

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Lidia Boss

**Mechanizm regulacji ekspresji genów
systemu toksyna – antytoksyna, Axe-Txe,
pochodzącego z patogennej bakterii
*Enterococcus faecium***

GDAŃSK 2014

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Praca wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej
Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,

pod kierunkiem
Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna
oraz dr Barbary Kędzierskiej

Medical University of Gdańsk 2014

ISBN 978-83-65098-00-9

Źródła finansowania

Grant nr N N301 251935 finansowany przez
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
pt. „Mechanizm działania systemu toksyna-antytoksyna, Axe-Txe,
pochodzącego z patogennej bakterii *Enterococcus faecium*”,
realizowany pod kierownictwem dr Barbary Kędzierskiej.

Praca naukowa współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu
Społecznego



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Część wyników zaprezentowanych w tej pracy została opublikowana
w artykule: Boss L., Labudda L., Wegrzyn G., Hayes F., Kędzierska B.
The axe-txe complex of *Enterococcus faecium* presents a multilayered mode of
toxin-antitoxin gene expression regulation. PLoS One 2013, 8, 9, e73569.

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	7
1.1. Klasyfikacja systemów toksyna – antytoksyna	10
1.1.1. Systemy toksyna – antytoksyna typu I	11
1.1.2. Systemy toksyna – antytoksyna typu II	14
1.1.3. Systemy toksyna – antytoksyna typu III	23
1.1.4. Systemy toksyna – antytoksyna typu IV	24
1.1.5. Systemy toksyna – antytoksyna typu V	26
1.1.6. Ewolucja systemów toksyna – antytoksyna	27
1.2. Biologiczna rola systemów toksyna – antytoksyna	28
1.2.1. Plazmidowe systemy toksyna – antytoksyna	29
1.2.2. Chromosomalne systemy toksyna – antytoksyna	30
1.3. System toksyna – antytoksyna <i>axe-txe</i>	34
2. CEL PRACY	38
3. MATERIAŁY	39
3.1. Szczepy bakteryjne	39
3.2. Plazmidy	39
3.3. Oligonukleotydy	43
3.4. Podłoża i pożywki	47
3.4.1. Pożywka LB (Luria-Bertani)	47
3.4.2. Podłoże LA	47
3.5. Antybiotyki	47
4. METODY	48
4.1. Amplifikacja DNA <i>in vitro</i> techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)	48
4.2. Kolonowanie DNA	48
4.2.1. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	48
4.2.2. Defosforylacja końców 5' wektorów plazmidowych	48
4.2.3. Elektroforeza w żelu agarozowym	49
4.2.4. Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego	49
4.2.5. Ligacja fragmentów DNA	49
4.3. Mutageneza miejscowo – specyficzna	49
4.3.1. Przygotowanie denaturowanej matrycy DNA	49
4.3.2. Mutageneza miejscowo – specyficzna	50
4.4. Transformacja komórek bakteryjnych plazmidowym DNA	50
4.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych	50
4.4.2. Transformacja plazmidowym DNA	51
4.5. Oznaczenie względnego poziomu luminescencji hodowli bakteryjnych	51
4.6. Test opóźnienia migracji DNA w żelu poliakrylamidowym	51
4.6.1. Przygotowanie białkowego ekstraktu z komórek bakteryjnych	51

4.6.2.	Test opóźnienia migracji DNA w żelu poliakrylamidowym.....	52
4.7.	Elektroforeza poliakrylamidowa	52
4.7.1.	Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących	52
4.7.2.	Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach niedenaturujących.....	53
4.8.	Określenie miejsca startu transkrypcji techniką wydłużania startera.....	54
4.8.1.	Eksperyment wydłużania startera.....	54
4.8.2.	Sekwencjonowanie DNA	54
4.9.	Analiza aktywności promotorów kasety <i>axe-txe</i> metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	55
4.10.	Badanie tempa wzrostu hodowli bakteryjnych	56
5.	WYNIKI	57
5.1.	Budowa i regulacja ekspresji genów operonu <i>axe-txe</i>	57
5.1.1.	Regulacja transkrypcji zachodzącej z promotora <i>p_{at}</i>	57
5.1.2.	Promotor <i>p_{axe}</i>	71
5.1.3.	Inne elementy kasety <i>axe-txe</i> , które mogą brać udział w regulacji ekspresji jej genów	81
5.2.	Interakcje pomiędzy elementami homologicznych systemów <i>axe-txe</i> i <i>yefM-yoeB</i>	91
5.2.1.	Wpływ białek chromosomalnej kasety <i>yefM-yoeB</i> na ekspresję genów plazmidowego modułu <i>axe-txe</i>	93
5.2.2.	Wpływ białek plazmidowej kasety <i>axe-txe</i> na ekspresję genów chromosomalnego systemu <i>yefM-yoeB</i>	96
6.	DYSKUSJA	101
7.	WNIOSKI.....	110
8.	PIŚMIENNICTWO	111
9.	STRESZCZENIE.....	127
10.	SUMMARY.....	129

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

- TA – *toxin-antitoxin* / toksyna-antytoksyna
LAB – *lactic acid bacteria* / bakterie mlekowe
VRE – *vancomycin – resistant enterococci* / wankomycyno-oporne enterokokki
DNA – *deoxyribonucleic acid* / kwas deoksyrybonukleotydowy
RNA – *ribonucleic acid* / kwas rybonukleotydowy
DNaza – *deoxyribonuclease* / deoksyrybonukleaza
RNaza – *ribonucelase* / rybonukleaza
RBS – *ribosome binding site* / miejsce wiązania rybosomu
SD – *Shine-Dalgarno sequence* / sekwencja Shine – Dalgarno
ATP – *adenosine triphosphate* / adenylotryfosforan
GTP – *guanidine triphosphate* / guanidynotryfosforan
CTP – *cytosine triphosphate* / cytozynotryfosforan
TTP – *thymidine triphosphate* / tymidynotryfosforan
UTP – *uridine triphosphate* / urydynotryfosforan
PSK – *post-segregational cell killing* / posgregacyjna eliminacja komórek
PCD – *post-segregational cell death* / programowana śmierć komórki
CFU – *colony forming unit* / jednostka tworząca kolonie
PCR – *polymerase chain reaction* / łańcuchowa reakcja polimerazy
RLU – *relative luminescence unit* / względna jednostka luminescencji
IPTG – izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd
DTT – ditiotreitol
EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* / kwas edetynowy
SDS – siarczan dodecyłu sodu
APS – *ammonium persulfate* / nadsiarczan amonu
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
UV – *ultraviolet* / promieniowanie ultrafioletowe
EMSA – *electrophoretic mobility shift assay* / test opóźnienia migracji w żelu

1. WSTĘP

W skład mikroflory jelita ludzkiego wchodzi ponad 500 gatunków mikroorganizmów, z czego większość stanowią bakterie. Całkowitą liczbę komórek bakteryjnych zasiedlających jelito grube człowieka szacuje się na około 10^{14} , przy czym procentowy udział poszczególnych gatunków bakterii może zmieniać się u różnych osób w zależności od wielu czynników, m.in. od wieku, płci i przyjmowanych leków [158]. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* stanowią część naturalnej mikroflory jelitowej ssaków, w tym również człowieka [182]. Enterokoki to Gram-dodatnie, fakultatywnie anaerobowe ziarenkowce, należące do grupy bakterii mlekowych (*lactic acid bacteria* – LAB) [35]. W jelitach zdrowych ssaków najczęściej i najliczniej występującymi gatunkami enterokoków są *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* [10, 39, 75, 128, 129, 139, 140].

Bakterie należące do rodzaju *Enterococcus* uważane są za oportunistyczne patogeny, które mogą powodować poważne infekcje [28]. Według danych opublikowanych w latach 2008-2013, bakterie *E. faecalis* i *E. faecium* stanowią jedną z głównych przyczyn infekcji dróg moczowych, zakażeń ran po zabiegach chirurgicznych oraz bakteremii u pacjentów hospitalizowanych [6, 40, 88]. Podejrzewa się, że większość przypadków infekcji enterokokami spowodowanych jest translokacją komórek bakteryjnych poprzez nabłonek jelita do węzłów chłonnych oraz krwioobiegu [54]. Prawdopodobieństwo rozprzestrzenienia się enterokoków w organizmie wzrasta jeśli doszło do zaburzenia integralności nabłonka jelitowego [157]. Wśród czynników istotnie wpływających na wirulencję enterokoków wyróżnia się obecność na powierzchni komórki bakteryjnej charakterystycznych białek (m.in. Agg, Ace, Esp), które ułatwiają adhezję bakterii do komórek nabłonka, zdolność do formowania biofilmu oraz do wydzielania enzymów degradujących tkankę gospodarza [51].

Znajdująca się na powierzchni komórek niektórych szczepów *E. faecalis*, glikoproteina Agg (*aggregation substance*) jest odpowiedzialna za specyficzny dla enterokoków proces agregacji komórek poprzedzający koniugację. W strukturze Agg obecny jest motyw Arg-Gly-Asp rozpoznawany przez receptory położone na powierzchni komórek nabłonka jelita. Agg ułatwia adhezję oraz agregację bakterii *E. faecalis* na powierzchni komórek gospodarza, a prawdopodobnie także translokację bakterii poprzez nabłonek jelitowy [157]. Innym białkiem, które również może być obecne na powierzchni *E. faecalis* jest Ace (*adhesion of collage from E. faecalis*). Prawdopodobnie białko to jest istotne w procesie kolonizacji tkanki wsierdza [103]. Białko Esp (*extracellular surface protein*), wykrywane na powierzchni zarówno *E. faecalis*, jak i *E. faecium*, odpowiada za kolonizację tkanek gospodarza oraz formowanie biofilmu, a także wpływa na zmniejszoną wrażliwość enterokoków na niektóre antybiotyki [13, 16, 52]. Do czynników determinujących wirulencję

enterokokków zalicza się także cytolizyny oraz niektóre proteazy serynowe i hialuronidazy. Dokładna biologiczna rola tych enzymów w procesie patogenyzy nie została jeszcze określona, jednak przypuszcza się, że są one odpowiedzialne za degradację tkanek gospodarza, wskutek czego dochodzi do wzrostu ilości składników odżywczych dostępnych dla enterokokków. Prawdopodobnie białka te pełnią również istotną rolę w procesie formowania biofilmu [66, 121]. Wiele czynników wirulencji *Enterococcus sp.* może być kodowanych nie tylko w DNA chromosomalnym, ale również w DNA plazmidowym, co oznacza, że mogą one być przekazywane pomiędzy komórkami bakteryjnymi na drodze horyzontalnego transferu genów. Do tego typu czynników należą m.in. białka agregacyjne Asa-1 i Agg oraz cytolizyny Hly i ClyL [29, 67, 108].

Opisane powyżej determinanty wirulencji wykrywane są dużo częściej w szczepach *E. faecalis* niż w przypadku *E. faecium* [44]. Zjawisko zróżnicowanego występowania poszczególnych determinant wirulencji w obu gatunkach bakterii pozostaje w zgodzie z danymi epidemiologicznymi, według których powodem około 60% zakażeń enterokokkami jest *E. faecalis*, podczas gdy *E. faecium* stanowi przyczynę niecałych 30% [51]. Istotnym jest fakt, że pomimo znacznie większej częstości zakażeń spowodowanych *E. faecalis* względem zakażeń *E. faecium*, to właśnie *E. faecium* stanowi większe zagrożenie w kontekście oporności bakterii na antybiotyki [68]. Przypuszczalnie często występujące w szczepach *E. faecium* mobilne elementy genetyczne wpływają na wzrost zdolności adaptacyjnych tego gatunku bakterii w środowisku szpitalnym, co utrudnia terapię infekcji spowodowanych przez bakterie należące do tego gatunku [110]. Zakażenia, których przyczyną są bakterie z rodzaju *Enterococcus*, charakteryzują się wysoką (sięgającą aż 45%) śmiertelnością wśród pacjentów hospitalizowanych po zabiegach chirurgicznych [51]. Co więcej ryzyko śmierci pacjenta dramatycznie rośnie, jeśli mamy do czynienia ze szczepem bakterii opornym na antybiotyki glikopeptydowe, w tym wankomycynę [19]. Antybiotyki glikopeptydowe wiążą się do sekwencji D-Ala-D-Ala prekursora peptydoglikanu, wskutek czego hamują syntezę ściany komórkowej bakterii. Oporność *Enterococcus sp.* na antybiotyki glikopeptydowe, w tym wankomycynę, wiąże się ze zmianą budowy prekursora peptydoglikanu, co zapobiega związaniu antybiotyku i zmniejsza wrażliwość bakterii na wankomycynę od 7 do 1000 razy [66]. Proces ten uwarunkowany jest obecnością w genomie przynajmniej jednego z sześciu operonów kodujących białka warunkujące oporność na antybiotyki glikopeptydowe (*vanA* - *vanG*). W komórkach *E. faecalis* oraz *E. faecium* najczęściej wykrywano obecność operonów *vanA* oraz *vanB*, przy czym determinanty oporności na antybiotyki glikopeptydowe częściej występowały w szczepach *E. faecium* niż w przypadku *E. faecalis* (odpowiednio 60% i 2% badanych szczepów) [7]. Operony *vanA* oraz *vanB* najczęściej kodowane są w obrębie transpozonów, które mogą stanowić część chromosomalnego lub plazmidowego DNA [68]. Ponadto enterokoki mogą nabywać na drodze horyzontalnego transferu genów

determinanty oporności na inne antybiotyki (np. chloramfenikol, tetracyklinę, makrolidy czy fluorochinolony) oraz przekazywać je bakteriom należącym do odległych ewolucyjnie gatunków (*Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*) [27, 109, 125, 163].

Zarówno determinanty oporności na antybiotyki, jak i czynniki wirulencji patogennych szczepów *Enterococcus sp.* mogą być kodowane w DNA plazmidowym, najczęściej w DNA tzw. megaplazmidów o wielkości nawet kilkudziesięciu par zasad. Obecność w komórce bakteryjnej plazmidów, w szczególności zaś megaplazmidów, wiąże się z obniżeniem tempa wzrostu bakterii i ich możliwości konkurencji w środowisku pozbawionym presji antybiotykowej [114, 174]. Jednym z elementów warunkujących stabilne dziedziczenie plazmidów w populacji komórek bakteryjnych są zakodowane w plazmidowym DNA systemy toksyna-antytoksyna (TA). Systemy TA to elementy genetyczne, złożone z pary genów, z których jeden koduje stabilną toksynę, a drugi – niwelującą jej działanie labilną antytoksynę. Toksyny tych modułów mogą wpływać na różnorodne procesy życiowe w komórce: od replikacji DNA po biosyntezę białek, ściany komórkowej, cytoszkieletu i ATP. Degradacja i brak możliwości syntezy *de novo* antytoksyny w komórkach potomnych, które nie oddzieliły kopii plazmidu niosącej kasetę TA, powoduje śmierć komórki w wyniku działania toksyny.

W 2006 roku stwierdzono, że istnieje fizyczne powiązanie pomiędzy jedną z najczęściej obserwowanych u enterokokków determinant oporności na wankomycynę (*vanA*) a kasetą toksyna-antytoksyna *axe-txe*. Kasetę *axe-txe* obecna była w 75% zbadanych plazmidów pochodzących z bakterii *Enterococcus* wyizolowanych z próbek klinicznych, z czego niemal 60% zawierała także operon *vanA* [122, 146].

Do niedawna uważano, że główną rolą plazmidowych systemów toksyna-antytoksyna jest stabilizacja plazmidowego DNA w populacji komórek bakteryjnych, co jest prawdą również w przypadku modułu *axe-txe*; jednak coraz częściej pojawiają się doniesienia o możliwości istnienia także innych biologicznych funkcji tych modułów [23]. Plazmidowy system toksyna-antytoksyna *axe-txe* jest homologiczny do chromosomalnej kasety *yefM-yoeB* *Escherichia coli*. Wysoki stopień podobieństwa białek obu modułów oraz podobny sposób działania toksyn, skłaniają do przypuszczenia, że kasety te mogłyby pełnić w komórce podobną rolę. W przypadku modułu *yefM-yoeB* wiadomo, że jest on istotny w procesie formowania biofilmu oraz patogenezy, jednak dokładna rola tego systemu w obu procesach nie została jak dotąd określona [92, 101, 105, 127, 165].

W związku z powszechnością występowania modułu *axe-txe* wśród wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus* (*vancomycin-resistant enterococci* – VRE), zaproponowano, że kasetę ta może stanowić cel do rozwoju potencjalnej strategii antybakteryjnej [72, 79, 127]. Próby praktycznego

wykorzystania modułu *axe-txe* wymagają jednak dokładnego poznania mechanizmu działania i regulacji ekspresji genów tego systemu.

Moja praca dotyczy regulacji ekspresji operonu *axe-txe*, w związku z czym we wstępie scharakteryzuję poznane typy systemów toksyna-antytoksyna, ze szczególnym naciskiem na mechanizmy regulacji ekspresji ich genów, następnie zostanie omówiona ewolucja kaset toksyna-antytoksyna, ich biologiczna rola oraz aktualny stan wiedzy na temat modułu *axe-txe*.

1.1. Klasyfikacja systemów toksyna – antytoksyna

Badania nad mechanizmami utrzymywania się plazmidów w populacjach komórek bakteryjnych doprowadziły do odkrycia w 1983 roku pierwszego systemu toksyna-antytoksyna, *ccdAB* (*control of cell death*), kodowanego w DNA plazmidu F [131]. Po podziale komórki niosącej ten plazmid, komórki potomne wraz z cytoplazmą dziedziczą zarówno stabilną toksynę CcdB, jak i antytoksynę CcdA, która jest degradowana przez protezę Lon [183]. Dopóki białka CcdA i CcdB znajdują się w kompleksie, działanie toksyny jest zahamowane, jednak degradacja oraz brak możliwości syntezy *de novo* antytoksyny w komórkach, które nie odziedziczyły plazmidu, powoduje aktywację toksyny poprzez uwolnienie jej z kompleksu. CcdB hamuje aktywność gyrazy, w wyniku czego dochodzi do wielokrotnych pęknięć podwójnej nici DNA i śmierci komórki [7, 90].

W tej chwili znanych jest już ponad 10000 potencjalnych systemów TA, obecnych w DNA chromosomalnym lub plazmidowym bakterii i archeobakterii, a także w DNA profagów [53, 115, 134, 159]. Toksyny wszystkich znanych typów systemów TA są białkami, natomiast antytoksyny mogą stanowić białka lub małe RNA (sRNA). Na podstawie molekularnej charakterystyki antytoksyn i różnic w mechanizmie ich działania, opisane dotychczas systemy TA podzielono na pięć typów (tabela 1).

Tabela 1. Klasyfikacja systemów toksyna-antytoksyna na podstawie rodzaju i mechanizmu działania antytoksyn

Table 1. Classification of toxin-antitoxin systems on the basis of molecular nature and mode of action of the antitoxin molecule

Typ systemu TA/ TA type	Rodzaj cząsteczki antytoksyny/ molecular nature of antitoxin	Mechanizm hamowania toksyczności/ mechanism of toxin neutralization
I	sRNA	Hamowanie biosyntezy toksyny na etapie translacji / <i>Toxin translation inhibition</i>
II	Białko / Protein	Bezpośrednia interakcja z toksyną i hamowanie jej aktywności / <i>Direct interaction with toxin and inhibition of its activity</i>

Typ systemu TA/ TA type	Rodzaj cząsteczki antytoksyny/ molecular nature of antitoxin	Mechanizm hamowania toksyczności/ mechanism of toxin neutralization
III	sRNA	Bezpośrednie interakcja z toksyną i hamowanie jej aktywności / <i>Direct interaction with toxin and inhibition of its activity</i>
IV	Białko / <i>Protein</i>	Działanie antagonistyczne względem toksyny, skierowane na struktury będące celem działania toksyny / <i>Antagonistic action of antitoxin on toxin's cellular targets</i>
V	Białko / <i>Protein</i>	Hamowanie biosyntezy toksyny poprzez degradację jej mRNA / <i>Toxin mRNA degradation</i>

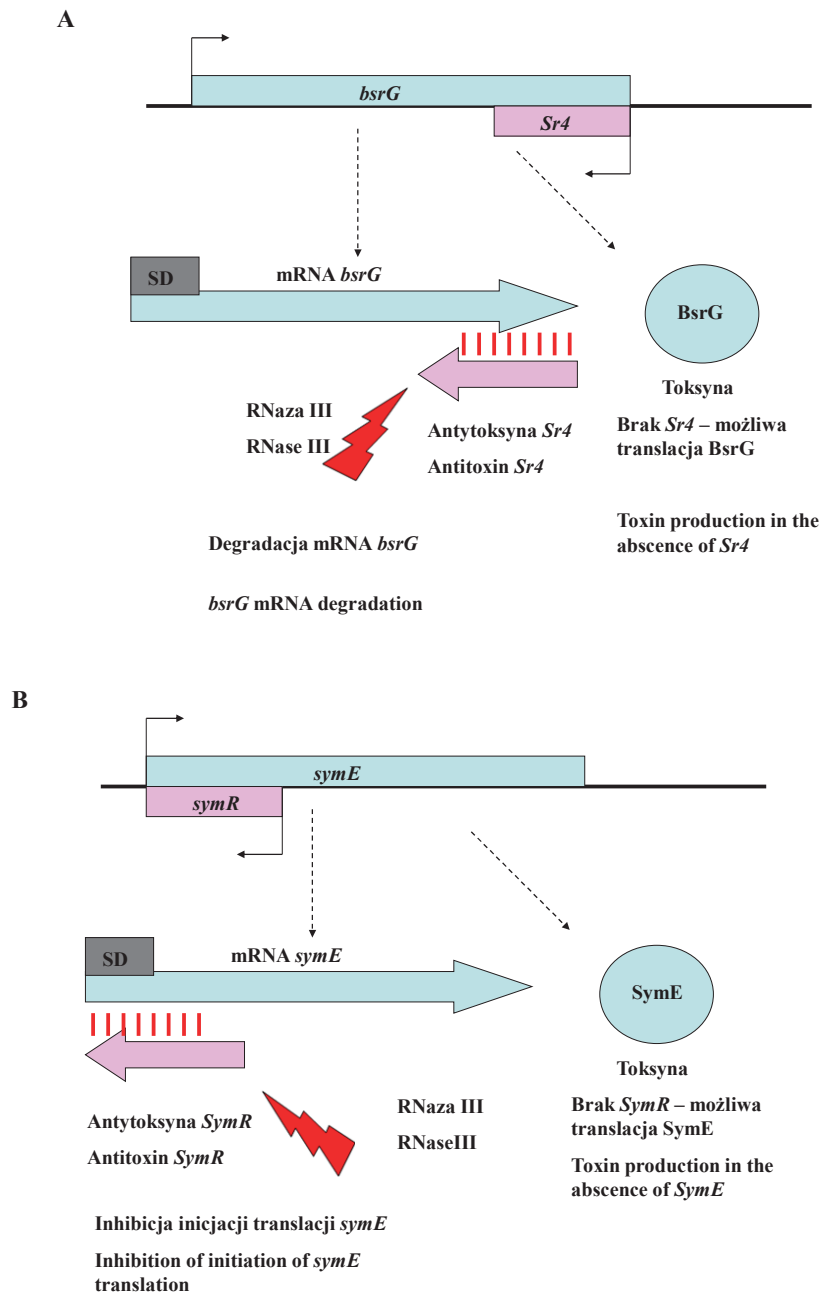
1.1.1. Systemy toksyna – antytoksyna typu I

Systemy TA typu I zbudowane są z genu kodującego toksynę oraz z kodowanego w obrębie tego genu (*in cis*) lub powyżej niego (*in trans*) antysensownego sRNA, stanowiącego antytoksynę. Sekwencja antytoksyn systemów TA typu I może być zatem komplementarna do sekwencji mRNA toksyny (*bsrG-Sr4*) [43] lub do sekwencji RNA znajdującej się powyżej mRNA toksyny, która jest niezbędna do jej translacji (*sok-hok*, *tisB-istRI*) [63, 64, 185]. Hybrydyzacja antytoksyny z mRNA toksyny może powodować degradację przez komórkowe RNazy powstałego w ten sposób dupleksu RNA (*bsrG-Sr4*) (rycina 1 A) [43] lub zapobiegać związaniu rybosomu do sekwencji Shine-Dalgarno mRNA toksyny (*symER*) (rycina 1 B) [95], co w obu przypadkach skutkuje zahamowaniem ekspresji toksyny. Większość antytoksyn systemów TA typu I ulega znacznie szybszej degradacji niż mRNA toksyn. Różnica w stabilności mRNA toksyny i sRNA antytoksyny umożliwia w pewnych warunkach translację znajdującą się w komórce puli mRNA toksyny i w konsekwencji – działanie toksyny na jej komórkowy cel.

Wiele systemów TA typu I charakteryzuje się skomplikowaną, wielostopniową regulacją ekspresji genu toksyny, obejmującą regulację na poziomie transkrypcji (np. inhibicja transkrypcji przez białko LexA w systemach *symER*, *tisB-istRI*) [43, 95], translacji i stabilności mRNA (opisane powyżej działanie antytoksyn) oraz modulację stabilności toksycznego białka (np. degradacja toksyny SymE przez protezę Lon) [95]. Ponadto w systemach, w których antytoksyna kodowana jest *in trans*, jej hybrydyzacja z mRNA toksyny wymaga często obecności białka Hfq [37, 180]. Zaobserwowano także, że niektóre systemy TA typu I charakteryzują się dodatkowymi mechanizmami regulacji ekspresji toksyny, najczęściej związanymi z dynamiką struktury drugorzędowej i modyfikacjami potranskrypcyjnymi mRNA. Przykładem może tu być kasetta *tisB-istRI*, w której gen toksyny TisB poprzedzony jest nie

ulegającą translacji sekwencją *tisA*; w wyniku kotranskrypcji tych sekwencji, powstaje długi mRNA (+1 mRNA), tworzący liczne struktury drugorzędowe, między innymi w rejonie wiązania rybosomu (*ribosome binding site* – RBS). Struktura drugorzędowa mRNA jest dynamiczna, toteż w niektórych momentach możliwe jest związanie rybosomu do RBS, jednak czas potrzebny na rekrutację rybosomu z cytoplazmy jest na tyle długi, że wydajność tego procesu jest bardzo niska. Modyfikacja potranskrypcyjna mRNA, polegająca na odcięciu rybonukleotydów od końca 5', powoduje utworzenie aktywnego translacyjnie +42 mRNA. Transkrypt ten powyżej miejsca RBS zawiera nieustrukturyzowany rejon („*standby site*”), do którego niespecyficznie wiąże się rybosom. Umożliwia to szybkie przemieszczenie się rybosomu do miejsca RBS i wydajną translację toksyny. Antytoksyna IstR1 hybrydyzuje z mRNA toksyny w rejonie „*standby site*”, a utworzony dupleks RNA trawiony jest przez RNazę III, wskutek czego powstaje krótki, nieaktywny translacyjnie transkrypt +106 mRNA *tisB* [37, 185].

Pomimo opisanych powyżej różnic w budowie i działaniu modułów TA typu I, systemy te uważane są za stosunkowo jednorodną grupę kaset toksyna-antytoksyna [18], jednak dokładny mechanizm regulacji ekspresji genów poszczególnych modułów tego typu jest niezwykle złożony i w wielu przypadkach może znacznie się różnić.



Rycina 1. Schemat przedstawiający działanie antytoksyn systemów TA typu I na przykładzie kaset *bsrG-Sr4* (*Bacillus subtilis*) i *symER* (*Escherichia coli*)

Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarnymi strzałkami oznaczono sekwencje promotorowe. **A Degradacja mRNA toksyny** Końce 3' sekwencji sRNA antytoksyny *Sr4* i mRNA toksyny *bsrG* są komplementarne, dupleks RNA rozpoznawany jest przez RNazę III. Degradacja mRNA uniemożliwia syntezę toksyny BsrG. **B Blokowanie inicjacji translacji toksyny** Sekwencja sRNA antytoksyny *symR* jest komplementarna do sekwencji Shine-Dalgarno (SD) mRNA toksyny *symE*. Hybrydyzacja RNA zapobiega związaniu rybosomu do SD i tym sposobem hamuje inicjację translacji toksyny. Dupleks RNA prawdopodobnie jest degradowany przez RNazę III [18]

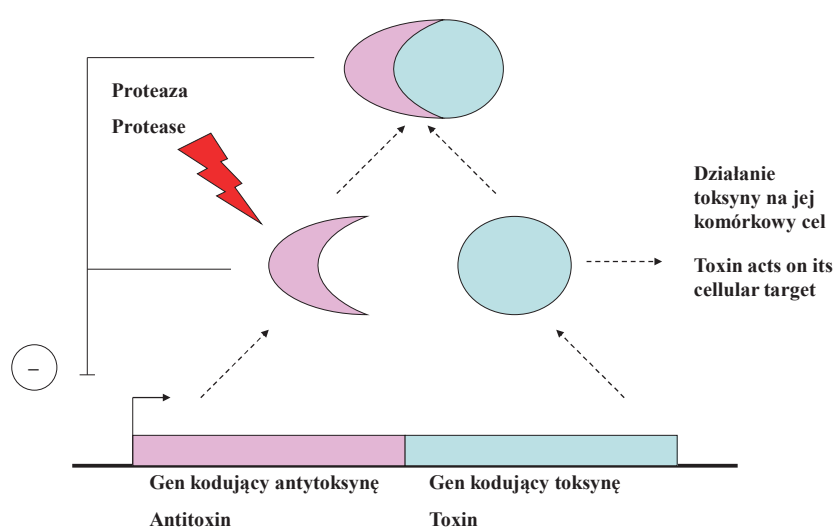
Figure 1. Toxin-antitoxin cassettes bsrG-Sr4 (Bacillus subtilis) and symER (Escherichia coli) as examples of two modes of regulatory mechanisms of type I TA systems. Toxin-associated elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrows denote promoters. A Toxin mRNA degradation 3' ends of antitoxin and toxin RNA hybridize. RNase III degrades RNA duplex, and, consequently, does not allow BsrG toxin synthesis. B Translation initiation inhibition Antitoxin RNA is complementary to Shine-Dalgarno (SD) sequence of the toxin mRNA. RNA hybridization prevents ribosome binding, and thus, inhibits SymE translation initiation [18]

1.1.2. Systemy toksyna – antytoksyna typu II

W systemach TA typu II białkowa antytoksyna bezpośrednio, niekowalencyjnie wiąże się z toksyną i hamuje jej aktywność, zwykle poprzez zmianę konformacji toksyny. W przypadku większości antytoksyn tego typu, domena odpowiedzialna za to oddziaływanie (zwykle C-terminalna) pozostaje nieustrukturyzowana do momentu utworzenia kompleksu toksyna-antytoksyna [85]. Cecha ta prawdopodobnie jest powodem stosunkowo szybkiej degradacji antytoksyn przez komórkowe proteazy (Lon, Clp) [60]; toksyny natomiast są białkami względnie stabilnymi. Zaburzenie stosunku ilości obu białek modułu TA w komórce prowadzi zatem do akumulacji w komórce aktywnej, niezwiązanej z antytoksyną, toksyny, a w konsekwencji – do zahamowania wzrostu lub śmierci komórki.

Większość modułów TA typu II charakteryzuje się podobną budową i mechanizmem regulacji ekspresji genów. Najczęściej występujący układ, to taki, w którym gen kodujący antytoksynę poprzedza gen kodujący toksynę i zachodzi na niego, oba zaś znajdują się pod kontrolą jednego promotora, ulegają kotranskrypcji oraz kotranslacji (rycina 2). Zbudowany w ten sposób operon podlega autoregulacji: związanie antytoksyny do rejonu operatorowego powyżej promotora powoduje zahamowanie transkrypcji obu genów. Zwykle oddziaływanie antytoksyny z toksyną powoduje wzrost jej powinowactwa do rejonu operatorowego DNA, istnieją jednak również takie kasety, w których represorem jest jedynie antytoksyna (*higBA*, *parDE*) (rycina 3 A, B) [34, 130], bądź funkcję regulatora ekspresji genów pełni trzecie białko (ω - ϵ - ζ) (rycina 4 B) [38]. Zaobserwowano, że w wielu systemach TA typu II (*relBE*, *phd-doc*, *vapBC*), zależnie od stechiometrycznego stosunku ilości cząsteczek antytoksyny do ilości cząsteczek toksyny, mogą tworzyć się kompleksy toksyna-antytoksyna

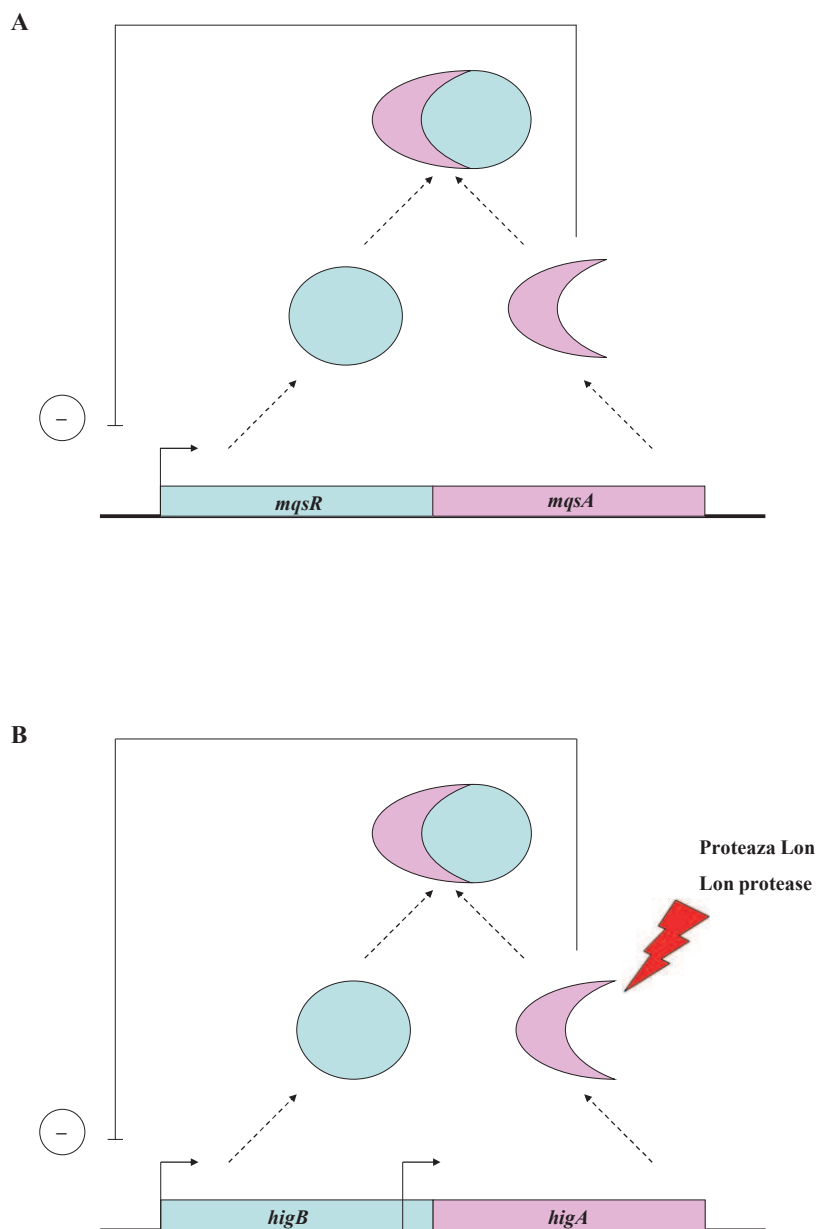
o zróżnicowanym powinowactwie do rejonu operatorowego DNA, w różny sposób wpływające na aktywność promotora. Zjawisko to, nazywane warunkową kooperatywnością (*conditional cooperativity*) [25, 26, 71, 133, 193], zapewnia ścisłą kontrolę ilości toksyny i antytoksyny w komórce oraz umożliwia subtelną regulację ekspresji genów operonu. Nie jest wykluczone, że podobnie jak w przypadku systemów TA typu I, regulacja ekspresji genów kaset TA typu II może być wielopoziomowa.



Rycina 2. Schemat przedstawiający kanoniczny model organizacji modułu toksyna – antytoksyna typu II Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarną strzałką oznaczono sekwencję promotorową. Geny antytoksyny i toksyny zachodzą na siebie, ulegają kotranskrypcji i kotranslacji. Antytoksyna oddziałuje z rejonem operatorowym DNA za pośrednictwem domeny N-terminalnej i powoduje represję promotora, toksyna działa jako korepresor. Oddziaływanie domeny C-terminalnej antytoksyny z toksyną niweluje toksyczny efekt, natomiast przy braku antytoksyny możliwe jest działanie toksyny na jej komórkowy cel [60]

Figure 2. Canonical model of type II toxin–antitoxin systems Toxin-associated elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrow denotes promoter. 3' end of the antitoxin gene overlaps 5' end of the toxin gene. Toxin and antitoxin are under control of a single promoter, they are co-transcribed and co-translated. The antitoxin protein binds to promoter/operator DNA region through its N-terminal domain and represses the promoter, toxin acts as a co-repressor. The C-

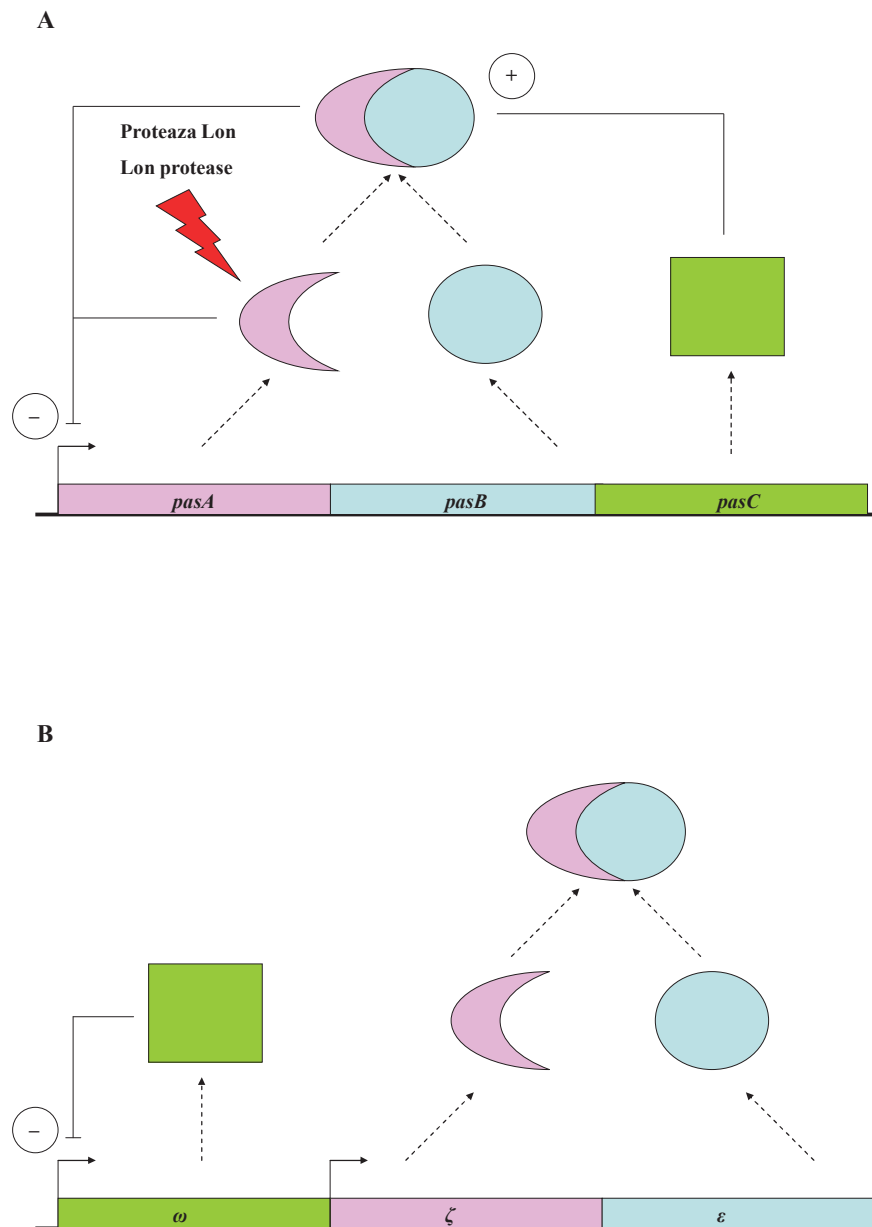
terminal domain of antitoxin binds to the toxin protein and neutralizes its toxic effect
[60]



Rycina 3. Schemat przedstawiający organizację modułów toksyna – antytoksyna, w których gen kodujący toksynę poprzedza gen kodujący antytoksynę Organizacja

i regulacja ekspresji genów tych modułów odbiega od modelu kanonicznego Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarnymi strzałkami oznaczono sekwencje promotorowe. **A Organizacja systemu *mqsRA* (*Escherichia coli*)** Kodowana poniżej genu toksyny antytoksyna jest represorem wspólnego dla obu genów promotora; oddziałuje ona z operatorem za pośrednictwem domeny C-terminalnej. W przeciwieństwie do większości antytoksyn systemów TA typu II, MqsA jest w pełni ustrukturyzowana w stanie wolnym, jest też białkiem stosunkowo stabilnym. Związanie MqsR do N-terminalnego końca antytoksyny powoduje nie tylko neutralizację toksyny, ale także destabilizację oddziaływania antytoksyny z DNA i derepresję promotora. **B Organizacja systemu *higBA* (*Escherichia coli*)** Geny antytoksyny i toksyny ulegają ekspresji za pośrednictwem dwóch różnych promotorów. C-terminalna domena HigA wiąże sekwencję operatorową i hamuje aktywność głównego promotora, kompleks toksyna-antytoksyna nie oddziałuje z DNA; mechanizm regulacji dodatkowego promotora, kontrolującego ekspresję antytoksyny nie został określony. Antytoksyna wiąże toksynę za pośrednictwem domeny N-terminalnej i hamuje jej aktywność [34, 195]

Figure 3. Toxin–antitoxin cassettes *mqsRA* (*Escherichia coli*) and *higBA* (*Escherichia coli*) exemplify the mode of regulatory mechanisms of type II TA systems with inverted gene order Toxin-associated elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrows denote promoters. **A Regulatory mechanism of *mqsRA* (*Escherichia coli*) TA system** Antitoxin protein binds to promoter/operator DNA region through its C-terminal domain and represses the promoter. In contrast to the canonical model of type II TA systems, antitoxin MqsA is fully structured in its unbound (with MqsR) state. MqsA is a relatively stable protein. The binding of MqsR through the N-terminal domain of MqsA neutralizes toxin and destabilizes interactions between antitoxin and DNA, and, consequently, causes derepression of the promoter. **B Regulatory mechanism of *higBA* (*Escherichia coli*) TA system** Toxin and antitoxin genes are under control of two distinctive promoters. The C-terminal domain of antitoxin binds to operator region of the main promoter and represses transcription. A mechanism for regulation of transcription driven from the other promoter is still unknown. Antitoxin interacts with the toxin through its N-terminal domain and neutralizes toxic effect [34, 195]



Rycina 4. Schemat organizacji modułów toksyna – antytoksyna zbudowanych z trzech komponentów Organizacja i regulacja ekspresji genów tych modułów odbiega

od modelu kanonicznego Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, z trzecim komponentem – symbolami zielonymi, czarnymi strzałkami oznaczono sekwencje promotorowe. **A Organizacja systemu *pasABC* (*Thiobacillus ferrooxidans*)** Wszystkie komponenty systemu ulegają ekspresji za pośrednictwem wspólnego promotora, antytoksyna, PasA, oddziałuje z operatorem jako represor, toksyna, PasB, wiążąc się z antytoksyną działa, jako korepresor. Białko PasC moduluje oddziaływanie pomiędzy PasA i PasB, wzmacniając neutralizujące właściwości antytoksyny. **B Organizacja systemu ω - ϵ - ζ (*Bacillus subtilis*)** Antytoksyna ulega koekspresji z toksyną i neutralizuje jej działanie, jednak ani antytoksyna, ani kompleks toksyna-antytoksyna nie oddziałuje z DNA; regulatorem ekspresji operonu jest natomiast trzecie białko – ω [38, 168]

Figure 4. Toxin–antitoxin cassettes *pasABC* (*Thiobacillus ferrooxidans*) and ω - ϵ - ζ (*Bacillus subtilis*) exemplify mode of regulatory mechanisms of type II TA systems composed of three genes Toxin associated elements are drawn in blue, antitoxin associated elements are drawn in pink, the third component is drawn in green, black arrows denote promoters. **A Regulatory mechanism of *pasABC* (*Thiobacillus ferrooxidans*) TA system** All three genes of *pasABC* system are under control of a single promoter. The antitoxin PasA protein binds to promoter/operator DNA and represses the promoter, The PasB toxin acts as a co-repressor. Protein PasC modulates interaction between PasA and PasB and enhances neutralizatory property of antitoxin. **B Regulatory mechanism of ω - ϵ - ζ (*Bacillus subtilis*) TA system** Toxin and antitoxin genes are under control of a single promoter. The regulatory protein ω modulates transcription of both toxin and antitoxin genes [38, 168]

Początkowo systemy toksyna – antytoksyna typu II podzielono na rodziny, uwzględniając homologię sekwencji aminokwasowych i struktury trzeciorzędowej tworzących je białek, przy czym klasyfikacja ta oparta była na założeniu, że danej rodzinie antytoksyn odpowiada specyficzna rodzina toksyn [63, 91, 134]. Jednak w wielu przypadkach kasety TA typu II są modułami hybrydowymi, złożonymi z komponentów należących do odmiennych rodzin [73, 161, 181], toteż zgodnie z aktualnymi danymi toksyny i antytoksyny systemów TA typu II podzielono odpowiednio na 13 i 20 niezależnych nadrodzin (tabela 2 i 3) [74, 115].

Tabela 2. Klasyfikacja toksyn systemów TA typu II na podstawie homologii sekwencji aminokwasowych i struktury trzeciorzędowej białek [74, 115]

Table 2. Classification of toxins from type II TA systems on the basis of homology of amino-acid sequences and protein structures [74, 115]

Nadrodzina toksyn / <i>Toxin superfamily</i>	Przykłady toksyn należących do nadrodziny / <i>Example</i>	Rodzaj aktywności toksyny / <i>Toxicity mechanism</i>	Skutek działania toksyny / <i>Toxicity effect</i>
RelE/ParE	RelE, ParE, HigB, PasB, YoeB, StbE, YafQ, Txe, YahV, YgjN, MqsR, SmeT11021(GinB)	Inhibicja gyrazy DNA lub trawienie mRNA wolnego oraz związanego z rybosomom / <i>Gyrase inhibition or mRNA degradation</i>	Zahamowanie replikacji DNA i indukcja odpowiedzi SOS lub zahamowanie translacji / <i>Inhibition of DNA replication and induction of the SOS response or translation inhibition</i>
CcdB/MazF	CcdB, MazF, YdcE, PemK, ChpBK	Inhibicja gyrazy DNA lub trawienie wolnego mRNA / <i>Gyrase inhibition or mRNA degradation</i>	Zahamowanie replikacji DNA i indukcja odpowiedzi SOS lub zahamowanie translacji / <i>Inhibition of DNA replication and induction of the SOS response or translation inhibition</i>
ξ	ξ,, PezT	Fosforylacja UDP-Glc-Nac / <i>UDP-Glc-Nac phosphorylation</i>	Zahamowanie syntezy peptydoglikanu / <i>Inhibition of peptidoglycan synthesis</i>
Doc	Doc	Blokowanie elongacji translacji poprzez wiązanie z podjednostką 30S i 70S rybosomu / <i>Inhibition of translation elongation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
HipA	HipA	Fosforylacja czynnika elongacji EF-Tu / <i>EF-Tu phosphorylation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
VapC	VapC	Trawienie tRNA ^{Met} / <i>tRNA^{Met} degradation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>

Nadrodzina toksyn / <i>Toxin superfamily</i>	Przykłady toksyn należących do nadrodziny / <i>Example</i>	Rodzaj aktywności toksyny / <i>Toxicity mechanism</i>	Skutek działania toksyny / <i>Toxicity effect</i>
YafO	YafO	Blokowanie elongacji translacji poprzez wiązanie z podjednostkami 30S rybosomu / <i>Inhibition of translation elongation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
VapD	VapD	Prawdopodobnie trawienie RNA / <i>RNA degradation</i>	Prawdopodobnie zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
RnIA	RnIA	Trawienie RNA / <i>RNA degradation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
HicA	HicA, SpyT510270(GinI)	Trawienie wolnego mRNA / <i>mRNA degradation</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
GinA	SpyT110270, SpyT29270, BceT1E33L	Nieznana / <i>Unknown</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
GinC	SpyT1 _{M1}	Nieznana / <i>Unknown</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>
GinD	BceT5 _{E33L}	Nieznana / <i>Unknown</i>	Zahamowanie translacji / <i>Translation inhibition</i>

Tabela 3. Klasyfikacja antytoksyn systemów TA typu II na podstawie homologii sekwencji aminokwasowych. Podana klasyfikacja nie obejmuje antytoksyny systemu *mqsRA* [74, 115]

*Table 3. Classification of antitoxins from type II TA systems on the basis of amino-acid sequences' homology. The classification does not include the *mqsRA* system antitoxin [74, 115]*

Nadrodzina antytoksyn / <i>Antitoxin superfamily</i>	Przykłady antytoksyn należących do nadrodziny / <i>Example</i>
Phd	Phd, YefM, Axe, PasB, StbD, YafN, RelB307
RelB	RelBK-12, DinJ, PaaI
PasA	PasA, YdcD, ParDEDL933, SpeA2TIGR4
MazE	VapB, MvpA, MazE, ChpBI, PemI, SpeA3TIGR4

Nadrodzina antytoksyn / <i>Antitoxin superfamily</i>	Przykłady antytoksyn należących do nadrodziny / <i>Example</i>
HigA	HigA, HipB, YgjMa, BceA5E33L, SmeA11021, MvA1K10, EcoA1EDL933
VapX	VapX
CcdA	CcdAF
ε	E
ParD	ParD _{RK2}
FizA	SpyA2 ₁₀₇₀
FizB	CcrA1 _{CB15}
FizC	SpyA1 _{M1}
FizD	NeuA1 _{C91}
FizE	AtuA1 _{C58}
FizF	SpyA1 ₁₀₂₇₀
FizG	NspA2 _{PC7120} , NspA5 _{PC7120}
FizH	AfuA2 _{DSM4304}
FizI	CcrA4 _{CB15}
FizJ	BceA1 _{33L}
FizK	NspA1 _{PC7120}

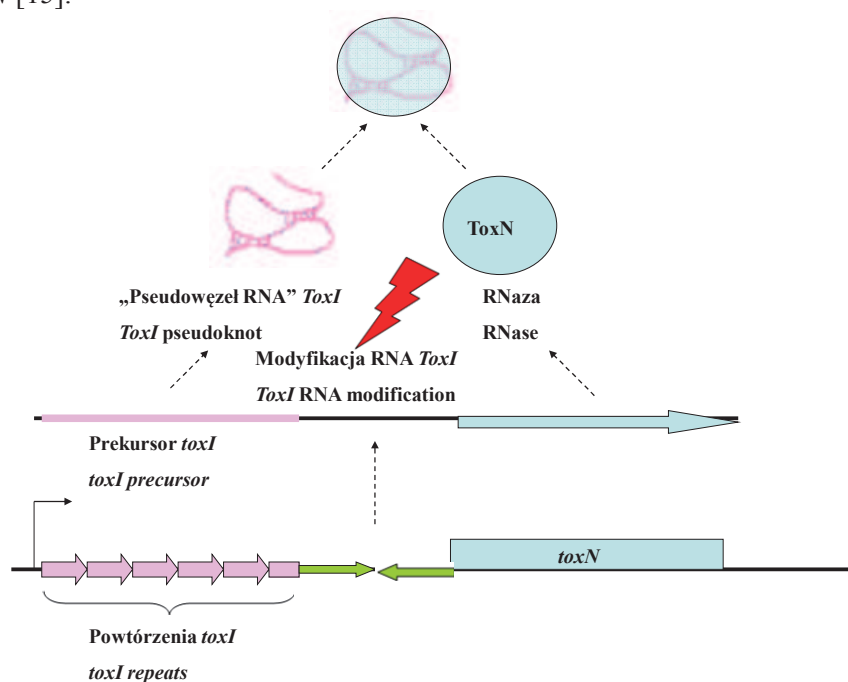
Opisane powyżej przykłady wskazują, że przyjęty model autoregulacji systemów TA typu II w wielu przypadkach nie obejmuje wszystkich zależności, które mogą mieć istotny wpływ na ekspresję genów kaset toksyna-antytoksyna.

1.1.3. Systemy toksyna – antytoksyna typu III

Antytoksyny kaset TA typu III stanowią małe RNA o charakterystycznej strukturze drugorzędowej – tzw. „pseudowęzłów RNA” (*pseudoknot*). Cząsteczki RNA antytoksyny wiążą się bezpośrednio z białkową toksyną i hamują jej toksyczne działanie.

Jednym z najlepiej opisanych modułów TA typu III jest system *toxIN*, kodowany na plazmidzie pECA1039 bakterii *Pectobacterium atrosepticum* (rycina 5) [50]. Kasetta ta zbudowana jest z genu kodującego toksynę ToxN, mającą aktywność RNazy rozpoznającej określoną sekwencję nukleotydową. Jest on poprzedzony powtórzonymi sekwencjami DNA kodującymi prekursorowe RNA antytoksyny, ToxI. Pomiędzy genami, kodującymi toksynę i antytoksynę, obecna jest sekwencja DNA, tworząca odwrócony palindrom, pełniącą rolę Rho-niezależnego terminatora transkrypcji. Ekspresja antytoksyny i toksyny zachodzi ze wspólnego promotora, toteż sekwencja terminatorowa bierze udział w regulacji ilości antytoksyny i toksyny w komórce – jedynie około 10% rozpoczętych transkrypcji skutkuje utworzeniem bicistronowego RNA *toxIN* [15]. ToxN trawi prekursorowy RNA *toxI*, wskutek czego powstaje dojrzała cząsteczka antytoksyny. Antytoksyna neutralizuje działanie toksyny, poprzez utworzenie z nią heteroheksamerycznego kompleksu (ToxI)₃(ToxN)₃ [167].

Dane uzyskane po przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych pozwoliły na identyfikację 125 potencjalnych systemów TA, należących do typu III, które podzielono na podstawie homologii sekwencji na 3 rodziny: *toxIN*, *cptIN*, *tenpIN* [15].



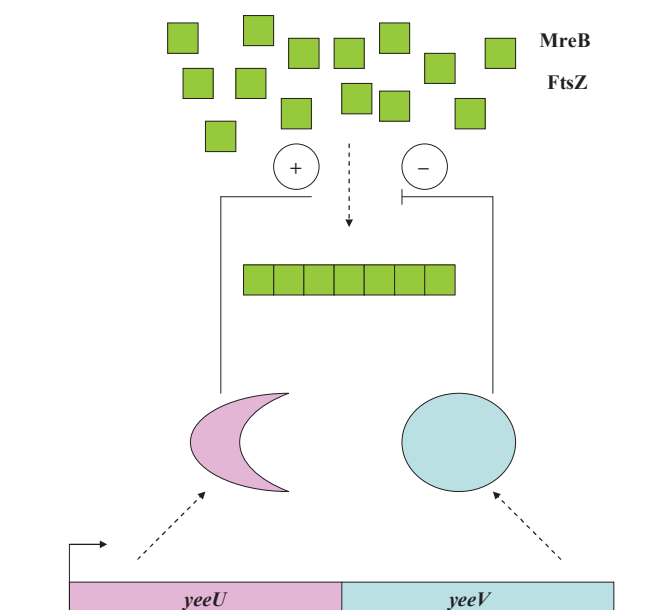
Rycina 5. Schemat przedstawiający organizację systemu toksyna – antytoksyna typu III, na przykładzie kastyety *toxIN* (*Pectobacterium atrosepticum*) Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarną strzałką oznaczono sekwencję promotorową, zielonymi – sekwencję terminatorową. Opis w tekście [15, 167]

Figure 5. Toxin–antitoxin cassette *toxIN* (*Pectobacterium atrosepticum*) exemplifies the mode of regulatory mechanisms of type III TA systems Toxin-associated elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrow denotes the promoter, green arrows denote terminator sequences. Description is placed in the text above [15, 167]

1.1.4. Systemy toksyna – antytoksyna typu IV

Jedyna znana kasetta typu IV, *yeeUV* (*cbeA-cbtA*) jest kodowana w DNA kryptycznego profaga CP-44-4 obecnego w chromosomalnym DNA bakterii *Escherichia coli* K-12. Moduł ten różni się od pozostałych typów kaset TA mechanizmem działania antytoksyny polegającym na antagonistycznym w stosunku do toksyny, oddziaływaniu, skierowanym bezpośrednio na komórkowy cel YeeV (rycina 6). Toksyna YeeV oddziałuje bezpośrednio z

białkami FtsZ i MreB, zaangażowanymi w tworzenie cytoszkieletu i septy podziałowej [173]. Związanie YeeV do białka FtsZ powoduje inhibicję jego aktywności GTPazowej i polimeryzacji, zaś związanie toksyny do białka MreB prawdopodobnie zaburza jego oddziaływanie z innymi komponentami kompleksu, co skutkuje obniżeniem wydajności polimeryzacji MreB [119, 173]. Antytoksyna YeeU, wiążąc do tworzącego się z tych białek filamentu, ułatwia polimeryzację FtsZ i MreB [118]. Co ciekawe, YeeU znosi efekt działania nie tylko toksyny YeeV, ale także innych czynników, hamujących polimeryzację białek FtsZ i MreB (A22, SulA, Dick, MinC) [118].

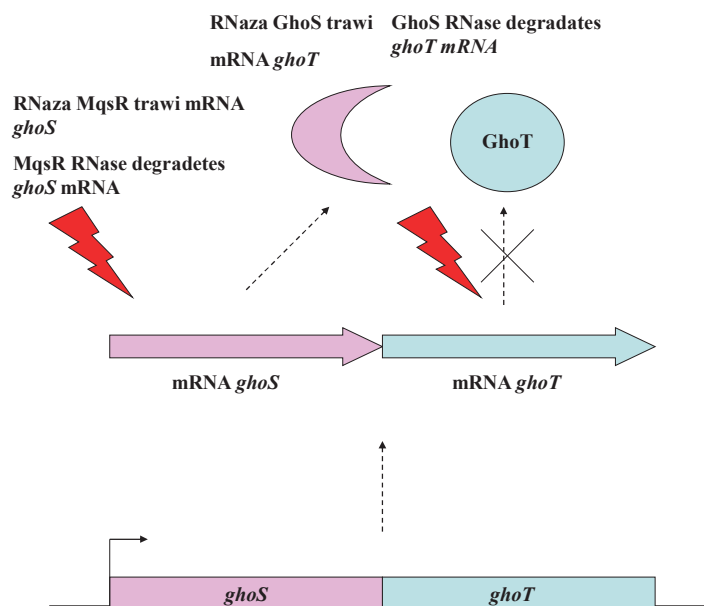


Rycina 6. Schemat przedstawiający działanie systemu toksyna – antytoksyna typu IV, na przykładzie kasety *yeeUV* (*Escherichia coli*) Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarną strzałką oznaczono sekwencję promotorową. Symbolami zielonymi oznaczono komórkowy cel toksyny i antytoksyny. Opis w tekście [118, 173]

Figure 6. Toxin–antitoxin cassette *yeeUV* (*Escherichia coli*) exemplifies the mode of regulatory mechanisms of type IV TA system Toxin associated-elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrow denotes the promoter. Cellular targets of the toxin action are drawn in green. Description is placed in the text above [118, 173]

1.1.5. Systemy toksyna – antytoksyna typu V

Dotychczas opisano tylko jeden przykład kasety TA typu V: system *ghoST* (*yjdOK*) obecny w DNA bakterii *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* oraz *Proteus* (rycina 7) [186, 187]. Toksyna GhoT jest małym, hydrofobowym białkiem, zawierającym dwie domeny transmembranowe, którego działanie powoduje zaburzenie struktury błony wewnętrznej, zaburzenie potencjału błonowego komórki, obniżenie poziomu ATP oraz tworzenie tzw. „ghost cells”, czyli powłok komórkowych pozbawionych cytoplazmy. Białko GhoS, w przeciwieństwie do antytoksyn innych systemów, jest stabilną RNazą, trawiącą specyficznie mRNA *ghoT* i w ten sposób obniżającą ilość toksyny w komórce [186]. Regulacja ekspresji antytoksyny zachodzi przy udziale, rozpoznającej sekwencję mRNA *ghoS*, RNazy MqsR. Zależność ta jest ciekawym przykładem interakcji pomiędzy systemami TA – białko MqsR jest jednym z komponentów chromosomalnego modułu toksyna-antytoksyna typu II, *mqsRA* [187].



Rycina 7. Schemat przedstawiający działanie systemu toksyna – antytoksyna typu V, na przykładzie kasety *ghoST* (*Escherichia coli*) Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarną strzałką oznaczono sekwencję promotorową. Opis w tekście [186, 187]

Figure 7. Toxin–antitoxin cassette *ghoST* (*Escherichia coli*) exemplifies the mode of regulatory mechanisms of type V TA system Toxin-associated elements are drawn

in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink, black arrow denotes the promoter. Description is placed in the text above [186, 187]

1.1.6. Ewolucja systemów toksyna – antytoksyna

Komponenty poszczególnych modułów TA wykazują podobieństwo strukturalne do różnorodnych białek (proteazy serynowe, ATPazy, RNazy, czynniki transkrypcyjne) [186, 196], jednak ich pierwotne pochodzenie pozostaje niejasne. Przypuszcza się, że systemy toksyna – antytoksyna nie mają jednego wspólnego przodka, lecz pojawiły się w toku ewolucji kilkakrotnie [4, 169]. Nieznane pozostają szczegóły procesu ewolucji chromosomalnych i plazmidowych kaset TA, wiadomo jednak, że możliwy jest ich transfer pomiędzy chromosomalnym i plazmidowym DNA [23]. W wielu przypadkach antytoksyny i toksyny tworzące jeden moduł charakteryzują się odmiennym pochodzeniem ewolucyjnym [4, 73, 161, 181].

Wydaje się, że kasety TA typu I powstawały wskutek duplikacji genów w obrębie poszczególnych taksonów, zaś ich propagacja miała miejsce głównie na drodze wertykalnego transferu genów [53]. Teoria ta wyjaśnia nierównomierne rozmieszczenie pośród taksonów poszczególnych rodzin kaset TA tego typu [53]. Możliwe jest jednak, że proces ewolucji niektórych kaset TA typu I przebiegał nieco inaczej. Kodowany w chromosomalnym DNA *Escherichia coli* K-12 system *ldr-rdl* jest homologiem kasety *par*, obecnej w DNA plazmidu pAD1 pochodzącego z Gram-dodatniej bakterii *Enterococcus faecalis* [53, 97]. Co ciekawe, mechanizm regulacji ekspresji *ldr* przypomina sposób regulacji ekspresji genu toksyny Hok plazmidowego modułu *hok-sok* z *Escherichia coli* [65]. Wydaje się zatem, że moduł *ldr-rdl* może być przykładem hybrydowej kasety TA typu I, posiadającej cechy charakterystyczne dla systemów TA pochodzących z odległych ewolucyjnie gatunków bakterii [189].

Nie można wykluczyć, że systemy TA typu II również mogły powstawać wskutek duplikacji genów w obrębie poszczególnych taksonów, jednak wiadomo, że rozprzestrzeniały się one pomiędzy taksonami także poprzez horyzontalny transfer genów, zaś w ich ewolucji istotną rolę odgrywał mechanizm wymiany genów *in situ* [4]. Oznacza to, że nowe moduły TA tego typu mogły ewoluować z istniejących już toksyn i antytoksyn, należących do odmiennych rodzin [4, 169]. Określenie pochodzenia i sposobu ewolucji systemów TA należących do typu III, IV i V wymaga dalszych badań.

Podobieństwo strukturalne pomiędzy białkami należącymi do odmiennych typów kaset TA, sugeruje, że kasety TA różnych typów mogły powstawać poprzez modyfikację i dostosowanie komponentów istniejących systemów TA [4, 169]. Toksyna systemu TA typu III, ToxN, wykazuje podobieństwo strukturalne do rodziny toksyn typu II, CcdB/MazF [15], zaś struktura toksyny typu V, GhoT, jest zbliżona do struktury toksyny systemu TA typu I, *hok-sok* [186], jest zatem możliwe, że nowe kasety TA danego typu powstawały wskutek modyfikacji komponentów kaset TA, należących do innych typów.

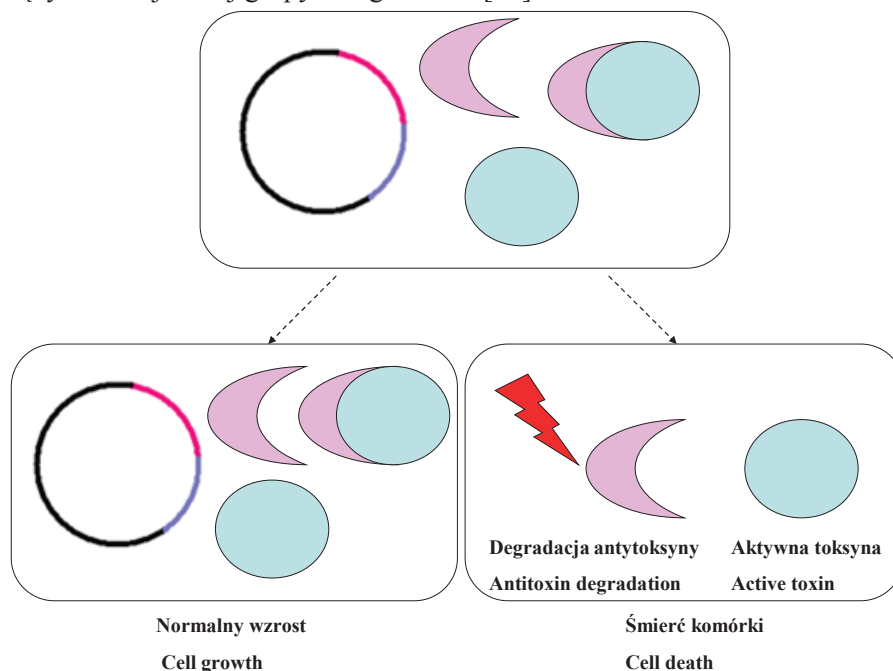
Co więcej możliwe jest, że toksyny i antytoksyny systemów TA powstawały w toku ewolucji z elementów o odmiennej funkcji [169]. Świadczyć o tym może obecność w strukturze niektórych antytoksyn domen charakterystycznych dla toksyn. Przykładem może tu być antytoksyna systemu TA typu IV, YeeU, której struktura trzeciorzędowa, pomimo znacznych różnic w sekwencji aminokwasowej, jest podobna do homologów toksyny typu II, RelE [5]. Teorię tę potwierdza także obecność domen właściwych antytoksynom w strukturze toksyn. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku toksyny SymE, która posiada domenę AbrB, charakterystyczną dla antytoksyn [96]. Ponadto możliwe jest stworzenie nowej pary toksyna – antytoksyna z istniejących komponentów o odmiennych funkcjach, o czym świadczy uzyskany poprzez mutagenезę genów kodujących antytoksyny *ghoS* i *mqsA*, system *arAT* [169]. Nie można wykluczyć, że systemy TA złożone z białek o strukturze zbliżonej do struktury komponentów innych typów kaset TA, powstały wskutek ewolucji konwergentnej, jednak możliwość ewolucji modułów hybrydowych z genów kaset różnych typów wydaje się wysoce prawdopodobna.

1.2. Biologiczna rola systemów toksyna – antytoksyna

Kasety toksyna-antytoksyna są szeroko rozpowszechnione w plazmidowym i chromosomalnym DNA bakterii. W niektórych przypadkach mogą stanowić nawet ponad 2.5% wszystkich otwartych ramek odczytu w genomie [115]. Oznacza to, że w jednej komórce może koegzystować wiele, zarówno homologicznych, jak i niehomologicznych systemów toksyna-antytoksyna. Różnorodność i obfitość występowania kaset TA sprawia, że nasuwa się pytanie nie tylko o ich biologiczną rolę, ale także o możliwość interakcji pomiędzy systemami TA, jak również o ich powiązania funkcjonalne z innymi komponentami komórki bakteryjnej. Interakcje takie mogą mieć charakter oddziaływania bezpośredniego bądź pośredniego, najczęściej związanego z rodzajem aktywności toksyny danego modułu. Pomimo podobieństwa strukturalnego elementów wielu systemów TA, kasety toksyna-antytoksyna charakteryzują się zwykle wysoką specyficznością, toteż bezpośrednie krzyżowe interakcje pomiędzy systemami TA są zjawiskiem stosunkowo rzadkim, szczególnie w przypadku modułów kodowanych w obrębie tego samego replikonu [1, 142]. Częściej obserwowanym zjawiskiem są oddziaływania pośrednie, które mogą dotyczyć zarówno interakcji pomiędzy systemami toksyna – antytoksyna, wpływu aktywności modułów TA na procesy, zachodzące w komórce bakteryjnej, jak i modulacji ekspresji genów bądź aktywacji toksyn np. w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska lub infekcję przez bakteriofagi.

1.2.1. Plazmidowe systemy toksyna – antytoksyna

Uważa się, że systemy TA kodowane w DNA plazmidowym odpowiadają przede wszystkim za posegregacyjną eliminację komórek, które nie odziedziczyły plazmidu (*post-segregational killing* – PSK) (rycina 8) [150, 177, 197] – stąd nazywa się je niekiedy systemami addycyjnymi [60]. Plazmidy, występujące w komórkach bakteryjnych naturalnie, charakteryzują się najczęściej niską liczbą kopii, zatem mechanizm PSK wpływa na ich stabilne utrzymywanie się w populacji bakterii. Ponadto obecność kasety TA zwiększa konkurencyjność niosącego ją plazmidu względem innych plazmidów, należących do tej samej grupy niezgodności [36].



Rycina 8. Schemat przedstawiający mechanizm posegregacyjnej eliminacji komórek Niebieskie symbole oznaczają toksynę, różowe – antytoksynę. Wskutek podziału komórki macierzystej, komórki potomne wraz z cytoplazmą otrzymują komponenty systemu toksyna – antytoksyna: stabilną toksynę i ulegającą szybkiej degradacji antytoksynę. Komórki, które nie odziedziczyły kopii plazmidu niosącego kasetę toksyna – antytoksyna, nie mają możliwości syntezy antytoksyny *de novo*, wobec czego dochodzi do akumulacji aktywnej toksyny i śmierci komórki w wyniku jej działania [184]

Figure 8. Mechanism of post-segregational cell killing (PSK) Toxin-associated elements are drawn in blue, antitoxin-associated elements are drawn in pink. After cell division, daughter cells receive with the cytoplasm labile antitoxin molecules and stable

toxin molecules. Daughter cells that did not inherit plasmid copy cannot synthesize antitoxin de novo. After antitoxin degradation, the toxin acts on its cellular target, and consequently, causes cell death [184]

W przypadku niektórych systemów TA obserwuje się bezpośrednie krzyżowe interakcje pomiędzy toksynami i antytoksynami modułów plazmidowych i chromosomalnych (plazmidowy moduł *par* i chromosomalne kasety *mazEF* i *chpB*) [155, 156]. Przypuszcza się, że zjawisko to może stanowić swoisty mechanizm anty-addykcyjny, zabezpieczający komórki, które utraciły plazmid przed śmiercią w wyniku działania toksyny [149].

Pomimo tego, że biologiczna rola plazmidowych modułów TA wydaje się oczywista, wiadomo, że mogą one pełnić także inne funkcje. Okazuje się, że biologiczna rola plazmidowych modułów TA może być taka sama lub zbliżona do funkcji jaką pełnią homologiczne do nich kasety chromosomalne [23]. Aktywność wielu systemów TA kodowanych w DNA chromosomalnym wpływa m.in. na regulację ekspresji genów powiązanych z wirulencją i opornością na antybiotyki [55, 72, 80, 122, 171]. Wykazano, że pochodzący z patogennej bakterii *Staphylococcus aureus* CH91 plazmidowy moduł TA typu II *pemKSA* wpływa na regulację ekspresji wielu genów, w tym również genów kodujących czynniki wirulencji. Co więcej, istnieją przesłanki, aby sądzić, że kasety *pemKSA* może być przekazywana pomiędzy chromosomalnym i plazmidowym DNA [23].

Wiele chromosomalnych systemów TA kodowanych jest w obrębie mobilnych elementów genetycznych takich, jak kryptyczne profagi (np. systemy *rnlAB*, *relBE*, *yeeUV*, *txpA-ratA* kodowane w DNA profagów CP4-57, Qin, CP4-44, *skin*) [43, 71, 104, 118, 119] czy superintegrony (homologi systemów *phd-doc* i *ccdAB* obecne w superintegronach *Vibrio cholerae* i *Vibrio fischeri*) [148, 172]. Podobnie, jak w przypadku modułów plazmidowych, ich pierwotną i podstawową funkcją jest zapewne stabilizacja tych rejonów DNA [43, 62, 148, 172], wiadomo jednak, że mogą mieć także inne biologiczne znaczenie. Wykazano na przykład, że system typu II *rnlAB* zabezpiecza populację komórek bakteryjnych przed infekcją przez bakteriofagi. Po infekcji komórki, synteza białek gospodarza zostaje wstrzymana, labilna antytoksyna RnIA ulega degradacji, wskutek czego dochodzi do akumulacji toksyny RnIB (rybonukleaza), która degraduje późne transkrypty fagowe i w ten sposób hamuje rozprzestrzenianie się wirusa [104, 312]. Podobną funkcję pełnią również plazmidowe moduły *hok-sok* (typ I) i *toxIN* (typ III) [50, 135], przy czym oba funkcjonują także jako moduły addykcyjne [50, 62].

1.2.2. Chromosomalne systemy toksyna – antytoksyna

Biologiczna rola kaset toksyna-antytoksyna kodowanych w chromosomalnym DNA pozostaje w wielu przypadkach niejasna. Chromosomalne moduły TA, jak wcześniej wspomniano, mogą funkcjonować jako systemy anty-addykcyjne [149], moduły stabilizujące mobilne elementy

genetyczne [33, 43, 148, 172] czy też systemy zabezpieczające populację bakteryjną przed infekcją bakteriofagami [86, 104, 132]. Istnieją jednak moduły, których komponenty nie uczestniczą w interakcjach krzyżowych z elementami innych systemów TA [148], a także takie, które nie wpływają stabilizująco na mobilne elementy genetyczne (*ccd_{O157H7}*) [192], zatem ich funkcja musi być zgoła odmienna. Prawdopodobnie aktywność niektórych z nich stanowi integralną część sieci zależności fizjologicznych w komórce bakteryjnej i jest istotna dla takich procesów, jak formowanie biofilmu czy powstawanie komórek o obniżonej wrażliwości na antybiotyki (tzw. „*persister cells*”) [11, 70, 101, 106, 113, 143, 160, 199, 200]. Do niedawna uważano, że bakterie wolno żyjące, narażone na nieustanne zmiany warunków środowiskowych, posiadają w swym genomie wiele modułów TA, natomiast nie ma ich lub ich ilość jest niewielka w genomach wewnątrzkomórkowych pasożytów i symbiontów [134]. Tego typu zależność wskazywałaby na adaptacyjną rolę chromosomalnych modułów TA, polegającą na przykład na modulacji tempa wzrostu bakterii w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska lub ich udziale w odpowiedzi SOS [95, 136]. Pomimo tego, że aktualne dane bioinformatyczne wskazują na brak tego typu korelacji [115], nadal nie można wykluczyć, że taka jest właśnie biologiczna funkcja niektórych chromosomalnych modułów TA.

Przykładem takiego systemu jest chromosomalna kasetta *Escherichia coli*, *relBE*, kodowana w DNA kryptycznego profaga Qin. Kasetta *relBE* może pełnić rolę modułu stabilizującego mobilne elementy genetyczne [71], jednocześnie jest uważana za system modulujący tempo wzrostu komórek w odpowiedzi na stres środowiskowy. Podczas hodowli bakterii przy niedoborze aminokwasów, toksyna RelE ulega aktywacji poprzez zależną od proteazy Lon degradację antytoksyny [31]. RelE jest rybonukleazą, która trawi mRNA związane z rybosomem [33, 89, 137]. Jej działanie powoduje odwracalne zahamowanie translacji i jest powiązane z procesem uwalniania rybosomu zatrzymanego w wyniku błędnej translacji, w czym pośredniczy tmRNA [31, 33]. Obniżony poziom translacji prowadzi do zahamowania wzrostu bakterii, zmniejsza ryzyko syntezy nieprawidłowych białek i obniża zapotrzebowanie energetyczne komórki, co ułatwia przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska [33, 57]. Teoria ta, zaproponowana przez Profesora Gerdes'a, wyjaśnia także biologiczne znaczenie pośredniej interakcji pomiędzy systemami *relBE* i *phd-doc* (moduł TA kodowany w genomie faga P1). Wywołane aktywnością toksyny Doc zahamowanie translacji, prowadzi do zależnej od proteazy Lon aktywacji toksyny systemu *relBE*. Przypuszczalnie działanie RelE stanowi część mechanizmu odpowiedzi komórki na stres wywołany aktywnością Doc [71].

Funkcję polegającą na modulacji tempa wzrostu w odpowiedzi na stres przypisuje się także systemom *mazEF* i *chpB* [33, 34]. Według innej teorii biologiczna rola systemu *mazEF* polega na uczestniczeniu w mechanizmie programowanej śmierci komórki bakteryjnej (*programmed cell death* – PCD) – zjawiska zbliżonego do apoptozy [2, 46]. Zgodnie z modelem programowanej

śmierci komórki, śmierć pewnej frakcji komórek w populacji w wyniku działania toksyny umożliwia przeżycie pozostałym bakteriom, poprzez dostarczenie im brakujących składników odżywczych [2, 46]. Zaobserwowano, że w obecności wysokiego stężenia czterofosforanu guanozyny (tzw. alarmonu głodu) w komórce, dochodzi do zahamowania ekspresji genów kasety *mazEF* [2]. Antytoksyna MazE jest degradowana przez protezę ClpAP, wskutek czego dochodzi do uwolnienia rybonukleazy MazF [2]. Zahamowanie translacji za pośrednictwem MazF jest do pewnego momentu odwracalne lecz długotrwała aktywność toksyny jest dla komórki letalna [3]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że zależnie od warunków środowiska system *mazEF* może służyć modulacji tempa wzrostu bądź prowadzić do programowanej śmierci komórki [3, 87].

Oba przedstawione modele funkcjonowania kaset TA stały się nieco kontrowersyjne po opublikowaniu przez Tsilibaris i wsp. w 2007 roku wyników badań nad pochodną szczepu *Escherichia coli* MG1655 niosącą delecje wszystkich znanych w tym czasie chromosomalnych modułów TA typu II (*yefM-yoeB*, *chpB*, *dinJ-yafQ*, *mazEF*, *relBE*). Autorzy przetestowali wpływ kilku różnych czynników stresowych na wzrost bakterii w hodowlach płynnych, nie zaobserwowali jednak żadnych różnic w tempie wzrostu komórek niosących mutacje i komórek typu dzikiego, nie wykazali również indukcji zjawiska programowanej śmierci w hodowlach komórek niosących kasetę *mazEF* [175]. Jednak uzyskane pięć lat później wyniki eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem modelu mysiego pokazują, że kasety toksyna-antytoksyna mają istotny wpływ na kondycję komórek bakteryjnych rosnących w specyficznym środowisku. Udowodniono m.in., że obecność kaset TA zwiększa odporność szczepów bakterii kolonizujących mysie tkanki na stres oksydacyjny oraz niedobór składników odżywczych, prawdopodobnie zgodnie z modelem zaproponowanym przez zespół Profesora Gerdes'a [60, 127]. Co więcej, obecność różnych kaset toksyna-antytoksyna wpływała na możliwości kolonizacji przez patogenny szczep *Escherichia coli* różnych tkanek gospodarza: moduły *yefM-yoeB* i *ybaJ-hha* zwiększały konkurencyjność niosącego je szczepu podczas kolonizacji pęcherza moczowego, zaś system *pasTI* (nazywany także *yffGF* lub *ratAB*) – podczas kolonizacji nerek [127].

Zjawisko programowanej śmierci komórek bakteryjnych zaobserwowano natomiast podczas procesu tworzenia form przetrwalnych bakterii *Myxococcus xanthus* (tzw. ciał owocowych), w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych. Jednym z elementów tego procesu jest autoliza nawet 80% populacji komórek bakteryjnych. Okazuje się, że śmierć komórek podczas tworzenia ciał owocowych wywołana jest prawdopodobnie przez toksynę MazF_{mx} homologiczną do białka MazF *Escherichia coli*. Delecja *mazF_{mx}* powoduje znaczną redukcję ilości ciał owocowych w populacji w warunkach głodu. Nie wiadomo czy białko to odpowiedzialne jest również za lizę komórek. Co ciekawe, regulacja ekspresji genu *mazF_{mx}* odbiega znacznie od modelu

kanonicznego dla kaset TA. Zarówno ekspresja *mazF_{mx}*, jak i aktywność toksyny regulowane są przez białko MrpC – jeden z globalnych czynników regulujących transkrypcję w komórkach *Myxococcus xanthus* podczas tworzenia ciał owocowych [123].

Eksperymenty przeprowadzone przez Norton'a i Mulvey'a z wykorzystaniem modelu mysiego pokazują, że przynajmniej niektóre kasety TA mogą posiadać kilka funkcji, a ich rola może zmieniać się, zależnie od warunków środowiska. Obecność systemu *pasTI* w genomie patogennego szczepu *Escherichia coli* (CFT073), poza zwiększeniem odporności bakterii na stres oksydacyjny i niedobór składników odżywczych, wpływała także na wzrost ilości komórek typu „*persistor*” w populacji w obecności ampicyliny lub ciprofloksacyny [127]. Komórki typu „*persistor*” stanowią niewielką subpopulację bakterii (około 1%), które pozostają żywotne w obecności letalnej dawki antybiotyku, przy czym ich oporność na antybiotyk ma charakter epigenetyczny [69, 92]. Mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze w pełni wyjaśniony, jednak zaobserwowano, że nadekspresja toksyn niektórych modułów TA (MqsR, TisB) w istotny sposób wpływa na wzrost ilości komórek typu „*persistor*” w populacji [42, 102], zaś delecja systemów TA obniża częstotliwość ich występowania [42, 102, 127]. Zaobserwowano także indukcję ekspresji toksyn licznych kaset TA w komórkach typu „*persistor*” (RelE, HigB, MazF, YafQ, YoeB, MqsR) w porównaniu z komórkami rosnącymi [99, 105, 165]. Przymuszczalnie bakteriostatyczny efekt działania toksyn systemów TA jest jednym z kluczowych czynników determinujących proces tworzenia fenotypu „*persistence*” [188].

Komórki typu „*persistor*” obserwuje się najczęściej w populacjach bakterii znajdujących się w stacjonarnej fazie wzrostu hodowli oraz wśród komórek tworzących biofilmy [116]. Interesującym jest fakt, że bakterie *Escherichia coli* formujące biofilm charakteryzują się zmienioną ekspresją wielu genów, w tym genów związanych z odpowiedzią stresową i kasety toksyna – antytoksyna *mqsRA* [12, 40, 143]. Delecja tej kasety obniża nie tylko częstotliwość występowania w populacji komórek „*persistor*”, ale również zdolność tworzenia biofilmu [94]. Okazuje się, że antytoksyna MqsA działa jako czynnik regulujący ekspresję genów istotnych dla procesu tworzenia biofilmu i odpowiedzi stresowej (*rpoS*, *csqD*) [10, 21, 170].

Defekty w procesie formowania biofilmu obserwuje się też w szczepie *E. coli* z delecją pięciu chromosomalnych systemów TA (*yefM-yoeB*, *chpB*, *dinJ-yafQ*, *mazEF*, *relBE*) [101]. Prawdopodobnie główną przyczyną tego zjawiska jest brak toksyn MazF i YafQ [106].

Kaseta *mqsRA* wpływa na fizjologię komórki bakteryjnej zarówno poprzez aktywność toksyny, jak i na poziomie regulacji ekspresji szeregu genów nie związanych bezpośrednio z samym systemem TA [19, 20, 84, 101, 170, 188]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że także działanie innych systemów toksyna – antytoksyna może stanowić integralną część subtelnych zależności

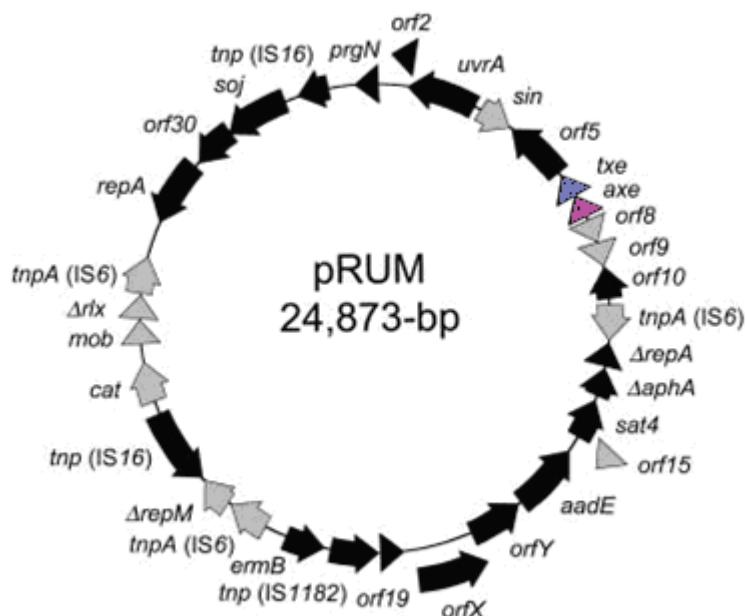
fizjologicznych w komórce, a ekspresja genów kaset TA w szerszej perspektywie może podlegać regulacji nie tylko poprzez kanoniczny mechanizm negatywnego sprzężenia zwrotnego, ale także inne czynniki.

Zarówno formowanie biofilmu, jak i występowanie komórek typu „*persistor*” mają istotne znaczenie medyczne. Zjawisko formowania biofilmu jest powiązane z około 80% chronicznych zakażeń bakteryjnych u ludzi [8, 116], zaś zjawisko występowania „*persistor cells*” jest jedną z głównych przyczyn zmniejszonej wrażliwości na antybiotyki komórek bakteryjnych tworzących biofilm [165]. Ścisły związek pomiędzy systemami toksyna-antytoksyna a powyższymi zjawiskami sprawia, że wyniki badania nad kasetami toksyna-antytoksyna mogą w niedalekiej przyszłości stanowić podstawę do stworzenia innowacyjnych technologii antibakteryjnych.

1.3. System toksyna – antytoksyna *axe-txe*

Nazwa systemu toksyna-antytoksyna *axe-txe* pochodzi od angielskiego odpowiednika sformułowania „antytoksyna i toksyna z bakterii *Enterococcus*” (*antitoxin from Enterococcus and toxin from Enterococcus*). Moduł ten został odkryty w 2003 roku w DNA, niosącego szereg determinanty antybiotykooporności, plazmidu pRUM (rycina 9), wyizolowanego z patogennego szczepu Gram-dodatniej bakterii *Enterococcus faecium* U37 [73, 144]. Późniejsze badania wykazały, że jest kodowany w plazmidowym DNA wielu lekoopornych, patogennych szczepów *E. faecium*, w tym również w DNA plazmidów niosących geny oporności na, nazywaną „antybiotykiem ostatniej szansy”, wankomycynę [122, 146].

Kaseta *axe-txe* jest funkcjonalna w komórkach bakterii należących do odległych ewolucyjnie gatunków; może działać jako moduł sprzyjający stabilnemu utrzymywaniu plazmidów w populacji komórek bakteryjnych zarówno Gram-dodatnich (*Enterococcus faecium* SE34, *Bacillus thuringiensis*), jak i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*) [73].



Rycina 9. Schemat przedstawiający organizację genetyczną plazmidu pRUM, pochodzącego z patogennego szczepu U37 bakterii *Enterococcus faecium*. Przewidywane otwarte ramki odczytu (ang. open reading frames - ORF), których transkrypcja zachodzi w kierunku zgodnym lub przeciwnym do kierunku ruchu wskazówek zegara zaznaczono odpowiednio – kolorem szarym i czarnym, kolorem niebieskim zaznaczono ORF toksyny Txe, różowym – antytoksyny Axe. Porównanie sekwencji kodowanych w obrębie przewidywanych ramek odczytu znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie kasyety *axe-txe*, wykazało homologię jedynie do hipotetycznych białek [73]

Figure 9. Genetic organization of the multidrug resistance plasmid pRUM of pathogenic *Enterococcus faecium* U37. ORFs predicted to be transcribed in the clockwise and counterclockwise directions are indicated in grey and black respectively. Txe encoding gene is indicated in blue, and that encoded Axe in pink [73]

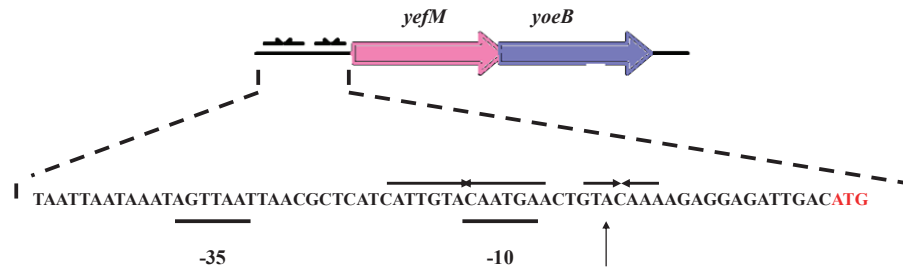
Moduł *axe-txe* posiada cechy charakterystyczne dla ogólnie przyjętego modelu organizacji kaset TA typu II:

- oba komponenty kasyety są niewielkimi białkami (antytoksyna ma masę 9,8 kDa, toksyna – 9,6 kDa) [73],
- gen kodujący antytoksynę poprzedza gen kodujący toksynę [73],
- geny kodujące oba białka zachodzą na siebie [73] i ulegają kotranskrypcji [79].

Antytoksyna Axe jest homologiczna do antytoksyny systemu *phd-doc*, podczas gdy, należące do nadrodziny toksyn RelE/ParE, białko Txe różni się znacznie od toksyny tego modułu [73]. Sekwencje aminokwasowe zarówno Axe, jak i Txe charakteryzują się podobieństwem – odpowiednio – do

antytoksyny YefM (około 25% podobieństwa, przy czym sekwencje aminokwasowe domen biorących udział w interakcji z toksynami wykazują około 60% podobieństwa) i toksyny YoeB (około 50% podobieństwa) chromosomalnego modułu *Escherichia coli*, *yefM-yoeB* [73, 124]. Aktywność toksyny Txe ma raczej efekt bakteriostatyczny niż letalny [73]. Txe, podobnie jak YoeB, jest endorybonukleazą, która trawi mRNA w miejscu znajdującym się w odległości trzech nukleotydów poniżej kodonu startowego AUG, wskutek czego dochodzi do zahamowania biosyntezy białek w komórce [79, 198]. Jednak efekt nadprodukcji obu toksyn *in vivo* jest odmienny, co może świadczyć o nieco innym mechanizmie ich działania. Nadekspresja *txe* powoduje zahamowanie wzrostu i podziałów komórek *Escherichia coli*, zaś nadprodukcja YoeB skutkuje nie tylko zahamowaniem wzrostu bakterii, ale także drastycznym spadkiem ilości zdolnych do podziałów komórek (*colony forming units* – CFU) [73, 124]. Obecność w komórce antytoksyny Axe neutralizuje toksyczne działanie Txe. Co ciekawe, nadekspresja samej antytoksyny w hodowlach płynnych również, choć w dużo mniejszym stopniu, spowalnia tempo wzrostu bakterii w porównaniu z tempem wzrostu bakterii niosących wektor kontrolny [73]. Pomimo podobieństwa sekwencji aminokwasowych oraz struktury trzeciorzędowej białek systemów *axe-txe* i *yefM-yoeB* [73, 124, 141], obie kasety charakteryzują się wysoką specyficnością interakcji pomiędzy toksyną i antytoksyną. Wyniki badań przeprowadzonych przez Grady i Hayes'a pokazują, że nadekspresja YefM w niewielkim stopniu redukuje hamujący wpływ Txe na wzrost gęstości optycznej hodowli bakteryjnej, nie wpływa natomiast na ilość komórek zdolnych do podziałów; podczas gdy antytoksyna Axe niweluje efekt działania YoeB, ale tylko w zakresie wpływu na ilość w hodowli komórek zdolnych do podziału [73]. W dostępnej literaturze nie ma danych na temat wpływu białek obu systemów na regulację ekspresji genów kasety homologicznej.

Regulacja ekspresji genów modułu *yefM-yoeB* zachodzi zgodnie z kanonicznym modelem autoregulacji systemów toksyna-antytoksyna typu II. Dimer YefM₂ wiąże się do palindromowych sekwencji operatora (rycina 10) za pośrednictwem domeny N-terminalnej i blokując miejsce wiązania podjednostki sigma polimerazy RNA, działa jako represor, wspólnego dla toksyny i antytoksyny, promotora *P_{yy}*. Toksyna YoeB działa natomiast jako korepresor [93, 98]. Wyniki uzyskane podczas realizacji badań, które posłużyły do przygotowania niniejszej rozprawy doktorskiej, sugerują, że pomimo podobieństwa pomiędzy plazmidowym systemem *axe-txe* i chromosomalnym *yefM-yoeB*, zarówno organizacja kasety *axe-txe*, jak i mechanizm regulacji ekspresji jej genów odbiega od modelu kanonicznego.



Rycina 10. Schemat przedstawiający organizację rejonu operatorowego/promotorowego p_{at} kasety $yefM$ - $yoeB$ Miejsce startu transkrypcji z promotora p_{yy} oznaczono pionową strzałką. Sekwencje -35 i -10 promotora p_{at} podkreślono. Sekwencję kodonu startowego genu $yefM$ zaznaczono czerwoną czcionką. Poziomymi strzałkami oznaczono sekwencje DNA tworzące odwrócone palindromy [98]

Figure 10. Organization of promoter/operator p_{yy} DNA region of $yefM$ - $yoeB$ TA module Vertical arrow indicates start of transcription driven from the p_{yy} promoter. -35 and -10 sequences of p_{yy} promoter are underlined. The ATG start codon of the $yefM$ gene is denoted in red. Horizontal arrows indicate palindromic DNA repeats [98]

2. CEL PRACY

Głównym celem mojej pracy było zbadanie mechanizmu regulacji ekspresji genów kasety toksyna-antytoksyna, *axe-txe*, pochodzącej z plazmidu pRUM *Enterococcus faecium*. Jako zadania szczegółowe przyjąłam określenie w jaki sposób zbudowany jest operon *axe-txe*, zbadanie jaka jest rola białek Axe i Txe w regulacji tego operonu oraz w jakim stopniu białka spokrewnionych systemów *yefM-yoeB* oraz *axe-txe* mogą wpływać na regulację ekspresji genów systemu homologicznego.

3. MATERIAŁY

3.1. Szczepy bakteryjne

Wykorzystane w tej pracy szczepy bakteryjne opisano w tabeli 4.

Tabela 4. Szczepy bakteryjne wykorzystane w tej pracy

Table 4. Bacterial strains

Szczep bakteryjny / <i>Bacterial strain</i>	Genotyp / <i>Genotype</i>	Źródło / <i>Source</i>
DH5 α	<i>F⁻ λ: fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17,</i> oporny na kwas nalidyksowy	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG [81]
Rosetta(DE3)	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, zakupiona od firmy Novagen
SC301467	<i>F⁻ λ: ilvG- rfb-50 rph-1 ΣmazF chyb ΣrelBE Σ(dinJ-yafQ) Σ(yefM-yoeB)</i>	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od prof. Finbar'a Hayes'a [30]

3.2. Plazmidy

Wykorzystane w tej pracy plazmidy opisano w tabeli 5.

Tabela 5. Plazmidy wykorzystane w tej pracy

Table 5. Plasmids

Plazmid / Plasmid	Charakterystyka / <i>Description</i>	Pismienictwo lub źródło / <i>Source</i>
pBBRlux	<i>Origin pBBR1, cm^R</i> Zawiera pozbawiony promotora operon <i>luxCDABE</i>	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Aleksandry Sikory [176]
pBBRlux-amp	Pochodny pBBRlux, amp ^R	Skonstruowany poprzez insercję <i>bla</i> w rejonie <i>cat</i> (trawienie EcoRI)
pluxat	Pochodny pBBRlux, zawiera operon <i>luxCDABE</i> pod kontrolą promotora <i>p_{at}</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego <i>p_{at}</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)

Plazmid / Plasmid	Charakterystyka / <i>Description</i>	Pismienictwo lub źródło / <i>Source</i>
pluxataxe	Pochodny pBBRlux zawiera operon <i>luxCDABE</i> pod kontrolą promotora p_{at} oraz gen <i>axe</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego p_{at} wraz z genem <i>axe</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxataxetxe	Pochodny pBBRlux zawiera operon <i>luxCDABE</i> pod kontrolą promotora p_{at} oraz geny <i>axe-txe</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego p_{at} wraz z genami <i>axe-txe</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxaxe	Pochodny pBBRlux, zawiera operon <i>luxCDABE</i> pod kontrolą promotora p_{axe}	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego p_{axe} powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxaxemut	Pochodny pBBRlux, jak pluxaxe, ale zawiera mutację w rejonie -10 p_{axe}	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego p_{axe} <i>mut</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxataxemut	Pochodny pBBRlux, jak pluxataxe, ale zawiera mutację w rejonie -10 p_{axe}	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego p_{at} wraz z genem <i>axemut</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxataxetxemut	Pochodny pBBRlux, jak pluxataxetxe, ale zawiera mutację w rejonie -10 p_{axe}	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego p_{at} wraz z genami <i>axemut-txe</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxataxetxelong	Pochodny pBBRlux, jak pluxataxetxe, ale zawiera rejon terminatorowy kasety <i>axe-txe</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego / operatorowego p_{at} wraz z genami <i>axe-txe</i> i rejonem terminatorowym tej kasety powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)

Plazmid / Plasmid	Charakterystyka / <i>Description</i>	Pismienictwo lub źródło / <i>Source</i>
pluxyy	Pochodny pBBRlux, zawiera operon <i>luxCDABE</i> pod kontrolą promotora p_{yy}	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego/operatorowego p_{yy} powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pluxyefM	Pochodny pBBRlux, zawiera operon <i>luxCDABE</i> oraz gen <i>yefM</i>	Skonstruowany poprzez ligację <i>yefM</i> powyżej operonu <i>luxCDABE</i> (trawienie SpeI/BamHI)
pBAD33	Origin P15A, cm^R	[76]
pBAD33axe	Pochodny pBAD33, zawiera <i>axe</i> pod kontrolą promotora arabinozowego	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pBAD33yefM	Pochodny pBAD33, zawiera <i>yefM</i> pod kontrolą promotora arabinozowego	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pBAD33yefMyoeB	Pochodny pBAD33, zawiera <i>yefM-yoeB</i> pod kontrolą promotora arabinozowego	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pBAD24	Origin pMB1, kan^R	[76]
pBAD24txe	Pochodny pBAD24, zawiera <i>txe</i> pod kontrolą promotora arabinozowego	Skonstruowany przez wstawienie <i>txe</i> pod kontrolą promotora arabinozowego (trawienie EcoRI/HindIII)
pET22b	Origin pBR322, amp^R , wektor ekspresyjny, zawierający powyżej rejonu MCS promotor p_{T7} oraz sekwencję kodującą znacznik histydynowy (His) ₆	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, zakupiony od firmy Novagen
pET22axe	Pochodny pET22b, zawiera <i>axe</i> pod kontrolą p_{T7}	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pET22ataxetxe	Pochodny pET22b, zawiera kasetę <i>axe-txe</i> wraz z rejonem promotorowym p_{at} , pod kontrolą p_{T7}	Skonstruowany poprzez wstawienie kasety <i>axe-txe</i> wraz z rejonem promotorowym p_{at} , pod kontrolą p_{T7} (trawienie NdeI/XhoI)

Plazmid / Plasmid	Charakterystyka / <i>Description</i>	Pismienictwo lub źródło / <i>Source</i>
pET22yefM	Pochodny pET22b, zawiera <i>yefM</i> pod kontrolą <i>p_{T7}</i>	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pET22yefMyoeB	Pochodny pET22b, zawiera <i>yefM-yoeB</i> pod kontrolą <i>p_{T7}</i>	Kolekcja Katedry Biologii Molekularnej UG, od dr Barbary Kędzierskiej
pTE103	<i>Origin ColE1</i> , amp ^R	[45]
pTEaxe	Pochodny pTE103, zawiera <i>axe</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie <i>axe</i> (trawienie EcoRI/HindIII)
pTEataxetxe	Pochodny pTE103, zawiera kasetę <i>axe-txe</i> wraz z rejonem promotorowym <i>p_{at}</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie <i>axe-txe</i> wraz z rejonem promotorowym <i>p_{at}</i> (trawienie EcoRI/HindIII)
pTEataxetxemut	Pochodny pTE103, jak pTEataxetxe, ale zawiera mutację w rejonie -10 <i>p_{axe}</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego/operatorowego <i>p_{at}</i> wraz z genami <i>axemut-txe</i> (trawienie EcoRI/HindIII)
pTEataxetxelong	Pochodny pTE103, jak pTEataxetxe, ale zawiera rejon terminatorowy tej kasety	Skonstruowany poprzez wstawienie rejonu promotorowego/operatorowego <i>p_{at}</i> wraz z genami <i>axe-txe</i> i rejonem terminatorowym tej kasety (trawienie EcoRI/HindIII)
pTEaxetxeW5C	Pochodny pTE103, zawiera kasetę <i>axe-txe</i> pozbawioną rejonu promotorowego <i>p_{at}</i> , zawiera mutację w rejonie <i>txe</i> (zamiana tryptofanu w pozycji 5 na cytozynę) – produktem ekspresji <i>txeW5C</i> jest nietoksyczna wersja Txe	Skonstruowany poprzez wstawienie kasety <i>axe-txeW5C</i> pozbawionej rejonu promotorowego <i>p_{at}</i> (trawienie EcoRI/HindIII)
pTEaxetxeW5Cmut	Pochodny pTE103, jak pTEaxetxeW5C, ale zawiera mutację w rejonie -10 <i>p_{axe}</i>	Skonstruowany poprzez wstawienie kasety <i>axemut-txeW5C</i> pozbawionej rejonu promotorowego <i>p_{at}</i> (trawienie EcoRI/HindIII)

3.3. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy wykorzystane w tej pracy opisano w tabeli 6.

Tabela 6. Oligonukleotydy wykorzystane w tej pracy Sekwencje oligonukleotydów podano rozpoczynając od końca 5'. Miejsca rozpoznawane przez wybrane enzymy restrykcyjne podkreślono.

Tabela 6. Oligonucleotides Oligonucleotides' sequences are written from 5' to 3', restriction enzyme sites are underlined.

Nr	Nazwa / Name	Sekwencja (5'-3') / Sequence	Opis / Description
1	Amp fd	GACGA <u>ATTCT</u> TACAATTTTCAG GTGGCAC	Starter do amplifikacji genu <i>bla</i> , zawierający miejsce restrykcyjne EcoRI
2	Amp rev	GGTGA <u>ATTCG</u> TAAACTTGGT CTGACAG	Starter do amplifikacji genu <i>bla</i> , zawierający miejsce restrykcyjne EcoRI
3	Pat fd lux	GAGT <u>ACTAGT</u> GAAAAAGCA GGATTTGAGG	Starter do amplifikacji rejonu promotor/operator <i>pat</i> , zawierający miejsce restrykcyjne SpeI
4	At prom rev	CCAAGGATCCGAATAAGCT ACTGCTTCC	Starter do amplifikacji rejonu promotor/operator <i>pat</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI
5	Axe_prom_rev	CGCGGGAATTCTAGAAATA AATAAGGGGT	Starter do amplifikacji rejonu promotora <i>p_{axe}</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI
6	Txe_rev_BamHI	ATTCG <u>GATCC</u> TTAATAGTGA TCTTTTGCAG	Starter do amplifikacji <i>txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI

Nr	Nazwa / Name	Sekwencja (5'-3') / Sequence	Opis / Description
7	Axe-prom_fd	CGCGGGAATTCTAGAAATA AATAAGGGGT	Starter do amplifikacji <i>axe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne EcoRI
8	Long_rev_BamHI	TATGGATCCAGTTGAAAAT GAAACG	Starter do amplifikacji rejonu terminatorowego <i>axe-txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI
9	Pyy fd lux	GAGTACTAGTGGGGAAAGG AGGGGG	Starter do amplifikacji rejonu promotor/operator <i>p_{pyy}</i> , zawierający miejsce restrykcyjne SpeI
10	Pyy rev	CATTCGGATCCTGACGCGCT TCGCTG	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego <i>p_{pyy}</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI
11	PyefM fd lux	GCGGACTAGTATGAACTGT ACAAAAGAGG	Starter do amplifikacji <i>yefM</i> , zawierający miejsce restrykcyjne SpeI
12	YefMprom Rev	CGGTCGGATCCATTAGTTTC ACTCAATGAT	Starter do amplifikacji <i>yefM</i> , zawierający miejsce restrykcyjne BamHI
13	Txe SD fd	ATAGAATTCGATGATTAAG GCTTGGTC	Starter do amplifikacji <i>txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne EcoRI

Nr	Nazwa / Name	Sekwencja (5'-3') / Sequence	Opis / Description
14	Txerev	CCGCAAGCTTTTAAGTTTCT GACCCTTTCC	Starter do amplifikacji <i>txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne HindIII
15	pETyefM-fd	GCGATACATATGCGTAC AATTAGCTACAGCGAA	Starter do amplifikacji <i>yefM</i> , zawierający miejsce restrykcyjne Idei
16	pET22YefM-rev	ATACTCGAGCTCAATGATGT CCTTTTCCGTTCC	Starter do amplifikacji <i>yefM</i> , zawierający miejsce restrykcyjne XhoI
17	pET22txe-rev	CCTCTCGAGATAGTGATCTT TTGCAGAATAA	Starter do amplifikacji <i>txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne XhoI
18	At prom fd	GAGTGAATTCGAAAAAGCA GGATTTGAGG	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego <i>p_{at}</i> , zawierający miejsce restrykcyjne EcoRI
19	Axerev	CCGCAAGCTTGCTCATGCCA ATAAAGATAATC	Starter do amplifikacji <i>axe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne HindIII
20	Long_fd_HinII	TACTAAGCTTATATCCGTAA TACGC	Starter do amplifikacji rejonu terminatorowego <i>axe-txe</i> , zawierający miejsce restrykcyjne HindIII

Nr	Nazwa / Name	Sekwencja (5'-3') / Sequence	Opis / Description
21	Axe Pr fd mut1	CAAAAAGAGATTACGACTC TATGCAAGAAACG	Starter do mutagenyzy miejscowo specyficznego rejonu -10 promotora p_{axe}
22	Axe Pr rev mut1	CGTTTCTTGCATAGAGTCGT AATCTTTTTTG	Starter do mutagenyzy miejscowo specyficznego rejonu -10 promotora p_{axe}
23	atfdemsa	AGCAACTAAAGCAGAAGTA CGGC	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego p_{at} znakowany biotyną na końcu 5'
24	Atrem emsa	TCATATAACTACGTAAATTT TGGCGG	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego p_{at}
25	yyfd emsa	ACCACTTTCACGTTAGAA	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego p_{yy} znakowany biotyną na końcu 5'
26	yy rev emsa	TTGTTGCCGGACAAATTCTG ACG	Starter do amplifikacji rejonu promotorowego/operatorowego p_{yy}
27	Pr ext at i axe	GCACTAAATCATCACTTTTCG GGAAAG	Starter wykorzystywany do badania miejsca startu transkrypcji z promotorów p_{at} i p_{axe}
28	Pr ext txe rev	ATGATTAAGGCTTGGTCTGA TGATGC	Starter wykorzystywany do badania miejsca startu transkrypcji z promotora p_{txe}

3.4. Podłoża i pożywki

3.4.1. Pożywka LB (Luria-Bertani)

Na 1000 ml:

10 g peptonu

5 g ekstraktu drożdżowego

10 g NaCl

Pożywkę jałowiono przez autoklawowanie przy ciśnieniu 0,7 atm przez 20 min.

3.4.2. Podłoże LA

Na 1000 ml:

10 g peptonu

5 g ekstraktu drożdżowego

10 g NaCl

15 g agaru bakteriologicznego

Podłoże jałowiono przez autoklawowanie przy ciśnieniu 1 atm przez 30 min.

3.5. Antybiotyki

- ampicylina – stężenie końcowe 100 µg/ml

- chloramfenikol – stężenie końcowe 35 µg/ml

kanamycyna – stężenie końcowe 50 µg/ml

4. METODY

4.1. Amplifikacja DNA *in vitro* techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Sporządzałam mieszaniny reakcyjne (50 μ l) o składzie:

- 5 μ l buforu (10 x Walk Buffer, A&A Biotechnology)
- Po 5 μ l obu starterów o stężeniu 10 μ M
- 1,5 μ l mieszaniny deoksynukleotydów o stężeniu 10 mM każdy
- 20 ng matrycy DNA
- 1,5 U polimerazy Walk (A&A Biotechnology)

Reakcję przeprowadzałam w termocyklerze z wykorzystaniem następującego programu:

- Denaturacja wstępna:	95 °C	5 minut		
- Denaturacja	95 °C	30 sekund		10
- Przyłączanie starterów	52 °C	30 sekund		
cykli				
- Wydłużanie starterów	72 °C	2 minuty / 1000 pz		20
- Denaturacja	95 °C	30 sekund		
- Przyłączanie starterów	58 °C *	30 sekund		
cykli				
- Wydłużanie starterów	72 °C	2 minuty / 1000 pz		
- Wydłużanie końcowe	72 °C	10 minut		

* Dla każdej pary starterów ustalano temperaturę przyłączania.

4.2. Kolonowanie DNA

4.2.1. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

DNA plazmidowy lub fragmenty DNA powielone z wykorzystaniem techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (rozdział 4.1.) trawiłam odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (Thermo Scientific) w buforze Fast Digest (Thermo Scientific). Trawienie przeprowadzałam w temperaturze 37°C przez 30 minut, następnie inaktywowałam enzym zgodnie z zaleceniami producenta.

4.2.2. Defosforylacja końców 5' wektorów plazmidowych

Po trawieniu DNA plazmidowego enzymami restrykcyjnymi i termicznej inaktywacji enzymów, przeprowadzałam defosforylację końców 5' potrawionych wektorów z wykorzystaniem alkalicznej fosfatazy FastAP (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta; następnie inaktywowałam enzym poprzez inkubację w temperaturze 85°C przez 15 minut.

4.2.3. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforezę przeprowadzałam w 1% żelu agarozowym w poziomym aparacie do elektroforezy w buforze TAE (40 mM Tris-octan o pH=8,3, 1 mM EDTA) [151]. Do roztworu DNA dodawałam bufor obciążający 6 x Loading Dye (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Tak przygotowane próbki nosiłam do studzienek w żelu i prowadziłam rozdzielanie przy napięciu 5 V na 1 cm długości żelu. Żel barwiłam w roztworze wodnym bromku etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml przez 10 minut lub barwniku SYBR® (Life Technologies) (zgodnie z zaleceniami producenta), a następnie uwidoczniałam DNA w świetle UV za pomocą aparatu Gel Doc XR (BioRad). Długość rozdzielanych fragmentów DNA porównywałam ze wzorcem O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.2.4. Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego

Fragmenty DNA plazmidowego uzyskane w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi rozdzielałam w żelu agarozowym (dokładny opis procedury zamieszczono w rozdziale 4.2.1), a następnie po wybarwieniu SYBR® wycinałam z niego odpowiednie fragmenty restrykcyjne. DNA izolowałam z żelu przy użyciu zestawu do oczyszczania fragmentów DNA z żelu agarozowego High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche).

4.2.5. Ligacja fragmentów DNA

Przeprowadzałam ligację fragmentów DNA w objętości 20 µl, przez noc w temperaturze 22°C, przy użyciu ligazy DNA faga T4 (Thermo Scientific) i odpowiedniego dla tego enzymu buforu (Thermo Scientific). Do reakcji używałam 4-krotnego lub 6-krotnego nadmiaru ilości klonowanego fragmentu DNA w stosunku do ilości wektora. Następnie inaktywowałam termicznie enzym, poprzez inkubację w temperaturze 65°C przez 15 minut. Uzyskaną w ten sposób mieszaninę transformowałam komórki kompetentne *Escherichia coli* DH5α (dokładny opis procedury zamieszczono w rozdziale 4.4.).

4.3. Mutageneza miejscowo – specyficzna

4.3.1. Przygotowanie denaturowanej matrycy DNA

DNA plazmidowy (500 ng) zawieszałam w 20 µl wody destylowanej, dodawałam 5 µl roztworu do denaturacji matrycy DNA (1 M NaOH, 1 mM EDTA). Przygotowaną w ten sposób mieszaninę inkubowałam w temperaturze 37°C przez 15 minut. Następnie przeprowadzałam precypitację DNA: do mieszaniny dodawałam wodny roztwór octanu sodu o pH=5,2 do końcowego stężenia 0,3 M oraz 75 µl zimnego 96% etanolu, następnie mieszaninę inkubowałam w temperaturze -80°C przez 60 minut. Próbkę wirowałam (15000 x g) przez 30 minut w temperaturze 4°C, przemywałam 1ml zimnego

70% wodnego roztworu etanolu, a następnie wirowałam (jw.) przez 15 minut w temperaturze 4°C. DNA suszyłam pod próżnią, po czym zawieszałam w 20 µl wody destylowanej [152].

4.3.2. Mutageneza miejscowo – specyficzna

Sporządzałam mieszaninę reakcyjną (50 µl) o składzie:

- 5 µl buforu (10 x Walk Buffer, A&A Biotechnology)
- Po 5 µl obu starterów o stężeniu 10 µM
- 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów o stężeniu 10 mM każdy
- 2-4 µl matrycy DNA
- 3 U polimerazy Walk (A&A Biotechnology)

Reakcję przeprowadzałam w termocyklerze z wykorzystaniem następującego programu:

- Denaturacja wstępna	95 °C	1 minuta	16
- Denaturacja	95 °C	30 sekund	
- Przyłączanie starterów	55 °C	1 minuta	
cykli			
- Wydłużanie starterów	72 °C	2 minuty / 1000 pz	
- Denaturacja	95 °C	1 minuta	
- Przyłączanie starterów	55 °C	1 minuta	
- Wydłużanie końcowe	72 °C	10 minut	

Po przeprowadzeniu mutagenezy, dodawałam do mieszaniny 2 U enzymu FastDigest*DpnI* (Thermo Scientific) i inkubowałam próbki w temperaturze 37°C przez 30 minut. *DpnI* specyficznie rozpoznaje sekwencje metylowane – G^{Me6}ATC, dzięki czemu umożliwia pozbycie się matrycowego DNA. Tak przygotowaną mieszaniną (używałam 1, 3 lub 5 µl mieszaniny) transformowałam komórki kompetentne *Escherichia coli* DH5α.

4.4. Transformacja komórek bakteryjnych plazmidowym DNA

4.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych

Hodowlę nocną komórek bakteryjnych odmładzałam w stosunku 1:100 w pożywce LB (rozdział 3.4.1.) uzupełnionej w razie potrzeby odpowiednim antybiotykiem (rozdział 3.5.). Bakterie hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C do momentu uzyskania wartości gęstości optycznej hodowli OD₆₀₀~0,2. Hodowlę bakteryjną wirowałam (~1600 x g) przez 10 minut w temperaturze 4°C. Osad bakteryjny zawieszałam zimnym roztworze wodnym CaCl₂ o stężeniu 100 mM (w objętości równej początkowej objętości hodowli) i inkubowałam w łaźni lodowej przez 60 minut. Następnie próbki wirowałam (jw.), a uzyskany osad zawieszałam w zimnym roztworze wodnym CaCl₂ o stężeniu 100mM (w objętości równej jednej dziesiątej początkowej objętości

hodowli), po czym ponownie inkubowałam w łaźni lodowej (jw.). Do przygotowanych w ten sposób komórek kompetentnych dodawałam 50% jałowy roztwór glicerolu do końcowego stężenie 15% v/v, następnie zamrażałam zawiesinę komórek bakteryjnych przy użyciu ciekłego azotu i przechowywałam je do momentu użycia w temperaturze -80°C [151].

4.4.2. Transformacja plazmidowym DNA

Zawiesinę komórek kompetentnych rozmrażałam w łaźni lodowej. Do 100 μl komórek kompetentnych dodawałam około 50 ng DNA plazmidowego lub 5-20 μl mieszaniny po ligacji. Po 60 minutach inkubacji w łaźni lodowej inkubowałam próbki przez 3 minuty w temperaturze 43°C , a następnie ponownie przenosiłam na 30 minut do łaźni lodowej. Po zakończeniu inkubacji próbek w łaźni lodowej, dodawałam do mieszaniny 900 μl pożywki LB i hodowałam bakterie z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 45 minut. 100 μl zawiesiny komórek bakteryjnych wysiewałam na płytki zawierające podłoże LA (rozdział 3.4.2.) uzupełnione odpowiednim antybiotykiem (rozdział 3.5.). Następnie inkubowałam płytki przez noc w temperaturze 37°C [151].

4.5. Oznaczenie względnego poziomu luminescencji hodowli bakteryjnych

Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystałam hodowle komórek *Escherichia coli* SC301467 niosących pochodne wektora pBBRlux-amp zawierające pozbawiony promotora operon *luxCDABE* oraz odpowiednie fragmenty kasety *axe-txe* lub *yefM-yoeB* (w przypadku badania wpływu białek kasety *axe-txe* kodowanych *in trans* na aktywność promotora *p_{at}* – także pochodne wektorów pBAD33 i pBAD24) (tabela 5) Hodowle nocne bakterii odmładzałam w stosunku 1:100 w pożywce LB (rozdział 3.4.1.) uzupełnionej odpowiednim antybiotykiem (rozdział 3.5.) i hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C do momentu uzyskania wartości gęstości optycznej hodowli $\text{OD}_{600} \sim 0,4$. Następnie wykonywałam pomiar luminescencji 200 μl hodowli bakteryjnej przy użyciu luminometru Junior (Brethold Technologies). Uzyskane wyniki znormalizowałam względem wartości gęstości optycznej hodowli i wyraziłam we względnych jednostkach luminescencji (*relative luminescence units* – RLU).

4.6. Test opóźnienia migracji DNA w żelu poliakrylamidowym

4.6.1. Przygotowanie białkowego ekstraktu z komórek bakteryjnych

Hodowle nocne bakterii *Escherichia coli* Rosetta(DE3) niosących odpowiednie plazmidy (tabela 5) odmładzałam w stosunku 1:100 w 10 ml pożywki LB (rozdział 3.4.1.) uzupełnionej odpowiednim antybiotykiem (rozdział 3.5.) i hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C do momentu

osiągnięcia wartości gęstości optycznej hodowli $OD_{600} \sim 0,5$. Ekspresję, kodowanych w plazmidowym DNA genów: *axe*, *axe-txe*, *yefM* lub *yefM-yoeB*, indukowałam poprzez dodanie do hodowli IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd) do końcowego stężenia 1mM. Po dodaniu induktora kontynuowałam hodowlę bakterii w tych samych warunkach przez kolejne 3 godziny. Następnie wirowałam hodowlę bakteryjną (1600 x g) przez 10 minut w temperaturze 4°C, uzyskany osad zawieszałam w buforze o następującym składzie: 20 mM Tris-HCl o pH=7,5, 50 mM NaCl. Komórki sonikowałam, po czym wirowałam próbki (15500 x g) przez 30 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant dializowałam przez noc w buforze o następującym składzie: 20 mM Tris-HCl o pH=7,5, 50 mM NaCl, 10% v/v glicerol.

4.6.2. Test opóźnienia migracji DNA w żelu poliakrylamidowym

DNA zawierający rejon operatorowy/promotorowy *p_{at}* lub *p_{yy}* powielalam przy użyciu techniki PCR (rozdział 4.1.). Sporządzałam mieszaniny (końcowa objętość 20 μ l) zawierające 0,1 nM dwuniciowego DNA znakowanego biotyną na końcu 5' oraz różne ilości odpowiedniego białkowego ekstraktu z komórek bakteryjnych (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 12,5; 25 μ g/ml) (sposób przygotowania ekstraktu opisano w rozdziale 4.6.1.) w buforze o następującym składzie: 20 mM Tris-HCl o pH=7,5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 μ g kompetitora – polimer DNA poli(dIdC). Przygotowane w ten sposób próbki inkubowałam w temperaturze 22°C przez 20 minut, po czym rozdzielałam je w 5 % natywnym żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.7.2.). Następnie przeprowadzałam transfer DNA na dodatnio naładowaną membranę nylonową (Milipore): po wypłukaniu żelu w 2 x rozcieńczonym buforze TBE (45,5 mM Tris-kwas borowy o pH=8,0, 1 mM EDTA) umieszczałam żel oraz membranę w aparacie do transferu. Transfer prowadziłam w 2 x rozcieńczonym buforze TBE przez 60 minut przy natężeniu prądu 380 mA, w temperaturze 4°C. Następnie immobilizowałam DNA na membranie z wykorzystaniem promieniowania UV (10 minut). Znakowane biotyną fragmenty DNA uwidoczniłam przy użyciu zestawu LightShift™ chemiluminescent EMSA kit (Pierce) zgodnie z zaleceniami producenta.

4.7. Elektroforeza poliakrylamidowa

4.7.1. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących

Przygotowałam żel dolny – rozdzielający (15%) oraz górny – zagęszczający (4%) (tabela 7).

Tabela 7. Skład żelu dolnego i górnego

Table 7. Upper and lower polyacrylamide gels composition

Składnik / Composition	Żel górny / Upper gel	Żel dolny / Lower gel
1,5 M Tris, pH=8,8	-	1,3 ml
1 M Tris, pH=6,8	0,25 ml	-
10% SDS	0,02 ml	0,05 ml
10% APS	0,02 ml	0,05 ml
40% mieszanina akrylamidów	0,25 ml	1,875 ml
TEMED	0,002 ml	0,004 ml
woda destylowana	1,65 ml	0,5 ml

Do próbek białkowego ekstraktu z komórek bakteryjnych (20 μ l) dodałam 5 μ l buforu obciążającego (240 mM Tris-Hcl o pH=6,8, 40% v/v glicerol, 8% w/v SDS, 5% v/v β -merkaptotanol, 0,04% w/v błękit bromofenolowy) i inkubowałam w temperaturze 95°C przez 5 minut. Po umieszczeniu żelu w aparacie do elektroforezy naniolałam tak przygotowane próbki do studzienek żelu poliakrylamidowego. Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze elektroforetycznym (na 1000ml: 12,11 g Tris, 17,92 g Tricine, pH=8,25, 1g SDS) przy natężeniu prądu 40 mA. Po rozdziale barwiłam żel w roztworze RotiBlue® (Roth) zgodnie z zaleceniami producenta. Wielkość interesujących mnie prążków porównywałam ze wzorcem białkowym Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

4.7.2. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach niedenaturujących

Przygotowałam natywne 5% żel poliakrylamidowy o następującym składzie:

- 1,25 ml 40% mieszaniny akrylamidów (stosunek ilości cząsteczek akrylamidu do bis-akrylamidu w mieszaninie – 19:1)
- 0,5 ml 10 x stężonego buforu TBE (0,89 M Tris – kwas borowy o pH=8,0, 20 mM EDTA)
- 0,14 ml 10% APS
- 0,007 ml TEMED
- 8,1 ml wody destylowanej

Po umieszczeniu żelu w aparacie do elektroforezy naniolałam próbki do studzienek żelu poliakrylamidowego. Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w 2 x rozcieńczonym buforze TBE przez 120 minut przy napięciu prądu 100 V w temperaturze 4°C.

4.8. Określenie miejsca startu transkrypcji techniką wydłużania startera

4.8.1. Eksperyment wydłużania startera

W celu określenia miejsca startu transkrypcji z promotorów p_{at} , p_{axe} i p_{txe} przeprowadziłam eksperyment wydłużania startera. Zastosowane do eksperymentu startery opisano w tabeli 7. Startery wyznakowałam radioaktywnym izotopem fosforu ^{32}P . Jako matrycę do reakcji wykorzystywałam całkowity RNA wyizolowany z komórek *Escherichia coli* SC301467 noszących odpowiednio: plazmid $pluxat$ lub $pluxaxe$ (tabela 5) bądź produkty reakcji transkrypcji *in vitro* (rozdział 4.9.) (analiza promotora p_{txe}). Reakcję przeprowadziłam w końcowej objętości 10 μl . Sporządziłam mieszaninę reakcyjną o następującym składzie: 10 μg całkowitego RNA (lub 5 μl roztworu produktów reakcji transkrypcji *in vitro*), 0,6 pmol znakowanego radioaktywnie startera, bufor do odwrotnej transkryptazy (RevertAid H *Minus* Reverse Transcriptase Buffer, Thermo Scientific), każdy z deoksyrybonukleotydów w stężeniu 1mM (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 10 U inhibitora rybonukleaz (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific). Matrycę RNA denaturowałam poprzez inkubację przez 2 minuty w temperaturze 99°C, następnie mieszaninę inkubowałam przez 60 minut w temperaturze 50°C. Po upływie tego czasu dodawałam 100 U odwrotnej transkryptazy (RevertAid H *Minus* Reverse Transcriptase, Thermo Scientific) i inkubowałam próbki przez 30 minut w temperaturze 42°C. Po zakończeniu inkubacji dodawałam 5 μl buforu (95% v/v formamid, 0,05% w/v błękit bromofenolowy, 0,05% cyjanoksylen). Produkty reakcji wydłużania startera poddawałam denaturacji w temperaturze 99°C przez 10 minut, po czym rozdzielałam je wraz z produktami sekwencjonowania odpowiedniego DNA plazmidowego (rozdział 4.8.2.) w 6% żelu poliakrylamidowym zawierającym 7M mocznik. Elektroforezę prowadziłam przy stałej mocy prądu 85W w buforze TBE (89 mM Tris – kwas borowy o pH=8,0, 2 mM EDTA). Żel suszyłam, po czym eksponowałam z użyciem ekranu firmy G&E Healthcare (Storage Phosphor Screen). Następnie skanowałam przy użyciu skanera laserowego Typhoon 9200 (G&E Healthcare).

4.8.2. Sekwencjonowanie DNA

Reakcję sekwencjonowania DNA plazmidowego przeprowadziłam przy użyciu zestawu SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing kit (Epicenter) według zaleceń producenta. Przygotowałam mieszaniny reakcyjne o składzie: 1,5 pmola znakowanego startera (tabela 7), 50 fmoli matrycy DNA (tabela 5); 7,5 μl buforu (3,5x) i wody destylowanej do 17 μl . Do mieszaniny dodawałam 5 u polimerazy SequiTherm EXELII Polymerase i rozdzielałam do czterech próbek (po 4 μl) zawierających po 2 μl mieszanin każdego z 4 deoksyrybonukleotydów i dideoksyrybonukleotydów. Reakcje

sekwencjonowania prowadziłam w termocyklerze, używając następującego programu:

- Wstępna denaturacja 95°C 5 minut
 - Denaturacja 95°C 30 sekund
 - Przyłączanie starterów 58°C 30 sekund
 - Wydłużanie starterów 72°C 30 sekund
- | x 30

Po zakończeniu programu, reakcje przerywałam dodając do każdej próbówki po 3 μ l buforu stopującego (Epicenter). Tak przygotowane próby denaturowałam przez 5 minut w 95°C, a następnie nakładałam po 4 μ l do studzienek żelu sekwencyjnego [154].

4.9. Analiza aktywności promotorów kasyety *axe-txe* metodą transkrypcji *in vitro*

Przeprowadziłam wielorundową reakcję transkrypcji *in vitro* w końcowej objętości 17 μ l, w temperaturze 37°C. Mieszaninę, zawierającą: 40 mM Tris-HCl o pH=8,0, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,1% v/v β -merkaptoetanolu, 0,025 U pirofosfatazy (Thermo Scientific) oraz 17 U inhibitora rybonukleaz RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) inkubowałam przez 7 minut. Następnie dodawałam 15 nM holoenzymu polimerazy RNA *Escherichia coli* E σ ⁷⁰ i inkubowałam przez kolejne 7 minut, po czym dodawałam DNA plazmidowy (odpowiednie pochodne wektora pTE103 – tabela 5) do końcowego stężenia 5nM i inkubowałam mieszaninę przez 7 minut. Reakcję inicjowałam poprzez dodanie mieszaniny czterech rybonukleotydów do końcowego stężenia 0,15 mM i 0,8 μ Ci UTP znakowanego radioaktywnym izotopem fosforu ³²P w pozycji α . Po 15 minutach inkubacji zatrzymywałam reakcję poprzez dodanie buforu stopującego (95% v/v formamid, 0,5 M EDTA, 0,05% w/v błękit bromofenolowy). Produkty reakcji rozdzielałam w 6% żelu poliakrylamidowym, zawierającym 7M mocznik. Elektroforezę prowadziłam przy stałym natężeniu prądu 60mA w buforze TBE (89 mM Tris – kwas borowy o pH=8,0, 2 mM EDTA). Żel suszyłam, po czym eksponowałam z użyciem ekranu firmy G&E Healthcare. Następnie skanowałam przy użyciu skanera laserowego Typhoon FLA 7000 (G&E Healthcare) [117]. Wielkość uzyskanych produktów RNA określałam na podstawie porównania ze wzorcem długości RNA RiboRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific) rozdzielonym w tym samym żelu. Po zakończeniu rozdziału odcięłam część żelu zawierającą wzorzec, a następnie wybarwiłam z wykorzystaniem roztworu bromku etydyny (0,5 μ g/ml) i uwidaczniałam RNA przy użyciu światła ultrafioletowego.

W przypadku przygotowania matrycy RNA do określenia miejsca startu transkrypcji z promotora *p_{axe}* z wykorzystaniem techniki wydłużania startera, reakcję transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA plazmidu pTEaxetxeW5Cmut (tabela 5) przygotowywałam bez dodatku znakowanego radioaktywnie UTP, następnie precypitowałam RNA zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale

4.3.1., przy czym wszystkie roztwory potrzebne do przeprowadzenia tej procedury przygotowałam z wykorzystaniem wody wolnej od nukleaz. Po precypitacji, RNA zawieszałam w 5µl wody wolnej od nukleaz.

4.10. Badanie tempa wzrostu hodowli bakteryjnych

Hodowle nocne bakterii *Escherichia coli* SC301467, niosących pochodne wektora pTE103 odmładzałam w stosunku 1:100 w pożywce LB (rozdział 3.4.1) uzupełnionej odpowiednim antybiotykiem (rozdział 3.5.) i hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C. Pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm prowadziłam co 15 minut przez 4 godziny. W przypadku badania wpływu kodowanych *in trans* białek kasety *axe-txe* na aktywność promotora *p_{at}*, eksperyment przeprowadziłam z wykorzystaniem szczepu *Escherichia coli* SC301467 niosącego oprócz pochodnych wektora pBBRlux, pochodne wektorów pBAD33 i pBAD24, pożywkę uzupełniałam dodatkowo arabinozą do końcowego stężenia 0,2%.

5. WYNIKI

5.1. Budowa i regulacja ekspresji genów operonu *axe-txe*

Plazmidowa kasetta *axe-txe* charakteryzuje się stosunkowo wysokim stopniem podobieństwa do chromosomalnej kasety *Escherichia coli yefM-yoeB* [73, 124]. Oba moduły posiadają cechy charakterystyczne dla kaset TA typu II [73, 79, 93, 98]. Regulacja ekspresji genów modułu *yefM-yoeB* zachodzi zgodnie z modelem charakterystycznym dla większości kaset TA typu II. Toksyna kodowana jest w genie poprzedzonym przez gen antytoksyny, oba zaś znajdują się pod kontrolą wspólnego promotora, ulegają kotranskrypcji i kotranslacji. Związanie antytoksyny do sekwencji operatorowej, znajdującej w rejonie promotora, powoduje jego represję, toksyna natomiast działa jako korepresor [93, 98]. Wyniki badań przeprowadzonych przez grupę Profesora Hengenrother'a sugerują, że organizacja kasety *axe-txe* może być zbliżona do budowy operonu *yefM-yoeB*, ponieważ, podobnie jak w przypadku modułu *yefM-yoeB*, geny *axe* i *txe* ulegają kotranskrypcji [79].

Jednym z istotnych elementów mojej pracy było określenie, czy budowa modułu *axe-txe* rzeczywiście jest zgodna z kanonicznym modelem organizacji kaset TA typu II, charakterystycznym także dla systemu *yefM-yoeB*, oraz zbadanie jaka jest rola białek Axe i Txe w regulacji operonu *axe-txe*.

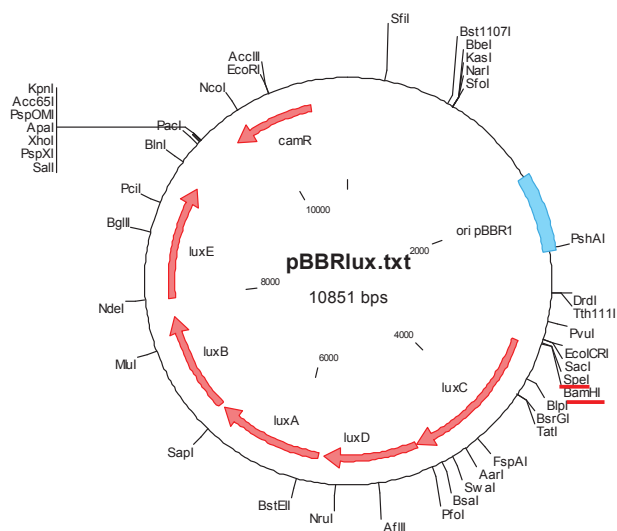
Badania dotyczące mechanizmu działania systemów TA pochodzących z różnych gatunków bakterii, w tym należących do rodzaju *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Synechocystis* i *Vibrio*, w wielu przypadkach z powodzeniem przeprowadzono w komórkach *Escherichia coli* [33, 100, 107, 162, 164]. Pochodzący z patogennej bakterii *Enterococcus faecium*, system *axe-txe* jest funkcjonalny w komórkach bakterii należących do odległych ewolucyjnie gatunków. Wykazano między innymi, że może działać jako moduł stabilizujący DNA plazmidowy w komórkach *Escherichia coli* [73]. Zasadnym wydawało się zatem zbadanie regulacji ekspresji tego systemu w komórkach tego dobrze poznanego organizmu modelowego. Aby zminimalizować ryzyko wystąpienia ewentualnych reakcji krzyżowych pomiędzy badanym systemem a komponentami chromosomalnych kaset TA, większość eksperymentów wykonałam wykorzystując szczep *E. coli* SC301467 (tabela 4), niosący delecje pięciu chromosomalnych modułów TA typu II (*relBE*, *chpB*, *mazF*, *dinJ/yafQ*, *yefM/yoeB*) obecnych w szczepie MG1655 *Escherichia coli*.

5.1.1. Regulacja transkrypcji zachodzącej z promotora *p_{at}*

W celu zbadania, czy wspólny dla genów kodujących antytoksynę i toksynę modułu *axe-txe* promotor *p_{at}* jest aktywny w komórkach *Escherichia coli* SC301467, wykonałam analizę aktywności tego promotora *in vivo*. Wykorzystałam fuzję promotora z systemem reporterowym, umieszczonym na niskokopijnym plazmidzie pBBRlux-amp (tabela 5). Plazmid pBBRlux-amp

różni się od wyjściowego plazmidu pBBRlux markerem selekcyjnym; prócz determinanty oporności na ampicylinę, podobnie jak pBBRlux, zawiera pozbawiony promotora oraz elementów regulatorowych operon *luxCDABE* (rycina 11). Geny *luxC*, *luxD* oraz *luxE* kodują enzymy o aktywności odpowiednio – transferazy, syntetazy oraz reduktazy – niezbędne do konwersji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do aldehydów. Geny *luxA* oraz *luxB* kodują odpowiednio podjednostki α i β lucyferazy. Enzym ten katalizuje reakcję utlenienia zredukowanej formy mononukleotydu flawinowego (FMNH₂) lub długołańcuchowych aldehydów. Reakcje katalizowane przez heterodimer lucyferazy są egzoenergetyczne, a energia uwalniana jest w postaci światła o długości fali około 490 nm. Wzrost poziomu luminescencji jest w przybliżeniu proporcjonalny do aktywności transkrypcyjnej promotora umieszczonego powyżej operonu *luxCDABE* [120].

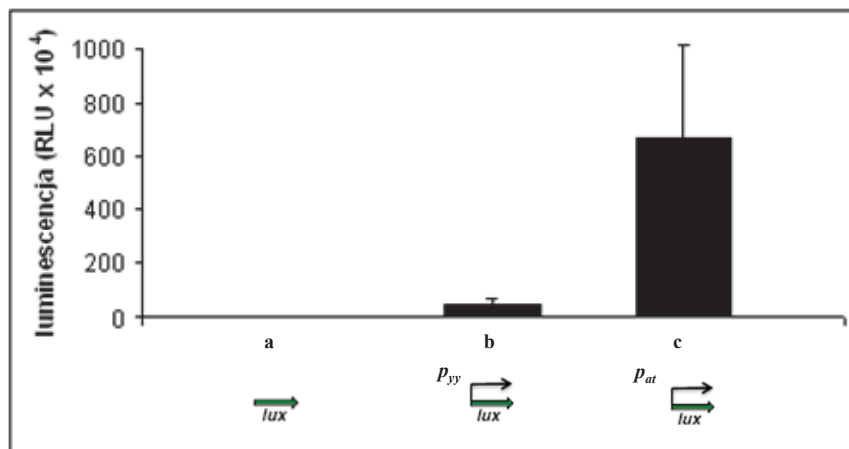
Rejon promotora *p_{at}* zidentyfikowałam na podstawie wyników analizy sekwencji DNA modułu *axe-txe* z wykorzystaniem programu komputerowego PromScan (<http://molbiol-tools.ca/promscan/>). Następnie poprzez insercję do plazmidu pBBRlux-amp fragmentu DNA kasety *axe-txe*, zawierającego potencjalny promotor *p_{at}* wraz z kodonem startowym *axe*, skonstruowałam plazmid pluxat (tabela 5). Tak przygotowanym konstruktem plazmidowym transformowałam bakterie *E. coli* SC301467.



Rycina 11. Schemat przedstawiający organizację genetyczną plazmidu pBBRlux

Figure 11. Genetic organization of the pBBRlux plasmid

Wykonałam pomiar luminescencji hodowli bakteryjnej, wyniki pomiarów luminescencji wyraziłam we względnych jednostkach luminescencji (*relative luminescence units* – RLU). Aktywność promotora p_{at} porównałam do zmierzonej w ten sam sposób aktywności promotora homologicznej kasety *yefM-yoeB*, p_{yy} . Uzyskane wyniki wskazują, że badany region DNA charakteryzuje się silną aktywnością promotorową, około dwudziestokrotnie przewyższającą aktywność promotora kasety *yefM-yoeB* (odpowiednio $\sim 7 \times 10^6$ i $\sim 3.5 \times 10^5$ RLU, podczas gdy poziom luminescencji kontroli negatywnej, zawierającej gen reporterowy pozbawiony promotora, kształtował się na poziomie około 100 RLU) (rycina 12). Dodatkowym potwierdzeniem wysokiej aktywności promotora p_{at} może być fakt, że próby skonstruowania fuzji transkrypcyjnych fragmentu DNA, zawierającego ten promotor z operonem laktozowym w wektorze o średniej (15-20) liczbie kopii na komórkę, skutkowały pojawieniem się mutacji w rejonie p_{at} , co jest cechą charakterystyczną bardzo silnych promotorów.

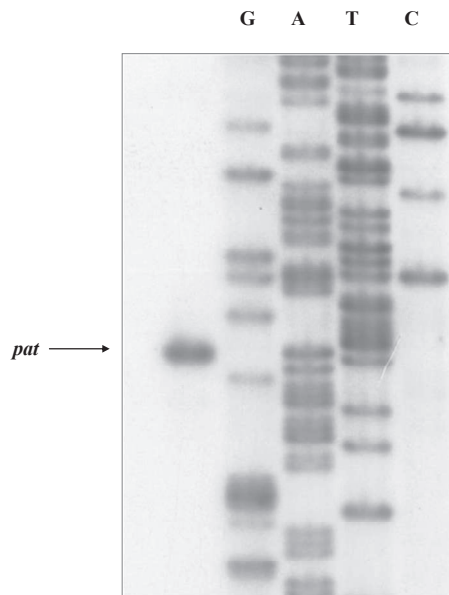


Rycina 12. Porównanie aktywności promotorów p_{at} i p_{yy} w komórkach *Escherichia coli* SC301467 Eksperyment przeprowadziłam z wykorzystaniem fuzji transkrypcyjnych operonu *luxCDABE* (pozbawionego promotora) z zawierającymi rejonami promotorowymi fragmentami kaset *axe-txe* (c) lub *yefM-yoeB* (b), które wykonałam w plazmidzie pBBRlux-amp (tabela 5). Bakterie *Escherichia coli* SC301467 niosące odpowiednie plazmidy hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania

gęstości optycznej hodowli $OD_{600} \sim 0,4$, po czym wykonywałam pomiar luminescencji. Jako kontrolę negatywną zastosowałam wynik pomiaru luminescencji hodowli komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid pBBRlux-amp, zawierający pozbawiony promotora operon *luxCDABE* (a). Wyniki pomiarów luminescencji wyraziłam we względnych jednostkach luminescencji (*relative luminescence units* – RLU). Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. Na wykresie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe, strzałkami zaznaczono promotory.

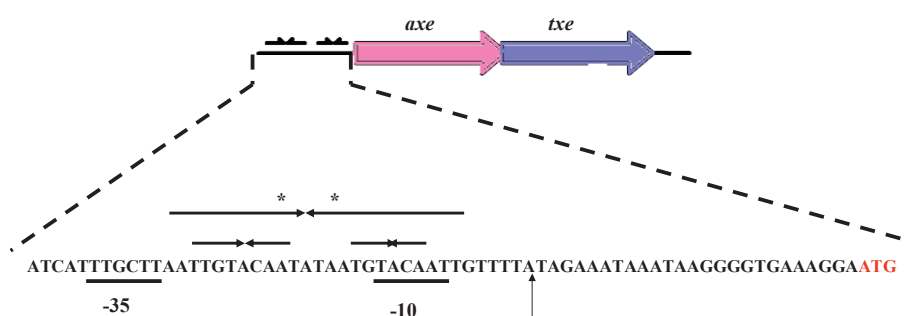
Figure 12. Comparison of transcriptional activity of p_{at} and p_{yy} promoters in *Escherichia coli* SC301467 Transcriptional fusions of the *luxCDABE* operon devoid of promoter to promoter/operator regions of fragments of the *axe-txe* operon (b) or *yefM-yoeB* (c) in pBBRlux-amp plasmid (Table 5). pBBRlux-amp derivatives were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach $OD_{600} \sim 0.4$. Luminescence in RLU (*relative luminescence units*) was measured. Result of luminescence measurement of bacterial cultures transformed with pBBRlux-amp plasmid (a) was applied as the negative control. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an error bar. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, black arrows indicate promoters.

Aby określić miejsce startu transkrypcji zachodzącej z promotora p_{at} , przeprowadziłam eksperyment wydłużania startera (*primer extension*). Jako matrycę do tej reakcji wykorzystałam całkowity RNA wyizolowany z komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid pluxat. W wyniku przeprowadzonej reakcji wykryłam pojedynczy produkt (rycina 13). Na podstawie położenia produktu reakcji wydłużania startera względem produktów reakcji sekwencjonowania DNA plazmidu pluxat przeprowadzonej techniką Sanger'a [154], wyznaczyłam miejsce startu transkrypcji (+1) z promotora p_{at} . Analiza sekwencji DNA, znajdującej się powyżej miejsca startu transkrypcji z promotora p_{at} , wykazała obecność sekwencji zbliżonych do sekwencji *consensus* rejonów -35 i -10 promotorów *Escherichia coli* [82]. Miejsca -35 i -10 promotora p_{at} rozdzielone są sekwencją DNA o optymalnej dla promotorów *E. coli* długości (siedemnaście nukleotydów). W odległości ośmiu nukleotydów od kodonu startowego genu *axe* stwierdziłam obecność sekwencji 5'- AAGGGG - 3', zbliżonej do sekwencji *consensus* miejsca wiązania rybosomu (rycina 14).



Rycina 13. Wynik badania miejsca startu transkrypcji zachodzącej z promotora *pat* uzyskany z wykorzystaniem techniki wydłużania startera Całkowity RNA wyizolowany z komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid pluxat, poddałam analizie typu „*primer extension*” z wykorzystaniem znakowanego radioaktywnie startera komplementarnego do sekwencji wektora, znajdującej się około 50 nukleotydów poniżej kodonu startowego genu *axe* (tabela 6). Reakcję sekwencjonowania DNA plazmidu pluxat metodą Sanger’a przeprowadziłam, wykorzystując ten sam starter. Produkt reakcji wydłużania startera oraz produkty reakcji sekwencjonowania DNA poddałam elektroforezie w 6% poliakrylamidowym żelu denaturującym. Sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano szczegółowo w rozdziale 4.8. Produkt reakcji wydłużania startera oznaczono strzałką

Figure 13. Primer extension analysis of the *pat* promoter of *axe-txe* module. Total RNA from *E. coli* SC301467 cells harbouring pluxat plasmid was subjected to primer extension analysis using a radioactively labelled primer that anneals 50 bp downstream *axe* start codon (table 6). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.8., and electrophoresed on a denaturing 6% polyacrylamide gel in parallel with nucleotide sequencing reactions (A, C, G, T) carried out with the same primer according to Sanger method. The major product from the primer extension is marked with an arrow.



Rycina 14. Schemat przedstawiający organizację rejonu operatorowego/promotorowego p_{at} kasety $axe-txe$ Miejsce startu transkrypcji z promotora p_{at} oznaczono pionową strzałką. Sekwencje -35 i -10 promotora p_{at} podkreślono. Sekwencję kodonu startowego genu axe zaznaczono czerwoną czcionką. Poziomymi strzałkami oznaczono sekwencje DNA tworzące odwrócone palindromy, analogiczne do obecnych w rejonie operatorowym, spokrewnionej z modulem $axe-txe$, kasety $yefM-yoeB$

Figure 14. Organization of the promoter/operator p_{at} DNA region of the $axe-txe$ TA module Vertical arrow indicates start of transcription driven from p_{at} promoter. -35 and -10 sequences of the p_{at} promoter are underlined. The ATG start codon of axe gene is denoted in red. Horizontal arrows indicate palindromic DNA repeats analogous to $yefM-yoeB$ palindroms

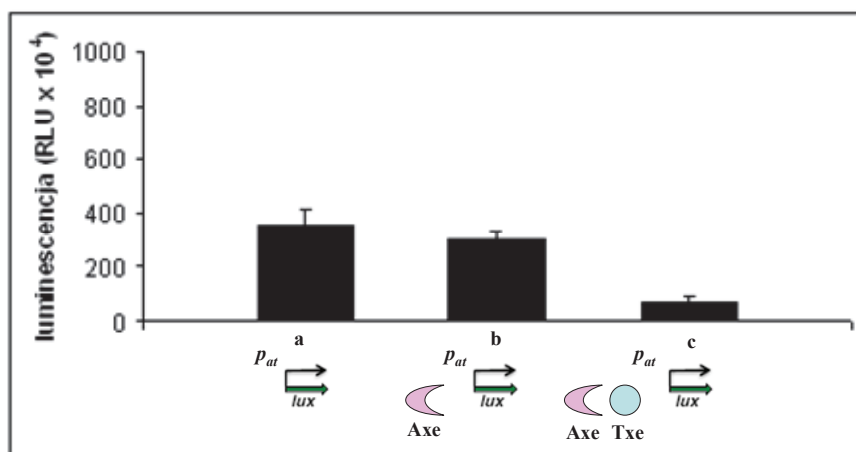
Homologiczny do $axe-txe$, system $yefM-yoeB$, podobnie jak większość systemów TA typu II, podlega autoregulacji, w której głównym represorem jest białko antytoksyny, a toksyna pełni rolę korepresora transkrypcji. Homodimer $YefM_2$ wiąże się do sekwencji DNA o charakterze odwróconych palindromów, z których jedna obecna jest w rejonie -10 promotora p_{yy} , druga zaś – w rejonie miejsca startu transkrypcji, +1 (rycina 10). Związanie toksyny do $YefM_2$ stabilizuje oddziaływanie dimeru antytoksyny z DNA. Oba odwrócone palindromy, rozpoznawane przez antytoksynę, posiadają taką samą sekwencję rdzeniową: 5'-TGTACA -3' [98]. W rejonie promotorowym kasety

axe-txe obecne są sekwencje DNA tworzące odwrócone palindromy o identycznej, jak w przypadku *yefM-yoeB*, sekwencji rdzeniowej, charakteryzujące się jednak wyższym stopniem komplikacji. Dwa sześci nukleotydowe odwrócone powtórzenia obecne w rejonie *p_{at}* są częścią długiego odwróconego palindromu (rycina 14). Wysoki stopień podobieństwa N-terminalnych domen YefM i Axe oraz obecność podobnych sekwencji palindromowych w rejonach promotorowych obu systemów mogłyby oznaczać, że mechanizm regulacji transkrypcji zachodzącej z promotora *p_{at}* może w pewnym stopniu przypominać regulację ekspresji operonu *yefM-yoeB*.

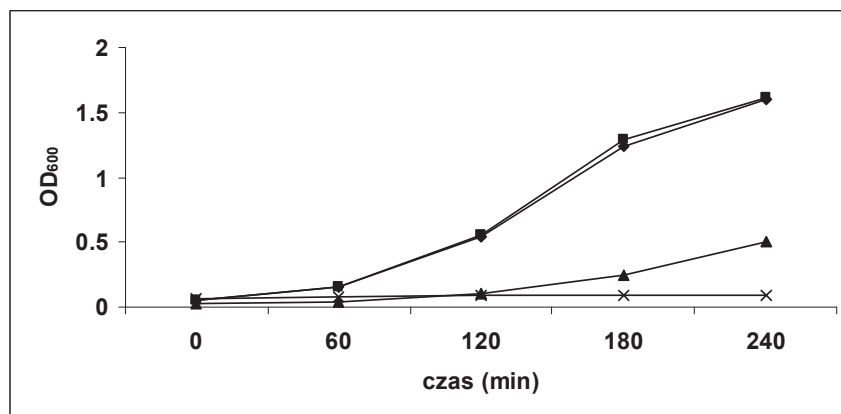
Zaplanowałam zatem, że zbadam *in vivo* wpływ nadekspresji antytoksyny Axe oraz kompleksu Axe-Txe na aktywność promotora *p_{at}* w komórkach *E. coli*, aby określić jaką rolę w regulacji transkrypcji zachodzącej z promotora *p_{at}* pełnią białka Axe i Txe. Osiem nukleotydów na końcu 3' genu *axe* zachodzi na koniec 5' genu *txe*, zaś oba geny ulegają kontrtranskrypcji [79]. Planowałam skonstruować pochodne plazmidu pBAD33, w których pod kontrolą promotora arabinozowego znajdowałyby się odpowiednio: gen, kodujący białko Axe lub kompleks Axe-Txe, z zachowaniem natywnej sekwencji kodującej operonu *axe-txe*. Układ taki zapewniłby uzyskanie odpowiednich proporcji ilości obu białek w komórce. Zaskakującym był fakt, że wielokrotne próby sklonowania fragmentu DNA, kodującego kompleks antytoksyna-toksyna, przeprowadzone z wykorzystaniem różnorodnych wektorów plazmidowych, za każdym razem skutkowały pojawieniem się mutacji w genie *txe* lub *axe*. Zdecydowałam więc, że zaplanowany eksperyment przeprowadzę, wykorzystując parę plazmidów, z których jeden będzie zawierał gen kodujący antytoksynę, drugi natomiast gen kodujący toksynę. Precyzyjna regulacja proporcji ilości antytoksyny i toksyny w komórce jest niezwykle istotna nie tylko dla wzrostu i możliwości podziałów komórki bakteryjnej, ale także może mieć znaczący wpływ na regulację ekspresji genów systemu TA [25, 26, 133, 193], toteż integralną częścią zaplanowanego przeze mnie eksperymentu było badanie komplementacji pomiędzy białkami Axe i Txe, w celu ustalenia, czy poziom ekspresji genów *axe* i *txe* w komórce jest odpowiednio zrównoważony. Badania takie wykonałam poprzez monitorowanie wzrostu hodowli komórek bakteryjnych, niosących odpowiednie plazmidy, w warunkach umożliwiających indukcję ekspresji genów modułu *axe-txe*. Aby przeprowadzić opisane powyżej doświadczenie przygotowałam szereg różnorodnych konstruktyw plazmidowych oraz podjęłam liczne próby dostosowania warunków ekspresji *axe* i *txe*. Wykorzystałam między innymi pochodne wektorów pACYC184, pKK223-3, pTE22b, pTE16b, pBAD33 oraz pBAD24, w których pod kontrolą promotorów indukowanych IPTG lub arabinozą umieściłam geny kodujące antytoksynę lub toksynę. Analizy przeprowadzałam manipulując stopniem ekspresji genów systemu *axe-txe* na poziomie transkrypcji lub translacji, wykorzystując odpowiednio – różne typy promotorów oraz stężenia induktorów bądź wymieniając sekwencję Shine-Dalgarno specyficzną dla modułu *axe-txe* na bliższą sekwencji *consensus*.

Odpowiednie szczepy *E. coli* transformowałam wykorzystując pary powyższych wektorów plazmidowych w różnych kombinacjach, a następnie przeprowadzałam analizy komplementacji oraz mierzyłam relatywny poziom luminescencji hodowli. Pomimo licznych prób, w żadnym ze zbadanych układów nie uzyskałam proporcji obu białek, charakterystycznej dla układu natywnego. Przykładowy wynik przedstawiono na rycinie 15. Badania wpływu białek kasety *axe-txe* na aktywność promotora p_{at} , przeprowadzone z wykorzystaniem pochodnych wektorów pBAD33 i pBAD24 wykazały, że nadprodukcja antytoksyny skutkuje stosunkowo słabą represją p_{at} (zaobserwowałam obniżenie poziomu luminescencji o około 20%), natomiast nadprodukcja obu białek kasety TA, powoduje silniejszą represję promotora p_{at} (obniżenie poziomu luminescencji o 80%). Badanie komplementacji pomiędzy białkami Axe i Txe naprodukowanymi z wykorzystaniem plazmidów użytych do przeprowadzenia powyższego eksperymentu wykazało, że nadekspresja toksyny z plazmidu pBAD24txe powoduje zahamowanie wzrostu hodowli bakteryjnej, jednak jednoczesna nadprodukcja antytoksyny z plazmidu pBAD33axe nie umożliwia pełnej neutralizacji Txe. Toksyna Txe jest rybonukleazą, która prawdopodobnie nie rozpoznaje specyficznej sekwencji RNA [79], może zatem degradować również mRNA lucyferazy. Widoczny na rycinie 15 A wynik, sugerujący silną represję promotora p_{at} przez kompleks Axe-Txe, nie jest zatem w pełni wiarygodny. Obserwowane obniżenie poziomu luminescencji może być efektem zarówno oddziaływania kompleksu Axe-Txe z sekwencją operatorową DNA, jak i skutkiem degradacji mRNA lucyferazy przez toksynę.

A



B



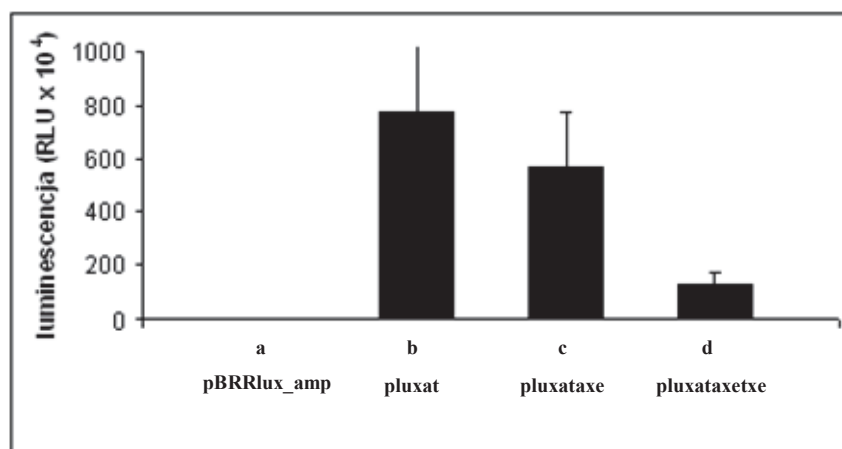
Rycina 15. Wpływ nadekspresji kodowanych *in trans* genów systemu *axe-txe* na aktywność transkrypcyjną promotora *p_{at}* i tempo wzrostu hodowli *Escherichia coli* SC301467 Rycina przedstawia przykładowe wykresy z danych dotyczących

wpływu nadekspresji *in trans* białek systemu *axe-txe* na aktywność promotora p_{at} oraz analiz komplementacji pomiędzy białkami Axe i Txe. **A Wpływ nadekspresji *in trans* białek systemu *axe-txe* na aktywność promotora p_{at} .** Bakterie szczepu *E. coli* SC301467, niosące plazmid *luxat* (*origin* pBBR1) oraz odpowiednie pochodne plazmidów pBAD33 (*origin* p15A) i pBAD24 (*origin* pMB1) hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do końcowego stężenia 0,2%, do momentu uzyskania $OD_{600} \sim 0,4$, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Na wykresie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe operonu *luxCDABE*, różowym – *axe*, niebieskim – *txe*, strzałkami zaznaczono promotory. Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe **a** pBAD33 + pBAD24 **b** pBAD33*axe* + pBAD24 **c** pBAD33*axe* + pBAD24*txe* **B Wpływ nadekspresji *in trans* genów systemu *axe-txe* na tempo wzrostu hodowli *Escherichia coli* SC301467** Bakterie szczepu *E. coli* SC301467, niosące plazmid *luxat* oraz odpowiednie pochodne plazmidów pBAD33 i pBAD24 hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 4 godziny, w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do końcowego stężenia 0,2%. Pomiary absorbancji przy długości fali 600 nm wykonywałam w odstępach trzydziestominutowych. Rombami oznaczono wyniki uzyskane dla hodowli komórek niosących plazmidy pBAD33 + pBAD24, kwadratami – pBAD33*axe* + pBAD24, trójkątami – pBAD33*axe* + pBAD33*txe*, krzyżykami – pBAD33 + pBAD24*txe*.

Figure 15. The influence of trans-encoded Axe-Txe proteins' overproduction on transcriptional activity of the p_{at} promoter and growth rate of *Escherichia coli* SC301467 Results presented on the diagram exemplify data from analysis of influence of overproduction of trans-encoded Axe-Txe proteins on p_{at} promoter activity and complementarity tests of Axe and Txe proteins. **A The influence of trans-encoded Axe-Txe proteins' overproduction on transcriptional activity of the p_{at} promoter** Plasmid *luxat* (*origin* pBBR1) and appropriate derivatives of pBAD33 (*origin* p15A) i pBAD24 (*origin* pMB1) were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium supplied with 0.2% arabinose at 37°C until culture reach $OD_{600} \sim 0.4$. Luminescence was measured in RLU. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, *txe* in blue, *axe* in pink, black arrows indicates promoters. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an errorbar. **a** pBAD33 + pBAD24 **b** pBAD33*axe* + pBAD24 **c** pBAD33*axe* + pBAD24*txe* **B The influence of trans-encoded Axe-Txe proteins' overproduction on growth rate of *Escherichia coli* SC301467** Plasmid *luxat* (*origin* pBBR1) and appropriate derivatives of pBAD33 (*origin* p15A) i pBAD24 (*origin* pMB1) were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium supplied with 0.2% arabinose at 37°C for 4 hours. Absorbance at 600 nm was measured every 30 minutes. pBAD33 + pBAD24 (diamonds), pBAD33*axe* + pBAD24 (squares), pBAD33*axe* + pBAD33*txe* (triangles), pBAD33 + pBAD24*txe* (crosses)

Ostatecznie wybrałam rozwiązanie alternatywne i zbadalam autoregulację promotora przez kompleks Axe-Txe eksprymowany *in cis*, to znaczy stosując

fuzję, w której oprócz badanego promotora, powyżej genu reporterowego, znajdowały się otwarte ramki odczytu *axe* i *txe*. Zaobserwowałam, że obecność antytoksyny powodowała stosunkowo niewielkie obniżenie aktywności promotora *p_{at}* (około 30% niższy poziom luminescencji w porównaniu z podstawową aktywnością promotora), natomiast w obecności kompleksu toksyna-antytoksyna, zaobserwowałam pięciokrotne obniżenie aktywności transkrypcyjnej badanego promotora (rycina 16).

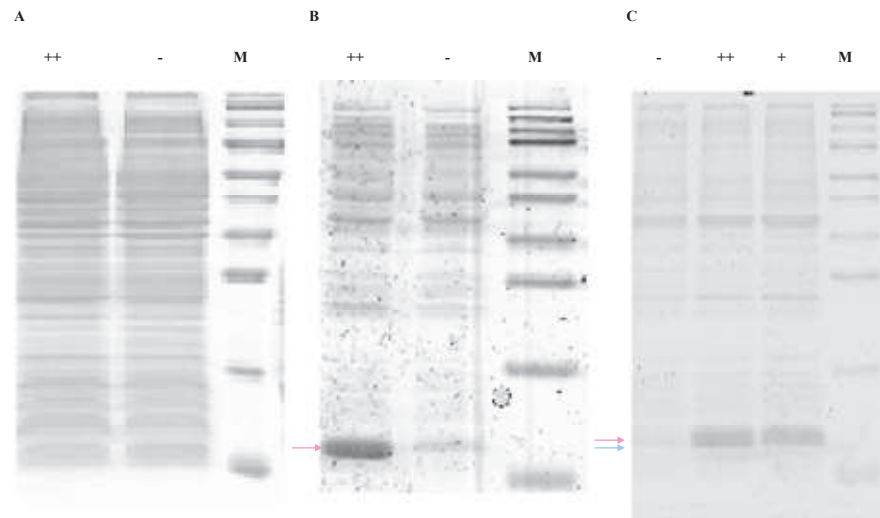


Rycina 16. Wpływ białek systemu *axe-txe*, kodowanych w układzie *in cis*, na aktywność transkrypcyjną promotora *p_{at}* Bakterie *Escherichia coli* SC301467, niosące pochodne plazmidu pBBRlux-amp hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania OD₆₀₀~0,4, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Rycina przedstawia wykres pomiaru luminescencji w komórkach niosących następujące plazmidy: **a** pBBRlux-amp (kontrola negatywna) **b** *pluxat* (wektor zawierający promotor *p_{at}*) **c** *pluxataxe* (wektor zawierający gen *axe* pod kontrolą promotora *p_{at}*) **d** *pluxataxetxe* (wektor zawierający geny *axe* i *txe* pod kontrolą promotora *p_{at}*). Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe.

Figure 16. The influence of *cis*-encoded *Axe-Txe* proteins production on transcriptional activity of *p_{at}* promoter in *Escherichia coli* SC301467 Appropriate derivatives of pBBRlux-amp plasmid were introduced to *E. coli* SC301467 **a** pBBRlux-amp (negative control) **b** *pluxat* (contains *p_{at}* promoter) **c** *pluxataxe* (contains *axe* under control of *p_{at}* promoter) **d** *pluxataxetxe* (contains *axe* and *txe* under control of *p_{at}* promoter).

promoter). Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach OD600 ~0.4. Luminescence was measured in RLU. Result of luminescence measurement of bacterial cultures transformed with pBBRlux-amp plasmid was applied as a negative control. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviations are denoted as error bars.

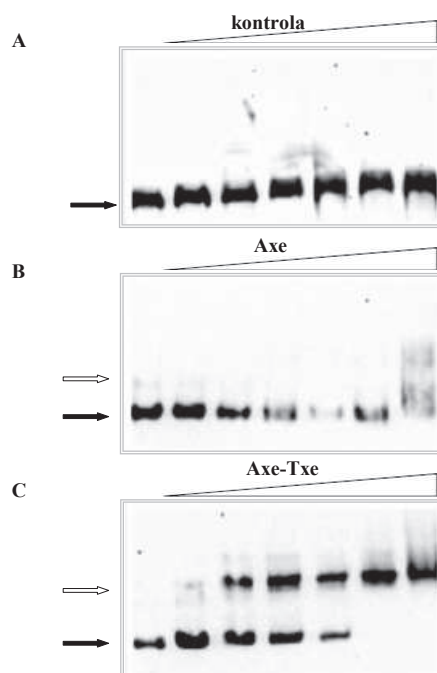
Kolejnym krokiem w moich badaniach było określenie powinowactwa antytoksyny Axe oraz kompleksu białek Axe-Txe do rejonu operatorowego promotora *p_{at}* w warunkach *in vitro*. W tym celu wykonałam test opóźnienia migracji DNA w żelu (*electrophoretic mobility shift assay* – EMSA), stosując fragment DNA zawierający rejon promotorowy kasety *axe-txe* oraz białkowe ekstrakty z komórek *E. coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowałam odpowiednie białka. Szczep Rosetta(DE3), jako pochodna szczepu *E. coli* B, nie posiada pięciu chromosomalnych kaset TA typu II (*relBE*, *chpB*, *mazF*, *dinJ/yafQ*, *yefM/yoeB*), których białka mogłyby interferować z modułem *axe-txe*. Geny kodujące białka systemu *axe-txe* dostarczyłam do komórek bakteryjnych, wykorzystując pochodne wektora plazmidowego pET22b, w których, pod kontrolą promotora *p_{T7}*, kodowana była antytoksyna Axe lub kompleks białek Axe-Txe, z zachowaniem układu, w którym geny obu komponentów systemu zachodzą na siebie (tabela 5). Co ciekawe, sklonowanie rejonu DNA *axe-txe* było możliwe jedynie, jeśli klonowany fragment zawierał również rejon promotora *p_{at}*. Fragment DNA, zawierający rejon promotor/operator kasety *axe-txe*, uzyskałam przy pomocy techniki PCR, wykorzystując startery, z których jeden był znakowany biotyną, co pozwoliło na późniejszą wizualizację DNA (tabela 6). Uzyskany w ten sposób produkt reakcji PCR, inkubowałam z różnymi stężeniami białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowałam odpowiednio: Axe lub kompleks Axe-Txe (rycina 17). Przygotowane próbki poddałam elektroforezie w 5% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, a następnie uwidoczniałam interesujące mnie fragmenty DNA przy użyciu metody opisanej w rozdziale 3.6., wykorzystując przeciwciała sprzężone ze streptawidyną. Wyniki testu EMSA widoczne są na rycinie 18. W przypadku fragmentów DNA inkubowanych w obecności antytoksyny Axe, efekt opóźnienia migracji DNA w żelu widoczny jest jedynie w ścieżkach zawierających DNA inkubowany z najwyższymi stężeniami ekstraktu białkowego (rycina 18 B), podczas gdy kompleks Axe-Txe powoduje podobny efekt już przy stężeniu ekstraktu 2,5 µg/ml (rycina 18 C). Inkubacja rejonu promotorowego kasety *axe-txe* z ekstraktem komórkowym, który nie zawierał żadnego z białek badanego systemu, nie powodowała przesunięcia migracji fragmentu DNA (rycina 18 A).



Rycina 17. Nadprodukcja białek systemu *axe-txe* w komórkach *Escherichia coli* Rosetta(DE3) Na rycinie przedstawiono wyniki badania poziomu nadprodukcji białek systemu *axe-txe* w hodowlach bakteryjnych wykorzystanych następnie do przygotowania białkowego ekstraktu, używanego do przeprowadzenia testu EMSA. Bakterie *Escherichia coli* Rosetta(DE3) niosące plazmidy: **A** pET22b (kontrola negatywna), **B** pET22axe, **C** pET22ataxetxe, hodowałam w temperaturze 37°C z wytrząsaniem, w pożywce LB, do momentu uzyskania gęstości optycznej $OD_{600} \sim 0,5$. Ekspresję *axe* lub *axe-txe* indukowałam poprzez dodanie do pożywki IPTG do końcowego stężenia 1mM, po czym prowadziłam hodowlę przez kolejne 3 godziny. Ekstrakt z komórek bakteryjnych poddałam elektroforezie w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym, w buforze Tris-Tricine (metodę opisano dokładnie w rozdziałach 4.6.1. i 4.7.2.). Literą „M” oznaczono ścieżkę zawierającą marker białkowy, „-” – ekstrakt z hodowli bakteryjnej bez dodatku IPTG, „+” – ekstrakt z hodowli bakteryjnej z dodatkiem 0,1mM IPTG, „++” – ekstrakt z hodowli bakteryjnej z dodatkiem 1 mM IPTG. Strzałkami różowymi oznaczono wysokość, na której powinna być widoczna antytoksyna Axe, niebieską – toksyna Txe.

Figure 17. Analysis of proteins' levels in bacterial crude extracts after *axe-txe* genes' overexpression in *Escherichia coli* Rosetta(DE3) Derivatives of pET22b expression vector were introduced to *E. coli* Rosetta(DE3) **A** pET22b (negative control), **B** pET22axe, **C** pET22ataxetxe. Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach $OD_{600} \sim 0,5$. Axe or Axe-Txe complex production was induced by adding IPTG. After IPTG-induction bacteria were grown as previously for next 3 hours. Bacterial crude extract was electrophoresed in 15% denaturing polyacrylamide gel in Tris-Tricine buffer (as outlined in chapters 4.6.1. and 4.7.2.). Protein molecular weight

marker is indicated with "M", crude extract from culture without IPTG supplement „-”, crude extract from culture supplemented with 0.1 mM IPTG „+”, crude extract supplemented with 1mM IPTD „++”. Pink arrows indicate Axe, blue arrow indicates Txe.



Rycina 18 Wiązanie białka Axe i kompleksu Axe-Txe do rejonu operatorowego promotora p_{at} Znakowany biotyną fragment DNA długości 295 pz, zawierający rejon operatorowy badanej kasy, poddano testowi EMSA z wykorzystaniem białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowano białka systemu *axe-txe*. DNA inkubowano przez 20 minut, w temperaturze 22°C, z różnymi stężeniami ekstraktu: 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 12,5 i 25 µg/ml. Tak przygotowane próbki poddano elektroforezie w natywnym 5% żelu poliakrylamidowym. Dalszą część procedury opisano szczegółowo w rozdziale 4.6. **A** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych niosących kontrolny plazmid pET22b. **B** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących Axe. **C** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących kompleks Axe-Txe. Czarnymi strzałkami zaznaczono DNA nie związany z białkiem, białymi – kompleksy DNA-białko.

Figure 18. Axe and Axe-Txe binding to the p_{at} promoter/operator region. A 295-bp 5' biotinylated fragment of p_{at} promoter-operator region was subjected to EMSA. The fragment was incubated with different concentrations of *E. coli* Rosetta(DE3) crude extracts: 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 and 25 µg/ml. Reactions were incubated for 20 min at 22°C, analyzed by native 5% PAGE, and processed further as outlined in chapter 4.6. (A) no Axe or Txe produced, (B) Axe overproduction (C) Axe-Txe overproduction. Filled

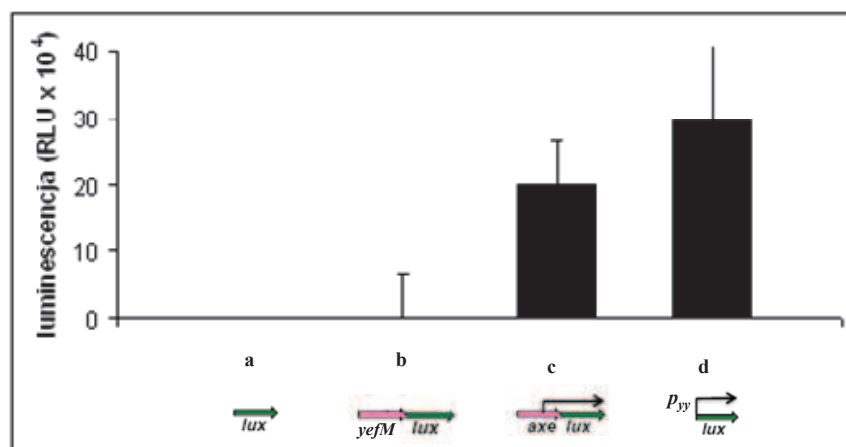
and open arrows denote positions of unbound DNA and protein-DNA complexes, respectively

Wyniki przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* badań wskazują, że geny *axe* i *txe* znajdują się pod kontrolą, charakteryzującego się wysoką aktywnością transkrypcyjną, promotora *p_{at}*. Operon *axe-txe* podlega autoregulacji, w której antytoksyna pełni rolę stosunkowo słabego represora transkrypcji zachodzącej z promotora *p_{at}*, zaś kompleks toksyna-antytoksyna wiąże się efektywnie do rejonu operatorowego *axe-txe*, powodując wydajną represję promotora *p_{at}*.

5.1.2. Promotor *p_{axe}*

Próby sklonowania fragmentu DNA zawierającego gen *txe* wraz z zachodzącym na niego genem *axe*, w taki sposób, aby oba znajdowały się pod kontrolą indukowanego promotora, za każdym razem skutkowały pojawieniem się mutacji w rejonie przynajmniej jednego z genów modułu *axe-txe*. Zmiany w sekwencji DNA pojawiające się w rejonie *axe* lub *txe* miały charakter mutacji punktowych bądź obejmujących duże rejonu DNA delecji, przy czym niemalże we wszystkich zaobserwowanych przypadkach powodowały zmianę ramki odczytu *txe*. Niepowodzenia podczas klonowania genów *axe-txe* skłaniały do przypuszczenia, że klonowany rejon DNA może zawierać dodatkowe elementy regulacyjne. Zaobserwowany toksyczny efekt można wyjaśnić w następujący sposób: w komórkach, w których geny *axe-txe* pozbawione były silnego promotora *p_{at}*, dodatkowa pula toksyny produkowana wskutek ekspresji *txe* z potencjalnego promotora *p_{axe}*, powodowała zaburzenie proporcji ilości antytoksyny i toksyny na korzyść Txe. W celu weryfikacji powyższego założenia, przeprowadziłam analizę sekwencji genu *axe*, wykorzystując program komputerowy PromScan, co umożliwiło mi identyfikację potencjalnej sekwencji promotorowej obecnej w obrębie tego genu.

Aby określić, czy w rejonie genu *axe* istotnie obecny jest aktywny w komórkach *Escherichia coli* promotor, skonstruowałam fuzję transkrypcyjną *axe* z pozbawionym promotora operonem *luxCDABE*, w plazmidzie pBBRlux-amp. Następnie zmierzyłam aktywność transkrypcyjną badanego fragmentu DNA, wykorzystując geny operonu *luxCDABE*, jako geny reporterowe. Uzyskany wynik porównałam z wynikiem podobnego eksperymentu przeprowadzonego z wykorzystaniem promotora, spokrewnionej z systemem *axe-txe*, kasety *yefM-yoeB* (rycina 19). Zaobserwowałam, że DNA w rejonie genu kodującego antytoksynę Axe, charakteryzuje się aktywnością transkrypcyjną porównywalną z aktywnością promotora *p_{yy}* kasety *yefM-yoeB* (odpowiednio $\sim 3 \times 10^5$ i $\sim 3,5 \times 10^5$ RLU, podczas gdy luminescencja kontroli negatywnej kształtowała się na poziomie około 100 RLU). Nie zaobserwowałam natomiast aktywności transkrypcyjnej w rejonie genu, kodującego antytoksynę YefM (~ 250 RLU).

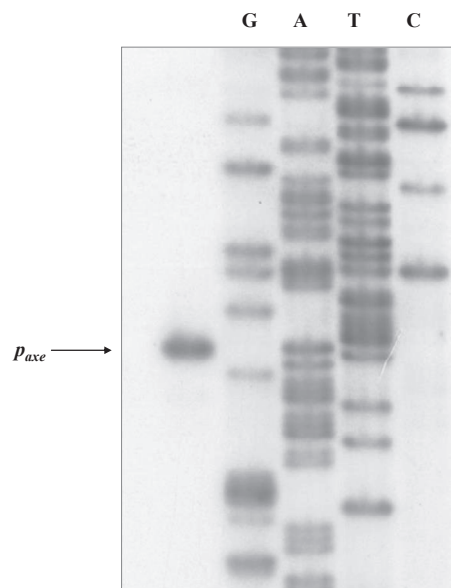


Rycina 19. Porównanie aktywności transkrypcyjnej promotorów p_{axe} i p_{yy} w komórkach *Escherichia coli* SC301467 Eksperyment przeprowadziłam z wykorzystaniem fuzji transkrypcyjnych pozbawionego promotora operonu *luxCDABE* z fragmentami DNA zawierającymi: gen *yefM* (b), gen *axe* (c), promotor p_{yy} (d), umieszczonych w plazmidzie pBBRlux-amp (tabela 5). Bakterie *Escherichia coli* SC301467 niosące odpowiednie plazmidy hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania gęstości optycznej hodowli $OD_{600} \sim 0,4$, po czym wykonywałam pomiar luminescencji. Jako kontrolę negatywną zastosowałam wynik pomiaru luminescencji hodowli komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid pBBRlux-amp, zawierający pozbawiony promotora operon *luxCDABE* (a). Wyniki pomiarów luminescencji wyraziłam w relatywnych jednostkach luminescencji. Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. Na wykresie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe operonu *luxCDABE*, różowym – elementy powiązane z antytoksynami, strzałkami zaznaczono promotory.

Figure 19. Comparison of transcriptional activity of p_{axe} and p_{yy} promoters in *Escherichia coli* SC301467 Transcriptional fusions of the *luxCDABE* operon devoid of promoter to DNA fragments containing *yefM* (b), *axe* (c), promoter p_{yy} (d) in pBBRlux-amp (table 5). Plasmid pBBR-lux derivatives were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach $OD_{600} \sim 0.4$. Luminescence was measured in RLU. Result of luminescence measurement of bacterial cultures transformed with pBBRlux-amp plasmid (a) was applied as the negative control. The results are averages of at least three independent experiments.

Standard deviation is denoted as an error bar. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, antitoxins genes in pink, toxins genes in blue, black arrows indicates promoters.

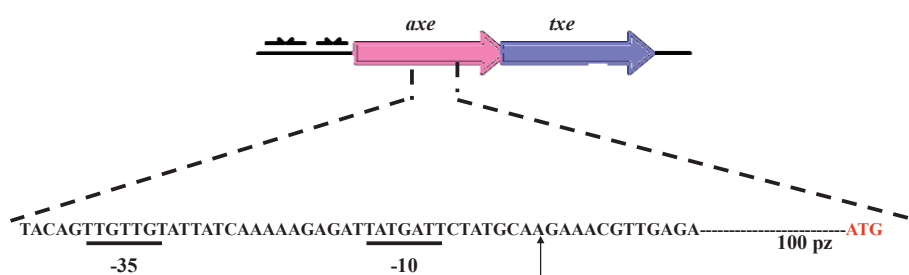
Aby określić miejsce startu transkrypcji zachodzącej z promotora p_{axe} , przeprowadziłam eksperyment typu „*primer extension*”. Jako matrycę do reakcji wydłużania startera wykorzystałam całkowity RNA wyizolowany z komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid $pluxaxe$ (tabela 5). Wykryłam jedno miejsce startu transkrypcji (+1) z promotora p_{axe} , znajdujące się w odległości około 110 nukleotydów od kodonu startowego *txe* (rycina 20). Analiza sekwencji DNA, znajdującej się powyżej miejsca startu transkrypcji z promotora p_{axe} , wykazała obecność sekwencji zbliżonych do sekwencji *consensus* rejonów -35 i -10 promotorów *Escherichia coli* [82]. Miejsca -35 i -10 promotora p_{axe} rozdzielone są sekwencją DNA o optymalnej dla promotorów *E. coli* długości siedemnastu nukleotydów (rycina 21).



Rycina 20. Wynik badania miejsca startu transkrypcji zachodzącej z promotora p_{axe} uzyskany z wykorzystaniem techniki wydłużania startera Całkowity RNA wyizolowany z komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid $pluxaxe$, poddałam analizie typu „*primer extension*” z wykorzystaniem znakowanego radioaktywnie startera komplementarnego do sekwencji wektora (tabela 6.). Reakcję sekwencjonowania DNA plazmidu $pluxaxe$ metodą Sanger’a przeprowadziłam, wykorzystując ten sam starter. Produkt reakcji wydłużania startera oraz produkty reakcji sekwencjonowania DNA poddałam elektroforezie w 6% poliakrylamidowym żelu

denaturującym. Sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano szczegółowo w rozdziale 4.8. Produkt reakcji wydłużania startera oznaczono strzałką.

Figure 20. Primer extension analysis of the p_{axe} promoter of the *axe-txe* module. Total RNA from *E. coli* SC301467 cells harbouring *pluxaxe* plasmid was subjected to primer extension analysis using a radioactively labelled primerr that anneals within flanking vector sequence (table 6). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.8., and electrophoresed on a denaturing 6% polyacrylamide gel in parallel with nucleotide sequencing reactions (A, C, G, T) carried out with the same primer according to Sanger method. The major product from the primer extension is marked with an arrow

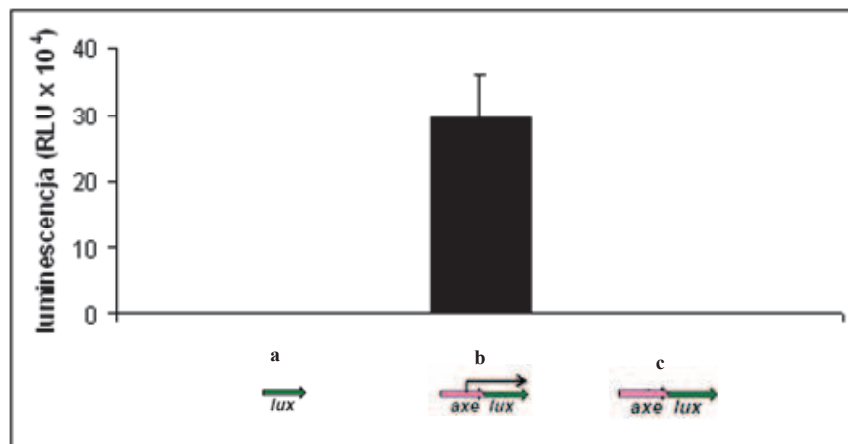


Rycina 21. Schemat przedstawiający organizację rejonu promotora p_{axe} kasety *axe-txe* Miejsce startu transkrypcji z promotora p_{axe} oznaczono pionową strzałką. Sekwencje -35 i -10 promotora p_{axe} podkreślono. Sekwencję kodonu startowego genu *txe* zaznaczono czerwoną czcionką

Figure 21. Organization of the promoter p_{axe} DNA region of *axe-txe* TA module Vertical arrow indicates start of transcription driven form the p_{axe} promoter. -35 and -10 sequences of the p_{axe} promoter are underlined. ATG start codon of the *txe* gene is denoted in red

W celu ustalenia, czy zaobserwowana w warunkach *in vivo* aktywność promotorowa DNA *axe* rzeczywiście jest wynikiem obecności promotora p_{axe} o wyznaczonej przeze mnie sekwencji, przeprowadziłam mutagenezę miejscowo – specyficzną DNA plazmidowego *pluxaxe* w taki sposób, aby zmodyfikować

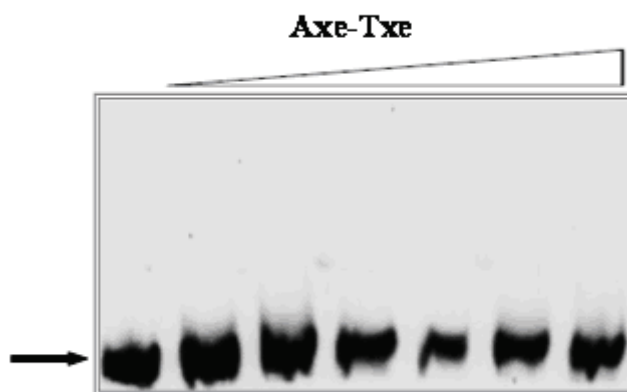
rejon $-10 p_{axe}$ (TATGAT \rightarrow TACGAC), przy jednoczesnym zachowaniu niezmięnionej sekwencji aminokwasowej Axe (plazmid pluxaxemut, tabela 5). Następnie zmierzyłam poziom luminescencji hodowli bakterii, niosących zmodyfikowany w ten sposób plazmid. Wprowadzone mutacje spowodowały niemalże całkowite zniesienie aktywności promotorowej (rycina 22). Wynik ten potwierdził obecność, w uprzednio wskazanym rejonie *axe*, aktywnego w komórkach *E. coli* promotora p_{axe} . Żadne z białek kasy *axe-txe* bądź bakteryjnych białek obecnych w ekstrakcie białkowym nie wiązało się do DNA zawierającego rejon promotora p_{axe} (rycina 23).



Rycina 22. Porównanie aktywności transkrypcyjnej rejonu *axe* przed i po mutageniezie sekwencji -10 promotora p_{axe} Eksperyment przeprowadziłam z wykorzystaniem fuzji transkrypcyjnych pozbawionego promotora operonu *luxCDABE* z fragmentami DNA zawierającymi: gen *axe* (b), gen *axe* zawierający zmodyfikowaną wersję promotora p_{axe} (c), w plazmidzie pBBRlux-amp (tabela 5). Bakterie *Escherichia coli* SC301467 niosące odpowiednie plazmidy hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania gęstości optycznej hodowli $OD_{600} \sim 0,4$, po czym wykonywałam pomiar luminescencji. Kontrolę negatywną stanowi wynik pomiaru luminescencji hodowli komórek *Escherichia coli* SC301467, niosących plazmid pBBRlux-amp, zawierający pozbawiony promotora operon *luxCDABE* (a). Wyniki pomiarów luminescencji wyraziłam w relatywnych jednostkach luminescencji. Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe. Na wykresie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów

DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe operonu *luxCDABE*, różowym – elementy powiązane z antytoksyną, strzałkami zaznaczono promotory

Figure 22. Comparison of transcriptional activity of p_{axe} before and after -10 promoter sequence mutagenesis Transcriptional fusions of the *luxCDABE* operon devoid of the promoter to DNA fragments containing native *axe* (b) or the mutated version of *axe* (c) in *pBBRlux-amp* (table 5). Plasmid *pBBR-lux* derivatives were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium at 37°C until the culture reached $OD_{600} \sim 0.4$. Luminescence was measured in RLU. Results of luminescence measurement of bacterial cultures transformed with *pBBRlux-amp* plasmid (a) were applied as the negative control. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an errorbar. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, antitoxins genes in pink, black arrows indicate promoters

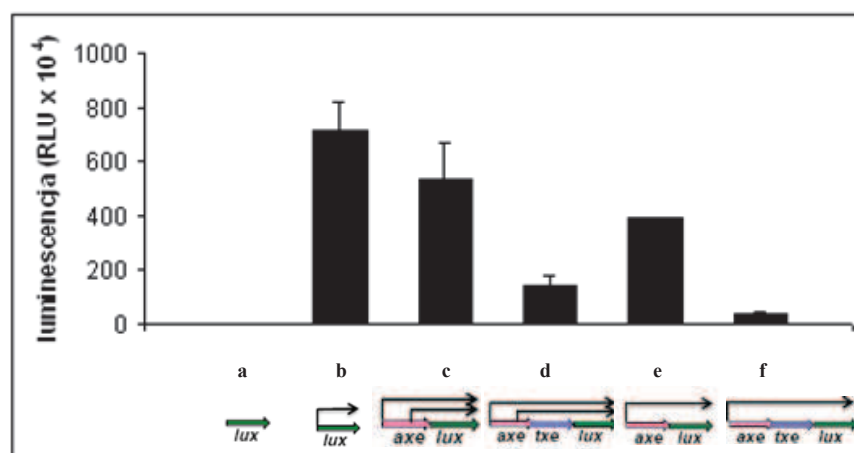


Rycina 23. Badanie powinowactwa białka Axe i kompleksu Axe-Txe do rejonu operatorowego promotora p_{axe} Znakowany biotyną fragment DNA, zawierający rejon promotora p_{axe} , poddano testowi EMSA z wykorzystaniem białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowano białka systemu *axe-txe*. DNA inkubowano przez 20 minut, w temperaturze 22°C, z różnymi stężeniami ekstraktu: 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 12,5 i 25 $\mu\text{g/ml}$. Tak przygotowane próbki poddano elektroforezie w natywnym 5% żelu poliakrylamidowym. Dalszą część procedury opisano szczegółowo w rozdziale 4.6. Czarną strzałką zaznaczono DNA nie związane z białkiem

Figure 23. Axe and Axe-Txe affinity to the p_{axe} promoter region. Biotinylated fragment of the p_{axe} promoter region was subjected to EMSA. The fragment was incubated with different concentrations of *E. coli* Rosetta(DE3) crude extracts: 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$. Reactions were incubated for 20 min at 22°C, analyzed by native 5% PAGE, and processed further as outlined chapter 4.6. Filled arrow denotes position of unbound DNA.

Obecność dodatkowego promotora w rejonie genu *axe* mogła wpływać na wyniki badania wpływu białek systemu *axe-txe* na ekspresję z promotora p_{at} , wykonanych w układzie *in cis* (rycina 16). Przeprowadziłam zatem powyższy

eksperyment ponownie, tym razem wykorzystując pochodne plazmidu pBBRlux-amp, zawierające mutacje w rejonie -10 promotora p_{axe} (rycina 24). Po mutagenizie p_{axe} , w obecności antytoksyny, poziom ekspresji genów reporterowych z promotora p_{at} uległ obniżeniu o około 40%, podczas gdy kompleks Axe-Txe, w tych samych warunkach, powodował silną represję p_{at} (poziom luminescencji o około 95% niższy niż w przypadku szczepów nie produkujących białek kasety $axe-txe$). Stosunkowo wysoki poziom luminescencji zaobserwowany w hodowlach niosących plazmid $pluxataxetxe$ ($\sim 1,4 \times 10^6$ RLU) był zatem prawdopodobnie wynikiem aktywności promotora p_{axe} .

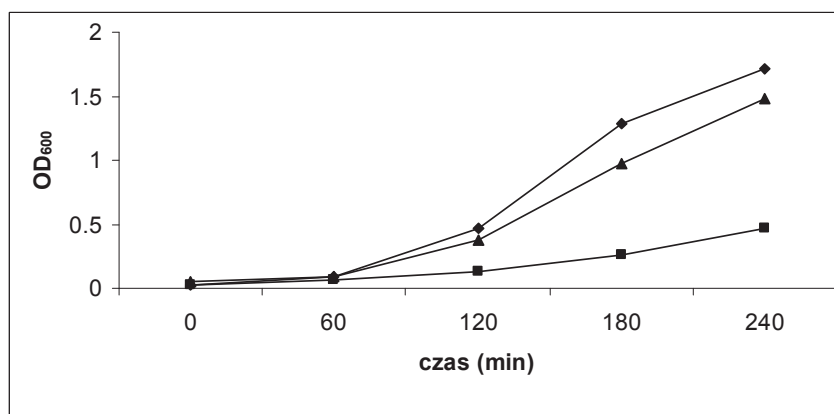


Rycina 24. Porównanie wpływu białek systemu $axe-txe$, kodowanych w układzie $in cis$, na aktywność promotora p_{at} , przed i po mutagenizie sekwencji -10 promotora p_{axe} Bakterie *Escherichia coli* SC301467, niosące pochodne plazmidu pBBRlux-amp hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania $OD_{600} \sim 0,4$, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Rycina przedstawia wykres pomiaru luminescencji w komórkach niosących następujące plazmidy: **a** pBBRlux-amp (kontrola negatywna), **b** $pluxat$ (wektor zawierający promotor p_{at}), **c** $pluxataxe$ (wektor zawierający gen axe pod kontrolą promotora p_{at}), **d** $pluxataxetxe$ (wektor zawierający geny axe i txe pod kontrolą promotora p_{at}), **e** $pluxataxemut$ (wektor zawierający gen axe , znajdujący się pod kontrolą promotora p_{at} niosący mutacje w rejonie -10 promotora p_{axe}), **f** $pluxataxetxemut$ (wektor zawierający gen axe , niosący mutacje w rejonie -10 promotora p_{axe} , oraz gen txe ; oba geny znajdują się pod kontrolą promotora p_{at}). Na wykresie umieszczono schematy,

ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe operonu *luxCDABE*, różowym – *axe*, niebieskim – *txe*, strzałkami zaznaczono promotory. Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe.

Figure 24. Comparison of the influence of cis-encoded Axe-Txe proteins' production on transcriptional activity of the p_{at} promoter before and after mutagenesis of the -10 sequence of p_{axe} promoter Appropriate derivatives of pBBRlux-amp plasmid were introduced to *E. coli* SC301467 **a** pBBRlux-amp (negative control), **b** *pluxat* (contains the p_{at} promoter), **c** *pluxataxe* (contains native version of *axe* under control of the p_{at} promoter), **d** *pluxataxetxe* (contains native versions of *axe* and *txe* under control of the p_{at} promoter), **e** *pluxataxemut* (contains mutated version of *axe* under control of the p_{at} promoter), **f** *pluxataxetxemut* (contains mutated version of *axe* and native version of *txe*, both under control of the p_{at} promoter) Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach OD600 ~0.4. Luminescence in RLU was measured. Results of luminescence measurement of bacterial cultures transformed with pBBRlux-amp plasmid were applied as the negative control. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an error bar. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, antitoxins genes in pink, toxins genes in blue, black arrows indicates promoters.

Transkrypcja zachodząca z promotora p_{axe} , prawdopodobnie skutkuje produkcją dodatkowej puli toksyny, na co wskazują wyniki badania tempa wzrostu hodowli, niosących pochodne plazmidu pTE103 (rycina 25). Plazmid pTEataxetxemut zawiera kasetę *axe-txe*, niosącą mutację w rejonie -10 promotora p_{axe} , przy jednoczesnym zachowaniu nie zmienionej sekwencji aminokwasowej Axe. Geny *axe* i *txe* znajdują się pod kontrolą promotora p_{at} . Tempo wzrostu hodowli komórek *Escherichia coli* SC301467 niosących ten plazmid nie różni się znacznie od tempa wzrostu komórek niosących wektor kontrolny pTE103. Zahamowanie wzrostu hodowli bakterii niosących plazmid pTEataxetxe, w którym obecne są oba promotory *axe-txe*, jest pośrednim dowodem na ekspresję *txe* z promotora p_{axe} . Co więcej, wynik ten wskazuje, że pula produkowanej toksyny nie jest w tym przypadku całkowicie neutralizowana przez Axe. Zaburzenie proporcji ilości Axe i Txe w komórkach niosących wektor pTEataxetxe może oznaczać, że regulacja ekspresji kasety *axe-txe* jest bardziej skomplikowana niż początkowo sądzono.

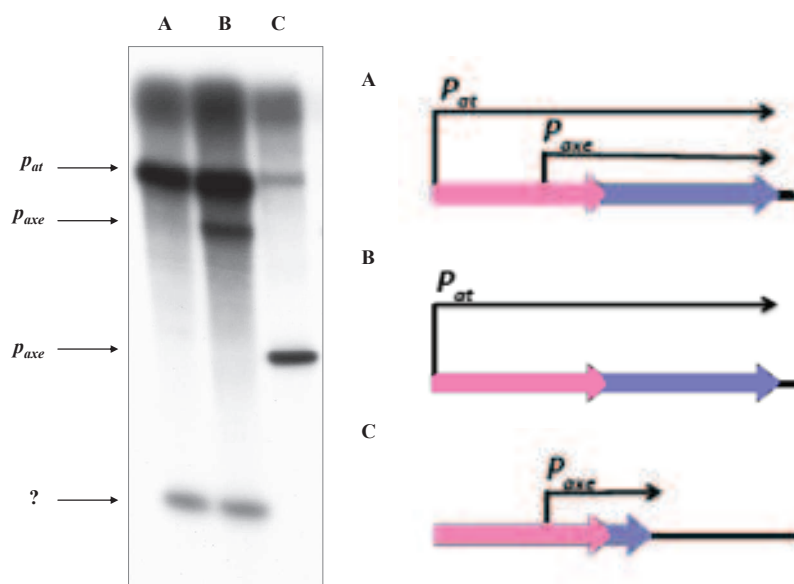


Rycina 25. Wpływ obecności aktywnego promotora p_{axe} na tempo wzrostu hodowli *Escherichia coli* SC301467, niosących kasetę *axe-txe* Bakterie szczepu *E. coli* SC301467, niosące pochodne plazmidu pTE103 hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, w pożywce LB przez 4 godziny. Pomiar absorpcji przy długości fali 600 nm wykonywałam w odstępach trzydziestominutowych. Rombami oznaczono wyniki dla hodowli komórek niosących plazmid kontrolny pTE103, kwadratami – pTEataxetxe, trójkątami – pTEataxetxemut. Tempo wzrostu hodowli komórek niosących plazmid zawierający promotor p_{axe} jest znacznie wolniejsze w stosunku do tempa wzrostu komórek niosących kasetę *axe-txe* pozbawioną tego promotora i komórek niosących wektor pTE103. Na rycinie przedstawiono reprezentatywną krzywą wykonaną na podstawie wyników z trzech niezależnie wykonanych eksperymentów.

Figure 25. Active p_{axe} promoter within the *axe-txe* system affects growth of *Escherichia coli* SC301467 Derivatives of the pTE103 vector were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium at 37°C for 4 hours. Absorbance at 600 nm was measured every 30 minutes. Negative control: pTE103 (diamonds), pTEataxetxe (squares), pTEataxetxemut (triangles). Growth rate of bacteria harbouring plasmid that contains native version of the p_{axe} promoter is lower compared to that harbouring inactive version of the p_{axe} or control vector pTE103. The diagram presents a representative result of at least three independent experiments.

W celu potwierdzenia, że obserwowany efekt zahamowania wzrostu komórek niosących plazmid pTEataxetxe jest związany z ekspresją *txe* z promotora p_{axe} , przeanalizowałam transkrypty uzyskane techniką transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem pochodnych wektora pTE103 (rycina 26). Obecność w

badanym DNA promotora p_{at} umożliwiła uzyskanie produktu reakcji o długości odpowiadającej teoretycznie ustalonej długości mRNA $axe-txe$ (rycina 26 A i B). Natomiast transkrypcja *in vitro* przeprowadzona z wykorzystaniem matrycy DNA zawierającej promotor p_{axe} , skutkowała uzyskaniem produktu RNA o długości odpowiadającej długości mRNA txe powiększonej o około 100 rybonukleotydów (rycina 26 B), co stanowiło wynik zgodny z wynikiem badania miejsca startu transkrypcji z tego promotora (rycina 20). Co ciekawe, obecność w matrycowym DNA całej sekwencji genu txe skutkowała utworzeniem jeszcze jednego produktu reakcji o długości około 300 rybonukleotydów (rycina 26 A i B), co wskazuje na obecność promotora również w rejonie DNA txe .



Rycina 26. Wynik badania aktywności transkrypcyjnej DNA kasety $axe-txe$
Przeprowadziłam wielorundową reakcję transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem holoenzymu polimerazy RNA *E. coli* (σ^{70}). Jako matrycę do reakcji wykorzystałam DNA plazmidowy pochodnych wektora pTE103, zawierających badane promotory. **A** Reakcja przeprowadzona na matrycy DNA pTEataxtxmut (plazmid zawierający kasetę $axe-txe$ pozbawioną promotora p_{axe}) **B** pTEataxtxe (plazmid zawierający kasetę $axe-txe$ wraz z promotorem p_{axe}) **C** pTEaxe (plazmid zawierający gen axe wraz z promotorem p_{axe}). Dokładny sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano w rozdziale 4.9. Na podstawie porównania migracji uzyskanego RNA w żelu poliakrylamidowym z markerem RNA (RiboRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific), określiłam długość transkryptów i przyporządkowałam je do badanych promotorów. Produkt

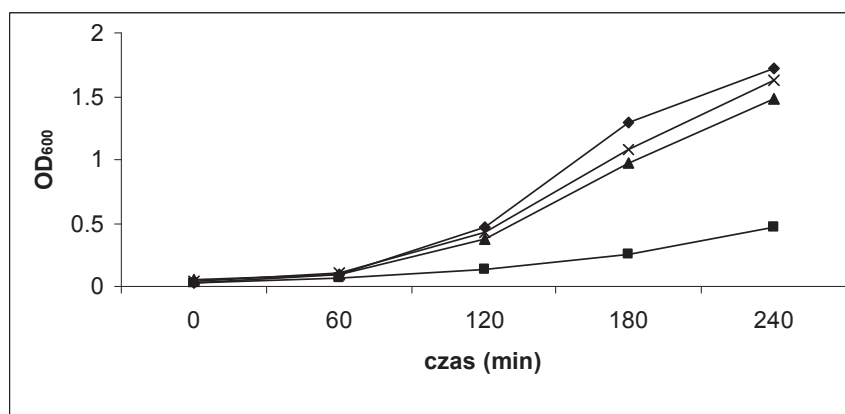
transkrypcji z promotora p_{at} ma długość ~850 rybonukleotydów (A, B), z promotora p_{axe} – około 680 rybonukleotydów (B); długość uzyskanych produktów odpowiada długości mRNA odpowiednio: *axe-txe* i *txe*, powiększonej o ~280 rybonukleotydów, co wynika z odległości pomiędzy końcem 3' badanych genów a obecną w wektorze sekwencją terminatorową. Na rycinie umieszczono schematy ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem różowym oznaczono gen kodujący antytoksynę, niebieskim – toksynę.

Figure 26. Transcription activity within the *axe-txe* operon. Multi-round *in vitro* transcription experiments were performed using *E. coli* $\sigma 70$ RNA polymerase holoenzyme and pTE103-derived template DNA: (A) pTEataxetxemut (contains the *axe-txe* operon with mutated version of the p_{axe} promoter), (B) pTEataxetxe (contains the *axe-txe* operon with native version of p_{axe}), (C) pTEaxe (contains the *axe* gene with native version of p_{axe} promoter). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.9. Transcripts' sizes were estimated according to an RNA ladder (RiboRuler Low Range RNA Ladder, Thermo Scientific) which was electrophoresed with the reactions and then excised and stained with ethidium bromide. The diagram presents a representative result of at least three independent experiments. Transcript of the p_{at} promoter is ~850 nucleotide long (A, B), transcript of the p_{axe} promoter is about 680 nucleotide long (B), which is corresponding to *axe-txe* and *txe* mRNA length respectively, enlarged by ~280 nucleotide distance between 3' end of genes and terminal sequence of pTE103 vector. Charts on the diagram indicate genetic organization of tested DNA fragments. Antitoxins' genes are drawn in pink, toxins genes in blue, black arrows indicates promoters.

Wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* potwierdziły obecność dodatkowego promotora p_{axe} w obrębie genu kodującego antytoksynę systemu *axe-txe*. Zmierzona *in vivo* aktywność zidentyfikowanego promotora jest około dwudziestokrotnie niższa niż aktywność promotora p_{at} , jednak porównywalna z aktywnością głównego promotora homologicznej kasyety *yefM-yoeB*. Transkrypcja zachodząca z promotora p_{axe} skutkuje produkcją dodatkowej puli toksyny Txe. Można zatem stwierdzić, że organizacja i regulacja ekspresji operonu *axe-txe* różni się od kanonicznego modelu przyjętego dla kaset toksyna-antytoksyna typu II.

5.1.3. Inne elementy kasyety *axe-txe*, które mogą brać udział w regulacji ekspresji jej genów

Podczas wykonywania pracy badawczej zaobserwowałam, że tempo wzrostu hodowli bakterii niosących kasetę *axe-txe* wraz z promotorami p_{at} i p_{axe} jest znacznie wolniejsze niż w przypadku bakterii niosących tę samą kasetę, pozbawioną promotora p_{axe} (ryciny 25 i 27). Co ciekawe, zjawisko takie nie miało miejsca w przypadku hodowli bakterii, niosących fragment kasyety *axe-txe* zawierający oba promotory, a ponadto sekwencję o długości około 20 par zasad, znajdującą się na końcu 3' za kodonem stop (typu „ochre”) *txe* (rycina 27).

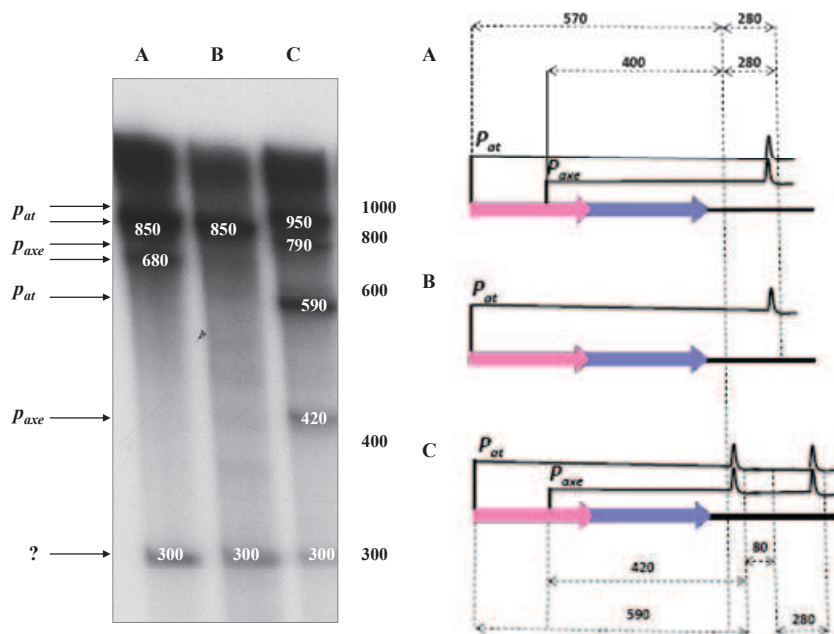


Rycina 27. Wpływ obecności sekwencji końca 3' *txe* na tempo wzrostu hodowli *Escherichia coli* SC301467, niosących kasetę *axe-txe* Bakterie szczepu *E. coli* SC301467, niosące pochodne plazmidu pTE103 hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, w pożywce LB przez 4 godziny. Pomiar absorpcji przy długości fali 600 nm wykonywałam w odstępach trzydziestominutowych. Rombami oznaczono wyniki dla hodowli komórek niosących plazmid kontrolny pTE103, kwadratami – pTEataxetxe, trójkątami – pTEataxetxmut., krzyżykami – pTEataxetxelong. Tempo wzrostu hodowli komórek niosących plazmid zawierający promotor *p_{axe}* jest znacznie wolniejsze w stosunku do tempa wzrostu komórek niosących kasetę *axe-txe* pozbawioną tego promotora i komórek niosących wektor pTE103. Zahamowania wzrostu nie zaobserwowano w przypadku hodowli komórek niosących plazmid zawierający kasetę *axe-txe* wraz z jej promotorami i sekwencją obecną na końcu 3' genu *txe*. Na rycinie przedstawiono reprezentatywną krzywą wykonaną na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnie wykonanych eksperymentów.

Figure 27. 3' end of the *txe* gene within the *axe-txe* system affects growth of *Escherichia coli* SC301467 Derivatives of pTE103 vector were introduced to *E. coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium at 37°C for 4 hours. Absorbance at 600 nm was measured every 30 minutes. Negative control: pTE103 (diamonds), pTEataxetxe (squares), pTEataxetxmut. (triangles), pTEataxetxelong (crosses). Growth rate of bacteria harbouring plasmid that contains native version of the *p_{axe}* promoter is lower compared to that harbouring an inactive version of *p_{axe}* or the control vector pTE103. Culture of bacteria harbouring plasmid that contains native version of *axe-txe* cassette and 20 bp sequence downstream *txe* gene shows normal

growth rate. The diagram presents a representative result of at least three independent experiments.

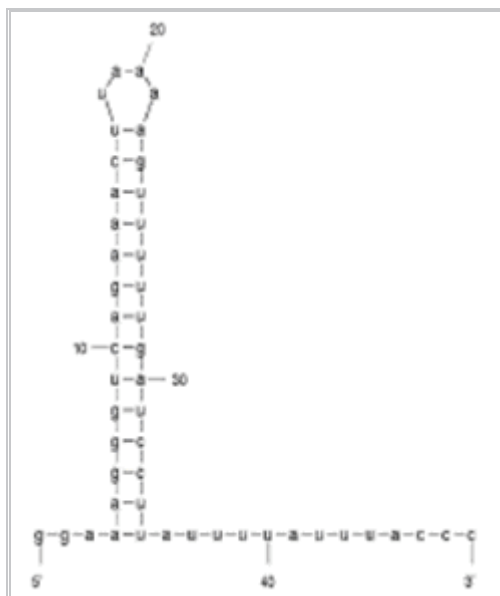
Aby wyjaśnić to zjawisko przeanalizowałam produkty reakcji transkrypcji *in vitro*, przeprowadzonej z wykorzystaniem odpowiednich pochodnych wektora pTE103 (rycina 28). Wyniki eksperymentu wskazują na obecność na końcu 3' kasety *axe-txe* sekwencji o charakterze stosunkowo słabego terminatora. Strukturę mRNA tego rejonu uzyskano przy pomocy programu komputerowego Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>) (rycina 29). Obecność sekwencji terminatorowej na końcu 3' kasety *axe-txe* potwierdziłam także w warunkach *in vivo*: poziom luminescencji hodowli bakterii niosących kasetę *axe-txe*, zakończoną dłuższym o około 20 par zasad fragmentem na końcu 3' *txe*, jest o rząd wielkości niższy niż w przypadku komórek niosących tę samą kasetę pozbawioną sekwencji terminatorowej (rycina 30). Powyższy wynik związany jest prawdopodobnie z niską efektywnością terminacji transkrypcji, co widoczne jest także w wynikach badań *in vitro* (rycina 28). Jedyne część rund transkrypcji, rozpoczynających się z obu promotorów kasety *axe-txe*, zostaje zahamowana na wysokości badanej sekwencji terminatorowej, co umożliwia zachowanie pewnego poziomu ekspresji genów reporterowych, obecnych w DNA pochodnych wektora pBBRlux-amp. Zaobserwowane różnice w tempie wzrostu poszczególnych hodowli bakteryjnych mogą być związane z regulacją ekspresji *txe* na etapie potranskrypcyjnym (problem ten przedyskutowano szerzej w rozdziale 6.).



Rycina 28. Porównanie aktywności transkrypcyjnej DNA kasety *axe-txe* i kasety *axe-txe* wydłużonej o 20 pz na końcu 3' *txe* Przeprowadziłam wielorundową reakcję transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem holoenzymu polimerazy RNA *E. coli* (σ^{70}). Jako matrycę do reakcji wykorzystywałam DNA plazmidowy pochodnych wektora pTE103. **A** Reakcja przeprowadzona na matrycy DNA pTEataxetxe (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* wraz z promotorem p_{axe}) **B** pTEataxetxemut (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* pozbawioną promotora p_{axe}) **C** pTEataxetxelong (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* wraz z promotorem p_{axe} wydłużoną o 20 pz na końcu 3' *txe*). Dokładny sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano w rozdziale 4.9. Na podstawie porównania migracji uzyskanego RNA w żelu poliakrylamidowym z markerem RNA (RiboRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific), określiłam długość transkryptów i przyporządkowałam je do badanych promotorów. W przypadku wektora zawierającego dłuższą wersję kasety *axe-txe*, zaobserwowałam pięć produktów reakcji. Długości czterech z nich odpowiadała teoretycznej długości transkryptów z promotorów p_{at} i p_{axe} , które powstały na skutek transkrypcji zakończonej na terminatorze kodowanym w pET103 lub na własnym terminatorze kasety *axe-txe*, obecnym w rejonie 20-to nukleotyduowej sekwencji na końcu 3' *txe*. Piąty zaobserwowany produkt reakcji, o długości około 300 nukleotydów, jest charakterystyczny dla prób, w których jako matryca zostało użyte DNA *txe*. Na rycinie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA wraz z szacunkową długością poszczególnych rejonów DNA. Kolorem różowym oznaczono gen, kodujący antytoksynę, niebieskim – toksynę.

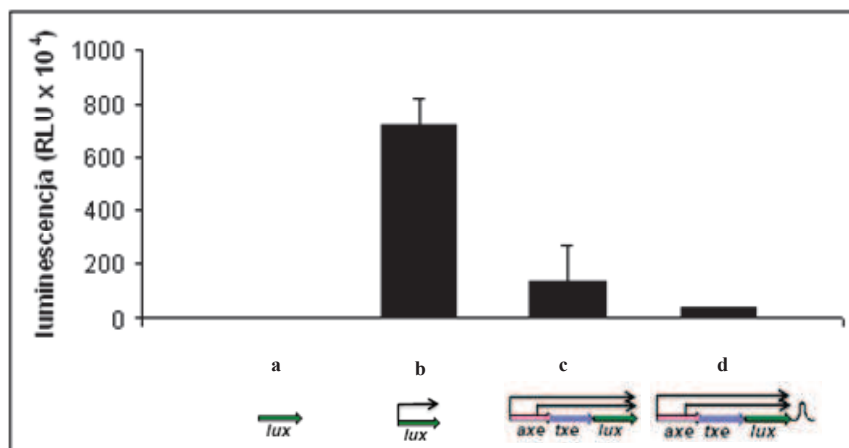
Figure 28. Comparison of transcription activity within the *axe-txe* operon elonged by 20 bp Multi-round *in vitro* transcription experiments were performed using *E. coli*

$\sigma 70$ RNA polymerase holoenzyme and *pTE103* - derived template DNA: **A** *pTEataxetxe* (contains native version of the *axe-txe* operon), **B** *pTEataxetxmut* (contains the *axe-txe* operon with mutated version of the p_{axe} promoter) **C** *pTEataxetxelong* (contains native version of the *axe-txe* operon elonged by 20 bp on the 3' end of the *txe*). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.9. Transcript sizes were estimated according to an RNA ladder (RiboRuler Low Range RNA Ladder, Thermo Scientific) which was electrophoresed with the reactions and then excised and stained with ethidium bromide. The diagram presents a representative result of at least three independent experiments. There are five types of transcription products from *pTEataxetxelong*: ~950 nucleotide and ~590 nucleotide long fragments of transcription from the p_{at} promoter, ~790 nucleotide and ~420 nucleotide fragments from the p_{axe} promoter ended by the *axe-txe* specific terminator or vector encoded terminator respectively and ~300 nucleotide long fragment specific for experiments where the *txe* gene was present in the template DNA. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Antitoxins' genes are drawn in pink, toxins' genes in blue, black arrows indicates promoters



Rycina 29. Przewidywana struktura końca 3' mRNA *axe-txe*

Figure 29. Putative structure of the 3' end of *axe-txe* mRNA

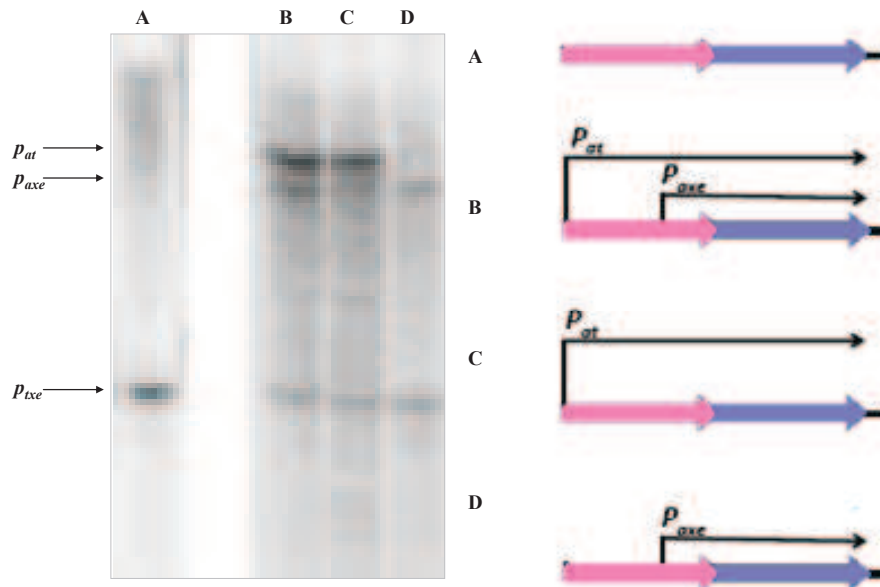


Rycina 30. Porównanie poziomu luminescencji hodowli bakteryjnych *Escherichia coli* SC301467, niosących kasetę *axe-txe*, zakończoną sekwencją terminatorową lub pozbawioną tej sekwencji Bakterie *Escherichia coli* SC301467, niosące pochodne plazmidu pBBRlux-amp hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania OD₆₀₀~0,4, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Rycina przedstawia wykres pomiaru luminescencji hodowli komórek, niosących następujące plazmidy: **a** pBBRlux-amp (kontrola negatywna) **b** pluxat (wektor zawierający promotor *p_{ai}*) **c** pluxataxetxe (wektor zawierający kasetę *axe-txe* pozbawioną sekwencji terminatorowej) **d** pluxataxetxelong (wektor zawierający kasetę *axe-txe*, zakończoną sekwencją terminatorową). Na wykresie umieszczono schematy, ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem zielonym zaznaczono geny reporterowe operonu *luxCDABE*, różowym – *axe*, niebieskim – *txe*, strzałkami zaznaczono promotory. Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe.

Figure 30. Comparison of the luminescence level of *Escherichia coli* SC301467 cultures harbouring the *axe-txe* operon with or without transcription terminator sequence Appropriate derivatives of pBBRlux-amp plasmid were introduced into *E. coli* SC301467: (a) pBBRlux-amp (negative control), (b) pluxat (contains the *p_{ai}* promoter), (c) pluxataxetxe (contains the *axe-txe* operon without transcription terminator sequence), (d) pluxataxetxelong (contains the *axe-txe* operon including transcription terminator sequence). Bacteria were grown in LB medium at 37°C until culture reach OD₆₀₀ ~0.4. Luminescence was measured in RLU. The level of luminescence measured in bacterial cultures transformed with pBBRlux-amp plasmid was applied as the

negative control. The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an errorbar. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Reporter genes are drawn in green, antitoxins genes in pink, toxins genes in blue, black arrows indicates promoters.

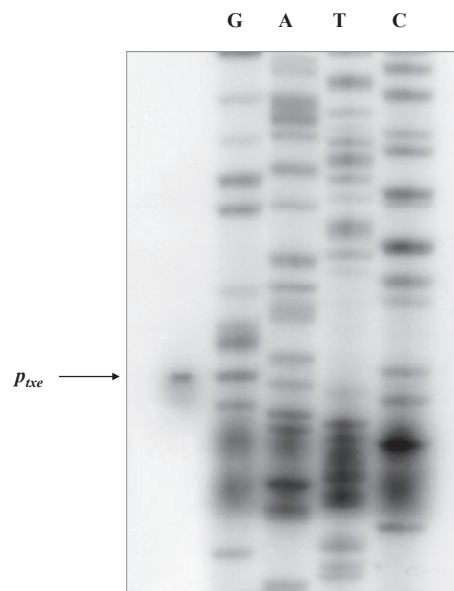
Reakcja transkrypcji *in vitro* na matrycy DNA kasety *axe-txe* skutkowała otrzymaniem RNA o długości odpowiadającej, określonej teoretycznie, długości mRNA transkryptów z promotorów p_{at} i p_{axe} oraz RNA o długości około 300 nukleotydów, pochodzącego z niezidentyfikowanego promotora. Dodatkowy transkrypt zaobserwowałam jedynie w próbach, w których matrycowy DNA zawierał *txe*, co wskazuje na obecność potencjalnego promotora w rejonie tego genu (rycina 26). Długość RNA powstającego w wyniku transkrypcji z potencjalnego promotora p_{txe} jest niezależna od odległości pomiędzy sekwencjami terminatorowymi a końcem 3' *txe* (rycina 28), co skłania do sugestii, że transkrypcja z potencjalnego promotora p_{txe} zachodzi w kierunku odwrotnym niż transkrypcja z pozostałych promotorów modułu *axe-txe*. Aby określić miejsce startu transkrypcji z promotora p_{txe} , przeprowadziłam eksperyment wydłużania startera, w którym jako matrycę do reakcji wykorzystałam produkty reakcji transkrypcji *in vitro* (rycina 31). Przy pomocy techniki autoradiografii, wykryłam jeden produkt reakcji „primer extension” (rycina 32). Na podstawie położenia produktu reakcji wydłużania startera względem produktów reakcji sekwencjonowania DNA plazmidu pTEaxetxeW5Cmut, przeprowadzonego techniką Sanger’a [82], wyznaczyłam miejsce startu transkrypcji (+1) zachodzącej z promotora p_{txe} .



Rycina 31. Wynik badania aktywności transkrypcyjnej DNA kasety *axe-txe* Przeprowadziłam wielorundową reakcję transkrypcji *in vitro* z wykorzystaniem holoenzymu polimerazy RNA *E. coli* (σ^{70}). Jako matrycę do reakcji wykorzystałam DNA plazmidowy pochodnych wektora pTE103. **A** Reakcja przeprowadzona na matrycy DNA pTEaxetxeW5Cmut (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* pozbawioną promotorów p_{at} i p_{axe} , kodujący nietoksyczną wersję Txe) **B** pTEataxetxe (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* wraz z jej promotorami) **C** pTEataxetxemut (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* pozbawioną promotora p_{axe}) **D** pTEaxetxeW5C (plazmid zawierający kasetę *axe-txe* pozbawioną promotora p_{at} , kodujący nietoksyczną wersję Txe). Dokładny sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano w rozdziale 4.9. Na podstawie porównania migracji uzyskanego RNA w żelu poliakrylamidowym z markerem RNA (RiboRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific), określiłam długość transkryptów i przyporządkowałam je do badanych promotorów. Produkt transkrypcji *in vitro* przeprowadzonej na matrycy DNA plazmidowego pTEaxetxeW5Cmut wykorzystano do reakcji wydłużania startera, w celu określenia miejsca startu transkrypcji z potencjalnego promotora p_{txe} . Na rycinie umieszczono schematy ilustrujące organizację badanych fragmentów DNA. Kolorem różowym oznaczono gen kodujący antytoksynę, niebieskim – toksynę.

Figure 31. Transcription activity within the *axe-txe* operon Multi-round *in vitro* transcription experiments were performed using *E. coli* σ^{70} RNA polymerase holoenzyme and pTE103 derivatives template DNA: **A** pTEaxetxeW5Cmut (contains mutated version of the *axe-txe* operon without p_{at} and p_{axe} promoters and non-toxic version of the Txe) **B** pTEataxetxe (contains native version of the *axe-txe* operon) **C** pTEataxetxemut (contains mutated version of the *axe-txe* operon without the p_{axe}

promoter) **D** pTEaxetxeW5C (contains mutated version of the *axe-txe* without the *p_{at}* promoter and non-toxic version of the *Txe*). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.9. Transcript sizes were estimated according to an RNA ladder (RiboRuler Low Range RNA Ladder, Thermo Scientific) which was electrophoresed with the reactions and then excised and stained with ethidium bromide. The diagram presents a representative result of at least three independent experiments. Products of *in vitro* transcription from pTEaxetxeW5Cmut template was used to performe primer extension analysis from the *p_{txe}* promoter. Charts on the diagram indicates genetic organization of tested DNA fragments. Antitoxins genes are drawn in pink, toxins genes in blue, black arrows indicates promoters

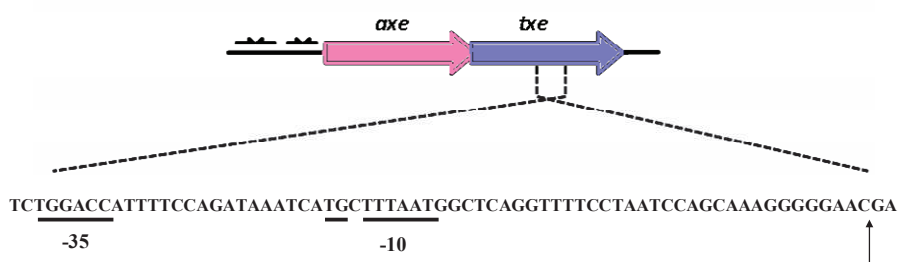


Rycina 32. Wynik badania miejsca startu transkrypcji zachodzącej z potencjalnego promotora p_{txe} uzyskany z wykorzystaniem techniki wydłużania startera Przeprowadziłam analizę typu „primer extension” z wykorzystaniem znakowanego radioaktywnie startera (tabela 6) na matrycy produktów reakcji transkrypcji *in vitro*. Reakcję sekwencjonowania DNA plazmidu pTEaxetxeW5Cmut metodą Sanger’a przeprowadziłam, wykorzystując ten sam starter. Produkt reakcji wydłużania startera oraz produkty reakcji sekwencjonowania DNA poddałam elektroforezie w 6% poliakrylamidowym żelu denaturującym. Sposób przeprowadzenia eksperymentu opisano szczegółowo w rozdziale 4.8. Produkt reakcji wydłużania startera oznaczono strzałką

Figure 32. Primer extension analysis of the putative p_{txe} promoter of the *axe-txe* module RNA product from *in vitro* transcription on pTEaxetxeW5Cmut DNA teplate was subjected to primer extension analysis using a radioactively labelled primer (table 6). Reactions were performed and analysed as outlined in chapter 4.8., and electrophoresed

on a denaturing 6% polyacrylamide gel in parallel with nucleotide sequencing reactions (A, C, G, T) carried out with the same primer according to Sanger method. The major product from the primer extension is marked with an arrow

Analiza sekwencji DNA kasety *axe-txe* wykazała obecność potencjalnej sekwencji promotorowej w stosunkowo dużej odległości od wyznaczonego miejsca startu transkrypcji (około 30 nukleotydów). Potencjalny promotor p_{txe} posiada rejon -10 o sekwencji zbliżonej do sekwencji *consensus* promotorów *Escherichia coli* (pięć z sześciu nukleotydów jest identycznych, jak w przypadku sekwencji *consensus*), poprzedzony elementem 5'-TG-3'. Rejon -35 promotora różni się od sekwencji *consensus* dwoma nukleotydami. Miejsca -35 i -10 promotora p_{txe} rozdzielone są sekwencją DNA o długości dwudziestu nukleotydów, przy czym sekwencja ta zawiera krótkie powtórzenia nukleotydów tymidynowych (rycina 33). Obecność pomiędzy rejonami -35 i -10, dłuższej niż w przypadku większości promotorów, sekwencji DNA zawierającej powtórzenia nukleotydów tymidynowych, jak również stosunkowo niski poziom zgodności sekwencji -35 z sekwencją *consensus*, są cechami charakterystycznymi promotorów o „wydłużonym” rejonie -10 [153]. Analiza sekwencji DNA znajdującej się poniżej miejsca startu transkrypcji z promotora p_{txe} nie wykazała obecności otwartych ramek odczytu, co skłania do przypuszczenia, że powstający w wyniku transkrypcji z tego promotora produkt stanowić może antysensowny, regulatorowy RNA.



Rycina 33. Schemat przedstawiający organizację rejonu potencjalnego promotora p_{txe} kasety *axe-txe*. Miejsce startu transkrypcji z promotora p_{txe} oznaczono pionową

strzałką. Zawierającą motyw 5'-TG-3', wydłużoną sekwencję -10 oraz sekwencję -35 podkreślono.

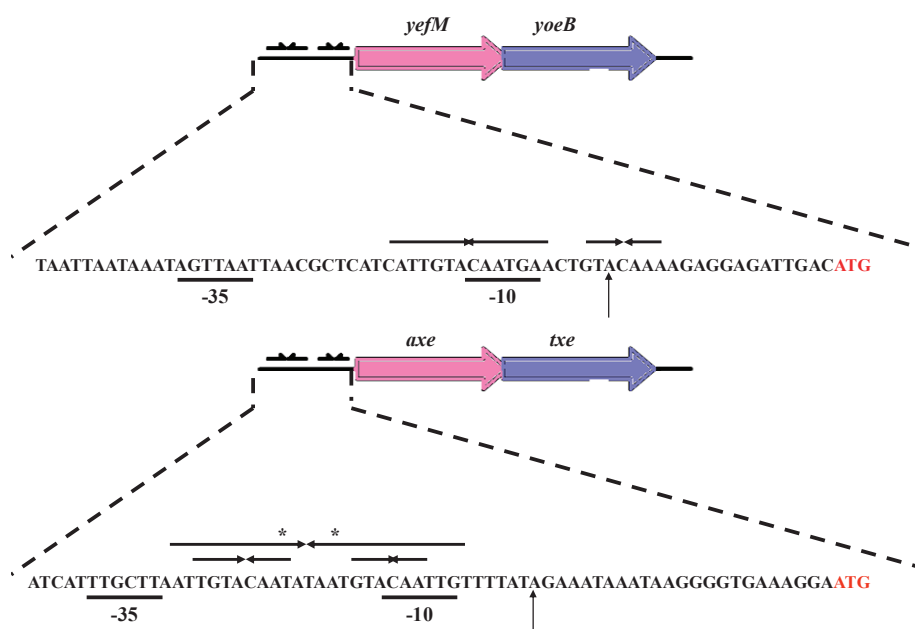
Figure 33. Organization of the putative promoter p_{txe} DNA region of the *axe-txe* TA module. Vertical arrow indicates start of transcription driven from the p_{txe} promoter. -35 and extended -10 sequences of the p_{txe} promoter are underlined.

Wyniki przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* badań wskazują na obecność terminatora transkrypcji w rejonie DNA poniżej końca 3' genu *txe*. Sekwencja, w obrębie której kodowany jest terminator, jest istotna dla utrzymania w komórce odpowiedniej proporcji ilości toksyny i antytoksyny.

W rejonie *txe* obecna jest sekwencja promotorowa p_{txe} , której aktywność potwierdzono w doświadczeniach *in vitro*. W tych warunkach, transkrypcja z promotoru p_{txe} zachodzi w kierunku przeciwnym niż transkrypcja z pozostałych promotorów kasety *axe-txe*, co pozwala przypuszczać, że powstający z p_{txe} produkt może mieć charakter antysensownego, regulatorowego RNA.

5.2. Interakcje pomiędzy elementami homologicznych systemów *axe-txe* i *yefM-yoeB*

Rejon operatorowy kasety toksyna-antytoksyna, *axe-txe*, jest zbudowany z sekwencji DNA o charakterze odwróconych palindromów, których rdzeń jest identyczny, jak rdzeń sekwencji rejonu operatorowego homologicznej kasety *yefM-yoeB*. Odległość pomiędzy odwróconymi powtórzeniami obecnymi w rejonach operatorowych obu kaset jest taka sama (trzyście nukleotydów) (rycina 34).



Rycina 34. Schemat przedstawiający porównanie organizacji rejonów promotor/operator p_{yy} i p_{at} kaset *yefM-yoeB* oraz *axe-txe*. Miejsca startu transkrypcji oznaczono pionowymi strzałkami. sekwencje -10 i -35 obu promotorów podkreślono. Kodony startkowe AUG antytoksyn zaznaczono czerwoną czcionką [17,98].

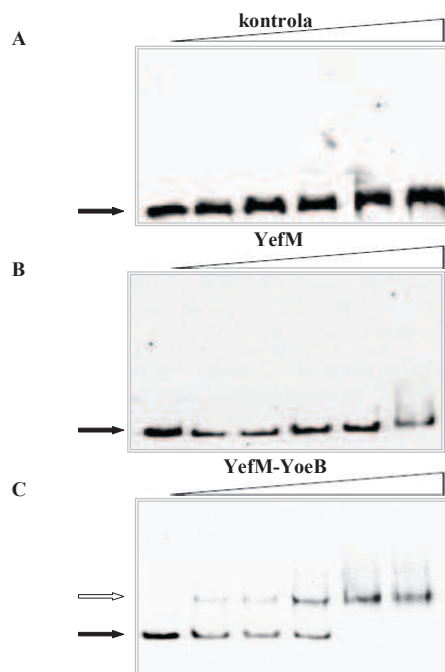
Figure 34. Comparison of organization of promoter/operator regions p_{yy} and p_{at} of *yefM-yoeB* and *axe-txe* TA modules. Vertical arrow indicates start of transcription driven from promoters p_{yy} and p_{at} . -35 and -10 sequences of p_{yy} and p_{at} promoters are underlined. Start codons of antitoxins are denoted in red [17,98].

Regulacja transkrypcji zachodzącej z promotora, znajdującego się powyżej końca 5' genu kodującego antytoksynę, w przypadku obu modułów wygląda podobnie. Związanie do DNA kompleksu toksyna-antytoksyna powoduje silną represję tego promotora, podczas gdy efekt związania do rejonu operatorowego samej antytoksyny jest znacznie słabszy. Pomimo wysokiego stopnia homologii sekwencji aminokwasowych białek obu systemów, kasety te charakteryzują się specyficzną interakcją pomiędzy toksyną i antytoksyną [73, 141]. Fakt ten nie wyklucza jednak możliwości wystąpienia innego rodzaju interakcji pomiędzy komponentami kaset *yefM-yoeB* i *axe-txe*. W dostępnej literaturze nie ma danych na temat wpływu białek obu systemów na regulację transkrypcji z promotora kasety homologicznej, jednak podobna budowa rejonów operatorowych obu modułów, zbliżony mechanizm regulacji głównych promotorów oraz wysoki stopień homologii, oddziałujących z DNA, domen N-terminalnych antytoksyn, skłaniają do przypuszczenia, że białka systemów *axe-*

txe i *yefM-yoeB* mogą wpływać na regulację ekspresji systemu homologicznego. Tego typu oddziaływanie mogłoby powodować np. zahamowanie ekspresji genów jednego z systemów, co przy braku komplementacji pomiędzy białkami kaset *axe-txe* i *yefM-yoeB* mogłoby prowadzić do aktywacji toksyny jednego z systemów. Wystąpienie takiego zjawiska mogłoby świadczyć m.in. o działaniu chromosomalnej kasety *yefM-yoeB* jako swoistego systemu anty-addykcyjnego.

5.2.1. Wpływ białek chromosomalnej kasety *yefM-yoeB* na ekspresję genów plazmidowego modułu *axe-txe*

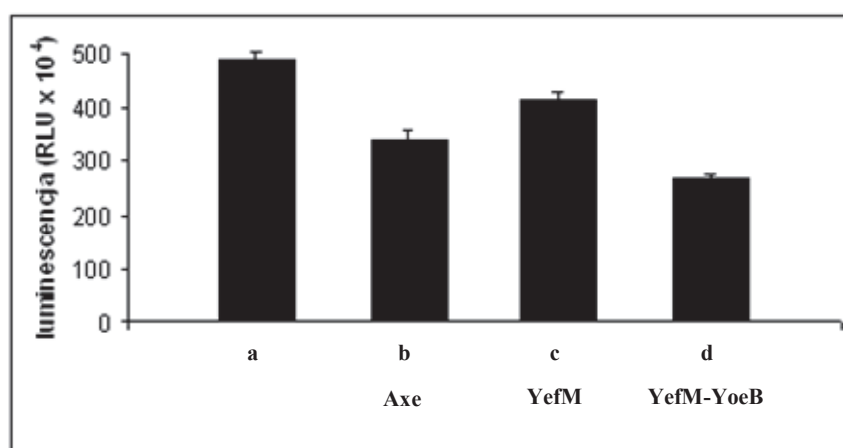
W celu określenia powinowactwa białek systemu *yefM-yoeB* do rejonu operatorowego promotora p_{at} kasety *axe-txe*, wykonałam test opóźnienia migracji w żelu znakowanego biotyną fragmentu DNA zawierającego rejon promotorowy p_{at} . DNA inkubowałam z różnymi stężeniami białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), niosących pochodne plazmidu pET22b zawierające geny: *yefM* lub *yefM-yoeB*, znajdujące się pod kontrolą promotora p_{T7} . Przygotowane próbki poddałam elektroforezie w 5% natywnym żelu poliakrylamidowym, a następnie uwidoczniałam interesujące mnie fragmenty DNA przy użyciu techniki opisanej w rozdziale 4.6. Obecność w ekstrakcie białkowym antytoksyny YefM powodowała stosunkowo niewielką zmianę mobilności elektroforetycznej badanego fragmentu DNA, przy czym uzyskany wynik świadczył o niskiej stabilności kompleksu DNA - białko (rycina 35 B). Natomiast w obecności obu białek systemu homologicznego, tempo migracji DNA zawierającego rejon operatorowy p_{at} zostało znacznie zmieniony, nawet przy zastosowaniu najniższych stężeń ekstraktu białkowego (rycina 35 C).



Rycina 35. Wiązanie białka YefM i kompleksu YefM-YoeB do rejonu operatorowego promotora p_{at} Znakowany biotyną fragment DNA długości 295 pz, zawierający rejon operatorowy kasyety *axe-txe*, poddano testowi EMSA z wykorzystaniem białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowano białka systemu *yefM-yoeB*. DNA inkubowano przez 20 minut, w temperaturze 22°C, z różnymi stężeniami ekstraktu: 0; 2,5; 5; 10; 12,5 i 25 µg/ml. Tak przygotowane próbki poddano elektroforezie w natywnym 5% żelu poliakrylamidowym. Dalszą część procedury opisano szczegółowo w rozdziale 4.6. **A** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych niosących kontrolny plazmid pET22b. **B** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących YefM. **C** Próbki inkubowane z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących kompleks YefM-YoeB. Czarnymi strzałkami zaznaczono DNA nie związane z białkiem, białymi – DNA, którego migracja w żelu została opóźniona wskutek związania białka

Figure 35. YefM and YefM-YoeB complex binding to the p_{at} promoter/operator region. 5' biotinylated DNA fragment of the p_{at} promoter-operator region was subjected to EMSA. The fragment was incubated with different concentrations of *E. coli* Rosetta(DE3) crude extracts: 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 and 25 µg/ml. Reactions were incubated for 20 min at 22°C, analyzed by native 5% PAGE, and processed further as outlined chapter 4.6. **A** no YefM or YoeB produced, **B** YefM overproduction, **C** YefM-YoeB overproduction. Filled and open arrows denote positions of unbound DNA and protein-DNA complexes, respectively

Określiłam także wpływ białek systemu *yefM-yoeB* na aktywność promotora *p_{at}* w warunkach *in vivo*, w szczepie *Escherichia coli* SC301467. W tym celu wykorzystałam wektor plazmidowy pluxat, w którym pod kontrolą promotora *p_{at}* znajdują się geny reporterowe *luxCDABE*. Białka kasety *yefM-yoeB* dostarczyłam *in trans*, wykorzystując pochodne plazmidu pBAD33, w których pod kontrolą promotora indukowanego arabinozą znajdują się odpowiednio geny: *yefM* lub *yefM-yoeB*. Bakterie hodowałam w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do momentu uzyskania wartości gęstości optycznej $OD_{600} \sim 0,4$, po czym wykonałam pomiar luminescencji hodowli. Nadprodukcja antytoksyny YefM nieznacznie obniżała poziom ekspresji genów reporterowych z promotora *p_{at}*, podczas gdy nadekspresja *yefM-yoeB* powodowała obniżenie poziomu luminescencji o około 60% (rycina 36).



Rycina 36. Porównanie wpływu białek systemu *yefM-yoeB* i antytoksyny Axe, kodowanych *in trans*, na aktywność promotora *p_{at}* Bakterie *Escherichia coli* SC301467, niosące plazmid pluxat oraz pochodne plazmidu pBAD33 hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do końcowego stężenia 0,2%, do momentu uzyskania $OD_{600} \sim 0,4$, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Rycina przedstawia wykres pomiaru luminescencji hodowli komórek, niosących następujące plazmidy: **a** pBAD33 (kontrola negatywna), **b** pBAD33axe (komórki, nadprodukujące białko Axe), **c** pBAD33yefM (komórki nadprodukujące białko YefM), **d** pBAD33yefMyoeB (komórki, nadprodukujące kompleks białek YefM-YoeB). Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej

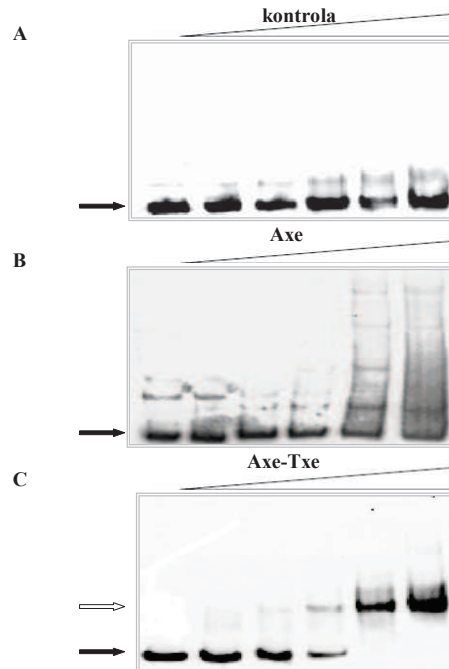
trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe.

Figure 36. Comparison of the influence of trans-encoded YefM-YoeB proteins overexpression and antitoxin Axe on transcriptional activity of the p_{at} promoter Plasmid *pluxat* and derivatives of *pBAD33* vector were introduced into *Escherichia coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium supplied with 0.2% arabinose at 37°C until culture reach OD600 ~0.4. Luminescence was measured in RLU. **a** *pBAD33* (negative control), **b** *pBAD33axe* (*Axe* overexpression), **c** *pBAD33yefM* (*YefM* overexpression), **d** *pBAD33yefMyoeB* (*YefM-YoeB* complex overexpression). The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an errorbar.

Kompleks YefM-YoeB wiąże się wydajnie *in vitro* do rejonu operatorowego promotora p_{at} , w sposób zbliżony do zaobserwowanego w przypadku białek Axe-Txe (rycina 35 C i rycina 18). Jednak badanie *in vivo* wpływu białek kasyety *yefM-yoeB* na aktywność tego promotora wskazuje, że poziom represji p_{at} będący wynikiem tego oddziaływania jest porównywalny z zaobserwowanym w obecności samej antytoksyny Axe (rycina 36).

5.2.2. Wpływ białek plazmidowej kasyety *axe-txe* na ekspresję genów chromosomalnego systemu *yefM-yoeB*

W celu określenia powinowactwa białek systemu *axe-txe* do rejonu operatorowego promotora p_{yy} kasyety *yefM-yoeB*, wykonałam test przesunięcia mobilności elektroforetycznej, znakowanego biotyną fragmentu DNA zawierającego rejon promotorowy p_{yy} . DNA inkubowałam z różnymi stężeniami białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), niosących pochodne plazmidu pET22b, zawierające znajdujące się pod kontrolą promotora p_{T7} geny: *axe* lub *axe-txe*. Przygotowane próbki poddałam elektroforezie w 5% natywnym żelu poliakrylamidowym, a następnie uwidoczniałam interesujące mnie fragmenty DNA przy użyciu techniki opisanej w rozdziale 4.6. Obecność w ekstrakcie białkowym antytoksyny Axe powodowała stosunkowo niewielką zmianę mobilności elektroforetycznej badanego fragmentu DNA, przy czym uzyskany wynik świadczył o niskiej stabilności kompleksu DNA-białko (rycina 37 B). Natomiast w obecności obu białek systemu homologicznego, szybkość migracji DNA zawierającego rejon operatorowy p_{yy} , została znacznie zmieniona (rycina 37 C), wskazując na efektywne formowanie kompleksu DNA-białko.

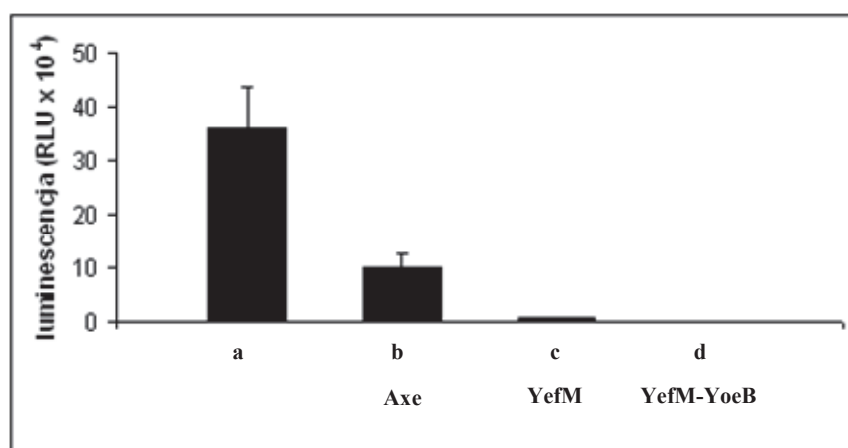


Rycina 37. Wiązanie białka Axe i kompleksu Axe-Txe do rejonu operatorowego promotora p_{yy} Znakowany biotyną fragment DNA, zawierający rejon operatorowy kasety *yefM-yoeB*, poddano testowi EMSA z wykorzystaniem białkowego ekstraktu z komórek *Escherichia coli* Rosetta(DE3), w których nadprodukowano białka systemu *axe-txe*. DNA inkubowano przez 20 minut, w temperaturze 22°C, z różnymi stężeniami ekstraktu: 0; 2,5; 5; 10; 12,5 i 25 $\mu\text{g/ml}$. Tak przygotowane próbki poddano elektroforezie w natywnym 5% żelu poliakrylamidowym. Dalszą część procedury opisano szczegółowo w rozdziale 4.6. **A** Próbkę inkubowaną z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych niosących kontrolny plazmid pET22b **B** Próbkę inkubowaną z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących Axe **C** Próbkę inkubowaną z białkowym ekstraktem z komórek bakteryjnych nadprodukujących kompleks Axe-Txe Czarnymi strzałkami zaznaczono DNA nie związane z białkiem, białymi – DNA, którego migracja w żelu została opóźniona wskutek związania białka.

Figure 37. Axe and Axe-Txe complex binding to the p_{yy} promoter/operator region. 5' biotinylated DNA fragment of the p_{yy} promoter-operator region was subjected to EMSA. The fragment was incubated with different concentrations of *E. coli* Rosetta(DE3) crude extracts: 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$. Reactions were incubated for 20 min at 22°C, analyzed by native 5% PAGE, and processed further as outlined in chapter 4.6. **A** no Axe or Txe produced, **B** Axe overproduction, **C** Axe-Txe complex overproduction. Filled and open arrows denote positions of unbound DNA and protein-DNA complexes, respectively

Zbadanie wpływu *in vivo* kompleksu Axe-Txe na aktywność promotora p_{yy} nie było możliwe ze względu na toksyczny efekt białka Txe. Próby konstrukcji plazmidów, w których geny *axe-txe* kodowane były z zachowaniem układu, w którym gen kodujący antytoksynę zachodzi na gen kodujący toksynę, oba zaś znajdują się pod kontrolą heterologicznego promotora, skutkowało pojawieniem się mutacji w rejonie klonowanego DNA. Modyfikacja *axe-txe*, polegająca na wprowadzeniu mutacji w rejonie promotora p_{axe} , powodowała znaczne zmniejszenie aktywności tego promotora, jednak w stopniu nie wystarczającym do całkowitego zahamowania produkcji dodatkowej puli toksyny. Natomiast zastosowanie do powyższego eksperymentu plazmidu, zawierającego kasetę *axe-txe* wraz z promotorem *pat*, niesło ryzyko uzyskania zafałszowanych wyników, ze względu na możliwość oddziaływania białek systemu *axe-txe* z własnym rejonem operatorowym.

Zdecydowałam zatem, że określę wpływ antytoksyny Axe na aktywność promotora p_{yy} w warunkach *in vivo*, w szczepie *Escherichia coli* SC301467. W tym celu wykorzystałam wektor plazmidowy *pluxat*, w którym pod kontrolą promotora p_{yy} znajdują się geny reporterowe *luxCDABE*. Antytoksynę Axe dostarczyłam *in trans*, wykorzystując plazmid *pBAD33axe*, w którym pod kontrolą promotora indukowanego arabinozą znajduje się gen *axe*. Bakterie hodowałam w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do momentu uzyskania wartości gęstości optycznej $OD_{600} \sim 0,4$, po czym wykonałam pomiar luminescencji hodowli. Nadprodukcja antytoksyny Axe powodowała obniżenie poziomu ekspresji genów reporterowych z promotora p_{yy} o około 60% (rycina 38).



Rycina 38. Porównanie wpływu antytoksyny systemu *axe-txe* i białek systemu *yefM-yoeB*, kodowanych *in trans*, na aktywność promotora p_{yy} Bakterie *Escherichia coli* SC301467, niosące plazmid *luxat* oraz pochodne plazmidu pBAD33 hodowałam z wytrząsaniem w temperaturze 37°C, w pożywce LB uzupełnionej arabinozą do końcowego stężenia 0,2%, do momentu uzyskania $OD_{600} \sim 0,4$, po czym przeprowadziłam pomiar luminescencji hodowli. Wyniki pomiaru luminescencji wyraziłam w RLU. Rycina przedstawia wykres pomiaru luminescencji hodowli komórek, niosących następujące plazmidy: **a** pBAD33 (kontrola negatywna), **b** pBAD33*axe* (komórki, nadprodukujące białko *Axe*), **c** pBAD33*yefM* (komórki nadprodukujące białko *YefM*), **d** pBAD33*yefMyoeB* (komórki, nadprodukujące kompleks białek *YefM-YoeB*). Przedstawione wyniki stanowią średnią z co najmniej trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów, słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe

Figure 38. Comparison of the influence of trans-encoded antitoxin of *axe-txe* system and proteins of *yefM-yoeB* system on transcriptional activity of the p_{yy} promoter Plasmid *luxat* and derivatives of pBAD33 vector were introduced into *Escherichia coli* SC301467. Bacteria were grown in LB medium supplied with 0.2% arabinose at 37°C until culture reach $OD_{600} \sim 0.4$. Luminescence was measured in RLU. **a** pBAD33 (negative control), **b** pBAD33*axe* (*Axe* overexpression), **c** pBAD33*yefM* (*YefM* overexpression), **d** pBAD33*yefMyoeB* (*YefM-YoeB* complex overexpression). The results are averages of at least three independent experiments. Standard deviation is denoted as an errorbar

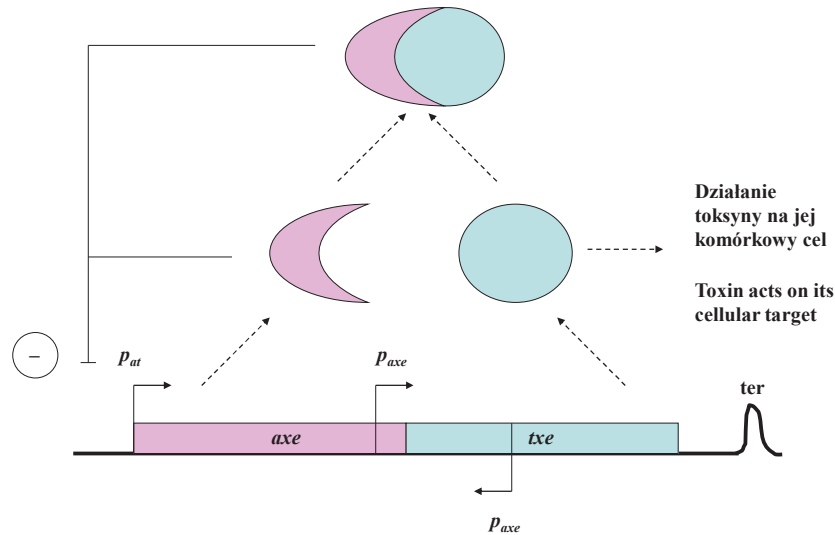
W warunkach *in vitro* antytoksyna Axe, podobnie jak YefM, charakteryzuje się stosunkowo słabym powinowactwem bądź wiąże się niestabilnie do rejonu operatorowego kasety homologicznej (ryciny 37 B i 35 B), natomiast kompleksy białek Axe-Txe i YefM-YoeB wiążą się wydajnie do sekwencji operatorowej spokrewnionego systemu (ryciny 37 C i 35 C). Pomimo podobnego sposobu oddziaływania z DNA, efekt *in vivo* wiązania białek obu systemów do sekwencji operatorowych kasety homologicznej znacznie się różni. W obecności Axe poziomu ekspresji genów z p_{yy} ulega znacznemu obniżeniu w porównaniu z efektem zaobserwowanym w przypadku oddziaływania YefM na promotor p_{at} . Wpływ kompleksu białek YefM-YoeB na aktywność promotora p_{at} jest porównywalny z efektem zaobserwowanym w przypadku oddziaływania Axe z promotorami obu systemów. Powyższe różnice mogą wynikać między innymi z rozbieżności w budowie rejonów operatorowych obu modułów.

6. DYSKUSJA

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są główną przyczyną infekcji ran pooperacyjnych i trzecią co do częstości przyczyną infekcji dróg moczowych u ludzi [145, 166]. Poważnym problemem w terapii tego typu zakażeń jest obserwowany w ostatnich latach wzrost liczby szczepów *Enterococcus* opornych na wiele grup antybiotyków, w tym antybiotyki glikopeptydowe (np. wankomycynę) [103]. Determinanty oporności na antybiotyki bakterii należących do tego rodzaju najczęściej kodowane są w DNA plazmidowym [193, 194] i mogą być przekazywane poprzez horyzontalny transfer genów do komórek bakterii innych gatunków, w tym do wysoce wirulentnych szczepów *Staphylococcus aureus* [49, 191].

Jednym z czynników zapewniających stabilne utrzymywanie plazmidowego DNA w populacji bakteryjnej są moduły toksyna-antytoksyna (TA), nazywane również systemami addykcyjnymi [48, 63, 83]. Kasety TA złożone są z pary genów, z których jeden koduje stabilną toksynę, a drugi – niwelującą jej działanie labilną antytoksynę. Wskutek podziału komórki macierzystej, komórki potomne wraz z cytoplazmą otrzymują komponenty systemu toksyna-antytoksyna. Komórki, które nie odziedziczyły kopii plazmidu niosącego kasetę TA, nie mają możliwości syntezy antytoksyny *de novo*, wobec czego dochodzi do akumulacji aktywnej toksyny i zahamowania podziałów lub śmierci komórki w wyniku jej działania. Udowodniono, że poza funkcją addykcyjną, moduły TA mogą odgrywać istotną rolę w powiązanych z problemem zakażeń szpitalnych procesach, takich jak formowanie biofilmu [94, 188], tworzenie komórek typu „*persister*” [42, 102, 105, 127] i kolonizacja tkanek gospodarza [127]. Systemy TA obecne są w większości plazmidów znajdujących się w komórkach *Enterococcus* [122, 146]. Przeprowadzona w 2006 roku analiza plazmidów wyizolowanych z wielolekoopornych szczepów *Enterococcus* wykazała obecność kasety toksyna – antytoksyna *axe-txe* w 75% izolatów, z czego ponad połowa była powiązana z opornością bakterii na wankomycynę [122]. Szczegółowe poznanie budowy i mechanizmu regulacji ekspresji operonu *axe-txe* mogłoby umożliwić praktyczne wykorzystanie tego modułu, w tym również opracowanie strategii antybakteryjnej, która mogłaby częściowo rozwiązać narastający problem antybiotykooporności bakterii.

System *axe-txe* posiada cechy charakterystyczne dla kaset TA typu II. Zarówno toksyna, jak i antytoksyna są niewielkimi białkami, koniec 3' genu kodującego antytoksynę zachodzi na koniec 5' genu kodującego toksynę [73], oba zaś ulegają kotranskrypcji [79]. Uzyskane przeze mnie dane wskazują jednak, że kasetta *axe-txe* charakteryzuje się unikatową budową operonu (rycina 39) i prawdopodobnie wielostopniową regulacją ekspresji genów.



Rycina 39. Schemat przedstawiający organizację kasety *axe-txe* Elementy powiązane z toksyną oznaczono niebieskimi symbolami, z antytoksyną – symbolami różowymi, czarnymi strzałkami oznaczono sekwencje promotorowe. Ośiem nukleotydów na koncu 3' *axe* zachodzi na koniec 5' *txe*. Promotor p_{at} podlega autoregulacji: antytoksyna oddziałuje z rejonem operatorowym DNA i powoduje represję promotora p_{at} , toksyna działa jako korepresor. W rejonie genu *axe* obecny jest promotor p_{axe} , transkrypcja z tego promotora skutkuje syntezą dodatkowej puli Txe. W rejonie genu *txe* obecny jest przypuszczalnie promotor p_{txe} . Transkrypcja z tego promotora prawdopodobnie zachodzi w kierunku odwrotnym względem p_{at} i p_{axe} . Oddziaływanie antytoksyny z toksyną niweluje toksyczny efekt, natomiast przy braku antytoksyny możliwe jest działanie toksyny na jej komórkowy cel.

Figure 39. Genetic organization of the *axe-txe* operon Toxin associated elements are drawn in blue, antitoxin – in pink, black arrow denote promoter. The 3' end of the antitoxin gene overlaps the 5' end of the toxin gene by eight nucleotides. The p_{at} promoter is autoregulated: Axe binds to DNA operator region and represses the p_{at} activity. Txe act as a co-repressor. The p_{axe} promoter is located within the *axe* gene. Transcription driven from the p_{axe} probably results in production of additional Txe proton. Putative p_{txe} promoter is localized within the *txe* gene. Orientation of the putative p_{txe} promoter is opposite to p_{at} and p_{axe} . Antitoxin interacts with toxin and neutralize its toxic effect.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że budowa modułu *axe-txe* różni się od kanonicznego modelu przyjętego dla kaset toksyna –

antytoksyna typu II obecnością trzech sekwencji promotorowych: p_{at} , p_{axe} oraz p_{txe} .

Promotor p_{at} znajduje się powyżej końca 5' axe . Zachodząca z p_{at} transkrypcja skutkuje powstaniem bicystronowego mRNA $axe-txe$. W rejonie promotorowym obecne jest miejsce operatorowe, zbudowane z sekwencji DNA, tworzących odwrócone palindromy. Wykazałam, że promotor p_{at} podlega autoregulacji: związanie antytoksyny Axe do rejonu operatorowego DNA powoduje częściową represję p_{at} , podczas gdy kompleks Axe-Txe silniej hamuje jego aktywność. Taki sposób regulacji ekspresji genów jest typowy dla kaset TA typu II. Testy opóźnienia migracji DNA w żelu (*electrophoretic mobility shift assay* – EMSA) wykazały, że antytoksyna Axe tworzy niestabilny kompleks z rejonem operatorowym p_{at} , jednak dopiero przy zastosowaniu wysokich stężeń ekstraktu białkowego. Natomiast obecność kompleksu Axe-Txe powoduje efekt opóźnienia migracji DNA już przy zastosowaniu stężenia ekstraktu 2,5 µg/ml. Zastosowanie do testu EMSA ekstraktu z komórek bakteryjnych nadprodukcujących badane białka, nie umożliwił precyzyjnego określenia ilości Axe i Axe-Txe użytych do eksperymentu. Wyniki badania poziomu nadprodukcji białek systemu $axe-txe$ w hodowlach bakteryjnych pokazują jednak, że nadekspresja axe skutkuje powstaniem znacznie większej ilości białka niż zaobserwowana w przypadku nadekspresji kompleksu toksyna-antytoksyna (rycina 17). Analiza elektroforetyczna frakcji rozpuszczalnej naprodukowanych białek wykazała, że pomimo denaturacji części naprodukowanej antytoksyny, ilość aktywnej formy Axe w ekstraktach komórkowych nadal przewyższała ilość aktywnego kompleksu Axe-Txe. Można zatem wnioskować, że do utworzenia kompleksu Axe-DNA *in vitro* konieczna jest obecność dużego nadmiaru antytoksyny, natomiast kompleks Axe-Txe wiąże się do operatora znacznie bardziej wydajnie niż białko Axe nie związane z toksyną.

Związanie Axe do rejonu operatorowego powoduje spadek aktywności transkrypcyjnej p_{at} o około 40%, natomiast w obecności kompleksu Axe-Txe zaobserwowałam zahamowanie aktywności tego promotora o około 95% (rycina 24). Powyższy rezultat uzyskano badając wpływ białek kasety $axe-txe$ na aktywność promotora p_{at} przy braku promotora p_{axe} . W obecności obu promotorów systemu $axe-txe$ poziom luminescencji był około dziesięciokrotnie wyższy (rycina 24). Rezultat ten może wynikać z bezpośredniego wpływu transkrypcji zachodzącej z promotora p_{axe} na aktywność promotora p_{at} bądź z różnic w powinowactwie kompleksu Axe-Txe do rejonu operatorowego p_{at} w obecności dodatkowej puli toksyny, powstającej w wyniku transkrypcji z p_{axe} . Mechanizm autoregulacji p_{at} jest zatem zbliżony do obserwowanego w przypadku większości kaset TA typu II, wydaje się jednak, że może być nieco bardziej skomplikowany. Promotor p_{at} charakteryzuje się bardzo wysoką aktywnością transkrypcyjną, około dwudziestokrotnie przewyższającą aktywność promotora, homologicznej do $axe-txe$, kasety $yefM-yoeB$. Zaobserwowałam, że w warunkach represji, aktywność promotora p_{at}

pozostaje nadal stosunkowo wysoka – jest porównywalna z podstawową aktywnością promotora kasety *yefM-yoeB*. Wydaje się zatem prawdopodobne, że ekspresja *axe-txe* może podlegać dodatkowej regulacji; być może poziom aktywności transkrypcyjnej promotora p_{at} zależy w pewnym stopniu od aktywności pozostałych promotorów kasety *axe-txe*.

Budowa niektórych modułów toksyna – antytoksyna typu II różni się od ogólnie przyjętego modelu organizacji kaset TA. Moduł *higBA* jest przykładem systemu TA typu II, którego organizacja różni się od modelu kanonicznego kolejnością, w jakiej ułożone są geny toksyny i antytoksyny w operonie oraz obecnością dwóch sekwencji promotorowych. Jeden z promotorów znajduje się w rejonie genu kodującego toksynę *higB* i kontroluje ekspresję antytoksyny *HigA*, drugi zaś obecny jest powyżej końca 5' *higB* i odpowiada za ekspresję *higA* i *higB* [22, 34]. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że budowa modułu *axe-txe* również odbiega od najczęściej występującego modelu organizacji kaset TA typu II. Wykazałam, że w rejonie genu kodującego antytoksynę obecna jest sekwencja promotorowa p_{axe} . W wyniku transkrypcji z p_{axe} powstaje RNA, w którym w odległości około 100 nukleotydów od końca 5' kodowana jest toksyna *txe*. Transkrypcja zachodząca z promotora p_{axe} skutkuje produkcją dodatkowej puli toksyny *Txe*. Ponadto zaobserwowałam, że w warunkach *in vitro* rejon genu *txe* również charakteryzuje się aktywnością transkrypcyjną. W obrębie genu kodującego toksynę zidentyfikowałam promotor p_{txe} . Transkrypcja rozpoczynająca się z tego promotora zachodzi w kierunku odwrotnym do transkrypcji rozpoczynającej się z pozostałych promotorów kasety *axe-txe* i skutkuje utworzeniem antysensownego RNA o długości około 300 nukleotydów. Kasetta *axe-txe* jest pierwszym opisanym systemem TA typu II charakteryzującym się taką budową operonu.

Promotor p_{axe} jest istotny dla działania kasety *axe-txe*, jako modułu stabilizującego DNA plazmidowy w komórkach *Escherichia coli* (wyniki eksperymentów wykonanych przez mgr Łukasza Labudda) [17]. Zmierzona *in vivo* aktywność p_{axe} jest około dwudziestokrotnie niższa niż aktywność promotora p_{at} , jednak porównywalna z aktywnością jedyne go promotora homologicznej kasety *yefM-yoeB*. Żadne z białek systemu *axe-txe*, bądź białek *Escherichia coli* obecnych w ekstrakcie komórkowym, nie wiąże się *in vitro* do rejonu DNA promotora p_{axe} (Rycina 23). Nie zaobserwowałam również wpływu białek kasety *axe-txe* na aktywność tego promotora *in vivo* (dane nie pokazane). Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że ekspresja z promotora p_{axe} skutkuje powstaniem dodatkowej puli toksyny, nie jest jednak pewne jaką rolę może pełnić dodatkowa porcja *Txe*. Zaobserwowano, że w wielu systemach TA typu II, zależnie od stechiometrycznego stosunku ilości cząsteczek antytoksyny do ilości cząsteczek toksyny, mogą tworzyć się kompleksy toksyna-antytoksyna o zróżnicowanym powinowactwie do rejonu operatorowego DNA, w różnym stopniu hamujące aktywność promotora. Zjawisko to, nazywane warunkową kooperatywnością

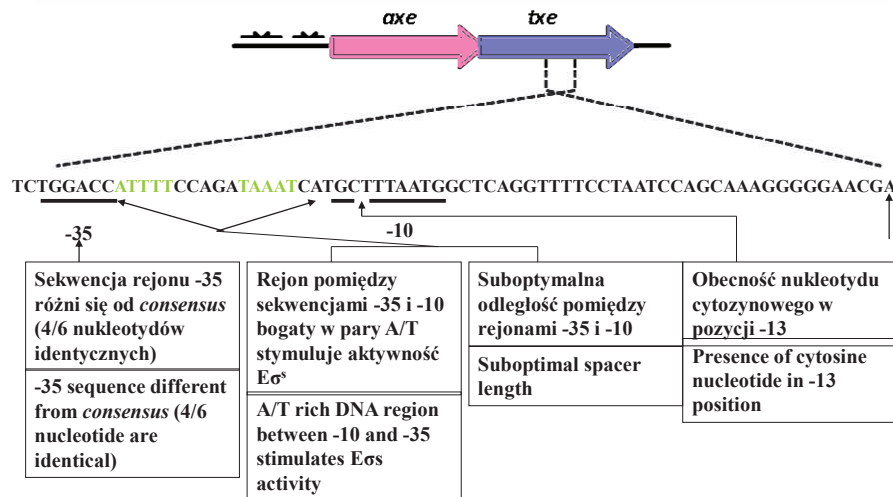
(*conditional cooperativity*), zapewnia ścisłą kontrolę ilości toksyny i antytoksyny w komórce oraz umożliwia subtelną regulację ekspresji genów operonu [25, 26, 57, 133, 193]. Istnieje możliwość, że mechanizm kontroli ekspresji *axe-txe* obejmuje również zjawisko „*conditional cooperativity*”, a dodatkowa porcja Txe może pełnić istotną rolę w regulacji aktywności promotora p_{at} .

Wiele systemów toksyna-antytoksyna charakteryzuje się skomplikowaną, wielostopniową regulacją ekspresji genów, obejmującą kontrolę na poziomie transkrypcji, translacji i stabilności mRNA. Uzyskane przeze mnie dane wskazują, że ekspresja operonu *axe-txe* może podlegać wielostopniowej regulacji. Próby sklonowania fragmentu *axe-txe* z zachowaniem natywnej sekwencji kasety, w taki sposób, aby geny badanego modułu znajdowały się pod kontrolą heterologicznego promotora, za każdym razem skutkowały pojawieniem się mutacji powodujących zmiany sekwencji aminokwasowej Txe. Zjawisko to związane jest z obecnością w rejonie *axe* promotora p_{axe} , kontrolującego ekspresję toksyny. Modyfikacja *axe-txe*, polegająca na wprowadzeniu mutacji w rejonie p_{axe} , przy jednoczesnym zachowaniu niezmięnionej sekwencji aminokwasowej antytoksyny, powodowała znaczne zmniejszenie aktywności tego promotora, jednak nie umożliwiała sklonowania DNA *axe-txe* z zachowaniem natywnej sekwencji tej kasety, co wskazywało na zaburzenie proporcji ilości białek Axe i Txe w komórce (dane nie pokazane). Być może efekt ten związany jest z obecnością powstającego w wyniku transkrypcji z p_{txe} antysensownego RNA, który mógłby wpływać na poziom translacji białek systemu *axe-txe*. Skonstruowanie plazmidu, na którym geny *axe-txe* znajdowały się pod kontrolą promotora heterologicznego, możliwe było pod warunkiem, że klonowany fragment DNA zawierał także rejon promotora p_{at} . Fenomen ten może potwierdzać istnienie dodatkowego mechanizmu regulacji ekspresji genów kasety *axe-txe*.

Zaobserwowano, że niektóre systemy TA typu I charakteryzują się dodatkowymi mechanizmami regulacji ekspresji toksyny, najczęściej związanymi z dynamiką struktury drugorzędowej i modyfikacjami potranskrypcyjnymi mRNA. Być może mechanizm regulacji ekspresji *txe* w pewnym stopniu przypomina mechanizm regulacji translacji toksyny systemu TA typu I *tisB-istR1*. Gen toksyny TisB poprzedzony jest nie ulegającą translacji sekwencją *tisA*; w wyniku kotranskrypcji tych sekwencji powstaje długi mRNA, tworzący liczne struktury drugorzędowe, między innymi w rejonie sekwencji wiążącej rybosom (*ribosome binding site* – RBS). Translacja *tisB* możliwa jest dopiero po zajściu modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA, polegającej na odcięciu rybonukleotydów od końca 5'. Rybosom wiąże się wtedy niespecyficznym do znajdującego się powyżej RBS nieustrukturyzowanego miejsca „*stanby site*”, co ułatwia jego późniejsze związanie w rejonie RBS. Dodatkowo antysensowny RNA IstR1 może hybrydyzować z rejonem 5'-UTR mRNA toksyny, a utworzony w ten sposób dupleks RNA trawiony jest

przez RNazę III, wskutek czego powstaje krótki, nieaktywny translacyjnie transkrypt *tisB* [37, 185]. Wydaje się, że stunuklotydowy odcinek obecny w RNA, utworzonym w wyniku transkrypcji z p_{axe} , znajdujący się powyżej *txe* może pełnić funkcję regulatorową. Analiza sekwencji nukleotydowej znajdującej się powyżej końca 5' *txe* wykazała obecność rejonu zbliżonego do sekwencji *consensus* miejsca wiązania rybosomu w odległości około 50 nukleotydów powyżej kodonu startowego *txe*. Podobnie jak w przypadku systemu *tisB-istR1*, regulacja ekspresji *txe* mogłaby zachodzić m.in. na etapie translacji. Mechanizm regulacji translacji *txe* może być związany z modyfikacją potranskrypcyjną mRNA powstającego z promotora p_{axe} , hybrydyzacją mRNA z antysensownym RNA powstającym w wyniku transkrypcji z promotora p_{txe} bądź kombinacją obu tych czynników.

W trakcie wykonywania pracy badawczej zaobserwowałam, że sekwencja promotora p_{txe} w warunkach *in vitro* jest rozpoznawana przez holoenzym polimerazy RNA, zawierający podjednostkę σ^{70} ($E\sigma^{70}$). Budowa promotora p_{txe} wskazuje jednak, że prawdopodobnie stanowi on część regulonu $E\sigma^S$ - holoenzymu odpowiedzialnego za ekspresję genów istotnych m.in. w odpowiedzi komórek bakteryjnych na stres środowiskowy. W zależności od budowy promotora, działania różnorodnych białkowych czynników transkrypcyjnych oraz kombinacji obu tych elementów, poszczególne sekwencje promotorowe w komórkach *Escherichia coli* mogą być rozpoznawane preferencyjnie przez holoenzym $E\sigma^S$ lub $E\sigma^{70}$. Rejon -35 promotora p_{txe} znajduje się w odległości 20 nukleotydów od rejonu -10, a jego sekwencja DNA różni się od sekwencji *consensus* (4/6 nukleotydów identycznych). Podjednostka σ^S polimerazy RNA wydajniej niż σ^{70} oddziałuje z promotorami charakteryzującymi się odległą od *consensus* sekwencją rejonu -35 i suboptymalną długością fragmentu DNA obecnego pomiędzy miejscami -10 i -35 [47, 111, 112, 179]. Najczęściej spotykaną i jedną z najbardziej istotnych cech promotorów zależnych od $E\sigma^S$ jest obecność cytozyny w pozycji -13 promotora [56, 111, 112, 153, 190], jest to również charakterystyczna cecha promotora p_{txe} (rycina 40).



Rycina 40. Schemat przedstawiający organizację rejonu promotora p_{txe} kasety *axe-txe* Miejsce startu transkrypcji z promotora p_{txe} oznaczono pionową strzałką. Zawierającą motyw 5' –TG – 3', wydłużoną sekwencję -10 oraz sekwencję -35 podkreślono. Na rycinie zaznaczono cechy p_{txe} charakterystyczne dla promotorów rozpoznawanych przez holoenzym Eσ^S [178, 179]

Figure 40. Organization of the putative promoter p_{txe} DNA region of the *axe-txe* TA module. Vertical arrow indicates start of transcription driven from the p_{txe} promoter. -35 and extended -10 sequences of the p_{txe} promoter are underlined. Features specific for the Eσ^S regulon are denoted on the diagram [178, 179]

Regulacja ekspresji niektórych operonów TA powiązana jest z odpowiedzią SOS komórek bakteryjnych. Przykładem mogą być tutaj systemy TA typu I, *symER* i *tisB-istRI*. Białko LexA jest represorem transkrypcji genów kodujących toksyny tych systemów. Różnorodne warunki stresowe mogą powodować zahamowanie replikacji oraz powstawanie i kumulację uszkodzeń DNA. W wyniku tego procesu, dochodzi do zależnej od RecA autolizy LexA i uwolnienia tego białka z kompleksu z DNA, a w konsekwencji – do indukcji ekspresji genów m.in. toksyn SymE i TisB [43, 95]. Ze względu na charakterystyczną budowę promotora p_{txe} , można przypuszczać, że regulacja ekspresji operonu *axe-txe* może ulegać modulacji w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska, jednak zagadnienie to wymaga jeszcze dalszych badań.

Dane, które uzyskałam w trakcie realizacji pracy badawczej wskazują, że sekwencja terminatorowa obecna w rejonie DNA poniżej końca 3' genu *txe*

jest istotna dla utrzymania w komórce odpowiedniej proporcji ilości toksyny i antytoksyny. Zaobserwowałam, że tempo wzrostu hodowli bakterii niosących kasetę *axe-txe* pozbawioną sekwencji terminatorowej jest znacznie wolniejsze niż tempo wzrostu komórek niosących natywną wersję kasety. Fenomen ten może być wynikiem zjawiska zbliżonego do obserwowanego w przypadku systemu *hok-sok*, należącego do typu I kaset TA. Moduł *hok-sok* złożony jest z trzech elementów: białkowej toksyny Hok, regulatorowego peptydu Mok oraz stanowiącej antysensowny RNA, antytoksyny Sok. W wyniku transkrypcji genów, kodujących Mok i Hok, powstaje bicistronowy, stabilny mRNA, którego końce 5' i 3' ulegają hybrydyzacji. Kotranslacja Mok i Hok możliwa jest dopiero po zajęciu modyfikacji potranskrypcyjnej mRNA, polegającej na degradacji końca 3' przez RNazę II – enzym wiążący się m.in. do niektórych struktur obecnych na końcach 3' RNA [77, 138]. Tego typu modyfikacja umożliwia jednocześnie hybrydyzację Sok z mRNA *mok-hok*, a powstały w ten sposób dupleks RNA ulega degradacji przez RNazę III, co ogranicza ilość produkowanej toksyny [95, 96, 97]. Jedną z zależności, która mogłaby wyjaśniać zaobserwowany przeze mnie wpływ obecności sekwencji terminatorowej *axe-txe* na działanie tego modułu, jest możliwość wzmacniania przez strukturę RNA obecną w tym rejonie sekwencji (rycina 29) degradacji mRNA od końca 3', co mogłoby obniżać stabilność transkryptu *txe*, a w konsekwencji ograniczać skalę syntezy toksyny w komórce. Wydaje się jednak równie prawdopodobne, że regulacja ekspresji toksyny może być związana z mechanizmem przypominającym w pewnym stopniu regulację translacji *hok*.

Regulacja ekspresji genów kaset TA za pośrednictwem antysensownego RNA jest cechą charakterystyczną systemów TA typu I, natomiast zjawisko represji transkrypcji, w wyniku oddziaływania białkowej antytoksyny lub kompleksu toksyna – antytoksyna z DNA, jest najczęściej występującym mechanizmem autoregulacji kaset TA typu II. Obecność i budowa promotorów p_{txe} i p_{axe} w rejonie kasety *axe-txe* oraz autoregulacja promotora p_{at} , mogą świadczyć o istnieniu skomplikowanego, wielostopniowego mechanizmu regulacji ekspresji tego operonu. Podstawą mechanizmu regulacji ekspresji *axe-txe* mogą być jednocześnie dwa rodzaje zależności: charakterystyczne dla kaset TA typu II oraz obserwowane w przypadku systemów TA typu I. Określenie dokładnego mechanizmu regulacji aktywności promotorów p_{txe} i p_{axe} oraz ekspresji *txe* wymaga jednak dalszych badań, w tym określenia mechanizmu działania systemu *axe-txe* w komórkach bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Badania takie są planowane jako kontynuacja prac opisanych w tej rozprawie.

Uważa się, że główną funkcją plazmidowych modułów TA jest zapewnienie stabilnego utrzymywania plazmidów w populacji komórek bakteryjnych. System *axe-txe* funkcjonuje jako moduł addykcyjny w komórkach bakterii należących do odległych ewolucyjnie gatunków (*Enterococcus faecium*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*) [73]. Złożona budowa operonu *axe-txe* oraz prawdopodobnie wielostopniowa regulacja ekspresji jego genów mogą skłaniać

do przypuszczenia, że moduł ten może posiadać także inną biologiczną rolę. Białka systemu *axe-txe* i chromosomalnej kasety *Escherichia coli*, *yefM-yoeB*, charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Co więcej, mechanizm działania toksyn kaset *axe-txe* i *yefM-yoeB* również jest zbliżony. Zarówno YoeB, jak i Txe jest endorybonukleazą która trawi mRNA w miejscu znajdującym się w odległości trzech nukleotydów poniżej kodonu startowego AUG, wskutek czego dochodzi do zahamowania biosyntezy białek w komórce [79,198]. Wykazałam, że pomimo specyficzności oddziaływań pomiędzy toksynami i antytoksynami tych modułów, kompleksy białek Axe-Txe i YefM-YoeB wiążą się wydajnie do sekwencji operatorowej spokrewnionego systemu i mogą w różny sposób wpływać na aktywność homologicznego promotora. W obecności Axe poziom ekspresji genów z p_{yy} ulega znacznemu obniżeniu w porównaniu z efektem zaobserwowanym w przypadku oddziaływania YefM na promotor p_{at} . Wpływ kompleksu białek YefM-YoeB na aktywność promotora p_{at} jest porównywalny z efektem zaobserwowanym w przypadku oddziaływania Axe z promotorami obu systemów. Powyższe różnice mogą wynikać między innymi z rozbieżności w budowie rejonów operatorowych obu modułów, jednak zaobserwowane zależności potwierdzają możliwość pośrednich interakcji pomiędzy spokrewnionymi systemami kodowanymi w DNA chromosomalnym i plazmidowym, które polegałyby na modulacji poziomu ekspresji genów spokrewnionych kaset przez białka systemu homologicznego.

Wyniki przeprowadzonych w ostatnich latach badań wskazują, że obecność modułu *yefM-yoeB* w genomie bakterii *Escherichia coli* CFT073, zwiększa konkurencyjność tego patogennego szczepu podczas kolonizacji pęcherza moczowego [127]. Prawdopodobnie kasety *yefM-yoeB* jest również zaangażowana w proces tworzenia biofilmu i powstawania komórek typu „*persister*” [99, 101, 105, 165]. Odkryty w chromosomalnym DNA *Escherichia coli* moduł *yefM-yoeB* występuje również w DNA chromosomalnym bakterii z rodzaju *Staphylococcus* [41, 126]. Komórki *Enterococcus*, zawierające plazmidy, w których obecna jest kasety *axe-txe*, mogą przekazywać je na drodze horyzontalnego transferu genów m.in. do komórek *Staphylococcus sp.* [49, 191]. Wydaje się zatem prawdopodobne, że kasety *axe-txe* mogłyby wpływać na fizjologię komórek bakteryjnych, w tym na procesy takie jak patogeniza lub formowanie biofilmu, bezpośrednio bądź poprzez interakcje z chromosomalnymi kasetami TA.

7. WNIOSKI

Głównym celem mojej pracy było zbadanie mechanizmu regulacji ekspresji genów kasyety toksyna-antytoksyna typu II, *axe-txe*, pochodzącej z patogennej bakterii *Enterococcus faecium*. Dane uzyskane w eksperymentach opisanych w niniejszej pracy pozwoliły na określenie, w jaki sposób zbudowany jest operon *axe-txe*, jaka jest rola białek Axe i Txe w regulacji tego operonu oraz w jakim stopniu białka spokrewnionych systemów *yefM-yoeB* oraz *axe-txe* mogą wpływać na regulację ekspresji genów systemu homologicznego. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań sugerują, że budowa oraz mechanizm regulacji ekspresji genów operonu *axe-txe* różni się od kanonicznego modelu przyjętego dla systemów TA typu II.

Wykazałam, że geny kodujące antytoksynę i toksynę znajdują się pod kontrolą, cechującego się wysoką aktywnością transkrypcyjną, promotora p_{at} . W obrębie genu kodującego antytoksynę obecny jest dodatkowy promotor p_{axe} , którego aktywność zmierzona *in vivo* jest około dwudziestokrotnie niższa niż aktywność promotora p_{at} , jednak porównywalna z aktywnością jedyne go promotora homologicznej kasyety *yefM-yoeB*. Transkrypcja zachodząca z promotora p_{axe} skutkuje prawdopodobnie produkcją dodatkowej puli toksyny Txe. W obrębie genu kodującego toksynę obecna jest sekwencja promotorowa p_{txe} , której aktywność potwierdziłam w doświadczeniach *in vitro*. W tych warunkach, transkrypcja z promotora p_{txe} zachodzi w kierunku przeciwnym niż transkrypcja z pozostałych promotorów kasyety *axe-txe*, co pozwala przypuszczać, że powstający z p_{txe} produkt może mieć charakter antysensownego, regulatorowego RNA. Wyniki przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* badań wskazują na obecność terminatora transkrypcji w rejonie DNA poniżej końca 3' genu *txe*. Sekwencja, w obrębie której kodowany jest terminator, jest istotna dla utrzymania w komórce odpowiedniej proporcji ilości toksyny i antytoksyny.

Potwierdziłam, że operon *axe-txe* podlega autoregulacji, w której antytoksyna pełni rolę stosunkowo słabego represora transkrypcji zachodzącej z promotora p_{at} , zaś kompleks toksyna-antytoksyna wiąże się efektywnie do rejonu operatorowego *axe-txe*, powodując wydajną represję promotora p_{at} .

Wyniki przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* badań wskazują, że białka spokrewnionych systemów *axe-txe* i *yefM-yoeB* mogą wpływać na ekspresję genów homologicznego systemu toksyna-antytoksyna, co może mieć istotne znaczenie w procesach patogenezy lub formowania biofilmu.

8. PIŚMIENICTWO

1. Ahidjo B. A., Kuhnert D., McKenzie J. L., Machowski E. E., Gordhan B. G., Arcus V., Abrahams G. L., Mizrahi V.: VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. *PLoS One* 2011, 6, e21738.
2. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G.: An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1996,93,12, 6059-6063.
3. Amitai S., Yassin Y., Engelberg-Kulka H.: MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 24, 8295-8300.
4. Anantharaman V., Aravind L.: New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol.* 2003, 4, 12, R81.
5. Arbing M. A., Handelman S. K., Kuzin A. P., Verdon G., Wang C., Su M., Rothenbacher F. P., Abashidze M., Liu M., Hurley J. M., Xiao R., Acton T., Inouye M., Montelione G. T., Woychik N. A., Hunt J. F.: Crystal structures of Phd-Doc, HigA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure* 2010, 18, 8, 996-1010.
6. Arias C.A., Murray B.E.: The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, 10, 4, 266–278.
7. Bahassi E. M., O'Dea M. H., Allali N., Messens J., Gellert M., Couturier M.: Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J. Bio. Chem.* 274 1999, 274, 16, 10936-10944.
8. Barraud N., Storey M. V., Moore Z. P., Webb J. S., Rice S. A., Kjelleberg, S.: Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.* 2009, 2, 3, 370-378.
9. Barreto A., Guimaraes B., Radhouani H., Araujo C., Goncalves A., Gaspar E., Rodrigues J., Igrejas G., Poeta P: Detection of antibiotic resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp. in stool of healthy growing children in Portugal. *J. Basic Microbiol.* 2009, 49, 6, 503–512
10. Barrios, A. F.; Zuo, R.; Ren, D.; Wood, T. K. (2006) "Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility." *Biotechnol. Bioeng.* 93(1): 188-200.
11. Bearman G. M. L., Wenzel R. P.: Bacteraemias: a leading cause of death. *Arch. Med. Res.* 2005, 36,6, 646–659.
12. Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Krzeminski M., Balestrino D., Haagensen J. A., Molin S., Prensier G., Arbeille B., Ghigo J. M.: Global

- impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 2004, 51, 3, 659-674.
13. Billstrom H., Lund B., Sullivan A., Nord C. E.: Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008, 32, 5, 374–377.
 14. Blower T. R., Fineran P. C., Johnson M. J., Toth I. K., Humphreys D. P., Salmond G. P.: Mutagenesis and functional characterization of the RNA and protein components of the *toxIN* abortive infection and toxin-antitoxin locus of *Erwinia*. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 19, 6029-6039.
 15. Blower T. R., Short F. L., Rao F., Mizuguchi K., Pei X. Y., Fineran P. C., Luisi B. F., Salmond G. P.: Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 13, 6158-6173.
 16. Borgmann S., Niklas D. M., Klare I., Zabel L. T., Buchenau P., Autenrieth I. B., Heeg P.: Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2004, 207, 4, 386–389.
 17. Boss L., Labudda L., Węgrzyn G., Hayes F., Kedzierska B.: The *axe-txe* complex of *Enterococcus faecium* presents a multilayered mode of toxin-antitoxin gene expression regulation. *PLoS One* 2013, 8, 9, e73569.
 18. Brantl S.: Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol.* 2012, 9, 12, 1488-1490.
 19. Brown D. F. J., Brown N. M., Cookson B. D., Duckworth G., Farrington M., French G. L., King L., Lewis D., Livermore D. M.: National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health – August 2004. *J. Hosp. Infect.* 2006, 62, 1–27.
 20. Brown B. L., Grigoriu S., Kim Y., Arruda J. M., Davenport, A., Wood, T. K., Peti, W., Page, R.: 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 Pathog.* 2009, 5, 12, e1000706.
 21. Brown B. L., Wood T. K., Peti W., Page, R.: Structure of the *Escherichia coli* antitoxin MqsA (YgiT/b3021) bound to its gene promoter reveals extensive domain rearrangements and the specificity of transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 3, 2285-2296.
 22. Budde P. P., Davis B. M., Yuan J., Waldor, M. K.: Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 2, 491-500.
 23. Bukowski M., Łyżen R., Helbin W.M., Bonar E., Szalewska-Palasz A., Węgrzyn G., Dubin G., Dubin A., Władyka B.: A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system PemIKSa. *Nat. Commun.* 2013, 4, 2012.
 24. Cartman S.T., J.T. Heap, S.A. Kuehne: The emergence of 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010, 300, 387-395

25. Cataudella I., Sneppen K., Gerdes K., Mitarai N.: Conditional cooperativity of toxin - antitoxin regulation can mediate bistability between growth and dormancy. *PLoS Comput. Biol.* 2013, 9, 8, e1003174.
26. Cataudella I., Trusina A., Sneppen K., Gerdes K., Mitarai, N.: Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 14, 6424-6434.
27. Charpentier E., Courvalin P.: Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 2103-2108.
28. Chenoweth C., Schaberg D.: The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990, 9, 80-89
29. Chow J. W., Thai L. A., Peri M. B., Vazquez J. A., Donabedian S. M., Clewell D. B., Zervos M. Z.: Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 37, 2474-2477.
30. Christensen S. K., Maenhaut-Michel G., Mine N., Gottesman S., Gerdes K., Van Melderen L.: Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol. Microbiol.* 2004, 51, 6, 1705-1717.
31. Christensen S. K., Mikkelsen M., Pedersen K., Gerdes, K.: RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2001, 98, 25, 14328-14333.
32. Christensen S. K., Pedersen K., Hansen F. G., Gerdes, K.: Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J. Mol. Biol.* 2003, 332, 4, 809-819.
33. Christensen-Dalsgaard M., Gerdes K.: Two higBA loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol. Microbiol.* 2006, 62, 2, 397-411.
34. Christensen-Dalsgaard M., Jorgensen M. G., Gerdes K.: Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* 2010, 75, 2, 333-348.
35. Ciftci A., Findik A., Ica T., Bas B., Onuk E. E., Gungordu S.: Slime production and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from arthritis in chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 2009, 71, 849-853
36. Cooper T. F., Heinemann J. A.: Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000, 97, 23, 12643-12648.
37. Darfeuille F., Unoson C., Vogel J., Wagner E. G.: An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol. Cell* 2007, 26, 3, 381-392.
38. de la Hoz A. B., Ayora S., Sitkiewicz I., Fernandez S., Pankiewicz R., Alonso J. C., Ceglowski P.: Plasmid copy-number control and better-than-

- random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000, 97, 2, 728-733.
39. de Kraker M.E., Jarlier V., Monen J.C., Heuer O.E., van de Sande N.: The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013, 19, 860–868.
 40. Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T. K.: Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* 2007, 9, 2, 332-346.
 41. Donegan N. P., Cheung A. L.: Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on *sigB* expression. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 8, 2795-2805.
 42. Dorr T., Vulic M., Lewis K.: Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 2010, 8, 2, e1000317.
 43. Durand S., Jahn N., Condon C., Brantl S.: Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol.* 2012, 9, 12, 1491-1497.
 44. Eaton T. J., Gasson M. J.: A variant enterococcal surface protein *Espfm* in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 216, 269–275.
 45. Elliott T., Geiduschek E. P.: Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a "-35" region. *Cell* 1984, 36, 1, 211-219.
 46. Engelberg-Kulka H., Glaser G.: Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53, 43-70.
 47. Espinosa-Urgel M., Chamizo C., Tormo A.: A consensus structure for sigma S-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 1996, 21, 3, 657-659.
 48. Faridani O. R., Nikraves A., Pandey D. P., Gerdes K., Good, L.: Competitive inhibition of natural antisense *Sok*-RNA interactions activates *Hok*-mediated cell killing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 20, 5915-5922.
 49. Ferber D.: Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science* 2003, 301, 5636, 1027.
 50. Fineran P. C., Blower T. R., Foulds I. J., Humphreys D. P., Lilley K. S., Salmond G. P.: The phage abortive infection system, *ToxIN*, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2009, 106, 3, 894-899.
 51. Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* *Microbiol.* 2009, 155, 1749-1757.
 52. Foulquie Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E.; De Vuyst L.: The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 106, 1-24
 53. Fozo E. M., Makarova K. S., Shabalina S. A., Yutin N., Koonin E. V., Storz G.: Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for

- new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 11, 3743-3759.
54. Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Stiles M. E.: Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 47, 1-24.
 55. Fu Z., Donegan N. P., Memmi G., Cheung A. L.: Characterization of MazFSa, an endoribonuclease from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 8871–8879.
 56. Gaal T., Ross W., Estrem S. T., Nguyen L. H., Burgess R. R., Gourse R. L.: Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 2001, 42, 4, 939-954.
 57. Garcia-Pino A., Balasubramanian S., Wyns L., Gazit E., Greve H.D., Magnuson R., Charlier D., van Nuland N., Loris R.: Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell* 2010, 142, 101–111
 58. Garcia-Pino A., Christensen-Dalsgaard M., Wyns L., Yarmolinsky M., Magnuson R. D., Gerdes K., Loris R.: Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 45, 30821-30827.
 59. Gerdes K.: Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3, 561-572.
 60. Gerdes K., Christensen S. K., Lobner-Olesen A.: Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 5, 371-382.
 61. Gerdes K., Helin K., Christensen O. W., Lobner-Olesen A.: Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. *J. Mol. Biol.* 1988, 203, 1, 119-129.
 62. Gerdes K., Larsen J. E., Molin S.: Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J. Bacteriol.* 1985, 161, 1, 292-298.
 63. Gerdes K., Rasmussen P. B., Molin S.: Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1986, 83, 10, 3116-3120.
 64. Gerdes K., Thisted T., Martinussen J.: Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: sok antisense RNA regulates formation of a hok mRNA species correlated with killing of plasmid-free cells. *Mol. Microbiol.* 1990, 4, 11, 1807-1818.
 65. Gerdes K., Wagner EGH.: RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, 10, 117-24.
 66. Gilmore M.: *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance.* Washington, DC: American Society for Microbiology. 2002
 67. Gilmore M. S., Segarra R. A., Booth M. C., Bogie C. P., Hall L. R., Clewell D. B.: Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded

- cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 1994, 176, 7335–7344.
68. Giraffa, G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26, 163–171.
 69. Glasspool R. M., Teodoridis J. M., Brown R.: Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Br. J. Cancer* 2006, 94, 8, 1087–1092.
 70. Gonzalez Barrios A. F., Zuo R., Hashimoto Y., Yang L., Bentley W. E., Wood T. K.: Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J. Bacteriol.* 2006, 188, 1, 305–316.
 71. Gotfredsen M., Gerdes K.: The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* 1998, 29, 4, 1065–1076.
 72. Goulard C., Langrand S., Carniel E., Chauvaux S.: The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins. *J. Bacteriol.* 2010, 192, 3669–3677.
 73. Grady R., Hayes F.: Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 5, 1419–1432.
 74. Guglielmini J., Van Melderen L.: Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere. *Mob. Genet. Elements* 2011, 1, 4, 283–290.
 75. Guimaraes B., Barreto A., Radhouani H., Figueiredo N., Gaspar E., Rodrigues J., Torres C., Igrejas G., Poeta P.: Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates and vancomycin-resistant enterococci in fecal samples of healthy children. *Microb. Drug. Resist.* 2009, 15, 211–216
 76. Guzman L. M., Belin D., Carson M. J., Beckwith J.: Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 14, 4121–4130.
 77. Hajnsdorf E., Steier O., Coscoy L., Teyssset L., Regnier P.: Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the rpsO transcripts of *Escherichia coli*: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp mb* mutant. *EMBO J.* 1994, 13, 14, 3368–3377.
 78. Hallgren A., Claesson C., Saedi B., Monstein H. J., Hanberger H., Nilsson L. E.: Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of clinical origin. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008, 299, 323–332.
 79. Halvorsen E. M., Williams J. J., Bhimani A. J., Billings E. A., Hergenrother P. J.: Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe-Txe toxin-antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis. *Microbiology* 2011, 157, 2, 387–397.

80. Han K. D., Matsuura A., Ahn H. C., Kwon A. R., Min Y. H., Park H. J., Won H. S., Park S. J., Kim D. Y., Lee B. J.: Functional identification of toxin-antitoxin molecules from *Helicobacter pylori* 26695 and structural elucidation of the molecular interactions. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 4842–4853.
81. Hanahan D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983, 166, 4, 557-580.
82. Harley C. B., Reynolds, R. P.: Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 5, 2343-2361.
83. Hayes F.: Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 2003, 301, 5639, 1496-1499.
84. Hayes F., Kedzierska B.: Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins (Basel)* 2014, 6, 1, 337-358.
85. Hayes F., Van Melderen L.: Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2011, 46, 5, 386-408.
86. Hazan R., Engelberg-Kulka H.: *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol. Genet. Genomics* 2004, 272, 2, 227-234.
87. Hazan R., Sat B., Engelberg-Kulka H.: *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 11, 3663-3669.
88. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M.: NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2008, 29, 996–1011
89. Hurley J. M., Cruz J. W., Ouyang M., Woychik N. A.: Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions in vivo. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 17, 14770-14778.
90. Jaffe A., Ogura T., Hiraga S.: Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *J. Bacteriol.* 1985, 163, 3, 841-849.
91. Jensen R. B., Gerdes K.: Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 1995, 17, 2, 205-210.
92. Kaern M., Elston T. C., Blake W. J., Collins J. J.: Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat. Rev. Genet.* 2005, 6, 6, 451-464.
93. Kamada K., Hanaoka F.: Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol. Cell* 2005, 19, 4, 497-509
94. Kasari V., Kurg K., Margus T., Tenson T., Kaldalu N.: The *Escherichia coli* *mqsR* and *ygiT* genes encode a new toxin-antitoxin pair. *J. Bacteriol.* 2010, 192, 11, 2908-2919.

95. Kawano M.: Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: hok/sok, ldr/rdl, symE/symR. *RNA Biol.* 2012, 9, 12, 1520-1527.
96. Kawano M., Aravind L., Storz G.: An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol. Microbiol.* 2007, 64, 3, 738-754.
97. Kawano M., Oshima T., Kasai H., Mori H.: Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2002, 45, 333-49;
98. Kedzierska B., Lian L. Y., Hayes F.: Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 1, 325-339.
99. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis, K.: Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 24, 8172-8180.
100. Khoo S. K., Loll B., Chan W. T., Shoeman R. L., Ngoo L., Yeo C. C., Meinhart A.: Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 27, 19606-19618.
101. Kim Y., Wang X., Ma Q., Zhang X. S., Wood T. K.: Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 4, 1258-1267.
102. Kim Y., Wood T. K.: Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 391, 1, 209-213.
103. Koch S., Hufnagel M., Huebner J.: Treatment and prevention of enterococcal infections--alternative and experimental approaches. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004, 4, 9, 1519-1531.
104. Koga M., Otsuka Y., Lemire S., Yonesaki T.: *Escherichia coli* rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics* 2011, 187, 1, 123-130.
105. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., Collins J. J.: A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 2007, 130, 5, 797-810.
106. Kolodkin-Gal I., Verdiger R., Shlosberg-Fedida A., Engelberg-Kulka H.: A differential effect of *E. coli* toxin-antitoxin systems on cell death in liquid media and biofilm formation. *PLoS One* 2009, 4, 8, e6785.
107. Kopfmann S., Hess W. R.: Toxin-antitoxin systems on the large defense plasmid pSYSA of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 10, 7399-7409.

108. Kreft B., Marre R., Schramm U., Wirth R.: Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 1992, 60, 25–30.
109. Kurenbach B. C., Bohn J. P.: Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid* 2003, 50, 86-93
110. Leavis H.L., Willems R.J., van Wamel W.J.: Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.* 2007, 3, e7.
111. Lee S. J., Gralla J. D.: Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 32, 30064-30071.
112. Lee S. J., Gralla J. D.: Open complex formation in vitro by sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase: roles for region 2 amino acids. *J. Mol. Biol.* 2003, 329, 5, 941-948.
113. Lemos J. A., Brown T. A. Jr., Abranches J., Burne, R. A.: Characteristics of *Streptococcus mutans* strains lacking the MazEF and RelBE toxin-antitoxin modules. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 253, 2, 251-257.
114. Lenski R.E., Simpson S. C., Nguyen T. T.: Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J. Bacteriol.* 1994, 176, 3140-3147.
115. Leplae R., Geeraerts D., Hallez R., Guglielmini J., Dreze P., Van Melderen L.: Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 13, 5513-5525.
116. Lewis K.: Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008, 322, 107-131.
117. Lyzen R., Kochanowska M., Wegrzyn G., Szalewska-Palasz A.: Transcription from bacteriophage lambda pR promoter is regulated independently and antagonistically by DksA and ppGpp. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 20, 6655-6664.
118. Masuda H., Tan Q., Awano N., Wu K. P., Inouye M.: YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2012, 84, 5, 979-989.
119. Masuda H., Tan Q., Awano N., Yamaguchi Y., Inouye M.: A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012, 328, 2, 174-181.
120. Meighen EA: Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *FASEB J.* 1993, 7, 1016–1022.
121. Mohamed J. A., Huang D. B.: Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56, 1581–1588.

122. Moritz E. M., Hergenrother P. J.: Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2007, 104, 1, 311-316.
123. Nariya H., Inouye M.: MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* 2008, 132, 1, 55-66.
124. Nieto C., Cherny I., Khoo S. K., de Lacoba M. G., Chan W. T., Yeo C. C., Gazit E., Espinosa M.: The *yefM-yoeB* toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 4, 1266-1278.
125. Noble W.C., Rahman M., Karadec T.: Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. *Vet. Microbiol.* 1996, 52, 143-52
126. Nolle N., Schuster C. F., Bertram R.: Two paralogous *yefM-yoeB* loci from *Staphylococcus equorum* encode functional toxin-antitoxin systems. *Microbiology* 2013, 159, 8, 1575-1585.
127. Norton J. P., Mulvey M. A.: Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 2012, 8, 10, e1002954.
128. Novais C., Coque T.M., Sousa J.C., Peixe L.V.: Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12, 1131-1134
129. Novais C., Freitas A.R., Sousa J.C., Baquero F., Coque T.M., Peixe L.V.: Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 1001-1008
130. Oberer M., Zangger K., Gruber K., Keller W.: The solution structure of ParD, the antidote of the ParDE toxin antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. *Protein Sci.* 2007, 16, 8, 1676-1688.
131. Ogura T., Hiraga S.: Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1983, 80, 15, 4784-4788.
132. Otsuka Y., Koga M., Iwamoto A., Yonesaki T.: A role of RnlA in the RNase LS activity from *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* 2007, 82, 4, 291-299.
133. Overgaard M., Borch J., Jorgensen M. G., Gerdes K.: Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* 2008, 69, 4, 841-857.
134. Pandey D. P., Gerdes K.: Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 3, 966-976.
135. Pecota D. C., Wood T. K.: Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 7, 2044-2050.

136. Pedersen K., Christensen S. K., Gerdes K.: Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 2002, 45, 2, 501-510.
137. Pedersen K., Zavialov A. V., Pavlov M. Y., Elf J., Gerdes K., Ehrenberg M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* 2003, 112, 1, 131-140.
138. Pepe C. M., Maslesa-Galic S., Simons R. W.: Decay of the IS10 antisense RNA by 3' exoribonucleases: evidence that RNase II stabilizes RNA-OUT against PNPase attack. *Mol. Microbiol.* 1994, 13, 6, 1133-1142.
139. Poeta P., Costa D., Rodrigues J., Torres C.: Study of faecal colonization by vanA-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 55, 278-280
140. Poeta P., Costa D., Rodrigues J., Torres C.: Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J. Antimicrob. Agents* 2006, 27, 131-137
141. Połom D., Boss L., Węgrzyn G., Hayes F., Kędzierska B.: Amino acid residues crucial for specificity of toxin-antitoxin interactions in the homologous Axe-Txe and YefM-YoeB complexes *FEBS J.* 2013, 22, 5906-5918.
142. Ramage H. R., Connolly L. E., Cox J. S.: Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* 2009, 5, 12, e1000767.
143. Ren D., Bedzyk L. A., Thomas S. M., Ye R. W., Wood T. K.: Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64, 4, 515-524.
144. Rice L. B., Carias L. L., Donskey C. L., Rudin S. D.: Transferable, plasmid-mediated vanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 4, 963-964
145. Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H., Gaynes R. P.: Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2000, 21, 8, 510-515.
146. Rosvoll T. C., Pedersen T., Sletvold H., Johnsen P. J., Sollid J. E., Simonsen G. S., Jensen L. B., Nielsen K. M., Sundsfjord A.: PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010, 58, 2, 254-268.
147. Rothenbacher F. P., Suzuki M., Hurley J. M., Montville T. J., Kirn T. J., Ouyang M., Woychik N. A.: *Clostridium difficile* MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage. *J. Bacteriol.* 2012, 194, 3464-3474.

148. Rowe-Magnus D. A., Guerout A. M., Biskri L., Bouige P., Mazel D.: Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res.* 2003, 13, 3, 428-442.
149. Saavedra De Bast M., Mine N., Van Melderen L.: Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 13, 4603-4609.
150. Salmon M. A., Van Melderen L., Bernard P., Couturier M.: The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol. Gen. Genet.* 1994, 244, 5, 530-538.
151. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. ISBN: 0-87969-309-6
152. Sambrook J., Russell DW.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. ISBN:0-87969-577-3
153. Sanderson A., Mitchell J. E., Minchin S. D., Busby S. J.: Substitutions in the Escherichia coli RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett.* 2003, 544, 1-3, 199-205.
154. Sanger F., Coulson A. R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975, 94, 3, 441-448.
155. Santos-Sierra S., Giraldo R., Diaz-Orejas R.: Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 152, 1, 51-56.
156. Santos-Sierra S., Giraldo R., Diaz Orejas R.: Functional interactions between chpB and parD, two homologous conditional killer systems found in the Escherichia coli chromosome and in plasmid R1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 168, 1, 51-58.
157. Sartingen S., Rozdzinski E., Muscholl-Silberhorn A., Marre R.: Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of Enterococcus faecalis through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 2000, 68, 6044-6047.
158. Savage D. C.: Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 1977, 31, 107-133
159. Sberro H., Leavitt A., Kiro R., Koh E., Peleg Y., Qimron U., Sorek R.: Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Mol. Cell* 2013, 50, 1, 136-148.
160. Schembri M. A., Kjaergaard K., Klemm P.: Global gene expression in Escherichia coli biofilms. *Mol. Microbiol.* 2003, 48, 1, 253-267.
161. Schmidt O., Schuenemann V. J., Hand N. J., Silhavy T. J., Martin J., Lupas A. N., Djuranovic S.: prfF and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 2007, 372, 4, 894-905.

162. Schuster C. F., Park J. H., Prax M., Herbig A., Nieselt K., Rosenstein R., Inouye M., Bertram R.: Characterization of a mazEF toxin-antitoxin homologue from *Staphylococcus equorum*. *J. Bacteriol.* 2013, 195, 1, 115-125.
163. Sedgley C.M., Lee E.H., Martin M.J.: Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth ex vivo. *J. Endod.* 2008, 34, 570-4.
164. Sevillano L., Diaz M., Yamaguchi Y., Inouye M., Santamaria R. I.: Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. *PLoS One* 2012, 7, 3, e32977.
165. Shah D., Zhang Z., Khodursky A., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K.: Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2006, 6, 53.
166. Shepard B. D., Gilmore M. S.: Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 2002, 4, 2, 215-224.
167. Short F. L., Pei X. Y., Blower T. R., Ong S. L., Fineran P. C., Luisi B. F., Salmond G. P.: Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2013, 110, 3, E241-249.
168. Smith A. S., Rawlings D. E.: Autoregulation of the pTF-FC2 proteic poison-antidote plasmid addiction system (pas) is essential for plasmid stabilization. *J. Bacteriol.* 1998, 180, 20, 5463-5465.
169. Soo V. W., Cheng H. Y., Kwan B. W., Wood T. K.: de novo synthesis of a bacterial toxin/antitoxin system. *Sci. Rep.* 2014, 4, 4807.
170. Soo V. W., Wood T. K.: Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Sci. Rep.* 2013, 3, 3186.
171. Syed M. A., Koyanagi S., Sharma E., Jobin M. C., Yakunin A. F., Lévesque C.: The chromosomal mazEF locus of *Streptococcus mutans* encodes a functional type II toxin-antitoxin addiction system. *J. Bacteriol.* 2011, 193, 1122–1130.
172. Szekeres S., Dauti M., Wilde C., Mazel D., Rowe-Magnus D. A.: Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Mol. Microbiol.* 2007, 63, 6, 1588-1605.
173. Tan Q., Awano N., Inouye M.: YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbiol.* 2011, 79, 1, 109-118.
174. Thomas C.M.: Evolution and population genetics of bacterial plasmids, in *Plasmid Biology* B.E. Funnell and G.J. Philips, Editors ASM Press: Washington DC. 2004, 509-528

175. Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Mine N., Van Melderen L.: What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J. Bacteriol.* 2007, 189, 17, 6101-6108.
176. Tsou A. M., Cai T., Liu Z., Zhu J., Kulkarni R. V.: Regulatory targets of quorum sensing in *Vibrio cholerae*: evidence for two distinct HapR-binding motifs. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 8, 2747-2756.
177. Tsuchimoto S., Nishimura Y., Ohtsubo E.: The stable maintenance system pem of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J. Bacteriol.* 1992, 174, 13, 4205-4211.
178. Typas A., Becker G., Hengge R.: The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 2007, 63, 5, 1296-1306.
179. Typas A., Hengge R.: Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigmaS promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2006, 59, 3, 1037-1051.
180. Unoson C., Wagner E. G.: A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2008, 70, 1, 258-270.
181. Unterholzner S. J., Poppenberger, B., Rozhon W.: Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mob. Genet. Elements* 2013, 3, 5, e26219.
182. Van Melderen L., Bernard P., Couturier M.: Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol. Microbiol.* 1994, 11, 6, 1151-1157.
183. Van Melderen L., Saavedra De Bast M.: Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 2009, 5, 3, e1000437.
184. Vankerkhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D., Goossens H.: Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4473-4479
185. Vogel J., Argaman L., Wagner E. G., Altuvia S.: The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr. Biol.* 2004, 14, 24, 2271-2276.
186. Wang X., Lord D. M., Cheng H. Y., Osbourne D. O., Hong S. H., Sanchez-Torres V., Quiroga C., Zheng K., Herrmann T., Peti W., Benedik M. J., Page R., Wood T. K.: A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8, 10, 855-861.
187. Wang X., Lord D. M., Hong S. H., Peti W., Benedik M. J., Page R., Wood T. K.: Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environ. Microbiol.* 2013, 15, 6, 1734-1744.

188. Wang X., Wood T. K.: Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 16, 5577-5583.
189. Weaver K.E.: The par toxin-antitoxin system from *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 and its chromosomal homologs. *RNA Biology* 2012, 9, 12, 1498–1503
190. Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V. F., Hengge R.: Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 5, 1591-1603.
191. Weigel L. M., Clewell D. B., Gill S. R., Clark N. C., McDougal L. K., Flannagan S. E., Kolonay J. F., Shetty J., Killgore G. E., Tenover F. C.: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003, 302, 5650, 1569-1571.
192. Wilbaux M., Mine N., Guerout A. M., Mazel D., Van Melderen L.: Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 7, 2712-2719.
193. Winther K. S., Gerdes K.: Regulation of enteric vapBC transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 10, 4347-4357.
194. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M., Seifert H., Wenzel R. P., Edmond M. B.: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39, 3, 309-317.
195. Yamaguchi Y., Park J. H., Inouye M.: MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 42, 28746-28753.
196. Yamamoto S., Kiyokawa K., Tanaka K., Moriguchi K., Suzuki K.: Novel toxin-antitoxin system composed of serine protease and AAA-ATPase homologues determines the high level of stability and incompatibility of the tumor-inducing plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 14, 4656-4666.
197. Yarmolinsky M. B.: Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 1995, 267, 5199, 836-837.
198. Zhang Y., Inouye M.: The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 11, 6627-6638.
199. Zhu L., Inoue K., Yoshizumi S., Kobayashi H., Zhang Y., Ouyang M., Kato F., Sugai M., Inouye M.: *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 3248–3255

200. Zhu L., Phadtare S., Nariya H., Ouyang M., Husson R. N., Inouye M.: The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from *Mycobacterium tuberculosis* target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol. Microbiol.* 2008, 69, 3, 559–569

9. STRESZCZENIE

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są jedną z głównych przyczyn infekcji ran pooperacyjnych i trzecią co do częstości przyczyną infekcji dróg moczowych u ludzi. Poważnym problemem w terapii tego typu zakażeń jest obserwowany w ostatnich latach wzrost liczby szczepów *Enterococcus* opornych na wiele grup antybiotyków, w tym antybiotyki glikopeptydowe (np. wankomycynę). Determinanty oporności na antybiotyki bakterii należących do tego rodzaju najczęściej zakodowane są w DNA plazmidowym i mogą być przekazywane poprzez horyzontalny transfer genów do komórek bakterii innych gatunków, w tym do wysoce wirulentnych szczepów *Staphylococcus aureus*. Jednym z czynników zapewniających stabilne utrzymywanie plazmidowego DNA w populacji bakteryjnej są moduły toksyna – antytoksyna (TA), nazywane również systemami addykcyjnymi. Systemy toksyna – antytoksyna zbudowane są najczęściej z pary genów, z których jeden koduje stabilną toksynę, a drugi – niwelującą jej działanie labilną antytoksynę. Wskutek podziału komórki macierzystej, komórki potomne wraz z cytoplazmą otrzymują komponenty systemu toksyna – antytoksyna. Komórki, które nie odziedziczyły kopii plazmidu niosącego kasetę TA, nie mają możliwości syntezy antytoksyny *de novo*, wobec czego dochodzi do akumulacji aktywnej toksyny i zahamowania podziałów lub śmierci komórki w wyniku jej działania. Dotychczas scharakteryzowano pięć typów kaset TA, różniących się molekularną naturą antytoksyn oraz mechanizmem regulacji ekspresji genów.

Moduł toksyna – antytoksyna *axe-txe* został odkryty w 2003 roku w DNA, niosącego szereg determinant antybiotykooporności, plazmidu pRUM, wyizolowanego z patogennego szczepu bakterii *Enterococcus faecium* U37. Późniejsze badania wykazały, że jest kodowany w plazmidowym DNA wielu lekoopornych, patogennych szczepów *Enterococcus sp.* Szczegółowe poznanie budowy i mechanizmu regulacji ekspresji operonu *axe-txe* mogłoby umożliwić praktyczne wykorzystanie tego modułu, w tym również opracowanie strategii antybakteryjnej, która mogłaby częściowo rozwiązać narastający problem antybiotykooporności bakterii. Dotychczas jednak wiedza na temat regulacji ekspresji genów tego modułu była bardzo ograniczona.

Dane uzyskane w eksperymentach opisanych w tej pracy jednoznacznie wskazują, że moduł *axe-txe* charakteryzuje się unikatową budową operonu oraz może podlegać skomplikowanej wielostopniowej regulacji ekspresji genów, obejmującej kontrolę na etapie transkrypcji i translacji. Mechanizm kontroli ekspresji genów *axe-txe* stanowić może połączenie dwóch poznanych wcześniej sposobów regulacji charakterystycznych dla systemów TA typu II i typu I. Co więcej, wyniki moich badań wskazują, że ekspresja genów *axe-txe* prawdopodobnie może zmieniać się w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska. Ponadto wraz z danymi literaturowymi sugerują, że kasetę *axe-txe* mogłaby wpływać na fizjologię komórek bakteryjnych, w tym na procesy

takie jak patogenezę lub formowanie biofilmu, bezpośrednio bądź poprzez interakcje z chromosomalnymi kasetami TA.

10. SUMMARY

Mechanism of gene expression regulation of the Axe-Txe toxin-antitoxin complex of a pathogenic bacterium *Enterococcus faecium*

Enterococci are among the most important nosocomial opportunistic pathogens. Bacteria of *Enterococcus* species are the main cause of surgical wounds' infections and the third cause of urinary tract infections. Antibiotic resistance of *Enterococcus* sp. has been of growing concern for a number of years. For instance, the risk of death from glycopeptide-resistant enterococci is much higher, achieving even 75%, compared with 45% for those infected with a susceptible strain. Enterococcal antibiotic resistance genes are often encoded in a plasmid DNA and may be transferred horizontally to other species of clinically important bacteria, including highly virulent strains of *Staphylococcus aureus*.

Plasmids generally impose a fitness cost to the host bacterium. One of the effective ways to promote plasmid maintenance in a non-selective environment are toxin – antitoxin (TA) systems. TA systems are usually composed of two genes controlled by a single promoter. One of TA system genes encodes a stable toxin protein and the other one – a labile antitoxin, which neutralizes the effect of the toxin. TA cassettes are also called addictive systems, due to the fact that the inability of antitoxin de novo synthesis in daughter cells, which did not inherit a plasmid copy, results in toxin activation and cell death. TA cassettes are classified into five types on the basis of molecular nature of antitoxins and different mechanisms of gene expression regulation.

The axe-txe module was first discovered in 2003 in a multidrug resistant plasmid pRUM of pathogenic strain *Enterococcus faecium* U37. A large body of evidence suggests that the axe-txe cassette is associated with many multidrug resistant plasmids of other pathogenic *Enterococcus* strains. As axe-txe appears to be widespread in multidrug resistant enterococci, including vancomycin resistant ones, the induction of toxin Txe activity could be an effective antibacterial strategy. Development of such a strategy requires, among other factors, a knowledge of the precise mechanism of axe-txe gene expression regulation.

Data presented in this dissertation suggests that the axe-txe TA system represents a novel model of gene expression regulation and operon composition. Interestingly, the data implies that the regulation of axe-txe gene expression is probably multilayered and exerted at both transcription and translation stage. The results presented in this study also indicate that the axe-txe operon shares features of two types of TA modules: type II and type I. On the basis of the data presented in this work and available literature, I also propose that the plasmid encoded axe-txe system may affect bacterial physiology, pathogenesis and biofilm formation directly or indirectly through influence gene expression of chromosomal toxin-antitoxin systems.