



UPPSALA
UNIVERSITET

Förekomst och funktion av toxin-antitoxinsystem i *Mycobacterium tuberculosis*

En sammanfattande studie av toxin-antitoxinsystem
kopplat till persistens, latens och virulens

Erik Gudmunds

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Förekomst och funktion av toxin-antitoxinsystem i *Mycobacterium tuberculosis*

Erik Gudmunds

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Möjligheten hos bakterier att reglera sin tillväxt är avgörande för deras framgång som patogener, livet i värdorganismer kan ställa hårda krav på förmågan att överleva och spridas. *Mycobacterium tuberculosis* är en humanpatogen med möjligheten att nedreglera tillväxthastigheten under lång tid och orsaka en latent infektion som långt senare kan bli aktiv. I *M. tuberculosis* genom har 79 toxin-antitoxinsystem (TA-system) hittats. TA-system består av ett toxinprotein samt ett antitoxin som kan neutralisera toxinets effekt. Toxiner kan när de är aktiva begränsa tillväxt, som vid latent infektioner, och inducera bildandet av persistenta celler som har förhöjd förmåga att klara av de förhållanden som råder vid infektion. Kunskap om toxin-antitoxinsystem relaterad till latent infektion kan möjliggöra nya effektiva behandlingar för att bota tuberkulos. I det här arbetet behandlas toxin-antitoxinsystem i *M. tuberculosis* med avseende på deras egenskaper och funktion. Antalet toxin-antitoxinsystem i bakteriens genom har visat sig vara stort i jämförelse med nära släktingar samt andra liknande patogener. Systemen uttrycks under infektionslika förhållanden och har en signifikant påverkan på tillväxt i infektionsvärdar. Signalmolekylen (p)ppGpp har visats vara huvudregleraren av toxin-antitoxinsystemens aktivitet. För att kunna förstå *M. tuberculosis* speciella infektionsförmåga krävs en djupare förståelse om hur dess tillväxt regleras. Kunskapen kan i framtiden generera potentiella måltavlor för antibakteriella behandlingar, vilket kan vara ett steg mot att utrota denna globala patogen.

Inledning

Prokaryoter är den livsform som dominerar jordens biosfär, i nästan alla tänkbara miljöer finns representanter som kan leva och föröka sig. Vissa arter är kapabla till att snabbt byta från en miljö till en annan. För att klara av omfattande och snabba förändringar i tillväxtmiljö krävs ett dynamiskt och i hög grad reglerbart genom. Studerandet av genreglering har pågått länge och har utgjort en fundamental del i vår förståelse för hur liv baserat på DNA och gener fungerar. Reglering av genuttryck sker på flera olika nivåer och kan medieras av DNA, RNA, proteiner eller kombinationer av dessa.

Toxin-antitoxinsystem (TA-system) upptäcktes hos bakteriella plasmider där de fungerar som stabiliserande enheter av plasmidens förekomst i populationen (Ogura & Hiraga 1983, Gerdes *et al.* 1986) men har framför allt under 00-talet också påvisats fungera i global genreglering, cellmetabolism och tillväxtreglering under olika stressinducerande förhållanden (Gerdes *et al.* 2005, Bertram & Schuster 2014).

De vanligaste TA-systemen består av operoner innehållande två gener där en gen kodar för ett toxin (alltid ett protein) som har en inhiberande eller toxisk effekt på en cellulär process, t.ex. translationen, och ett antitoxin som kan inaktivera toxinet (Bukowski *et al.* 2013). Antitoxinet kan antingen utgöras av ett protein eller ett RNA. Baserat på antitoxinets karaktär har TA-systemen delats in i fem olika typer. Typ I: Antitoxinet är ett anti-sense RNA, vilket är ett

RNA som kan baspara med toxinets mRNA som förhindrar syntes av toxinproteinet. Typ II: Antitoxinet är ett protein som kan binda till och neutralisera toxinets aktivitet. Typ III: Antitoxinet är ett RNA som direkt kan binda till toxinet. Typ IV: Antitoxinet är ett antagonistiskt protein som kan interagera med samma målmolekyl som toxinet, men interagerar inte direkt med toxinet. Antitoxinets bindande till målmolekylen hindrar toxinets effekt. Typ V: Antitoxinet är ett ribonukleas (klyver fosfodiesterbindningar i RNA) som klyver toxinets mRNA (Cook *et al.* 2013).

Kromosomala TA-system har visat sig vara svåra att karakterisera på grund av att de finns i ett stort antal samt att deletionsmutanter där ett TA-system raderas från genomet inte visar någon specifik fenotyp (Wagner & Unoson 2012). Under de senaste åren har kunskapen om TA-systemens funktion ökat markant och bevis för att TA-system är involverade i bildandet av så kallade persistenta celler har framkommit. Denna sorts celler är genetiskt identiska med resterande majoritet av celler i en population men har en annorlunda fenotyp. Persistenta celler, som i vissa fall utgör upp till 1 % av den totala populationen vid normala förhållanden, är mer tåliga mot flera olika sorters stress såsom näringsbrist, syrebrist och närvaron av antibiotika (Maisonneuve *et al.* 2011a). Denna tålighet medieras av en nedreglering av cellmetabolismen. Majoriteten av generna som normalt finns uttryckta nedregleras medan en minoritet av generna uppregleras, däribland gener som kodar för TA-system (Keren *et al.* 2011). De persistenta cellerna inom en population tros utgöra en slags garanti för genotypens fortsatta överlevnad, då dessa är ”förberedda” på tillväxtbegränsade förhållanden, medan resten av populationen har normal tillväxthastighet men är känsligare för stressfaktorer (Maisonneuve *et al.* 2013). Karakteristiskt för en population som innehåller persistenta celler är att tillväxtinhiberingen av antibiotika sker i två olika faser. Den initiala celldödshastigheten är hög för att sedan när endast få celler finns kvar signifikant avta. Fenomenets förklaring tillskrivs de persistenta cellernas förhöjda antibiotikatolerans (Wen *et al.* 2014).

Mycobacterium tuberculosis som orsakar infektionssjukdomen tuberkulos är en mänsklig patogen vilken 2014 orsakade 1,5 miljoner människors död, totalt insjuknade 9,6 miljoner människor samma år (WHO 2015). Bakterien utgör alltså ett extremt utbredd världshälsoproblem och en utökad kunskap om dess livsstil och patogenitet är avgörande för utvecklandet av nya effektiva behandlingar. Karakteristiskt för *M. tuberculosis* är förmågan att utveckla latenta infektioner, en infektion där tillväxten är starkt begränsad, som är svårbehandlad och kan finnas kvar i årtionden (Dutta & Karakousis 2014).

Den snabbt växande mängden sekvensdata har lett till allt fler upptäckter av kromosomala TA-system, i de genom som sekvenserats av *M. tuberculosis* har det hittats 79 potentiella TA-system, varav minst 36 har verifierats experimentellt (Sala *et al.* 2014). Detta kan jämföras med *Salmonella typhimurium*, 8 potentiella TA-system, eller *Vibrio cholerae*, 13 potentiella TA-system, där båda i likhet med *M. tuberculosis* är humanpatogener (Pandey & Gerdes 2005). I en av *M. tuberculosis* närmaste släktingar, den icke-patogena *Mycobacterium smegmatis* har endast tre TA-system hittats. Utifrån denna kunskap är det inte helt godtyckligt att relatera *M. tuberculosis* höga antal TA-system till bakteriens speciella infektionsförmåga (Frampton *et al.* 2012). Som ett svar på detta utförs nu forskning för att kunna förklara TA-systemens funktion (exempel på referenser: Korch *et al.* 2009, Han *et al.* 2010, Albrethsen *et al.* 2013, Tiwari *et al.* 2015, Lee *et al.* 2015). Det grundläggande syftet till all denna forskning är att i slutändan komma på ett sätt att förhindra infektioner av *M. tuberculosis* eller bota tuberkulos.

En övergripande frågeställning till arbetet är: ”Vad har TA-system för funktion och evolutionär historia i *M. tuberculosis* och i andra bakterier?”. Det syftar till att sammanfatta vilka TA-system som finns i *M. tuberculosis*, hur de fungerar rörande reglering, interaktioner, mekanismer, deras evolutionära historia och vad de har för funktion i *M. tuberculosis* speciella livsstil. Denna kunskap sammanfattas sedan bland annat med en diskussion om hur TA-system kan utgöra måltavlor för antibakteriella behandlingar.

TA-system: en översikt

De olika typerna av TA-system har beroende på antitoxinets molekylära tillhörighet delats in i fem distinkta grupper. Medan toxinet uteslutande är ett protein kan antitoxinet vara någonting av följande: ett anti-sense RNA (typ I), ett protein (typ II), ett icke-kodande RNA (kodar inte för ett protein, typ III), ett antagonistiskt protein (typ IV), ett endoribonukleas (klyver fosfodiesterbindningar i RNA, typ V). I detta avsnitt presenteras typ II och typ IV vilka är de TA-system som hittats i *M. tuberculosis* (Goeders & Van Melderen 2014, Sala *et al.* 2014) och finns behandlat i resten av arbetet. Efter upptäckten 2011 (Tan *et al.* 2011) har endast ett fåtal typ IV system hittills beskrivits i litteraturen vilket är anledningen till att det behandlas endast kortfattat i avsnittet.

Typ II TA-system

Av de olika typerna av TA-system är det typ II som har studerats mest och finns i högst antal. I *M. tuberculosis* H37Rv (H37Rv är en stam av *M. tuberculosis*) är troligen 76 av 79 TA-system typ II, övriga tre är av typ IV (Sala *et al.* 2014). Typ II TA-system består av ett toxinprotein, ungefär 100 aminosyrarester stort, och ett antitoxin som också är ett protein. Antitoxinet kan binda till toxinet och inhibera toxinets effekt som utförs på någon cellulär process vilket ofta är degradering av mRNA eller inhiberandet av DNA-replikering. Som exempel kan nämnas VapC som degraderar mRNA och tRNA (Ahidjo *et al.* 2011) och MazF som både kan binda till topoisomeraser (enzymmer som förhindrar supercoiling i DNA) och degradera mRNA (Huang & He 2010).

TA-komplex är en benämning som används då antitoxinet är bundet till toxinet och inhiberar toxinets aktivitet. Dessa komplex kan vara av olika polymera karaktärer, t.ex. består VapBC30-komplexet av fyra VapC30 monomerer och fyra VapB30 monomerer och bildar alltså en heterooktamer (Lee *et al.* 2015). VapB är antitoxinet och VapC är toxinet, numret 30 specificerar ett system bland de 50 VapBC-systemen som finns i *M. tuberculosis* (Sala *et al.* 2014), se Figur 2 nedan. Denna slags nomenklatur gäller de flesta typ II-systemen, antitoxinet benämns med den av de två bokstäverna som kommer först i alfabetet, toxinet den efterföljande.

Typ II toxin

Den vanligaste sortens aktivitet som typ II toxin utövar i cellen är ribonukleasaktivitet, klyvandet av RNA. Detta kan ske på två sätt, antingen associerat med en ribosom eller som fria enzym. En familj av typ II TA-system vid namn RelE är exempel på ribosom-associerande ribonukleaser, med några undantag. Dessa binder till ribosomens A-plats vilket är den plats där aminosyraladdat tRNA initialt binder, där klyver de mRNA som processas av ribosomen. Detta sker med förhållandevis låg specificitet. RelE i *Escherichia coli* K12 klyver kodonen CAG, CUG och GCG vid 37 % av det totala antalet klyvningar (Goeders *et al.* 2013). YafQ, också i *E. coli* klyver specifikt vid AAA-kodon som efterföljs av A eller G (Prysak *et al.* 2009). Exempel på medlemmar i RelE-familjen som hittats i *M. tuberculosis* är

RelBE1, RelBE2 och RelBE3, dessa har hög sekvenslikhet i jämförelse med RelBE i *E. coli* (Korch *et al.* 2009).

Exempel på ribonukleostoxiner som inte associerar med ribosomen är MazF, VapC och HigB (Zhu *et al.* 2008, Ahidjo *et al.* 2011, Sala *et al.* 2013) varav alla finns representerade i olika antal i *M. tuberculosis*. Bland dessa finns exempel på hög specificitet; VapC4 klyver tre tRNA:s av totalt 45 i *M. tuberculosis* (Cruz *et al.* 2015). VapC30 klyver endast ett tRNA (Lee *et al.* 2015). MazF7 klyver specifikt mellan första och andra nukleotiden i sekvensen U'CGCU medan MazF3 klyver sekvenserna UU'CCU eller CU'CCU mellan andra och tredje nukleotiden (klyvningen markerad med apostrof). I studien där detta undersöktes gjordes också en sökning i alla gener i H37Rv efter de specifika sekvenserna och resultatet visade att sekvenserna var signifikant underrepresenterade i en del av de gener som tillhör genfamiljerna PE och PPE. Dessa genfamiljer har tidigare blivit kopplade till patogenitet vilket skulle kunna indikera att MazF3 och MazF7 har reglerande roller i genuttryck under infektion (Zhu *et al.* 2008).

Av de typ II toxin som inte är eller inte exklusivt är ribonukleaser är ParE och MazF de mest studerade. Båda har DNA topoisomeraser som målmolekyler. MazF4 i *M. tuberculosis* har visat sig vara ett speciellt toxin eftersom det har två målmolekyler. Det fungerar som ett ribonukleas men kan också binda till och inhibera DNA topoisomeras I, det enda typ I topoisomeraset i *M. tuberculosis*. Effekten av detta blir att negativ supercoiling som uppstår t.ex. vid transkription inte kan motverkas vilket i sig leder till tillväxtinhibering (Huang & He 2010).

ParE i *E. coli* har DNA gyras som målprotein vilket är det topoisomeras (typ II) som används vid replikering av DNA. DNA gyras är det enda typ II topoisomeraset i *M. tuberculosis* vilket gör det till en bra kandidat att inhibera för att nedreglera tillväxten (Aubry *et al.* 2004). Tre homologer av toxinet har hittats i *M. tuberculosis* varav ParE1 och ParE2 visade sig kunna inhibera celltillväxt när de sattes in i *E. coli*. Jämfört med de andra TA-systemen från *M. tuberculosis* som testades i samma studie var ParE1 och ParE2 effektiva, båda reducerade tillväxten med en faktor 10^{-6} (Gupta 2009).

Typ II antitoxin

Det som karaktäriserar typ II antitoxin är att de har en N-terminal med DNA-bindande strukturer och en C-terminal som kan binda till toxinet. De DNA-bindande motiven är involverade i antitoxinets autoregulering av TA-operonets uttryck (se nedan). C-terminalen hos många antitoxin tenderar att vara ostrukturerad när proteinet inte binder till toxinet medan det är mer strukturerat när det är bundet till toxinet. Detta tros vara kopplat till att antitoxin ofta består av sura aminosyror, vilket medför en ökad fallenhet för konformationsförändringar vid interaktion med det mer basiska toxinet (Brzozowska & Zielenkiewicz 2013). Denna egenskap kan vara kopplad till antitoxinens stabilitet (halveringstid i cellen), då ostrukturerade peptidsekvenser generellt känns igen och degraderas av proteaser (Mikita *et al.* 2013). Antitoxinet HipB i HipBA-systemet i *E. coli* regleras på ett liknande sätt, där C-terminalen inte struktureras vid bindandet men döljs av HipA (toxinet) vilket kan hindra proteasets åtkomst till antitoxinet (Hansen *et al.* 2012).

VapBC-system är de mest förekommande TA-systemen i *M. tuberculosis* (Sala *et al.* 2014) vilket också reflekteras i antalet studier gjorda på VapB antitoxin. Då VapB4 studerades visade det sig att den toxininhiberande egenskapen inte verkar vara beroende av enskilda

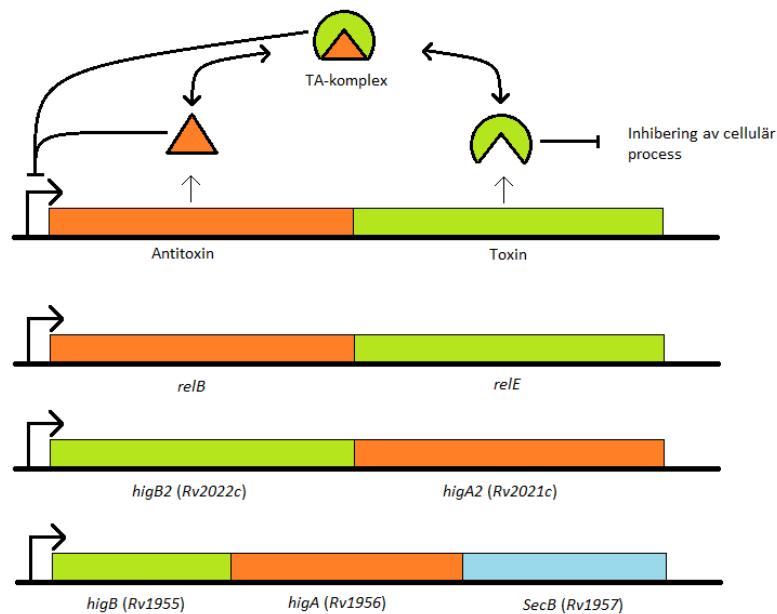
aminosyror eftersom substitutionsmutationer, där en aminosyra utbyts till en annan i proteinet, inte kunde identifieras (Jin *et al.* 2015).

Genetisk organisering och reglering av typ II TA-system

TA-systemen tillhörande typ II är med få undantag organiserade i tvågensoperon, där antitoxinet ligger sekvensmässigt uppströms toxinet. Oftast finns bara en promotor kopplat till antitoxinet som används till transkribering av båda generna. Promotorn autoregleras av antitoxinet, antingen självt eller med toxinet som co-repressor. Detta innebär att när TA-komplex är inaktiverade, då antitoxin och toxin är bundna, är uttrycket av ett TA-operon lågt. Repressoraktiviteten från antitoxinet medieras av dess DNA-bindande motiv vilka kan vara av flera olika typer beroende på antitoxinets familjetillhörighet (Gerdes *et al.* 2005). Figur 1 visar en grafisk återgivning av ett typiskt TA-operon, dess reglering, samt två exempel på de undantagsfall som finns.

TAC (Toxin-Antitoxin-Chaperone), som är ett av undantagen för organisering av TA-operon, är ett trekomponentsystem i *M. tuberculosis* (Figur 1). Det består av ett HigAB-system som är beroende av chaperonet SecB. Chaperoner är en grupp proteiner som kan hjälpa till att vecka och stabilisera andra protein. I fallet TAC stabiliseras antitoxinet HigA av SecB vilket förhindrar dess nedbrytning. I en SecB deletionsmutant (SecB raderat från genomet) där både HigA och HigB fanns närvarande observerades en reducerad tillväxt vilket indikerar att chaperonet SecB är involverat i systemets funktion (Bordes *et al.* 2011).

VapBC i *M. smegmatis* följer samma mönster som RelBE i Figur 1. För att undersöka om systemet verkligen var autoreglerande av antitoxinet konstruerades en mutant som saknade antitoxingenen på kromosomen men på en plasmid hade VapBC-promotorn tillsammans med enzymet β -galaktosidas (ett reporterprotein). I de celler som saknade antitoxinet erhöles en högre koncentration av reportergen, vilket indikerar att i frånvaro av antitoxinet uppreglas uttrycket (Robson *et al.* 2009).



Figur 1. Överst: en generell schematisk illustration över hur regleringen av TA-operon går till. Den vinkelade pilen indikerar promotorn, varefter antitoxingenen följer och sedan nedströms toxingenen. Proteinprodukten från antitoxingenen kan binda och nedreglera transkription från promotorn, antingen ensamt eller med toxinet bundet, detta indikeras av streck som avslutas med ett vinkelrätt streck. Bindandet mellan toxin och antitoxin sker i en jämviktsreaktion, vilket indikeras av dubbelriktade pilar. Näst överst: TA-systemet RelBE är ett representativt system för hur de flesta TA-system är organiserade. Näst underst: HigAB2 i *M. tuberculosis* är ett omvänt system, där toxinet positionerar närmast promotorn. Underst: TAC-systemet (Toxin-Antitoxin-Chaperone) i *M. tuberculosis*. För detaljer, se den löpande texten (baseras på Figur 2 i Pandey & Gerdes 2005 och Figur 1 i Sala *et al.* 2013).

Typ IV TA-system

Toxin-antitoxinsystem av typ IV verifierades år 2011 då det publicerades en studie om YeeUV (Tan *et al.* 2011). När sekvensdata analyserades indikerades det att *yeeV* skulle kunna ingå i ett TA-operon, där det fanns en gen uppströms samt en promotor. Denna gen var *yeeU* som visade sig koda för ett antitoxinprotein. Det som skiljer typ IV system från typ II är att det inte sker någon direkt interaktion mellan antitoxinet och toxinet i typ IV. Antitoxinets inhiberande effekt utgörs av dess förmåga att binda till samma substrat som toxinet (Masuda *et al.* 2012).

YeeV-toxinet har två cellskelettproteiner som målmolekyl, FtsZ och MreB, som medverkar bland annat vid celledelning. När YeeV-proteinet överuttrycks bildas deformerade celler och celltillväxt upphör (Tan *et al.* 2011). Som tidigare nämnts har tre potentiella typ IV system hittats i *M. tuberculosis*, men dessa har hittills inte verifierats experimentellt (Sala *et al.* 2014) vilket gör att de inte beskrivs ytterligare här.

Metoder för att studera TA-system

Verifieringen av TA-system sker oftast genom att TA-operonet raderas från kromosomen med hjälp av molekylärgenetiska metoder varpå olika plasmider transformeras in i cellerna. På dessa plasmider finns antingen antitoxingenen eller toxingenen av intresse, eller båda två. Generna placeras under reglering av en inducerbar promotor, t.ex. *lacP* (*lac*-operonets promotor). På detta sätt kan genuttrycket kontrolleras och styras till att ske endast då promotorn är aktiv vid tillväxt på ett speciellt medium eller liknande. När endast toxinet finns

på plasmiden, förväntas en lägre tillväxt jämfört med vildtypen (samma stam med samma plasmid som nu saknar TA-generna), och när antitoxinet också finns med förväntas tillväxtfenotypen vara av vildtypkaraktär.

M. tuberculosis har en generationstid på 20-24 timmar medan den snabbväxande släktingen *M. smegmatis* har en generationstid på 3 timmar. Den långa generationstiden hos *M. tuberculosis* innebär att det tar mycket lång tid att skapa genetiska varianter, t.ex. deletionsmutanter där en eller fler gener raderats. *M. smegmatis* används därför i relativt stor utsträckning som en modellorganism för *M. tuberculosis* (Smith 2003). *E. coli* har en generationstid på cirka 20 minuter. Också *E. coli* används som modellorganism för att studera TA-system i *M. tuberculosis*. Detta görs genom att ta gensekvenserna för ett TA-system i *M. tuberculosis* och sedan stoppa in dessa på en plasmid i *E. coli*. Slutsatserna kan komma att begränsas genom att TA-systemet studeras i en annan bakterieart, men i huvudsak är målmolekylerna så pass konserverade, t.ex. DNA gyras, att effekten av TA-systemet syns trots artskillnaden.

TA-system i *M. tuberculosis*

Det höga antalet TA-system i *M. tuberculosis* i jämförelse med andra humanpatogener gör frågan kring dess funktion och ursprung relevant. I detta avsnitt behandlas ursprunget och distribueringen av TA-system i *M. tuberculosis* samt besläktade arter. Syftet är att understryka antalet och att visa på att detta stora antal är kopplat till de arter inom släktet *Mycobacterium* som kan orsaka tuberkulos. Avsnittet inleds med bakgrund om *M. tuberculosis* speciella infektionsförmåga.

***M. tuberculosis* patogenitet**

Utöver förekomsten av multiresistenta varianter av *M. tuberculosis* försvåras behandling i och med dess egenskap att övergå i ett latent stadium. Detta karaktäriseras, i likhet med persistenta celler, av låg eller ingen tillväxt men med fortsatt levnadsförmåga, inom vad som kallas granulomer i lungorna eller andra delar av kroppen. Granulomer är aggregationer av både döda och levande makrofager och andra sorters immunceller som innesluter bakterien för att förhindra aktiv infektion (Ernst 2012). En latent infektion är svår att upptäcka eftersom den infekterade saknar symptom, endast histopatologiska (undersökning av sjuk kroppsvävnad) analyser kan avgöra dess förekomst. Under mycket lång tid kan symptom frånvara men möjligheten finns att infektionen aktiveras när som helst under den infekterades livstid. Vid immunosuppressiva tillstånd, t.ex. vid HIV-infektion, är det mycket vanligt att bakterien övergår från det latent stadium till det aktiva och orsakar en sekundär infektion. Under aktiv infektion lever och förökar sig patogenen intracellulärt i makrofager (Dutta & Karakousis 2014).

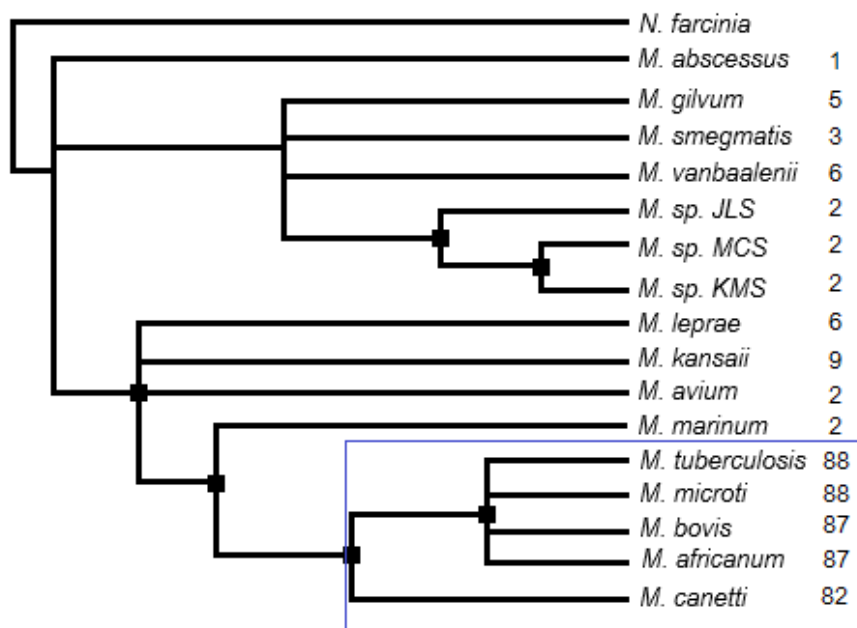
Evolution av TA-system

Ramage *et. al.* 2009 analyserade med bioinformatiska metoder distributionen och evolutionen av TA-system inom släktet *Mycobacterium*. Antalet TA-system i de arter som ingår i det så kallade *Mycobacterium tuberculosis*-komplexet (MTBC) är avsevärt högre i antal jämfört med andra arter inom släktet (Figur 2). Samtliga arter inom det här komplexet kan orsaka tuberkulos men *M. tuberculosis* står för majoriteten av sjukdomsfallen. Observera att antalet (88) som hittades i denna studie inte överensstämmer med antalet (79) som visas i Figur 3. Anledningen är att de två studierna använde olika bioinformatiska tillvägagångssätt för att i

genomdata upptäcka TA-systemen. Det höga antalet väcker intressanta frågor om att antalet TA-system korrelerar med bakteriens patogena förmåga.

Olika antal TA-system i *Mycobacterium* spp.

Mycobacterium marinum är en fiskpatogen som inte ingår i MTBC. I *M. marinum* hittades endast två stycken TA-system. *Mycobacterium leprae*, bakterien som orsakar sjukdomen lepra, lever som en intracellulär patogen i likhet med *M. tuberculosis*. *M. leprae* har sex TA-system. Dessa skillnader i antalet TA-system kan potentiellt förklara hur *M. tuberculosis* har evoluerat som art från andra mykobakterier och hur dess speciella tillväxt inom sin sjukdomsvärd har uppkommit (Ramage *et al.* 2009).



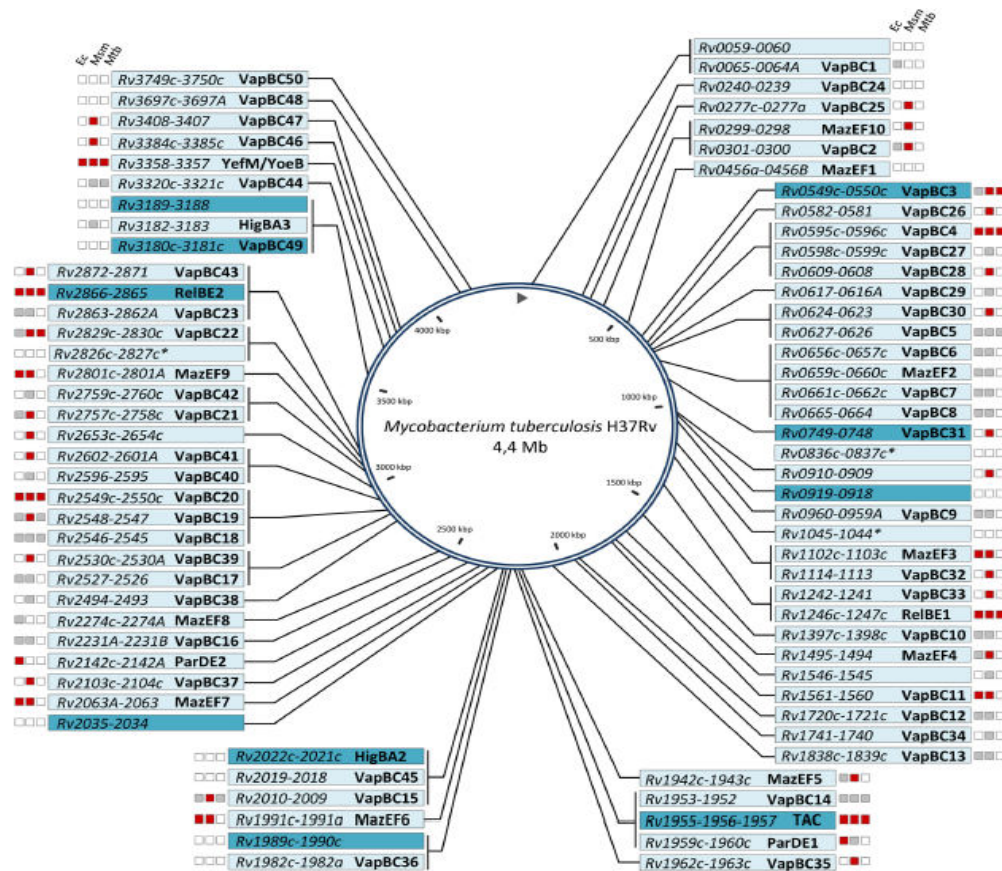
Figur 2. Fylogenetiskt träd över medlemmar i *Mycobacterium* spp. baserat på 16S rRNA. *Nocardia farcinia* fungerar som rot. Till höger syns antalet TA-system som hittades av Ramage och medarbetare år 2009 i respektive art. Senare uppgifter kan eventuellt tillskriva vissa arter andra antal. I den blå rutan syns de arter som är medlemmar i MTBC. Observera att alla medlemmar i släktet *Mycobacterium* inte är med i fylogeniaanalysen.

Slutsatser som är rimliga att dra utifrån den ojämna distributionen inom släktet är att TA-systemen inte i första hand ärvt vertikalt, alltså från kromosom till kromosom (till skillnad från horisontell genöverföring), i artikeln (Ramage *et al.* 2009) föreslås istället superintegriner som förklaring. Dessa fungerar som stora genetiskt överförbara element innehållande ett antal godtyckliga gener samt för integriner specifika gener och sekvenser som möjliggör dess integrering i en bakteries genom (Rowe-Magnus *et al.* 1999).

Överflöd av TA-system hos *M. tuberculosis*

Den speciella tillväxten som denna patogen har samt kunskapen om att i dess genom finns ett stort antal TA-system väcker intressanta frågor. Har redundansen, det upprepande antalet TA-system, en betydelse? I Figur 3 visas alla de TA-system som upptäckts i den senaste mer omfattande bioinformatiska analysen (Sala *et al.* 2014) vilket ger en uppfattning om hur TA-

systemen är fördelade på kromosomen, deras antal och vad som hittills har kunnat fastställas om några av systemen.



Figur 3. Kromosomkarta över TA-system som finns i *M. tuberculosis*. Totalt 79 konfirmerade eller föreslagna system. 67 av dem representerar en definierad familj: 50 VapBC, 10 MazEF, 1 YefM/YoeB, 2 RelBE, 2 HigBA, 2 ParDE, 1 TAC, 3 potentiella typ IV system (markerade med asterisk), 8 system som inte karaktäriserats. 63 av systemen har blivit experimentellt undersökta varav 37 har visats funktionella i antingen *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* eller *E. coli*, detta visas intill varje system i form av kvadrater med olika ifyllning. De röda kvadraterna står för ”tillväxtinhibering”, gråa för ”ingen tillväxtinhibering” och vita för ”inte testat”. Kvadraten längst till vänster representerar *E. coli*, mitten *M. smegmatis* och till höger *M. tuberculosis*, se ovan delen av figuren för visuell beskrivning av vilken kvadrat som tillhör vilken art. De system som är markerade med mörkblå bakgrund har visats vara överuttryckta i persistenta celler (se nedan). Figuren är tagen från (Sala *et al.* 2014, Open access).

TA-systemens funktion

I detta avsnitt behandlas TA-systemens funktion i *M. tuberculosis*, vilket generellt tycks vara att delta i tillväxtreglering som svar på olika tillväxtförhållanden. Frågor som återstår att svara på är till exempel: Hur och när aktiveras TA-system? Hur är TA-system kopplat till persistens? Vad reglerar aktiveringen av TA-system? Den litteratur som försöker svara på dessa frågor sammanfattas här.

TA-systemens uttryck och aktivering

För att utforska TA-systemens funktion är det intressant att veta när TA-systemen finns uttryckta i bakterien och hur de aktiveras. I syfte att ta reda på detta analyseras transkriptom och proteom hos bakterier under olika sorters förhållanden, t.ex. näringsbrist eller syrebrist.

Ett transkriptom utgörs av alla mRNA som finns i en cell vid en viss tid och ett proteom utgörs av alla proteiner som finns i en cell vid en viss tid. Uttrycket av TA-systemen under normala tillväxtförhållanden karaktäriseras av antitoxinens repression av promotorerna, uttrycksnivåerna är således låga och TA-system är inaktiverade. Detta innebär att det vid proteom-/transkriptomstudier blir fördelaktigt att upptäcka TA-system som uttrycks i högre grad vid olika sorters förhållanden. Uttrycket som sker vid normala förhållanden används som en jämförande referens för att se om uttrycket är högre.

Molekylära mekanismer för aktivering

Vad som på molekylär nivå aktiverar TA-system i *M. tuberculosis* är inte klarlagt. Proteaser är de rimligaste kandidaterna men har inte kunnat kopplas till degradering av antitoxin specifikt i *M. tuberculosis*. I *E. coli* degraderas antitoxin av Lon-proteaset (Maisonneuve *et al.* 2013) Persistens induceras i *E. coli* av TA-system som i sig regleras av proteaser (Maisonneuve *et al.* 2011a), för att koppla detta till *M. tuberculosis* kan nämnas att vissa TA-system är uppregerade i persistenta celler, se nedan.

Uttryck av TA-system under olika tillväxtförhållanden

Tillväxtförhållanden som aktiverar TA-system och dess uttryck har kunnat identifieras. Vid tillväxt under näringsbrist, som sker vid infektion av makrofager (Dutta & Karakousis 2014), höjdes genuttrycket hos femton TA-proteiner (Tabell 1; Albrethsen *et al.* 2013). Det är intressant att av dessa TA-proteiner utgörs två stycken av antitoxin (VapB32 och ParE2). Detta kan innebära, med avseende på TA-operoners autoreglering (se det tidigare avsnittet ”Typ II TA-system”) att de respektive TA-operonerna nedregleras. Det betyder också att om det är proteaser som aktiverar TA-system genom proteolys av antitoxin, som i *E. coli*, så sker denna process selektivt. Vissa antitoxin bryts ned medan vissa lämnas och kan på något sätt också öka i uttryck.

Tabell 1. TA-system som ökade i koncentration då *M. tuberculosis* utsattes för näringsbrist, i jämförelse med uttrycket av proteiner vid normal näringstillgång.

TA-protein	Ökningsfaktor
VapC4	10,6
VapC27	4,7
VapC5	4,0
VapB52	100
VapC13	100
MazF6	4,5
VapC37	4,9
ParE2	3,6
VapC38	100
VapC39	8,0
VapC19	8,6
VapC41	13,4
VapC22	100
RelE2	100
VapC44	12,4

Vid tillväxt under syrebrist, som sker då patogenen infekterar en värd (Via *et al.* 2008), visades det att VapBC15 och HigAB1 (Ramage *et al.* 2009) samt MazF3 och VapB24 (Zhu *et al.* 2010) uttrycktes i större mängd. Genuttryck från celler som infekterat mänskliga makrofager analyserades och visade ett förhöjt uttryck av VapBC3 och VapBC11 samt RelBE1, RelBE2 och RelBE3 (Korch *et al.* 2009, Ramage *et al.* 2009). Resultaten fastställer att TA-system åtminstone finns uttryckta vid stresstillstånd som råder vid infektion samt vid faktisk infektion av människoceller.

De olika studierna som analyserar proteinprofiler under olika tillväxtförhållanden visar att icke-relaterade toxin och antitoxin kan uppregleras samtidigt. Detta skulle kunna tyda på "cross-talk" mellan TA-system, att ett toxin eller ett antitoxin påverkar regleringen eller aktiviteten av ett annat TA-system. "Cross-talk"-fenomenet mellan TA-system är dock under diskussion, studier finns som tyder på hög specificitet mellan toxin och antitoxin (Ramirez *et al.* 2013) men det finns också studier som visar att antitoxin från ett operon kan neutralisera aktiviteten av ett toxin från ett annat operon. MazF3 och MazF1 (båda är toxin) visades kunna interagera med antitoxin tillhörande VapB-familjen (Zhu *et al.* 2010).

Persistens

Det kan vara genom persistenta celler som latent tuberkulos kan bildas. När *M. tuberculosis* infekterar en människa bildas i cirka 90 % av fallen en latent infektion. De bakterier som orsakar infektionen överförs via luftburna slemdroppar från en individ med aktiv infektion, där bakterierna har hög eller normal tillväxt (Dutta & Karakousis 2014). Den latent infektionsformen har, i likhet med persistens, egenskapen att tillväxten är starkt nedreglerad. Det har visat sig att både i persistenta celler och i celler som utsätts för tillväxtförhållanden som liknar de vid latent infektion finns TA-system uttryckta och aktiva (Keren *et al.* 2011, Albrethsen *et al.* 2013). Detta gör det intressant att undersöka om en koppling finns mellan persistens och latent infektion.

Transkriptom hos persistenta M. tuberculosis-celler

För att undersöka relationen mellan TA-systemen och bildandet av persistens gjordes en transkriptomanalys av persistenta celler i en växande kultur av *M. tuberculosis* H37Rv (Keren *et al.* 2011). Antalet persistenta celler ökade med tiden och kunde korreleras till tillväxtfas. Vid exponentiell tillväxt var antalet lägre än vid stationär tillväxt, då antalet celler i kulturen varken ökar eller minskar (eng. steady state).

Det totala transkriptomet vid ovanstående studie visade att majoriteten av generna nedreglerades i persistenta celler, 1408 av dem tvåfaldigt och 628 fyrfaldigt, medan 282 och 68 uppreglerades respektive två- och fyrfaldigt vid 14 dagar. Bland de gener som nedreglerades var många involverade i metaboliska processer, t.ex. respirationen, glykolysen och pyruvatmetabolism. Detta resultat visar att i kulturer av *M. tuberculosis*, där alla celler är genetiskt identiska, finns två sorters fenotyper med stora skillnader i genuttryck. Bland de gener som var uppreglerade i persistenta celler fanns 10 stycken TA-system (Keren *et al.* 2011). Eftersom undersökningen baseras på mRNA finns både toxin och antitoxin representerade i vart och ett av systemen. Det kan vara av intresse att göra samma studie med avseende på proteom i persistenta celler. Antitoxin kan finnas utan sitt respektive toxin eller *vice versa*, vilket är intressant vid undersökandet av uttrycksmönster och funktioner hos TA-system.

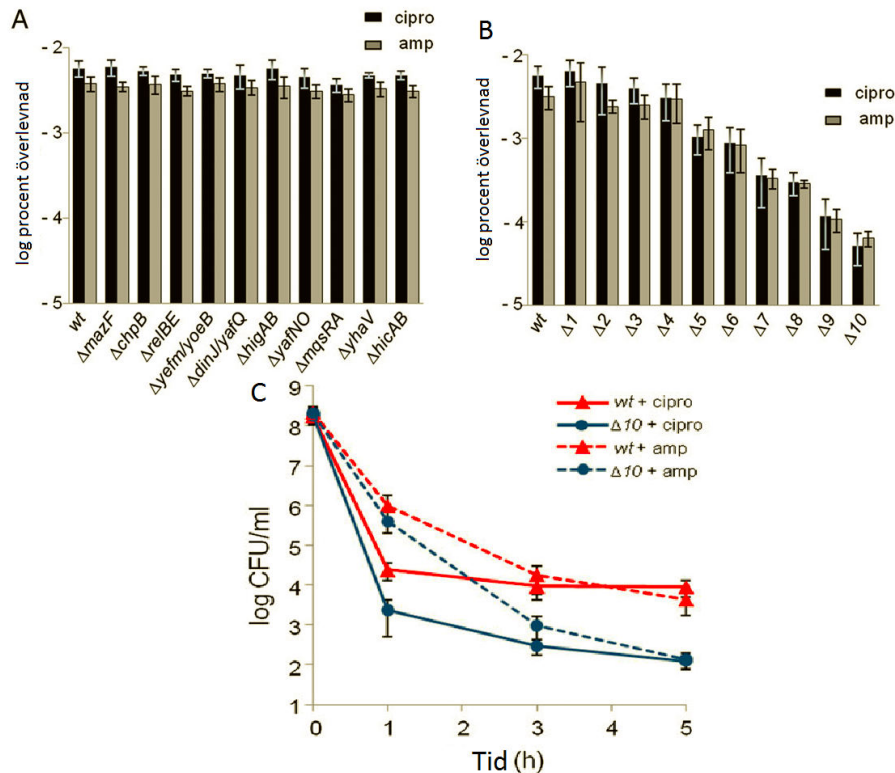
TA-system och persistens i M. tuberculosis

Experimentellt undersökande studier där TA-system direkt kopplas till persistens är få men resultaten av dessa är intressanta. I *M. smegmatis* finns fyra TA-system VapBC, MazEF och phd/doc. VapBC konfirmerades först vara ett TA-system i *M. smegmatis*, då överuttryck av VapC inhiberade celltillväxt men effekten kunde hindras genom uttryck av VapB. Toxinet VapC delar 81 % sekvenslikhet med VapC30 från *M. tuberculosis* baserat på BLAST (eng. Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.* 1990). Vidare visade det sig att en mutant där VapBC raderats var oförmögen att klara av brist på kalcium. Vildtypen visade efter näringsbristen normal tillväxt medan mutanten var oförmögen att fortsätta växa. När mutanten komplementerades med ett VapBC-loci på en plasmid erhöles vildtypens fenotyp. Detta indikerar att VapBC-systemet är essentiellt för *M. smegmatis* för att kunna växa efter en förlängd (64 h) näringsbrist. Förmågan förklaras av att hos vildtypen finns persistenta celler närvarande i populationen som inte påverkas av näringsbristen och kan överleva den, medan mutanten inte har det, varpå hela populationen dör av näringsbrist (Demidenok *et al.* 2014).

Liknande resultat som ovan erhöles då en trippelmutant av *M. tuberculosis*, där MazEF3, MazEF6 och MazEF9 deleterats, utsattes för olika antibiotika vid tillväxt i medium. Då tillväxten var i mitten av den exponentiella fasen överlevde 15-, 7- och 6-faldigt färre celler i deletionsmutanten jämfört med vildtypen för respektive tillsats av levofloxacin, gentamycin och rifampin (antibiotika). Detta undersöktes genom att ta prover från kulturen och sedan låta dem växa på plattor för att bestämma antalet celler per volymenhet i den ursprungliga kulturen. Liknande resultat erhöles då en kultur i tidig exponentiell tillväxtfas undersöktes. När mutanten sedan MIC-testades, ett test där den minimala inhiberande koncentrationen av antibiotika fastställs som ett mått på dess förmåga att inhibera bakterietillväxt, erhöles ingen skillnad mellan trippelmutanten och vildtypen. Detta faktum tyder på att den förhöjda känsligheten för antibiotika inte orsakas av TA-systemen i sig utan har uppkommit på annat sätt. Det större antalet överlevare i vildtypen än i trippelmutanten tillskrivs vildtypens förmåga (eller ökade förmåga) att bilda persistenta celler (Tiwari *et al.* 2015).

Persistens i E. coli

Studier i *E. coli* har visat att antalet TA-system har en effekt på bildningen av persistenta celler vid antibiotikabehandling i kultur (Maisonneuve *et al.* 2011a). Ett bibliotek med TA-mutanter gjordes i *E. coli*, från deletion av ett TA-system upp till deletionen av 10 system av totalt 11 stycken. Samtliga av de tio representanterna är ribonukleaser. Vid fyra TA-deletioner visade sig en signifikant minskning i antalet persistenta celler, vid en annan kombination av deletioner krävdes endast två deletioner för en signifikant minskning. Detta jämfört med vildtypen. Den generella trenden visade tydligt att ju fler TA-deletioner desto lägre antal persistenta celler bildades (Figur 4). Då alla tio TA-systemen var raderade skedde en 100–200-faldig minskning i antalet persistenta celler.



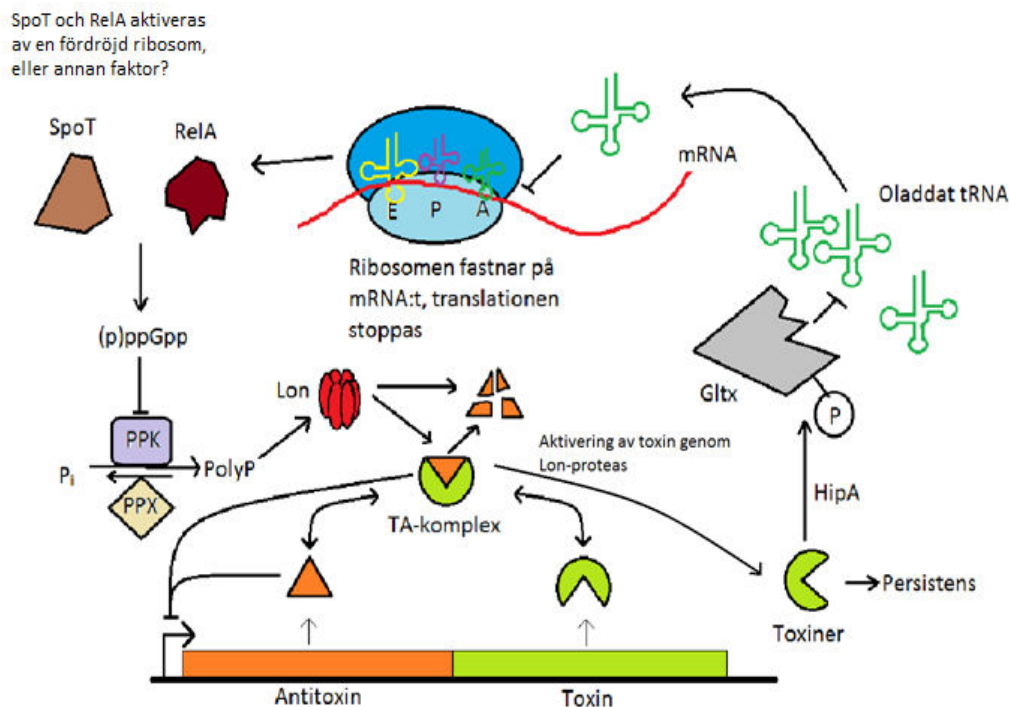
Figur 4. Resultat som visar att TA-system fungerar synergistiskt vid bildandet av persistenta celler i *E. coli*. Symbolen Δ (delta) symboliserar en eller flera deletioner. A) Antalet persistenta celler av stammar med endast ett deleterat TA-system efter antibiotikabehandling under fem timmar. Vildtypen (MG1655) benämns "wt" och fungerar som referens. Antalet persistenta celler mäts i antalet överlevande efter antibiotikabehandling. Skalan är logaritmisk i procent överlevande av det ursprungliga antalet celler i kulturen. B) Antalet persistenta celler vid successiv ökning i antalet TA-system som deleterats från de olika stammarna. C) Förändringen i antalet celler i en kultur över tid vid behandling med ciprofloxacin och ampicillin. Stammar som jämförs är $\Delta 10$ -TA-mutanten och vildtyp. Figuren hämtad från (Maisonneuve *et al.* 2011a, Open access).

Resultaten tyder på att TA-system fungerar mer eller mindre synergistiskt (Maisonneuve *et al.* 2011a). I studien undersöktes också relationen mellan Lon-proteaset och TA-systemen. Vid deletioner av Lon-proteaset minskade antalet persistenta celler samt vid kontrollerat uttryck av proteaset i vildtypen, genom en inducerbar promotor, ökade antalet persistenta celler. Då Lon-proteaset uttrycktes på samma kontrollerade sätt i minus 10-mutanten sågs ingen signifikant skillnad i antalet persistenta celler. Resultatet visar att Lon direkt reglerar TA-systemens aktivitet och persistens i *E. coli* (Maisonneuve *et al.* 2011a).

Signalmolekylen (p)ppGpp reglerar persistens i *E. coli*

Av Maisonneuve *et al.* som nämndes ovan fortsattes studierna men nu inriktade på hur Lon-proteaset aktiveras och regleras. Lon kan aktiveras av polyfosfat (PolyP; Kuroda *et al.* 2001) vilket är en polymer av oorganiskt fosfor som består av hundratals fosfatmolekyler. PolyP syntetiseras av enzymet polyfosfatkinas (PPK) och bryts ned av exopolyfosfatas (PPX). PPX regleras av signalmolekylen pentaguanosinfosfat ((p)ppGpp), en molekyl som är involverad i ett annat translationsreglerande system kallat stringenta responsen som fungerar bland annat vid aminosyrabrist (Jain *et al.* 2006). Maisonneuve *et al.* 2013 visade att vid bindandet av (p)ppGpp till PPX inhiberas den hydrolytiska förmågan (förmågan att bryta ned (p)ppGpp) varpå PolyP ackumuleras i cellen. PolyP som binder till Lon-proteaset aktiverar dess

proteasaktivitet, vilket bland annat involverar degradering av antitoxin, som beskrivits ovan (Maisonneuve *et al.* 2013). Resultaten från studien samt en uppföljande studie (Germain *et al.* 2015) resulterade i att en modell formulerades som beskriver hur (p)ppGpp fungerar som central reglerare av TA-systemens aktivitet och därmed också persistens (Figur 5).



Figur 5. Schematisk bild över hur persistens regleras med TA-system som effektiv utförare samt hur dessa regleras av koncentrationen (p)ppGpp i cellen. Figuren bör läsas med den ribosomen som utgångspunkt och sedan fortsätta enligt pilarna. Den högra delen av figuren visar den potentiella återkopplingsloop som HipBA-systemet kan utgöra för att styra koncentrationen (p)ppGpp.

Koncentrationen (p)ppGpp i populationens celler har funnits vara olika vilket bekräftar kopplingen till persistens. Från mikroskopstudier där koncentrationen av molekylerna mättes med hjälp av ett reportersystem visades en slumpmässig ökad koncentration i cellerna med en frekvens på $4,86 \times 10^{-4}$ av totalt 150000 undersökta celler. (p)ppGpp syntetiseras av enzymerna RelA och SpoT. *relA* med en kontrollerbar promotor tillsattes till *E. coli* K12 (vildtyp) på en plasmid. Då promotorn inducerades, alltså då *relA* uttrycktes i större mängd och koncentrationen av (p)ppGpp ökade, kunde en ökad mängd persistenta celler observeras (Germain *et al.* 2015).

Hur koncentrationen av (p)ppGpp kontrolleras i detalj återstår att upptäcka. Ett intressant fynd är att TA-systemet HipBA har visat sig kunna öka koncentrationen (p)ppGpp, detta genom att måltavlan för HipA-toxinet är enzymet glutamyl tRNA syntetas (GltX) vars uppgift är att ladda aminosyran glutamat till sitt specifika tRNA. HipA inhiberar GltX vilket resulterar i ackumulering av oladdat tRNA^{Glu}, detta i sin tur aktiverar RelA som börjar syntetisera (p)ppGpp (Maisonneuve *et al.* 2013). HipBA utgör således en positiv återkopplingsloop där koncentrationen (p)ppGpp upprätthålls och fortsätter att inducera aktiveringen av TA-system, inklusive HipA, som i sin tur inhiberar translation och därmed håller RelA aktivt. Återkopplingsloopen finns med i Figur 5.

(p)ppGpp-metabolism i M. tuberculosis

Med modellen i Figur 5 som utgångspunkt är det relevant att undersöka metabolismen av (p)ppGpp i *M. tuberculosis*. Flera studier av detta har gjorts men har inte direkt involverat TA-system. I ljuset av modellen kan viktiga kunskaper finnas att hämta där (p)ppGpp i *M. tuberculosis* studeras specifikt med avseende på TA-system.

En stam av *M. tuberculosis* där RelA (syntetiserar (p)ppGpp) raderats från genomet som infekterade möss visade signifikanta skillnader i infektionsförmåga jämfört med vildtypen. Granulomer i möss infekterade av deletionsmutanten var både färre och mindre i storlek, och uppvisade en begränsad förmåga att fortsätta växa under infektionstiden. Rörande morfologi och histologi i lungor och njurar fanns slående skillnader. För att undersöka vad RelA har för genreglerande roll utfördes en transkripomanalys av celler vid näringsbrist vilken visade att det fanns skillnader mellan vildtypen och mutanten i genuttryck (Dahl *et al.* 2003). Dessa skulle kunna förklaras genom att RelA-mutanten saknar förmågan att genomgå den stringenta responsen, men skulle också kunna förklaras genom att TA-system förblir deaktiverade eftersom ingen (p)ppGpp finns. I en studie där en defekt variant av PPX (bryter ned PolyP och deaktiveras av (p)ppGpp) jämfördes med vildtypen visade PPX-mutanten en ökad motståndskraft mot antibiotika (Thayil *et al.* 2011). Detta kan, enligt modellen, betyda högre andel persistenta celler genom att PolyP ackumuleras i cellen och aktiverar TA-system. I enlighet med detta resulterar frånvaron av PolyP i en PPK-mutant tvärtom i en ökad känslighet mot antibiotika (Singh *et al.* 2013).

I studien med PPX-mutanten undersöktes också dess patogenitet där det visade sig att mutanten var sämre att infektera och överleva i marsvin (Thayil *et al.* 2011).

Virulens och TA-system

M. tuberculosis speciella virulens kan vara kopplad till persistenta celler vilkas bildning i sig kan kontrolleras av TA-system på ett sätt som mer eller mindre liknar *E. coli*-modellen. Det har visats att TA-system finns överuttryckta i förhållanden som liknar de som bakterien utsätts för vid intracellulär infektion och kan begränsa tillväxt. Dessutom har persistens i *E. coli* visats vara reglerat av (p)ppGpp och frånvaron av denna molekyl i *M. tuberculosis* resulterar i minskad virulens. I det här avsnittet behandlas TA-system direkt relaterat till virulens i *in vivo*-studier i mänskliga makrofager och marsvin.

Vid infektion i lungorna finns *M. tuberculosis* som en intracellulär patogen hos de makrofager som är ämnade åt att bekämpa infektionen. Förmågan att infektera makrofager kräver speciella former av genuttryck då syrebrist, näringsbrist, lågt pH med mera kan förekomma (Via *et al.* 2008).

TA-system och tillväxt under stressförhållanden

I den enda omfattande studien (Tiwari *et al.* 2015) som har jämfört tillväxt mellan TA-deletionsmutanter och vildtyp har intressanta resultat erhållits. Tillväxten hos olika sorters kombinationer deletionsmutanter av MazF3, MazF6 och MazF9 jämfördes med tillväxten hos vildtypen vid oxidativ stress. Ingen förändrad tillväxt sågs där bara en eller två av ovanstående gener var raderade. I trippelmutanten, där alla tre generna var raderade, erhöles en 18-faldig minskning i överlevnad. Samma sorts kombination av deletionsmutanter utsattes för näringsbrist där överlevnaden undersöktes efter 14 dagars tillväxt under näringsbrist.

Överlevnaden minskades vid detta tillstånd hos enkelmutanterna MazF3 och MazF9 fyrfaldigt respektive sjufaldigt. I mutanten då både MazF3 och MazF9 saknades reducerades överlevnaden 50-faldigt och i trippelmutanten 88-faldigt. Notera att åtminstone MazF3 har visat sig öka i uttryck vid syrebrist (Zhu *et al.* 2010) och MazF6 under näringsbrist (Albrethsen *et al.* 2013).

TA-system och virulensförmåga

MazF3/F6/F9-deletionmutantens tillväxt analyserades också i mänskliga makrofager där den visade en fyrfaldig minskning i överlevnad, detta vid 6 dagar efter infektionstillfället (Tiwari *et al.* 2015). Förmågan att växa som intracellulär patogen försämrades alltså vid frånvaro av de tre TA-systemen.

Utifrån ovanstående resultat fortsatte Tiwari *et al.* (2015) att undersöka dessa TA-system vid infektion av marsvin. I enlighet med makrofageexperimenten uppvisades en försämrad tillväxt av trippelmutanten i lungorna och i njurarna hos marsvinen efter fyra veckor, tillväxten hos vildtypen var sju gånger så stor. Efter åtta veckor steg denna siffra till 52 och 10 gånger så mycket tillväxt i njurar respektive lungorna. Granulomer från marsvin infekterade med trippelmutanten var mindre i storlek och mindre nekrotiska (innehållande döda celler) än granulomerna från marsvinen som infekterades med vildtypen. Detta efter åtta veckors infektion. Det totala antalet granulomer i lungor och lever var två och nio gånger fler hos marsvin infekterade med vildtypen. Resultaten visar att TA-system är viktiga för lyckosam patogenitet hos bakterien samt att TA-system i *M. tuberculosis* kan verka synergistiskt. Det senare har tidigare visats i *E. coli* (Maisonneuve *et al.* 2011a).

Författarna till denna unika men viktiga studie (Tiwari *et al.* 2015) föreslår en modell för hur TA-system kan reglera tillväxten under infektionsförloppet: Under normala förhållanden är toxiner deaktiverade av sina antitoxiner medan vanliga tillväxtgener uttrycks. TA-komplexen binder till deras promotorer och förhindrar transkription av TA-operon. Vid förändrade förhållanden, såsom syrebrist, näringsbrist, antibiotika, kontakt med immunförsvar, aktiveras TA-systemen genom att antitoxinerna degraderas av proteaser. Frånvaron av antitoxin leder till att TA-operon uttrycks i högre nivåer. Eftersom proteaser fortfarande degraderar antitoxin hålls toxinerna aktiva. Toxinerna börjar utöva sin aktivitet i cellen, den existerande mRNA-poolen byts ut mot en annan som inte innehåller igenkänningssekvenser för toxinernas ribonukleasaktiviteter, samtidigt som tRNA och rRNA klyvs vilket nedreglerar tillväxthastigheten. Denna försänkta metabola status kan antingen hållas kvar, vilket kan innebära latent infektion, eller kan stress- och virulensgener aktiveras vilket möjliggör en aktiv infektion (Tiwari *et al.* 2015).

Diskussion

Vad som karaktäriserar fältet TA-system är delar av ovisshet samt delar med mer klarhet. Majoriteten av studier som gjorts inriktar sig på ett eller ett fåtal system. Resultaten är signifikanta och understryker betydelsen av att studera TA-system, men de ger begränsade mängder konkret kunskap rörande funktionen, t.ex. persistens och rollen vid infektion. Det var efter 2011, då Maisonneuve *et al.* fastställde att TA-systemen i *E. coli* direkt är kopplade till bildandet av persistenta celler som direkta kunskaps samband började formas. Men, utan grundkunskapen från molekylära och biokemiska studier av specifika TA-system och deras förmåga att nedreglera tillväxt skulle sambandet till persistens vara många gånger svårare att klarlägga.

Upptäckterna underlättades genom studien från 2011 (Maisonneuve *et al.* 2011b) genom att proteaser specifikt upptäcktes reglera TA-systemens aktivitet. Detta gjorde att man började undersöka proteasaktivitet, som sedan tidigare är studerat på sitt håll, och det visade sig att proteaset Lon indirekt regleras av signalmolekylen (p)ppGpp. Den molekylära modellen som visas i Figur 5 kunde formuleras år 2013 (Maisonneuve *et al.* 2013) och kommer kunna utgöra en mer fast mark att stå på då TA-systemens funktion fortsätts att undersökas i andra arter än *E. coli*, bland andra *M. tuberculosis*. Det här arbetet har fokuserat på *M. tuberculosis* i vilken kunskapen kring TA-system inte har nått lika långt som i *E. coli* men som mycket väl kan dra nytta av ovanstående modell. Om samma sorts studier som gjorts i *E. coli* också görs på *M. tuberculosis* kan stora framsteg komma att göras rörande latent tuberkulosinfektioner.

TA-systemens roll vid persistens i *M. tuberculosis*

Slutet av avsnittet ”Persistens” rörande metabolismen av (p)ppGpp i *M. tuberculosis* syftar till att utgöra en indirekt bro mellan kunskapen från *E. coli*-modellen samt hur det kan tänkas fungera i patogenen. (p)ppGpp-metabolism undersöktes kopplat till virulens i ett antal studier, t.ex. gjordes infekterande celler oförmögna att syntetisera signalmolekylen och visade därefter en minskad förmåga att överleva i en infektionsvärd. Studierna relaterar inte i sig till persistensfunktionen, men där finns andra studier presenterade i ännu tidigare avsnitt som fyller delar av resonemangets fallgropar. TA-system visades vara viktiga för att effektivt överleva perioder av stress, såsom antibiotika eller näringsbrist. Överlevandet i sig är förknippat med persistens.

TA-system och virulens i *M. tuberculosis*

Som Tiwari *et al.* 2015 föreslagit verkar TA-system utgöra en viktig del i virulens hos *M. tuberculosis*. Bevis på direkta samband mellan TA-system och virulens har erhållits och en modell formulerats baserat på dessa bevis samt tidigare kunskap. Modellen beskriver hur TA-system aktiveras vid olika stresstillstånd som råder vid infektion i syfte att omreglera det globala uttrycket av mRNA. Denna modell är utifrån innehållet i den här uppsatsen rimlig och stöds av fakta.

Från flera transkriptom- och proteomanalyser har det framkommit att olika TA-system finns uttryckta vid olika sorters stress, till exempel syrebrist eller näringsbrist, förhållanden som bakterien utsätts för vid infektion av makrofager. Denna kunskap kan relateras till att TA-system också finns uttryckta hos persistenta celler samt det förhållandevis höga antalet system i *M. tuberculosis*. Det är rimligt att anta att det höga antalet system har att göra med förmågan att klara av olika sorters stress samt att utöver det också kunna inducera persistenta celler. En delmängd av TA-system kan t.ex. reglera genuttryck och tillväxt som svar på syrebrist, en annan delmängd kan aktiveras som svar på näringsbrist eller aktiveras slumpmässigt för att bilda persistenta celler. Allt detta i syfte att möjliggöra infektion hos infektionsvärdar där det finns en mängd olika hinder att överkomma.

TA-system i *M. tuberculosis* och antibakteriell behandling

För att sätta den existerande kunskapen samt den kunskap som troligen kommer inom en snar framtid om TA-system i *M. tuberculosis* i ett större perspektiv krävs en diskussion kring hur de kan utgöra måltavlor för antibakteriella behandlingar för att motverka och stoppa latent tuberkulosinfektioner.

Proteaser som mål för antibiotika

Den troliga kopplingen mellan latent infektion och TA-system gör TA-system till intressanta måltavlor. Principen skulle eventuellt kunna handla om att behålla systemen inaktiverade vid infektion och under den konventionella behandlingen av bakterien. Detta för att hindra bakterien att övergå i latent stadium, eventuellt genom att hindra bildandet av persistenta celler. Den första kandidaten att rikta in sig på kanske inte just är ett TA-system i sig utan ett proteas som har rollen att aktivera systemen. Anledningen till detta är att TA-system har visat sig fungera synergistiskt. Synergieffekten har hittats främst i *E. coli* (Figur 4) men också i *M. tuberculosis*. Att inhibera aktiviteten hos endast ett eller ett fåtal TA-system förväntas därmed inte ha någon större effekt på tillväxtregleringen och bildandet av persistenta celler.

Distributionen av TA-system i *M. tuberculosis*

I *M. tuberculosis* genom har 76 typ II TA-system hittats och tre typ IV-system. Gemensamt för system av typ II och typ IV är att antitoxinet är ett protein. Typ II antitoxin interagerar och inhiberar toxinet med direktbindning medan typ IV antitoxin binder kompetitivt till toxinets målmolekyl, ingen direkt interaktion sker. En fråga som är intressant att ställa utifrån den stora skillnaden i antalet typ II och typ IV är ifall ett godtyckligt typ II-system på något sätt skulle kunna utgöra en större selektiv fördel än ett typ IV dito.

Molekylära skillnader mellan typ II- och typ IV-system

Genom att typ IV antitoxin binder till målmolekylen i sig finns det utrymme för en till nivå av reglering jämfört med typ II-system. Denna nivå kan utgöras av att bindandet av antitoxinet har en effekt på målmolekylens funktion, till exempel att målmolekylens aktivitet underlättas. Typ II-antitoxin har inte bevisats ha förmågan till att binda till andra protein än till det tillhörande toxinet, vilket indikerar att nivån av reglering begränsas till toxinet. Möjligen kan ett TA-system fungera som en hybrid mellan typ II och typ IV.

Slutliga reflektioner

I syfte att förstå och behandla tuberkulos som världshälsosjukdom är kunskap om *M. tuberculosis* tillväxtreglering i sin infektionsvärd essentiell. En stor del av denna kunskap kan troligen komma att baseras på TA-systemens aktiviteter och roller. För att utöka denna kunskap kan det vara fördelaktigt att studera TA-system i *M. tuberculosis* på samma sätt som gjorts i *E. coli*. Resultaten från sådana studier kan komma att bilda skarpare och mer underbyggda samband mellan TA-system och infektionsförmågan hos patogenen, vilket i sig kan leda till att fler överlever sjukdomen.

Tack

Tack till Anna Suarez Larsson för kontinuerligt och konstruktivt handledande och återkopplande under skrivandet. Tack till Anton Wahlgren, Christoffer Mattson Langseth och Joel Striem för återkoppling och stöd.

Referenser

- Ahidjo BA, Kuhnert D, McKenzie JL, Machowski EE, Gordhan BG, Arcus V, Abrahams GL, Mizrahi V. 2011. VapC Toxins from *Mycobacterium tuberculosis* Are Ribonucleases that Differentially Inhibit Growth and Are Neutralized by Cognate VapB Antitoxins. *PLoS ONE* 6: e21738.
- Albrethsen J, Agner J, Piersma SR, Højrup P, Pham TV, Weldingh K, Jimenez CR, Andersen P, Rosenkrands I. 2013. Proteomic Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* Identifies Nutrient-starvation-responsive Toxin–antitoxin Systems. *Mol Cell Proteomics* 12: 1180–1191.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Aubry A, Pan X-S, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1281–1288.
- Bertram R, Schuster CF. 2014. Post-transcriptional regulation of gene expression in bacterial pathogens by toxin-antitoxin systems. *Front Cell Infect Microbiol*, doi 10.3389/fcimb.2014.00006.
- Bordes P, Cirinesi A-M, Ummels R, Sala A, Sakr S, Bitter W, Genevax P. 2011. SecB-like chaperone controls a toxin–antitoxin stress-responsive system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 108: 8438–8443.
- Brzozowska I, Zielenkiewicz U. 2013. Regulation of toxin–antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70: 33–41.
- Bukowski M, Lyzen R, Helbin WM, Bonar E, Szalewska-Palasz A, Wegrzyn G, Dubin G, Dubin A, Wladyka B. 2013. A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system PemIK(Sa). *Nat Commun* 4: 2012.
- Cook GM, Robson JR, Frampton RA, McKenzie J, Przybilski R, Fineran PC, Arcus VL. 2013. Ribonucleases in bacterial toxin–antitoxin systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1829: 523–531.
- Cruz JW, Sharp JD, Hoffer ED, Maehigashi T, Vvedenskaya IO, Konkimalla A, Husson RN, Nickels BE, Dunham CM, Woychik NA. 2015. Growth-regulating *Mycobacterium tuberculosis* VapC-mt4 toxin is an isoacceptor-specific tRNase. *Nat Commun* 6: 7480.
- Dahl JL, Kraus CN, Boshoff HIM, Doan B, Foley K, Avarbock D, Kaplan G, Mizrahi V, Rubin H, Barry CE. 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10026–10031.

- Demidenok OI, Kaprelyants AS, Goncharenko AV. 2014. Toxin–antitoxin vapBC locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* 352: 69–77.
- Dutta NK, Karakousis PC. 2014. Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 343–371.
- Ernst JD. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 12: 581–591.
- Frampton R, Aggio RBM, Villas-Bôas SG, Arcus VL, Cook GM. 2012. Toxin-Antitoxin Systems of *Mycobacterium smegmatis* Are Essential for Cell Survival. *J Biol Chem* 287: 5340–5356.
- Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. 2005. Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 3: 371–382.
- Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. 1986. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci* 83: 3116–3120.
- Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. 2015. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 112: 5171–5176.
- Goeders N, Drèze P-L, Melderer LV. 2013. Relaxed Cleavage Specificity within the RelE Toxin Family. *J Bacteriol* 195: 2541–2549.
- Goeders N, Van Melderer L. 2014. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins* 6: 304–324.
- Gupta A. 2009. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin–antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 45–53.
- Han J-S, Lee JJ, Anandan T, Zeng M, Sripathi S, Jahng WJ, Lee SH, Suh J-W, Kang C-M. 2010. Characterization of a chromosomal toxin–antitoxin, Rv1102c–Rv1103c system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 293–298.
- Hansen S, Vulić M, Min J, Yen T-J, Schumacher MA, Brennan RG, Lewis K. 2012. Regulation of the *Escherichia coli* HipBA Toxin-Antitoxin System by Proteolysis. *PLoS ONE* 7: e39185.
- Huang F, He Z-G. 2010. Characterization of an interplay between a *Mycobacterium tuberculosis* MazF homolog, Rv1495 and its sole DNA topoisomerase I. *Nucleic Acids Res* 38: 8219–8230.
- Jain V, Kumar M, Chatterji D. 2006. ppGpp: Stringent response and survival. *J Microbiol* 44: 1–10.

- Jin G, Pavelka MS, Butler JS. 2015. Structure-Function Analysis of VapB4 Antitoxin Identifies Critical Features of a Minimal VapC4 Toxin-Binding Module. *J Bacteriol* 197: 1197–1207.
- Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K. 2011. Characterization and Transcriptome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Persisters. *mBio* 2: e00100–11.
- Korch SB, Contreras H, Clark-Curtiss JE. 2009. Three *Mycobacterium tuberculosis* Rel Toxin-Antitoxin Modules Inhibit Mycobacterial Growth and Are Expressed in Infected Human Macrophages. *J Bacteriol* 191: 1618–1630.
- Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kornberg A. 2001. Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli*. *Science* 293: 705–708.
- Lee I-G, Lee SJ, Chae S, Lee K-Y, Kim J-H, Lee B-J. 2015. Structural and functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC30 toxin-antitoxin system: implications for the design of novel antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 43: 7624–7637.
- Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. 2013. (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154: 1140–1150.
- Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. 2011a. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 108: 13206–13211.
- Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. 2011b. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 108: 13206–13211.
- Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu K-P, Inouye M. 2012. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84: 979–989.
- Mikita N, Cheng I, Fishovitz J, Huang J, Lee I. 2013. Processive Degradation of Unstructured Protein by *Escherichia coli* Lon Occurs via the Slow, Sequential Delivery of Multiple Scissile Sites Followed by Rapid and Synchronized Peptide Bond Cleavage Events. *Biochemistry (Mosc)* 52: 5629–5644.
- Ogura T, Hiraga S. 1983. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 80: 4784–4788.
- Pandey DP, Gerdes K. 2005. Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 33: 966–976.
- Pryszak MH, Mozdziejcz CJ, Cook AM, Zhu L, Zhang Y, Inouye M, Woychik NA. 2009. Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol Microbiol* 71: 1071–1087.

- Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. 2009. Comprehensive Functional Analysis of Mycobacterium tuberculosis Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Pathogenesis, Stress Responses, and Evolution. *PLoS Genet* 5: e1000767.
- Ramirez MV, Dawson CC, Crew R, England K, Slayden RA. 2013. MazF6 toxin of Mycobacterium tuberculosis demonstrates antitoxin specificity and is coupled to regulation of cell growth by a Soj-like protein. *BMC Microbiol* 13: 240.
- Robson J, McKenzie JL, Cursons R, Cook GM, Arcus VL. 2009. The vapBC Operon from Mycobacterium smegmatis Is An Autoregulated Toxin–Antitoxin Module That Controls Growth via Inhibition of Translation. *J Mol Biol* 390: 353–367.
- Rowe-Magnus DA, Guérout A-M, Mazel D. 1999. Super-integrans. *Res Microbiol* 150: 641–651.
- Sala A, Bordes P, Genevaux P. 2014. Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Mycobacterium tuberculosis. *Toxins* 6: 1002–1020.
- Sala A, Calderon V, Bordes P, Genevaux P. 2013. TAC from Mycobacterium tuberculosis: a paradigm for stress-responsive toxin—antitoxin systems controlled by SecB-like chaperones. *Cell Stress Chaperones* 18: 129–135.
- Singh R, Singh M, Arora G, Kumar S, Tiwari P, Kidwai S. 2013. Polyphosphate Deficiency in Mycobacterium tuberculosis Is Associated with Enhanced Drug Susceptibility and Impaired Growth in Guinea Pigs. *J Bacteriol* 195: 2839–2851.
- Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev* 16: 463–496.
- Tan Q, Awano N, Inouye M. 2011. YeeV is an Escherichia coli toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol* 79: 109–118.
- Thayil SM, Morrison N, Schechter N, Rubin H, Karakousis PC. 2011. The Role of the Novel Exopolyphosphatase MT0516 in Mycobacterium tuberculosis Drug Tolerance and Persistence. *Plos One* 6: e28076.
- Tiwari P, Arora G, Singh M, Kidwai S, Narayan OP, Singh R. 2015. MazF ribonucleases promote Mycobacterium tuberculosis drug tolerance and virulence in guinea pigs. *Nat Commun* 6: 6059.
- Via LE, Lin L, Ray SM, Carrillo J, Allen SS, Eum SY, Taylor K, Klein E, Manjunatha U, Gonzales J, Lee EG, Park SK, Raleigh JA, Cho SN, McMurray DN, Flynn JL, Barry CE. 2008. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infect Immun* 76: 2333–2340.
- Wagner EGH, Unoson C. 2012. The toxin-antitoxin system tisB-istR1. *RNA Biol* 9: 1513–1519.

Wen Y, Behiels E, Devreese B. 2014. Toxin–Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis* 70: 240–249.

WHO. 2015. WHO | Global tuberculosis report 2015. WWW-dokument 2015-: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Hämtad 2015-11-06.

Zhu L, Phadtare S, Nariya H, Ouyang M, Husson RN, Inouye M. 2008. The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol Microbiol* 69: 559–569.

Zhu L, Sharp JD, Kobayashi H, Woychik NA, Inouye M. 2010. Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* Toxin-Antitoxins Can Physically and Functionally Interact. *J Biol Chem* 285: 39732–39738.

Förekomst och funktion av toxin-antitoxinsystem i *Mycobacterium tuberculosis*: etisk bilaga

Erik Gudmunds

Självständigt arbete i biologi 2015

Etiska reflektioner kring toxin-antitoxinsystem i *Mycobacterium tuberculosis* och tuberkulos

Denna etikbilaga innehåller personliga etiska reflektioner kring ämnet toxin-antitoxinsystem (TA-system) i *Mycobacterium tuberculosis*. Detta inkluderar redogörelse av etiska frågor rörande vad kunskapen om TA-system kan syfta till, det vill säga, utvecklandet av både existerande och nya behandlingar av tuberkulos samt bekämpandet av tuberkulos generellt. Bakgrundsfakta kring ämnet finns att läsa i huvuduppsatsen (Gudmunds 2016). Bilagan innehåller också en forskningsetisk analys av huvuduppsatsen.

Fortsatt grundforskning om TA-system är nödvändig och bör främjas

Den forskning som uppsatsen baseras på utgörs i hög grad av grundforskning med tillägget att det görs i en patogen organism där kunskap alltid kan komma att ha en betydelse för behandling av sjukdom. I ett samhälle där konkurrensen om forskningspengar är betydande kan det finnas en fallenhet hos kapitalinnehavare att ge anslag med etiketter. Med det menas att forskningen som pengarna finansierar har bestämda mål och syften, t.ex. utvecklandet av nya antibiotika eller verktyg för diagnosticering. Denna slags forskning har väldefinierade syften, något som grundforskningen till sin natur mer eller mindre saknar (kanske mindre i fallet *M. tuberculosis*), båda sorterna är dock viktiga och kan ge upphov till framsteg på sina olika sätt. Därför är det inte etiskt försvarbart att låta grundforskningen underfinansieras till förmån för öronmärkt forskning. Kunskapen som genereras ur grundforskningen kan komma ha revolutionerande betydelse, något som historien har flera exempel på. Det ska understrykas att forskningsfinansieringen går en balansgång mellan grundforskning och riktad forskning, det gäller att hitta en etisk försvarbar och realistisk lutning på det hela som ger den högsta möjliga nyttan samt kunskapen.

Etiska frågeställningar rörande individer med tuberkulos

Ska läkare eller myndigheter ha rätt att tvångsisolera patienter som bär på multiresistenta sorter av *M. tuberculosis*? Kan det vara etiskt försvarbart för en läkare att bryta sin tystnadsplikt gentemot en patient i syfte att hindra smittspridning till personer i patientens närhet? Kan man tvinga patienter till att fullgöra hela behandlingar i syfte att minimera uppkomsten av resistenta stammar av *M. tuberculosis*? Samtliga ovanstående frågor är viktiga på både på ett etiskt och medicinskt plan att reflektera över vid beslutsfattning och framtagandet av riktlinjer kring tuberkulos. Avgörande vid samtliga frågor är att väga patientens individuella rättigheter mot dennes omgivnings rättigheter samt på något sätt väga in populationsetiska argument. Med det sistnämnda menar jag att en individs rättigheter, t.ex. vid vägran till fullgjord behandling, ska ställas mot risken att resistenta genotyper sprids inom en population av människor, som i dagens globaliserande anda utgör i stort sett hela jordens befolkning.

Forskningsetik

Till den bästa av min förmåga har jag försökt att hämta källor från väl ansedda tidskrifter samt från ett brett spektrum av författare. Ett partiskt urval av fakta har i möjligaste mån undvikits. Det ska dock sägas att inläsningen av ämnet TA-system på den korta tiden inte ger den breda kunskap som behövs för att belysa samtliga relevanta fakta och infallsvinklar som är rimligt med avseende på uppsatsens längd.