

Aleksandra Nowak^{1*}, Stefan Tyski^{1,2}

¹Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa

²Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w maju 2012

1. Wstęp. 2. Budowa, sposób działania i autoregulacja dwuskładnikowych systemów regulacyjnych (TCS). 3. TCS a biofilm. 3.1. Biofilm paciorkowców. 3.1.1. System VicRK *S. mutans*. 3.1.2. System ComDE *S. mutans*. 3.1.3. System HK11/RR11 (LiaSR) *S. mutans*. 3.1.4. System CiaRH *S. mutans*. 3.1.5. System CovRS (CsrRS) paciorkowców grup A, B, C. 3.1.6. System BfrAB *S. gordonii*. 3.2. Biofilm gronkowców. 3.2.1. System ArlRS *S. aureus*. 3.2.2. System GraRS *S. aureus*. 3.2.3. System WalkR *S. aureus*. 3.2.4. System LytSR *S. aureus*. 3.2.5. System SaeRS *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. 3.3. Biofilm enterokoków. 3.3.1. System FsrABC *E. faecalis*. 3.3.2. System EtaSR *E. faecalis*. 4. Podsumowanie

The role of two-component regulatory systems of Gram-positive cocci in biofilm formation

Abstract: Two-component systems (TCS) are common in bacterial cells and play an important role in response to various signals coming from environment. The simplest TCS consists of two elements: a membrane sensor protein, which receives signals and the other – a regulatory protein that modulates target gene expression in response to the stimulus. The recent studies have shown that biofilm formation is dependent on many genetic factors, including the two-component regulatory systems. The bacterial cells living in biofilm communities are very vital and resistant to many antibiotics and antimicrobial agents. Therefore, in-depth knowledge of TCS involved in biofilm formation seems to be necessary to combat the growing resistance of bacteria.

1. Introduction. 2. Structure, organization and autoregulation of two-component regulatory systems. 3. TCS and the biofilm. 3.1. Streptococcal biofilm. 3.1.1. The VicRK system of *S. mutans*. 3.1.2. The ComDE system of *S. mutans*. 3.1.3. The HK11/RR11 (LiaSR) system of *S. mutans*. 3.1.4. The CiaRH system of *S. mutans*. 3.1.5. The CovRS (CsrRS) system of grup A, B, C streptococci. 3.1.6. The BfrAB system of *S. gordonii*. 3.2. Staphylococcal biofilm. 3.2.1. The ArlRS system of *S. aureus*. 3.2.2. The GraRS system of *S. aureus*. 3.2.3. The WalkR system of *S. aureus*. 3.2.4. The LytSR system of *S. aureus*. 3.2.5. The SaeRS system of *S. aureus* and *S. epidermidis*. 3. Enterococcal biofilm. 3.3.1. The FsrABC system of *E. faecalis*. 3.3.2. The EtaSR system of *E. faecalis*. 4. Summary

Słowa kluczowe: dwuskładnikowe systemy regulacyjne, biofilm, ziarenkowce Gram-dodatnie

Key words: two-component systems, biofilm, Gram-positive cocci

1. Wstęp

Rok 1986 przyjmuje się za początek badań nad zjawiskiem transdukcji sygnału u bakterii. W tym czasie Nixon i wsp. po raz pierwszy użyli określenia dwuskładnikowy system regulacyjny (two-component system, TCS) [56]. Również w roku 1986 Nifai i Magasanik wykazali, że dwuskładnikowy system regulacyjny poprzez fosforylację białek może kontrolować asymilację azotu u bakterii [55]. Te dwa odkrycia, pierwsze dotyczące wysokiej konserwatywności sekwencji aminokwasowych oraz drugie dotyczące fosforylacji białek w TCS zapoczątkowały ogromne zainteresowanie tematyką dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, które trwa do dnia dzisiejszego [9]. W piśmiennictwie prócz wymienionego skrótu TCS można spotkać także określenia TCSTS (two component signal transduction system), jak również systemy dwuskładnikowe czy dwuskładnikowe systemy regulacyjne. Obecnie wiadomo

już, że TCS u bakterii występują powszechnie i odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na różnego rodzaju sygnały docierające z otoczenia. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne zaangażowane są w wiele procesów życiowych bakterii m.in. wirulencję, kompetencję, koniugację oraz tworzenie biofilmu. Wykazano również udział TCS w regulacji licznych szlaków metabolicznych a także transporcie jonów i substancji odżywczych. Mimo, iż znana jest budowa i sposób działania wielu TCS, to wciąż pozostaje szereg niejasności w tej dziedzinie, głównie w obszarze różnorodności sygnałów przez nie odbieranych, roli TCS w patogenezie zakażeń oraz wzajemnych zależności pomiędzy różnymi dwuskładnikowymi systemami regulacyjnymi [35, 36, 75].

Zsekwencjonowanie licznych genomów bakteryjnych znacznie ułatwiło oszacowanie potencjalnej liczby genów kodujących białka sensorowe i regulatorowe wchodzące w skład TCS. Analizy proteomów wielu bakterii, w tym kilku gatunków ziarenkowców Gram-dodatnich

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa, tel.: 22- 628-08-22; tel./fax: 22 621 13 51; e-mail: olanowak1@gmail.com

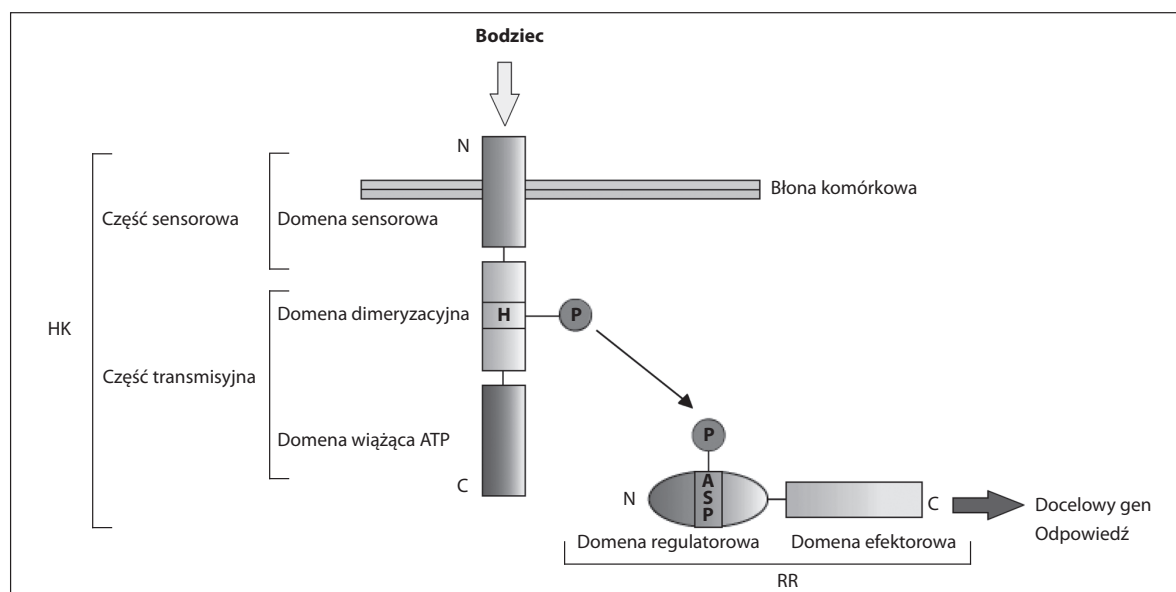
wykazały, że *Streptococcus mutans* i *Streptococcus pneumoniae* posiadają 13 TCS [2, 13] natomiast *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz *Enterococcus faecalis* po 17 TCS [16, 28, 84]. Okazuje się również, że bakterie o większym genomie kodują zazwyczaj większą liczbę białek tworzących układy dwuskładnikowe. Także genomy bakterii bytujących w zróżnicowanych środowiskach kodują więcej TCS niż genomy drobnoustrojów żyjących w środowiskach jednolitych (dogodnych). Jest to szczególnie zauważalne u bakterii chorobotwórczych [7].

2. Budowa, sposób działania oraz autoregulacja TCS

Prototypowy, modelowy dwuskładnikowy system regulacyjny składa się z błonowego białka sensorowego, którym jest kinaza histydynowa (HK), odbiera ona sygnał ze środowiska oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego – regulatora odpowiedzi (RR), zaś RR po zmianie konformacji wynikającej z odebrania sygnału, reguluje ekspresję docelowego genu. W przypadku budowy kinazy histydynowej wyróżnić można dwa elementy składowe: tzw. część sensorową, którą tworzy domena sensorowa oraz część transmisyjną, którą stanowią domena dimeryzacyjna o enzymatycznej aktywności kinazy histydynowej wraz z domeną wiążącą ATP. Część sensorowa zlokalizowana jest w błonie komórkowej, z kolei część transmisyjna znajduje się w przestrzeni cytoplazmatycznej. Oczywiście kinazy histydynowe mogą budową nieznacznie odbiegać od modelu prototypowego i ich część sensorowa może

być zakotwiczona w cytoplazmie. Wykazano, iż model budowy kinazy histydynowej zależy w głównej mierze od rodzaju działającego bodźca. Białko regulatorowe z kolei tworzą dwie domeny: domena regulatorowa (posiadająca konserwowaną resztę kwasu asparaginowego Asp) oraz domena efektorowa oddziałująca z DNA (Rys. 1). Należy podkreślić, że schemat budowy oraz ogólna zasada działania TCS u różnych grup bakterii są podobne [7, 10, 22].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne są tak skonstruowane, że pozwalają doskonale połączyć bodziec oraz reakcję na ten bodziec. Mechanizm działania TCS, choć złożony, umożliwia drobnoustrojom wykrywanie i odpowiednie reagowanie na zmiany warunków otoczenia. Wśród czynników, które mogą być odbierane przez TCS wyróżniono wiele sygnałów chemicznych i fizycznych, takich jak: stężenie jonów (np. Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), stężenie związków odżywczych, temperatura, pH, zawartość tlenu, osmolarność, potencjał redoks, a także kontakt z komórkami gospodarza. Bodziec odbierany przez dwuskładnikowy system regulacyjny przekształcany jest w sygnał komórkowy na drodze autofosforylacji silnie konserwowanej reszty histydynowej białka sensorowego. Sygnał ze środowiska zewnętrznego wychwytywany jest przez część N-końcową białka sensorowego (domena sensorowa) a następnie przekazywany na część C-końcową, gdzie zlokalizowana jest domena dimeryzacyjna. W kolejnym etapie przekazania sygnału reszta fosforanowa przenoszona jest na kwas asparaginowy domeny regulatorowej zlokalizowanej w części N-końcowej białka regulatorowego. Etap



Rys. 1. Schemat budowy prototypowego układu dwuskładnikowego. Za zgodą [79]

HK – kinaza histydynowa, RR – regulator odpowiedzi, H – reszta histydynowa białka sensorowego, ASP – reszta kwasu asparaginowego, P – reszta fosforanowa N – N-końiec białka, C – C-końiec białka

końcowy z kolei obejmuje modulację ekspresji docelowych genów przez domenę efektorową zlokalizowaną na części C-końcowej.

Droga transdukcji sygnału w prostym układzie dwuskładnikowym obejmuje zazwyczaj trzy reakcje:

1. Autofosforylację: $HK-His + ATP = HK-His \sim P + ADP$
2. Fosfotransfer: $HK-His \sim P + RR \sim Asp = HK-His + RR-Asp \sim P$
3. Defosforylację: $RR-Asp \sim P + H_2O = RR-Asp + Pi$

Silnie konserwowana reszta histydynowa białka sensorowego działa jak „przekaznik” przenosząc sygnał na resztę kwasu asparaginowego białka regulatorowego dlatego dwuskładnikowe systemy regulacyjne są idealnie skonstruowane do pełnienia funkcji przekaznika i „przetwornika” sygnałów docierających ze środowiska. Błonowa lokalizacja białka sensorowego oraz wysoki stopień specyficzności pomiędzy sensorem i regulatorem pozwala na skuteczną transdukcję sygnału, której efektem jest fizjologiczna lub strukturalna odpowiedź na dany bodziec [7, 19, 51, 72].

Wiele dwuskładnikowych systemów pozytywnie reguluje ekspresję własnych genów. Operony kodujące te systemy posiadają, co najmniej dwa promotory: 1) promotor konstytutywny, odpowiadający za syntezę wystarczającej liczby białek sensorowych i regulatorowych w celu detekcji sygnału i uruchomienia właściwej dla niego odpowiedzi oraz 2) promotor autoregulowany odpowiadający, za ekspresję dodatkowych kopii sensora oraz białka regulatorowego. Autoregulacja zapewnia niejako „pamięć” poprzednich spotkań z sygnałem, gdyż nawet po jego zaniku poziom stężenia białka sensorowego w komórce pozostaje na wysokim poziomie [8]. Okazało się, że bakterie, które uprzednio poddane były działaniu czynnika stresowego, którym był niedobór fosforu, ponownie wystawione na działanie tego samego czynnika, zareagowały znacznie szybciej. Dzieje się tak, dlatego, że w komórce bakteryjnej nawet po zaniku sygnału pozostaje podwyższony poziom białka sensorowego jak i regulatorowego, co zapewnia swego rodzaju pamięć z pierwszego spotkania. Autoregulacja umożliwia również hierarchiczną organizację ekspresji genów danego regulonu. Ekspresja pewnych genów jest zależna od białka regulatorowego ekspresjonowanego z promotora konstytutywnego, podczas gdy inne są ściśle zależne od białek regulatorowych ekspresjonowanych z promotora autoregulacyjnego [8, 34, 38, 65].

3. TCS a biofilm

Tworzenie biofilmu przez bakterie, w tym ziarenkowce Gram-dodatnie, jest procesem złożonym i ściśle kontrolowanym. Obecnie wiadomo już, że na prawidłowy przebieg tego procesu wpływa wiele czynników,

wśród których dużą rolę przypisuje się dwuskładnikowym systemom regulacyjnym (Tab. I) [35, 36, 72].

Bakterie rosną i funkcjonują, przylegając prawie do każdej powierzchni biotycznej i abiotycznej, tworząc niezwykłą pod względem architektonicznym społeczność zwaną biofilmem. Najprościej biofilm można zdefiniować jako społeczność drobnoustrojów rosnącą w wielokomórkowych agregatach, związaną z powierzchnią, otoczoną zewnątrzkomórkową macierzą składającą się z polisacharydów, białek oraz DNA (tzw. eDNA). Co ciekawe, domniemane mikrokolonie biofilmu zidentyfikowano już w skamieniałościach pochodzących sprzed ok. 3,3–3,4 miliardów lat. Istnieją liczne dowody potwierdzające, że zdolność do tworzenia biofilmu jest prastarą cechą prokariotycznego cyklu życiowego przez miliony lat niezwykle konserwowaną i niezbędną do przeżycia w zróżnicowanych środowiskach [1, 5, 27, 47].

Budowa biofilmu bywa różna i zależy od kilku czynników, głównie od warunków panujących w danym środowisku oraz własności tworzących go drobnoustrojów. Powstawanie biofilmu jest procesem złożonym, ściśle kontrolowanym, obejmującym kilka etapów (Rys. 2). Pierwszy etap, tzw. wstępna adhezja ma charakter odwracalny i uzależniona jest od kilku czynników tj. temperatury, sił Van der Waalsa czy oddziaływań sił elektrostatycznych. Druga faza, nazywana trwałą adhezją, jest z kolei nieodwracalna. Kluczową rolę w przypadku tego etapu odgrywają specyficzne oddziaływania adhezyjne różnego typu zlokalizowanych na powierzchni komórek. Kolejne etapy powstawania warstwy biologicznej to dojrzewanie oraz uwolnienie komórek (dyspersja). W fazie dojrzewania dochodzi do ostatecznego uformowania w pełni funkcjonalnego biofilmu. W fazie tzw. dyspersji z kolei następuje odrywanie się fragmentów biofilmu lub uwolnienia komórek potomnych, które mogą przemieszczać się w poszukiwaniu nowych korzystnych nisz życiowych [18]. Mechanizm molekularny sterujący tworzeniem biofilmu może różnić się między gatunkami, a nawet pomiędzy różnymi szczepami tego samego gatunku. Zdolność bakterii do formowania biofilmu stwarza możliwość ochrony podczas wzrostu i rozwoju komórek, warunkuje oporność na wiele antybiotyków i innych związków przeciwbakteryjnych, umożliwiając przetrwanie w niekorzystnym środowisku, a także zdobywanie nowych nisz ekologicznych [1, 27, 47].

Biofilm wpływa na wiele aspektów ludzkiego życia, ale przede wszystkim przyczynia się do rozwoju wielu groźnych dla człowieka zakażeń bakteryjnych. Większość z nich powodowanych jest przez drobnoustroje występujące w postaci biofilmu, dlatego tak ważne wydaje się opracowanie skutecznych metod jego zwalczania [1, 5, 27, 47]. Zwłaszcza biofilm ziarenkowców Gram-dodatnich ma ogromne znaczenie w chorobotwórczości, a może powstawać zarówno na powierzchniach tkanek jak również implantowanych wyrobów

Tabela I

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne ziarenkowców Gram-dodatnich uczestniczące w tworzeniu biofilmu

Drobno- ustrój	TCS	Ogólna funkcja	Efekt inaktywacji genów TCS na biofilm	Piśmien- nictwo
<i>S. mutans</i>	VicRK	Wzrost komórek, adhezja, formowanie biofilmu , genetyczna kompetencja	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: szorstki, kłaczkowaty i z mniejszą liczbą komórek	[81]
<i>S. mutans</i>	ComDE	Formowanie biofilmu , genetyczna kompetencja, synteza bakteriocyny, odpowiedź na warunki stresowe	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: zmiany w strukturze, odnotowano także znaczny spadek biomasy	[5, 45, 46]
<i>S. mutans</i>	LiaSR HK/RR11	Odpowiedź na warunki stresowe m.in. stres termiczny, oksydacyjny, formowanie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: zmniejszenie gęstości komórek, spadek biomasy	[44, 46, 58]
<i>S. mutans</i>	CiaRH	Odpowiedź na niekorzystne warunki panujące w środowisku, synteza bakteriocyny (mutacyny I), genetyczna kompetencja tworzenie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: inaktywacja genu <i>ciaH</i> skutkowałą redukcją biomasy. Inaktywacja <i>ciaR</i> nie wykazywały znaczących różnic w strukturze	[33, 42, 50, 82]
Paciorkowce grupa A, B, C	CovRS (CsrRS)	Rozwój, patogenezą, tworzenie biofilmu	Inaktywacja genu <i>covR</i> spowodowała niezdolność szczepu do formowania biofilmu	[14, 11, 43, 75]
<i>S. gordonii</i>	BfrAB	Formowanie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: wyraźny spadek biomasy, zmniejszona adhezja do apatytu sHA	[84, 86]
<i>S. aureus</i>	ArlRS	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zwiększona zdolność szczepu do tworzenia biofilmu , ale zmniejszona zdolność do przylegania w porównaniu ze szczepem dzikim	[77]
<i>S. aureus</i>	GraRS	Oddziaływania międzykomórkowe oraz tworzenie biofilmu w obecności cytrynianu	Zaobserwowano podwyższony poziom formowania biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego bez obecności cytrynianu	[68]
<i>S. aureus</i>	WalKR	Metabolizm ściany komórkowej, formowanie biofilmu	Ogólne zaburzenia w tworzeniu biofilmu	[16]
<i>S. aureus</i>	LytSR	Śmierć oraz liza komórek (autoliza) podczas formowania biofilmu	Biofilm szczepu z mutacją w genie <i>lytS</i> cechował się większą grubością oraz biomasą w porównaniu do szczepu dzikiego	[26, 63, 69]
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	SaeRS	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zwiększenie zdolności do tworzenia biofilmu	[31, 48]
<i>E. faecalis</i>	FsrABC	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zmniejszona zdolność do tworzenia biofilmu	[28, 29, 60]
<i>E. faecalis</i>	EtaSR	Stres komórkowy, wirulencja, formowanie biofilmu	Niewielkie zmiany w strukturze biofilmu	[76]

medycznych. Dlatego niezwykle interesującym jest uzyskanie pełnego wglądu w udział TCS w tworzeniu struktury biofilmu tych drobnoustrojów.

3.1. Biofilm paciorkowców

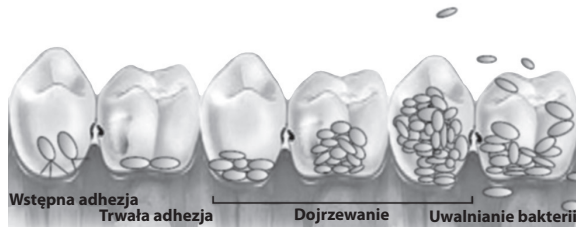
Bakterie z rodzaju *Streptococcus* są częstymi patogenami człowieka. Niektóre z nich mogą powodować zakażenia oportunistyczne np. próchnicę zębów wywoływaną głównie przez *S. mutans* oraz *S. sobrinus* [14]. Opisano siedem gatunków paciorkowców izolowanych od ludzi i zwierząt należących do grupy „mutans” są to: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. criceti*, *S. rattii*, *S. ferus*, *S. macacae* i *S. downei* [73, 78]. Szczepy paciorkowców kolonizujących jamę ustną, zwłaszcza z gatunku *S. mutans* odpowiedzialne są za tworzenie biofilmu w postaci płytki nazębnej – istotnej struktury sprzyjającej powsta-

waniu próchnicy i stanów zapalnych w obrębie dziąseł (Rys. 2). Jama ustna stanowi złożony ekosystem, który zasiedla bardzo zróżnicowana mikroflora składająca się z około 500 gatunków drobnoustrojów [39]. Liczne oddziaływania pomiędzy nimi stanowią dobrą podstawę do formowania złożonej społeczności biofilmu.

Inne paciorkowce jak *S. pneumoniae* odpowiadający głównie za zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, czy *S. pyogenes* związany z zapaleniem gardła, anginą a nawet zapalenia stawów czasami także wykazują zdolność do tworzenia biofilmu w przebiegu wyżej wymienionych infekcji.

3.1.1. System VicRK u *S. mutans*

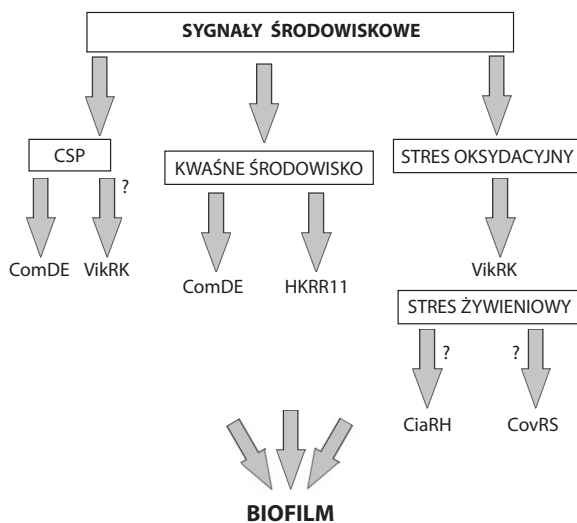
Dwuskładnikowy system regulacyjny VicRK jest jednym z 13 zidentyfikowanych u *S. mutans* UA159. Schemat budowy tego układu nie odbiega od prototy-



Rys. 2. Etapy powstawania biofilmu na przykładzie płytki nazębnej

powego, zatem operon *vicRKX* koduje, odpowiednio, błonową kinazę histydynową VicK oraz wewnątrzkomórkowy modulator odpowiedzi VicR jego główną rolą jest udział w adaptacji komórki bakteryjnej do zmian zachodzących w otoczeniu (Rys. 3). Inaktywacja genów *vicK* oraz *vicR* wykazała, że ich produkty uczestniczą w prawidłowym wzroście komórek, adhezji, formowania biofilmu oraz tzw. genetycznej kompetencji. Zjawisko to polega na naturalnej zdolności niektórych bakterii, w tym *Streptococcus* sp. do pobierania heterologicznego DNA, i jak wykazano, jest to proces niezwykle powszechny w społeczności biofilmu [66, 81].

W porównaniu ze szczepem dzikim *S. mutans* UA159, szczepy z mutacją zarówno w genie *vicK* jak i *vicR* tworzą odbiegający od typowego dla *S. mutans* UA159 biofilm. Biofilm szczepu dzikiego jest gładki i równy, podczas gdy biofilm szczepów zmutowanych szorstki, kłaczkowaty i z mniejszą liczbą komórek [66, 81]. Zidentyfikowano także trzeci gen wchodzący w skład operonu *vicRKX*. Produkt genu *vicX* jest niezbędny do prawidłowego wzrostu komórek, adhezji i kompetencji. Aby określić jak produkt genu *vicX* wpływa na architekturę biofilmu oraz sam proces jego kształtowania, badano szczep z mutacją w genie *vicX*. Analiza porównawcza w elektronowym mikro-

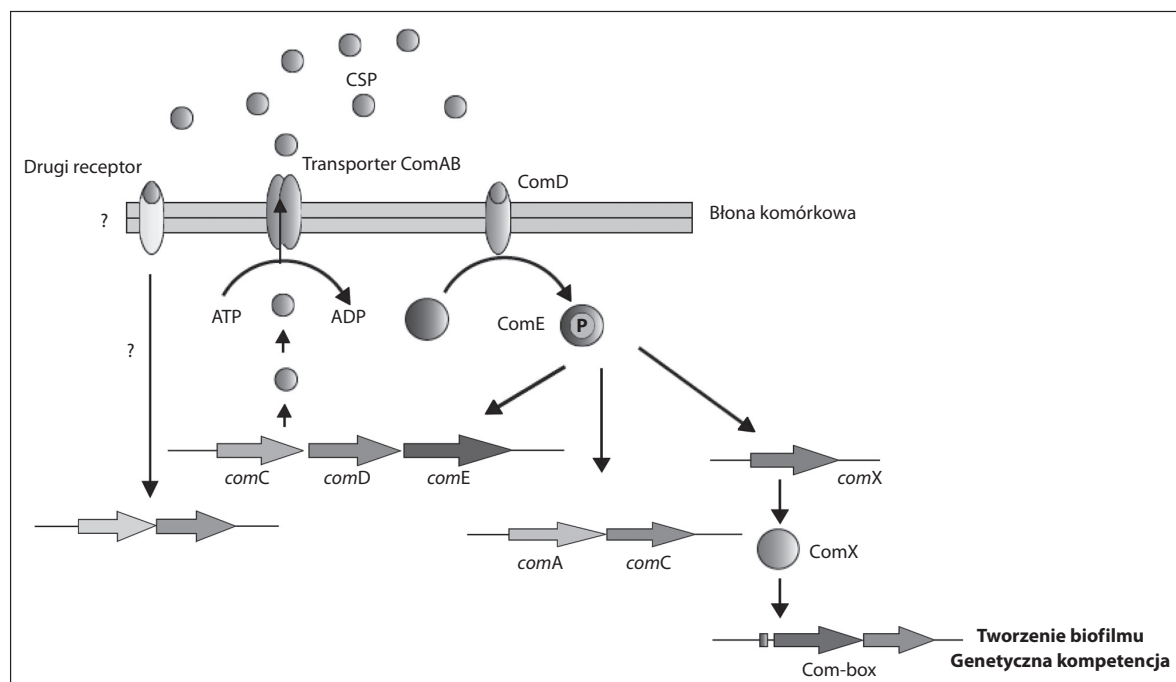


Rys. 3. Przykłady sygnałów środowiskowych aktywujących TCS i wpływających na biofilm *S. mutans*. Za zgodą [65]

skopie skaningowym, (SEM), biofilmu zmutowanego szczepu z inaktywowanym genem *vicX* oraz dzikiego rosnącego na podłożu płynnym uzupełnionym glukozą (12 nM) lub sacharozą (6 nM) wykazały znaczne różnice architektoniczne w budowie [67].

3.1.2. System ComDE *S. mutans*

Kolejnym zaangażowanym w tworzenie biofilmu u *S. mutans* dwuskładnikowym systemem regulacyjnym jest ComDE [45, 46]. Geny systemu ComDE wchodzą w skład operonu *comCDE*, a jego produktami są: prekursor CSP, kinaza histydynowa – białko sensorowe rozpoznające CSP oraz regulator odpowiedzi, który koordynuje ekspresję genów *comAB*, *comCDE* oraz *comX*. System ComDE odgrywa również kluczową rolę w tzw. genetycznej kompetencji, syntezie bakteriocyny oraz odpowiedzi na warunki stresowe [46]. Operon *comCDE* wraz z operonem *comAB* kodują geny odpowiadające za zjawisko wyczuwania liczebności (QS, Quorum Sensing), w którym cząsteczką sygnałową jest białko CSP (Competence Stimulating Protein). Quorum Sensing stanowi pewną odmianę transdukcji sygnału różniącą się od klasycznego dwuskładnikowego systemu rodzajem odbieranego bodźca. System QS zaangażowany jest w regulację wielu procesów takich jak: wirulencja, produkcja metabolitów wtórnych, bioluminescencja, koniugacja, transformacja czy tworzenie biofilmu. Mechanizm tego zjawiska związany jest z syntezą mediatorów chemicznych, których stężenie rośnie w miarę zagęszczania się populacji, aż do osiągnięcia pewnej gęstości krytycznej, powyżej której związanie mediatora z receptorem powierzchniowym (ComD) stanowi sygnał dla komórki. Bakterie reagują na sygnały wysyłane przez własne komórki co znacznie ułatwia im monitorowanie zagęszczenia populacji oraz dostosowanie ekspresji genów do fazy wzrostu. Zjawisko quorum sensing wymaga aktywności sześciu genów kodowanych przez dwa operony, *comAB* oraz *comCDE*. Produkty pierwszego budują transporter typu ABC, niezbędny do eksportu CSP na zewnątrz komórki bakteryjnej, drugi omówiono powyżej. Poziom ekspresji genów uzależniony jest od poziomu ComX, który jest alternatywną podjednostką sigma polimerazy RNA. Gen *comC*, kodujący prekursor CSP oraz operon *comAB* kodujący system sekrecji CSP, w głównej mierze odpowiadają za syntezę i transport aktywnego CSP (Rys. 4). Inaktywacja któregoś z nich znacznie ogranicza zdolność do genetycznej kompetencji *S. mutans*. Dodatkowo mutanty w genie *comC* wykazują zmiany w strukturze biofilmu, ale ich biomasa był porównywalna z szczepem dzikim *S. mutans*. Dodanie syntetycznego CSP powoduje powrót do struktury biofilmu, charakterystycznej dla szczepu dzikiego. Z kolei inaktywacja genów *comD* i *comE* powoduje zmiany w strukturze, biofilm staje się znacznie cieńszy, a także odnotowuje się znaczny spadek



Rys. 4. Schemat transdukcji sygnału z udziałem dwuskładnikowego systemu ComDE zaangażowanego w tworzenie biofilmu oraz tzw. genetyczną kompetencję *S. mutans*. Za zgodą [45, 65].

biomasy (ok. 70%) w porównaniu do szczepu dzikiego. Warto podkreślić, że krzywe wzrostu obu mutantów mają podobny przebieg, co wskazuje na to, że inaktywacja jednego z genów kodujących TCS w tym samym stopniu oddziałuje na wzrost i gęstość komórek. Wykazano także, że dodanie syntetycznego CSP do płynnej hodowli mutantów nie może przywrócić biomasy biofilmu na poziomie szczepu dzikiego, co dodatkowo potwierdza, że dwuskładnikowy system regulacyjny ComDE odgrywa bardzo ważną rolę w wykrywaniu i transdukcji sygnału z udziałem CSP. Mutanty *S. mutans* w genie *comX* formują biofilm bardzo podobny do biofilmu mutantów w genach *comD* i *comE*. Uzyskane wyniki w przypadku tych czterech mutantów, dwa rodzaje biofilmu – pierwszy z defektem w strukturze (*comC*) oraz drugi zarówno z defektem w strukturze jak i redukcją biomasy (*comD*, *comE*, *comX*) sugerują istnienie drugiego receptora wykrywającego peptyd CSP, ale aktywującego inny mechanizm odpowiedzi. W celu potwierdzenia tej hipotezy skonstruowano potrójnego mutantu *comCDE*. Szczep ten formował biofilm o obniżonej biomase podobnie jak mutanty w genach *comD* i *ComE*, ale wykazywał defekt w strukturze podobnie jak *comC*. Okazało się również, że dodanie syntetycznego CSP do hodowli takiego szczepu zmutowanego spowodowało częściowe przywrócenie struktury jaką wykazywał biofilm szczepu dzikiego, co z kolei umocniło hipotezę o istnieniu kolejnego receptora dla peptydu CSP [5, 45, 46].

3.1.3. System LiaSR (HK11/RR11) u *S. mutans*

Powyższy dwuskładnikowy system regulacyjny zidentyfikowany w genomie *S. mutans* UA159 przez Li i wsp. [44], nazwany początkowo HK11/RR11 obecnie zyskał nową nazwę LiaSR nadaną mu przez Chong i wsp., ze względu na dużą homologię do systemu LiaRS *B. subtilis* [12]. System HK11/RR11 zaangażowany jest w proces segregacji komórek oraz odpowiedź na warunki stresowe m.in. stres termiczny oraz oksydacyjny i, jak wykazano, odgrywa on istotną rolę w formowaniu biofilmu *S. mutans*. Analiza porównawcza między szczepem zmutowanym w genie *rr11* (*liaR*), a szczepem dzikim *S. mutans* UA159 pozwoliła wytypować aż 174 geny zależne do białka regulatorowego RR11 (LiaR) zaangażowane w formowanie biofilmu [58]. Wykazano, że delekcja w genach *hk11* oraz *rr11* skutkuje defektem w strukturze biofilmu, zmniejszeniem jego gęstości, przylegania do podłoża biofilmu, ponadto zaobserwowano spadek biomasy biofilmu zmutowanych szczepów w porównaniu ze szczepem dzikim *S. mutans*. W celu stwierdzenia, czy TCS kodowany przez *hk11/rr11* mógłby funkcjonować jako tzw. druga ścieżka przekazywania sygnału, dodano syntetyczny CSP do hodowli mutantów. Okazało się jednak, że w tym przypadku dodanie CSP nie miało znaczącego wpływu na biofilm [44, 58]. W celu obniżenia wirulencji oraz zdolności próchnicotwórczych szczepów *S. mutans* stworzono podwójnego mutantu w dwóch systemach regulacyjnych ComCDE oraz HK11/RR11 [46]. Uzyskane wyniki wskazują, że jednoczesna inaktywacja

obu TCS obniża wirulencję oraz zdolność *S. mutans* do tworzenia zmian próchnicowych w stopniu wyższym niż inaktywacja tylko jednego z systemów. Szczep zmutowany w genach *comCDE* oraz *hk11/rr11* wykazywał defekt w zdolności do tzw. genetycznej kompetencji, zdolności do wzrostu na podłożu o pH 5,0 oraz tworzył biofilm zdeformowany o obniżonej biomase. Eksperymenty z udziałem zwierząt wskazują, że mutanty te cechuje obniżona zdolność do kolonizacji jamy ustnej, a nawet samej inicjacji procesu próchnicotwórczego. Badania te stanowią dobrą podstawą do opracowania strategii mających na celu profilaktykę lub leczenie zakażeń powodowanych przez *S. mutans* [46].

3.1.4. System CiaRH u *S. mutans*

Dwuskładnikowy system regulacyjny CiaRH *S. mutans* zaangażowany jest w tworzenie biofilmu, syntezę bakteriocyny (mutacyny I), genetyczną kompetencję oraz odpowiedź na niekorzystne warunki panujące w danym środowisku. Okazało się, że system ten występuje dość powszechnie u paciorkowców, u których bierze udział w procesie patogenezycji oraz odpowiedzi na warunki stresowe [82]. Po przebadaniu mutantów *S. pneumoniae* w genach *cia* wskazano na możliwy udział systemu CiaRH w utrzymaniu integralności ściany komórkowej [50]. Intensywne badania TCS CiaRH *S. mutans* wykazały na jego wyjątkowe właściwości. Różni się on bowiem od systemów CiaRH zidentyfikowanych u innych paciorkowców dodatkowym białkiem CiaX, kodowanym przez pierwszy gen operonu *ciaXRH* [82]. Inaktywacja genu *ciaH* skutkuje zwiększeniem tolerancji na stres oksydacyjny u *S. mutans*, zahamowaniem syntezy mutacyny I, redukcją zdolności szczepu do tzw. naturalnej kompetencji oraz wzrostem tolerancji na kwaśne pH. Delecja CiaH skutkuje także redukcją biomasy biofilmu oraz zmniejszeniem rozmiarów komórek, co może sugerować udział dwuskładnikowego systemu CiaRH w regulacji wzrostu i/lub podziału komórek *S. mutans*. Z kolei mutanty w genie *ciaR* nie wykazywały znaczących różnic w strukturze biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego *S. mutans* UA140. Określono również wpływ inaktywacji genu *ciaX* kodowanego na operonie *ciaXRH*. Okazało się, że mutanty w tym genie także wykazują defekty w strukturze biofilmu [33, 42].

3.1.5. System CovRS (CsrRS) paciorkowców grup A, B, C

Dwuskładnikowy system regulacyjny CovRS znany również pod nazwą CsrRS po raz pierwszy został zidentyfikowany w genomach szczepów GAS (Group A Streptococci). U tych szczepów odgrywa on istotną rolę w rozwoju, patogenezycji oraz w tworzeniu biofilmu [43]. Dwuskładnikowy system CovRS reguluje ekspresję ok. 15% genów GAS wśród nich m.in. operonu *has* (hyaluronic acid capsule synthesis) oraz genów: *ska* (streptokinase), *sagA* (streptolysin S), *speB* (cysteine protease B)

[14]. Wykazano iż inaktywacja genu *covR* spowodowała niezdolność szczepu do formowania biofilmu w przeciwieństwie do inaktywacji *covS*. Uzyskane wyniki sugerowały zależny od szczepu wpływ kinazy histydynowej CovS na formowanie biofilmu GAS. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnych szczepów GAS mających inaktywowany gen *covS*. Wyniki potwierdziły zależny od właściwości szczepu mechanizm regulacji [11, 75]. Wykazano także, że białko CovR jest wymagane do ekspresji genów związanych z wirulencją paciorkowców grupy B oraz grupy C [14].

3.1.6. System BfrAB u *S. gordonii*

Dwuskładnikowy system regulacyjny BfrAB (Biofilm Formation Related) został zidentyfikowany poprzez przeszukiwanie integracyjnej biblioteki plazmidów w genomie *Streptococcus gordonii* V288. System ten jest zaangażowany w tworzenie biofilmu [84]. Gen *bfrA* koduje białko regulatorowe o masie cząsteczkowej ok. 25,7 kDa, a z kolei gen *bfrB* kinazę histydynową o masie cząsteczkowej 32,9 kDa. W porównaniu ze szczepem dzikim *S. gordonii* V288, szczep zmutowany w systemie *bfr* wykazuje nieprawidłowości w tworzeniu biofilmu, ma niższą biomasa oraz zmniejszoną adhezję do apatytu sHA (saliva-coated hydroxyapatite). Ponadto, osiadłe i planktonowe komórki tworzące tzw. wczesny biofilm na sHA wykazują wyższy poziom ekspresji genów *bfr* niż komórki wolnożyjące, sugerując istotną rolę dwuskładnikowego systemu regulacyjnego Bfr AB we wczesnych etapach rozwoju biofilmu *S. gordonii* [84].

Według dostępnych danych system BfrAB reguluje ekspresję genów *bfrCD*, *bfrEFG*, kodujących białka systemu transportu ABC oraz ekspresję genu *bfrH*, kodującego CAAX amino-terminalną proteazę. Wykazano, że oczyszczona domena wiążąca DNA białek BfrA wiąże się do regionów promotorowych *bfrCD*, *bfrEFG* oraz *bfrH*, co sugeruje, że system BfrAB *S. gordonii* może kontrolować tworzenie biofilmu poprzez regulację systemów transportu typu ABC [86].

3.2. Biofilm gronkowców

Proces powstawania biofilmu gronkowców, pod względem genetycznym i molekularnym jest niezwykle złożony. W tworzeniu biofilmu gronkowcowego istotną rolę odgrywa polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (PIA, polysaccharide intercellular adhesin), będąca produktem operonu *icaADBC*. Ekspresja operonu *ica* modulowana jest przez różnego typu sygnały i prawdopodobnie znajdują się pod kontrolą SigB. Wiadomo również, że może być włączana i wyłączana przez sekwencje insercyjne (IS). Innymi białkami zaangażowanymi w tworzenie biofilmu gronkowców są także AAP (accumulation-associated protein), ClfA (clum-

ping factor A), białko **Bap** (biofilm associated protein) oraz **SSP1** (staphylococcal surface protein). W genomie *S. aureus* zidentyfikowano 17 TCS [4, 24]. Poniżej przedstawiono kilka najważniejszych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, zaangażowanych w tworzenie biofilmu gronkowcowego.

3.2.1. System *ArlRS* u *S. aureus*

Operon *arlRS* koduje dwuskładnikowy system regulacyjny *ArlRS*. Produktem genu *arlS* jest kinaza histydynowa, z kolei *arlR* regulator odpowiedzi wykazujący podobieństwo do rodziny białek OmpR-PhoP. Mutacja w systemie *ArlRS* zwiększa zdolność szczepu *S. aureus* do tworzenia biofilmu, jednak mechanizm tego procesu jak dotąd nie został poznany. Ponadto mutanty *arlRS* cechowały się zwiększoną zdolnością do autolizy i zmniejszoną aktywnością hydrolaz peptydoglikanu. Badano także strukturę biofilmu z zastosowaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) i wykazano że, biofilm tworzony przez komórki zmutowane był obfitszy ale cechowało go zmniejszone przyleganie do powierzchni abiotycznej [77].

3.2.2. System *GraRS* u *S. aureus*

Początkowo dwuskładnikowemu systemowi regulacyjnemu **GraRS** (Glycopeptide Resistance Associated) przypisano wraz z pompą efflux *VraFG* udział w oporności na wankomycynę [68]. Obecnie stwierdzono udział systemu **GraRS** w oddziaływaniach komórkowych oraz tworzeniu biofilmu gronkowców w obecności niskich stężeń cytrynianu. Jednak mechanizm tego procesu pozostaje jak dotąd nieznan. Wiadomo natomiast, że mutanty w systemie *GraRS* nie tworzą agregatów w obecności cytrynianu. Dla tych szczepów zaobserwowano także podwyższony poziom formowania biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego hodowanego bez obecności cytrynianu. Niedawno wykazano także, że mutacja w genach *graRS* prowadzi do wzrostu całkowitego ujemnego ładunku na powierzchni komórek. Okazało się bowiem, że system *GraRS* pozytywnie reguluje ekspresję genu *dlt*, którego produkt jest niezbędny do wytwarzania cząsteczek kwasu lipotejchowego na powierzchni komórek. Mutanty w locus *dlt* cechował podwyższony poziom ładunków ujemnych na powierzchni komórki oraz tworzenie biofilmu. Jest zatem możliwe, że wzrost formowania biofilmu na powierzchni abiotycznej przejawiany przez mutanty *graRS* bez obecności cytrynianu związany jest z obniżonym stężeniem białka *Dlt* w komórce. Prowadzi to do zwiększenia zdolności gronkowców do przylegania do powierzchni [68].

3.2.3. System *WalKR* u *S. aureus*

Silnie konserwowany *WalKR*, znany także pod nazwą *YycGF*, dwuskładnikowy system regulacyjny jest

charakterystyczny dla bakterii Gram-dodatnich o małej zawartości par GC w genomie. Wykazano obecność tego typu systemu m.in. w przypadku *S. aureus* [17], [49], *B. subtilis* [20, 21], *E. faecalis* [30], *L. monocytogenes* [37], *S. pneumoniae* [40] i *S. mutans* [66]. System *WalKR* kodowany jest przez operon *yycFG*, którego dwa pierwsze geny kodują odpowiednio kinazę histydynową *WalK* oraz regulator odpowiedzi *WalR* [16]. Wykazano, że system ten odgrywa istotną rolę w metabolizmie ściany komórkowej, bierze również udział w tworzeniu biofilmu. Wykazano, że inaktywacja *WalKR* prowadzi do powstania fenotypu charakteryzującego się brakiem oporności na środki powierzchniowo czynne tj. Triton X-100, brakiem agregacji komórek oraz zaburzeniami w tworzeniu biofilmu [16].

3.2.4. System *LytSR* u *S. aureus*

Operon *lytSR* *S. aureus* koduje dwuskładnikowy system regulacyjny *LytSR*. Inaktywacja *lytSR* powoduje zmianę aktywności hydrolaz mureiny wytwarzanych przez komórki tego patogenu oraz zaburzenia w spontanicznej ich lizie. Po odpowiedniej stymulacji komponent sensorowy *LytS* oddziałuje z regulatorem odpowiedzi *LytR*, który z kolei aktywuje ekspresję genów znajdujących się pod jego kontrolą. Jednym z miejsc docelowych systemu *LytSR* jest operon *lrgAB*, który wraz z operonem *cidAB* kontroluje śmierć oraz lizę komórkową [26, 63]. Gen *cidA* koduje białko podobne do holiny, które jest aktywatorem hydrolaz mureiny i lizy komórek *S. aureus*, podczas gdy *lrgA* koduje antyholinę pełniącą rolę inhibitora wspomnianych procesów [26]. Ostatnie badania wskazują, że biologiczną funkcją operonów *cid* oraz *lrg* jest kontrola śmierci komórek oraz ich lizy podczas rozwoju biofilmu *S. aureus* [3, 62, 70, 80]. Produkt genu *cidA* jest pozytywnym efektem lizy komórek i uwalniania pozakomórkowego DNA z biofilmu podczas gdy operon *lrg* jest inhibitorem lizy. W celu zbadania wpływu dwuskładnikowego systemu regulacyjnego *LytSR* na rozwój biofilmu, inaktywowano operon *lytSR* klinicznego szczepu *S. aureus* UAMS-1 i wykazano, że jest on niezbędny do rozwoju prawidłowego biofilmu tego szczepu [69].

3.2.5. System *SaeRS* u *S. aureus* oraz *S. epidermidis*

System *SaeRS* początkowo został zidentyfikowany w genomie *S. aureus*. Wykazano jego udział w syntezie adhezyn [32] oraz γ -hemolizyny [83]. U gronkowca złocistego operon *sae* koduje cztery geny *saePQRS*, spośród których gen *saeR* koduje białko regulatorowe a gen *saeS* kinazę histydynową [23]. Funkcja dwóch pozostałych genów jak dotąd nie została poznana, jednakże upatruje się ich roli w regulacji zależnej od operonu [57]. Dwuskładnikowy system regulacyjny *SaeRS*, będący jednym z 17 zidentyfikowanych w genomie tego patogenu, zaangażowany jest w wirulencję oraz tworzenie

biofilmu. Wykazano także, że delecja *saeR* powoduje zaburzenia wzrostu w warunkach beztlenowych oraz zmniejszenie zdolności do asymilacji azotu. Ponieważ udział systemu SearRS w formowaniu biofilmu i autolizie *S. epidermidis* pozostawał kwestią sporną, utworzono mutanta zarówno w genie *seaR* jak i *saeS*. Okazało się, że delecja *saeRS* powoduje zwiększenie zdolności do tworzenia biofilmu oraz stężenia eDNA w macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki zmutowanego szczepu cechowała także zwiększona zdolność do autolizy oraz zmniejszona żywotność zarówno w postaci planktonowej jak i w formie biofilmu [31, 48].

3.3. Biofilm enterokoków

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* uważane są za patogeny oportunistyczne. *Enterococcus faecalis* jest jednym z najczęściej występujących gatunków enterokoków u ludzi i odpowiada za ok. 80–90% zakażeń. *E. faecalis* oraz *E. faecium* wykazują zdolność do tworzenia biofilmu. Białkami zaangażowanymi w tworzenie biofilmu enterokoków są m.in. **Esp** (Enterococcal surface protein), **Fsr** (*E. faecalis* regulator), **GelE**, **Epa** (Enterococcal polysaccharide antigen), **Atn**, **EtaR**, **SalB** (Secretory antigen-like B), **SalA** (Secretory antigen-like A), **DltA**, **Bop** (Biofilm on plastic surface), **EbpABC** (Endocarditis and biofilm-associated pili), **EbpR**, **Bee** (Biofilm enhancer in *Enterococcus*), **SrtC** [52].

W genomie *E. faecalis* V583 zidentyfikowano 17 dwuskładnikowych systemów regulacyjnych oraz pojedyncze białko regulatorowe, które odgrywają rolę w tworzeniu biofilmu [28].

3.3.1. System FsrABC u *E. faecalis*

Wśród zidentyfikowanych w genomie *E. faecalis* V583 systemów – system FsrABC może mieć wpływ na tworzenie biofilmu [29]. Operon *fsr* koduje trzy geny *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*. *FsrC* to kinaza histydynowa, z kolei *FsrA* to regulator odpowiedzi. Produkty operonu *fsr* są niezbędne do syntezy dwóch proteaz sekrecyjnych, żelatynazy (**GalE**) oraz proteazy serynowej (**SprE**) [60]. Liczne badania nad systemem FsrABC wykazały, że kontroluje on rozwój biofilmu *E. faecalis* poprzez syntezę żelatynazy. Spośród 18 regulatorów odpowiedzi zidentyfikowanych w genomie tego patogenu jedynie inaktywacja genu *fsrA* powodowała znaczne ograniczenie zdolności do tworzenia biofilmu na polistyrenowych płytkach przez zmutowany szczep. Ponieważ gen *fsrA* jest jednym z trzech kodowanych na operonie *fsrABC*, odpowiadającym za syntezę **GelE** oraz **SprE**, badano także wpływ inaktywacji genów *fsrB*, *fsrC*, *gelE*, *sprE* na tworzenie biofilmu przez *E. faecalis* V583. Analiza mutantów w wyżej wymienionych genach wykazała, że z wyjątkiem genu proteazy serynowej *sprE*, wszystkie zmutowane szczepy cechowała zmniejszona zdolność do tworzenia biofilmu [28].

3.3.2. System EtaSR *E. faecalis*

Kolejnym dwuskładnikowym systemem zidentyfikowanym w genomie *E. faecalis* V583 jest EtaSR. Składa się on z regulatora odpowiedzi EtaR, wykazującego duże podobieństwo do LisR *L. monocytogenes* (77%) i do białka regulatorowego CsrR *S. pyogenes* (70%) oraz kinazy histydynowej EtaS, która w 53% jest homologiczna do LisK *L. monocytogenes*, a w 54% do CsrS *S. pyogenes*. System ten okazuje się być zaangażowany w odpowiedź na stres komórkowy oraz wirulencję *E. faecalis*. W warunkach *in vitro* szczepy z mutacją w systemie *etaSR* cechuje większa wrażliwość na niskie pH oraz większa odporność na wysoką temperaturę (55°C) w porównaniu do szczepu dzikiego *E. faecalis* V583. Stwierdzono także udział EtaSR w tworzeniu biofilmu. Jednak szczep z mutacją w genie *etaR* wykazywał niewielkie zmiany w strukturze biofilmu [76].

4. Podsumowanie

Liczba wykrytych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych związanych z tworzeniem biofilmu wzrosła w ostatnich latach głównie ze względu na duży postęp w dziedzinie genomiki i proteomiki. Mimo iż znanych jest wiele czynników biorących udział w tworzeniu biofilmu niezbędne są dodatkowe badania i eksperymenty aby umożliwić lepsze zrozumienie regulacji procesu powstawania biofilmu. Oceniono, że około 95% mikroorganizmów żyjących w naturze tworzy biofilmy [74]. Komórki bakteryjne takiej społeczności cechuje duża żywotność oraz oporność na wiele stosowanych antybiotyków, dlatego dogłębne poznanie funkcjonowania TCS zaangażowanych w tworzenie biofilmu wydają się konieczne do walki z wciąż rosnącą opornością bakterii.

Piśmiennictwo

1. Abee T., Kovács A.T., Kuipers O.P., van der Veen S.: Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 172–179 (2011)
2. Ajdic, D., McShan W.M., McLaughlin R.E., Savic G., Chang J., Carson M.B., Primeaux C., Tian R., Kenton S., Jia H., Lin S., Qian Y., Li S., Zhu H., Najjar F., Lai H., White J., Roe B.A., Ferretti J.J.: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14434–14439 (2002)
3. Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114–1128 (2006)
4. Aparna M. S., Yadav S.: Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.* **12**, 526–530 (2008)
5. Baj J., Markiewicz Z. (red.): *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa – 2006
6. Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirschberg 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)
7. Beier, D., Gross R.: Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 143–152 (2006)
 8. Bijlsma J.J., Groisman E.A.: Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**, 359–366 (2003)
 9. Bourret R.B., Silversmith R.E.: Two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 113–115 (2010)
 10. Cheung J., Hendricksom W.A.: Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 116–123 (2010)
 11. Cho K.H., Caparon M.G.: Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1545–1556 (2005)
 12. Chong P., Drake L., Biswas I.: LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **76**, 3093–3099 (2008)
 13. Cvitkovitch D.G., Li Y.H., Ellen R.P.: Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1626–1632 (2003)
 14. Dmitriev A., Mohapatra S.S., Chong P., Neely M., Biswas S., Biswas I.: CovR-controlled global regulation of gene expression in *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, **6**, 1–11 (2011)
 15. Dubrac S., Bisicchia P., Devine K.M., Msadek T.: A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **70**, 1307–1322 (2008)
 16. Dubrac S., Boneca I.G., Poupel O., Msadek T.: New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**, 8257–8269 (2007)
 17. Dubrac S., Msadek T.: Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 1175–1181 (2004)
 18. Dunne W.M.: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155–166 (2002)
 19. Eguchi Y., Utsumi R.: Introduction to bacterial signal transduction networks. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 1–6 (2008)
 20. Fabret, C., Hoch J.A.: A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* **180**, 6375–6383 (1998)
 21. Fukuchi K., Kasahara Y., Asai K., Kobayashi K., Moriya S., Ogasawara N.: The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146**, 1573–1583 (2000)
 22. Galperin M.Y.: Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 150–159 (2010)
 23. Giraud, A.T., Calzolari A., Cataldi A.A., C. Bogno, Nagel R.: 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 15–22
 24. Gotz F.: *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**, 1367–1378 (2002)
 25. 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)
 26. Groicher K.H., Firek B.A., Fujimoto D.F., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *IrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**, 1794–1801 (2000)
 27. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
 28. Hancock L., Perego M.: Two-component signal transduction in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184**, 5819–5825 (2002)
 29. Hancock L., Perygo M.: The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* **186**, 5629–5639 (2004)
 30. Hancock L., Perego M.: Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* **186**, 7951–7958 (2004)
 31. Handke L.D., Rogers K.L., Olson M.E., Somerville G.A., Jerrells T. J., Rupp M.E., Dunman P.M., Fey P.D.: *Staphylococcus epidermidis* *saeR* is an effector of anaerobic growth and a mediator of acute inflammation. *Infect. Immun.* **76**, 141–152 (2008)
 32. Harraghy N., Kormanec J., Wolz C., Homerova D., Goerke C., Ohlsen K., Qazi S., Hill P., Herrmann M.: *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology*, **151**, 1789–1800 (2005)
 33. He X., Wu C., Yarbrough D., Sim L., Niu G., Merritt J., Shi W., Qi F.: The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation. *Mol. Microbiol.* **70**, 112–126 (2008)
 34. Hoffer S.M., Westerhoff H.V., Hellingwerf K.J., Postma P.W., Tommassen J.: Autoamplification of a two-component regulatory system results in “learning” behavior. *J. Bacteriol.* **183**, 4914–4917 (2001)
 35. Jaworski A., Serweciński L., Stączek P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacji bakterii przy udziale chemicznych cząstek sygnałowych. *Post. Biol. Kom.* **32**, 231–256 (2005)
 36. Juda M., Dadas E., Malm E.: Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* **46**, 237–248 (2007)
 37. Kallipolitis B.H., Ingmer H.: *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 111–115 (2001)
 38. Kato A., Tanabe H., Utsumi R.: Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J. Bacteriol.* **181**, 5516–5520 (1999)
 39. Kroes I., Lepp P.W., Relman D.A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14547–14552 (1999)
 40. Lange R., Wagner C., de Saizieu A., Flint N., Molnos J., Stieger M., Caspers P., Kamber M., Keck W., Amrein K.E.: Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **237**, 223–234 (1999)
 41. Lembke C., Podbielski A., Hidalgo-Grass C., Jonas L., Hanski E., Kreikemeyer B.: Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2864–2875 (2006)
 42. Lévesque C.M., Mair R.W., Perry J.A., Lau P.C., Li Y.H., Cvitkovitch D.G.: Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Letts. Appl. Microbiol.* **45**, 398–404 (2007)
 43. Levin J.C., Wessels M.R. : Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A Streptococcus. *Mol. Microbiol.* **30**, 209–219 (1998)
 44. Li Y.H., Lau P.C., Tang N., Svensäter G., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Novel two-component regulatory system involved in

- biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **184**, 6333–6342 (2002)
45. Li Y.H., Tang N., Aspiras M.B., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **184**, 2699–2708 (2002)
 46. Li Y.H., Tian X.L., Layton G., Norgaard C., Sisson G.: Additive attenuation of virulence and cariogenic potential of *Streptococcus mutans* by simultaneous inactivation of the ComCDE quorum-sensing system and HK/RR11 two-component regulatory system. *Microbiology*, **154**, 3256–3265 (2008)
 47. López D., Vlamakis H., Kolter R.: Biofilms. *Cold Spring Harbour Perspect. Biol.* **2**, 1–11 (2010)
 48. Lou Q., Zhu T., Hu J., Ben H., Yang J., Yu F., Liu J., Wu Y., Fischer A., Francois P., Schrenzel J., Qu D.: Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. *BMC Microbiol.* **11**, 1–15 (2011)
 49. Martin P.K., Li T., Sun D., Biek D.P., Schmid M.B.: Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**, 3666–3673 (1999)
 50. Mascher T., Zähler D., Merai M., Balmelle N., de Saizieu A.B., Hakenbeck R.: The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 60–70 (2003)
 51. Mitrophanov A.Y., Groisman E.A.: Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes. Dev.* **22**, 2601–2611 (2008)
 52. Mohamed J.A., Huang D.B.: Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1581–1588 (2007)
 53. Nakayama J., Cao Y., Horii T., Sakuda S., Akkermans A.D., de Vos W.M., Nagasawa H.: Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **41**, 145–154 (2001)
 54. Nakayama J., Tanaka E., Kariyama R., Nagata K., Nishiguchi K., Mitsuhashi R., Uemura Y., Tanokura M., Kumon H., Sonomoto K.: Siamycin attenuates *fsr* quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **189**, 1358–1365 (2007)
 55. Ninfa A.J., Magasanik B.: Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5909–5913 (1986)
 56. Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M.: Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7850–7854 (1986)
 57. Novick R.P., Jiang D.: The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology*, **149**, 2709–2717 (2003)
 58. Perry J.A., Lévesque C.M., Suntharalingam P., Mair R.W., Bu M., Cline R.T., Peterson S.N., Cvitkovitch D.G.: Involvement of *Streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**, 439–444 (2008)
 59. Peterson M.M., Mack J.L., Hall P.R., Alsup A.A., Alexander S.M., Sully E.K., Sawires Y.S., Cheung A.L., Otto M., Gresham H.D.: Apolipoprotein B is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe*, **4**, 555–566 (2008)
 60. Qin X., Singh K.V., Weinstock G.M., Murray B.E.: Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* **183**, 3372–3382 (2001)
 61. Qin Z., Zhang J., Xu B., Chen L., Wu Y., Yang X., Shen X., Molin S., Danchin A., Jiang H., Qu D.: Structure-based discovery of inhibitors of the YycG histidine kinase: new chemical leads to combat *Staphylococcus epidermidis* infections. *BMC Microbiol.* **10**, 96 (2006)
 62. Rice K.C., Bayles K. W.: Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 85–109 (2008)
 63. Rice K.C., Firek B.A., Nelson J.B., Yang S.J., Patton T.G., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **185**, 2635–2643 (2003)
 64. Rice L.B.: Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 183–187 (2001)
 65. Senadheera D., Cvitkovitch D.G.: Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 178–188 (2008)
 66. Senadheera M.D., Guggenheim B., Spatafora G.A., Huang Y.C., Choi J., Hung D.C., Treglown J.S., Goodman S.D., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gpbB*, and *fif* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J. Bacteriol.* **187**, 4064–4076 (2005)
 67. Senadheera M.D., Lee A.W., Hung D.C., Spatafora G.A., Goodman S.D., Cvitkovitch D.G.: The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J. Bacteriol.* **189**, 1451–1458 (2007)
 68. Shanks R.M., Meehl M.A., Brothers K.M., Martinez R.M., Donegan N.P., Graber M.L., Cheung A.L., O'Toole G.A.: Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway in *Staphylococcus aureus* that is dependent on fibronectin binding proteins and the GraRS two-component regulatory system. *Infect. Immun.* **76**, 2469–2477 (2008)
 69. Sharma-Kuinkel B.K., Mann E.E., Ahn J.S., Kuechenmeister L.J., Dunman P.M., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J. Bacteriol.* **191**, 4767–4775 (2009)
 70. Spoering A.L., Gilmore M.S.: Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 133–137 (2006)
 71. Steinhilber A., Goerke C., Bayer M.G., Doring G., Wolz C.: 2003. Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**: 6278–6286
 72. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N.: Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 (2000)
 73. Strużycka I., Radziejewska M., Rucińska K.: Epidemiologia bakterii z grupy *Streptococcus mutans* w różnych populacjach. *Nowa Stomatologia*, 1/2001, 20–23
 74. Strużycka I., Stępień I.: Biofilm nowy sposób rozumienia mikrobiologii. *Nowa Stomatologia* 3/2009, 85–89
 75. Sugareva V., Arlt R., Fiedler T., Riani C., Podbielski A., Kreikemeyer B.: Serotype – and strain- dependent contribution of the sensor kinase CovS of the CovRS two-component system to *Streptococcus pyogenes* pathogenesis. *BMC Microbiol.* **1**, 10–34 (2010)
 76. Teng F., Wang L., Singh K.V., Murray B.E., Weinstock G.M.: Involvement of PhoP-PhoS homologs in *Enterococcus faecalis* virulence. *Infect. Immun.* **70**, 1991–1996 (2002)
 77. Toledo-Arana A., Merino N., Vergara-Irigaray M., Débarbouillé M., Penadés J.R., Lasa I.: *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* **187**, 5318–5329 (2005)

78. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. II Edycja. Vol. 3: The Firmicutes. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York – 2009 s. 662–663
79. West A.H., Stock A.M.: Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–376 (2001)
80. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, **295**, 1487 (2002)
81. Winkler M.E., Hoch J.A.: Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **190**, 2645–2648 (2008)
82. Wu C., Ayala E.A., Downey J.S., Merritt J., Goodman S.D., Qi F.: Regulation of *ciaXRRH* operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **192**, 4669–4679 (2010)
83. Yamazaki K., Kato F., Kamio Y., Kaneko J.: Expression of gamma-hemolysin regulated by *sae* in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 174–180 (2006)
84. Zhang Y., Lei Y., Khammanivong A., Herzberg M.C.: Identification of a novel two-component system in *Streptococcus gordonii* V288 involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* **72**, 3489–3494 (2004)
85. Zhang Y.Q., Ren S.X., Li H.L., Wang Y.X., Fu G., Yang J., Qin Z.Q., Miao Y.G., Wang W.Y., Chen R.S., Shen Y., Chen Z., Yuan Z.H., Zhao G.P., Qu D., Danchin A., Wen Y.M.: Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577–1593 (2003)
86. Zhang Y., Whiteley M., Kreth J., Lei Y., Khammanivong A., Evavold J.N., Fan J., Herzberg M.C.: The two-component system BfrAB regulates expression of ABC transporters in *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*. *Microbiology*, **155**, 165–173 (2009)