriers cellulära aktiviteter; utanför triangeln visas faktorer från omgivningen (egen figur).

Diskussion

TA system är en sofistikerad överlevnadsstrategi

Tydligt kan antitoxin och toxin reversera sin effekt snabbt och enkelt i bakterier (figur 8). Båda situationer är nödvändiga för bakteriens överlevnad. Vid god tillgång på näring kommer antitoxin att binda toxinet. Ökad stabilitet i TA-komplex ger bakterien möjlighet att växa exponentiellt. Vid en snabb förändring i omgivningen kommer fria, instabila och kortlivade antitoxiner direkt leda till ökad persistens-frekvens och därmed en högre överlevnadsgrad. Mekanismerna hos TA-systemet är snabba, effektiva och resurssnåla. II TA-system reflekterar bakteriers sofistikerade strategi för att utnyttja begränsade resurser maximalt vid olika förhållanden.

Figur 6 (Maisonneuve *et al.* 2013) bekräftar redundans av TA-loci. Det verkar som att varje TA-par har en jämn och parallell funktion vid uppkomsten av persistens (figur 6A). Varför bakterier slösar resurser/energi genom att ha många oberoende gener för ett och samma mål kan vara svårt att förstå. Räcker det inte med ett eller två TA-system i en cell? Bakteriella genom är alltid i snabb förändring genom evolution och genförluster och nyförvärv av DNA sker konstant. Bakterier borde genom evolutionen ha kunnat minska den genetiska bördan genom att ta bort flera TA-gener. Det är också energikrävande att ha överflödiga II TA-system, eftersom varje toxin måste neutraliseras konstant av ett antitoxin som kontinuerligt måste syntetiseras för att behålla rätt koncentration (högre [A] än [T]). Ju fler TA-par, desto mer energi/resurser kommer en bakterie att behöva lägga på II TA-system. Varför väljer bakterier att behålla så många typer II TA-loci genom evolutionens gång?

Vid tillväxtfas är persistens en form av "bet-hedging" hos bakterier. "Bet-hedging", vilket fritt översatt till svenska blir riskspridning, är en strategi som tillämpas av många organismer för

att öka sin överlevnad. Bakterier visar fenotypisk heterogenitet i en population med identiska genotyper (Maisonneuve *et al.* 2011). Den fenotypiska variationen mellan individer ökar sannolikheten för att åtminstone en individ ska överleva. Hos en population av bakterier är alltid en mycket liten fraktion av populationen vilande (persistenta), även om ingen aminosyrabrist eller andra stressfaktorer finns närvarande. Om någon ogynnsam händelse plötsligt sker, har den vilande populationen en möjlighet att klara sig och återskapa populationen. Ur denna aspekt är det värt att låta en liten andel av populationen bli persistenta även om det för tillfället är goda biologiska förutsättningar för tillväxt.

Vid stresstillstånd är specifik, känslig och snabb signalöverföring till Lon viktig. Varje TA-lokus ökar möjligheten till att en okänd aktiverande signal sänds ut. Ju fler TA-loci som är närvarande i en cell, desto mindre chans att signalen inte når fram. Varje TA-lokus arbetar parallellt för en spridning av stressresponser. Fasani *et al* (2013) studerade mängder av TA-system och frekvensen av persistenta fenotyper. De drog slutsatsen att ökning av TA-system i bakterier medför en förhöjd frekvens av persistens.

Alla mRNaser av *E.coli* visar likheter inom genetisk organisering, transkription och translationell reglering samt fysiologiska egenskaper. Dessutom kan deras funktion inhiberas av proteaset Lon. Det tyder kraftigt på att alla mRNaser har utvecklats genom konvergent evolution (Maisonneuve *et al.* 2011). Konvergent evolution verkar också vara en vanlig metod bland bakterier. Den kända kunskapen om II TA-systemen hos *M.tuberculosis* visar likhet i den reglerande mekanismen. Det är också flera TA-par med få cellulära proteaser som styr bildning av persistens och återupplivning, vilket är en adaptiv fördel då den är resurssnål.

En snabb genomgång av typ II TA-system ger insikten att II TA-systemet är reversibelt, omfattande och konvergent. Det är en sofistikerad överlevnadsstrategi hos bakterier.

Tillämpning av TA system i framtidens nya medicin

II TA-system är brett spridda hos prokaryota organismer, men är frånvarande hos eukaryota organismer, vilket skapar möjligheten att eliminera patogener genom att använda TA-system som molekyllära mål för nya läkemedel. Det är därför viktigt att utforska TA-system, förstå deras olika mekanismer och faktorerna bakom, och att hitta den gemensamma nämnaren för alla TA-system. I allmänhet utgör instabiliteten av antitoxin en molekyllär bas för TA-system, (p)ppGpp inducerad Lonproteolys är essentiellt för TA-system hos *E.coli K-12*. Hela TA-systemet ger värdefulla nya insikter som kan utnyttjas i framtidens nya antibiotika. Här är några förslag på framtida forskning:

De olika intermediärerna för signalöverföring av Lon är också intressanta. Om en signalväg kan blockeras så behålls Lon i låg koncentration vilket gör att antitoxinhalten blir högre och förhindrar persistens. Aktivering av Lon kräver tre direkta signalbärare: RelA, (p)ppGpp och polyP samt några indirekta faktorer: SpoT, PPK och PPX. Om nya antibiotika kan modifiera eller inhibera signalbärare kan Lon inte aktiveras, vilket kraftigt minskar frekvensen av persistens.

Resuscitationprocessen (d.v.s. att bakterierna lämnar det persistenta stadiet) är också intressant, men forskningsrapporter som berör ämnet är relativt få. Förståelse av processen kan leda till mediciner med förmågan att blockera resuscitation så att persistenta bakterier inte kan återgå till tillväxtfasen och orsaka en ytterligare infektion.

Avslutning

E.coli K-12 har en relativt enkel modell av II TA-system, men vissa mer elakartade bakterier som *S.aureus* och *M.tuberculosis* har många fler TA-par och deras aktiviteter är reglerade av flera olika proteaser. Deras signalöverföringsvägar och globala regulatorer skiljer sig också från *E.coli*. Det verkar som att varje bakterieart har skaffat sina egna differentierade II TA-system och cellulära proteaser genom evolutionens gång. Så tillämpningen av nya strategier mot II TA-system hos bakterier kommer troligen att vara artspecifika och inte universella. Framtida forskning kommer bland annat att utforska II TA-systemet hos *M. tuberculosis*.

Tack

Jag tackar Lage Cerenius, min handledare, för handledarskap och stöd under uppsatsarbetet. Professor Gerhart Wagner och Magnus Lundgren, som är expert inom TA system och bakterier, granskade teknisk information för uppsatsen. Jag är tacksam för deras hjälp! Jag tackar Lisa Björling Johansson, Christoffer Fransson, Hanne Carlsson, Fia Svensk, och Henrik Karlsson för deras hjälp med att rätta språket. Jag tackar också för hjälp från språkverkstadspersonalen: Lillemor Aronsson, Kristina Ohlsson, Kristina Asker.

Referenser

- Baum JA. 1994. Tn5401, a new class II transposable element from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology* **176**:2835-2845.
- Brown LB, Grigoriu S, Kim Y, Jennifer MA, Avenport A, Thomas KW, Peti W. 2009. Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: A novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an Antitoxin with Unique Properties. *PLoS Pathogens* **5**:e1000706.
- Brzozowska I, Zielenkiewicz U. 2013. Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis Plasmid **70**: 33-41.
- Chopra NS, Pathak A, Bhatnagar R, Bhatnagar S. 2013. Linkage, mobility, and selfishness in the MazF family of bacterial toxins: A snapshot of bacterial evolution. *Genome Biology and Evolution* **5**:2268–2284.
- Donegan NP; Thompson, Fu ZB, Cheung AL. 2010. Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPc in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **192**:1416-1422.
- Elizabeth MF, Matthew RH, Stora G. 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**: 579–589.
- Fasani RA, Savageau MA. 2013. Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E2528–E2537.
- Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphrey DP, Lilley KS, Salmond GPC. 2008. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *PNAS* **106**:894–899.
- Fozo EM, Hemm MR, Storz G. 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**:579–589.
- Gerdes K, Maisonneuve E. 2012. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci, *Annual Review of Microbiology* **66**:103–123.
- Gerdes K, Wagner G. 2007. RNA antitoxins *Current Opinion in Microbiology* **10**:117–124.
- Gottesman S. 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **30**:465–506.

- Jun W, Jianping X. 2009. Magic spot: (p) ppGpp. *Journal of Cellular Physiology* **220**:297–302.
- Kamada K, Hanaoka F, Burley SK. 2003. Crystal structure of the MazE/MazF complex. Molecular bases of antidote-toxin recognition. *Molecular Cell* **11**: 875–884.
- Kasari V, Mets T, Tenson T, Kaldalu N. 2013. Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* **13**:45.
- Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**: 8172–8180.
- Keren I, Mulcahy LR, Lewis K. 2012. Persister eradication: lessons from the world of natural products. *Methods in Enzymology*, **517**: 387-406.
- Kim JH, O'Brien KM, Sharma R, Boshoff HIM, Rehren G, Chakraborty S, Wallach JB, Monteleone M, Wilson DJ, Aldrich CC, Barry III CE, Rhee KY. 2013. A genetic strategy to identify targets for the development of drugs that prevent bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 19095–19100.
- Kint CI, Natalie V, Fauvart M, Micfhiels J. 2012. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in Microbiology*, **20**:577-585.
- Kuroda A, Murphy H, Cashel M, Kornberg A. 1997. Guanosine tetra and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**: 21240–21243.
- Snyder L, Champness W. 1997. Global regulatory mechanisms. *Molecular genetics of bacteria*, ss.329-331 ASM press, Washington.
- Madl T, Melderer LV, Mine N, Respondek M, Oberer M, Keller W, Khatai L, Zangger K. 2006. Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA. *Journal of Molecular Biology* **364**:170–185.
- Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **108**:13206-13211.
- Makarova KS, Wolf Y, Koonin EV. 2009. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct* **4**:19.
- Mikkil CD, Mikkil GJ, Gerdes K. 2009. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Molecular Microbiology* **75**:333-348.
- Niepa HRT, Gilbert LJ, Ren DC. 2012 Controlling *Pseudomonas aeruginosa* persister cells by weak electrochemical currents and synergistic effects with tobramycin. *Biomaterials* **33**:7356-7365.
- Overgaard M, Borch J, Gerdes K. 2009. RelB and RelE of *Escherichia coli* form a tight complex that represses transcription via the ribbon–helix–helix motif in RelB. *Journal of Molecular Biology* **394**: 183–196.
- Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. 2009. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genetics* **5**:e1000767.
- Sayed N, Nonin-Lecomte S, Réty S, Felden B. 2012 Functional and structural insights of a *Staphylococcus aureus* apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**: 43454-43463.
- Schmidt O, Schuenemann VJ, Hand NJ, Silhavy TJ, Martin J, Lupas AN, Djuranovic S. 2007. PrIF and yhaV encode a new toxin–antitoxin system in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. **372**: 894–905.

- Schoenberg D; Cunningham KS 1998, Characterization of mRNA Endonucleases
WWW-dokument: 1998.0708: <http://www.idealibrary.com>. Hämtad 2014-04-10.
- Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. 2006. Persisters:
A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology* **6**: 53–61.
- Szekeres S, Dauti M, Wilde C, Mazel D, Rowe-Magnus DA. 2007. Chromosomal
toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of
selection. *Molecular Microbiology* **63**: 1588–1605.
- Zhang, J., Zhang, Y. & Inouye, M. 2003. Characterization of the interactions within the
mazEF addiction module of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:
32300–32306.