

原核生物毒素-抗毒素系统的研究进展

李百元^{1,2}, 陈丹^{*1}

1 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199

2 湖南科技学院 湘南优势植物资源综合利用湖南省重点实验室, 湖南 永州 425199

李百元, 陈丹. 原核生物毒素-抗毒素系统的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3492-3499

Li Baiyuan, Chen Dan. Advances in prokaryotic toxin-antitoxin system[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3492-3499

摘 要: 毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TA)由具有杀菌或抑菌作用的毒素和能中和毒素毒性的抗毒素组成, 在细菌和古菌的染色体和可移动遗传元件中分布广泛。TA 系统具有结构和功能的多样性, 目前分为八大类型(I–VIII 型)。研究发现 TA 系统与细菌生物膜的形成、细菌毒力、耐药性细菌感染、质粒拷贝数的调控及原噬菌体切离后在细胞中的稳定维持等相关。文章综述了近年来 TA 系统的最新分类、TA 系统的功能及抗毒素的其他调控功能等进展, 并对 TA 领域的应用做了简要描述。

关键词: 毒素-抗毒素系统; 可移动遗传元件; TA 的分类; TA 的功能

Advances in prokaryotic toxin-antitoxin system

LI Baiyuan^{1,2}, CHEN Dan^{*1}

1 College of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China

2 Key Laboratory of Comprehensive Utilization of Advantage Plants Resources in Hunan South, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, Hunan, China

Abstract: Toxin-antitoxin (TA) system is prevalent in chromosomes and mobile genetic elements of bacteria and archaea. TA systems are diverse in structure and function, which are currently classified into eight types (type I–VIII). They are involved in biofilm formation, virulence, drug-resistant infection of host bacteria, regulation of plasmid copy number, and maintenance of prophage after its excision. In this

基金项目: 湖南省教育厅科学研究一般项目(20C0855); 国家自然科学基金青年基金(32100151); 湖南省自然科学基金青年基金(2021JJ40221); 广东省海洋药物重点实验室开放项目(LMM2020-1)

Supported by: General Scientific Research Project of Hunan Education Department (20C0855); National Natural Science Foundation of China (32100151); Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ40221); Open Project of Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Materia Medica (LMM2020-1)

***Corresponding author:** E-mail: cd409698080@126.com

Received: 2021-11-26; **Accepted:** 2022-02-14; **Published online:** 2022-03-12

paper, we reviewed the latest classification and functions of TA systems and the regulatory functions of antitoxin, and then briefly described the application of TA systems.

Keywords: toxin-antitoxin system; mobile genetic elements; TA classification; TA functions

毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统广泛存在于细菌和古菌的染色体和质粒中, 目前发现在其他的可移动遗传元件(如转座子、原噬菌体和基因岛)中也广泛存在, 它们在协助细菌应对恶劣环境、耐受抗生素作用并产生耐药菌方面具有重要作用^[1-3]。近年来的研究发现, 毒素-抗毒素系统广泛存在于环境微生物和病原微生物的基因组中, 并且在可移动遗传元件中的分布丰度高于基因组的其他位置, 而可移动遗传元件又是耐药基因广泛传播的主要介质, 这引起了国际微生物学界的高度关注^[4-5]。文章从 TA 系统的分类、功能及调控 3 个方面对 TA 系统的新进展进行了综述, 为更深入地研究、开发和应用 TA 系统提供科学基础。

1 TA 系统的分类

TA 系统由具有杀菌或抑菌作用的毒素(toxin)及与其相邻并能中和毒素毒性的抗毒素(antitoxin)组成, 根据 TA 系统组成和抗毒素拮抗毒素的分子机制, 可将其分为 8 类^[6]: (1) I 型系统: 抗毒素为反义 RNA, 抗毒素通过与毒素 mRNA 结合阻止毒素的翻译, 包括 Idr-Rdl、Hok-Sok 等^[7-8]; (2) II 型系统: 抗毒素为蛋白, 其通过直接的蛋白-蛋白相互作用方式, 结合和抑制毒素蛋白, 使毒素被中和, 包括 RelE-RelB、MazE-MazF 等^[8-9]; (3) III 型系统: 抗毒素为 RNA, 通过 RNA 与毒素蛋白直接相互作用抑制毒素蛋白的毒性, 包括 ToxI-ToxN 等^[10]; (4) IV 型系统: 抗毒素为蛋白, 其不与毒素蛋白直接相互作用, 而是通过阻止毒素蛋白结合其靶标, 包括 YeeU-YeeV 等^[11]; (5) V 型系统: 抗毒素是一种 RNase 酶, 特异性降解毒素 mRNA, 进而抑制毒素的表

达, 包括 GhoT-GhoS^[12]; (6) VI 型系统: 抗毒素为蛋白, 抗毒素通过与毒素蛋白的作用促进毒素蛋白被蛋白酶降解, 包括 SocB-SocA 等^[13]; (7) VII 型系统: 抗毒素是一种酶, 毒素蛋白是抗毒素酶活性的直接靶点, 抗毒素通过翻译后修饰毒素而直接导致毒素失活, 包括 HepT-MntA、TglT-TakA 等^[14]; (8) VIII 型系统: 毒素作为一种 sRNA 而不是蛋白发挥作用, 抗毒素 RNA 通过反义结合使毒素 RNA 失活, 包括 SdsR-RyeA 等^[6,15]。I-VI 型的 TA 系统已经被深入研究, 其机制被清楚解析, 但是 VII-VIII 型的 TA 系统最近才被提出, 下面将集中对 VII 和 VIII 型 TA 系统及最近新报道的疑似新型 TA 系统分类单元展开讨论。

Wang 等^[14]提出的 VII 型 TA 系统包括了一大类具有特殊中和毒素方式的 TA 系统, 与之前的 6 类显著不同。在 VII 型 TA 中, 抗毒素是一种酶, 毒素蛋白是抗毒素酶活性的直接靶点, 抗毒素通过对毒素蛋白进行翻译后修饰, 直接导致毒素失活, 如 HepT-MntA、Hha-TomB 和 TglT-TakA 系统。HepT-MntA TA 系统中, 抗毒素 MntA 具有核酸转移酶活性, 能够利用 ATP 作为底物将 3 个 AMP 逐个转移到毒素蛋白 HepT 活性基序 RX4H 附近的酪氨酸, 基于遗传、生化、结构和体内、体外活性分析, 证实这种多聚腺苷酸化修饰(polyadenylation)是抗毒素中和毒素毒性的关键^[16]。大肠杆菌 Hha-TomB TA 系统中, Hha 毒素通过减少菌毛的产生来减少生物膜的形成^[17], 而 TomB 抗毒素能够氧化 Hha 毒素蛋白的半胱氨酸使其毒性降低^[18]。TglT-TakA TA 系统的抗毒素 TglA 是一种新型的非典型丝氨酸蛋白激酶, 通过磷酸化毒素蛋白的丝氨酸位点使其失活^[19]。这 3 对 TA 系统中的抗毒素都具有酶的特征, 并且

通过对毒素蛋白的修饰来降低或者丧失其毒性,因此将这 3 类 TA 划分为 VII 型 TA 系统。Choi 等^[15]发现 SdsR 的异位表达导致显著的 Hfq 依赖性细胞死亡,并伴有细胞成丝。这种 SdsR 驱动的细胞死亡被 RyeA (转录在相反 DNA 链上的一种 sRNA)的过表达所缓解,指出 SdsR-RyeA 是一种新型的毒素-抗毒素系统,其中毒素和抗毒素都是 sRNA。Song 等^[6]将 SdsR-RyeA TA 系统定义为 VIII 型 TA,该类型 TA 系统的出现突破了毒素是蛋白质的定义,拓展了 TA 系统的研究领域,也为 TA 系统的生理生化功能研究搭建了重要的框架。此外, Li 等发现嗜盐古菌 *Haloarcula hispanica* 染色体编码的 CreT-CreA 系统中,毒素 CreT 为 sRNA,抗毒素 CreA 也是 sRNA,但是抗毒素 CreA 拮抗毒素 CreT 毒性的前提是必须有 CRISPR 系统 cascade 的参与,其可利用抗毒素 CreA 控制毒素 CreT 的表达,使宿主菌对其“上瘾”,而 CRISPR-cascade 组分一旦被破坏,就会诱导 CreT 毒素表达,抑制或杀死宿主菌^[20]。鉴于其毒素-抗毒素系统的结构特征与拮抗方式的特殊性,推测其可能为新型的毒素-抗毒素系统。另外, CreT-CreA 系统新颖的分子机制在基因工程和基因编辑等应用方面具有巨大的潜在价值。随着越来越多的原核生物基因组被完成测序及分子生物学研究技术的发展,相信会有更多具有新颖作用方式的 TA 被发现。

2 TA 系统的功能

2.1 TA 系统的三大生物学功能

TA 系统最早被发现存在于低拷贝的质粒上,此后,在细菌和古细菌的染色体、质粒和可移动遗传元件上已鉴定出数千个 TA 系统,它们在细菌生理和遗传元件的维持中发挥着不同的作用^[1-3]。目前研究最多的三大生物学功能分别是 TA 维持质粒稳定的分离后致死效益

(post-separational killing system, PSK)^[21]、导致宿主细菌的顿挫感染(abortive infection)^[22]和持留性感染^[23]。PSK 途径稳定质粒一直被认定是质粒编码 TA 系统的主要功能,即在细胞分裂过程中质粒由于复制或分离错误发生丢失时,由于抗毒素极不稳定很快被蛋白酶水解,不含质粒的子代细胞中残留的毒素蛋白会发挥出毒性,抑制细胞的分裂或直接杀死细胞,从而起到维持质粒在群体中稳定的功能。然而, Cooper 等在 2000 年提出了 PSK 理论的不足,认为 TA 系统维持质粒的稳定是质粒与质粒竞争的结果,即编码有 TA 的质粒通过竞争优势将无 TA 的质粒淘汰掉而保留编码有 TA 的质粒,进而维持编码有 TA 质粒的稳定^[24]。

2.2 TA 系统的新功能

随着研究的不断深入,TA 系统的不同功能逐步被揭示出来,如与生物体的压力胁迫^[25]、基因组的稳定^[26]、细菌生物膜的形成^[27]、细菌毒力^[28]、细菌耐药性感染^[4]、细胞的生长及细胞的程序性死亡^[29-30]等相关,然而这些研究的 TA 系统主要是染色体编码的,相较于染色体编码的 TA 系统,质粒编码的 TA 系统研究时间最长,但是其生理功能一直未被完全解析。Kamruzzaman 等通过对质粒上的 TA 系统分析,发现在接合型质粒上 II 型 TA 系统分布广泛,其中,禽源和人源的大肠杆菌和沙门氏菌上分布的 IncI、IncF 型抗生素耐药性和毒力质粒具有最高丰度的 ParE-ParD TA 系统,其作为质粒稳定和应激反应的元件,可将大肠杆菌对氨基糖苷类、喹诺酮类和 β -内酰胺类抗生素的耐受性提高 100–1 000 倍;此外,表达 ParE 毒素可诱导 SOS 反应,抑制细胞分裂并促进生物膜的形成^[4]。最近的研究发现,海洋细菌内源质粒编码的 PrpT-PrpA TA 系统中的抗毒素 PrpA 通过结合到质粒复制起始区,直接调控质粒的拷贝数^[31],进一步拓宽了质粒编码

TA 系统的功能。

2.3 其他可移动原件上 TA 系统的功能

随着可移动遗传元件如原噬菌体、接合型整合元件、基因岛上的 TA 系统不断被发现, 其编码的 TA 系统的生理功能也逐渐被解析。Yao 等发现希瓦氏菌原噬菌体 CP4So 编码的 ParE_{So}-CopA_{So} 可以维持切离后原噬菌体环形结构的稳定^[32]。铜绿假单胞菌原噬菌体 Pf4 编码的 II 型毒素-抗毒素系统 PfiT-PfiA 可以诱导 Pf4 溶源化, 进而产生病毒粒子, 并且毒素 PfiT 的过量表达会引起细菌形态的延长^[2]。*Clostridioides difficile* 编码的毒素-抗毒素系统在原噬菌体 phiCD630-1 和 phiCD630-2 稳定和遗传中起着重要的作用^[5]。在霍乱弧菌中, TA 系统 MosAT 可以提高接合型整合元件 STX 的稳定, 从而持续赋予宿主对多种抗生素的抗性^[33]。霍乱弧菌的染色体包含第一染色体和第二染色体(secondary chromosomes), 第二染色体也编码生长必需的一些基因; 目前已经发现第二染色体至少存在 17 对 TA 系统, 其中 II 型 TA 系统 RelB-RelE1 和 ParD-ParE1 已被报道与其稳定性相关^[34]。基因岛编码的 TA 系统也有少量的报道, 如沙门氏菌基因岛 SGI1 编码的 TA 系统 SgiAT 和猪链球菌毒力岛 SsPI-1 编码的 SezAT TA 系统在基因岛稳定性中起着关键作用^[3,35]。此外, Li 等发现 CreT-CreA 同源系统在不同微生物和不同 CRISPR 亚型中普遍存在^[20]。CRISPR-Cas 系统极易被移动元件如 IS 破坏, 而 CreT-CreA 系统的存在可保护 CRISPR-Cas 系统不被可移动遗传元件插入而导致其失活, 同时对 CRISPR-Cas 系统在宿主细胞中的稳定性也至关重要^[20]。

2.4 TA 系统功能研究难点

虽然越来越多的 TA 系统被发现, 但是大部分 TA 系统的生物学功能未被解析, 比如在模式生物大肠杆菌 K-12 中已经发现 40 对 TA

系统, 只有少数 TA 系统的功能被清楚解析等。TA 系统功能研究的难点在于缺少有效的功能预测体系, 功能研究存在盲目性。综合大部分发表的 TA 系统功能的报道, 发现 TA 系统的功能通常依赖于该系统毒素蛋白和抗毒素蛋白的功能, 比如 TA 系统维持质粒的稳定性是基于毒素蛋白的毒性特征来保持编码有 TA 系统的质粒稳定存在^[21]; PrpT-PrpA TA 系统调控质粒拷贝数的依据是抗毒素 PrpA 结合到质粒复制起始区竞争 RNAP 的结合来实行其调控的功能^[31]等。在 TA 系统中, 毒素蛋白往往比较保守, 其功能比较明确, 在 II 型 TA 系统中基于毒素蛋白的功能和结构特征细分为八大家族, 即 *relBE*、*mazEF*、*vapBC*、*ccdAB*、*parDE*、*higBA*、*hipBA* 和 *phd-doc*; 但是其抗毒素蛋白相对不保守, 特别是不同家族来源的毒素蛋白和抗毒素蛋白组合的杂合 TA 系统的发现进一步增加了其功能预测的难度。因此, 在后续的 TA 功能预测上, 需要同时考虑毒素蛋白和抗毒素蛋白的结构特征, 才能更好地预测 TA 系统的功能。

3 抗毒素的转录调控功能

3.1 抗毒素结合自身启动子区调控转录

在 8 种类型的 TA 系统中, II 型 TA 系统分布最广、研究最清楚。II 型 TA 系统由稳定的毒素蛋白和不稳定的抗毒素蛋白组成, 毒素蛋白的毒性可被抗毒素蛋白直接中和, 而抗毒素蛋白极易被体内的蛋白酶 Lon 或 ClpAP 降解^[36]。正常情况下, 细菌为了避免毒素蛋白的毒害, 可以通过转录调控的方式来平衡毒素蛋白和抗毒素蛋白在体内的表达。当抗毒素蛋白被水解, 毒素蛋白从毒素-抗毒素复合物中游离出来, 其可以作用于胞内特异的组分如抑制促旋酶等, 从而抑制细菌生长或者杀死细菌。II 型 TA 系统中, 抗毒素蛋白通常包含 2 个结构域, 即 N 端 DNA 结合结构域

和 C 端与毒素蛋白结合的结构域,这 2 个结构域通过中心的弹性小环结构或者铰链状区域连接。通常情况下,抗毒素蛋白的 DNA 结合结构域分为 3 种不同的类型:Helix-Turn-Helix (HTH)、Ribbon-Helix-Helix (RHH)和 SpoVT/AbrB 蛋白结构域^[37]。单独的抗毒素蛋白可以通过结合自身的启动子来抑制操纵子的转录,而毒素一般作为共阻遏物参与调控,其与抗毒素结合形成毒素-抗毒素复合物可以更有效地抑制操作子的转录,如 CcdB-CcdA 系统^[36]。有些报道发现,胞内的毒素蛋白和抗毒素蛋白的分子比值会影响其形成的复合物组成,并且复合物组成的不同也会影响其与启动子区 DNA 的结合^[38]。II 型 TA 系统中,大部分抗毒素基因在基因结构上位于毒素基因的上游,但是也有例外,例如 MqsR-MqsA 系统中的毒素基因 *mqsR* 位于抗毒素基因 *mqsA* 的上游,而且只有单独的抗毒素蛋白 MqsA 才能调控自身操纵子的转录,毒素蛋白与抗毒素蛋白的结合不仅不能增强其与启动子 DNA 的结合,相反会抑制或者降低其与 DNA 的结合^[39]。

3.2 抗毒素结合特定基因启动子区调控转录

抗毒素蛋白除了与自身的启动子区结合外,还能结合到特定基因的启动子区参与调控其他基因转录的调控。大肠杆菌中的 MqsR-MqsA 系统是第一个被证实其抗毒素 MqsA 不仅能调控自身转录还能结合到其他基因的启动子区调控其转录,如 MqsA 结合到 *rpoS* 的启动子区抑制 *rpoS* 基因的转录,从而介导了宿主的普遍性应激反应^[40];此外, MqsA 还能特异性结合到大肠杆菌生物膜和生理活性等相关基因 *cspD*、*mcbR* 和 *spy* 的启动子区^[41-42]。因此, MqsR-MqsA 系统不仅可以通过其表达的毒素蛋白产生毒性,也可以通过调控其他基因的转录来影响宿主细胞的生理活性。恶臭假单胞菌 KT2440 编码的 MqsR/MqsA 系统中的抗毒素 MqsA 通过结

合到 *rpoS* 和 *algU* 基因的启动子区来调节细菌普遍性应激反应和生物膜形成,而且其结合的特异 DNA 序列与大肠杆菌编码的 MqsA 结合序列相同^[43]。铜绿假单胞菌的 HigB-HigA 系统中抗毒素 HigA 通过结合致病因子 *mvfR* 的启动子区调控其转录,进而影响细菌的致病性^[28], HigA 也可以与调控因子 *amrZ* 和 *exsA* 的启动子区结合来负调控 T3SS 和 T6SS 分泌系统的表达^[44]。Wen 等发现金黄色葡萄球菌编码的 II 型 TA 系统 SavR-SavS 不仅可以调控自身的转录,而且还可以结合到毒力基因 *hla* 和 *efb* 的启动子区抑制该毒力基因的转录^[45]。海洋细菌希瓦氏菌原噬菌体 CP4So 编码的 ParE_{So}-CopA_{So} 系统中的抗毒素 CopA_{So} 不仅能调控自身的转录,而且能结合到质粒 pMR-1 编码的 PemK_{So}-PemI_{So} 的启动子区^[32]。

3.3 抗毒素其他调控方式

TA 系统能调控其他基因的转录,同时也能被其他基因调控,如金黄色葡萄球菌的基因 *sigB* 的表达能明显抑制毒素-抗毒素系统 MazE-MazF 的启动子活性^[46],海洋细菌内源质粒编码的 TA 系统 PrpT-PrpA (ParE-PF03693) 中的抗毒素 PrpA 直接调控质粒的拷贝数^[31]。

在上述抗毒素结合的启动子区均发现存在特异“回文序列(palindromic DNA)”,这说明抗毒素蛋白主要是通过转录调控的方式特异性结合回文序列,从而发挥其生理功能。因此,在毒素-抗毒素系统的功能预测上,可以借鉴其结合回文序列特征,通过预测染色体上目标基因启动子区的 DNA 序列结构特征,从而预测该 TA 系统的潜在调控基因,进而预测该 TA 系统的潜在功能。

4 TA 系统的应用及展望

TA 系统可用作抗菌治疗。毒素具有多种生理活性,可干扰细菌的复制、翻译、ATP 合成和

细胞壁合成等重要生理过程。Równicki 等利用多肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)作为抗菌策略人工激活大肠杆菌 MazE-MazF 和 HipB-HipA 毒素-抗毒素系统,即利用 PNA 与抗毒素 mRNA 的结合抑制抗毒素翻译,导致游离毒素分子过多,从而抑制细胞生长^[47],为抗菌治疗打开了新思路。

TA 系统可用作抗肿瘤治疗。Shapira 等利用腺病毒作为毒素和抗毒素传递的载体,通过严格控制毒素和抗毒素的表达选择性地根除癌细胞,正常细胞由于抗毒素 MazE 的高表达而受到保护^[48]。原核细胞中的毒素 Kid 可以诱导人类细胞凋亡,Turnbull 等通过蛋白酶体机制降解 Kis 抗毒素,从而释放 Kid 毒素,触发表达人乳头状瘤病毒癌蛋白 E6 的癌细胞死亡^[49]。Houry 等构建了一个嵌入 YoeB-YefM TA 系统,并对 *yefM* 抗毒素基因进行了改造,在其 3'非翻译区域放置了 8 个 miR-21 靶位点,由此产生的 TA 系统在人类细胞中自主作用,识别过表达 miR-21 的细胞(被 YoeB 杀死)和未表达 miR-21 的细胞(仍然受到 YefM 的保护),从而选择性地杀死高水平表达 miR-21 的人乳腺癌细胞^[50]。

TA 系统作为潜在的分子生物学工具,大量的报道已经证实其可以维持可移动遗传元件如质粒和原噬菌体等的稳定性。Sevillano 等^[51]在基于 YefM-YoeBsl TA 系统相互作用特征的基础上,将毒素 *yoeBsl* 基因整合到链霉菌染色体上,然后将抗毒素基因 *yefMsl* 克隆到表达型的温敏型质粒,从而达到在不添加任何抗生素的前提下保持表达型质粒在宿主细胞内的稳定存在。类似的 TA 系统还有 CcdAB,其已经开发成商用基因克隆及蛋白原核表达体系试剂盒,如可用于 PCR 克隆的 StabyCloningTM,以及原核表达的 StabyExpressTM、StabyTM Codon、CherryTM Express 等。此外,TA 系统在微生物基因修饰

系统中也具有巨大的应用价值,如毒素蛋白基因 *relE* 作为反向筛选标记成功用于枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒杆菌的基因替换、敲除和敲入,使其遗传操作更加快捷和高效^[52]。

综上所述,利用人工策略对 TA 系统进行激活、改造,对于研发防控病原菌传播和治疗病原菌感染的新型药物及开发肿瘤的定向治疗技术具有重要的临床意义,在医药和工程领域具有重要的应用前景。此外,利用 TA 系统作为分子生物学工具,在基因工程和基因编辑等应用方面也具有巨大的潜在价值。

REFERENCES

- [1] Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. Annual Review of Genetics, 2011, 45: 61-79
- [2] Li YM, Liu XX, Tang KH, Wang WQ, Guo YX, Wang XX. Prophage encoding toxin/antitoxin system PfiT/PfiA inhibits Pf4 production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(4): 1132-1144
- [3] Huguet KT, Gonnet M, Doublet B, Cloeckaert A. A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* genomic island 1[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32285
- [4] Kamruzzaman M, Iredell J. A ParDE-family toxin antitoxin system in major resistance plasmids of *Enterobacteriaceae* confers antibiotic and heat tolerance[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9872
- [5] Peltier J, Hamiot A, Garneau JR, Boudry P, Maikova A, Hajnsdorf E, Fortier LC, Dupuy B, Soutourina O. Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*[J]. Communications Biology, 2020, 3: 718
- [6] Song S, Wood TK. Toxin/antitoxin system paradigms: toxins bound to antitoxins are not likely activated by preferential antitoxin degradation[J]. Advanced Biosystems, 2020, 4(3): 1900290
- [7] Gerdes K, Helin K, Christensen OW, Løbner-Olesen A. Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the *parB* locus of plasmid R1[J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 203(1): 119-129
- [8] Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance,

- programmed cell death, and cell cycle arrest[J]. *Science*, 2003, 301(5639): 1496-1499
- [9] Karoui H, Bex F, Drèze P, Couturier M. Ham22, a mini-F mutation which is lethal to host cell and promotes *recA*-dependent induction of lambdoid prophage[J]. *The EMBO Journal*, 1983, 2(11): 1863-1868
- [10] Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair[J]. *PNAS*, 2009, 106(3): 894-899
- [11] Masuda H, Tan Q, Awano N, Wu KP, Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(5): 979-989
- [12] Wang X, Lord DM, Cheng HY, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, Quiroga C, Zheng K, Herrmann T, Peti W, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(10): 855-861
- [13] Aakre CD, Phung TN, Huang D, Laub MT. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp[J]. *Molecular Cell*, 2013, 52(5): 617-628
- [14] Wang XX, Yao JY, Sun YC, Wood TK. Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(5): 388-393
- [15] Choi JS, Kim W, Suk S, Park H, Bak G, Yoon J, Lee Y. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(10): 1319-1335
- [16] Yao JY, Zhen XK, Tang KH, Liu TL, Xu XL, Chen Z, Guo YX, Liu XX, Wood TK, Ouyang SY, et al. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(19): 11054-11067
- [17] García-Contreras R, Zhang XS, Kim Y, Wood TK. Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2394
- [18] Marimon O, Teixeira JMC, Cordeiro TN, Soo VWC, Wood TL, Mayzel M, Amata I, García J, Morera A, Gay M, et al. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13634
- [19] Yu X, Gao X, Zhu K, Yin H, Mao X, Wojdyla JA, Qin B, Huang H, Wang M, Sun YC, et al. Characterization of a toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 216
- [20] Li M, Gong LY, Cheng FY, Yu HY, Zhao DH, Wang R, Wang T, Zhang SJ, Zhou J, Shmakov SA, et al. Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2021, 372(6541): eabe5601
- [21] Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells[J]. *PNAS*, 1986, 83(10): 3116-3120
- [22] Dy RL, Richter C, Salmond GPC, Fineran PC. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections[J]. *Annual Review of Virology*, 2014, 1(1): 307-331
- [23] Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure[J]. *Science*, 2016, 354(6318): aaf4268
- [24] Cooper TF, Heinemann JA. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids[J]. *PNAS*, 2000, 97(23): 12643-12648
- [25] Nigam A, Ziv T, Oron-Gottesman A, Engelberg-Kulka H. Stress-induced MazF-mediated proteins in *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e00340-19
- [26] Soutourina O. Type I toxin-antitoxin systems in *Clostridia*[J]. *Toxins*, 2019, 11(5): 253
- [27] Wang Y, Zhang SP, Zhang MY, Kempfer ML, Guo DD, Han JT, Tao XY, Wu Y, Zhang LQ, He YX. The antitoxin MqsA homologue in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 has a rewired regulatory circuit through evolution[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(5): 1740-1756
- [28] Guo YX, Sun CL, Li YM, Tang KH, Ni SW, Wang XX. Antitoxin HigA inhibits virulence gene *mvjR* expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(8): 2707-2723
- [29] Jurénas D, Chatterjee S, Konijnenberg A, Sobott F, Droogmans L, Garcia-Pino A, Van Melderen L. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(6): 640-646
- [30] Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(11): 779-790
- [31] Ni SW, Li BY, Tang KH, Yao JY, Wood TK, Wang PX, Wang XX. Conjugative plasmid-encoded toxin-antitoxin system PrpT/PrpA directly controls plasmid copy number[J]. *PNAS*, 2021, 118(4): e2011577118
- [32] Yao JY, Guo YX, Wang PX, Zeng ZS, Li BY, Tang KH, Liu XX, Wang XX. Type II toxin/antitoxin system ParE_{So}/CopA_{So} stabilizes prophage CP4So in *Shewanella oneidensis*[J]. *Environmental Microbiology*,

- 2018, 20(3): 1224-1239
- [33] Wozniak RAF, Waldor MK. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(3): e1000439
- [34] Szekeres S, Dauti M, Wilde C, Mazel D, Rowe-Magnus DA. Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(6): 1588-1605
- [35] Yao XY, Chen T, Shen XD, Zhao Y, Wang M, Rao XC, Yin SP, Wang J, Gong YL, Lu SG, et al. The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(2): 243-257
- [36] Vandervelde A, Drobnak I, Hadži S, Sterckx YGJ, Welte T, De Greve H, Charlier D, Efremov R, Loris R, Lah J. Molecular mechanism governing ratio-dependent transcription regulation in the *ccdAB* operon[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(6): 2937-2950
- [37] Chan WT, Espinosa M, Yeo CC. Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016, 3: 9
- [38] Gelens L, Hill L, Vandervelde A, Danckaert J, Loris R. A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*[J]. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(8): e1003190
- [39] Brown BL, Lord DM, Grigoriu S, Peti W, Page R. The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the *mqsRA* operon promoter[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(2): 1286-1294
- [40] Wang X, Kim Y, Hong SH, Ma Q, Brown BL, Pu M, Tarone AM, Benedik MJ, Peti W, Page R, et al. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(6): 359-366
- [41] Kim Y, Wang XX, Zhang XS, Grigoriu S, Page R, Peti W, Wood TK. *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1105-1121
- [42] Brown BL, Grigoriu S, Kim Y, Arruda JM, Davenport A, Wood TK, Peti W, Page R. Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(12): e1000706
- [43] Sun CL, Guo YX, Tang KH, Wen ZL, Li BY, Zeng ZS, Wang XX. MqsR/MqsA toxin/antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 840
- [44] Song YJ, Zhang SP, Luo GH, Shen YL, Li CC, Zhu YB, Huang Q, Mou XY, Tang XY, Liu TG, et al. Type II antitoxin HigA is a key virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(10): 2930-2940
- [45] Wen W, Liu BH, Xue L, Zhu ZL, Niu LW, Sun BL. Autoregulation and virulence control by the toxin-antitoxin system SavRS in *Staphylococcus aureus*[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(5): e00032-e00018
- [46] Donegan NP, Cheung AL. Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on *sigB* expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(8): 2795-2805
- [47] Równicki M, Pieńko T, Czarnecki J, Kolanowska M, Bartosik D, Trylska J. Artificial activation of *Escherichia coli mazEF* and *hipBA* toxin-antitoxin systems by antisense peptide nucleic acids as an antibacterial strategy[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2870
- [48] Shapira S, Shapira A, Kazanov D, Hevroni G, Kraus S, Arber N. Selective eradication of cancer cells by delivery of adenovirus-based toxins[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38581-38591
- [49] Turnbull A, Bermejo-Rodríguez C, Preston MA, Garrido-Barros M, Pimentel B, De La Cueva-Méndez G. Targeted cancer cell killing by highly selective miRNA-triggered activation of a prokaryotic toxin-antitoxin system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1730-1736
- [50] Houri H, Ghalavand Z, Faghihloo E, Fallah F, Mohammadi-Yeganeh S. Exploiting *yoeB-yefM* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae* on the selective killing of miR-21 overexpressing breast cancer cell line (MCF-7)[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(3): 2925-2936
- [51] Sevillano L, Díaz M, Santamaria RI. Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 39
- [52] Wu J, Deng AH, Sun QY, Bai H, Sun ZP, Shang XL, Zhang Y, Liu Q, Liang Y, Liu SW, et al. Bacterial genome editing via a designed toxin-antitoxin cassette[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 822-831