



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudi Comparatiu de Sistemes Toxina-Antitoxina

Laura Maria Porcel Serra

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43231060F

Treball tutelat per Antoni Bennasar Figueras
Departament de Microbiologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Sistemes Toxina-Antitoxina (TA), toxina, antitoxina, plasmidi, cromosoma, bacteri, arqueobacteri, aplicacions biotecnològiques, aplicacions clíniques, aplicacions ambientals.

Introducció

Els sistemes Toxina-Antitoxina (TA) es defineixen com a petits mòduls genètics que es componen de dos elements bàsics: una toxina, que a tots els sistemes TA que es coneixen fins al moment és una proteïna, i una antitoxina, que pot ser tant una proteïna com un RNA de petit tamany (sRNA).¹ Generalment, les toxines són més estables que les antitoxines, però aquestes darreres s'expressen amb major proporció per tal de dur a terme la seva funció primària: inhibir l'acció de la toxina, ja sigui de forma directa com a inhibidor per si mateix, o bé controlant la producció de la toxina.² En diferents condicions d'estrès cel·lular, la antitoxina pot ser degradada per proteòlisi o veure alterada la seva transcripció, el que implícitament disminueix els seus nivells. Això permet que la toxina pugui actuar de forma lliure damunt la seva diana.³

El primer sistema TA que es va descriure va ser el sistema *CcdA/CcdB* localitzat al plasmidi F d'*E. coli*, implicat en mantenir el creixement de les poblacions bacterianes assegurant-se d'eliminar aquelles cèl·lules que, després de la divisió cel·lular, no han incorporat el plasmidi. Posteriorment, es va comprovar que els sistemes TA també es troben als cromosomes de bacteris i arqueobacteris de forma abundant.^{1,3} Aquest fet canvia el marc de funcionalitat d'aquests sistemes TA, que no sols es limitaran a l'addició plasmídica.³

Entre les diferents funcions associades als sistemes TA localitzats a cromosomes en podem destacar aquelles relacionades amb l'adaptació cel·lular, tals com resistència o virulència, o la protecció davant invasions plasmídiques. De fet, s'ha observat una relació directa entre el nombre de regions TA presents al genoma i la virulència d'aquella bacteri. Ara bé, també es creu que els sistemes TA podrien estar implicats en fenòmens de mort programada en resposta a diferents tipus d'estrès, com per exemple el tractament amb antibiòtics. L'evidència més acceptada però, es basa en que els sistemes TA actuen com un mecanisme de control que afavoreix i millora la supervivència en condicions d'estrès nutricional regulant el creixement i la formació de biofilms^{2,4}.

Aquests sistemes TA poden classificar-se en cinc tipus (I-V), en funció de la seva estructura genètica i el seu mecanisme d'acció. Mentre que totes les toxines són proteïnes, només els tipus II, IV i V estan formats per antitoxines proteiques; als tipus I i III l'antitoxina és un sRNA^{1,5}. A cada un d'aquests cinc tipus, les interaccions toxina-antitoxina que s'estableixen són diferents i deriven, per tant, en un diferent mecanisme d'acció⁵. En el cas dels sistemes TA de tipus I, l'antitoxina és un sRNA antisentit que s'uneix a l'RNA missatger (mRNA) de la toxina, evitant així la seva traducció i propiciant la seva degradació. Per la seva banda, als de tipus II, on ambdós components són proteïnes, l'antitoxina aconsegueix neutralitzar l'efecte de la toxina formant un complex proteïna-proteïna estable. Les antitoxines dels sistemes tipus III són sRNA amb múltiples repeticions que són reconegudes per la toxina i en suposen un lloc d'unió. A aquests tres primeres sistemes, l'objectiu final és la degradació del complex toxina-antitoxina que es forma. Finalment, els tipus IV i V són els més desconeguts fins al moment, ja que només se'n coneix un exemple de cada un d'ells. L'antitoxina del tipus IV, CbeA, funciona com un competidor de la seva toxina, promovent la polimerització de les dianes de la toxina. L'antitoxina GhoS, del sistema de tipus V, és una endoribonucleasa que s'encarrega de degradar l'RNAm que codifica per a la seva toxina^{1,4}.

El coneixement i estudi d'aquests sistemes TA, així com de les seves funcions, dels diferents sistemes existents i de la distribució dins la població microbiana han ofert un ventall de possibles aplicacions biotecnològiques, clíniques i ambientals. Entre elles, cal destacar

l'estabilització de plasmidis, la producció de vectors per a selecció positiva o la seva utilització per dur a terme contenció biològica activa. Tal vegada però, una de les aplicacions més prometedores és el seu ús farmacològic³.

Objectius

El present treball pretén assolir dos objectius concrets. En primer lloc, l'estudi i revisió dels diferents sistemes TA que es troben a la població microbiana, fent especial èmfasi en la classificació d'aquests sistemes, el mecanisme d'acció de cada un d'ells i la seva distribució dins la població.

Per altra banda, i com a segon objectiu, l'anàlisi i investigació de les possibles aplicacions que el coneixement d'aquests sistemes TA pot proporcionar, analitzant en profunditat les implicacions clíniques, ambientals i biotecnològiques que comencen a sorgir.

Metodologia

L'actualització bibliogràfica i l'obtenció del material bibliogràfic s'ha obtingut mitjançant els motors de recerca PubMed i Google Scholar, amb la introducció de paraules claus i termes específics relacionats amb el tema. Una altra de les fonts consultades per dur a terme el treball són diferents bases de dades on-line, en concret BtoxDB, TAFinder i RASTA-bacteria.

Classificació dels sistemes Toxina-Antitoxina

Els sistemes TA, formats per una toxina i la seva antitoxina, es classifiquen de forma general en cinc categories en funció de la naturalesa i el mecanisme d'acció de l'antitoxina. Cal destacar que els sistemes I, II i III són els més àmpliament estudiats i on se'n troben més exemples, mentre que els sistemes IV i V només se'n coneix un exemple de cada i per tant són encara més desconeguts⁵.

Sistemes TA tipus I

En línies generals, als sistemes TA tipus I l'antitoxina és un sRNA antisentit i inestable que, mitjançant la unió al mRNA de la toxina per aparellament de bases, inhibeix la seva traducció i per tant altera els nivells d'expressió de la toxina i condueix a la seva degradació. A aquests sistemes tipus I, la toxina és una proteïna petita de menys de 60 aminoàcids i hidrofòbica⁶.

El primer sistema tipus I descobert, i que ha esdevingut un model d'estudi per a aquest tipus d'antitoxines, és el sistema *hok/Sok* del plasmidi RI d'*E. coli* (Figura 1 A). Al locus *hok/sok* s'hi troben codificats tres gens: *hok*, *mok* i *sok*. El gen *hok* codifica per a la toxina, una proteïna transmembrana que provoca danys a nivell de membrana cel·lular. Per la seva banda, el gen *mok* és necessari per a la expressió i traducció del gen *hok*, modulant la seva expressió a través de les regions d'ambdós marcs de lectura que es superposen. Finalment, el gen *sok* codifica per a l'antitoxina, un sRNA antisentit que evita la traducció del gen *mok* i això condueix a la inhibició del mRNA del gen *hok*. Aleshores, es forma el complex *hok* (mRNA)/Sok (sRNA) que pot ser degradat per una RNasa III. Ara bé, com que l'antitoxina Sok és molt més inestable, quan la cèl·lula perd el plasmidi, Sok és degradat de forma ràpida i la toxina *hok*, que és molt més estable, es segueix traduint. D'aquesta forma, les cèl·lules duen a terme l'eliminació d'aquelles cèl·lules que han perdut el plasmidi i s'asseguren la supervivència^{7,8}.

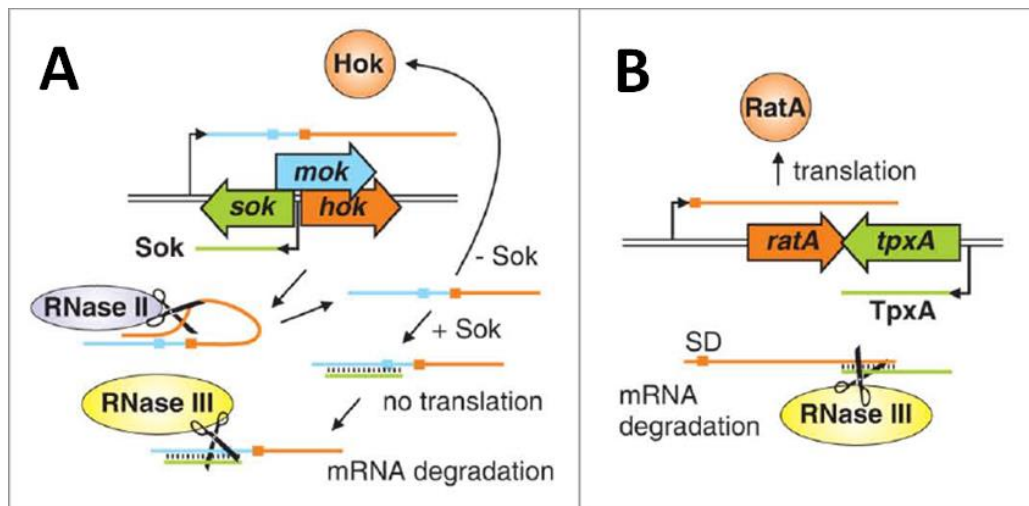


Figura 1. Exemples de sistemes TA tipus I. A) Regulació del sistema *hok/Sok* del plasmidi RI d'*E. coli*. **B)** Regulació del sistema *TpxA/RatA* localitzat a *B. subtilis*. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

Altres sistemes tipus I trobats a *E. coli* també han estat estudiats en profunditat, entre ells el sistema *ldr/Rdl* que presenta moltes similituds a nivell d'organització i regulació amb el sistema *hok/Sok*, i el sistema *symE/SymR*, on en destaquen algunes variacions respecte al funcionament més general dels sistemes TA tipus I⁹. En el cas concret del sistema *symE/SymR* una de les grans diferències amb la resta de sistemes d'aquesta classificació és el fet que la antitoxina *SymR* és més estable que la resta d'antitoxines i que la toxina *symE* és degradada per una proteasa, en lloc de per una ribonucleasa com passa a la resta d'aquests sistemes. Un altre dels fets a destacar és que la repressió de la síntesis de la toxina *symE*, que es troba a un gen induït per la resposta SOS, no es redueix a un únic punt sinó que és possible a tres nivells. Aquesta inhibició pot donar-se a nivell de transcripció per part del repressor *LexA*, a nivell de traducció per la pròpia toxina *SymR* o ja a nivell d'estabilitat proteica per part de la proteasa *Lon*, qui a més a més se'n carrega de la seva degradació. La possibilitat d'aquest control a diferents punts permet a la cèl·lula mantenir uns nivells suficientment baixos de toxina que no danyen a la pròpia cèl·lula, fins que no sigui necessària la seva activitat^{8,9}.

Pel que fa a bacteris Gram positives, el primer sistema TA tipus I es va trobar al plasmidi *pAD1* d'*Enterococcus faecalis*, el sistema *fst/RNAII*. Pel que s'ha pogut observar tindria un mecanisme d'acció similar al sistema *hok/Sok* on l'antitoxina *RNAII* inhibeix la traducció de *fst* per complementaritat de bases. En aquest cas però, el complex resultant no és substrat de la *RNase III*, pel que en el cas de cèl·lules que han perdut el plasmidi, la inestabilitat pròpia de l'antitoxina permet l'acumulació de la toxina *fst* i, per tant, la seva mort⁸.

Tots aquests sistemes descrits seguirien una mateixa estratègia per aconseguir la neutralització de la toxina: la inhibició del seu mRNA, amb una posterior eliminació del complex format, tot i que no a tots els casos imprescindible. Ara bé, una estratègia alternativa pareix que seria la utilitzada als sistemes TA tipus I de *B. subtilis*, mitjançant la degradació directa d'aquest missatge^{8,10}.

De tots els sistemes TA tipus I localitzats a *B. subtilis* els més àmpliament estudiats són els sistemes *TpxA/RatA* (Figura 1 B) i *BsrG/SR4*. A ambdós sistemes, el mecanisme d'acció és

similar als descrits anteriorment, on l'antitoxina inhibeix el missatger de la toxina per complementaritat de bases. Ara bé, hi ha certes divergències respecte als sistemes descrits anteriorment que confereixen a aquests sistemes un mecanisme diferencial. En contraposició als aparellaments dels casos anteriors, que tenen lloc als extrems 5', als sistemes de *B. subtilis* els aparellaments es donen als extrems 3'. Una de les teories que podrien explicar aquesta diferència en l'aparellament seria que a la maquinària de degradació de *B. subtilis* hi trobem activitat exoribonucleasa 5'-3' d'una importància vital en la degradació de mRNA. En aquest cas, un aparellament a l'extrem 5' obstaculitzaria aquesta via i això podria arribar a ser perjudicial per a la pròpia cèl·lula. Tot i això, el mecanisme pel qual es duu a terme la degradació mitjançant activitat exoribonucleasa 3'-5' no es coneix encara amb exactitud. El que sí s'ha pogut comprovar és la obligació de degradar el mRNA de la toxina. Ha pogut comprovar-se com, per a la viabilitat de *B. subtilis* és necessària la degradació d'aquest missatger per part d'una RNasa III. Aquest fet no és d'aquesta obligatorietat a tots els sistemes anteriorment descrits, on amb la formació del complex toxina-antitoxina moltes vegades és suficient per complir l'objectiu del sistema TA. No obstant això, no pot descartar-se del tot que l'antitoxina tingui un efecte en la modulació de la traducció, de forma similar que als sistemes descrits anteriorment¹⁰.

Tot i que aquestes dues estratègies són les més freqüents a aquests tipus de sistemes, es poden trobar altres mecanismes que assegurin l'estricta regulació de l'expressió de la toxina, així com promoure la seva degradació^{9,10}.

Sistemes TA tipus II

D'entre tots els sistemes TA, els de tipus II són els més estudiats i dels que se'n té un millor coneixement. En aquests tipus de sistemes tant la toxina com l'antitoxina són proteïnes, d'aproximadament uns 100 aminoàcids. El mecanisme general d'acció suposa que l'antitoxina, més inestable, s'uneix a la toxina, qui té una major estabilitat, i inhibeix la seva activitat. Les interaccions que s'estableixen són del tipus proteïna-proteïna, però trobem múltiples diferències a nivell estructural i funcional entre els diferents sistemes d'aquesta classificació^{11,12}.

Les antitoxines d'aquests tipus de sistemes estan formades per dos dominis, un d'unió a proteïna mitjançant interaccions proteïna-proteïna i un altre d'unió al DNA. De forma general, quan aquestes antitoxines no es troben unides a una proteïna, són inestables ja que la seva estructura es troba més desordenada i tenen més probabilitats de ser degradades per proteòlisi. Ara bé, quan interaccionen amb la seva toxina mitjançant el seu domini d'unió a proteïna, es veuen estabilitzades. Aquesta unió inhibeix l'activitat de la toxina, i a més a més en regula la seva expressió ja que el complex proteïna-proteïna format s'uneix a l'operador del corresponent operó mitjançant el domini d'unió al DNA de l'antitoxina. D'aquesta forma, l'antitoxina no és només capaç d'inhibir de forma directa l'activitat de la toxina, sinó que també té la capacitat de reprimir la seva expressió¹¹.

Fins al moment, els sistemes TA tipus II s'han classificat en 14 famílies en funció del seu mecanisme d'acció i de les seves característiques estructurals. Dins elles se'n distingeixen dos tipus de famílies: aquelles formades per dos components (toxina i antitoxina) i aquelles que estan formades per tres components, on a més a més de la toxina i l'antitoxina hi

trobem un regulador¹². La classificació de les 14 famílies, així com el detall de quines són les seves dianes poden veure's a la Taula 1.

Un dels sistemes millor caracteritzats fins al moment, i que fou un dels primers en descobrir-se és el sistema *CcdB/CcdA* del plasmidi F d'*E. coli*. La toxina *CcdB* s'uneix i inhibeix de forma específica a una DNA girasa, concretament una topoisomerasa de tipus II essencial per a *E. coli*. Tot i que a l'antitoxina *CcdA* s'hi troba l'element d'unió al DNA, i poder així reprimir l'expressió de la toxina, diferents estudis demostren que *in vivo* és necessària la presència de les dues proteïnes per a que es dugui a terme aquesta regulació. Així, la toxina *CcdB* podria regular la capacitat d'unió al DNA de l'antitoxina en funció de la proporció en la que *CcdB* es trobi formant part del complex. D'aquesta forma, la repressió té lloc quan els nivells d'antitoxina són iguals o superiors a la toxina; quan la toxina es troba present en excés no hi ha repressió¹³. Un altre dels sistemes que també tenen com a diana una DNA girasa és el sistema *ParE/ParD*, però en aquest cas la sola presència de l'antitoxina *ParD* es necessària per dur a terme la regulació de l'operó, i per tant, la seva repressió¹⁴.

<i>Família TA amb dos components</i>				
#	Família TA	Toxina	Antitoxina	Diana
1	<i>ccd</i>	<i>CcdB</i>	<i>CcdA</i>	DNA girasa
2	<i>hicBA</i>	<i>HicA</i>	<i>HicB</i>	Ruptura RNA
3	<i>hipBA</i>	<i>HipA</i>	<i>HipB</i>	Fosforilació EF-Tu
4	<i>mazEF (chpA)</i>	<i>MazF (ChpAK)</i>	<i>MazE (ChpAI)</i>	Ruptura mRNA
5	<i>parD (PemKI)</i>	<i>Kid (PemK)</i>	<i>Kis (Pemi)</i>	Ruptura mRNA
6	<i>parDE</i>	<i>ParE</i>	<i>ParD</i>	DNA girasa
7	<i>phd-doc</i>	<i>Doc</i>	<i>Phd</i>	Ribosoma
8	<i>relBE</i>	<i>RelE</i>	<i>RelB</i>	Ribosoma
9	<i>vapBC (vag)</i>	<i>VapC</i>	<i>VapB</i>	RNAs
10	<i>mosAT</i>	<i>mosT</i>	<i>mosA</i>	-
11	<i>yeeUV</i>	<i>yeeV</i>	<i>yeeU</i>	-
<i>Família TA amb tres components</i>				
#	Família TA	Toxina	Antitoxina	Regulador
12	ω - ϵ - ζ	ζ zeta	ϵ epsilon	ω omega
13	<i>pasABC</i>	<i>PasB</i>	<i>PasA</i>	<i>PasC</i>
14	<i>paaR-paaA-parE</i>	<i>ParE</i>	<i>PaaA</i>	<i>paaE</i>

Taula 1. Classificació per famílies dels sistemes TA tipus II. Es distingeix entre les famílies formades per dos components (1-11) i les formades per tres components (12-14). La informació correspon a la base de dades TAfinder.

Una altra de les dianes que podem trobar als sistemes tipus II és la ruptura de mRNA, com és el cas dels sistemes *MazF/MazE*, *Kid/Kis* i la família *HicBA*. En el cas de l'operó *mazEF*, aquest codifica per a la toxina *MazF* qui té com a objectiu tallar mRNAs a llocs específics inhibint així el creixement cel·lular. La toxina veu neutralitzada la seva acció per l'antitoxina *MazE*, qui pot ser degradada per una serin proteasa depenent d'ATP. En aquest cas, el

complex *MazF-MazE* es forma amb un dímer d'antitoxina amb dos dímers de toxina, que resulta en una forma molt efectiva de regular i disminuir la presència i efecte de la toxina¹⁵.

Per la seva banda, l'operó *parD* codifica per a la toxina *Kid*, una RNasa que talla llocs específics de mRNA, i l'antitoxina *Kis*, que a més a més d'inhibir a la toxina actua com a repressor de la seva expressió. Aquesta activitat repressiva es veu afavorida per la formació del complex, ja que augmenta la seva eficàcia d'unió. Aquest sistema es troba molt estudiat al plasmidi R1 d' *E. coli*, on tot apunta a que la seva funció seria vital per al bon manteniment de la replicació del plasmidi. La toxina *Kid* inhibiria la divisió cel·lular, i això permetria a la maquinària de replicació dur a terme la seva funció a temps, i això incrementaria l'efectivitat de la mateixa. Per tant, el sistema *Kid/Kis* tindria un paper molt important en el bon funcionament d'aquesta replicació¹⁶.

En el cas de la família *HicBA* la toxina, *HicA*, actua a nivell de traducció, mitjançant la interrupció de mRNA i mRNAs de transferència (tmRNA), causant així la seva degradació. Pareix però que la ruptura dels tmRNAs és independent de la traducció, pel que la activitat de la toxina seria independent de ribosomes. Cal destacar que, a diferència de la tendència habitual als altres sistemes TA, nivells molt elevats de la toxina no tenen efecte bactericida, però sí bacteriostàtic impedit així la seva reproducció però no sent causa de mort¹⁵.

Un altre dels sistemes que es troben molt ben caracteritzats i estudiats és el sistema *RelE/RelB*, que juntament amb el sistema *Doc/Phd* tenen els ribosomes com a diana. Al sistema *RelE/RelB* (Figura 2 A), la toxina s'uneix al lloc A del ribosoma, en concret entre el segon i el tercer nucleòtid del codó d'stop, inhibint d'aquesta forma la síntesi proteica. Pel que s'ha pogut observar, la toxina *RelE* per si mateixa no té activitat endoribonucleasa, pel que es creu que seria dependent de ribosomes, on hi seria un factor associat que estimularia l'activitat del propi ribosoma. L'antitoxina, *RelB*, actua englobant a la toxina i evitant així la seva unió al lloc A del ribosoma. A continuació tindrien lloc una sèrie de canvis estructurals que inhabilitarien el centre catalític de la toxina^{15,17}.

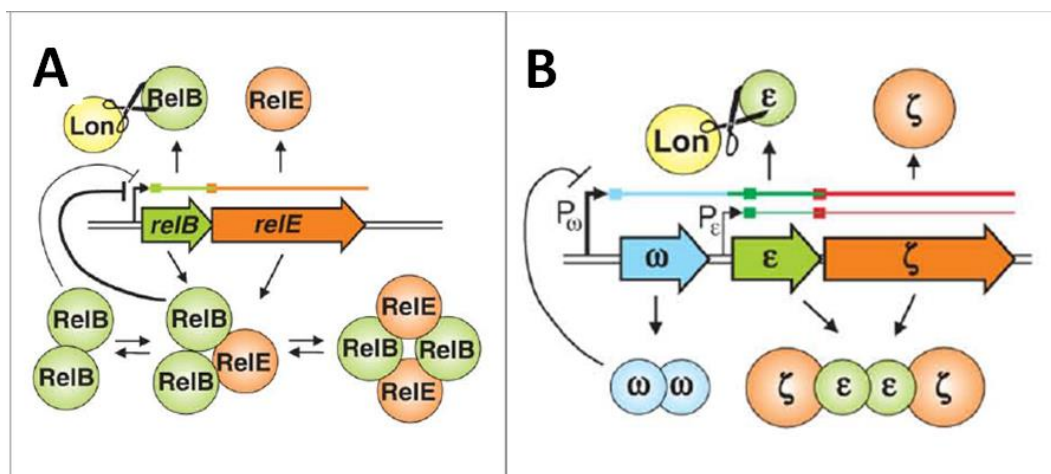


Figura 2. Exemples de sistemes TA tipus II. A) Regulació del sistema *RelE/RelB* d'*E. coli*. **B)** Regulació del sistema ω - ϵ - ζ localitzat al plasmidi pSM19035 de *S. Pyogenes*. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

A la família *HipBA*, la toxina *HipA* presenta activitat quinasa, essent la seva diana la fosforilació del factor d'elongació termoinestable (EF-Tu) per tal d'evitar-hi la unió de l'aminoacil tRNA. Aquesta activitat es veu inhibida per l'antitoxina HipB, qui a més a més s'encarrega de regular l'expressió a l'operó. Així doncs, un dímer de HipB s'uniria de forma específica al DNA, i a aquest complex HipB-DNA s'hi unirien dues molècules de toxina pels seus extrems. Aquest tipus d'interacció que s'estableix contrasta de forma significativa amb la resta d'interaccions que trobem als sistemes TA¹⁸.

Les tres darreres famílies (9-11, Taula 1) són les més desconegudes per al moment, on no se'n coneix exactament la seva diana ni el seu mecanisme exacte, tot i que es sospita que el sistema *VapC/VapB* estaria implicat en controls de qualitat a nivell d'expressió gènica, ja que conté un domini PIN, que a eucariotes la seva funció és la degradació de mRNAs mitjançant mutacions terminadores¹².

Tots els sistemes desenvolupats anteriorment es troben formats per dos components, toxina i antitoxina. Com pot veure's a la Taula 1, a la classificació dels TA tipus II hi trobem tres famílies formades per tres components. Una de les més sorprenents a nivell d'organització és el sistema ω - ϵ - ζ , localitzat al plasmidi pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (Figura 2 B). La toxina ζ es veu neutralitzada per l'antitoxina en forma de dímer ϵ_2 donant lloc a la formació del complex $\zeta_2\epsilon_2$. Ara bé, la diferència amb la resta de sistemes de tipus II la trobem al fet que ni la toxina, ni l'antitoxina ni el complex format són els encarregats de regular la seva expressió, sinó que entra en joc ω , que en forma de dímer regula l'activitat del promotor. A la família *paaR-paaA-parE*, *parR* és necessària per a la regulació del sistema però a diferència de l'anterior família, el complex *ParE-PaaA* si que es troben també implicats en aquesta regulació. Finalment, la darrera família formada per tres components és *pasABC*. En aquests cas, el tercer component *PasC* no s'encarrega de la regulació de l'expressió sinó que la seva funció recau en millorar la formació del complex toxina-antitoxina, que és el responsable de regular la seva pròpia expressió^{5,12}.

Els sistemes TA tipus II són dels més comuns a la població microbiana, i per tant dels que se'n coneixen més exemples i se'n té una major comprensió. Això ha possibilitat la seva classificació en les diverses famílies així com la major investigació de les seves implicacions a nivell biològic¹².

Sistemes TA tipus III

Els sistemes TA tipus III, on el coneixement encara és limitat, es basen de forma general en la interacció directa entre un RNA (antitoxina) i una proteïna (toxina). Els exemples que fins al moment es coneixen d'aquest tipus de sistemes, en un primer moment varen ser classificats com a sistemes encarregats de la protecció davant bacteriòfags, que es coneixen com a sistemes Abi. Aquests sistemes Abi són extremadament tòxics quan es troben activats i poden actuar a nivell d'inhibició de la síntesi proteica del DNA dels fags quan hi ha una infecció. Posteriorment, es va veure com alguns sistemes Abi podien funcionar com un sistema TA, tot i que no encaixaven en la classificació ja existent (tipus I o II). Aleshores es va establir el tercer tipus de sistemes TA, on al seu locus hi trobem que entre el gen que codifica per la toxina i el que codifica per a la antitoxina hi apareix una petita seqüència de repeticions palindròmica. Aquesta petita seqüència actuaria com a regulador dels nivells tant de toxina com d'antitoxina^{19,20}.

El primer sistema TA identificat i classificat com a tipus III va ser el sistema *ToxN/ToxI* (Figura 3). L'antitoxina *ToxI* és un RNA que s'encarrega de contrarestar l'activitat endoribonucleasa de la toxina. Aquesta forma de funcionar no és tan diferent de la resta de sistemes descrits, ara bé, el sistema *ToxN/ToxI* no podia classificar-se com un TA on els dos components són proteics (tipus II) ni com un RNA antisentit (tipus I). Per aquest motiu sorgeix la nova classificació¹⁹. Als estudis realitzats del complex toxina-antitoxina es pot veure com es dóna una associació triangular entre tres molècules de proteïna *ToxN* i tres RNA, amb estructura secundària de pseudoknot, d'antitoxina *ToxI*²⁰.

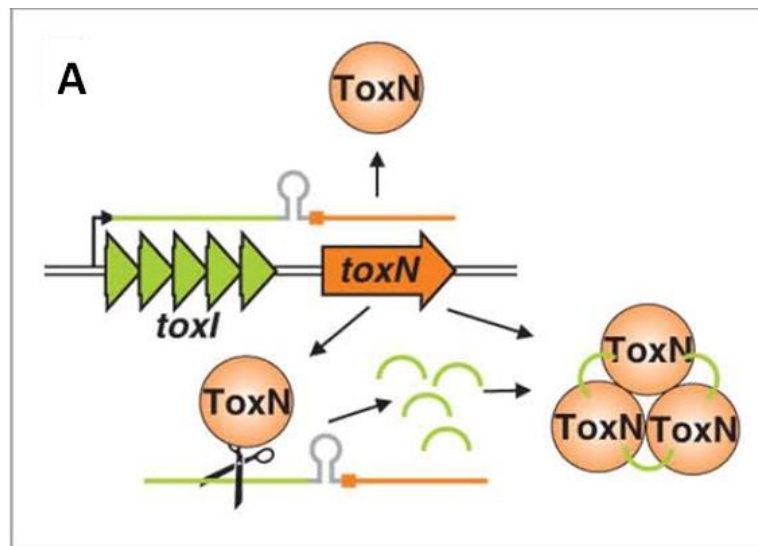


Figura 3. Exemple d'un sistema TA tipus III. A) Regulació del sistema *ToxN/ToxI*.
Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

Un altre dels sistemes *Abi* que recentment s'ha proposat classificar-lo com a sistema TA tipus III és el sistema *AbiQ*, identificat al plasmidi pSRQ900 de *Lactococcus lactis*. A aquest sistema hi trobem la mateixa organització descrita per al sistema *ToxN/ToxI*, on la toxina *ABIQ* és neutralitzada per la seva antitoxina *antiQ* i on al seu locus hi trobem una seqüència amb repeticions encarregada de regular el seus nivells²¹.

Com que la seva aparició és relativament recent, encara se'n coneixen poques famílies i pocs exemples dins elles, sobretot en comparació amb el coneixement i els exemples que es troben als tipus I i II. A més a més, els mecanismes exactes pels quals duen a terme la seva funció no es troben encara del tot elucidats²⁰.

Sistemes TA tipus IV i V

Fins al moment, dels sistemes tipus IV i V només se'n coneix un exemple de cada i la informació que se'n disposa de cada un d'ells és molt limitada, ja que són els sistemes més recentment descoberts i classificats. Al sistema de tipus IV la toxina *CbtA* s'encarrega d'inhibir la polimerització de les proteïnes estructurals necessàries per a la divisió cel·lular *MreB* i *FtsZ*. L'antitoxina *CbeA* actua en aquest cas unint-se de forma directa amb les dianes de la toxina i evitant així la seva acció, pel que en aquest sistema no es forma el característic complex toxina-antitoxina. Per la seva banda, al sistema tipus V descrit fins al moment *GhoT/GhoS*, l'antitoxina posseeix activitat endoribonucleasa que s'encarrega de provocar ruptures de forma específica al mRNA de la toxina^{1,2}.

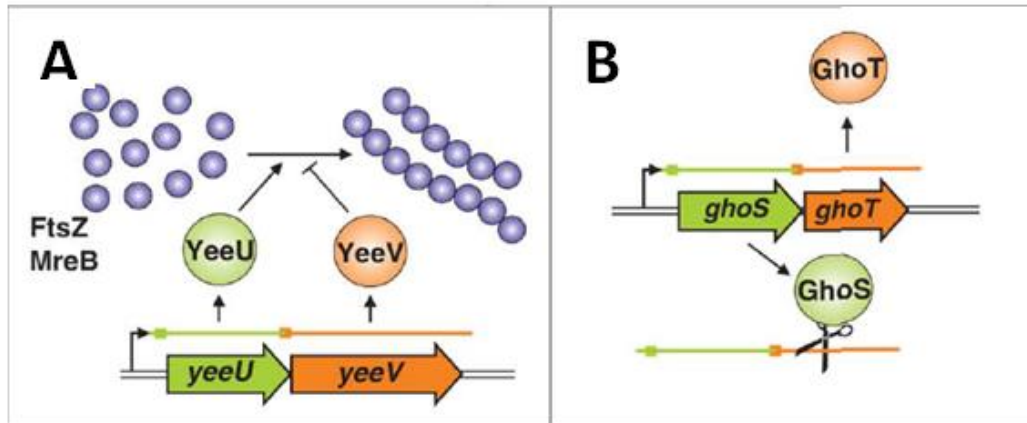


Figura 4. Exemples de sistemes TA tipus IV i V. A) Regulació del sistema de tipus IV YeeU/YeeV d'*E. coli*. **B)** Regulació del sistema de tipus V GhoT/GhoS. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

Pel que fa al sistema CbtA/CbeA, classificat com a tipus IV i també conegut com a YeeU/YeeV (Figura 4 A), la major diferència respecte a la resta de sistemes descrits i que justifica la nova classificació, és l'absència de complex toxina-antitoxina. A més a més, la toxina CbtA és la primera que s'ha descrit que afecta a la morfologia i a la divisió cel·lular de forma tan directa. S'ha descrit com CbtA s'uneix i inhibeix a les proteïnes MreB i FtsZ, proteïnes citoesquelètiques homòlogues a la actina i la tubulina d'eucariotes respectivament. Aquestes proteïnes, per la seva gran implicació en processos fisiològics cel·lulars, veuen extremadament regulada la seva presència ja que són essencials per a la viabilitat de la bacteri. Ara bé, l'antitoxina CbeA duu a terme la seva funció inhibidora interaccionant amb les pròpies dianes de la toxina, i no de forma directa amb ella. Aquesta es sobretot una diferència notable respecte als sistemes de tipus II, on s'estableixen els contactes proteïna-proteïna entre la toxina i l'antitoxina. El mecanisme exacte que possibilita aquest funcionament no es coneix del tot²².

Finalment, el darrer sistema classificat ha estat el sistema GhoT/GhoS com a TA tipus V (Figura 4 B). En aquest cas, la toxina GhoT inhibeix el creixement, i a més a més quan es troba en altes concentracions provoca la lisi cel·lular. Per la seva banda, l'antitoxina GhoS evita l'acció de la toxina mitjançant la ruptura del seu mRNA. Aquest és el principal fet diferenciador amb la resta de sistemes TA descrits, ja que prèviament no s'havien descrit sistemes TA on l'antitoxina de forma directa provoqués la ruptura del missatger de la toxina. A banda d'això, aquest sistema presenta també dues característiques pròpies que el diferencien de la resta: en situació d'estrès l'antitoxina no es degradada de forma proteolítica i pareix que no s'uneix a la regió promotora, tot i que no s'ha identificat fins al moment cap regulador. Tot apunta a que aquest sistema estaria implicat en la formació i manteniment de cèl·lules persistents, que són aquelles que adquireixen resistència a antibiòtics sense canvis a nivell genètic. Així, es proposa que la toxina incrementaria la persistència induint les cèl·lules a un estat latent, tot i que el mecanisme exacte de com això s'aconsegueix no s'ha pogut descobrir²³.

Distribució

Tot i que el primer sistema TA va ser identificat a un plasmidi, actualment es coneix de l'existència de sistemes TA tant a plasmidis com a cromosomes de bacteris, arqueobacteris i molt possiblement de fongs, essent especialment abundants a bacteris³. Tot i que s'ha arribat a un consens sobre la funcionalitat dels sistemes TA als plasmidis, la seva presència als cromosomes planteja noves possibilitats en quant a funció. Els estudis que s'han realitzat relacionats amb l'abundància de sistemes TA a cromosomes ha permès establir nous marcs i relacionar la seva presència amb mecanismes de resposta a estrès nutricional²⁴.

Una de les evidències més clares d'aquests estudis és la gran diversitat que trobem en la distribució d'aquests sistemes. Fins al moment no ha pogut demostrar-se una relació directa entre el nombre de sistemes TA presents i factors tals com el nivell de creixement, pertànyer a un determinat fílum o les condicions de vida²⁴. Per exemple, a *Escherichia coli* K12 s'han identificat més de 33 sistemes TA, a organismes com *Nitrosomonas europaea* o *Sinorhizobium meliloti* se'n troben més de 50 i a d'altres com *Campylobacter jejuni* o *Bacillus subtilis* menys de 3. Ara bé, un cas interessant el trobem a l'organisme *Mycobacterium tuberculosis* on s'hi poden trobar més de 60 sistemes TA mentre que *Mycobacterium smegmatis*, que no és patogènic, només presenta 2 sistemes TA^{24,25}. En aquest cas si pareix haver-hi una relació entre el nombre de sistemes TA i la patogenicitat de l'organisme, i en el cas concret de *M. tuberculosis* serien determinants a l'estat latent tan prolongat dins els macròfags, característica vital per a la seva virulència²⁵. A més a més, es troben diferències en la distribució d'aquests sistemes dins individus aïllats de la mateixa espècie. Per exemple, mentre que homòlegs d'algunes toxines com Ccdb, MazF o HipA són molt abundants, altres es troben absents o en molt poca proporció. La seva explicació recau en el fet que l'herència és horitzontal, i per això el nombre de còpies varia entre diferents individus²⁴.

Un altre dels punts relacionats amb la distribució dels sistemes TA més discutit ha estat la presència o no d'aquests sistemes a microorganismes simbiòtics. En un primer estudi, que es va realitzar amb un total de 126 genomes procariotes, dels quals 110 corresponien a bacteris i 16 a arqueobacteris, es va arribar a la conclusió que els sistemes TA no es trobaven presents als procariotes simbiòtics mentre que si se'n trobaven en abundància als de vida lliure. En aquell moment, això va permetre donar suport a la hipòtesis que els sistemes TA desenvolupen una funció relacionada amb la resposta a l'estrès, ja que els organismes simbiòtics estarien molt menys exposats a l'estrès metabòlic²⁶. Ara bé, així com el coneixement dels sistemes TA s'ha ampliat i es té un millor accés a les seqüències genòmiques de molts més microorganismes, aquestes conclusions s'han vist rebutjades. Les darreres evidències demostren la presència de sistemes TA a bacteris simbiòtics. A més a més, fins fa relativament poc es desestimava la idea que aquests sistemes TA poguessin trobar-se a eucariotes, però a genomes de fongs s'han identificat més de 10 seqüències que codificarien per un homòleg de la toxina *Doc* d'*E. coli*. Tot i que es desconeix l'existència de la seva antitoxina, i per tant no es podria parlar encara d'un sistema TA, aquests resultats obrin les possibilitats d'acció i localització d'aquests tipus de sistemes²⁵.

Un dels aspectes interessants a tenir en compte per tal de comprendre millor la distribució dels sistemes TA, és la seva comparativa en relació a altres sistemes de defensa que podem trobar a bacteris i arqueobacteris. De forma general, a procariotes podem establir dos grups diferents de sistemes de defensa. Per una banda, aquells que el seu mecanisme d'acció es basa en diferenciar el DNA propi del DNA que no ho és, i que poden considerar-

se com un sistema immunitari de procariotes. Dins aquest primer grup hi trobem el sistema R-M que és capaç de diferenciar el DNA propi mitjançant metilacions o el sistema CRISPR qui reconeix de forma específica agents infecciosos. Dins el segon grup de sistemes de defensa, hi podem trobar aquells que actuen a través de mort cel·lular programada o induint estats latents. Dins aquesta categoria, no sols hi trobem els sistemes TA sinó que també s'hi inclouen els sistemes ABI que, tot i que no es troben tan ben caracteritzats com els sistemes TA, pareixen intervenir a nivell de traducció²⁷.

En general, al genomes de bacteris i arqueobacteris hi hauria fins a un màxim d'un 10% destinat a sistemes de defensa i s'establiria una relació directa entre el número de gens dedicats a sistemes de defensa i el tamany del genoma. Els anàlisis realitzats en relació als sistemes de defensa posen de manifest que bàsicament hi hauria quatre estratègies que seguirien els diferents organismes: predomini de sistemes R-M i ABI, abundància de sistemes TA i CRISPR, presència dels tots els sistemes per igual, o absència d'ells. Pel que s'ha pogut veure a una gran majoria de bacteris termòfils i arqueobacteris hi predominen els sistemes TA i CRISPR, mentre que a bacteris hi podem trobar representats tots els sistemes de defensa²⁷.

Finalment, i en relació als diferents sistemes de classificació, no trobem una distribució similar entre els cinc tipus de sistemes establerts. Pel que ha pogut comprovar-se, els sistemes TA tipus I segueixen una herència vertical, i els permet la transmissió a la seva progènie. Aquest fet podria explicar la distribució més restrictiva d'aquests tipus de sistemes, on a determinades bacteris hi predominen famílies concretes de tipus I, mentre que a altres la seva presència és inexistent. Per la seva banda, els sistemes tipus II i III pareixen seguir un patró d'herència horitzontal, però mentre que els de tipus III solen presentar-se a Firmicutes i Fusobacteris, els sistemes TA de tipus II són molt abundants i es troben àmpliament distribuïts als microorganismes procariotes. Pel que fa als sistemes IV i V, com que només se'n coneix un exemple de cada, la seva distribució no pot ser avaluada¹. En relació als sistemes tipus II, que són els més estudiats per la seva gran presència, cal destacar que el nombre de sistemes TA que podem trobar varia entre espècies diferents, i inclús entre individus aïllats de la mateixa espècie. A més a més, ha pogut demostrar-se que no existeix una relació directa entre el tamany del genoma i el nombre de sistemes TA tipus II presents²⁸.

Aplicacions dels sistemes TA

L'estudi i el coneixement dels sistemes TA, que ha experimentat un creixement exponencial sobretot en els darrers anys, i ha permès el desenvolupament de nombroses tècniques i estratègies en l'àmbit de la biotecnologia, la medicina o el medi ambient.

Una de les principals aplicacions és la utilització d'aquests sistemes TA per a l'estabilització de plasmidis dins un cultiu bacterià, aspecte de vital importància a la indústria que s'encarrega de produir DNA o proteïnes a partir de microorganismes. Generalment, aquesta producció fa necessària la incorporació d'un plasmidi que funciona com a vector, portant el gen que ha d'expressar-se. El principal problema a resoldre es que les cèl·lules portadores del plasmidi tenen una menor taxa de creixement, ja que aquest plasmidi suposa una important càrrega per al seu metabolisme. De forma comú s'utilitzen gens que els confereixen resistència a antibiòtics per tal d'assegurar el creixement i supervivència de les cèl·lules portadores del plasmidi, mitjançant l'addició d'antibiòtics. Ara bé, tant per a la

indústria alimentària com per al sector mèdic i farmacèutic l'addició d'antibiòtics no és la millor estratègia, pels seus elevats costos i pels nivells de contaminació que poden suposar per al propi cultiu, per al producte final o per al medi ambient quan són utilitzats a gran escala. Per aquest motiu, una de les alternatives que més força ha guanyat és la utilització de sistemes TA enlloc de gens de resistència a antibiòtics, que promou l'eliminació d'aquelles cèl·lules que no contenguin el plasmidi²⁹.

A aquests tipus de vectors on s'utilitzen sistemes TA, el procediment habitual (Figura 5) és clonar l'operó del sistema TA complet dins un plasmidi, i aleshores a totes aquelles cèl·lules que es perd el plasmidi ja no es produeix síntesi del sistema TA. Com a conseqüència d'això, l'antitoxina comença a degradar-se, per la seva menor estabilitat respecte a la toxina, qui pot dur a terme la seva funció i arribar a produir la mort cel·lular^{29,30}. Amb el mateix propòsit, s'ha plantejat un nou sistema d'obtenció de plasmidis amb sistemes TA que pareix millorar l'estabilitat i augmentar el rendiment del procés. Aquesta nova estratègia es coneix com a SCS (separated component stabilization) i es basa en la introducció dels dos elements per separat: la toxina al cromosoma bacterià i l'antitoxina al plasmidi (Figura 5). Aquesta estratègia SCS segueix garantint l'estabilitat del plasmidi sense la necessitat d'utilitzar antibiòtics, però a més a més augmenta de forma considerable els nivells de producte i és funcional en qualsevol medi de cultiu. En conclusió, pareix que l'estratègia SCS on es realitza una separació entre el gen de la toxina i l'antitoxina és molt més efectiva que la utilització de l'operó complet³⁰.

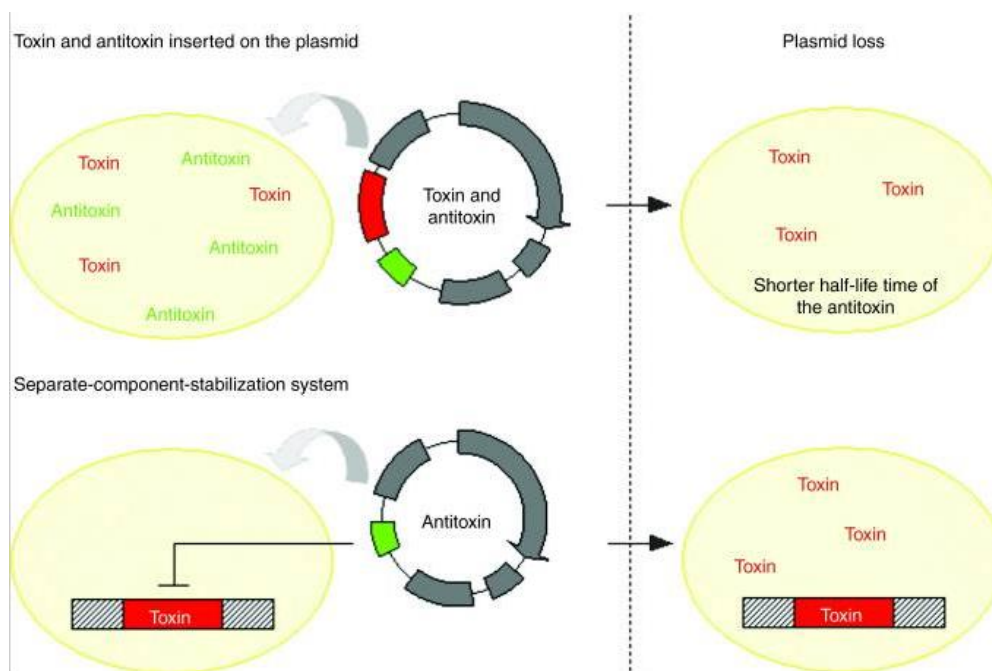


Figura 5. Diferents estratègies per a la estabilització plasmídica mitjançant sistemes TA. A la part superior s'esquemmatitza la inserció de l'operó TA al complet al plasmidi i el resultat un cop la cèl·lula per aquest plasmidi. A la part inferior pot veure's l'estratègia SCS, on la toxina s'introdueix al cromosoma bacterià mentre que l'antitoxina la trobem al plasmidi. Figura adaptada de Vandermeulen, *et al.*, 2011.

A nivell clínic, aquestes estratègies d'estabilització plasmídica pareixen ser útils en tractaments amb teràpia gènica, tot i que fins al moment només s'han utilitzat a models clínics. Als darrers anys, la teràpia gènica ha experimentat un creixement exponencial, tant en el tractament de malalties com en la prevenció de patir-les, però en la majoria de casos sols a nivell experimental i es manté com una estratègia de futur que encara cal polir. Un dels principals inconvenients de la teràpia gènica és la inseguretat que aquesta tècnica ofereix, per la incapacitat de predir alguns dels efectes que es poden desencadenar com per exemple el fet d'utilitzar gens resistents a antibiòtics com a marcadors. Entre les diferents opcions que es proposen per solucionar això, hi trobem els sistemes TA que aparentment complirien la majoria de requisits per a donar bons resultats amb aquesta tècnica, tot i que en aquest cas encara ens trobem parlant de perspectives de futur i no d'una aplicació immediata³¹.

Una altra de les aplicacions dels sistemes TA més notables al camp de la biotecnologia és la seva utilitat com a vectors de selecció positiva en tècniques com la clonació de DNA. El major problema al que ha de fer front la clonació de DNA és la baixa freqüència d'inserció dels inserts de DNA dins el plasmidi. De forma general, només un 10% dels vectors incorporen l'insert de DNA, el que suposa un número molt poc satisfactori. Un cop s'ha produït la inserció del vector, es poden seguir dues tàctiques: o bé eliminar aquelles cèl·lules que no han incorporat el vector amb l'insert de DNA o seleccionar de forma positiva aquelles cèl·lules que contenen l'insert de DNA. Els sistemes TA suposen una eina molt interessant per dur a terme aquesta selecció positiva ja que només permetrien la supervivència i creixement d'aquelles cèl·lules que han incorporat l'insert de DNA³².

Un dels sistemes TA que primer es va utilitzar amb aquest propòsit va ser el sistema *CcdB/CcdA* del plasmidi F d'*E. coli* (Figura 6). En aquest cas, s'aconsegueix aquesta selecció positiva mitjançant la inactivació de la toxina *CcdB*, ja que quan aquesta es troba al plasmidi incorporat per les cèl·lules, s'inhibeix el seu creixement. Ara bé, si el gen de la toxina *CcdB* es veu interromput per un insert de DNA, ja no pot interferir en el creixement de les cèl·lules i la selecció positiva dels clons recombinants és molt més senzilla: només aquelles cèl·lules que han incorporat el plasmidi amb l'insert seran viables i mostraran un creixement a una placa amb medi de cultiu³³.

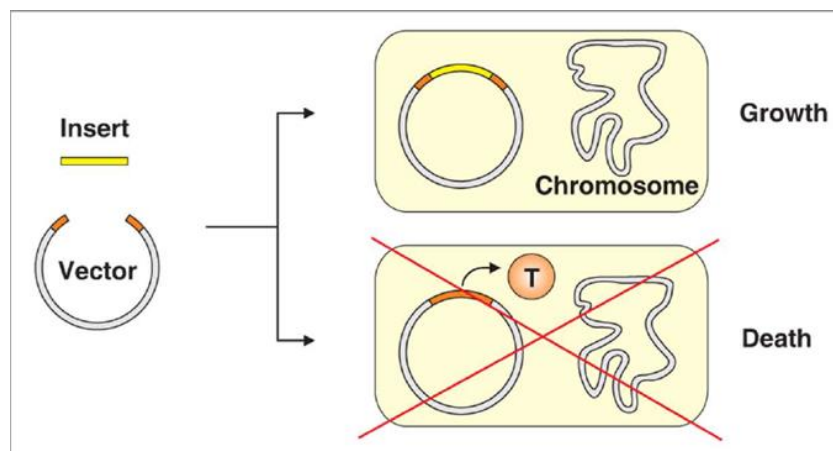


Figura 6. Esquema de la tècnica de selecció positiva mitjançant sistemes TA. Utilització del sistema *CcdB/CcdA* com a vector de selecció positiva durant la clonació de DNA. La incorporació d'un insert permet la inactivació de la toxina i com a conseqüència s'afavoreix el creixement de la cèl·lula. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

De forma molt més recent, una nova forma de selecció positiva mitjançant sistemes TA ha estat desenvolupada, i rep el nom de sistema StabyCloning (Figura 7). En aquest cas, s'utilitza tant la toxina *CcdB*, que es troba dins el cromosoma del bacteri, com l'antitoxina *CcdA*, que no es troba de forma completa a l'insert, amb 14 parells de bases a l'extrem 5' del vector. Un cop es produeix la inserció del fragment dins el vector, si hi ha un emparellament a la regió 5' s'obté el gen de l'antitoxina complet i funcional. Només aquelles cèl·lules que incorporin el vector amb el gen de l'antitoxina complet seran viables, ja que tindran la capacitat de neutralitzar l'efecte de la toxina codificada al cromosoma bacterià. A totes aquelles on l'emparellament no s'hagi produït o l'insert no s'ha incorporat, com no poden neutralitzar la toxina no seran viables i no experimentaran un creixement. Un dels gran avantatges d'aquest sistema StabyCloning és la velocitat del procés, que es redueix a una hora fins al moment de plaquejar³².

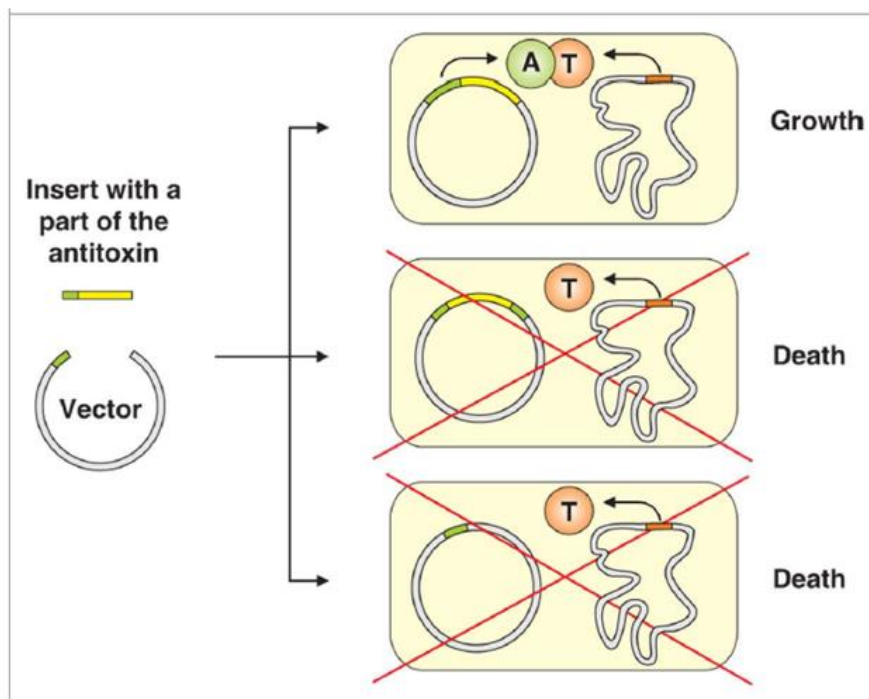


Figura 7. Esquema del sistema StabyCloning. Utilització del sistema *CcdB/CcdA* com a vector de selecció positiva durant la clonació de DNA mitjançant el sistema StabyCloning. La incorporació de la antitoxina de forma truncada permet seleccionar positivament aquelles cèl·lules que incorporen el vector amb el gen de l'antitoxina complet. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

Per una altra banda, els coneixements adquirits en relació al sistema TA *MazF/MazE* d' *E. coli* y en relació a la seva activitat endoribonucleasa específica de seqüència han permès desenvolupar un sistema de producció de proteïnes recombinants mitjançant el sistema SPP (single protein production). La toxina *MazF* és una endoribonucleasa que té com a diana mRNAs de seqüències ACA, causant un estat de latència quasi total, on les cèl·lules segueixen metabòlicament actives però no experimenten creixement cel·lular. Aleshores, l'eliminació d'aquestes seqüències ACA mitjançant mutagènesis dirigida al gen d'interès i una inducció de l'expressió de la toxina *MazF*, fan que es trobi inhibida a síntesi de totes les proteïnes excepte la que té la seqüència ACA modificada. Com que les seqüències ACA són marcs oberts de lectura poden substituir-se per alguna altra seqüència que no sigui diana de

MazF. D'aquesta forma es pot realitzar la producció de proteïnes mitjançant aquest sistema SPP, que resulta molt útil per exemple en casos d'estudis relacionats amb proteïnes de membrana, on aquesta tècnica permet el marcatge de les proteïnes d'interès amb isòtops C^{13} i N^{15} o per a la producció de proteïnes a major escala on es veurien reduïts els costos³⁴.

Tal vegada però, l'aplicació dels sistemes TA més estudiada i que més perspectives de futur presenta és el seu interès a nivell farmacològic i el seu ús com a fàrmacs antibacterians. De forma recurrent existeix l'interès de trobar nous fàrmacs i medicaments que resultin efectius davant agents microbians, ja que la resistència i la tolerància als ja existents augmenta cada vegada més. En els darrers anys, els sistemes TA s'han proposat com una bona estratègia alternativa, ja que les seves dianes comprenen processos cel·lulars diferents com la replicació del DNA o la síntesi proteica i de mRNAs, i resulten interessants per la seva implicació en la mort cel·lular programada. A més a més, la seva àmplia distribució tant a plasmidis com a cromosomes de bacteris i arqueobacteris, lligat a la seva quasi absència a organismes eucariotes, fan d'aquests sistemes TA uns candidats idonis per al desenvolupament de medicaments antibacterians³⁵.

Els estudis relacionats amb l'ús farmacològic dels sistemes TA s'han centrat en el seu desenvolupament mitjançant l'activació artificial de les toxines, tot i que es tracta encara de les primeres aproximacions i el que fan es plantejar un futur prometedor en aquesta àrea^{36,37}. Per les seves característiques estructurals i funcionals, els sistemes TA tipus II pareixen ser els principals candidats per dur a terme aquesta activació artificial, que pot tenir lloc de forma directa o indirecta (Figura 8). En primer lloc, la situació ideal seria l'obtenció d'un compost capaç d'inhibir l'acció de l'antitoxina de forma directa, ja sigui provocant la separació del complex TA ja format (Figura 8 A) o evitant la seva formació (Figura 8 B), ja que això conduiria de forma immediata a l'activació de la toxina i la mort de la cèl·lula. Ara bé, no tots els casos requereixen una separació completa del complex format, com és el cas de l'activació de la toxina *MazF*, on pareix que seria suficient l'eliminació de l'antitoxina del centre actiu o inclús una activació al·lostèrica de la toxina quan es troba formant part del complex TA. A altres sistemes però, si pareix imprescindible dur a terme aquesta disrupció del sistema pre-format, com és el cas de la toxina RelE, on el complex que forma amb l'antitoxina és massa gran com per poder accedir al centre actiu³⁶.

També s'ha plantejat la possibilitat de dur a terme l'activació d'aquesta toxina de forma indirecta mitjançant la degradació proteolítica de l'antitoxina el que també conduiria, com en el cas de l'activació directa, a que la toxina pugui dur a terme la seva funció i per tant conduir a la cèl·lula a la seva mort. Aquesta activació indirecta pot plantejar-se de dues formes diferents: o bé mitjançant la inhibició de la transcripció al locus del sistema unint-se al promotor i evitant així la producció d'antitoxina (Figura 8 C) o bé degradant l'antitoxina a través de l'activació de proteases tals com Lon o Clp (Figura 8 D), el que permetria la degradació constant d'antitoxina, evitant així l'autorepressió transcripcional per part del complex TA, i la producció constant de toxina per a que dugui a terme la seva funció³⁶.

Ara bé, fins al moment no s'ha trobat cap molècula capaç de dur a terme aquesta funció de forma convincent, tot i que s'han fet alguns avanços esperançadors³⁶. Un exemple és la recerca d'un compost amb la capacitat de separar el sistema $\zeta\epsilon$ del plasmidi d' *S. pyogenes*. En aquest cas, es va demostrar que la separació d'aquest complex era possible, però només si s'utilitzava una mescla de pèptids, i no un sol component³⁷. Es per això que

aquestes estratègies encara es troben en fases d'estudi molt primerenques, però plantejen un futur molt prometedor^{36,37}.

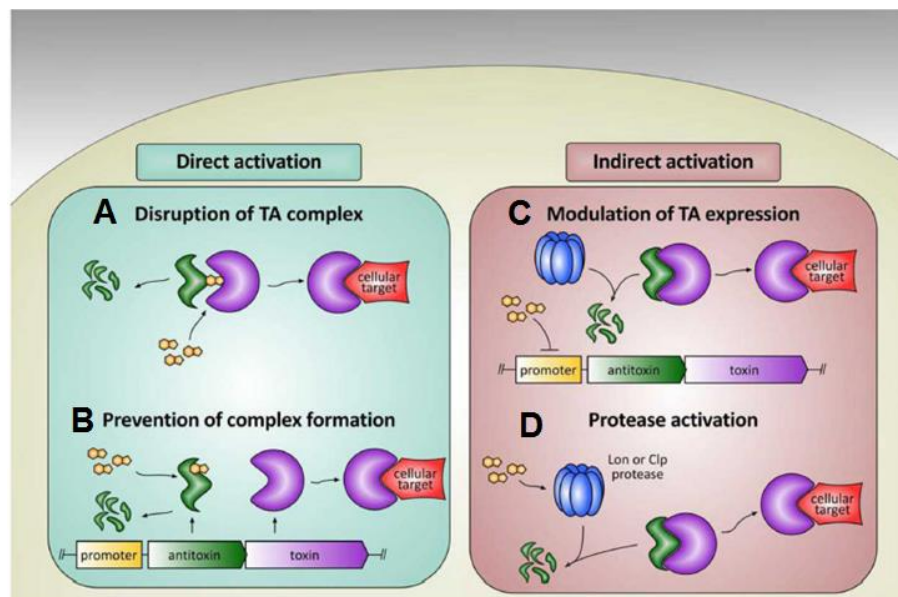


Figura 8. Esquema de les diferents estratègies per a l'activació artificial de toxines, de forma directa (esquerra) o indirecta (dreta): **A)** Mitjançant la separació del complex TA ja format. **B)** Evitant la formació del complex TA. **C)** Mitjançant la repressió de la transcripció per unió al promotor del locus dels sistema TA. **D)** A través de l'activació de proteases encarregades de degradar l'antitoxina. Als casos A, B i D la diana de l'activador (color taronja) és l'antitoxina, mentre que al cas C és el promotor. Figura adaptada de Williams y Hergenrother, 2012.

Un altre dels potencials usos dels sistemes TA és en l'àmbit de les infeccions virals, tals com el virus de la immunodeficiència humana (VIH) o el virus de l'hepatitis C, com a estratègia per desenvolupar nous fàrmacs antivirals³⁵. Pel que fa al virus del VIH, estudis molt recents han aportat evidències dels beneficis d'utilitzar la toxina *MazF* del sistema TA *mazEF* com a antiviral davant aquest virus (Figura 9 A)³⁸. A les primeres etapes de la infecció pel virus VIH-1, es necessita la presència tant de la proteïna Tat com de la seqüència TAR, qui actua com a transactivador, i que és on s'unirà la proteïna Tat per tal de d'induir la transcripció de la resta del genoma de VIH-1. En aquest estudi es proposa la construcció d'un vector on a la seqüència TAR hi dugui clonat el gen de la toxina *MazF*, per a que d'aquesta forma quan la proteïna Tat s'uneixi a la seqüència TAR la toxina es veurà expressada. Així, quan limfòcits T CD4+ portadors d'aquest vector són infectats amb el virus, es produeix la producció de toxina i una conseqüent degradació dels mRNAs del virus, per la qual cosa la replicació del virus es veu inhibida. A més a més, es va observar que els nivells de toxina que es produïen no causaven danys cel·lulars importants ni impedièn el creixement cel·lular. Aquesta teràpia només s'ha provat a macacos rhesus amb resultats similars als obtinguts a l'estudi anterior. Tot i que es tracta d'un estudi molt recent, aporta noves vies i estratègies per tal de combatir el virus del VIH mitjançant la utilització de sistemes TA^{35,38}.

El sistema TA *mazEF* també s'utilitza per investigar possibles eines antivirals davant el virus de l'hepatitis C (Figura 9 B). En aquest cas, els experiments anaven orientats a aprofitar la

particularitat de les proteases virals, que actuen amb molta especificitat, com és el cas de la proteasa NS3 imprescindible per a la replicació del virus de l'hepatitis C. El protocol es va basar en fusionar l'extrem N-terminal de la toxina *MazF* amb l'extrem C-terminal de l'antitoxina *MazE* mitjançant una seqüència de connexió que es reconeguda específicament per la proteasa NS3. Així, l'exposició de d'aquesta seqüència fusionada amb la proteasa deriva en un tall que allibera la toxina, qui d'aquesta forma és capaç de dur a terme la seva funció ja que es troba activa. Partint de la mateixa idea, un altre estudi va mostrar com, quan es realitza una fusió entre la toxina completa i una part de l'antitoxina amb una seqüència connectora que NS3 reconeix específicament, aquesta proteïna fusionada no afectava a cèl·lules sanes, és a dir, no infectades pel virus, però que si produïa la mort de totes aquelles cèl·lules infectades pel virus o que expressaven la proteïna NS3. En aquests casos, els possibles efectes adversos que es podrien derivar de l'alliberació de la toxina, com el fet que pogués afectar a mRNAs eucariotes, es controlaria amb les dosis administrades de toxina, de manera que pogués únicament afectar al virus però no perjudicar la cèl·lula³⁵.

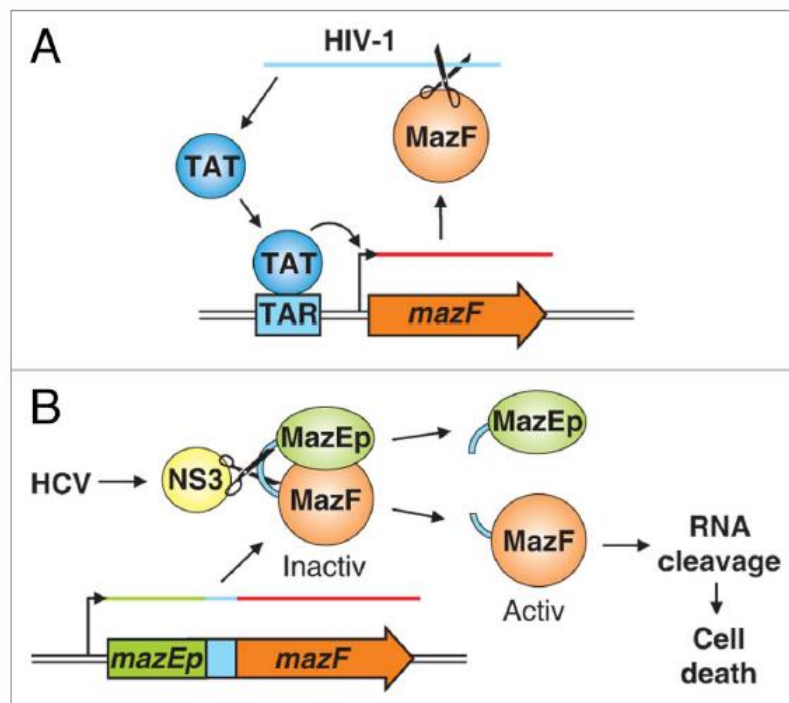


Figura 9. Esquema de les possibles aplicacions dels sistemes TA com a agents antivirals. A) Utilització de la toxina *MazF* del sistema TA *mazEF* com a agent antiviral al virus de la immunodeficiència humana (VIH). **B)** Utilització de la toxina *MazF* del sistema TA *mazEF* com a agent antiviral al virus de la hepatitis C. Figura adaptada de Unterholzner, *et al.*, 2013.

Per altra banda, s'ha avaluat la utilitat dels sistemes TA en relació a la contenció d'organismes modificats genèticament. Aquests organismes solen ser habituals en l'àmbit biotecnològic, però en els darrers anys ha anat augmentat l'interès en la possibilitat d'alliberar alguns d'aquests organismes al medi ambient, ja que podrien resultar d'utilitat a l'agricultura per netejar camps contaminants o com una forma de controlar l'acció de fungicides i pesticides. Ara bé, aquesta alliberació ha de ser totalment segura i controlada, i és per aquest motiu que cada vegada més s'intenten trobar estratègies per millorar aquestes condicions. Una de les principals formes de contenció, i que podria arribar a ser de les més efectives, és l'autodestrucció d'aquests organismes mitjançant gens que eliminin les bacteris

un cop han realitzat la seva funció³⁹. Un dels principals entrebancs d'aquesta solució és la possibilitat de que sorgeixin mutacions que dotin a aquests organismes de resistència a aquests gens supressors i per tant les facin sobreviure. Per aquest motiu, els sistemes TA sonen com a possibles candidats per dur a terme aquesta contenció biològica⁴⁰.

Un dels primers estudis realitzats sobre aquest tema, estudiava si el sistema *reIEB* d'*E. coli* podia utilitzar-se per controlar la proliferació de cèl·lules eucariotes, en concret cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae*. Es va comprovar que l'expressió de la toxina *ReIE* inhibeix el creixement d'aquests llevats i que a aquestes cèl·lules el sistema TA també funciona, ja que aquelles cèl·lules que expressen l'antitoxina experimenten uns nivells de creixement molt superiors a aquelles cèl·lules que no ho fan. Això obre la porta a poder aplicar aquests tipus de sistemes a cèl·lules eucariotes. Aleshores, aquest sistema *reIEB* podria aplicar-se de la següent forma: l'expressió de la toxina vendrà regulada per un promotor per glucosa, mentre que l'expressió de l'antitoxina serà constant. D'aquesta forma, les cèl·lules només seran viables en medis que contenguin glucosa. Per exemple, si estam parlant d'un procés industrial de fermentació, on un vessament d'organismes modificats és un gran risc, aquest sistema de repressió per glucosa poden significar un gran avanç. En condicions de fermentació, la toxina es troba reprimida per la gran presència de glucosa i si alguna cèl·lula escapa d'aquestes condicions serà autodestruïda, ja que la baixa presència de glucosa del medi deixarà de reprimir el gen de la toxina, qui podrà dur a terme la seva funció destruint la cèl·lula³⁹.

A més a més del sistema *reIEB*, el sistema TA *Kid/Kis* del plasmidi R1 d'*E. coli* també pareix ser funcional a cèl·lules eucariotes. De forma general, ha pogut veure's com la toxina *Kid* és capaç d'induir l'apoptosi a algunes cèl·lules eucariotes tals com llevats, *Xenopus laevis* i cèl·lules humanes, i que com a tots els sistemes TA aquest efecte es veu contrarestat per l'antitoxina *Kis*. Els efectes tant de la toxina com de l'antitoxina podrien ser regulats *in vivo* a través del control dels seus nivells, mitjançant una regulació transcripcional per a aquests gens. Així, l'expressió d'ambdós gens, el de la toxina i el de l'antitoxina, podrien utilitzar-se per modular la proliferació i la mort cel·lular a cèl·lules eucariotes, promovent una mort cel·lular selectiva. Aquesta aplicació seria molt important en termes de càncer, sobretot si s'aconseguís dirigir de forma selectiva l'efecte de la toxina a les cèl·lules canceroses, mentre que les cèl·lules sanes no es veurien danyades per la protecció que els conferiria l'antitoxina⁴¹.

Un exemple concret on s'ha aplicat aquesta mort cel·lular selectiva mitjançant el sistema TA *Kid/Kis* és a l'experiment realitzat a peix zebra (*Danio rerio*) amb l'objectiu de determinar el paper de les cèl·lules germinals durant la diferenciació sexual. Un dels mètodes utilitzats va ser provocar la mort de les cèl·lules germinals mitjançant l'acció de la toxina i protegint les cèl·lules somàtiques amb l'antitoxina. És un bon exemple de com aquest sistema pareix funcionar a cèl·lules eucariotes, i planteja un futur prometedor en quant a les seves aplicacions⁴².

La conclusió a la que podem arribar de totes aquestes aplicacions, on el paper dels sistemes TA és vital, és que la gran majoria d'elles es troben en una fase encara d'estudi, on es necessari seguir investigant i sobretot avaluant els riscos i les possibles implicacions d'aquestes tècniques.

Conclusions

Els sistemes Toxina-Antitoxina (TA) estan formats per dos elements essencials: la toxina, element amb major estabilitat i de caràcter proteic, i l'antitoxina, que presenta una menor estabilitat i pot ser una proteïna o un sRNA. Aquesta diferència d'estabilitat entre ambdós components és una característica important alhora d'utilitzar aquests sistemes com a eines biotecnològiques o clíniques.

Tot i que les funcions d'aquests tipus de sistemes no es troben del tot clares, i no s'ha arribat a establir un consens, les evidències més clares apunten a una implicació en control i millora de la supervivència en condicions d'estrès nutricional, així com la seva participació a esdeveniments de mort cel·lular programada.

Fins al moment, els sistemes TA s'han classificat en 5 tipus de sistemes (I-V) en funció de la seva organització estructural i del seu mecanisme d'acció. Els tres primers tipus de sistemes són els que es troben millor caracteritzats, d'on se'n coneixen més exemples i on la investigació és més exhaustiva, essent especialment rellevants els sistemes de tipus II per la gran quantitat d'exemples que se'n coneixen i la diversitat d'organismes on poden trobar-se.

El primer sistema TA va ser descobert a un plasmidi i posteriorment es va comprovar la seva presència cromosomes de bacteris i arqueobacteris, i certs estudis apunten a una possibilitat de trobar-los a fongs el que suposaria la seva presència també a organismes eucariotes.

La distribució d'aquests sistemes és molt diversa, entre diferents espècies i entre organismes aïllats de la mateixa espècie. Fins al moment no han pogut relacionar-se massa factors amb el número de sistemes TA que presenta un organisme, si ha pogut establir-se però que hi hauria una relació directa entre la patogenicitat que presenta un organisme i el número de sistemes TA.

Per les seves característiques estructurals i funcionals, els sistemes TA suposen una eina recurrent d'experimentació per a possibles aplicacions a diversos camps, especialment en els darrers anys on la informació es cada vegada més àmplia i més accessible. Entre els diferents usos que s'estan donant a aquests sistemes, cal destacar aquells orientats al camp de la biotecnologia, la medicina o el medi ambient.

Una de les principals aplicacions dels sistemes TA és a l'estabilització de plasmidis durant processos de producció de DNA o proteïnes. Aquests sistemes donen l'oportunitat d'eliminar la utilització d'antibiòtics durant aquests processos, aspecte d'importància a nivell econòmic, ambiental i de contaminació de cultius o productes. A més a més, pareix que podrien resultar útils a nivell clínic en tractaments com la teràpia gènica. Altres aplicacions interessants són el seu ús com a vectors de selecció positiva en processos de clonació de DNA, on ja s'han desenvolupat diverses estratègies que milloren la rendibilitat del procés, o com a eines per a la producció de proteïnes recombinants, de gran interès sobretot a gran escala.

D'altra banda, la seva aplicació més important i que més esperances planteja en un futur és a nivell mèdic i farmacològic, amb la intenció de desenvolupar nous fàrmacs antimicrobians i antivirals més efectius.

Finalment, una de les aplicacions a nivell ambiental més prometedora és la seva utilització per a la contenció biològica d'organismes modificats genèticament, que permetria l'alliberació d'aquests organismes de forma controlada i segura per múltiples propòsits.

Totes aquestes aplicacions encara es troben en fases molt primerenques d'estudi, i són poques d'elles les que ja s'apliquen amb seguretat. Tot i així, els sistemes TA suposen una bona alternativa en molts casos i la seva utilitat al món científic és inqüestionable. El que si queda molt clar, és que el coneixement dels sistemes TA en profunditat, les seves característiques estructurals, les seves funcions i la seva distribució dins el món microbià són de vital importància per poder desenvolupar tècniques i aplicacions a tots els nivells.

Bibliografia

1. Goeders, N. & Van Melderen, L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins (Basel)*. **6**, 304–324 (2013).
2. Wen, Y., Behiels, E. & Devreese, B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog. Dis.* **70**, 240–9 (2014).
3. Schuster, C. F. & Bertram, R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* **340**, 73–85 (2013).
4. Mruk, I. & Kobayashi, I. To be or not to be: Regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res.* **42**, 70–86 (2014).
5. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. & Rozhon, W. Biology , identification , and application Toxin – antitoxin systems. 1–13 (2013).
6. Fozo, E. M. New type I toxin-antitoxin families from 'wild' and laboratory strains of *E. coli*: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. *RNA Biol.* **9**, 1504–1512 (2012).
7. Faridani, O. R., Nikravesh, 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.* **34**, 5915–5922 (2006).
8. Gerdes, K. & Wagner, E. G. H. RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 117–124 (2007).
9. Kawano, M. Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: hok/sok, ldr/rdl, symE/symR. *RNA Biol.* **9**, 1520–7 (2012).
10. Durand, S., Jahn, N., Condon, C. & Brantl, S. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol.* **9**, 1491–7 (2012).
11. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol. Direct* **4**, 19 (2009).

12. Park, S. J., Son, W. S. & Lee, B. J. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 1155–1167 (2013).
13. Afif, H., Allali, N., Couturier, M. & Van Melderen, L. The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. *Mol. Microbiol.* **41**, 73–82 (2001).
14. 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.* **16**, 1676–1688 (2007).
15. Yamaguchi, Y. & Inouye, M. Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 779–790 (2011).
16. López-Villarejo, J., Lobato-Márquez, D. & Díaz-Orejas, R. Coupling between the Basic Replicon and the Kis-Kid Maintenance System of Plasmid R1: Modulation by Kis Antitoxin Levels and Involvement in Control of Plasmid Replication. *Toxins (Basel)*. **7**, 478–492 (2015).
17. Goeders, N., Drèze, P. L. & Van Melderen, L. Relaxed cleavage specificity within the rele toxin family. *J. Bacteriol.* **195**, 2541–2549 (2013).
18. Schumacher, M. A. *et al.* Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* **323**, 396–401 (2009).
19. Fineran, P. C. *et al.* The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 894–899 (2009).
20. Blower, T. R. *et al.* Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6158–6173 (2012).
21. Samson, J. E., Spinelli, S., Cambillau, C. & Moineau, S. Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system. *Mol. Microbiol.* **87**, 756–768 (2013).
22. 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.* **84**, 979–989 (2012).
23. Wang, X. *et al.* A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology* **8**, 855–861 (2012).
24. Van Melderen, L. & De Bast, M. S. Bacterial toxin-Antitoxin systems: More than selfish entities? *PLoS Genet.* **5**, (2009).
25. Yamaguchi, Y., Park, J.-H. & Inouye, M. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 61–79 (2011).
26. Pandey, D. P. & Gerdes, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 966–976 (2005).

27. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4360–4377 (2013).
28. Lepiae, R. *et al.* Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5513–5525 (2011).
29. Kroll, J., Klintner, S., Schneider, C., Voß, I. & Steinbüchel, A. Plasmid addiction systems: Perspectives and applications in biotechnology. *Microb. Biotechnol.* **3**, 634–657 (2010).
30. Szpirer, C. Y. & Milinkovitch, M. C. Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. *Biotechniques* **38**, 775–781 (2005).
31. Vandermeulen, G., Marie, C., Scherman, D. & Pr eat, V. New Generation of Plasmid Backbones Devoid of Antibiotic Resistance Marker for Gene Therapy Trials. *Mol. Ther.* **19**, 1942–1949 (2011).
32. Stieber, D., Gabant, P. & Szpirer, C. Y. The art of selective killing: Plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications. *Biotechniques* **45**, 344–346 (2008).
33. Bernard, P., Gabarit, P., Bahassi, E. M. & Couturier, M. Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* **148**, 71–74 (1994).
34. Suzuki, M., Zhang, J., Liu, M., Woychik, N. a. & Inouye, M. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol. Cell* **18**, 253–261 (2005).
35. Chan, W. T., Balsa, D. & Espinosa, M. One cannot rule them all: Are bacterial toxins-antitoxins druggable? *FEMS Microbiol. Rev.* 522–540 (2015). doi:10.1093/femsre/fuv002
36. Williams, J. J. & Hergenrother, P. J. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends in Microbiology* **20**, 291–298 (2012).
37. Lioy, V. S., Rey, O., Balsa, D., Pellicer, T. & Alonso, J. C. A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* **63**, 31–39 (2010).
38. Chono, H. *et al.* Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *E. coli* mRNA interferase. *Hum. Gene Ther.* **22**, 35–43 (2011).
39. Kristoffersen, P., Jensen, G. B., Gerdes, K. & Piřkur, J. Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5524–5526 (2000).
40. Torres, B., Jaenecke, S., Timmis, K. N., Garc a, J. L. & D az, E. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. *Microbiology* **149**, 3595–3601 (2003).
41. De la Cueva-M endez, G., Mills, A. D., Clay-Farrace, L., Diaz-Orejas, R. & Laskey, R. a. Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J.* **22**, 246–251 (2003).

42. Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G. & Raz, E. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4074–4079 (2005).