

Ksenia Szymanek\*, Andrzej Młynarczyk, Grażyna Młynarczyk

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2008 r.

1. Wstęp. 2. Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (TCSTS – two component signal transduction system). 2.1. System *agr*. 2.1.1. Organizacja genetyczna systemu *agr*. 2.1.2. Struktura i dojrzewanie cząsteczki autoinduktora AIP. 2.1.3. Aktywacja przekazywania sygnału w TCSTS. 2.1.3.1. Oddziaływanie ligand-sensor w systemie quorum sensing. 2.1.3.2. Aktywacja domeny białka efektora – AgrA. 2.1.4. Region intergeniczny systemu *agr*. 2.1.5. RNA III. 2.1.5.1. Struktura i organizacja. 2.1.5.2. Funkcja. 2.1.6. Regulacja systemu *agr*. 2.1.6.1. Autoregulacja zależna od AgrA. 2.1.6.2. Regulacja zależna od SarA. 2.1.6.3. Regulacja zależna od *rap/traP*. 2.1.7. Zróżnicowanie i znaczenie systemu *agr*. 2.2. Inne systemy TCSTS uczestniczące w regulacji ekspresji genów *S. aureus*. 3. Inne czynniki regulacyjne ekspresji genów *S. aureus*, nie będące TCSTS. 4. Podsumowanie

### Regulatory systems of gene expression in *Staphylococcus aureus*

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is one of the most common human pathogens. The expression of genes in *S. aureus*, including these encoding virulence factors, seems to be dependent on many inner- and extracellular agents (pH, CO<sub>2</sub>, cell density, autoinducer concentration, the phase of growth). Each of these signals may activate a distinct cell regulatory system via a different pathway. Up to date many molecular mechanisms engaged in the global regulation of virulence factors have been identified. Sixteen of them, for example: *agrA/C*, *saeS/R*, *arlS/R*, *srrA/B* (*srhS/R*) *lytS/R*, *rap/traP* belong to the two-component signal transduction systems. Each of them consists of a sensor histidine kinase and a response regulator protein. These systems, including quorum sensing systems, are sensitive to environmental signals. The second class of global regulatory systems are proteins belonging to the SarA-family of proteins, which together with other alternative transcriptional factors, such as RNA III, MgrA, Rot, Sigma<sub>B</sub>, may determine the virulent phenotype by binding to the promoter regions of regulated genes. Moreover, the mechanisms of bacterial pathogenesis may be modulated in the proteolytic way by ClpP protein and also at the translational level by the antisense mechanism involving RNA III molecules. Thanks to these regulatory mechanisms, bacteria are able to colonize and cause infections almost in every tissue of human body.

1. Introduction. 2. TCSTS – two component signal transduction system. 2.1. *agr* system. 2.1.1. Genetic organization of *agr*. 2.1.2. Structure and maturation of autoinducer peptide (AIP). 2.1.3. Activation of signal transduction in TCSTS. 2.1.3.1. Ligand-sensor interaction in the quorum sensing system. 2.1.3.2. Activation of response regulator domain of AgrA. 2.1.4. Intergenic region of *agr*. 2.1.5. RNA III. 2.1.5.1. Structure and organization. 2.1.5.2. Function. 2.1.6. Regulation of *agr* system. 2.1.6.1. AgrA-dependent autoregulation. 2.1.6.2. SarA-dependent regulation. 2.1.6.3. *rap/traP*-dependent regulation. 2.1.7. Diversity and role of *agr* system. 2.2. Other TCSTS mechanisms of regulation of gene expression in *S. aureus*. 3. Non-TCSTS mechanisms of regulation of gene expression in *S. aureus*. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *agr*, czynniki wirulencji, dwuskładnikowe systemy regulacyjne, RNA III, *Staphylococcus aureus*

**Key-words:** *agr*, RNA III, *Staphylococcus aureus*, two component regulatory systems, virulence factors

## 1. Wstęp

Aktywność różnych genów w komórkach określonego szczepu *Staphylococcus aureus* nie jest jednako- wa i często zależy od warunków środowiskowych. Ich ekspresja podlega najczęściej złożonym procesom regulacyjnym i może przebiegać na różnych poziomach oraz przy wykorzystaniu różnych mechanizmów. Naj- częściej jest ona uzależniona od: i) warunków środowi- ska, takich jak: stężenie tlenu i dwutlenku węgla, pH, ii) gęstości populacji komórek bakteryjnych, iii) fazy wzrostu hodowli oraz iv) zawartości w środowisku ze- wnętrnym tzw. cząsteczek AIP (autoinducing pepti- de). Dotychczas u *S. aureus* zidentyfikowano co naj- mniej kilkanaście różnych systemów regulatorowych,

które można przyporządkować do dwóch grup czynni- ków uczestniczących w globalnej regulacji ekspresji genów, są to: dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału, aktywne również w regulacji quorum sensing (np.: *agrA/C*, *saeS/R*, *srrA/B*, *arlS/R*, *lytS/R*, *rap/traP*) oraz rodzina białek SarA [8, 13]. Białka sensorowe układów dwuskładnikowych umożliwiają rozpozna- wanie czynników pozakomórkowych, podczas gdy regulatory odpowiedzi, w połączeniu z alternatywny- mi czynnikami transkrypcyjnymi (np.: Rot, Sigma<sub>B</sub>, MgrA) i rodziną białek SarA (SarA, SarR, SarS, SarT, SarU, SarV, SarX, SarY, SarZ) działają jako efek- tory wewnątrz złożonej sieci regulacyjnej komórki bakteryjnej. Ponadto modyfikacja ekspresji genów może przebiegać na poziomie inicjacji translacji, przy

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Chałubiń- skiego 5, 02-004 Warszawa, tel.: (22) 628 27 39, e-mail: xenia.szymanek@wum.edu.pl

wykorzystaniu mechanizmu małych antysensownych cząsteczek RNA, RNA III lub na poziomie dojrzałego produktu genu, przy udziale proteaz Clp [8, 61, 66].

## 2. Dwuskładnikowe systemy przekazywania sygnału (TCSTS – two component signal transduction system)

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne warunkują zdolność drobnoustrojów do odbierania sygnałów ze środowiska zewnętrznego. Są one wysoce konserwatywne wśród organizmów prokariotycznych. W ich skład zawsze wchodzi dwa elementy: białko sensorowe oraz białko regulatorowe (efektorowe). Sensorem jest enzym o aktywności kinazy histydynowej, zlokalizowany w błonie komórkowej. Zawiera on domenę zewnętrzną (N-koniec białka), która odbiera sygnał środowiskowy oraz domenę wewnątrzkomórkową (C-koniec białka), która wykazuje aktywność kinazy histydynowej. Podczas aktywacji, następuje ATP-zależna autofosforylacja substratowa reszty histydynowej, a następnie przeniesienie reszty fosforanowej na białko regulatora. W cząsteczce regulatora odpowiedzi na sygnał, fosforylacji ulega silnie konserwowana, znajdująca się w domenie N-końcowej reszta asparaginianowa. Prowadzi to do aktywacji regulatora oraz zapoczątkowuje

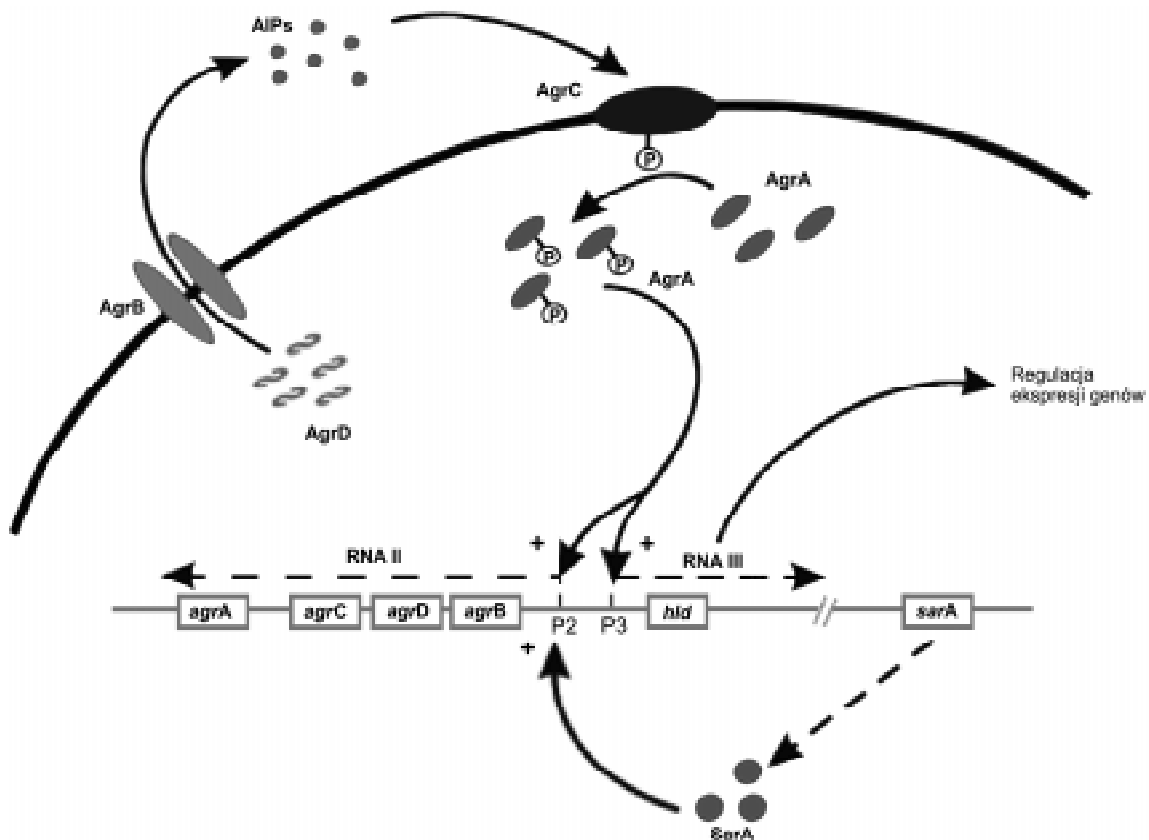
kaskadę zdarzeń, prowadzących do powstania aktywnego czynnika kontrolującego poziom ekspresji różnych genów, najczęściej na poziomie transkrypcji [75]. Funkcje czynników transkrypcyjnych, wiążących DNA poniżej lub powyżej sekwencji promotorowych genów, mogą pełnić różne białka np. w systemie *agr* u *S. aureus* AgrA i/lub kwasy nukleinowe np. RNA III systemu *agr* [36, 43].

U *S. aureus* zostało dotychczas poznanych i opisanych kilka systemów dwuskładnikowych m.in. *agrA/C*, *saeR/S*, *srrA/B*, *arI/R/S*, *lytR/S*, *rapI/traP* [3, 9, 27, 29, 47, 76]. Uczestniczą one w globalnych systemach regulacyjnych oraz bezpośrednio w kontroli ekspresji genów kodujących zarówno czynniki wirulencji, białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej, jak i białka metabolizmu podstawowego. Do tej pory u *S. aureus* najlepiej poznany został system *agr* (accessory gene regulator) [74].

### 2.1. System *agr*

#### 2.1.1. Organizacja genetyczna systemu *agr*

System *agr* u *S. aureus* jest kodowany przez geny zlokalizowane na chromosomie. Składa się on z fragmentu DNA o wielkości ~3 kpz (Rys. 1), kodującego dwa transkrypty: RNAII i RNAIII, które ulegają transkrypcji z dwóch odrębnych promotorów, odpowiednio



Rys. 1. Schemat organizacji oraz regulacji systemu *agr*

**AgrD1** MNTLFNLFDFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVPKELTQLHE  
**AgrD2** MNTLVNMFDFIILKAKAIGIVGGVNACSSLFDEPKVPAELTNLYDK  
**AgrD3** MKKLLNKVIELLVDFDNSIGYRAAYINCDFLLDEAENPKELTQLHE  
**AgrD4** MNTLLNIFDFITGVLKNIGNVASYSTCYFIMDEVEIPKELTQLHE

Rys. 2. Sekwencja aminokwasów propeptydów AgrD u *Staphylococcus aureus* ze wszystkich czterech klas. Podkreśleniem zaznaczono sekwencję peptydów AIP

P2 i P3, o przeciwnie skierowanych orientacjach [74]. Transkrypt RNAII kodują cztery geny: *agrA*, *agrB*, *agrC* i *agrD*. Białka AgrA i AgrC są elementami klasycznego systemu dwuskładnikowego, gdzie AgrC (sensor) stanowi zakotwiczoną w błonie komórkowej, zdolną do autofosforylacji kinazę histydynową, natomiast AgrA (regulator, efektor) pełni funkcję białka odpowiedzi oraz czynnika transkrypcyjnego. AgrD jest propeptydem, wydzielanego na zewnątrz komórki peptydu autoinduktora AIP (autoinducing peptide), zwanego również feromonem, które stanowi swoisty ligand dla białka sensora systemu quorum sensing. Natomiast AgrB jest złożonym białkiem transbłonowym, uczestniczącym w transporcie oraz modyfikacji posttranslacyjnej AgrD [8, 27, 74].

Transkrypt RNAIII koduje gen *hld* hemolizyny  $\delta$  oraz pełni funkcje regulatorowe w aktywacji i/lub represji ekspresji genów systemu *agr*, a także licznych czynników wirulencji zarówno tych związanych z błoną komórkową, jak i wydzielanych na zewnątrz komórki [6, 69]. Schemat pokazujący całościowo działanie systemu *agr* został przedstawiony na rys. 1.

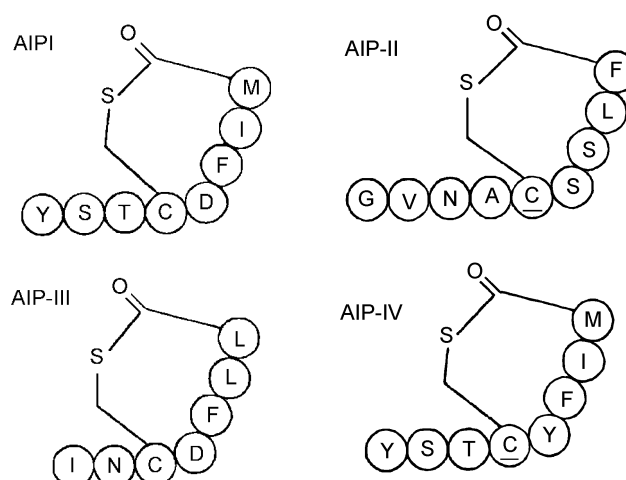
### 2.1.2. Struktura oraz dojrzewanie cząsteczki autoinduktora AIP

Peptyd AIP gronkowca złocistego jest małą cząsteczką zbudowaną z 7 do 9 aminokwasów, zawierającą w swojej strukturze pięcioczłonowy pierścień laktonowy [41, 54]. W strukturze genu *agrD* obserwuje się występowanie zjawiska polimorfizmu, co przekłada się na znaczne zróżnicowanie struktury I-rzędowej peptydów AgrD oraz AIP. Zróżnicowanie dotyczy również produktów genów *agrB* oraz *agrC*, czyli białek ściśle związanych z modyfikacją, sekrecją AgrD oraz aktywacją sensora AgrC. Na podstawie analizy sekwencji genów *agrB*, *agrC* i *agrD*, wyróżnia się obecnie u *S. aureus*, cztery grupy *agr*, oznaczone jako *agr-I*, *agr-II*, *agr-III* i *agr-IV* [41]. Różnice w sekwencji propeptydów *agrD* (AgrD-I, AgrD-II, AgrD-III i AgrD-IV) oraz peptydów AIP (AIP-I, AIP-II, AIP-III, AIP-IV) u poszczególnych czterech grup *agr* przedstawiono odpowiednio na rys. 2 i 3 [41, 54].

Propeptydy AgrD ze wszystkich czterech grup są niedojrzałymi postaciami odpowiednich peptydów AIP. Każdy z nich zawiera na N-końcu amfoteryczną

strukturę  $\alpha$ -helikalną, która umożliwia zakotwiczenie produktu w błonie komórkowej oraz silnie hydrofilną C-końcową domenę, która pozostaje niezakotwiczona w cytoplazmie [99]. Sekwencja autoinduktora znajduje się w środkowej części propeptydu. Może ona zawierać, w zależności od klasy, 7 do 9 aminokwasów. Cechą wspólną dla wszystkich cząsteczek AIP jest obecność reszty cysteiny w piątej pozycji od C-końca [41, 57, 73]. Poza tym jedynie cząsteczki autoinduktora z grupy I i IV mają niemal identyczną strukturę I-rzędową, różniącą się tylko jedną pozycją aminokwasu w pozycji czwartej od C-końca (u AgrD-I – reszta kwasu asparaginowego D, u AgrD-IV – reszta tyrozynowa Y) [54, 60]. W strukturze dojrzałego peptydu jest obecny pierścień laktonowy, zbudowany z pięciu aminokwasów, w którym znajduje się wiązanie tioestrowe, wytworzone między grupami: siarkowodorową silnie konserwowanej reszty cysteinowej, a karboksylową ostatniego aminokwasu na C-końcu peptydu (Rys. 3) [57, 60].

Przekształcenie propeptydu AgrD w dojrzałą cząsteczkę autoinduktora, obejmuje cztery etapy. Są nimi: dwa cięcia proteolityczne, wytworzenie pierścienia laktonowego i transport na zewnątrz komórki. Ważną rolę w modyfikacji posttranslacyjnej AgrD odgrywa struktura  $\alpha$ -helikalna. Umożliwia ona zagnieżdżenie propeptydu w błonie komórkowej w pobliżu białka AgrB, które pełni podwójną funkcję: endopeptydazy



Rys. 3. Struktura cząsteczek autoinduktora (AIP) ze wszystkich czterech grup *agr*

cysteinowej oraz transportera w systemie transportu typu ABC (ATP-binding cassette) [99].

AgrB jest białkiem transbłonowym, złożonym z sześciu podjednostek o strukturze  $\alpha$ -helikalnej zlokalizowanych w błonie komórkowej, oddzielonych krótkimi pętlami znajdującymi się zarówno po jej stronie zewnętrznej, jak i cytoplazmatycznej. Cztery peryferyczne położone struktury mają właściwości silnie hydrofobowe i najprawdopodobniej uczestniczą w obróbce propeptydu AgrD, natomiast dwie środkowe spirale, o właściwościach hydrofilowych, stanowią potencjalny kanał transportera [81, 97]. Z badań przeprowadzonych w 2004 roku przez Zhang i wsp. wynika, że za przetwarzanie propeptydu AgrD-I jest odpowiedzialny fragment AgrB-I pomiędzy 43 a 67 aminokwasem, natomiast za analogiczną obróbkę AgrD-II, fragment AgrB-II, zawierający aminokwasy w pozycji od 126 do 141. AgrB-I i AgrB-II wykazują 60% homologii i pomimo tego, że regiony pomiędzy 126 a 141 aminokwasem różnią się tylko w czterech pozycjach, analogiczne procesy przeprowadzają z udziałem różnych domen. Dotychczas nie wyjaśniono przyczyn takiego podziału funkcji [98].

W późniejszych badaniach Zhang i wsp. podjęli próbę znalezienia miejsca w strukturze białka AgrB, stanowiącego potencjalne centrum aktywne proteazy [77]. Okazało się, że jedynie reszty dwóch aminokwasów – histydyny w pozycji 77 (H77) i cysteiny (C84), są niezbędne do wytworzenia prawidłowego białka AIP. Ponad to reszty obydwu aminokwasów są zlokalizowane po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, tuż przy powierzchni, co ułatwia im dostęp do docelowego miejsca działania. Centrum aktywne endopeptydazy rozpoznaje w cząsteczce AgrD silnie konserwowaną sekwencję asparaginian-glutaminian, znajdującą się tuż za sekwencją autoinduktora. Następuje pierwsze cięcie proteolityczne i uwolnienie grupy karboksylowej na C-końcu propeptydu. W tym samym czasie wysoce reaktywna grupa siarkowodorowa reszty cysteinowej C84 dokonuje ataku na resztę SH cysteiny propeptydu, prowadząc do jej aktywacji. Następuje reakcja transestryfikacji i wytworzenie wiązania tioestrowego z grupą karboksylową ostatniego aminokwasu. W ten sposób reszty pięciu aminokwasów zostają zamknięte w pierścieniu laktonowym [77].

Słabiej poznany jest mechanizm modyfikacji posttranslacyjnej N-końca AgrD. Brak jest uniwersalnego motywu tuż przed sekwencją AIP, natomiast konserwowany motyw izoleucyna-glicyna znajduje się w różnej odległości od pierwszego aminokwasu autoinduktora w cząsteczkach AIP-I/IV, AIP-II oraz AIP-III. Wiadomo jednak, że AgrB-I może przeprowadzać prawidłową modyfikację N-końca zarówno AgrD-I, jak i AgrD-III, prowadząc do powstania aktywnych cząsteczek AIP-I i AIP-III [41]. Najprawdopodobniej jest

to proces bardziej skomplikowany i uczestniczą w nim również inne enzymy bądź struktury komórki.

Aktywny transport zmodyfikowanych cząsteczek AgrD przez kanał błonowy białka AgrB jest ostatnim etapem powstawania peptydu AIP [27].

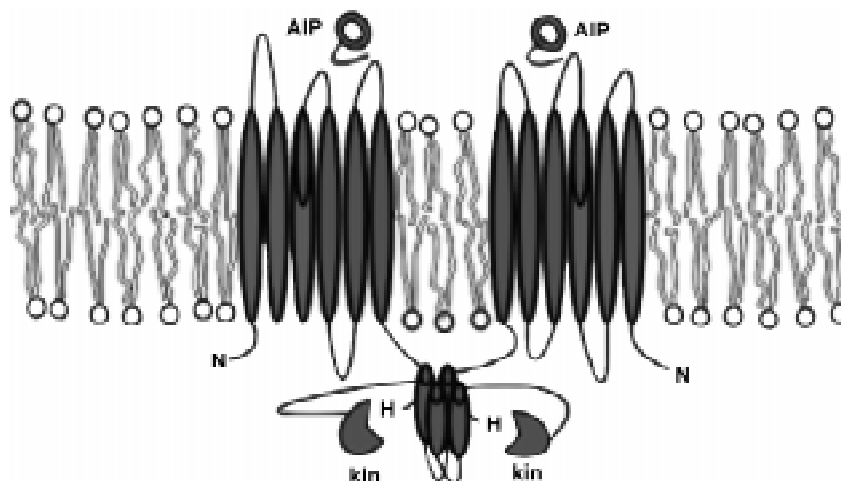
### 2.1.3. Aktywacja przekazywania sygnału w TCSTS

#### 2.1.3.1. Oddziaływanie ligand-sensor w systemie quorum sensing

Wydzielone na zewnątrz komórki cząsteczki autoinduktora mogą stanowić ligandy dla swoistych receptorów. Jeżeli stężenie AIP w środowisku osiągnie pewną krytyczną wartość, oddziaływanie ligand-receptor staje się na tyle silne by nastąpiła aktywacja sensora [42]. Funkcję sensorową pełni AgrC [48]. Jest to białko o masie cząsteczkowej 46 kDa, o właściwościach kinazy histydynowej I typu (EnvZ-like histidine kinase), pełniące ważną funkcję w procesach komórkowego przekazywania sygnału. Występuje w komórce w postaci homodimeru, zlokalizowanego po części w błonie komórkowej i w cytoplazmie. Składa się z pięciu domen, nazwanych: S (sensor), DHp (dimerization histidine phosphotransfer), CA (catalytic ATP-binding), RR (response regulator) i HPt (histidine-containing phosphotransfer) [17, 48]. Region sensora składa się z dwóch układów domen transbłonowych, z których każda zawiera sześć struktur  $\alpha$ -helikalnych. Stanowią one miejsce rozpoznawania i wiązania ligandu. C-końiec domeny S przechodzi w domenę DHp, złożoną z czterech spiral  $\alpha$ -helikalnych, zawierających w swojej strukturze dwie cząsteczki silnie konserwowanej histydyny (Rys. 4). Odpowiada ona zarówno za dimeryzację jak i, dzięki obecności pierścienia imidazolowego, przenoszenie grup fosforanowych [17, 48].

Domena DHp jest bezpośrednio połączona ze strukturą CA. Jest to domena silnie konserwowana u *Prokaryota*, zawiera centrum aktywne o właściwościach ATP-azy, dzięki czemu może pełnić funkcję katalityczną w procesie fosforylacji [17, 48].

Oddziaływanie AIP z receptorem jest wysoce specyficzne. Zatem jedynie związanie ligandu z właściwym mu receptorem, czyli AIP-I z AgrC-I, AIP-II z AgrC-II itd., spowoduje aktywację szlaku przekazywania sygnału. Natomiast wiązania niespecyficzne działają antagonistycznie i powodują zablokowanie układu TCSTS [52]. Wydaje się, że cząsteczki autoinduktora mają jednakowe powinowactwo do receptorów każdego typu i ich wiązanie następuje na zasadzie kompetycyjnego wypierania, jednakże analizy ilościowe wykazały, że jest to mechanizm bardziej złożony. Okazuje się, że mechanizm oddziaływania antagonistycznego jest znacznie mniej skomplikowany niż agonistycznego [53]. Przeprowadzone badania dowodzą, że modyfikacja strukturalna w cząsteczce AIP polegająca na zmianie pierścienia tiolaktonowego na laktamowy



Rys. 4. Schemat budowy cząsteczki sensora AgrC

lub laktonowy, powoduje utratę funkcji aktywatora układu dwuskładnikowego, natomiast nie wpływa na zdolność do blokowania układów niespecyficznych [57]. Dotychczas nie został dokładnie wyjaśniony mechanizm wiązania cząsteczek autoinduktora z receptorem. Wiadomo, że w strukturze AIP kluczową rolę odgrywa makropierścień oraz, że jest to oddziaływanie wysoce specyficzne. Zmiana jednego aminokwasu, jak to jest w przypadku cząsteczek AIP-I i AIP-IV, powoduje utratę zdolności do oddziaływania agonistycznego z sensorem. Z kolei doświadczenia, w których badano interakcje AIP-AgrC z wykorzystaniem zmodyfikowanych cząsteczek AIP, zredukowanych do samego pięciocząłowego pierścienia tiolaktonowego wykazały, że makropierścień blokuje aktywację TCS wszystkich czterech typów [53]. Jest on zatem wystarczający do wiązania receptora i inhibicji, ale do aktywacji kinazy histydynowej jest niezbędna również obecność krótkiego ogonka aminokwasowego [57]. Nie wiadomo, które dokładnie aminokwasy odgrywają kluczową rolę w tym procesie oraz czy większe znaczenie ma ich rodzaj, czy lokalizacja. Badania dowodzą bowiem, że dla aktywności AIP-I kluczowe znaczenie ma kwas asparaginowy (D5), zlokalizowany w makropierścieniu, natomiast w przypadku AIP-II jest to asparagina (N3) położona w ogonku autoinduktora [57, 60]. Z kolei wyniki innych eksperymentów pokazują, że ważną rolę mogą odgrywać konserwowane na C-końcu peptydu dwa aminokwasy silnie hydrofobowe: izoleucyna (I), leucyna (L), metionina (M) lub fenyloalanina (F), ponieważ substytucja alaniną F i L w AIP-II spowodowała znaczną redukcję potencjału zarówno agonistycznego, jak i antagonistycznego autoinduktora II typu. Obecność tych hydrofobowych aminokwasów ma wpływ także na sposób wiązania ligandu do receptora. Dowiedziono bowiem, że białka fuzyjne AgrC-I:IV i AgrC-IV:I wiążą preferencyjnie AIP-I

i IV w części dystalnej (bliżej C-końca) domeny sensorowej kinazy [57].

Ponieważ wiązanie ligand-receptor jest wysoce specyficzne, pewne determinanty tej swoistości muszą występować również w strukturze cząsteczki AgrC. Dotychczasowe badania dowodzą, że ważną rolę w rozpoznawaniu i wiązaniu ligandu odgrywa C-końcowa hydrofobowa domena S receptora [94], a dokładnie reszty aminokwasowe zlokalizowane w jej centralnej, zewnątrzkomórkowej pętli [26], bowiem zamiana w strukturze AgrC-IV pięciu aminokwasów w pozycjach 100-F, 101-T, 104-V, 107-V, 116-I na analogiczne, charakterystyczne dla AgrC-I (100-Y, 101-A, 104-T, 107-S, 116-S), spowodowała zmianę specyficzności receptora [26].

Utworzenie specyficznego wiązania pomiędzy AIP, a domeną sensorową odpowiedniego białka AgrC, prowadzi do zmiany konformacji białka, która umożliwia wzajemne zbliżenie się domen DHp i CA oraz przeniesienie grupy fosforanowej z centrum katalitycznego ATP na pierścień imidazolowy histydyny, znajdującej się w rdzeniu domeny dimeryzacyjnej [17]. Następuje auto-trans-fosforylacja reszty histydynowej i tym samym aktywacja kinazy histydynowej. Następnym etapem szlaku przekazywania sygnału w komórce bakterii jest przeniesienie grupy fosforanowej z reszty histydynowej na asparaginową, znajdującą się na N-końcu białka AgrA, co prowadzi do aktywacji białka efektorowego [17, 43, 48].

#### 2.1.3.2. Aktywacja domeny białka efektoru AgrA

Białko AgrA jest drugim kluczowym elementem systemu dwuskładnikowego *agrA/C* i stanowi jego domenę RR (response regulator). AgrA jest białkiem złożonym z 238 aminokwasów, którego sekwencja jest silnie konserwowana wśród szczepów *S. aureus* u wszystkich czterech grup *agr* [65]. Najważniejszymi

Tabela I

Czynniki wirulencji *S. aureus* podlegające *agr*-zależnej pozytywnej oraz negatywnej regulacji [16, 100]

Numer ORF szczepu <i>S. aureus</i> COL	Nazwa genu	Funkcja produktu ekspresji genu
Regulacja pozytywna		
3653	<i>aur</i>	Aureolizyna
396	<i>clfB</i>	Czynnik clumping factor B
583	<i>geh</i>	Lipaza (hydrolaza estrów glicerolowych)
4061	<i>hla</i>	$\alpha$ -toksyna (hemolizyna)
1427	<i>hld</i>	$\delta$ -toksyna (hemolizyna)
1928	<i>hlgB</i>	Składnik B $\gamma$ -toksyny (hemolizyna)
1927	<i>hlgC</i>	Składnik C $\gamma$ -toksyny (hemolizyna)
667	<i>lip</i>	Lipaza triacyloglicerolowa
1175	<i>pls</i>	Białko powierzchniowe zawierające motyw LPXTG
2036	<i>set8</i>	Egzotoksyna 2
2928	<i>spIA</i>	Proteaza serynowa SplA
2929	<i>spIB</i>	Proteaza serynowa SplB
324	<i>spID</i>	Proteaza serynowa SplD
327	<i>spIF</i>	Proteaza serynowa SplF
2175	<i>sspC</i>	Proteaza
2927	–	Homolog paciorkowcowej adhezyny Emb
1029	–	Homolog białka powierzchniowego Map
4374	–	Białko powierzchniowe Map
5147	–	Homolog paciorkowcowej hemaglutyniny
4523	–	Modulina $\beta$ 2 rozpuszczalna w fenolu
Regulacja negatywna		
4081	<i>spa</i>	Powierzchniowe białko A
3910	<i>ssaA</i>	Prekursor antygeny sekretoryjnego
1941	–	Antygen miozyny

elementami strukturalnymi białka są: reszta asparaginowa na N-końcu i sekwencja LytTR na C-końcu. Reszta asparaginowa AgrA jest akceptorem grupy fosforanowej i odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji białka. Natomiast region LytTR jest odpowiedzialny za funkcję efektora [68]. Zawiera w swojej strukturze dwa zasadowe, silnie hydrofilne aminokwasy, o dużym ładunku dodatnim, które nadają dodatni charakter całej domenie C-końcowej. Dzięki tej właściwości wykazuje ona powinowactwo do DNA. Motyw LytTR rozpoznaje i wiąże się do ściśle określonej sekwencji, będącej ciągiem krótkich, niedoskonałych powtórzeń [TA][AC][CA]GTTN[AG][TG], znajdującej się w regionach promotorowych genów, nadając białku AgrA funkcję czynnika transkrypcyjnego [68]. Białko to jest pozytywnym regulatorem ekspresji obydwu transkryptów systemu *agr*, jednak wydajność wiązania do promotora P2 jest wyższa niż do P3 [43]. Wykazano, że AgrA w obecności donorów grup fosforanowych, szczególnie jeżeli są to małe cząsteczki, takie jak fosforan acetylowy, ma tendencję do tworzenia homodimerów, które charakteryzują się większą aktywnością w porównaniu z pojedynczymi cząsteczkami, zwłaszcza do promotora P2 (względem P3) [43]. Ponadto

białko AgrA pośrednio uczestniczy w regulacji transkrypcji innych genów, szczególnie tych związanych z patogennością drobnoustrojów (Tabela I) [16, 100].

#### 2.1.4. Region intergeniczny systemu *agr*

Pomiędzy promotorem P2 i P3 systemu *agr* występuje fragment DNA o długości 120 nukleotydów, który zawiera miejsca wiążące czynniki regulatorowe dla obydwu operonów. Bayer i wsp. dowiedli, że w regionie tym znajduje się 17-nukleotydowa sekwencja zawierająca ciąg kilku krótkich, odwróconych sekwencji powtórzonych, tzw. inverted repeats (IR) [5]. Poza tym w pozycjach -45 od P2 i -66 od P3 znajdują się cztery siedmionukleotydowe sekwencje powtórzone 5'-AGTTAAG-3', z których dwie środkowe obejmują IRs [67]. Wydaje się, że do tych sekwencji mogą przyłączać się czynniki transkrypcyjne, konkurując ze sobą o miejsce wiązania zarówno z P2, jak i P3. Jednak do aktywacji operonu P3 wymagana jest obecność jedynie dwóch, najbliższych położonych sekwencji powtórzonych, co sugeruje możliwość przeprowadzania niezależnej regulacji obydwóch promotorów *agr*. Poza tym w regionie promotorowym P3, pomiędzy nukleotydem -10 a -35 znajduje się 19-nukleotydowy fragment

DNA, odgrywający istotną rolę w aktywacji transkrypcji RNA III. Okazuje się bowiem, że delecja trzech nukleotydów z tego rejonu objawia się fenotypowo konstytutywną ekspresją operonu P3 [67].

### 2.1.5. RNA III

#### 2.1.5.1. Struktura i organizacja

Jest to cząsteczka RNA o wielkości 514 par zasad, kodowana przez system *agr* *S. aureus* [69, 74]. Ulega transkrypcji podczas środkowej fazy wzrostu wykładniczego hodowli [4, 92] z promotora P3, który ma orientację przeciwną do promotora P2 [74]. Cząsteczka RNA III przyjmuje skomplikowaną strukturę drugorzędową, w której występują fragmenty niesparowane, jak również sekwencje dwuniciowe [69]. RNA III zawiera 14 struktur typu „szpilka do włosów” (hairpin), z których utworzone są trzy przestrzenne domeny o strukturze  $\alpha$ -helisy (A, B i C) oraz 5'-domenę początkową (nukleotydy od 1 – 31) i 3'-domenę końcową (nukleotydy od 383 – 514). Domeny A i B stanowią środkową część cząsteczki (nukleotydy od 32–382), natomiast  $\alpha$ -helikalna domena C znajduje się w obrębie domeny 3'-końcowej. Liczne oddziaływania i parowanie nukleotydów między fragmentami początkowymi, a środkowymi i/lub końcowymi cząsteczki (A24-G30/U452-458  $\alpha$ -helisy C) (U32-A42/U371-G382  $\alpha$ -helisy B), stabilizują jej strukturę drugorzędową [69]. Jednocześnie powodują, że helisa C znajduje się w przestrzeni w pobliżu zarówno 3'-, jak i 5'-końca. Występowanie licznych niesparowanych nukleotydów w obrębie helisy C powoduje, że łatwo może dojść do wiązania innych jednoniciowych sekwencji RNA [69].

Każda struktura typu hairpin składa się z ogonka, który stanowią sparowane nukleotydy (podwójna nić) oraz z jednoniciowej pętli na szczycie. W RNA III struktury hairpin 7, 13 i 14 zawierają pętle bogate w nukleotydy cytydynowe, co jest dość nietypowe dla organizmów prokariotycznych, których genom jest bogaty w pary A-T [6]. Zatem wysoce prawdopodobne jest, że sekwencje te mogą pełnić rolę czynników wiążących DNA/RNA. W obrębie helisy B znajdują się szpilki od 2 do 11, natomiast 3'-końcowa domena obejmuje struktury 12, 13 i 14. W zależności od zawartości par A-U i G-C różna jest stabilność tych struktur, jak również ich funkcja [4, 66, 67]. Na przykład bogata w pary G-C struktura 14, jest wysoce stabilna i silnie konserwowana w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, sąsiaduje z terminatorem RNA III i wraz z nim pełni funkcję czynnika regulacyjnego [69].

Większość cząsteczki RNA III stanowią sekwencje niekodujące, jednak między 70 a 165 nukleotydem znajduje się sekwencja genu *hld*  $\delta$ -lizyny. Zawiera ona kodon start AUG i stop UAA translacji oraz sekwencję Shine-Dalgarno (GAA), która stanowi miejsce wiązania rybosomu.

#### 2.1.5.2. Funkcja

Wykazano, że 514-nukleotydowa cząsteczka RNA III pełni plejotropową funkcję. W niewielkiej części (między 70 a 165 nukleotydem) zawiera sekwencję kodującą genu *hld*. Produktem tego genu jest 26 aminokwasowe białko  $\delta$ -lizyny, posiadające właściwości cytolizyny [38]. Już badania przeprowadzone na początku lat pięćdziesiątych XX wieku wykazały, że gen *hld* jest częścią strukturalną systemu *agr*, jednak ulega transkrypcji z innego promotora (P3) znajdującego się powyżej promotora P2 i podlega pozytywnej regulacji przez system *agr* [37]. Janzon i Arvidson wykazali również rolę RNA III jako czynnika regulacyjnego, ponieważ okazało się, że mutanty pozbawione 3'-końca cząsteczki produkują  $\delta$ -lizynę z wydajnością 50–75% niższą w porównaniu ze szczepami dzikimi. Dowiedziono również, że mutacja, polegająca na delekcji sekwencji RNA III przez zastąpienie, daje podobny efekt fenotypowy co mutacje w genie *agrA*, czyli powoduje spadek ekspresji genów kodujących egzoproteiny, takie jak hemolizyna  $\alpha$ , proteaza serynowa, metaloproteaza i jednocześnie powoduje 10-krotny wzrost ekspresji powierzchniowego białka A [37]. Poznanie struktury drugorzędowej cząsteczki RNA III [69] oraz badania prowadzone w późniejszych latach, pozwoliły na dokładniejsze poznanie mechanizmu jego działania jako regulatora ekspresji genów.

Domena zawierająca 5'-koniec cząsteczki RNA III, odgrywa rolę aktywatora ekspresji genów *hla* i *hly*, kodujących hemolizyny  $\alpha$  i  $\beta$  [66, 69]. Morfeldt i wsp. udowodnili, że 5'-koniec cząsteczki RNA III i 5'-koniec cząsteczki genu *hla* wykazują 75% komplementarności oraz, że region między 42 a 72 zasadą RNA III zawiera liczne niesparowane nukleotydy, które mogą stanowić potencjalne miejsce wiązania [66]. Pozwala to przypuszczać o związaniu RNA III z początkowym odcinkiem mRNA-*hla*, co inicjuje zmiany konformacyjne, prowadzące do odsłonięcia miejsca Shine-Dalgarno wiązania rybosomu (RBS) i zainicjowania translacji [66]. Jest to tzw. mechanizm antysensownej regulacji na poziomie transkryptu genu.

Funkcję regulatorową pełni również 3'-koniec RNA III [4, 37]. Jest niezbędny do aktywacji translacji genu *hld* [69] oraz odpowiada za 1-godzinne opóźnienie powstawania produktu tego genu w porównaniu z pojawieniem się transkryptu [4]. Mutanty, zawierające 5'-koniec RNA III (z całą ramką odczytu *hld*, ale bez 3'-końca) połączony z promotorem  $\beta$ -laktamazy, produkują  $\delta$ -lizynę prawie natychmiast po powstaniu RNA III, w odróżnieniu od mutantów zawierających całą, funkcjonalną cząsteczkę RNA III, u których nadal obserwowano 1-godzinne opóźnienie ekspresji tego enzymu [4]. Przyczyna tego zjawiska nadal nie została wyjaśniona. Wydaje się, że sam 3'-koniec RNA III nie ma bezpośredniego wpływu na inicjację translacji

transkryptu genu  $\delta$ -lizyny. Prawdopodobnie uczestnicstwo tej domeny w regulacji ekspresji innych genów generuje zmiany konformacyjne *in vivo*, które umożliwiają jednoczesne przyłączenie rybosomu do miejsca inicjacji translacji *hld* lub utworzenie stabilnego kompleksu 16S rRNA/RNAlIIII/tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, co prowadzi do 1-godzinnej opóźnienia ekspresji  $\delta$ -lizyny. Zatem można przypuszczać, że RNA III pełni rolę pośredniego aktywatora translacji *hld*.

Domena 3'-końcowa RNA III uczestniczy również w negatywnej regulacji ekspresji białka powierzchniowego Spa (gen *spa*, staphylococcal protein A). Już badania przeprowadzone w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku dowodzą, że mutanty pozbawione RNA III wykazywały 10-krotny wzrost ekspresji genu *spa* [37], natomiast wprowadzenie do szczepu *S. aureus*, defektywnego w *agr*, operonu P3, podłączonego do promotora *P-bla* objawia się fenotypowo w komórce bakteryjnej spadkiem produkcji proteiny A [69]. Dokładny mechanizm tej regulacji nie został dotychczas poznany, nie wiadomo również czy 3'-domena RNA III reguluje transkrypcję *spa* w sposób pośredni czy bezpośredni.

Poza tym, że RNA III *S. aureus* uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących różne czynniki wirulencji, może również modulować wyrażanie się genów innych systemów regulacyjnych. Jednym z nich jest system *rot* (repressor of toxins), kodowany przez 498-nukleotydową ramkę odczytu *rot* [59]. Badania porównawcze transkryptomów dowodzą, że Rot jest globalnym regulatorem i może uczestniczyć zarówno w pozytywnej (*spa*, *sarS*, *clfB*, *coa thrB*), jak i negatywnej (*hla*, *hly*, *geh*, *ureA*, *sspA*, *sspB*, *sspC*, *splA*, *splB*, *splC*, *splD*, *splE*, *splF*) regulacji licznych genów [82]. Z kolei cząsteczka RNA III jest aktywatorem ekspresji niektórych toksyn ( $\alpha$ -,  $\beta$ - toksyna, geny *hla*, *hly*) i represorem bakteryjnych białek powierzchniowych, takich jak białko A (*spa*), koagulaza (*coa*), czynnik „clumping factor” (*clf*) [18, 58], dlatego można stwierdzić, że RNA III jest bezpośrednim antagonistą białka Rot [71]. Jednakże mechanizm tego antagonizmu może być również pośredni, ponieważ okazuje się, że RNA III wiąże mRNA-*rot*, blokując jego translację i tym samym pośrednio aktywuje transkrypcję genów represjonowanych przez Rot [25]. W mechanizmie tej regulacji uczestniczy 3'-koniec RNA III, a dokładniej struktury „hairpin” 13 i 14. Każda z nich, w pętli, zawiera odcinki bogate w niesparowane nukleotydy cytydynamowe, które są wysoce komplementarne do heksameru w sekwencji Shine-Dalgarno mRNA-*rot* [7]. Zatem RNA III przyłącza się do 5'-końca transkryptu *rot*, co determinuje pojawienie się miejsca rozpoznawalnego dla endorybonukleotydyzy III (RNaza III). Następuje cięcie enzymatyczne w mRNA-*rot*, co prowadzi do jego degradacji [7]. Najprawdopodobniej po-

dobny mechanizm negatywnej regulacji przez RNA III i RNazo-zależnej degradacji dotyczy genu *spa* [36].

### 2.1.6. Regulacja systemu *agr*

System *agr* *S. aureus* uczestniczy w regulacji ekspresji licznych genów związanych ze strukturami powierzchniowymi, wirulencją i metabolizmem tego gatunku bakterii. Jednakże sam również podlega regulacji przez potencjalnie trzy niezależne mechanizmy: i) mechanizm autoindukcji przez białko AgrA, ii) regulacji zależnej od SarA, iii) system quorum sensing *rap/trpA*.

#### 2.1.6.1. Autoregulacja zależna od AgrA

Białko AgrA jest efekтором systemu quorum sensing *agrA/C* *S. aureus* [65, 74]. Dowiedziono, że aktywne, ufosforylowane białko posiada zdolność do wiązania sekwencji DNA w regionie intergenicznym systemu *agr*, prowadząc do jego aktywacji [43, 67, 68] (Rys. 1, podrozdział 2.1.3.2. oraz 2.1.4.). We wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego hodowli bakteryjnej są wytwarzane na pewnym niskim poziomie cząsteczki AgrB i AgrD, co prowadzi do gromadzenia w środowisku feromonów AIP. Kiedy zostanie osiągnięty pewien krytyczny poziom cząsteczek autoinduktora, następuje aktywacja kinazy histydynamowej AgrC, co pociąga za sobą kaskadę zdarzeń prowadzących do fosforylacji AgrA. Białko odpowiedzi wiąże się z regionem znajdującym się powyżej promotora operonu P2 oraz P3, aktywując transkrypcję RNA II i RNA III, a tym samym również genów *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* oraz *hld*.

#### 2.1.6.2. Regulacja zależna od Sar A

Białko SarA po raz pierwszy zostało zidentyfikowane, jako czynnik wiążący DNA w regionie intergenicznym systemu *agr*, w trakcie badań nad mechanizmem regulacji ekspresji RNA III [67]. Jest to 124-amino-kwasowy polipeptyd, zaliczany obecnie do tzw. rodziny białek Sar [5, 12, 13]. Gen kodujący SarA (*sarA*) znajduje się w chromosomie w locus *sar* i stanowi jeden z trzech nakładających się na siebie transkryptów [34]. SarA jest białkiem homodimerycznym, jednodomenowym. Każdy monomer w domenie zawiera pięć struktur o charakterze  $\alpha$ -helis, trzy  $\beta$ -kartki oraz kilka pętli między nimi. Tworzą one cząsteczkę, którą można opisać następującym wzorem:  $\alpha 1\alpha 2 - \beta 1\alpha 3\alpha 4 - \beta 2\beta 3 - \alpha 5$  [49]. Struktury  $\alpha$ -helikalne, jak również  $\beta$ -kartki są silnie konserwowane w rodzinie białek Sar i stanowią potencjalne miejsce wiązania zarówno z większą, jak i mniejszą bruzdą cząsteczki DNA [49]. Ponadto wiadomo, że białka SarA, SarR (homolog SarA), jak również AgrA rozpoznają i współzawodniczą ze sobą o tę samą sekwencję w miejscach promotorowych genów [56, 68, 79]. Dzięki tej właściwości SarA uczestniczy w regulacji transkrypcji genów zarówno w sposób



bezpośredni, jak i pośredni. Może bowiem wiązać regiony promotorowe genów kodujących czynniki wirulencji aktywując (białko wiążące fibrynogen, białko wiążące fibronektynę, enzymy i toksyny) lub hamując (białko A, proteazy) ich transkrypcję. Z kolei oddziaływanie z regionem intergenicznym *agr* (Rys. 1), prowadzi do jego aktywacji i tym samym pośredniej regulacji genów znajdujących się pod kontrolą tego systemu [13]. Ostatnio wykazano, że SarA może również wiązać już zsyntetyzowane cząsteczki mRNA zwiększając ich stabilność i wydłużając czas połowicznego rozpadu, co także może wpływać na fenotypowe podwyższenie poziomu ekspresji regulowanych genów [79].

### 2.1.6.3. Regulacja zależna od *rap/traP*

System *rap/traP* zaliczany jest, podobnie jak *agr*, do dwuskładnikowych systemów przekazywania sygnału (TCSTS). Zbudowany jest z białka Rap (RNA III activating protein) o masie cząsteczkowej 33 kDa, zwanego również ortologiem rybosomalnego białka L2 [45] oraz białka Trap (target of Rap), o masie cząst. 21 kDa [3]. NH<sub>2</sub>-koniec Rap wykazuje wysoki stopień homologii do rybosomalnego białka L2, kodowanego przez gen *rpIB*. Mogą to być nawet te same białka, ale pełniące różne funkcje w zależności od miejsca docelowej lokalizacji. Rap jest 277-aminokwasowym białkiem, wydzielanym na zewnątrz komórki w sposób jeszcze nie do końca poznany [45, 46]. Posiada zdolność indukcji potrójnej fosforylacji białka Trap, które jest unikalne dla *S. aureus*. Trap zbudowane jest ze 167 aminokwasów i wykazuje globularną strukturę  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -kartki. W odróżnieniu od receptorów innych systemów quorum sensing nie posiada domeny transbłonowej, co jednak nie wyklucza możliwości pełnienia przez nie funkcji kinazy histydynowej [3]. Zaindukowane Trap ulega potrójnej fosforylacji w pozycjach histydyny His-66, His-79 i His-154, stając się aktywnym czynnikiem transkrypcyjnym [32]. Analiza transkryptomów, szczepów *S. aureus* Trap<sup>+</sup> i Trap<sup>-</sup>, przy zastosowaniu techniki mikroczipów wykazała, że jest to białko pełniące funkcję globalnego regulatora ekspresji genów [44]. Białko Trap może aktywować geny kodujące liczne czynniki wirulencji: *hla*, *hly*, *hld*, *hlgB* (hemolizyny  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), *capA*, *capD*, *capF*, *capJ*, *capK*, *capL* (syntetazy polisacharydu otoczkowego), *lip* (prekursora lipazy triacylglicerolowej), *geh* (hydrolazy estrów glicerolowych), *sspA* (gronkowcowej proteazy serynowej), *aur* (prekursora aureolizyny) oraz ich systemy regulacyjne, tj. *agrA-D*; jak również geny metabolizmu podstawowego, takie jak: *arcA* (deaminazy argininowej), *ure* (ureazy), *pyrP* (permeazy uracylowej). Natomiast negatywnej regulacji ulegają przede wszystkim geny kodujące czynniki związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej tj.: *sdrC*, *sdrD* (białek wiążących fibrynogen, bogatych

w reszty Ser i Asp), *clfB* (prekursora białka wiążącego fibrynogen), *spa* (prekursora gronkowcowego białka A), ale również geny kodujące adaptatorowe białka odpowiedzi: *groE* (chaperonu 60 kDa), *dnaJ* (białko szoku cieplnego), czy też białka związane z funkcjami komórkowymi np.: *pgk* kinazy fosfoglicerynowej. Dowiedziano, że u *S. aureus* Trap aktywuje transkrypcję 63 genów, natomiast hamuje 15 innych [44]. Wpływ systemu *rap/traP* na ekspresję *agr* udowodniano kilkakrotnie wskazując, że mutanty defektywne w *traP* nie są zdolne do syntezy cząsteczek RNA III i/lub mogą wytwarzać hemolizyny na obniżonym poziomie [3, 32, 44]. Jednak nowsze badania sugerują, że Trap nie odgrywa żadnej roli w regulacji ekspresji systemu *agr*. Okazuje się bowiem, że mutanty *S. aureus* zawierające inaktywowany gen *traP* wykazują aktywność hemolityczną na takim samym poziomie, co szczepy dzikie [1, 87]. Zatem wydaje się, że sprzeczne wyniki dotyczące wpływu systemu *rap/traP* na transkrypcję RNA III wymagają dalszych badań.

System *rap/traP* podlega pozytywnej autoregulacji. Poza tym posiada również mechanizm negatywnej regulacji przeprowadzanej przez białko RIP (RNA III inhibiting protein) [3]. Białko RIP posiada NH<sub>2</sub>-koniec (YSPXTNF, gdzie X = reszta cysteinowa lub tryptofanowa) o wysokim stopniu homologii do analogicznej domeny RAP. Pozwala to przypuszczać, że oba białka wiążą się z tą samą sekwencją genu docelowego na zasadzie kompetencyjnego wypierania. Jednakże ten agonistyczno-antagonistyczny mechanizm wykryto dotychczas jedynie u gronkowców koagulazo-ujemnych (*S. xylosum*, *S. warnerii*) [3].

### 2.1.7. Zróźnicowanie i znaczenie systemu *agr*

System *agr* uczestniczy w globalnej regulacji ekspresji genów związanych z patogennością (Tabela I) oraz metabolizmem podstawowym drobnoustrojów z gatunku *S. aureus* [16]. Ekspresja różnych czynników wirulencji jest uzależniona od zagęszczenia komórek w hodowli oraz fazy wzrostu szczepu bakteryjnego [92]. We wczesnej fazie wzrostu logarytmicznego wytwarzane są przede wszystkim adhezyny i białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki bakteryjnej, takie jak: białko A, białko wiążące kolagen, białko wiążące fibronektynę czy białko wiążące fibrynogen. Warunkują one kolonizację patogenu w odpowiedniej mikroniszy w organizmie gospodarza. Natomiast w późnej fazie wzrostu wykładniczego oraz w fazie stacjonarnej, synteza adhezyn ulega zahamowaniu, z kolei aktywacji ulegają geny kodujące egzotoksyny i enzymy, takie jak toksyny  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , TSST-1, eksfoliatyny, leukotoksyny, które umożliwiają niszczenie tkanek organizmu gospodarza, rozprzestrzenianie się patogenu do innych narządów oraz mogą być

Tabela II

Charakterystyka systemów regulacji genów u *S. aureus* innych niż *agr* i ich wpływ na ekspresję czynników wirulencji

Nazwa systemu lub czynnika regulacyjnego	Geny strukturalne	Organizacja	Rola w regulacji ekspresji genów czynników wirulencji <i>S. aureus</i> i/lub efekt fenotypowy regulacji		Piśmiennictwo
			Pozytywna	Negatywna	
<i>saeS/R</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> exoproteins regulator)	<i>saeS</i> <i>saeR</i> <i>saeQ</i> <i>saeP</i>	QSS <sup>1</sup> , regulacja <i>agr</i> -, SarA-zależna, Sigma <sub>B</sub> – niezależna	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>coa</i> <sup>2</sup> , <i>spa</i> , <i>lip</i> <sup>3</sup> , <i>dna</i> <sup>4</sup> brak wpływu na <i>agr</i> i <i>sarA</i>	proteazy	[2, 29–31, 89]
<i>arlS/R</i> (autolysis – related locus)	<i>arlS</i> <i>arlR</i>	QSS, regulacja <i>agr</i> -, SarA-, i MgrA-zależna	<i>agr</i> ABCD, <i>arlR</i> , <i>hld</i> , <i>lytS/R</i> , <i>cap5A/5D</i> <sup>5</sup> , <i>lrg</i> AB <sup>6</sup> , <i>ssaA</i> <sup>7</sup> , <i>sdrCDE</i> <sup>8</sup> , <i>ssp</i> <sup>9</sup> , <i>rot</i> , w sumie 36 genów	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>lip</i> <sup>3</sup> , <i>spa</i> , <i>ssp</i> <sup>9</sup> , <i>spl</i> <sup>10</sup> , <i>coa</i> <sup>2</sup> , <i>norA</i> <sup>11</sup> , <i>lukE</i> <sup>12</sup> , <i>cap</i> <sup>5</sup> , <i>hlg</i> <sup>13</sup> , <i>ebh</i> <sup>14</sup> , głównie autolizyny i hydrolazy peptydoglikanu, w sumie 78 genów	[19–22, 47, 51]
<i>srrA/B</i> (Staphylococcal respiratory response) lub <i>srhS/R</i>	<i>srrA</i> ( <i>srhS</i> ), <i>srrB</i> ( <i>srhR</i> )	QSS, regulacja w odpowiedzi na stężenie tlenu w środowisku, regulacja <i>agr</i> -zależna	<i>agr</i> , <i>tsst-1</i> <sup>15</sup> , <i>spa</i> – w warunkach obecności tlenu	<i>agr</i> , <i>tsst-1</i> <sup>15</sup> , <i>spa</i> – w warunkach beztlenowych	[61, 76, 90, 95]
<i>lytS/R</i>	<i>lytS</i> <i>lytR</i>	QSS	<i>lrg</i> AB <sup>6</sup> , wzrost tolerancji szczepów na penicyliny	–	[9, 10, 33, 68]
<i>rap/traP</i> (RNA III activating protein/target of Rap)	<i>rap</i> <i>traP</i>	QSS (Podrozdz. 2.1.6.3.)	potencjalny alternatywny aktywator systemu <i>agr</i>	–	[3, 28, 45, 46, 87]
SarA	<i>sarA</i>	Czynnik transkrypcyjny, białko jednodomenowe, zarówno <i>agr</i> -zależny, jak i <i>agr</i> -niezależny regulator ekspresji genów (Podrozdz. 2.1.6.2.) Rodzina białek Sar, homologi SarA, również działają jako czynniki transkrypcyjne;	<i>sarA</i> , <i>agr</i> , <i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> <sup>13</sup> , <i>spa</i> , <i>coa</i> <sup>2</sup> , <i>fnb</i> <sup>16</sup>	<i>sarS</i> , <i>sarT</i> , <i>sarV</i>	[5, 8, 12, 3, 34, 49, 55, 56, 79]
SarR	<i>sarR</i>	Białko jednodomenowe	<i>agr</i>	<i>sarA</i>	
SarS	<i>sarS</i> ( <i>sarH1</i> )	Białko dwudomenowe	<i>spa</i>	<i>hla</i>	
SarT	<i>sarT</i>	Białko jednodomenowe	<i>sarS</i>	<i>hla</i> , <i>agr</i> , <i>sarU</i>	
SarU	<i>sarU</i>	Białko dwudomenowe	<i>agr</i>	–	
SarV	<i>sarV</i>	Białko jednodomenowe	autoliza	–	
SarX	<i>sarX</i>	Białko jednodomenowe	–	<i>agr</i>	
SarY	<i>sarY</i>	Białko dwudomenowe	nieznana funkcja	nieznana funkcja	
SarZ	<i>sarZ</i>	Homolog białka MarR	<i>hla</i>	–	
MgrA	<i>mgrA</i>	Czynnik transkrypcyjny, należy do białek z rodziny Sar, jest homologiem białka MarR, wykazuje działanie synergistyczne	głównie egzoproteiny, <i>lukDFMS</i> <sup>12</sup> , <i>set12</i> <sup>17</sup> , <i>set14</i> <sup>18</sup> , <i>lip</i> <sup>3</sup> , <i>nuc</i> <sup>19</sup> , <i>sak</i> <sup>20</sup> , <i>sod</i> <sup>21</sup> , <i>cap5A-P</i> <sup>5</sup> , <i>sarA</i> , <i>sarX</i> , z systemem <i>agr</i> <i>sigB</i> , <i>lytS</i> , w sumie 175 genów	głównie komórkowe białka związane ze strukturami powierzchniowymi <i>spa</i> , <i>mrp</i> <sup>22</sup> , <i>fib</i> <sup>23</sup> , <i>isaB</i> <sup>24</sup> , <i>ebh</i> <sup>14</sup> , <i>hflX</i> <sup>25</sup> , <i>sarV</i> , w sumie 180 genów	[50, 51, 55]
Rot (repressor of toxins)	<i>rot</i>	Czynnik transkrypcyjny, homolog białek z rodziny Sar, białko jednodomenowe, antagonistą <i>agr</i> (Podrozdz. 2.1.5.2.)	<i>spa</i> , <i>sspBC9</i> , w sumie 86 genów	<i>hla</i> , <i>hnb</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> <sup>13</sup> , w sumie 60 genów	[59, 82]
Sigma <sub>B</sub>	<i>sigB</i>	Czynnik transkrypcyjny RsbUVW-zależny	<i>coa</i> <sup>2</sup> , <i>fnbA</i> <sup>16</sup> , <i>cap</i> <sup>5</sup> , <i>clfA</i> <sup>26</sup> , brak wpływu na <i>sae</i>	<i>hla</i> , <i>spl</i> <sup>10</sup> , <i>nuc</i> <sup>19</sup>	[8, 31, 100]
ClpX/P	<i>clpX</i> <i>clpP</i>	Aktywność proteolityczna	–	<i>agr</i> , <i>hsr</i> <sup>27</sup> , <i>osr</i> <sup>28</sup> , autoliza, acyldepsiptydy (czynniki antybakteryjne)	[23, 61]

<sup>1</sup>) QSS – quorum sensing system<sup>2</sup>) *coa* – gen kodujący koagulazę<sup>3</sup>) *lip* – gen kodujący lipazę<sup>4</sup>) *dna* – gen kodujący DNazę (nukleaza DNA)<sup>5</sup>) *cap5A/cap5D* – geny kodujące syntetazy polisacharydu otoczkowego

odpowiedzialne za wystąpienie niektórych objawów chorobowych [18, 24, 58, 72, 78]. System *agr* uczestniczy w regulacji ekspresji genów kodujących te czynniki wirulencji zarówno w sposób bezpośredni (z udziałem RNA III), jak i pośredni (Podrozdział 2.1.3.2. oraz 2.1.6.1.). Jako że białko AgrA jest efektem układu dwuskładnikowego i autoinduktorem całego systemu *agr*, zatem aktywując transkrypcję RNA III, pośrednio reguluje ekspresję genów podlegających RNA III-zależnej regulacji (Podrozdział 2.1.5.2.).

System *agr* występuje u różnych gatunków bakterii w obrębie rodzaju *Staphylococcus* [15]. Nie jest to jednak system jednorodny. Istnieje duże zróżnicowanie genów w obrębie regionu *agrBCD*, co przekłada się na produkty tych genów [41]. Niewielkie różnice w strukturze cząsteczki autoinduktora muszą być skorelowane również ze zmianami w białkach ściśle związanych z obróbką i wydzielaniem AgrD oraz oddziaływaniem dojrzałego AIP, czyli na wysoce swoistych cząsteczkach AgrB oraz AgrC. Wśród 34 gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus*, przy zastosowaniu techniki PCR, zidentyfikowano 24 typy systemu *agr* [15]. Natomiast wśród szczepów tylko *S. aureus*, przy zastosowaniu zestawu czterech par starterów, komplementarnych do regionu hiper-zmiennego w obrębie sekwencji genów *agrB*, *agrC* i *agrD*, wyróżniono cztery grupy *agr* (Podrozdział 2.1.2.) [41]. Oddziaływanie cząsteczek w obrębie grupy jest wysoce specyficzne i aktywacja AgrC może nastąpić praktycznie jedynie przez swoisty autoinduktor grupowy. Jednakże zahamowanie konkretnego systemu może nastąpić przez każdy inny, nieswoisty typ AIP [41, 93]. Naukowcy podejmują liczne próby określenia polimorfizmu i przynależności grupowej szczepów *S. aureus* będących ludzkimi izolatami klinicznymi, podejmują

również próby powiązania występowania typu systemu *agr* z fenotypem, zjadliwością, przynależnością filogenetyczną patogenu lub rodzajem wywołwanej infekcji u ludzi [35, 39, 40, 63, 64, 88, 91, 93, 96]. Wyniki tych badań nie są jednoznaczne, ponieważ w niektórych pracach nie dostrzeżono żadnej z wyżej wymienionych korelacji [63, 88], natomiast w innych zaobserwowano pewne zależności. Dowiedziono, że występowanie szczepów gronkowca złocistego zdolnych do wydzielania toksyny TSST-1, powiązane jest z fenotypem *agr* – grupy III [40, 41]; szczepów posiadających gen *eta* lub *etb*, czyli wytwarzających eksfoliatynę, z grupą *agr-IV* [39, 40], natomiast izolatów produkujących toksynę PVL (Panton-Valentine leukocidin), odpowiedzialnych za ciężkie stany zapalne dolnych dróg oddechowych, z *agr-I* i/lub III grupy [64]. Poza tym stwierdzono, że szczepy *S. aureus* należące do grupy *agr-I* i II częściej są zdolne do wywołwania chorób związanych z wydzielaniem enterotoksyn (*agr-I*) oraz *endocarditis* (*agr-II*) [40]. Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem techniki RLFP/*DraI* (restriction fragment length polymorphism) wykazały, że za zakażenia ucha u pacjentów hospitalizowanych w niewielkich koreańskich szpitalach odpowiedzialne były przede wszystkim CA-MRSA (community-acquired methicillin resistance *S. aureus*) należące do grupy *agr-I* [96]. Przyczyny takich korelacji są trudne do wyjaśnienia, być może z określonym genotypem *agr* związane jest występowanie lub ekspresja innych genów, które w pewnym stopniu determinują fenotyp i tropizm tkankowy szczepu bakteryjnego.

Dowiedziono również, że MRSA należące do typu *agr-II* mają podwyższoną zdolność o wytwarzania biofilmu [11, 85], co związane jest z dużą częstością występowania zakażeń odcewnikowych oraz innych,

<sup>6)</sup> *lrgAB* – geny kodujące sekrecyjne białka LrgA i B podobne do holiny, które hamują aktywność enzymów hydrolitycznych mureiny

<sup>7)</sup> *ssaA* – gen kodujący antygen sekrecyjny SsaA

<sup>8)</sup> *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* – geny kodujące białka adhezyjne SdrC, SdrD, i SdrE, z grupy MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)

<sup>9)</sup> *ssp* – gen kodujący proteazę serynową Ssp

<sup>10)</sup> *spl* – gen kodujący proteazę serynową Spl

<sup>11)</sup> *norA* – gen kodujący pompę błonową warunkującą wielolekooporność *S. aureus*

<sup>12)</sup> *lukE*, *lukF-PV*, *lukM*, *lukO*, *lukS-PV* – geny kodujące leukotoksyny np.: LukO+LukE, LukF-PV+LukS-PV

<sup>13)</sup> *hlg* – gen kodujący potencjalne białko błonowe o właściwościach dehydratazy serynowej (gamma-hemolizyna)

<sup>14)</sup> *ebh* – gen kodujący potencjalne białko powierzchniowe o właściwościach adhezyjnych (MSCRAMM), wiąże fibronektynę

<sup>15)</sup> *tsst-1* – gen kodujący toksynę 1 zespołu szoku toksycznego TSST-1

<sup>16)</sup> *fnb* – gen kodujący białko wiążące fibronektynę (MSCRAMM)

<sup>17)</sup> *set12* – gen kodujący egzotoksynę 12

<sup>18)</sup> *set14* – gen kodujący egzotoksynę 14

<sup>19)</sup> *nuc* – gen kodujący nukleazę

<sup>20)</sup> *sak* – gen kodujący prekursor stafilokiny

<sup>21)</sup> *sod* – gen kodujący dysmutazę ponadtlenkową

<sup>22)</sup> *mrp* – gen kodujący potencjalne białko błonowe o właściwościach kanału transportera

<sup>23)</sup> *fib* – gen kodujący potencjalne białko wiążące fibrynogen (MSCRAMM)

<sup>24)</sup> *isaB* – gen kodujący potencjalne białko o właściwościach hemaglutyniny

<sup>25)</sup> *hflIX* – gen kodujący białko podobne do protein wiążących GTP

<sup>26)</sup> *clfA* – gen kodujący czynnik clumping factor A (CF-A) (MSCRAMM), białko wiążące fibrynogen

<sup>27)</sup> *hsr* – gen kodujący białko odpowiedzi szoku cieplnego

<sup>28)</sup> *osr* – gen kodujący białko odpowiedzi na szok oksydacyjny

których źródłem są narzędzia i urządzenia medyczne [11]. Wiadomo jest, że za zdolność bakterii do wytwarzania biofilmu, w dużej mierze odpowiedzialne są adhezyny i białka związane ze strukturami powierzchniowymi komórki patogenu. Wiadomo również, że system *agr* w naturalnych warunkach pełni funkcję inhibitora ekspresji białek powierzchniowych *S. aureus* w późnej fazie wzrostu logarytmicznego oraz w fazie stacjonarnej. W tym aspekcie istotna wydaje się informacja, że wszystkie izolaty *agr* typu II, o podwyższonej zdolności do produkcji biofilmu, były defektywne w systemie *agr* [11, 85], co może wyjaśniać fenomen fenotypu hiperadherentnego.

Ponadto wydaje się, że istnieje pewna korelacja między systemem regulacyjnym *agr* a wyrażaniem się fenotypu GISA i h-GISA (glycopeptide intermediate resistance *S. aureus*, heterogeneous-GISA). Są to szczepy gronkowca złocistego o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy (GISA) i na zróżnicowanym poziomie (h-GISA), które przysparzają coraz więcej problemów w leczeniu ciężkich infekcji o etiologii MRSA. Mechanizm tej oporności do tej pory nadal nie został do końca wyjaśniony [14]. Badania dowodzą, że najprawdopodobniej system *agr* uczestniczy w wyrażaniu się fenotypu GISA [35, 80, 85, 91]. Analiza na modelu farmakodynamicznym wykazuje, że zmutowane szczepy *S. aureus* ze wszystkich czterech grup *agr*, defektywne w systemie *agr*, mogą osiągać wartość MIC (minimal inhibitory concentration) dla wankomycyny nawet 6 do 8 µg/ml, co jest wartością 2–3-krotnie wyższą w porównaniu z dzikimi szczepami *agr* [80, 91]. Jednakże jedynie mutanty *agr*<sup>-</sup> z grupy *agr*-II, charakteryzowały się najwyższą wartością MIC (8 µg/ml). Zatem wydaje się, że brak aktywnego systemu regulacyjnego ułatwia drobnoustrojom przetrwanie w warunkach presji niektórych czynników chemioterapeutycznych (wankomycyny). Podobne wyniki uzyskano stosując metodę analizy RLFP/*Sma*I na izolatach klinicznych GISA i h-GISA również defektywnych w systemie *agr* [85]. Szczepy te, posiadające liczne mutacje punktowe, delecyjne, insercyjne w operonach P2 i P3, były niezdolne do produkcji δ-lizyny i jednocześnie przeżywały na podłożach zawierających podwyższone stężenie wankomycyny 4 µg/ml [85]. Badania te pozwalają stwierdzić współwystępowanie fenotypu GISA z genotypem *agr*<sup>-</sup>, ale dotyczy to tylko szczepów należących do grupy *agr* II [62, 84, 85]. Dotychczas nie zostały wyjaśnione przyczyny opisanych korelacji, wynika to nadal z niedostatecznej wiedzy na temat funkcji systemu *agr*. Najprawdopodobniej, oprócz funkcji autoregulacyjnej oraz regulatorowej podczas ekspresji czynników wirulencji system *agr* może wpływać również na syntezę ściany komórkowej szczepów gronkowca złocistego. Z badań przeprowadzonych w 2005 roku wynika, że szczepy *S. aureus* typu *agr*-II,

*agr* – defektywne, wykazywały obniżoną zdolność autolityczną [83]. Zatem można domniemywać, że *agr* jest aktywatorem ekspresji hydrolaz ściany komórkowej i dlatego jego dysfunkcja zaburza procesy autolizy, prowadząc do powstania ściany komórkowej o nietypowej grubości [83, 86]. Taki fenotyp jest najprawdopodobniej jednym z mechanizmów warunkujących powstawanie szczepów *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy.

## 2.2. Inne systemy TCSTS uczestniczące w regulacji ekspresji genów *S. aureus*

U *S. aureus* oprócz systemu *agr* zidentyfikowano jeszcze kilka innych dwuskładnikowych układów quorum sensing uczestniczących w regulacji mechanizmów patogenezы. Zaliczamy do nich: *saeR/S*, *srrA/B*, *arlR/S*, *lytR/S* oraz omówiony w podrozdziale 2.1.6.3. system *rap/traP*. Informacje na temat organizacji i funkcji tych systemów zostały umieszczone w tabeli II.

## 3. Inne czynniki regulacyjne ekspresji genów *S. aureus*, nie będące TCSTS

Poza dwuskładnikowymi systemami regulatorowymi TCSTS u gronkowca złocistego zostało opisanych kilka innych czynników, uczestniczących w regulacji ekspresji genów kodujących między innymi determinanty wirulencji. Zaliczamy do nich: i) mechanizm pozytywnej i negatywnej regulacji z udziałem antysensownego RNA (podrozdz. 2.1.5.2.); ii) czynniki transkrypcyjne: RNA III (podrozdz. 2.1.5.1. oraz 2.1.5.2.); białka z rodziny SarA (podrozdz. 2.1.6.2. oraz tabela II); MgrA, Rot, Sigma<sub>B</sub> (Tabela II), posiadające zdolność wiązania DNA w miejscach promotorowych genów, aktywując bądź hamując ich transkrypcję; iii) białka o aktywności proteolitycznej (ClpX/P), działające na dojrzwały produkt genów (Tabela II).

## 4. Podsumowanie

*S. aureus* jest ludzkim, oportunistycznym patogenem, mogącym wywoływać groźne zakażenia zarówno szpitalne, jak i pozaszpitalne. Rozwój infekcji warunkowany jest zdolnością wytwarzania przez bakterię licznych czynników wirulencji, tzw. *vir*: i) białek powierzchniowych, o właściwościach antygenowych i adherentnych, determinujących pierwszy etap kolonizacji; ii) wydzielanych na zewnątrz komórki toksyn i enzymów prowadzących, poprzez destrukcję tkanek, do rozprzestrzeniania się infekcji. Ekspresja determinant wirulencji oraz innych genów, związanych z metabolizmem podstawowym, może podlegać regulacji

na różnych poziomach i może być kontrolowana przez wiele różnych mechanizmów. Do najważniejszych zaliczamy tzw. dwuskładnikowe systemy quorum sensing, z których każdy zawiera białko sensorowe o aktywności kinazy histydynowej oraz białko odpowiedzi RR. Jak dotąd u *S. aureus* poznano 16 tego typu mechanizmów. Aktywacja tych układów jest uzależniona od czynników zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i środowiskowych. Istotną rolę odgrywa również mechanizm pozytywno/negatywnej regulacji przez małe antysensowne cząsteczki RNA, RNA III, które przyłączając się do odpowiednich sekwencji mRNA prowadzą do inicjacji lub inhibicji procesu translacji. Ponadto ekspresja determinant *vir* może być aktywowana lub hamowana na etapie inicjacji transkrypcji, przez czynniki transkrypcyjne, posiadające zdolność wiązania DNA w regionach promotorowych genów. Także degradacja dojrzałych produktów genów może w sposób bezpośredni lub pośredni wpływać na wyrażanie zjadliwego fenotypu patogenu.

Procesy regulacji ekspresji czynników wirulencji *S. aureus* są bardzo złożone i wysoce specyficzne. Każdy z systemów regulatorowych, w określonych warunkach, może bezpośrednio wpływać na geny kodujące determinanty chorobotwórczości, ale jednocześnie ekspresja genów strukturalnych tych systemów również podlega regulacji przez inne mechanizmy. Dokładne powiązania i zależności między systemami regulatorowymi nadal nie są do końca wyjaśnione i wymagają dalszych badań. Wiadomo jednak, że dzięki nim drobnoustroje posiadają zdolność do adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Ponad to determinują one kontrolowaną syntezę oraz wydzielanie właściwych czynników wirulencji, w odpowiednim czasie tak, aby zapewnić komórkom drobnoustroju możliwość przetrwania i rozwoju w niemalże każdej tkance ludzkiego organizmu i w niemalże każdych warunkach.

## Piśmiennictwo

- Adhikari R.P., Arvidson S., Novick R.P.: A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP::kan*. *Infect. Immun.* **75**, 4534–4540 (2007)
- Adhikari R.P., Novick R.P.: Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology*, **154**, 949–959 (2008)
- Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirshberg M., Koyfman N., Matthews H.R., Nhan R.T., Singh B., Uziel O.: Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNA-III-activating protein (TRAP). *J. Biol. Chem.* **276**, 2658–2667 (2001), Erratum in: *J. Biol. Chem.* **276**, 12476 (2001), *J. Biol. Chem.* **276**, 20803 (2001)
- Balaban N., Novick R.P.: Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol. Lett.* **133**, 155–161 (1995)
- Bayer M.G., Heinrichs J.H., Cheung A.L.: The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 4563–4570 (1996)
- Benito Y., Kolb F.A., Romby P., Lina G., Etienne J., Vandenesch F.: Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA*, **6**, 668–679 (2000)
- Boisset S., Geissmann T., Huntzinger E., Fechter P., Bendridi N., Possedko M., Chevalier C., Helfer A.C., Benito Y., Jacquier A., Gaspin C., Vandenesch F., Romby P.: *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev.* **21**, 1353–1366 (2007)
- Bronner S., Monteil H., Prévost G.: Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 183–200 (2004)
- Brunskill E.W., Bayles K.W.: Identification and molecular characterization of a putative locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 611–618 (1996)
- Brunskill E.W., Bayles K.W.: Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 5810–5812 (1996)
- Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Demelio V., Spina D., Nicoletti G., Stefani S.: *agr*-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 220–227 (2007)
- Cheung A.L., Bayer A.S., Zhang G., Gresham H., Xiong Y.Q.: Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**, 1–9 (2004)
- Cheung A.L., Nishina K.A., Trotonda M.P., Tamber S.: The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 355–361 (2008)
- Cui L., Iwamoto A., Lian J.Q., Neoh H.M., Maruyama T., Horikawa Y., Hiramatsu K.: Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 428–38 (2006)
- Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Greenland T., Novick R.P., Bes M., Etienne J., Lina G.: High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J. Bacteriol.* **184**, 1180–1186 (2002)
- Dunman P.M., Murphy E., Haney S., Palacios D., Tucker-Kellogg G., Wu S., Brown E.L., Zagursky R.J., Shlaes D., Projan S.J.: Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* **183**, 7341–7353 (2001)
- Dutta R., Qin L., Inouye M.: Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640 (1999)
- Foster T.J., Höök M.: Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**, 484–488 (1998)
- Fournier B., Aras R., Hooper D.C.: Expression of the multi-drug transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**, 664–671 (2000)
- Fournier B., Hooper D.C.: A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**, 3955–3964 (2000)
- Fournier B., Klier A., Rapoport G.: The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 247–261 (2001)

22. Fournier B., Klier A.: Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **150**, 3807–3819 (2004)
23. Frees D., Sørensen K., Ingmer H.: Global virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: pinpointing the roles of ClpP and ClpX in the *sar/agr* regulatory network. *Infect. Immun.* **73**, 8100–8108 (2005)
24. Gaskill M.E., Khan S.A.: Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **263**, 6276–6280 (1988)
25. Geisinger E., Adhikari R.P., Jin R., Ross H.F., Novick R.P.: Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol. Microbiol.* **61**, 1038–1048 (2006)
26. Geisinger E., George E.A., Muir T.W., Novick R.P.: Identification of ligand specificity determinants in AgrC, the *S. aureus* quorum sensing receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 8930–8938 (2008)
27. George E.A., Muir T.W.: Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent *Staphylococci*. *Chem. Bio. Chem.* **8**, 847–855 (2007)
28. Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B.: Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components *agr* and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4060–4067 (2002)
29. Giraud A.T., Calzolari A., Cataldi A.A., Bogni C., Nagel R.: The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 15–22 (1999), Erratum in: *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 117 (1999)
30. Giraud A.T., Cheung A.L., Nagel R.: The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**, 53–58 (1997)
31. Goerke C., Fluckiger U., Steinhuber A., Bisanzio V., Ulrich M., Bischoff M., Patti J.M., Wolz C.: Role of *Staphylococcus aureus* global regulators *sae* and Sigma<sub>B</sub> in virulence gene expression during device-related infection. *Infect. Immun.* **73**, 3415–3421 (2005)
32. Gov Y., Borovok I., Korem M., Singh V.K., Jayaswal R.K., Wilkinson B.J., Rich S.M., Balaban N.: Quorum sensing in *Staphylococci* is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *J. Biol. Chem.* **279**, 14665–14672 (2004)
33. Groicher K.H., Firek B.A., Fujimoto D.F., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**, 1794–1801 (2000)
34. Heinrichs J.H., Bayer M.G., Cheung A.L.: Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 418–423 (1996)
35. Howe R.A., Monk A., Wootton M., Walsh T.R., Enright M.C.: Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 855–857 (2004)
36. Huntzinger E., Boisset S., Saveanu C., Benito Y., Geissmann T., Namane A., Lina G., Etienne J., Ehresmann B., Ehresmann C., Jacquier A., Vandenesch F., Romby P.: *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* **24**, 824–835 (2005)
37. Janzon L., Arvidson S.: The role of delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **9**, 1391–1399 (1990)
38. Janzon L., Lofdahl S., Arvidson S.: Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 480–485 (1989)
39. Jarraud S., Lyon G.J., Figueiredo A.M., Gérard L., Vandenesch F., Etienne J., Muir T.W., Novick R.P.: Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6517–6522 (2000)
40. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F.: Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* **70**, 631–641 (2002)
41. Ji G., Beavis R., Novick R.P.: Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**, 2027–2030 (1997)
42. Ji G., Beavis R.C., Novick R.P.: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12055–12059 (1995)
43. Koenig R.L., Ray J.L., Maleki S.J., Smeltzer M.S., Hurlburt B.K.: *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* **186**, 7549–7555 (2004)
44. Korem M., Gov Y., Kiran M.D., Balaban N.: Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect. Immun.* **73**, 6220–6228 (2005)
45. Korem M., Sheoran A.S., Gov Y., Tzipori S., Borovok I., Balaban N.: Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 167–175 (2003)
46. Korem M., Sheoran A.S., Gov Y., Tzipori S., Borovok I., Balaban N.: Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 167–175 (2003)
47. Liang X., Zheng L., Landwehr C., Lunsford D., Holmes D., Ji Y.: Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**, 5486–5492 (2005)
48. Lina G., Jarraud S., Ji G., Greenland T., Pedraza A., Etienne J., Novick R.P., Vandenesch F.: Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 655–662 (1998)
49. Liu Y., Manna A.C., Pan C.H., Kriksunov I.A., Thiel D.J., Cheung A.L., Zhang G.: Structural and function analyses of the global regulatory protein SarA from *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2392–2397 (2006)
50. Luong T.T., Dunman P.M., Murphy E., Projan S.J., Lee C.Y.: Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 1899–1910 (2006)
51. Luong T.T., Lee C.Y.: The *arl* locus positively regulates *Staphylococcus aureus* type 5 capsule via an MgrA-dependent pathway. *Microbiology*, **152**, 3123–3131 (2006)
52. Lyon G.J., Mayville P., Muir T.W., Novick R.P.: Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, *AgrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13330–13335 (2000)
53. Lyon G.J., Wright J.S., Muir T.W., Novick R.P.: Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **41**, 10095–10104 (2002)
54. Malone C.L., Boles B.R., Horswill A.R.: Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* autoinducing peptides by using the

- synechocystis DnaB mini-intein. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6036–6044 (2007)
55. Manna A.C., Cheung A.L.: Expression of SarX, a negative regulator of *agr* and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 4288–4299 (2006)
  56. Manna A.C., Cheung A.L.: Transcriptional regulation of the *agr* locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1289–1301 (2006)
  57. Mayville P., Ji G., Beavis R., Yang H., Goger M., Novick R.P., Muir T.W.: Structure-activity analysis of synthetic auto-inducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1218–1223 (1999)
  58. McDevitt D., François P., Vaudaux P., Foster T.J.: Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**, 237–248 (1994)
  59. McNamara P.J., Milligan-Monroe K.C., Khalili S., Proctor R.A.: Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**, 3197–3203 (2000)
  60. MDowell P., Affas Z., Reynolds C., Holden M.T., Wood S.J., Saint S., Cockayne A., Hill P.J., Dodd C.E., Bycroft B.W., Chan W.C., Williams P.: Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 503–512 (2001)
  61. Michel A., Agerer F., Hauck C.R., Herrmann M., Ullrich J., Hacker J., Ohlsen K.: Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J. Bacteriol.* **188**, 5783–579 (2006)
  62. Moise-Broder P.A., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Schentag J.J., Forrest A., Moellering R.C. Jr.: Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1700–1705 (2004)
  63. Monecke S., Slickers P., Ehricht R.: Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 237–251 (2008)
  64. Monecke S., Slickers P., Ellington M.J., Kearns A.M., Ehricht R.: High diversity of Pantone-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1157–1164 (2007)
  65. Morfeldt E., Panova-Sapundjieva I., Gustafsson B., Arvidson S.: Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 195–201 (1996)
  66. Morfeldt E., Taylor D., von Gabain A., Arvidson S.: Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* **14**, 4569–4577 (1995)
  67. Morfeldt E., Tegmark K., Arvidson S.: Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **21**, 1227–1237 (1996)
  68. Nikolskaya A.N., Galperin M.Y.: A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2453–2459 (2002)
  69. Novick R.P., Ross H.F., Projan S.J., Kornblum J., Kreiswirth B., Moghazeh S.: Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**, 3967–3975 (1993)
  70. Novick R.P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**, 1429–1449 (2003)
  71. Oscarsson J., Harlos C., Arvidson S.: Regulatory role of proteins binding to the *spa* (protein A) and *sarS* (staphylococcal accessory regulator) promoter regions in *Staphylococcus aureus* NTCC 8325-4. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 253–266 (2005)
  72. O'Toole P.W., Foster T.J.: Nucleotide sequence of the epidermolytic toxin A gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3910–3915 (1987)
  73. Otto M.: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides*, **22**, 1603–1608 (2001)
  74. Peng H.L., Novick R.P., Kreiswirth B., Kornblum J., Schlievert P.: Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**, 4365–4372 (1988)
  75. Podbielski A., Kreikemeyer B.: Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 81–95 (2004)
  76. Pragman A.A., Yarwood J.M., Tripp T.J., Schlievert P.M.: Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 2430–2438 (2004)
  77. Qiu R., Pei W., Zhang L., Lin J., Ji G.: Identification of the putative staphylococcal AgrB catalytic residues involving the proteolytic cleavage of AgrD to generate autoinducing peptide. *J. Biol. Chem.* **280**, 16695–16704 (2005)
  78. Recsei P., Kreiswirth B., O'Reilly M., Schlievert P., Gruss A., Novick R.P.: Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Br. J. Dermatol.* **139**, Suppl. 53, 9–12 (1998)
  79. Roberts C., Anderson K.L., Murphy E., Projan S.J., Mounts W., Hurlburt B., Smeltzer M., Overbeek R., Disz T., Dunman P.M.: Characterizing the effect of the *Staphylococcus aureus* virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives. *J. Bacteriol.* **188**, 2593–2603 (2006)
  80. Rose W.E., Rybak M.J., Tsuji B.T., Kaatz G.W., Sakoulas G.: Correlation of vancomycin and daptomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* in reference to accessory gene regulator (*agr*) polymorphism and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1190–1193 (2007)
  81. Saenz H.L., Augsburger V., Vuong C., Jack R.W., Götz F., Otto M.: Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch. Microbiol.* **174**, 452–455 (2000)
  82. Sad'd-Salim B., Dunman P.M., McAleese F.M., Macapagal D., Murphy E., McNamara P.J., Arvidson S., Foster T.J., Projan S.J., Kreiswirth B.N.: Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J. Bacteriol.* **185**, 610–619 (2003)
  83. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Fowler V.G. Jr, Moellering R.C. Jr, Novick R.P., Lucindo N., Yeaman M.R., Bayer A.S.: Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2687–2692 (2005)
  84. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr, Novick R.P., Venkataraman L., Wennersten C., DeGirolami P.C.,

- Schwaber M.J., Gold H.S.: *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance. *J. Infect. Dis.* **187**, 929–938 (2003)
85. Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C. Jr, Wennersten C., Venkataraman L., Novick R.P., Gold H.S.: Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1492–1502 (2002)
86. Sakoulas G., Moellering R.C. Jr, Eliopoulos G.M.: Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin. Infect. Dis.* **42**, Suppl. 1, 40–50 (2006)
87. Shaw L.N., Jonsson I.M., Singh V.K., Tarkowski A., Stewart G.C.: Inactivation of *traP* has no effect on the *agr* quorum-sensing system or virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **75**, 4519–4527 (2007)
88. Shopsin B., Mathema B., Alcabes P., Said-Salim B., Lina G., Matsuka A., Martinez J., Kreiswirth B.N.: Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 456–459 (2003)
89. Steinhuber A., Goerke C., Bayer M.G., Doring G., Wolz C.: Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**, 6278–6286 (2003)
90. Throup J.P., Zappacosta F., Lunsford R.D., Annan R.S., Carr S.A., Lonsdale J.T., Bryant A.P., McDevitt D., Rosenberg M., Burnham M.K.R.: The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry*, **40**, 10392–10401 (2001)
91. Tsuji B.T., Rybak M.J., Lau K.L., Sakoulas G.: Evaluation of accessory gene regulator (*agr*) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1089–1091 (2007)
92. Vandenesch F., Kornblum J., Novick R.P.: A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **173**, 6313–6320 (1991)
93. Wright III J.S., Traber K.E., Corrigan R., Benson S.A., Musser J.M., Novick R.P.: The *agr* radiation: an early event in the evolution of *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* **187**, 5585–5594 (2005)
94. Wright J.S. 3rd, Lyon G.J., George E.A., Muir T.W., Novick R.P.: Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of staphylococcal quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16168–16173 (2004)
95. Yarwood J.M., McCormick J.K., Schlievert P.M.: Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors. *J. Bacteriol.* **183**, 1113–1123 (2001)
96. Yoon H.J., Choi J.Y., Lee K., Yong D., Kim J.M., Song Y.G.: Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Med. J.* **48**, 176–183 (2007)
97. Zhang L., Gray L., Novick R.P., Ji G.: Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34736–34742 (2002)
98. Zhang L., Ji G.: Identification of a staphylococcal AgrB segment(s) responsible for group-specific processing of AgrD by gene swapping. *J. Bacteriol.* **186**, 6706–6713 (2004)
99. Zhang L., Lin J., Ji G.: Membrane anchoring of the AgrD N-terminal amphipathic region is required for its processing to produce a quorum-sensing pheromone in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 19448–19456 (2004)
100. Ziebandt A.K., Becher D., Ohlsen K., Hacker J., Hecker M., Engelmann S.: The influence of *agr* and  $\Sigma_{aB}$  in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics*, **4**, 3034–3047 (2004)