

Dawid Gmitter\*, Grzegorz Czerwonka, Wiesław Kaca

Department of Microbiology, Institute of Biology, The Jan Kochanowski University in Kielce

Received in April 2018 r., accepted in August 2018 r.

**Abstract:** Bacterial competition, defined as a local neighbour interactions, can lead to competitors coexistence, bacterial community self-organization or as travelling waves of species dominance in ecological niches. Bacteria have developed many mechanisms to communicate and compete. Kin discrimination mechanisms in bacterial populations allow species to distinguish a friend from a foe in bacterial environment. Type Vb and VI secretion systems (TVbSS and TVISS) play crucial role in this phenomenon. A contact-dependent growth inhibition (CDI), primarily found in *Escherichia coli* strains, utilizes CdiB/CdiA protein of type Vb secretion system, described also as two-partner secretion (TPS) system, to inhibit growth of non-kin strains, where cell contact is required. Presence of an intracellular small immunity protein (CdiI) protects *E. coli* cells from autoinhibition. Other bacterial competition system, primarily found in nodulation process of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain, engages type VI secretion system. The structure of TVISS is more complicated and comprises the series of proteins with structural homology to bacteriophage tail proteins and membrane proteins which builds the core of the system (Tss proteins). Meanwhile, other proteins of the TVISS was described as associated proteins (Tag proteins). Important proteins for TVISS are haemolysin coregulated protein (Hcp) which has hexameric, tubular structure and VgrG protein (valine-glycine repeat G) which play a dual role in the process: as a chaperone protein in secretion of effector toxin or/and as a secreted toxin itself. Despite the structural differences of both secretion systems they show functional homology in competition phenomenon and govern the social life of bacterial community.

1. Introduction. 2. Contact-dependent growth inhibition. 2.1. Structure of CDI machinery. 2.2. Effectors of CDI system. 3. Type VI secretion system. 3.1. Structure of type VI secretion system. 3.2. Effectors of type VI secretion system. 4. Membership to polymorphic toxins system. 5. Role of the systems in bacterial biology. 6. Conclusions

#### SYSTEMY SEKRECJI TYPU VB ORAZ VI JAKO CZYNNIKI KONKURENCJI BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

**Streszczenie:** Konkurencja bakteryjna, zdefiniowana jako lokalne oddziaływania, może doprowadzić do koegzystencji konkurentów, samoorganizacji społeczności bakteryjnej lub rozkładu dominacji gatunków w niszach ekologicznych. Bakterie wykształciły wiele mechanizmów komunikacji i konkurencyjności. Dyskryminacja krewniacza pozwala gatunkom na rozróżnienie komórek krewniaczych od niespokrewnionych w środowisku bytowania. System sekrecji typu Vb oraz VI (SSTVb i TSSVI) odgrywają istotną rolę w tym zjawisku. System inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu, odkryty w *Escherichia coli*, wykorzystuje białka CdiB/CdiA przynależne do SSTVb, opisywane również jako dwu-partnerski system sekrecji, do inhibicji wzrostu niespokrewnionych szczepów i wymaga kontaktu komórek. Obecność wewnątrzkomórkowej, małej proteiny immunoprotekcyjnej (CdiI) chroni komórki *E. coli* przed autoinhibicją. Inny system konkurencji bakteryjnej, początkowo opisany w procesie nodulacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, angażuje system sekrecji typu VI. Struktura TSSVI jest bardziej skomplikowana i zawiera w sobie szereg białek homologicznych do ogonka bakteriofagów i białek membranowych budujących rdzeń aparatury (białka Tss). Część białek wchodzących w skład TSSVI opisano jako białka akcesoryjne (białka Tag). Ważnymi dla funkcjonowania TSSVI są heksamery Hcp (*haemolysin coregulated protein*) oraz białka VgrG (*valine-glycine repeat G*), które odrywają podwójną rolę: białek chaperonowych dla sekrecji toksyn i/lub właściwych toksycznych efektorów. Pomimo znacznych różnic w budowie, oba przedstawione systemy wykazują homologiczną funkcję w zjawisku konkurencji i regulują interakcje społeczności bakteryjnych

1. Wstęp. 2. Inhibicja wzrostu zależna od kontaktu. 2.1. Budowa białkowej aparatury systemu CDI. 2.2. Efekторы systemu CDI. 3. System sekrecji typu VI. 3.1. Budowa systemu sekrecji typu VI. 3.2. Efekторы systemu sekrecji typu VI. 4. Przynależność do systemu polimorficznych toksyn. 5. Znaczenie systemów w biologii drobnoustrojów. 6. Podsumowanie

**Key words:** contact-dependent growth inhibition, bacterial competition, type Vb secretion system, type VI secretion system  
**Słowa kluczowe:** inhibicja wzrostu zależna od kontaktu, konkurencja bakteryjna, system sekrecji typu Vb, system sekrecji typu VI

## 1. Introduction

Bacteria exist in the environment in the form of complex communities, inside which numerous interactions are observed – from cooperation to competition for living space and access to nutrients [43, 83, 102].

The best-known example of the coexistence of microorganisms is the biofilm. It is a complex structure in which the cells are surrounded by a matrix consisting mainly of polysaccharides, proteins and DNA. The biofilm matrix is a protective barrier – it slows down the diffusion of antibiotics, protects against physical fac-

\* Corresponding author: Dawid Gmitter, Department of Microbiology, Institute of Biology, The Jan Kochanowski University in Kielce, 15 Świetokrzyska Street, 25-406 Kielce, Poland, phone: 41 349 61 22; e-mail: dawid.gmitter@ujk.edu.pl

tors and ensures adequate humidity of the cells' living environment [97]. A biofilm community may consist of both bacteria belonging to one species and agglomerates which combine organisms belonging to many species [84, 119]. In addition, biofilms can be created by prokaryotic and eukaryotic microorganisms [14, 13].

The phenomenon of Quorum Sensing (QS) should be mentioned as a kind of behaviour classified as cooperation. It is the ability of bacteria to "communicate" through signal chemical molecules (autoinducers). An increase in the concentration of autoinducers, in response to the growing population of microorganisms in the biofilm, triggers the activation of appropriate signalling pathways, which is the basis for bacterial colonization of subsequent biotic and abiotic surfaces [74, 97].

Bacteria, like higher organisms, constantly compete with each other and, according to research, competition among them occurs more often than cooperation [34]. In an unfavourable environment where access to nutrients is hindered, microorganisms use numerous mechanisms to secure an advantageous position for themselves [102]. Bacterial competition may be related to the phenomenon of kin discrimination, because the cooperation of the bacterial population is desirable between related cells [63]. The term kin discrimination describes the ability of bacteria to distinguish cells of an unrelated strain from those belonging to the same or very closely related strain and induce changes in the functioning of an unrelated organism [109], such as swarming growth inhibition [4] or inhibition of growth [10]. Kin discrimination combined with bacterial competition is an interesting mechanism which requires contact between cells through specialized proteins building two systems of secretion: contact-dependent growth inhibition (CDI) and type VI secretion system (TVISS). This phenomenon is based on the elimination of unrelated strains, i.e. ones sensitive to protein toxins transported by the systems mentioned above directly into the cell [63, 116]. Several other examples of interactions between bacterial cells are mentioned in the literature, for which direct contact is an important factor, among others: C-signalling in *Myxococcus xanthus* or single-stranded DNA transport with the relaxase enzyme bonded covalently at the 5'-end through a Type IV secretion system [21, 52].

## 2. Contact-dependent growth inhibition

The term contact-dependent growth inhibition (CDI) was presented by Aoki et al. in 2005 [10]. It refers to the phenomenon exhibited by the strain *Escherichia coli* EC93, which is characterized by the ability to inhibit the growth of other *E. coli* strains in liquid culture. This phenomenon is conditioned by the operation of gene

expression products of the *cdiBAI* operon [10]. The CdiA and CdiB proteins belong to the type Vb secretion system (TVbSS), also referred to as the two-partner secretion system (TPS) [107, 117]. The Gram-negative bacteria secretion system classified as a V-type system consists of five sub-classes: types from Va to Ve. Proteins belonging to these subclasses are structurally similar to each other, all of them have a protein transport channel with a  $\beta$ -barrel structure [107].

The genes of the *cdiBAI* operon in the *E. coli* EC93 strain are expressed in a constitutive way. This system operates with high efficiency – a single cell of the dominant strain is capable of the reversible inhibition of the growth of even hundreds of unrelated strain cells located in its environment [10, 12]. The *cdiBAI* operon, after being introduced into the laboratory strain of *E. coli* K-12, changes the CDI- phenotype to CDI + [10].

### 2.1. Structure of CDI machinery

The first of the proteins encoded by the *cdiBAI* operon (CdiB) is an extracellular protein of about 64.5 kDa. It adopts the structure of a  $\beta$ -barrel, and its function is to secrete and present at the CdiA exoprotein on the surface of the cell which attacks bacteria. The antibacterial toxin is the CdiA protein. It is a protein of about 319 kDa. At its carboxyl-terminus the CdiA protein possesses a domain which constitutes the toxin proper – the CdiA-CT region (C-terminal CdiA) [11]. The amino-terminus of the protein synthesized by various strains of *E. coli*, with a length of about 2,800 amino acids, has a high degree of phylogenetic similarity, while the CdiA-CT region (approx. 250–350 amino acids) is diverse from strain to strain [7]. The CdiA-CT toxin most often exhibits nucleolytic activity. These regions are separated from each other by the conservative VE(NN) motif. The CdiI immunoprotein conditions the protection against auto-inhibition. It recognizes the CdiA toxin specific for itself and inhibits its action by binding to it [11, 42]. In the studies carried by Tana et al. (2015) the structure of the CdiI protein of *Neisseria meningitidis* MC58 strain was presented. This protein has a structure which is homologous to the RNA binding proteins belonging to the Whirly family. It was also suggested that the immunoprotective activity of the CdiI protein may result from restricting the access of the CdiA toxin – EndoU ribonuclease – to the RNA molecule [103]. Research results indicate that the formation of a bond between CdiA and CdiI proteins is stabilized by various mechanisms: by  $\beta$ -augmentation, in the course of which the toxin extends the  $\beta$ -hairpins domain to form an antiparallel  $\beta$ -sheet with the fragment of the immunoprotective protein [72, 73] or complementarity resulting from shape and charge [72].

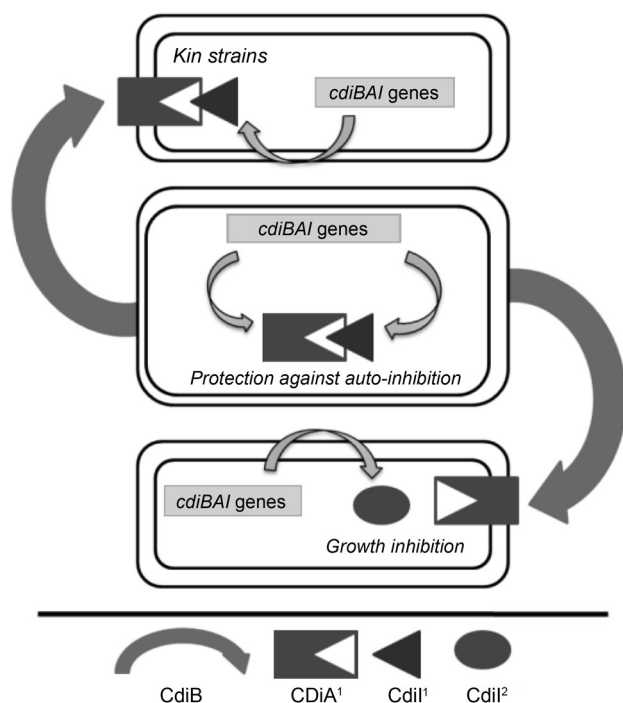


Fig. 1. Schematic presentation of the operation of *E. coli* type CDI system

The CdiB protein allows for the introduction of the CdiA1 toxin into the attacked cell. If the toxin is recognized by the CdiI1 immunoprotective protein, its inactivation follows, which indicates cell kinship. In the absence of kinship, the CdiI2 immunoprotein is unable to bind the toxin and growth is inhibited. At the same time, the formation of a complex between the CdiA1 and CdiI1 proteins provides the cell with autoimmunoprotection.

The CDI system used by *E. coli* strains came to be called the *E. coli* – type CDI. A generalized flowchart of this system is presented in Figure 1. Identical or very similar systems can also be found in other pathogenic strains. Among others, the *Dickeya dadantii* 3937 strain [8] and the *Enterobacter cloacae* and *N. meningitidis* [46]. species can be mentioned. Also, the genus *Pseudomonas* possesses a gene operon in its genome, responsible for inhibiting growth conditioned by *E. coli* – type system. In a study by Mercy et al. (2016) on the model strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, it was observed that this system plays a role in the process of adhesion, biofilm formation and competition. The uniqueness of the CDI system in microorganisms of the *Pseudomonas* genus results from the variability of the motifs separating the amino and carboxyl terminal ends of the toxic CdiA protein. The bioinformatics analysis indicated that it is possible to distinguish five classes of this motif: WVHN, VE(NN), LYVT, DAMV and NEALV [71].

The CDI system characteristic for the genera *Burkholderia*, *Ralstonia* and *Cupriavidus* has been termed a *Burkholderia* – type CDI. The genus *Burkholderia* has an operon in its genome consisting of *bcpAIOB* genes [77]. In addition to the CDI-specific proteins (BcpA-CdiA, BcpB-CdiB and BcpI-CdiI), this operon encodes a small additional BcpO lipoprotein. Its function

has not been fully explained but it is required for secretion of the BcpA toxin by the *Burkholderia thailandensis* E264 strain. An additional difference is the occurrence of the NxxLYN motif instead of VE(NN) in the BcpA toxin, and the toxin itself has RNase activity [6, 53].

Another type of a CDI system is the one present in *Xenorhabdus doucetiae*, called the *cdiBCAI*-type. The *in silico* comparative analysis indicates that such an operon often occurs among environmental bacteria. The gene *cdiC*, characteristic of this type, encodes a homologue of the C protein (belonging to acetyltransferases) functioning as a toxin activator. The *cdiBCAI* operon encodes the CdiA toxin in which a conservative VE(NN) motif occurs [78].

It should be noted that in the genomes of bacteria that have an *E. coli* – type CDI system, repeated sequences called orphan fragments often occur. They encode CdiA-CT toxins and CdiI protective polypeptides, and their function and importance have not been explained. A hypothesis has been postulated whereby they can constitute a substitute “arsenal” activated under specific conditions. It refers, in particular to *cdiI* genes, as their nucleotide sequences seem to encode fully functional proteins [11].

## 2.2. Effectors of CDI system

The effectors of the CDI system are characterized by a diversified mechanism of antibacterial activity. In the case of the *E. coli* strain EC93, CdiA most probably exhibits the ability to create pores in the cell wall of the attacked bacteria [47]. In turn, other bacteria produce CdiA-CT toxins, which generally possess nucleolytic activity [118]. A more detailed analysis of the region responsible for toxicity indicates that it can be divided into two parts: a carboxyl terminus, which is a nucleolytic enzyme – a toxin that becomes severed before translocation – and an amino terminus playing a key role in nuclease transport [111, 117]. The CdiA-CT toxin synthesized by *E. cloacae* degrades ribosomal RNA [18]. In contrast, the toxin described for the *E. coli* 536 strain (UPEC536) is a tRNase which requires activation by the presence of Oacetylserine A (CysK) sulfahydrolase. This is the first known toxin for whose activity an additional factor is required [30]. More recent research findings show that the activity of CDI toxins can also be regulated by other factors. An example could be CdiA synthesized by the *E. coli* strain EC869. This strain produces CdiA with tRNase activity, for whose activation the Elongation Factor Ts (EF-Ts) is necessary. In addition, this toxin binds to the Elongation Factor Tu (EF-Tu). It is a GTP-dependent tRNase, which, as the authors point out, suggests that tRNA is degraded by the above toxin only in the presence of the GTP + EF-Tu-tRNA complex [47]. Batot

et al. (2017) presented the crystal structure of the CdiA toxin complex and the immunoprotective protein derived from *Yersinia kristensenii*. The toxin produced by the above bacterium was qualified as part of the RNaz A superfamily [16]. Meanwhile, CdiA synthesized by *Xenorhabdus doucetiae* is an  $Mg^{2+}$  – dependent DNase [78]. Also the CdiAs described in *D. dadantii* [111] and the toxin CdiA-CT0<sub>11</sub> synthesised by the *E. coli* strain EC869 [72] are DNases. In the latter case, we deal with DNase dependent on  $Zn^{2+}$  [72].

The mechanism of action of the CDI system is based on the ability of the CdiA protein to extend over a distance of several hundred Å, and then become bound to the target cell by interacting with its extracellular receptor. The earliest studies have shown that this receptor is the BamA protein (also known as YaeT or Omp85) [9]. AcrB, which is part of the inner membrane and component of the efflux pump which guarantees multidrug resistance, is also involved in the transport of toxins [9]. Transport of the toxin through the outer membrane of the cell occurs freely, whereas its translocation into the cytoplasm requires energy supply [85]. It has been shown that the inhibitory activity of the *E. coli* CDI system is directed only towards strains belonging to the species *E. coli* which are unable to block the toxin action by the CdiI protein (unrelated strains). Meanwhile, interspecific competition is not conditioned by this mechanism. An *E. coli* strain EC93 does not cause growth-inhibiting effects on other  $\gamma$ -proteobacteria, including: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Citrobacter freundii* or *Proteus mirabilis*. This may result from polymorphisms occurring in the 6th and 7th extracellular BamA receptor loop [89]. Interestingly, CDI proteins also mediate in BamA-independent aggregation of *E. coli* cells. This is the result of the interaction between homologous CdiA proteins, because the expression of this protein is necessary for cell aggregation [88]. Recent studies have shown that the CdiA proteins of *E. coli* strains can be divided into three classes which have an affinity for various surface receptors: 1) the first class is CdiA proteins homologous to those which are synthesized by *E. coli* EC93, and which use the BamA protein as the receptor, 2) the second class includes proteins which recognize the heteromeric OmpC-OmpF porins as the receptor, 3) the third class effectors include the CdiA proteins recognizing the Tsx nucleoside transporter. Specificity to recognized receptors is determined by the CdiA region of about 300 amino acids, located between the regions of the FHI-1 and FHI-2 peptide repetitions. This region is characterized by similarity in the range of 24–27% between particular classes and has a conservative central element FHI-1 [19, 87]. A very unusual CdiA-CT transport system has been described for the *E. coli* 536 strain, in which the N-terminus in the

CdiA-CT domain interacts with the pilus [17]. It was also shown that in the genus *Burkholderia*, loops 6th and 7th in the BamA receptor differ significantly compared to *E. coli*, and the possible receptor in this system is a lipopolysaccharide (LPS) [53].

### 3. Type VI secretion system

The type VI secretion system (TVISS) is a protein apparatus responsible for the secretion of protein toxins by Gram-negative bacteria [95]. According to Records (2011), the first information about this system comes from the 1970s, when Roest et al. identified in the genome of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* a set of genes responsible for inhibiting the ability to effectively grow nodules on pea roots. The term *imp* (impaired in nodulation) was used for these genes. Their nucleic acid sequence did not show homology to any genes known at that time. In 2003, the analysis of the supernatant from a *R. leguminosarum* culture allowed to conclude that the *impJ* gene is necessary for the secretion of the RbsB protein of about 27 kDa with amino acid signal sequences at its amino-terminus. Soon after, similar observations were made for other organisms, including *Vibrio cholerae* and *P. aeruginosa* as well as *Edwardsiella tarda*, a bacteria pathogenic for fish [82].

#### 3.1. Structure of type VI secretion system

The type VI secretion system is characterized by a more complex structure compared to the type V secretion system [40]. The operon encoding the TVISS apparatus may consist of a different number of genes depending on the species. The basic set of proteins, referred to as the core component, is encoded by thirteen genes. These proteins are necessary to create a functional system. In addition to the core component, the TVISS operon is often equipped with additional genes encoding accessory proteins, which can perform three basic functions: 1) they are components essential for the proper synthesis of the TVISS secretory device, 2) they are regulatory components – acting at the transcriptional or posttranscriptional stage – regulating gene expression or TVISS activity and 3) are TVISS effectors or immunoprotective proteins [29, 123].

The proteins forming the TVISS core are termed Tss (Type six secretion), while for the accessory subunits the term Tag (Type six associated gene) is used [90]. The core component genes (*tssA-M*) are found in the genomes of 25% of all known Gram-negative bacteria, with particular emphasis on proteobacteria. TVISS gene loci can create additional phylogenetic sub-classes. A cluster was found in the genomes of the proteobacteria (TVIS<sup>1</sup>), a cluster distinctive for the genus

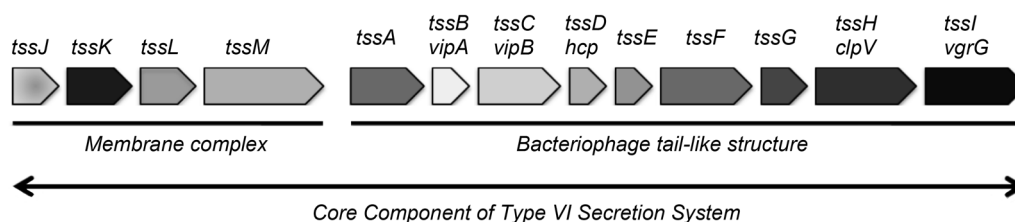


Fig. 2. Cluster of 13 genes being part of the core component of the type VI secretion system

*Francisella* (TVIS<sup>II</sup>) and *Bacterioidetes* (TVIS<sup>III</sup>). The *tssE*, *tssG*, *tssJ* and *tssH* genes do not have homologues in TVIS<sup>II</sup>, whereas in TVIS<sup>III</sup> there occur no equivalents of *tssA*, *tssJ*, *tssM* i *tssL*. The cluster TVIS<sup>I</sup> has been characterised the best [55]. The *tssA-M* genes are further divided into the following groups: the first one (*tssA-I*) encodes proteins that form a structure similar to the tail of a bacteriophage, together with a structure that resembles a basal plate. It is responsible for introducing the effector into the attacked cell. The second group are proteins encoded by *tssI-M* genes which build the basic membrane complex [20, 123] (Fig. 2).

One of the components of the TVISS apparatus included in the structure resembling a bacteriophage tail is the TssD protein, also referred to as Hcp (Haemolysin coregulated protein). This protein was first described in 1996, and the lack of signal sequences in its structure allowed for proposing a new mechanism of protein secretion [20, 82]. The secretion of the Hcp protein depends on other proteins encoded by TVISS genes. The Hcp protein forms a hexameric structure in the shape of a ring with the inner diameter of 4.0 nm (40Å) and the outer diameter equal to 8.5 nm (85Å) [82]. Hcp hexamers have the ability to create nanotube-like structures, through which TVISS effector proteins are delivered to the interior of the targeted cell. The nanotube is also an important chaperone protein for TVISS effectors, providing protection against degradation [90].

Hcp proteins are a means of transport for toxins and at the same time are secreted into the interior of the targeted cell themselves. Thanks to this, in many cases they show additional biological functions [79, 82], among others they may constitute effector proteins [90]. Nanotubes consisting of hexamers are structurally similar to the main proteins in the tail of  $\lambda$  bacteriophage, and their internal and external diameters are almost identical to the tail tube of the T4 phage. Hcp also show similarity of the amino acid sequence to the gene product 19 (gp 19) of the T4 phage [58]. Gp19 proteins polymerize to form a channel through which the bacteriophage supplies its DNA to the interior of the bacterial cell [24]. Similarly, the internal ring of Hcp hexamers binds TVISS effector proteins [114].

As mentioned above, the Hcp proteins are not only the element that builds the TVISS apparatus but are

also secreted by all bacteria possessing TVISS inside the attacked cell [80]. On the one hand, Hcp proteins perform only the function of receptors and chaperones for toxic products of operons. This mechanism is observed, among others, in the case of *P. aeruginosa* and Hcp proteins encoded by genes located within the first HSI genomic island. *P. aeruginosa* has three such islands whose genes code for secreted Hcp proteins (Hcp secretion island I, HSI-I) and allow the secretion of at least three toxic effector proteins referred to as Tse1-3 (Type VI Secretion Export 1–3) [100]. On the other hand, many bacteria, e.g. those belonging to the *Enterobacteriaceae* family, have in their genome genes encoding Hcps with C-terminal Extension Toxins (Hcp-ET). Such types of toxins are called “evolved” Hcp and are assigned, among others, to the activity of DNase or phospholipase [64].

The type VI secretion system also engages structures with high similarity to the structures characteristic for bacteriophage tails, such as gp18 proteins, which form protect for gp19 proteins. By shrinking, these proteins allow for the protrusion of the tail tube and introduction of the phage DNA into the cell of the attacked bacteria [24]. The type VI secretion structures, having a high resemblance to the theca of the phage tail, are structures created by the VipA and VipB proteins (TssB and TssC) [101]. The structure created from VipA/B proteins has a diameter of 10 nm (100Å), which makes it possible for the Hcp nanotubes to hide in it [82]. The VipA/B structure allows the Hcp nanotubes to penetrate through the membrane of the attacked cell. The VipA/VipB structure undergoes decomposition with the participation of the ClpV protein (encoded by the *tssH* gene). This protein exhibits the AAA + ATPase function (ATPase Associated with Diverse Cellular Activities) [23, 15]. As indicated by Bröms et al. (2013), interactions between the VipA and VipB proteins enabling the creation of a functional theca for the Hcp nanotubes play a key role in the activity of the type VI secretion system [23].

Another important element of the type VI secretion system being a component of a structure resembling a bacteriophage tail is the TssI protein, also called VgrG (Valine-glycine repeat G). Its domains are similar to those of the gp27 and gp5 proteins which build the centre of the T4 phage tail base plate [15]. The VgrG

protein is the end of the Hcp nanotube and enables wall penetration for the bacterium invading the cell [98]. The VgrG domain similar to the gp5 protein has a rigid and  $\beta$ -twisted helical structure, forming a needle-like element [41]. In many cases, it was observed that onto the VgrG “needle” an additional protein possessing a PAAR domain, which is a toxic effector, may be anchored [99, 41, 22, 28]. In this case, we refer to VgrG, which are the chaperones of the proper TVISS effectors [80]. In addition, as in the case of Hcp, the “evolved” VgrG with the toxic domain at the C-terminus was isolated [80]. An example of “evolved” VgrG are two proteins synthesized by the *Agrobacterium tumefaciens* C58 strain which controls the secretion of two toxic effectors with DNase activity (Type VI DNase Effectors, Tde): Tde1 and Tde2 with high specificity [22].

Additional elements forming the base plate which occurs in the apparatus of the type VI secretion system are TssEFG proteins. These proteins are recruited by the TssK protein into the TssJLM membrane complex [75]. The membrane complex is evolutionarily similar to the subcomplex associated with the type IVb secretion system (TIVbSS) and consists of three conserved domains: the lipoprotein membrane TssJ as well as the TssL and TssM proteins anchored in the cell wall [76]. The biogenesis of the TVISS apparatus begins with the formation of the membrane complex TssJLM [75]. The TssM protein is an ATPase belonging to the IcmF family (Intraacellular Multiplication Protein F). The Walker A motive which is present in this protein, is vital in the process of ATP hydrolysis by TssM, which provides the energy for the interactions of the Hcp protein with TssL (this protein belongs to the ImcH/DotU family) and its secretion [67].

Similarly, as in the case of CDI, also the activity of effectors of the type VI secretion system is inhibited by immunoprotective proteins. An example may be furnished by the Tse2 effector used by *P. aeruginosa* described above. This effector acts as an inhibitor of cell proliferation, and its activity is inhibited by the highly stable binding of the Tsi2 immunoprotective protein (Type VI Secretion Immunity 2) [61]. The presence of the pair: toxin/immunoprotective protein has also been established in species such as *V. cholerae* [31, 51], *P. mirabilis* [4] or *Pseudomonas protegens* [115]. A schematic representation of the TVISS apparatus is presented in Figure 3.

### 3.2. Effectors of type VI secretion system

The variety of the TVISS effectors is much greater than in the case of the CDI system. The effectors can be divided into those which are a mechanism of bacterial competition, and the ones which influence eukaryotic organisms [2, 29]. In addition, the effectors transpor-

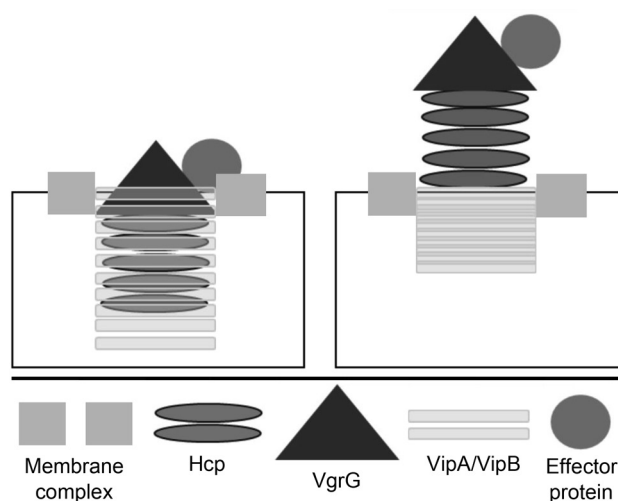


Fig. 3. Diagram of the structure of the type VI secretion system apparatus

Hcp and VgrG proteins form a structure similar to the bacteriophage tail, which through VipA/VipB structure contractions can be translocated inside another cell. An additional effector protein may be attached to the VgrG protein.

ted by this system are described as specialized effectors – already described “evolved” Hcp and VgrG, as well as such effectors that interact directly with Hcp and/or VgrG, often through the PAAR domain (cargo effectors) [35]. On account of the mechanism of action, four major classes of effectors and immunoprotective proteins which inhibit them have been described: 1) effectors Tae with amidase activity (Type VI amidase effectors) and Tai immunoprotein (Type VI amidase immunity), 2) effectors Tge with glucose hydrolase activity (Type VI glycoside hydrolase effectors) together with Tgi immunoproteins (Type VI glycoside hydrolase immunity) – the target for the activity of both groups is peptidoglycan, 3) effectors with lipase activity (Type VI lipase effectors, Tle), which hydrolyse phospholipids in the cell membrane, along with protective proteins Tli (Type VI lipase immunity), 4) and effectors Tde with DNase activity (Type VI DNase effectors) and their Tdi immunoprotein (Type VI DNase immunity) [35].

One of the toxins which belongs to the Tae group is the above-mentioned Tse1 effector encoded in the *P. aeruginosa* genome within the first island coding Hcp proteins which undergo secretion. Tse1 is an amidase which specifically recognizes the  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelic acid (D-Glu-*m*DAP). The active site of Tse1 is easily accessible and the enzyme exhibits *in vitro* activity. In *in vivo* research has shown that this enzyme is more active against Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria [91, 27]. Subsequent toxins which belong to the Tae group, whose enzymatic activity is directed towards peptidoglycan – Ssp1 and Ssp2 proteins, are produced by the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*. Both proteins are inhibited by

immunoprotective proteins encoded by *rap* genes located in the environment of genes coding the toxins [32].

The activity of another group of TVISS effectors, Tge, was demonstrated on the example of a strain belonging to the *P. protegens* species [115]. Antibacterial effect of this type of effector may occur in the case of *P. protegens* i.e. towards *Pseudomonas putida*. In addition, the structure of the effector complex with its specific immunoprotective protein obtained by NMR shows, that the enzymatic activity is inhibited by binding the immunoprotein to the active location [115]. Also the previously mentioned Tse3 toxin belongs to the group of Tge toxins and shows mureidase activity [91].

Examples of toxins included in the Tle can be enzymes belonging to the PLA<sub>1</sub> and PLA<sub>2</sub>, with phospholipase A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> activity, respectively. The Tle toxins are widespread amongst pathogenic bacteria. A further example of such an effector is PldA synthesized by *P. aeruginosa*. This protein is the effector of the type VI secretion system, whose components are coded on the second island of secreted Hcp proteins [92]. Enteraggregating *E. coli* strains can synthesize the Tle1 toxin with phospholipase activity of type A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>, which is an effector used in competition with other bacteria. The activity of the Tle1 effector is inhibited by the Tli1 immunoprotein, through the formation of complexes at a 1:1 ratio. The transport of Tle1 is possible through protein interactions with the C-terminus of VgrG1, which has a domain similar to transthyretin [33].

The effectors belonging to Tde were first described by Ma et al. (2014) on the example of the *A. tumefaciens* strain C58 [66]. This effector exhibits DNase activity and ensures that *A. tumefaciens* strains have an advantage in both intra- and interspecific competition. Nucleolytic activity is due to the presence of the HxxD motif and is inhibited by a specific immunoprotective protein called Tdi. In addition, the above toxin is characterized by the lack of significant homology to other bacterial DNases [66].

The toxin secreted by TVISS, which does not belong to any of the above groups, is the Tne2 toxin with the activity of NADase (Type VI NADase effector). This toxin is one of the two which is synthesized by the strain *P. protegens*, the first one is RhsA which exhibits nucleolytic activity. A specific immunoprotective protein corresponds to the Tne2. Significantly, the genes encoding toxins with NADase activity are widespread amongst both Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. In the second case, the secretion of toxins takes place with the participation of the type VII secretion system (TVIISS), which is specific for Gram-positive bacteria [104].

Another example of TVISS effectors is RHS (Rearrangement hotspot) toxins. These toxins are widely distributed among Gram-negative bacteria. The genes which encode them can be found in the genomes of

such species like *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and others. [56, 54, 65]. Similarly to the CdiA protein, also RHS toxins consist of the conserved N-terminus, which consists of YD repeats defining the presented group of effectors, and the C-terminus constituting the toxic domain. There occurs a conservative PxxxxDPxGL motif between these regions. The toxic activity of the C-terminus domain is inhibited by a specific immunoprotective protein [54]. Studies conducted by Alcoforado Diniza et al. (2015) on the example of *S. marcescens* indicate that RHS toxins are the main effectors of the secretion system conditioning intra-specific bacterial competition. *S. marcescens* Db10 can synthesize at least two toxins belonging to the RHS group (Rhs1 and Rhs2). The Rhs2 protein is a DNase, whereas in the case of Rhs1 the presence of a toxic domain with an unknown mechanism of action has been demonstrated [1]. RHS proteins very often also have a PAAR domain, which allows for the recognition of toxins by the type VI secretion system, its binding to VgrG and translocation to the inside of the attacked cell [65].

One of the factors controlling the operation of TVISS is Quorum Sensing [101]. On the example of the *B. thailandensis*, it has been demonstrated that the strains having a mutation in the receptors of QS auto-inducers, exhibit reduced expression of TVISS effectors and immunoprotective proteins, resulting in the arrest of their proliferation during cell culture cultivation in the presence of parental strains possessing a fully functional QS system [68]. In the case of *V. cholerae* C6706 TVISS it remains under the control of QS and the global regulator TsrA – mutations in the *tsrA* and *luxO* genes cause increased expression of the genes encoding structural elements of the TVISS apparatus. This effect is dependent on the HapR regulator, which binds to the promoter region of genes encoding TVISS components [122].

Interestingly, QS can regulate the expression of various copies of clusters coding TVISS to various degrees, which takes place also in the case of *P. aeruginosa* PAO1. This strain has three clusters of TVISS (H1-3) genes. The H1 cluster codes the previously described Tse1-3 toxins [48]. As shown, H2 cluster genes undergo increased expression (regulated by the QS systems of the Las and Rhl type) during the transition from the logarithmic phase of growth to the stationary phase. In addition, the inhibition of the expression of the H2 cluster is effected in the presence of iron ions [96]. The results of previous studies using the *P. aeruginosa* PA14 strain show, that the three H1-3 clusters encoding TVISS are also regulated by QS, but in a different way. In the case of PA14, the expression of H1 is suppressed, whereas the expression of H2 and H3 is increased as a result of the action of the LasR regulators and the MvfR transcription regulator [60]. The PAO1 and PA14 strains differ in the number of the copies of genes enco-

ding TVISS elements [60], and the specific organization of the H2 cluster is a characteristic feature of the PA14 strain [48]. It is worth mentioning that individual copies of *P. aeruginosa* also remain under the control of the RsmA and AmrZ global regulators [3].

Different regulation of two different clusters of TVISS genes by QS is also observed in the case of *Vibrio parahaemolyticus*. This species has clusters called TVISS1 (VP1386-1414) and TVISS2 (VPA1024-1046). The expression of TVISS1 is inhibited and of TVISS2 induced by OpaR – a regulator dependent on population density [110]. The research results of Zhang et al. (2011) show, that TVISS can also be regulated by environmental conditions. On the example of *Yersinia pseudotuberculosis*, which has 4 clusters of TVISS genes in its genome, their different thermoregulation was demonstrated, whereas only the expression of the TVISS4 cluster was positively regulated at 26°C. In addition, there was elevated expression of this cluster in response to the action of YpsI and YtbI homoserine lactones synthases. Such conclusions were based on the use of strains bearing the deletion of the genes encoding the above synthases, whereas the effect of deleting the *ypsI* gene was stronger compared to the *ybtI* gene deletion [121]. The type VI secretion system controlled by homoserine lactones, has also been described in the case of the strain *Aeromonas hydrophila* SSU [50].

The factor conditioning cross-species competition based on TVISS may be the growth environment, which was presented on the example of experiments with a strain of *P. aeruginosa* in competition with a strain of *A. tumefaciens*. In laboratory conditions, the dominant strain was *P. aeruginosa*, whereas in the conditions imitating the natural environment *A. tumefaciens* dominated [49]. The type VI secretion system is also regulated by the very presence of competitors. Studies by Lazzaro et al. (2017) show that the *S. marcescens* Db10 strain adjusts the level of TVISS genes expression to the potential of competitors. Expression is intensified in the presence of strong competitors and silenced in a situation of a relative balance between competitors [57].

Interesting research results were also presented by Weber et al. (2009). Using the example of the *Vibrio anguillarum* strain NB10, they showed that TVISS proteins can indirectly regulate the expression of EmpA and PrtV proteases, which resulted from a direct, positive effect on the expression of the stress response regulator – RpoS – and the QT – VanT system regulator [112].

#### 4. Membership to polymorphic toxins system

The type Vb and type VI secretion systems, determining the competition requiring contact, can be attributed to the so-called polymorphic toxin systems (PTS)

– a relatively recently isolated group of protein antibacterial toxins. The following factors determine whether a given toxin belongs to PTS:

Homologous structure: toxins belonging to PTS consist of two parts: the amino-terminus and the carboxyl-terminus, which constitutes the toxin proper. Both fragments are separated from each other by a conservative amino acid motif. The amino-terminus is the fragment with a high degree of phylogenetic similarity, and often plays a role in the transport of the toxic region, which is strongly varied between particular species, but also between strains.

The presence of protein constituting an immunoprotein: this protein inhibits the toxin, thereby protecting the cell from autoinhibition, but also from the toxin introduced by another cell belonging to the same species/strain. The immunoprotein is an inhibitor only for the toxin specific to itself. The interspecific diversity of protective proteins, corresponds to the diversity of toxins [120, 46].

The group of polymorphic toxins includes CdiA toxins, as well as some effectors secreted by the type VI secretion system – RHS and evolved Hcp/VgrG. Another example of PTS are the products of *maf* (multiple adhesin family) genes presented in the genus *Neisseria* [46]. *Maf* genes are found within the pathogenicity island of IHT-G (Island of Horizontally Transferred DNA-G). It has been demonstrated that the *mafB* gene encodes a functionally active toxin. This toxin possesses EndoU ribonuclease activity. The gene placed directly behind *mafB* – *mafI* – encodes an immunoprotective protein. The MafB toxin is specific to the genus *Neisseria*. A characteristic feature of this system is that the MafB protein has a globular structure. An additional *mafA* gene encoding for the lipoprotein embedded in the outer membrane, is often found upstream of the gene encoding the MafB toxin. Its function has not yet been determined. The nucleotide sequence of this gene has no similarity to the nucleotide sequences of the genes of other secretion systems [44,45]. Similarly, for the genus *Myxobacteria* a cluster of genes coding toxins from the PTS group has been described. These are toxins transported between cells by means of exchange through the outer membrane (Outer Membrane Exchange, OME). The cluster was named *sitBAI*. The SitA protein is a polymorphic toxin whose activity is inhibited by SitI. SitB acts as a supporting protein, and plays a significant role in the functioning of SitA. The toxic domain of SitA protein is located at the C-terminus of the protein [108]. Polymorphic toxins may also show a “distance” effect, i.e. they are secreted into bacteria’s environment and diffuse in it. Few bacteriocins can be mentioned here: colicins and soluble pyocins (Soluble pyocins, S-pyocins) [120, 46] (Fig. 4).



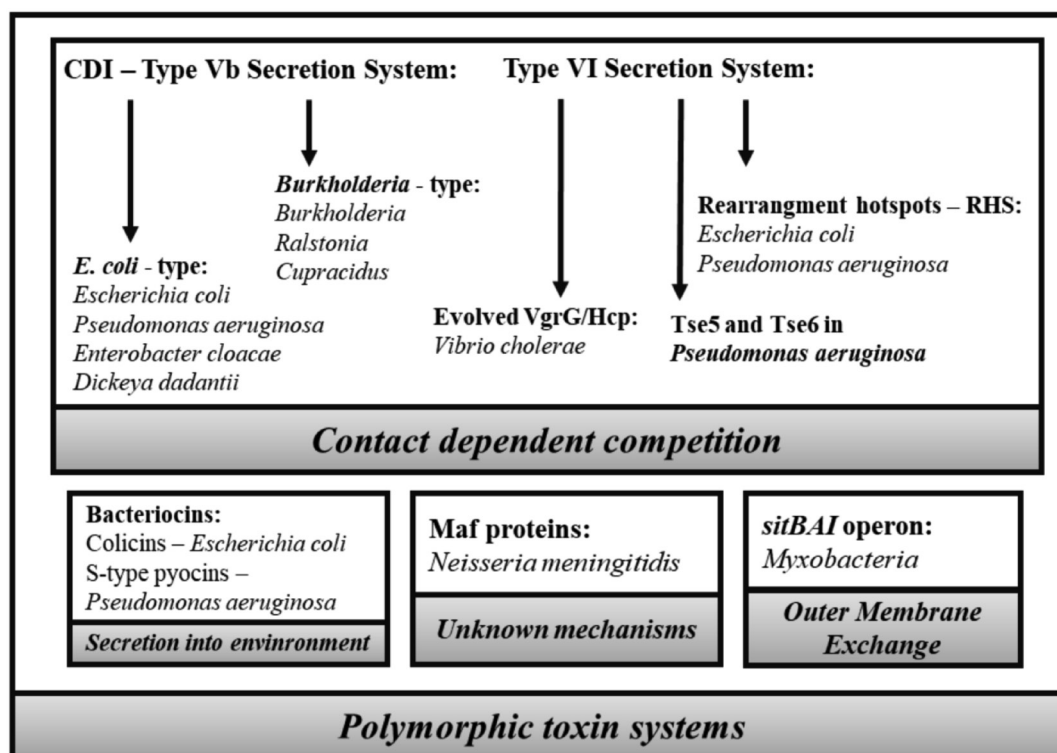


Fig. 4. Polymorphic toxin systems

The effectors of the CDI and TVISS system belong to the group of polymorphic toxins, which are characterized by homologous structure and the presence of an immunoprotective protein in cells. For the operation of CDI and TVISS effectors, direct contact of cells is required, and the exchange takes place using the secretion apparatus of these systems. Although the toxins encoded by the *sitBAI* operon are also exchanged as a result of cell contact, secretion occurs according to the Outer Membrane Exchange mechanism. Bacteriocins are released into the environment. The mechanism of secreting toxins from the Maf family is unknown.

## 5. Role of the systems in bacterial biology

The *E. coli* strain EC93 uses the CDI system effectively, as a mechanism which ensures its advantage in intra-species competition. This strain is the main isolate from rat faeces [10]. It is suggested that the CDI system is used to eliminate competing cells. However, this only applies to related strains [89] and it has not been demonstrated that CDI is important in interspecific competition. On the example of *B. thailandensis*, it has been observed that competition and kin discrimination conditioned by the CDI system, regulates the biofilm structure [7]. Studies also show that CDI can shape the biofilm structure independently of growth inhibition processes [37, 88], by inducing cells aggregation which express genes encoding identical CdiA proteins [88]. It has also been shown that the BcpA protein determines cell operations [37], and the *bcpA-IOB* gene cluster is a cellular communication mediator [38]. Similar observations have been made on the example of *P. aeruginosa*, a bacterium which has two copies of genes encoding CDI system proteins. Although studies have shown, that the expression of none of them is related to the first stages of biofilm biogenesis, as in the case of *Escherichia* and *Burkholderia*, they are nonetheless important in bacterial competition, as they

allow for excluding unrelated strains, as demonstrated on the model of deletion strains competing with a wild strain. Importantly, the research on CDI in the case of *P. aeruginosa* showed for the first time, that this system is an important virulence factor in the processes of respiratory infection [70]. The question about the role of CDI in bacterial biology still remains unanswered. Recent studies using the *E. coli* strain EC93 indicate the importance of the *cdiBAI* cluster in the stabilization of the genetic element – the conjugative plasmid. The plasmid, which in natural conditions disappeared after the occurrence of approx. 50 cell divisions, was maintained in 60% of cells from the EC93 strain population for twice as long after the incorporation of the *cdiBAI* genes into it [86].

Numerous reports indicate, that TVISS is an element of bacterial competition, both intra – and interspecific [92, 26, 106, 2, 81, 62]. The fact that TVISS effectively delivers toxic effectors between cells of different strains, may result from the fact that unlike CDI, this system does not require a surface receptor to translocate toxins. Using fluorescence microscopy, Gerc et al. (2015) studied the dynamics of the biosynthesis of the TVISS apparatus on the example of *S. marcescens* Db10. The results of these experiments showed, that an attack with the use of TVISS does not require prior induction

with cellular contact [39]. Such observations indicate the essence of TVISS in competition for the ecological niche colonization. However, it is important to bear in mind that the use of TVISS comes at a high cost for the cell, which means that it becomes more sensitive to attack from competing cells [59].

Like CDI, TVISS is not just a simple competition system but also plays an important role in the socio-biology of bacteria and in the phenomenon of kin discrimination. Studies using mathematical models in combination with *in vitro* experiments indicate, that bacterial competition based on TVISS largely shapes the interaction of cells and may be an important mechanism that indirectly – through the elimination of unrelated strains – leads to the development of the interaction of related cells [69]. The type VI secretion system is also involved in the formation and maturation of bacterial biofilm and in the communication between cells in the biofilm, as illustrated by the example of *P. fluorescens* MFE01 [36] and in the case of the *Acidovorax citrulli* strain xjl12, where it has been observed that the presence and functions of genes encoding TVISS core affect biofilm formation [105].

An interesting example of kin discrimination conditioned by TVISS is the Dienes phenomenon of *P. mirabilis* strains [113]. This phenomenon consists in the creation of a macroscopic borderline, called a demarcation line, between unrelated strains of *P. mirabilis* during the swarming movement. The recognition of the kin between strains results from the TVISS-dependent exchange of the IdsD protein encoded by the *idsABCDEF* operon. This protein, after penetration into the cytoplasm, is able to form complexes with IdsE, which provides information about the kinship of strains. Unrelated strains – those for which the IdsDE complex is not created, compete with each other [25, 93]. One possible effector of the competition is the proteins, coded by the *idrABCDE* operon, which are also transported by the TVISS apparatus [113, 94]. The Ids and Idr proteins are an example of non-canonical TVISS effectors, which suggests a wide range of TVISS activity. As has been proven, in competition between the *P. mirabilis* strains forming the demarcation lines also Primary hcp-vgrG Effector operon (Pef) is involved, whose activity is inhibited by a specific immunoprotective protein [4, 5]. This suggests, that the Dienes phenomenon is most likely to be conditioned by many independent mechanisms.

## 6. Conclusions

The contact-dependent growth inhibition system (CDI) and the type VI secretion system (TVISS), determine the bacterial competition and the phenomenon

of kin discrimination amongst Gram-negative bacteria. Importantly, despite the numerous structural similarities and homologous biological function, the molecular mechanisms of the two systems is clearly different. It is also puzzling, that these two systems belong to a group of polymorphic toxins, which appear to be evolutionarily related. The wide occurrence of both systems, the presence of many types of toxic effectors and immunoproteins specific to them, but also the fact that individual species and even strains exhibit the expression (under strict control of many factors) of both systems suggests that the above mechanisms play a huge role in the socio-biology of bacteria. So far, the research has focused mainly on explaining the mechanisms of CDI and TVISS activity, and the question about their significance for population still remains unanswered. An interesting direction seems to be the research aimed at clarifying the hierarchy of the action and potential of both systems in arrangements using large populations, going beyond the previously studied mutant-parent strain or two competing strains/species systems. This direction fits in the recently growing interest in the bacterial population understood as a closely dependent “cell community”. There is also a possibility of the practical application of the knowledge gained from the study of the above relationships, i.e., in the design of new methods of detecting and differentiating microorganisms and methods of their eradication, which could replace antibiotics of ever diminishing efficacy.

## Acknowledgements

The article has been financed with funds of BS UJK No. 612 529.

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

## Literature

1. Alcoforado Diniz J., Coulthurst S.J.: Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *J. Bacteriol.* **197**, 2350–2360 (2015)
2. Alcoforado Diniz J., Liu Y.C., Coulthurst S.J.: Molecular weaponry: Diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cell. Microbiol.* **17**, 1742–1751 (2015)
3. Allsopp L.P., Wood T.E., Howard S.A., Maggiorelli F., Nolan L.M., Wettstadt S., Filloux A.: RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7707–7712 (2017)
4. Alteri C.J., Mobley H.L.T. *et al.*: Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003608 (2013)
5. Alteri C.J., Himpsl S.D., Zhu K., Hershey H.L., Musili N., Miller J.E., Mobley H.L.T.: Subtle variation within conserved effector operon gene products contributes to T6SS-mediated killing and immunity. *PLoS Pathogens*, **13**, e1006729 (2017)

6. Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: The *Burkholderia* *bcpAIOB* genes define unique classes of two-partner secretion and contact dependent growth inhibition systems. *PLoS Genetics*, **8**, e1002877 (2012)
7. Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: Kind discrimination and competitive exclusion mediated by contact-dependent growth inhibition systems shape biofilm community structure. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004076 (2014)
8. Aoki S.K., Diner E.J., de Roodenbeke C.T., Burgess B.R., Poole S.J., Braaten B.A., Low D.A.: A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature*, **468**, 439–442 (2010)
9. Aoki S.K., Low D.A. *et al.*: Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* **70**, 323–340 (2008)
10. Aoki S.K., Pamma R., Hernday A.D., Bickham J.E., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, **309**, 1245–1248 (2005)
11. Aoki S.K., Poole S.J., Hayes C.S., Low D.A.: Toxin on a stick: modular CDI toxin delivery systems play roles in bacterial competition. *Virulence*, **2**, 356–359 (2011)
12. Aoki S.K., Webb J.S., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 1777–1786 (2009)
13. Bandara H.M., Yau J.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranyake L.P.: *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.* **10**, DOI:10.1186/1471-2180-10-125 (2010)
14. Bandara H.M.H.N., Yau J.Y.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranyake L.P.: *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1623–1631 (2009)
15. Basler M.: Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, DOI:10.1098/rstb.2015.0021 (2005)
16. Batot G., Goulding C.W. *et al.*: The CDI toxin of *Yersinia kristensenii* is a novel bacterial member of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5013–5025 (2017)
17. Beck C.M., Diner E.J., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: The F pilus mediates a novel pathway of CDI toxin import. *Mol. Microbiol.* **93**, 276–290 (2014)
18. Beck C.M., Morse R.P., Cunningham D.A., Iniguez A., Low D.A., Goulding C.W., Hayes C.S.: CdiA from *Enterobacter cloacae* delivers a toxic ribosomal RNase into target bacteria. *Structure*, **22**, 707–718 (2015)
19. Beck C.M., Willett J.L.E., Cunningham D.A., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors from uropathogenic *Escherichia coli* use heterotrimeric osmoporins as receptors to recognize target bacteria. *PLoS Pathogens*, **12**, e1005925 (2016)
20. Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J.: Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 3–8 (2008)
21. Blango M.G., Mulvey M.A.: Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 177–181 (2009)
22. Bondage D.D., Lin J.-S., Ma L.-S., Kuo C.-H., Lai E.-M.: Vgr GC terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3931–40 (2016)
23. Bröms J.E., Ishikawa T., Wai S.N., Sjöstedt A.: A functional VipA-VipB interaction is required for the type VI secretion system activity of *Vibrio cholerae* O1 strain A1552. *BMC Microbiol.* **13**, 96, DOI:10.1186/1471-2180-13-96 (2013)
24. Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **65**, 167–176 (2011)
25. Cardarelli L., Saak C., Gibbs K.A.: Two proteins form a heteromeric bacterial self-recognition complex in which variable subdomains determine allele-restricted binding. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00251-15 (2015)
26. Carruthers M.D., Nicholson P.A., Tracy E.N., Munson R.S.: *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE*, **8**, e59388 (2013)
27. Chou S., Bui N.K., Russell A.B., Lexa K.W., Gardiner T.E., LeRoux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system. *Cell Rep.* **1**, 656–664 (2012)
28. Cianfanelli F.R., Alcoforado Diniz J., Guo M., De Cesare V., Trost M., Coulthurst S.J.: VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, **12**, e1005735 (2016)
29. Coulthurst S.J.: The type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* **164**, 640–654 (2013)
30. Diner E.J., Beck C.M., Webb J.S., Low D.A., Hayes C.S.: Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI). *Genes Dev.* **26**, 515–525 (2012)
31. Dong T.G., Ho B.T., Yoder-Himes D.R., Mekalanos J.J.: Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2623–2628 (2013)
32. English G., Trunk K., Rao V.A., Srikannathasan V., Hunter W.N., Coulthurst S.J.: New secreted toxins and immunity proteins encoded within the type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* **86**, 921–936 (2012)
33. Flaugnatti N., Journet L. *et al.*: A phospholipase A1 antibacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* **99**, 1099–1118 (2016)
34. Foster K.R., Bell T.: Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.* **22**, 1845–1850 (2012)
35. Gallique M., Bouteiller M., Merieau A.: The type VI secretion system: A dynamic system for bacterial communication? *Front. Microbiol.* **8**, DOI:10.3389/fmicb.2017.01454 (2017)
36. Gallique M., Decoin V., Barbey C., Rosay T., Feuilloley M.G.J., Orange N., Merieau A.: Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS ONE*, **12**, e0170770 (2017)
37. Garcia E.C., Anderson M.S., Hagar J.A., Cotter P.A.: *Burkholderia* BcpA mediates biofilm formation independently of interbacterial contact-dependent growth inhibition. *Mol. Microbiol.* **89**, 1213–1225 (2013)
38. Garcia E.C., Perault A.I., Marlatt S.A., Cotter P.A.: Interbacterial signaling via *Burkholderia* contact-dependent growth inhibition system proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8296–8301 (2016)
39. Gerc A.J., Diepold A., Trunk K., Porter M., Rickman C., Armitage J.P., Stanley-Wall N.R., Coulthurst S.J.: Visualization of the *Serratia* type VI secretion system reveals unprovoked attacks and dynamic assembly. *Cell Rep.* **12**, 2131–2142 (2015)
40. Green E.R., Meccas J.: Bacterial secretion systems – an overview. *Microbiol. Spectr.* **4**, DOI:10.1128/microbiolspec (2016)
41. Hachani A., Allsopp L.P., Oduko Y., Filloux A.: The VgrG proteins are “la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. *J. Biol. Chem.* **289**, 17872–17884 (2014)
42. Hayes C.S., Koskiniemi S., Ruhe Z.C., Poole S.J., Low D.A.: Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, DOI:10.1101/cshperspect.a010025 (2014)

43. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B.: Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 15–25 (2010)
44. Jamet A., Jousset A.B., Euphrasie D., Mukorako P., Boucharlat A., Ducouso A., Charbit A., Nassif X.: A new family of secreted toxins in pathogenic *Neisseria* species. *PLoS Pathogens*, **11**, e1004592 (2015)
45. Jamet A., Nassif X.: Characterization of the Maf family of polymorphic toxins in pathogenic *Neisseria* species. *Microb. Cell*, **2**, 88–90 (2015)
46. Jamet A., Nassif X.: New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00285-15 (2015)
47. Jones A.M., Garza-Sánchez F., So J., Hayes C.S., Low D.A.: Activation of contact-dependent antibacterial tRNase toxins by translation elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, DOI:10.1073/pnas.1619273114 (2017)
48. Jones C., Hachani A., Manoli E., Filloux A.: An *rhs* gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *J. Bacteriol.* **196**, 800–810 (2014)
49. Kapitein N., Mogk A.: Type VI secretion system helps find a niche. *Cell Host Microbe*, **16**, DOI:10.1016/j.chom.2014.06.012 (2014)
50. Khajanchi B.K., Sha J., Kozlova E.V., Erova T.E., Suarez G., Sierra J.C., Popov V.L., Horneman A.J., Chopra A.K.: N-acyl-homoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, **155**, 3518–3531 (2009)
51. Kirchberger P.C., Unterweger D., Provenzano D., Pukatzki S., Boucher Y.: Sequential displacement of type VI secretion system effector genes leads to evolution of diverse immunity gene arrays in *Vibrio cholerae*. *Sci. Rep.* **7**, DOI:10.1038/srep45133 (2017)
52. Konovalova A., Søgaard-Andersen L.: Close encounters: Contact-dependent interactions in bacteria. *Mol. Microbiol.* **81**, 297–301 (2011)
53. Koskiniemi S., Garza-Sánchez F., Edman N., Chaudhuri S., Poole S.J., Manoil C., Hayes C.S., Low D.A.: Genetic analysis of the CDI pathway from *Burkholderia pseudomallei* 1026b. *PLoS ONE*, **10**, e0120265 (2015)
54. Koskiniemi S., Lamoureux J.G., Nikolakakis K.C., t'Kint de Roodenbeke C., Kaplan M.D., Low D.A., Hayes C.S.: Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7032–7037 (2013)
55. Kube S., Wendler P.: Structural comparison of contractile nanomachines. *AIMS Biophysics*, **2**, 88–115 (2015)
56. Kung V.L., Khare S., Stehlik C., Bacon E.M., Hughes A.J., Hauser A.R.: An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1275–1280 (2012)
57. Lazzaro M., Feldman M.F., Vescovi E.G.: A transcriptional regulatory mechanism finely tunes the firing of Type VI Secretion System in response to bacterial enemies. *mBio*, **8**, DOI:10.1128/mBio.00559-17 (2017)
58. Leiman P.G., Basler M., Ramagopal U.A., Bonanno J.B., Sauder J.M., Pukatzki S., Burley S.K., Almo S.C., Mekalanos J.J.: Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4154–4159 (2009)
59. LeRoux M., Mougous J.D. *et al.*: Quantitative single-cell characterization of bacterial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 19804–19809 (2012)
60. Lesic B., Starkey M., He J., Hazan R., Rahme L.G.: Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology*, **155**, 2845–2855 (2009)
61. Li M., Le Trong I., Carl M.A., Larson E.T., Chou S., de Leon J.A., Dove S.L., Stenkamp R.E., Mougous J.D.: Structural basis for type VI secretion effector recognition by a cognate immunity protein. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002613 (2012)
62. Liu L., Ye M., Li X., Li J., Deng Z., Yao Y.-F., Ou H.-Y.: Identification and characterization of an antibacterial Type VI Secretion System in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front. Cellular Infect. Microbiol.* **7**, DOI:10.3389/fcimb.2017.00442 (2017)
63. Lyons N.A., Kraigher B., Stefanic P., Mandic-Mulec I., Kolter R.: A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* **26**, 733–742 (2016)
64. Ma J., Pan Z., Huang J., Sun M., Lu C., Yao H.: The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*, **8**, DOI:10.1080/21505594.2017.1279374 (2017)
65. Ma J., Sun M., Dong W., Pan Z., Lu C., Yao H.: PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environment. Microbiol.* **19**, 345–360 (2017)
66. Ma L.S., Hachani A., Lin J.S., Filloux A., Lai E.M.: *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, **16**, 94–104 (2014)
67. Ma L.S., Narberhaus F., Lai E.M.: IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. *J. Biol. Chem.* **287**, 15610–15621 (2012)
68. Majerczyk C., Schneider E., Greenberg E.P.: Quorum sensing control of type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *eLife*, **5**, DOI:10.7554/eLife.14712 (2016)
69. McNally L., Bernardy E., Thomas J., Kalziqi A., Pentz J.T., Brown S., Hammer B., Yunker P.Y., Ratcliff W.: Killing by Type VI secretion drives clonal phase separation and the evolution of cooperation. *Nat. Commun.* **8**, DOI:10.1101/063487 (2017)
70. Melvin J.A., Gaston J.R., Phillips S.N., Springer M.J., Marshall C.W., Shanks R.M.Q., Bomberger M.: *Pseudomonas aeruginosa* contact-dependent growth inhibition plays dual role in host-pathogen interactions. *mSphere*, **2**, e00336-17 (2017)
71. Mercy C., Ize B., Salcedo S.P., de Bentzmann S., Bigot S.: Functional characterization of *Pseudomonas* contact dependent growth inhibition (CDI) systems. *PloS One*, **11**, e0147435 (2016)
72. Morse R.P., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Gerrick E., Low D.A., Hayes C.S., Goulding C.W.: Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 21480–21485 (2012)
73. Morse R.P., Willett J.L.E., Johnson P.M., Zheng M., Credali A., Iniguez A., Nowick J.S., Hayes C.S., Goulding C.W.: Diversification of  $\beta$ -augmentation interactions between CDI toxin/immunity proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3766–3784 (2016)
74. Myszkka K., Czaczuk K.: Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **64**, 582–589 (2010)
75. Nazarov S., Schneider J.P., Brackmann M., Goldie K.N., Stahlberg H., Basler M.: Cryo-EM reconstruction of Type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *The EMBO Journal*, e201797103 (2017)
76. Nguyen V.S., Cambillau C. *et al.*: Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nat. Microbiol.* **2**, DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.103 (2017)
77. Nikolakakis K.C., Low D.A. *et al.*: The toxin/immunity network of *Burkholderia pseudomallei* contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Mol. Microbiol.* **84**, 516–529 (2012)

78. Ogier J.C., Duvic B., Lanois A., Givaudan A., Gaudriault S.: A new member of the growing family of contact-dependent growth inhibition systems in *Xenorhabdus doucetiae*. *PLoS ONE*, **11**, e0167443 (2016)
79. Peng Y., Tan C. *et al.*: Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. *Sci. Rep.* **6**, DOI: 10.1038/srep26816 (2016)
80. Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T.: The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 11–17 (2009)
81. Ray A., Schwartz N., de Souza Santos M., Zhang J., Orth K., Salomon D.: Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. *EMBO Reports*, e201744226 (2017)
82. Records A.R.: The Type VI Secretion System: A multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 751–757 (2011)
83. Rendueles O., Ghigo J.: Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiol. Spect.* **3**, DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.f1 (2015)
84. Røder H.L., Sørensen S.J., Burmølle M.: Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends Microbiol.* **24**, 503–513 (2016)
85. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Beck C.M., Low D.A., Hayes C.S.: The proton-motive force is required for translocation of CDI toxins across the inner membrane of target bacteria. *Mol. Microbiol.* **94** 466–481 (2014)
86. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Chen A.J., Leung N.Y., Hayes C.S., Low D.A.: CDI systems are stably maintained by a cell-contact mediated surveillance mechanism. *PLoS Genetics*, **12**, e1006145 (2016)
87. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Xiong J., Koskiniemi S., Beck C.M., Perkins B.R., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors use modular receptor-binding domains to recognize target bacteria. *mBio*, **8**, DOI:10.1128/mBio.00290-17 (2017)
88. Ruhe Z.C., Townsley L., Wallace A.B., King A., Van der Woude M.W., Low D.A., Yildiz F.H., Hayes C.S.: CdiA promotes receptor-independent intercellular adhesion. *Mol. Microbiol.* **98**, 175–192 (2015)
89. Ruhe Z.C., Wallace A.B., Low D.A., Hayes C.S.: Receptor polymorphism restricts contact-dependent growth inhibition to members of the same species. *mBio*, **4**: DOI:10.1128/mBio.00480-13 (2013)
90. Ruiz F.M., Santillana E., Spinola-Amilibia M., Torreira E., Culebras E., Romero A.: Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: A component of the type VI secretion system. *PLoS ONE*, **10**, e0129691 (2015)
91. Russell A.B., Hood R.D., Bui N.K., Leroux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, **475**: 343–349 (2011)
92. Russell A.B., LeRoux M., Hathazi K., Agnello D.M., Ishikawa T., Wiggins P.A., Wai S.N., Mougous J.D.: Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, **496**, 508–512 (2013)
93. Saak C.C., Gibbs K.A.: The self-identity protein IdsD is communicated between cells in swarming *Proteus mirabilis* colonies. *J. Bacteriol.* **198**, 3278–3286 (2016)
94. Saak C.C., Zepeda-Rivera M.A., Gibbs K.A.: A single point mutation in a TssB / VipA homolog disrupts sheath formation in the type VI secretion system of *Proteus mirabilis*. *PLoS ONE*, **12**, e0184797 (2017)
95. Salomon D., Orth K.: Type VI secretion system. *Curr. Biol.* **25**, DOI:10.1016/j.cub.2015.02.031 (2015)
96. Sana T.G., Hachani A., Bucior I., Soscia C., Garvis S., Termine E., Egel J., Filloux A., Bleves S.: The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 27095–27105 (2012)
97. Satpathy S., Sen S.K., Pattanaik S., Raut S.: Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **7**, 56–66 (2016)
98. Sha J., Rosenzweig J.A., Kozlova E.V., Wang S., Erova T.E., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K.: Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. *Microbiology*, **159**, 1120–1135 (2013)
99. Shneider M.M., Buth S.A., Ho B.T., Basler M., Mekalanos J.J., Leiman P.G.: PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, **500**, 350–353 (2013)
100. Silverman J.M., Agnello D.M., Zheng H., Andrews B.T., Li M., Catalano C.E., Gonen T., Mougous J.D.: Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol. Cell*, **51**, 584–593 (2013)
101. Silverman J.M., Brunet Y.R., Cascales E., Mougous J.D.: Structure and regulation of the Type VI Secretion System. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 453–472 (2012)
102. Stubbendieck R.M., Straight P.D.: Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* **198**, 2145–2155 (2016)
103. Tan K., Johnson P.M., Stols L., Boubion B., Eschenfeldt W., Babnigg G., Hayes C.S., Joachimiak A., Goulding C.W.: The structure of a contact-dependent growth-inhibition (CDI) immunity protein from *Neisseria meningitidis* MC58. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 702–709 (2015)
104. Tang J.Y., Bullen N.P., Ahmad S., Whitney J.C.: Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *J. Biol. Chem.* **2**, 1504–1514 (2017)
105. Tian Y., Zhao Y., Wu X., Liu F., Hu B., Walcott R.R.: The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 38–47 (2015)
106. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuk B., Provenzano D., Pukatzki S.: The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* **5**, DOI:10.1038/ncomms4549 (2014)
107. Van Ulsen P., Rahman S., Jong W.S.P., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J.: Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 1592–1611 (2014)
108. Vassallo C.N., Cao P., Conklin A., Finkelstein H., Hayes C.S., Wall D.: Infectious polymorphic toxins delivered by outer membrane exchange discriminate kin in myxobacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.29397 (2017)
109. Velicer G.J., Plucaín J.: Evolution: Bacterial territoriality as a byproduct of kin discriminatory warfare. *Curr. Biol.* **26**, DOI: 10.1016/j.cub.2016.03.033 (2016)
110. Wang L., Qiu J. *et al.*: Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, **8**, e73363 (2013)
111. Webb J.S., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Aoki S.K., Hayes C.S., Low D.A.: Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PLoS ONE*, **8**, e57609 (2013)
112. Weber B., Hasic M., Chen C., Wai S.N., Milton D.L.: Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ. Microbiol.* **11**, 3018–3028 (2009)
113. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L.: Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *mBio*, **4**, DOI:10.1128/mBio.00374-13. Editor (2013)

114. Whitney J.C., Mougous J.D. *et al.*: Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol. Microbiol.* **92**, 529–542 (2014)
115. Whitney J.C., Chou S., Russell A.B., Biboy J., Gardiner T.E., Ferrin M.A., Brittnacher M., Vollmer W., Mougous J.D.: Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair. *J. Biol. Chem.* **288**, 26616–26624 (2013)
116. Whitney J.C., Mougous J.D. *et al.*: A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.26938 (2017)
117. Willett J.L.E., Gucinski G.C., Fatherree J.P., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11341–1346 (2015)
118. Willett J.L.E., Ruhe Z.C., Goulding C.W., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiA/CdiB two-partner secretion proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3754–4765 (2015)
119. Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., Song Z.: Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* **3**, 74–81 (2011)
120. Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind L.: Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol. Direct*, **7**, DOI:10.1186/1745-6150-7-18 (2012)
121. Zhang W., Xu S., Li J., Shen X., Wang Y., Yuan Z.: Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by ahl-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Arch. Microbiol.* **193**, 351–363 (2011)
122. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J.: Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21128–21133 (2010)
123. Zoued A., Brunet Y.R., Durand E., Aschtgen M.S., Logger L., Douzi B., Journet L., Cambillau C., Cascales E.: Architecture and assembly of the type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1664–1673 (2014)

Dawid Gmiter\*, Grzegorz Czerwonka, Wiesław Kaca

Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w sierpniu 2018 r.

**Streszczenie:** Konkurencja bakteryjna, zdefiniowana jako lokalne oddziaływania, może doprowadzić do koegzystencji konkurentów, samoorganizacji społeczności bakteryjnej lub rozkładu dominacji gatunków w niszach ekologicznych. Bakterie wykształciły wiele mechanizmów komunikacji i konkurencyjności. Dyskryminacja krewniacza pozwala gatunkom na rozróżnienie komórek krewniaczych od niespokrewnionych w środowisku bytowania. System sekrecji typu Vb oraz VI (SSTVb i SSTVI) odgrywają istotną rolę w tym zjawisku. System inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu, odkryty w *Escherichia coli*, wykorzystuje białka CdiB/CdiA przynależne do SSTVb, opisywane również jako dwu-partnerski system sekrecji, do inhibicji wzrostu niespokrewnionych szczepów i wymaga kontaktu komórek. Obecność wewnątrzkomórkowej, małej proteiny immunoprotekcyjnej (CdiI) chroni komórki *E. coli* przed autoinhibicją. Inny system konkurencji bakteryjnej, początkowo opisany w procesie nodulacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, angażuje system sekrecji typu VI. Struktura SSTVI jest bardziej skomplikowana i zawiera w sobie szereg białek homologicznych do ogonka bakteriofagów i białek membranowych budujących rdzeń aparatury (białka Tss). Część białek wchodzących w skład SSTVI opisano jako białka akcesoryjne (białka Tag). Ważnymi dla funkcjonowania SSTVI są heksamery Hcp (haemolysin coregulated protein) oraz białka VgrG (valine-glycine repeat G), które odrywają podwójną rolę: białek chaperonowych dla sekrecji toksyn i/lub właściwych toksycznych efektorów. Pomimo znacznych różnic w budowie, oba przedstawione systemy wykazują homologiczną funkcję w zjawisku konkurencji i regulują interakcje społeczności bakteryjnych.

1. Wstęp. 2. Inhibicja wzrostu zależna od kontaktu. 2.1. Budowa białkowej aparatury systemu CDI. 2.2. Efektory systemu CDI. 3. System sekrecji typu VI. 3.1. Budowa systemu sekrecji typu VI. 3.2. Efektory systemu sekrecji typu VI. 4. Przynależność do systemu polimorficznych toksyn. 5. Znaczenie systemów konkurencji w biologii bakterii. 6. Podsumowanie

#### TYPE VB AND VI SECRETION SYSTEMS AS COMPETITION AGENTS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

**Abstract:** Bacterial competition, defined as a local neighbour interaction, can lead to competitors' coexistence, bacterial community self-organization or rearrangement of species dominance structure in ecological niches. Bacteria developed many mechanisms to communicate and compete. Kin discrimination mechanisms in bacterial populations allow species to distinguish a friend from a foe in bacterial environment. Type Vb and VI secretion systems (TVIbSS and TVISS) play a crucial role in this phenomenon. A contact-dependent growth inhibition (CDI), primarily found in *Escherichia coli* strains, utilizes CdiB/CdiA protein of type Vb secretion system, described also as two-partner secretion (TPS) system, to inhibit growth of non-kin strains, where cell contact is required. Presence of an intracellular small immunity protein (CdiI) protects *E. coli* cells from autoinhibition. Other bacterial competition system, involved mainly in the nodulation process of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain, engages type VI secretion system. The structure of TVISS is more complicated and comprises a series of proteins with structural homology to bacteriophage tail proteins and membrane proteins, which build the core of the system (Tss proteins). Other proteins of the TVISS have been described as associated proteins (Tag proteins). Important proteins for TVISS are also haemolysin coregulated protein (Hcp), which has a hexameric, tubular structure, and VgrG protein (valine-glycine repeat G). VgrG plays a dual role in the process: is a chaperone protein in the secretion of effector toxin or/and is secreted as a toxin itself. Despite the structural differences between these secretion systems, they both show functional homology in the competition phenomenon and govern the social life of bacterial community.

1. Introduction. 2. Contact-dependent growth inhibition. 2.1. Structure of the CDI system. 2.2. Effectors of the CDI system. 3. Type VI secretion system. 3.1. Structure of the type VI secretion system. 3.2. Effectors of the type VI secretion system. 4. Members of the polymorphic toxin system. 5. Role of the competition systems in bacterial biology. 6. Conclusions

**Słowa kluczowe:** inhibicja wzrostu zależna od kontaktu, konkurencja bakteryjna, system sekrecji typu Vb, system sekrecji typu VI  
**Keywords:** contact-dependent growth inhibition, bacterial competition, type Vb secretion system, type VI secretion system

### 1. Wstęp

Bakterie bytują w środowisku w postaci złożonych społeczności, wewnątrz których obserwowane są liczne interakcje – począwszy od współpracy, a kończąc na konkurencji o przestrzeń życiową i dostęp do składników pokarmowych [43, 83, 102]. Najlepiej poznanym przykładem współistnienia mikroorganizmów jest bio-

film. Jest to skomplikowana struktura, w której komórki otoczone są macierzą składającą się głównie z polisacharydów, białek i DNA. Macierz biofilmu stanowi barierę ochronną – spowalnia dyfuzję antybiotyków, chroni przed czynnikami fizycznymi oraz zapewnia odpowiednią wilgotność środowiska życia komórek [97]. Na społeczność biofilmu mogą składać się zarówno bakterie należące do jednego gatunku, jak i aglomeraty skupia-

\* Autor korespondencyjny: Dawid Gmiter, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce; tel: 41 349 61 22; e-mail: gmiterd@gmail.com

jące organizmy należące do wielu gatunków [84, 119]. Ponadto, biofilm może być tworzony przez mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne [13, 14].

Jako zachowanie zaliczane do kooperacji wymień należy zjawisko tzw. „wyczuwania kworum”, czyli Quorum Sensing (QS). Jest to zdolność „komunikowania się” bakterii poprzez sygnałowe cząsteczki chemiczne (autoinduktory). Wzrost stężenia autoinduktorów, w odpowiedzi na rozrastającą się populację drobnoustrojów w biofilmie, powoduje uruchomienie odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych, co stanowi podstawę dla kolonizacji przez bakterie kolejnych powierzchni biotycznych i abiotycznych [74, 97].

Bakterie, podobnie jak organizmy wyższe, stale ze sobą konkurują i jak wskazują badania, konkurencja występuje wśród nich częściej niż kooperacja [34]. W niekorzystnym dla siebie środowisku, gdzie dostęp do składników pokarmowych jest utrudniony, drobnoustroje wykorzystują liczne mechanizmy mające zapewnić im przewagę [102]. Konkurencja bakteryjna powiązana może być ze zjawiskiem dyskryminacji krewniaczej (kin discrimination), ponieważ kooperacja populacji bakteryjnej jest pożądana pomiędzy komórkami spokrewnionymi [63]. Termin dyskryminacja krewniacza określa zdolność bakterii do odróżnienia komórek szczepu niespokrewnionego od tych należących do tego samego, lub bardzo blisko spokrewnionego, szczepu i wywołania zmian w funkcjonowaniu niespokrewnionego organizmu [109], takich jak zahamowanie wzrostu rozpełzłego [4] lub inhibicja wzrostu [10]. Ciekawym mechanizmem jest dyskryminacji krewniaczej połączona z konkurencją bakteryjną wymagającą kontaktu komórek poprzez wyspecjalizowane białka budujące dwa systemy sekrecji: system inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu (Contact-Dependent Growth Inhibition, CDI) oraz system sekrecji typu VI (Type VI Secretion System, TVISS). Zjawisko to opiera się na eliminacji szczepów niespokrewnionych, tj. wrażliwych na białkowe toksyny transportowane przez powyższe systemy bezpośrednio do wnętrza komórki [63, 116]. W literaturze wymienia się kilka innych przykładów oddziaływań pomiędzy komórkami bakteryjnymi, dla których ważnym czynnikiem jest ich bezpośredni kontakt, m.in.: C-sygnalizacja u *Myxococcus xanthus* lub transport jednoniciowego DNA z enzymem relaksazą związanego kowalencyjnie na końcu 5' poprzez system sekrecji typu IV [21, 52].

## 2. Inhibicja wzrostu zależna od kontaktu

Termin inhibicja wzrostu zależna od kontaktu (CDI) został przedstawiony przez Aokiego i wsp. w 2005 roku [10]. Odnosi się on do fenomenu wykazywanego przez szczep *Escherichia coli* EC93, który charakteryzuje się

zdolnością do zahamowania wzrostu innych szczepów *E. coli* w hodowli płynnej. Zjawisko to warunkowane jest działaniem produktów ekspresji genów operonu *cdiBAI* [10]. Białka CdiA oraz CdiB należą do podklasy b systemu sekrecji typu V (Type Vb Secretion System, TVbSS), określanej również jako dwu-partnerski system sekrecji (Two-Partner secretion System, TPS) [107, 117]. System sekrecji bakterii Gram-ujemnych klasyfikowany jako system typu V składa się z pięciu podklas: typy od Va do Ve. Białka należące do tych podklas są do siebie strukturalnie podobne, wszystkie posiadają białkowy kanał transportujący o strukturze  $\beta$ -baryłki [107].

Geny operonu *cdiBAI* szczepu *E. coli* EC93 ulegają ekspresji w sposób konstytutywny. System ten działa z wysoką wydajnością – pojedyncza komórka dominującego szczepu jest zdolna do odwracalnego zahamowania wzrostu nawet setek komórek szczepów niespokrewnionych znajdujących się w jej otoczeniu [10, 12]. Operon *cdiBAI*, po wprowadzeniu do laboratoryjnego szczepu *E. coli* K-12, zmienia fenotyp CDI– na CDI+ [10].

### 2.1 Budowa białkowej aparatury systemu CDI

Pierwsze z białek kodowanych przez operon (CdiB) jest zewnątrzkomórkową proteiną o wielkości ok. 64,5 kDa. Przyjmuje ono strukturę  $\beta$ -baryłki, a jego funkcją jest sekrecja i prezentowanie egzoproteiny CdiA na powierzchni komórki atakującej bakterii. Toksyną antybakteryjną jest białko CdiA. Jest to białko wielkości ok. 319 kDa. Białko CdiA posiada na swoim końcu karboksylowym domenę stanowiącą właściwą toksynę – region CdiA-CT (C-terminal CdiA) [11]. Koniec aminowy białka syntetyzowanego przez różne szczepy *E. coli*, o długości ok. 2800 aminokwasów, wykazuje wysoki stopień podobieństwa filogenetycznego, natomiast region CdiA-CT (ok. 250–350 aminokwasów) jest zróżnicowany pomiędzy szczepami [7]. Toksyna CdiA-CT wykazuje najczęściej aktywność nukleolityczną. Region aminowy i karboksylowy oddzielone są od siebie konserwatywnym motywem VE(NN). Immunoproteina CdiI warunkuje ochronę przed autoinhibicją. Rozpoznaje ona specyficzną dla siebie toksynę CdiA i wiążąc się do niej, hamuje jej działanie [11, 42]. W badaniach Tana i wsp. przedstawiono strukturę białka CdiI szczepu *Neisseria meningitidis* MC58. Białko to posiada strukturę homologiczną do białek wiążących RNA należących do rodziny Whirly. Zasynergowano również, że działanie immunoprotekcyjne białka CdiI może wynikać z ograniczenia dostępu toksyny CdiA – rybonukleazy EndoU – do cząsteczki RNA [103]. Wyniki badań wskazują, że wiązanie się ze sobą białek CdiA oraz CdiI stabilizowane jest przez różne mechanizmy: m.in. przez  $\beta$ -augmentację, w przebiegu której toksyna wydłuża domenę  $\beta$ -spinki by utworzyć antyrównoległą  $\beta$ -harmonijkę z fragmentem białka



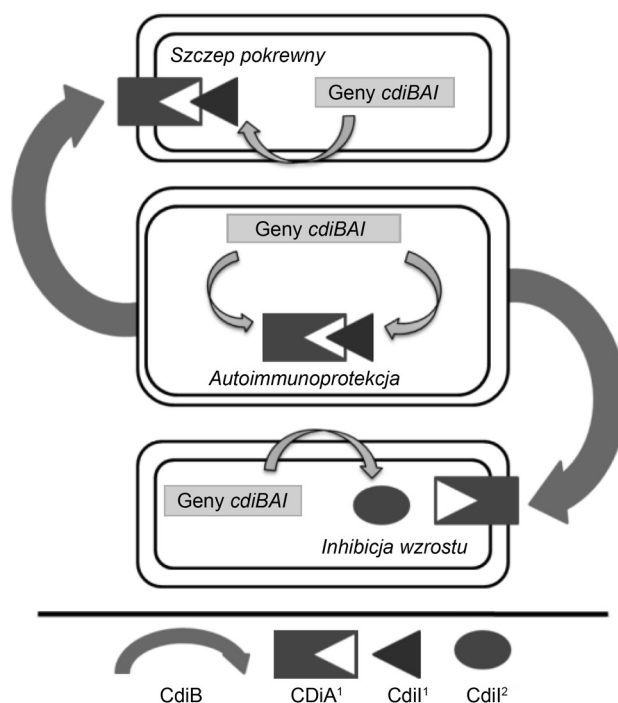
immunoprotekcyjnego [72, 73] lub komplementarność wynikającą z kształtu i ładunku [72].

System CDI wykorzystywany przez szczepy *E. coli* nazwano systemem typu *E. coli* (*E. coli* – type CDI). Uogólniony schemat działania tego systemu został przedstawiony na rycinie 1. Identyczne lub bardzo podobne systemy występują również w innych szczepach patogennych. Między innymi wymieć można szczep *Dickeya dadantii* 3937 [8] oraz gatunki *Enterobacter cloacae* i *N. meningitidis* [46]. Również rodzaj *Pseudomonas* posiada w swoim genomie operon genów odpowiadający za zahamowanie wzrostu uwarunkowane kontaktem typu *E. coli*. W badaniach Mercy'ego i wsp. na modelowym szczepie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 zaobserwowano, że system ten odgrywa rolę w procesie adhezji, tworzeniu biofilmu oraz konkurencji. Unikalność systemu CDI mikroorganizmów rodzaju *Pseudomonas* wynika ze zmienności motywów oddzielających końce aminowy i karboksylowy toksycznego białka CdiA. Analiza bioinformatyczna wykazała, że możliwe jest wyodrębnienie pięciu klas tego motywu: WVHN, VE(NN), LYVT, DAMV oraz NEALV [71].

System CDI charakterystyczny dla rodzajów *Burkholderia*, *Ralstonia* oraz *Cupriavidus* został nazwany terminem CDI typu *Burkholderia* (*Burkholderia* – type CDI). Rodzaj *Burkholderia* posiada w genomie operon składający się z genów *bcpAIOB* [77]. Poza białkami typowymi dla CDI (*BcpA* – *CdiA*, *BcpB* – *CdiB* oraz *BcpI* – *CdiI*), operon ten koduje dodatkową, małą lipoproteinę *BcpO*. Jej funkcja nie została w pełni wyjaśniona, jednak jest ona wymagana do sekrecji toksyny *BcpA* przez szczep *Burkholderia thailandensis* E264. Dodatkową różnicą jest występowanie motywu NxxLYN zamiast VE(NN) w toksynie *BcpA*, a sama toksyna posiada aktywność RNazy [6, 53].

Innym typem systemu CDI jest ten obecny u bakterii *Xenorhabdus doucetiae*, nazwany typem *cdiBCAI* (*cdiBCAI*-type). Analiza porównawcza *in silico* wskazuje, że taki operon często występuje wśród bakterii środowiskowych. Charakterystyczny dla tego typu gen *cdiC* koduje homolog białka C (należącego do acetylotransferaz) pełniącego funkcję aktywatora toksyny. Operon *cdiBCAI* koduje toksynę *CdiA*, w której występuje konserwatywny motyw VE(NN) [78].

Należy odnotować fakt, że w genomach bakterii posiadających system CDI typu *E. coli* często występują powtarzające się sekwencje nazwane fragmentami sierocymi (orphan). Kodują one toksyny *CdiA*-CT oraz protekcyjne polipeptydy *CdiI*, a ich funkcja i znaczenie nie zostały wyjaśnione. Postulowana jest hipoteza, że mogą stanowić „arsenał” zastępczy aktywowany w specyficznych warunkach. Dotyczy to w szczególności genów *cdiI*, gdyż ich sekwencje nukleotydowe wydają się kodować w pełni funkcjonalne białka [11].



Ryc. 1. Schemat działania systemu CDI typu *E. coli*

Białko *CdiB* umożliwia wprowadzenie toksyny *CdiA*<sup>1</sup> do wnętrza komórki atakowanej. Tam, jeśli toksyna rozpoznana zostanie przez białko immunoprotekcyjne *CdiI*<sup>1</sup>, następuje jej inaktywacja, co świadczy o pokrewieństwie komórek. W przypadku braku pokrewieństwa, immunoproteina *CdiI*<sup>2</sup> nie jest w stanie związać toksyny i dochodzi do zahamowania wzrostu. Równocześnie, powstanie kompleksu pomiędzy białkami *CdiA*<sup>1</sup> oraz *CdiI*<sup>1</sup> zapewnia komórce autoimmunoprotekcję.

## 2.2. Efektory systemu CDI

Efektory systemu CDI charakteryzują się zróżnicowanym mechanizmem aktywności antybakteryjnej. W przypadku szczepu *E. coli* EC93, *CdiA* najprawdopodobniej wykazuje zdolność do tworzenia porów w ścianie komórkowej atakowanej bakterii [47]. Z kolei inne bakterie produkują toksyny *CdiA*-CT, które najczęściej posiadają aktywność nukleolityczną [118]. Dokładniejsza analiza regionu odpowiedzialnego za toksyczność wskazuje, że można go podzielić na dwie części: koniec karboksylowy, będący enzymem nukleolitycznym – toksyną, która ulega „odcięciu” przed translokacją – oraz koniec aminowy grający kluczową rolę w transporcie nukleazy [111, 117]. Toksyna *CdiA*-CT syntetyzowana przez *E. cloacae* degraduje rybosomalny RNA [18]. Natomiast toksyna opisana dla szczepu *E. coli* 536 (UPEC536) jest tRNazą, która wymaga aktywacji poprzez obecność sulfahydralazy *O*-acetylseryny A (*CysK*). Jest to pierwsza poznana toksyna, do aktywności której wymagany jest dodatkowy czynnik [30]. Nowsze wyniki badań pokazują, że aktywność toksyn CDI może być również regulowana innymi czynnikami. Przykładem może być *CdiA* syntetyzowana przez szczep *E. coli* EC869. Szczep ten produkuje *CdiA* o aktywności tRNazy, dla aktywacji

której niezbędny jest czynnik elongacyjny Ts (Elongation Factor Ts, EF-Ts). Ponadto, toksyna ta wiąże się do czynnika elongacyjnego Tu (EF-Tu). Jest ona tRNAzą GTP-zależną, co jak wskazują autorzy, sugeruje, że tRNA jest degradowany przez powyższą toksynę jedynie w obecności kompleksu GTP+EF-Tu-tRNA [47]. Batot i wsp. zaprezentowali strukturę kryształu kompleksu toksyny CdiA oraz białka immunoprotekcyjnego pochodzącego ze *Yersinia kristensenii*. Toksynę produkowaną przez powyższą bakterię zakwalifikowano do superrodziny RNaz A [16]. Tymczasem CdiA syntetyzowana przez *Xenorhabdus doucetiae* jest Mg<sup>2+</sup>-zależną DNazą [78]. Również CdiA opisane u *D. dadantii* [111] oraz toksyna CdiA-CT0<sub>11</sub> syntetyzowana przez szczep *E. coli* EC869 [72] są DNazami. W tym drugim przypadku mamy do czynienia z DNazą zależną od Zn<sup>2+</sup> [72].

Mechanizm działania systemu CDI polega na zdolności białka CdiA do wydłużenia się na odległość kilkuset Å, a następnie związaniu się do atakowanej komórki przez oddziaływanie z jej zewnątrzkomórkowym receptorem. Najwcześniejsze badania wykazały, że receptorem takim jest białko BamA (znane również jako YaeT lub Omp85) [9]. W transporcie toksyny uczestniczą również AcrB, które jest elementem błony wewnętrznej i składnikiem pompy „efflux” gwarantującej wielolekooporność [9]. Transport toksyny poprzez błonę zewnętrzną komórki zachodzi swobodnie, natomiast jej translokacja do cytoplazmy wymaga dostarczenia energii [85]. Wykazano, że aktywności inhibicyjna systemu CDI *E. coli* skierowana jest jedynie względem szczepów należących do gatunku *E. coli*, które nie są w stanie zablokować działania toksyny przez białko CdiI (szczepy niespokrewnione). Tymczasem konkurencja międzygatunkowa nie jest uwarunkowana tym mechanizmem. Szczep *E. coli* EC93 nie wywołuje efektu hamującego wzrost względem innych  $\gamma$ -proteobakterii, w tym m.in.: *Salmonella enterica* serowar Typhimurium, *Citrobacter freundii* lub *Proteus mirabilis*. Może to wynikać z polimorfizmów występujących w 6 i 7 zewnątrzkomórkowej pętli receptora BamA [89]. Co interesujące, białka CDI pośredniczą również w niezależnej od BamA agregacji komórek *E. coli*. Wynika to z oddziaływań pomiędzy homologicznymi białkami CdiA, ponieważ do agregacji komórek niezbędna jest ekspresja tego białka [88]. W najnowszych badaniach wykazano, że białka CdiA szczepów *E. coli* można podzielić na 3 klasy, które charakteryzują się powinowactwem do różnych powierzchniowych receptorów: 1) klasa pierwsza to białka CdiA homologiczne do tych, które są syntetyzowane przez *E. coli* EC93, a które jako receptor wykorzystują białko BamA, 2) do klasy drugiej zaliczyć można białka, które jako receptor rozpoznają heteromeryczne poriny OmpC-OmpF, 3) do efektorów klasy trzeciej zalicza się białka CdiA rozpoznające

transporter nukleozydów Tsx. Specyficzność względem rozpoznawanych receptorów jest determinowana przez region CdiA długości ok. 300 aminokwasów zlokalizowany pomiędzy regionami powtórzeń peptydowych FHI-1 oraz FHI-2. Region ten charakteryzuje się podobieństwem w 24–27% pomiędzy poszczególnymi klasami oraz posiada konserwatywny centralny element FHI-1 [19, 87]. Bardzo nietypowy system transportu CdiA-CT został opisany dla szczepu *E. coli* 536, w przypadku którego koniec N w domenie CdiA-CT oddziałuje z fimbrią płciową F [17]. Wykazano również, że w rodzaju *Burkholderia* pętla 6 i 7 w białkowym receptorze BamA różnią się znacząco w porównaniu do *E. coli*, a możliwym receptorem w tym systemie jest lipopolisacharyd (LPS) [53].

### 3. System sekrecji typu VI

System sekrecji typu VI (SSTVI) jest białkową aparaturą odpowiedzialną za sekrecję toksyn białkowych przez bakterie Gram-ujemne [95]. Jak podaje Records (2011), pierwsze informacje dotyczące tego systemu pochodzą z lat 70., kiedy to Roest wraz ze wsp. zidentyfikowali w genomie *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* zespół genów odpowiadających za zahamowanie zdolności do efektywnego powstawania brodawek na korzeniach grochu. Geny te określono terminem *imp* (impaired in nodulation). Ich sekwencje nukleotydowe nie wykazywały homologii do znanych w tamtym okresie genów. W roku 2003 analiza supernatantu z hodowli *R. leguminosarum* pozwoliła wysnuć wniosek, że gen *impJ* jest niezbędny do sekrecji białka RbsB – proteiny wielkości 27 kDa posiadającej aminokwasowe sekwencje sygnałowe na swoim końcu aminowym. Wkrótce potem podobne obserwacje poczyniono dla innych organizmów, m.in. *Vibrio cholerae* i *P. aeruginosa* oraz patogennej dla ryb bakterii *Edwardsiella tarda* [82].

#### 3.1. Budowa systemu sekrecji typu VI

System sekrecji typu VI charakteryzuje się bardziej złożoną budową w porównaniu do systemu sekrecji typu V [40]. Operon kodujący aparat sekrecji SSTVI w zależności od gatunku może składać się z różnej liczby genów. Podstawowy zestaw białek, określane jako komponent rdzeniowe, kodowany jest przez trzynaście genów. Białka te są wymagane do powstania funkcjonalnego systemu. Poza komponentem rdzeniowym, operon SSTVI często wyposażony jest w dodatkowe geny kodujące białka pomocnicze, które mogą pełnić 3 podstawowe funkcje: 1) są składnikami niezbędnymi do właściwej syntezy aparatu sekrecyjnego SSTVI, 2) są składnikami regulującymi – działającymi na etapie transkrypcji lub posttranskrypcyjnie – ekspresję genów

lub aktywność SSTVI oraz 3) są efektorami SSTVI lub białkami immunoprotekcyjnymi [29, 123].

Białka tworzące główny rdzeń (core) SSTVI określa się terminem Tss (Type six secretion), natomiast dla podjednostek akcesoryjnych wykorzystano termin Tag (Type six associated gene) [90]. Geny komponentu rdzeniowego (*TssA-M*) odnajduje się w genomach 25% wszystkich znanych bakterii Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem proteobakterii. Loci genów SSTVI mogą tworzyć dodatkowe filogenetyczne sub-klassy. Wyodrębniono klaster występujący w genomach proteobakterii (TVIS<sup>I</sup>), klaster charakterystyczny dla rodzaju *Francisella* (TVIS<sup>II</sup>) oraz typu Bacterioidetes (TVIS<sup>III</sup>). Geny *tssE*, *tssG*, *tssJ* i *tssH* nie posiadają homologów w TVIS<sup>II</sup>, natomiast w TVIS<sup>III</sup> nie występują odpowiedniki *tssA*, *tssJ*, *tssM* i *tssL*. Najlepiej scharakteryzowanym jest klaster typu TVIS<sup>I</sup> [55]. Geny *tssA-M* dodatkowo dzieli się na następujące grupy: pierwsza (*tssA-I*) koduje białka tworzące strukturę podobną do ogonka bakteriofaga wraz ze strukturą przypominającą płytkę podstawną. Odpowiada ona za wprowadzenie efektora do zaatakowanej komórki. Drugą grupą są białka kodowane przez geny *tssI-M*, te budują podstawowy kompleks błonowy [20, 123] (Ryc. 2).

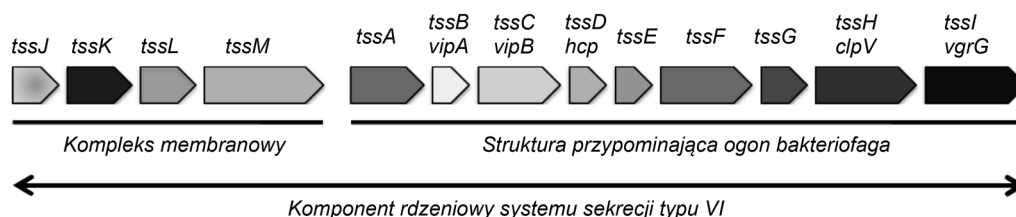
Jedną ze składowych aparaty SSTVI wchodzących w skład struktury przypominającej ogonek bakteriofaga jest białko TssD określane również jako Hcp (Haemolysin coregulated protein). Białko to zostało opisane po raz pierwszy w 1996 roku, a brak sekwencji sygnałowych w jego strukturze pozwolił na zaproponowanie nowego mechanizmu sekrecji protein [20, 82]. Sekrecja białka Hcp zależna jest od pozostałych białek kodowanych przez geny SSTVI. Białko Hcp tworzy heksametryczną strukturę przyjmującą pierścień o średnicy wewnętrznej równej 4,0 nm oraz zewnętrznej równej 8,5 nm [82]. Heksametry Hcp posiadają zdolność do tworzenia struktur przypominających nanotuby, poprzez które białka efektorowe SSTVI dostarczane są do wnętrza atakowanej komórki. Nanotuba stanowi również ważne białko opiekuńcze dla efektorów SSTVI, zapewniając ochronę przed degradacją [90].

Białka Hcp stanowią środek transportu toksyn i jednocześnie same ulegają sekrecji do wnętrza atakowanej komórki. Dzięki temu w wielu przypadkach wykazują dodatkowe funkcje biologiczne [79, 82], m.in. mogą stanowić białka efektorowe [90]. Nanotuby składające

się z heksametrów są strukturalnie podobne do głównych białek ogonka bakteriofaga  $\lambda$ , a ich wewnętrzne i zewnętrzne średnice są niemalże identyczne jak tuba ogonka u faga T4. Hcp wykazują również podobieństwo sekwencji aminokwasowej do produktu genu 19 (gene product 19, gp19) faga T4 [58]. Białka gp19 polimeryzując tworzą kanał, przez który bakteriofag dostarcza swoje DNA do wnętrza komórki bakteryjnej [24]. Podobnie wewnętrzny pierścień heksametrów Hcp wiąże białka efektorowe SSTVI [114].

Jak wspomniano powyżej, białka Hcp nie stanowią jedynie elementu budującego aparat systemu sekrecji typu VI, ale są również wydzielane przez wszystkie bakterie posiadające SSTVI do wnętrza komórki atakowanej [80]. Z jednej strony białka Hcp pełnią jedynie funkcje receptorów i białek opiekuńczych dla toksycznych produktów operonów. Taki mechanizm obserwowany jest m.in.: w przypadku *P. aeruginosa* i białka Hcp kodowanych przez geny znajdujące się w obrębie pierwszej genomowej wyspy HSI. *P. aeruginosa* posiada trzy takie wyspy, których geny kodują białka Hcp ulegające sekrecji (Hcp secretion island I, HSI-I) i umożliwiają sekrecję przynajmniej trzech toksycznych białek efektorowych określanymi jako Tse1-3 (Type VI Secretion Exportem 1-3) [100]. Z drugiej strony, wiele bakterii, np. należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, posiada w swoim genomie geny kodujące białka Hcp będące w fuzji z toksyczną domeną znajdującą się na ich końcu C (Hcps with C-terminal Extension Toxins, Hcp-ET). Takiego typu toksyny nazwano „evolved” Hcp („przedłużonymi” Hcp) i przypisuje im się m.in.: aktywność DNazy lub fosfolipazy [64].

System sekrecji typu VI angażuje również struktury o dużym podobieństwie do struktur charakterystycznych dla ogonków bakteriofagów takich jak białka gp18, które stanowią osłonę dla białek gp19. Białka te kurcząc się umożliwiają wysunięcie się tuby ogonka i wprowadzenie DNA faga do komórki atakowanej bakterii [24]. Strukturami systemu sekrecji typu VI posiadającymi wysokie podobieństwo do osłonki ogonka fagowego są struktury tworzone przez białka VipA oraz VipB (TssB oraz TssC) [101]. Struktura powstająca z białek VipA/B ma średnicę rzędu 10 nm, co umożliwia ukrycie się w niej nanotuby Hcp [82]. Struktura VipA/B umożliwia nanotubie Hcp przebicie się przez błonę zaatakowanej komórki. Struktura VipA/VipB



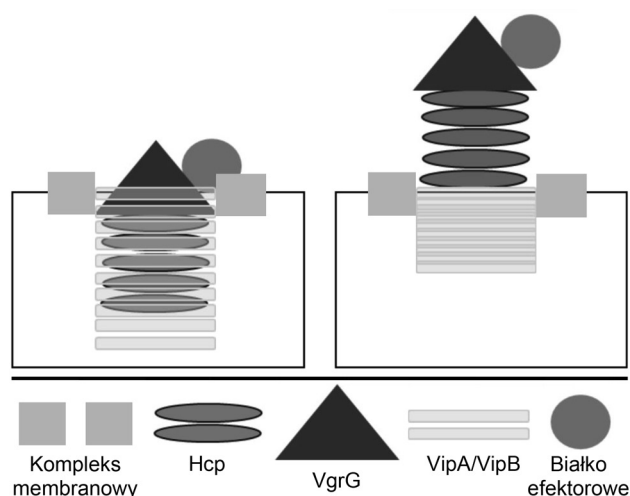
Ryc. 2. Klaster 13 genów wschodzących w skład komponentu rdzeniowego systemu sekrecji typu VI

ulega rozpadowi z udziałem białka ClpV (kodowanego przez gen *tssH*). Białko to wykazuje funkcję ATPazy AAA+ (ATPase Associated with diverse cellular Activities, ATPaza związana ze zróżnicowaną aktywnością komórkową) [23, 15]. Jak wskazują Bröms wraz ze wsp. (2013) oddziaływania pomiędzy białkami VipA oraz VipB umożliwiające powstanie funkcjonalnej osłonki dla nanotuby Hcp odgrywają kluczową rolę w aktywności systemu sekrecji typu VI [23].

Kolejnym ważnym elementem systemu sekrecji typu VI składającym się na strukturę przypominającą ogon bakteriofaga jest proteina TssI, nazywana również VgrG (Valine-glycine repeat G). Posiada ona domeny podobne do domen białek gp27 i gp5 budujących centrum płytki podstawowej ogonka faga T4 [15]. Proteina VgrG stanowi zakończenie nanotuby Hcp i umożliwia bakterii atakującej przebicie ściany komórkowej [98]. Domena VgrG podobna do białka gp5 posiada sztywną i  $\beta$ -skreconą helikalną strukturę, formującą element przypominający igłę [41]. W wielu przypadkach zaobserwowano, że na „igłę” VgrG zakotwiczone może być dodatkowa proteina posiadająca domenę PAAR, będąca toksycznym efektem [99, 41, 22, 28]. W takim przypadku mowa jest o VgrG, które stanowią białka opiekuńcze właściwych efektorów SSTVI [80]. Dodatkowo, analogicznie jak w przypadku Hcp, wyodrębniono „evolved” VgrG z toksyczną domeną na końcu C [80]. Przykładem „evolved” VgrG są dwa białka syntetyzowane przez szczep *Agrobacterium tumefaciens* C58, które z dużą specyficznością kontrolują sekrecję dwóch toksycznych efektorów wykazujących aktywność DNazy (Type VI DNase Effectors, Tde): Tde1 oraz Tde2 [22].

Dodatkowymi elementami budującymi płytkę podstawową występującą w aparacie systemu sekrecji typu VI, są białka TssEFG. Białka te rekrutowane są przez białko TssK do kompleksu membranowego TssJLM [75]. Kompleks membranowy jest ewolucyjnie zbliżony do subkompleksu związanego z systemem sekrecji typu IVb i składa się z trzech konserwatywnych domen: błonowej lipoproteiny TssJ oraz białek TssL i TssM zakotwiczonych w ścianie komórkowej [76]. Biogeneza aparatury SSTVI rozpoczyna się formowaniem kompleksu membranowego TssJLM [75]. Białko TssM jest ATPazą należącą do rodziny IcmF (Intraellular Multiplication Protein F). Występujący w tym białku motyw Walkera A jest niezbędny w procesie hydrolizy ATP przez TssM, co zapewnia energię dla oddziaływań białka Hcp z TssL (białko to należy do rodziny ImcH/DotU) oraz jego sekrecji [67].

Podobnie jak w przypadku CDI, również aktywność efektorów systemu sekrecji typu VI jest hamowana poprzez białka immunoprotekcyjne. Przykładem mogą być opisywany już powyżej efektor Tse2 wykorzystywany przez *P. aeruginosa*. Efektor ten działa jako



Ryc. 3. Schemat budowy aparatury systemu sekrecji typu VI. Białka Hcp oraz VgrG tworzą strukturę podobną do ogonka bakteriofaga, która poprzez skurcze struktury VipA/VipB może zostać translokowana do wnętrza innej komórki. Do białka VgrG przyłączone może być dodatkowe białko efektorowe.

inhibitor proliferacji komórek, a jego aktywność jest hamowana przez wysoce stabilne wiązanie się białka immunoprotekcyjnego Tsi2 (Type VI Secretion Immunity 2) [61]. Obecność pary toksyna/białko immunoprotekcyjne stwierdzono również dla takich gatunków jak *V. cholerae* [31, 51,], *P. mirabilis* [4] czy *Pseudomonas protegens* [115]. Schematyczne przedstawienie aparatury SSTVI zaprezentowano na rycinie 3.

### 3.2. Efekторы systemu sekrecji typu VI

Różnorodność efektorów SSTVI jest znacznie większa niż w przypadku systemu CDI. Efekторы można podzielić na takie, które stanowią mechanizm konkurencji bakteryjnej oraz na wywierające wpływ na organizmy eukariotyczne [2, 29]. Dodatkowo efekторы transportowane przez ten system opisuje się jako efekторы wyspecjalizowane (specialized effectors) – opisywane już „evolved” Hcp oraz VgrG, a także takie efekторы, które oddziałują bezpośrednio z Hcp i/lub VgrG, często poprzez domenę PAAR (cargo effectors) [35]. Ze względu na mechanizm działania opisano cztery główne klasy efektorów oraz blokujących je białek immunoprotekcyjnych: 1) efekторы o aktywności amidazy Tae (Type VI amidase effectors) oraz immunoproteiny Tai (Type VI amidase immunity), 2) efekторы o aktywności hydrolazy glikozydowej Tge (Type VI glycoside hydrolase effectors) wraz z immunoproteinami Tgi (Type VI glycoside hydrolase immunity) – celem działania dla obu powyższych grup jest peptydoglikan, 3) efekторы o aktywności lipazy Tle (Type VI lipase effectors), które hydrolizują fosfolipidy w błonie komórkowej, wraz z białkami protekcyjnymi Tli (Type VI lipase

immunit), 4) oraz efektory o aktywności DNazy Tde (Type VI DNase effectors) oraz ich immunoproteiny Tdi (Type VI DNase immunity) [35].

Jedną z toksyn należących do grupy Tae jest wspomniany powyżej efektor Tse1 kodowany w genomie *P. aeruginosa* w obrębie pierwszej wyspy kodującej białka Hcp ulegających sekrecji. Tse1 jest amidazą rozpoznającą specyficznie kwas  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelinowy (D-Glu-*m*DAP). Miejsce aktywne Tse1 jest łatwo dostępne i enzym wykazuje działanie *in vitro*. W badaniach *in vivo* wykazano, że enzym ten jest bardziej aktywny względem bakterii Gram-ujemnych niż bakterii Gram-dodatnich [91, 27]. Kolejne toksyny należące do grupy Tae, których aktywność enzymatyczna skierowana jest wobec peptydoglikanu – białka Ssp1 oraz Ssp2, produkowane są przez oportunistyczny patogen człowieka *Serratia marcescens*. Oba białka hamowane są przez proteiny immunoprotekcyjne kodowane przez geny *rap* znajdujące się w otoczeniu genów kodujących same toksyny [32].

Aktywność kolejnej z grup efektorów SSTVI, Tge, wykazano na przykładzie szczepu należącego do gatunku *P. protegens* [115]. Antybakteryjny efekt tego typu efektora skierowany może być w przypadku *P. protegens* m.in. wobec *Pseudomonas putida*. Dodatkowo struktura kompleksu efektora z właściwym dla niego białkiem immunoprotekcyjnym otrzymana z wykorzystaniem NMR pokazuje, że aktywność enzymatyczna hamowana jest poprzez wiązanie immunoproteiny do miejsca aktywnego [115]. Również wspomniana wcześniej toksyna Tse3 należy do grupy toksyn Tge i wykazuje aktywność mureidazy [91].

Przykładami toksyn zaliczanych do Tle mogą być enzymy należące do grup PLA<sub>1</sub> oraz PLA<sub>2</sub>, kolejno o aktywności fosfolipazy A<sub>1</sub> oraz A<sub>2</sub>. Toksyny Tle są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii patogennych. Kolejnym przykładem takiego efektora jest PldA syntetyzowana przez *P. aeruginosa*. Białko to jest efektoorem systemu sekrecji typu VI, którego składowe kodowane są na drugiej wyspie białek Hcp ulegających sekrecji [92]. Enteroagregacyjne szczepy *E. coli* mogą syntetyzować toksynę Tle1 o aktywności fosfolipazy typu A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>, która stanowi efektor wykorzystywany w konkurencji z innymi bakteriami. Aktywność efektora Tle1 hamowana jest przez immunoproteinę Tli1 poprzez tworzenie kompleksów w stosunku 1:1. Transport Tle1 możliwy jest poprzez interakcje białka z końcem C VgrG1, które posiada domenę podobną do transtyretyny [33].

Efektory należące do Tde zostały po raz pierwsze opisane przez Ma i wsp. (2014) na przykładzie szczepu *A. tumefaciens* C58 [66]. Efektor ten wykazuje aktywność DNazy i zapewnia szczepom *A. tumefaciens* przewagę zarówno w konkurencji wewnątrz-, jak i międzygatunkowej. Aktywność nukleolityczna wynika z obecności motywu HxxD i jest hamowana przez spe-

cyficzne białko immunoprotekcyjne, Tdi. Dodatkowo powyższą toksynę charakteryzuje brak istotnej homologii do innych bakteryjnych DNaz [66].

Toksyną wydzielaną przez SSTVI nie należącą do żadnej z wymienionych wyżej grup jest toksyna Tne2 o aktywności NADazy (Type VI NADase effector). Toksyna ta jest jedną z dwóch syntetyzowanych przez szczep *P. protegens* – pierwszą jest RhsA wykazująca aktywność nukleolityczną. Toksynie Tne2 odpowiada specyficzne białko immunoprotekcyjne. Co znamienne, geny kodujące toksyny o aktywności NADazy są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród bakterii Gram-ujemnych, jak i wśród bakterii Gram-dodatnich. W drugim przypadku sekrecja toksyn odbywa się z udziałem systemu sekrecji typu VII, który jest charakterystyczny dla bakterii Gram-dodatnich [104].

Kolejnym przykładem efektorów SSTVI są toksyny RHS (Rearrangement hotspot). Toksyny te są szeroko rozpowszechnione wśród bakterii Gram-ujemnych. Geny je kodujące odnaleźć można w genomach takich gatunków jak *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* i in. [56, 54, 65]. Podobnie jak białko CdiA, również toksyny RHS składają się z konserwatywnego końca N, w skład którego wchodzi powtórzenie YD definiujące przedstawioną grupę efektorów oraz końca C stanowiącego domenę toksyczną. Pomiędzy tymi regionami występuje konserwatywny motyw PxxxxDPxGL. Aktywność toksycznej domeny końca C hamowana jest przez swoiste białko immunoprotekcyjne [54]. Badania przeprowadzone przez Alcoforado Diniza i wsp. na przykładzie *S. marcescens* wskazują, że toksyny RHS stanowią główny efektor systemu sekrecji warunkujący wewnątrzgatunkową konkurencję bakteryjną. *Serratia marcescens* Db10 syntetyzować może co najmniej dwie toksyny należące do grupy RHS (Rhs1 oraz Rhs2). Białko Rhs2 jest DNazą, natomiast w przypadku Rhs1 wykazano obecność toksycznej domeny o nieznanym mechanizmie działania [1]. Białka RHS bardzo często posiadają również domenę PAAR, która umożliwia rozpoznanie toksyny przez system sekrecji typu VI, jej związania do VgrG oraz translokację do wnętrza komórki atakowanej [65].

Jednym z czynników regulujących działanie SSTVI jest Quorum Sensing [101]. Na przykładzie *B. thailandensis* wykazano, że szczepy posiadające mutację w receptorach autoinduktorów QS wykazują zmniejszoną ekspresję efektorów SSTVI oraz białek immunoprotekcyjnych, czego rezultatem jest zatrzymanie ich proliferacji w trakcie hodowli w obecności szczepów rodzicielskich posiadających w pełni funkcjonalny system QS [68]. W przypadku *V. cholerae* C6706 SSTVI pozostaje pod kontrolą QS oraz globalnego regulatora TsrA – mutacje w genach *tsrA* oraz *luxO* wywołują zwiększoną ekspresję genów kodujących elementy strukturalne aparatury SSTVI. Efekt ten jest zależny

od regulatora HapR, który wiąże się do regionu promotorowego genów kodujących składowe SSTVI [122].

Co ciekawe QS może regulować ekspresję różnych kopii klastrów kodujących SSTVI w różnym stopniu, co ma miejsce m.in. w przypadku szczepu *P. aeruginosa* PAO1. Szczep ten posiada trzy klastry genów SSTVI (H1-3). Klaster H1 koduje opisane wcześniej toksyny Tse1-3 [48]. Jak wykazano, geny klastra H2 ulegają zwiększonej ekspresji (regulowanej systemami QS typu Las i Rhl) w trakcie przechodzenia z fazy logarytmicznego wzrostu w fazę stacjonarną. Dodatkowo inhibicja ekspresji klastra H2 wywołwana jest w obecności jonów żelaza [96]. Wyniki wcześniejszych badań z zastosowaniem szczepu *P. aeruginosa* PA14 pokazują, że występujące w nim trzy klastry H1-3 kodujące SSTVI również są regulowane przez QS, jednak w odmienny sposób. W przypadku PA14, ekspresja H1 ulega supresji, natomiast ekspresja H2 oraz H3 jest zwiększona w wyniku działania regulatorów LasR oraz regulatora transkrypcyjnego MvfR [60]. Szczepy PAO1 oraz PA14 różnią się liczbą kopii genów kodujących elementy SSTVI [60], a specyficzna organizacja klastra H2 jest cechą charakterystyczną dla szczepu PA14 [48]. Warto nadmienić, że poszczególne kopie SSTVI u *P. aeruginosa* pozostają również pod kontrolą globalnych regulatorów RsmA oraz AmrZ [3].

Odmienna regulacja poprzez QS dwóch różnych klastrów genów SSTVI jest również obserwowana w przypadku *Vibrio parahaemolyticus*. Gatunek ten posiada klastry nazwane SSTVI1 (VP1386-1414) oraz SSTVI2 (VPA1024-1046). Ekspresja SSTVI1 jest zahamowana a SSTVI2 indukowana przez OpaR – regulator zależny od gęstości populacji [110]. Wyniki badań Zhang i wsp. (2011) pokazują, że SSTVI może być regulowany również przez warunki środowiskowe. Na przykładzie *Yersinia pseudotuberculosis*, która posiada w swoim genomie 4 klastry genów SSTVI, wykazano ich różną termoregulację, przy czym jedynie ekspresja klastra SSTVI4 była pozytywnie regulowana w temperaturze 26°C. Dodatkowo dochodziło do podwyższonej ekspresji tego klastra w odpowiedzi na działanie syntetaz laktonów homoseryny YpsI oraz YtbI. Wnioski takie wysnuto na podstawie wykorzystania szczepów noszących delecję genów kodujących powyższe syntetazy, przy czym wpływ delecji genu *ypsI* był silniejszy w porównaniu do delecji genu *ytbI* [121]. System sekrecji typu VI kontrolowany przez laktony homoseryny opisano także w przypadku szczepu *Aeromonas hydrophila* SSU [50].

Czynnikiem warunkującym konkurencję międzygatunkową opartą na SSTVI może być środowisko wzrostu, co zaprezentowano na przykładzie eksperymentów ze szczepem *P. aeruginosa* w konkurencji ze szczepem *A. tumefaciens*. W warunkach laboratoryjnych szczepem dominującym był *P. aeruginosa*, zaś w warunkach

imitujących środowisko naturalne dominował *A. tumefaciens* [49]. System sekrecji typu VI regulowany jest również poprzez samą obecność konkurentów. Badania Lazzaro i wsp. pokazują, że szczep *S. marcescens* Db10 dostosowuje poziom ekspresji genów SSTVI do potencjału konkurentów. Ekspresja jest nasiloną w obecności silnych konkurentów i wyciszana w sytuacji względnej równowagi pomiędzy konkurentami [57].

Ciekawe wyniki badań przedstawił również Weber wraz z wsp. (2009). Na przykładzie szczepu *Vibrio anguillarum* NB10 wykazali, że białka SSTVI mogą pośrednio regulować ekspresję proteaz EmpA oraz PrtV co wynikało z bezpośredniego, pozytywnego wpływu na ekspresję regulatora odpowiedzi na stres – RpoS – oraz regulatora systemu QS – VanT [112].

#### 4. Przynależność do systemu polimorficznych toksyn

Systemy sekrecji typu Vb i typu VI, warunkujące konkurencję wymagającą kontaktu można przypisać do tzw. systemów polimorficznych toksyn (Polymorphic Toxin Systems, PTS) – stosunkowo niedawno wyodrębnionej grupy białkowych toksyn antybakteryjnych. O przynależności danej toksyny do PTS decydują następujące czynniki:

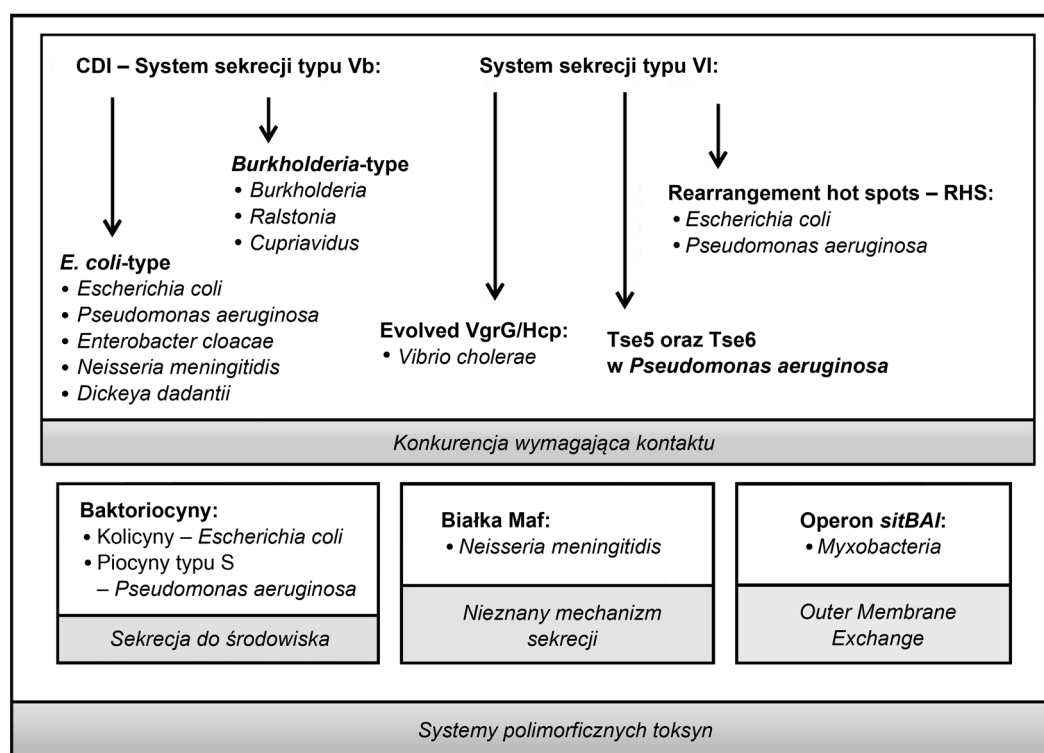
- 1) Homologiczna budowa: toksyny należące do PTS składają się z dwóch części: końca aminowego oraz końca karboksylowego, który stanowi właściwą toksynę. Oba fragmenty są oddzielone od siebie konserwatywnym motywem aminokwasowym. Koniec aminowy jest fragmentem o wysokim stopniu podobieństwa filogenetycznego i często odgrywa on rolę w transporcie regionu toksycznego, który jest silnie zróżnicowany pomiędzy poszczególnymi gatunkami, ale również pomiędzy szczepami.
- 2) Obecność białka stanowiącego immunoproteinę: białko takie powoduje inhibicję toksyny, chroni w ten sposób komórkę przed autoinhibicją, ale również przed działaniem toksyny wprowadzonej przez drugą komórkę należącą do tego samego gatunku/szczepu. Immunoproteina stanowi inhibitor jedynie dla specyficznej dla siebie toksyny. Zróżnicowanie międzygatunkowe białek protekcyjnych odpowiada zróżnicowaniu toksyn [120, 46].

Do grupy polimorficznych toksyn zalicza się toksyny CdiA, a także niektóre efekторы wydzielane przez system sekrecji typu VI – RHS oraz „evolved” Hcp/VgrG. Innym przykładem PTS są produkty obecnych w genomie rodzaju *Neisseria* genów *maf* (multiple adhesin family) [46]. Geny *maf* znajdują się w obrębie wyspy patogeniczności IHT-G (Island of Horizontally Transferred DNA-G). Wykazano, że gen *mafB* koduje funkcjonalnie aktywną toksynę. Toksyna ta posiada

aktywność rybonukleazy EndoU. Gen znajdujący się bezpośrednio za *mafB* – *mafI* – koduje białko immunoprotekcyjne. Toksyna MafB jest specyficzna dla rodzaju *Neisseria*. Cechą charakterystyczną tego systemu, jest to, że białko MafB ma strukturę globularną. Dodatkowy gen, *mafA*, kodujący wbudowaną w błonę zewnętrzną lipoproteinę, jest często odnajdywany przed genem kodującym toksynę MafB. Jego funkcja nie została dotychczas określona. Sekwencja nukleotydowa tego genu nie posiada podobieństwa do sekwencji nukleotydowych genów innych systemów sekrecji [44, 45]. Podobnie dla rodzaju *Myxobacteria* opisano klastery genów kodujących toksyny z grupy PTS. Są to toksyny transportowane pomiędzy komórkami poprzez wymianę poprzez błonę zewnętrzną (Outer Membrane Exchange, OME). Klastery te nazwano *sitBAI*. Białko SitA jest polimorficzną toksyną, której aktywność hamuje SitI. SitB pełni funkcję białka pomocniczego, odgrywa znaczącą rolę w funkcjonowaniu SitA. Toksyczna domena białka SitA zlokalizowana jest na C końcu proteiny [108]. Polimorficzne toksyny mogą również wykazywać działanie „na odległość”, tzn. zostają one wydzielone do środowiska bytowania bakterii i dyfundują w nim. Wymienić tu można bakteriocyny: kolicyny (colicins) oraz rozpuszczalne piocyny (Soluble piocins, S-piocins) [120, 46] (Ryc. 4).

## 5. Znaczenie systemów konkurencji w biologii bakterii

Szczep *E. coli* EC93 efektywnie wykorzystuje system CDI jako mechanizm zapewniający mu przewagę w konkurencji wewnątrzgatunkowej. Szczep ten jest głównym izolatem z kału szczurów [10]. Sugeruje się, że system CDI służy do eliminacji konkurujących komórek. Jednak dotyczy to jedynie pokrewnych szczepów [89] i jak dotąd nie wykazano by CDI miało znaczenie w konkurencji międzygatunkowej. Na przykładzie *B. thailandensis* zaobserwowano że, warunkowana przez system CDI konkurencja oraz dyskryminacja krewniacza reguluje strukturę biofilmu [7]. Badania pokazują również, że CDI może kształtować strukturę biofilmu w sposób niezależny od procesów hamowania wzrostu [37, 88], poprzez wywoływanie agregacji komórek wykazujących ekspresję genów kodujących identyczne białka CdiA [88]. Wykazano, że także białko BcpA warunkuje współdziałanie komórek [37], a klastery genów *bcpAIOB* jest mediatorem komunikacji komórkowej [38]. Podobne obserwacje poczyniono na przykładzie *P. aeruginosa*, bakterii posiadającej dwie kopie genów kodujących białka systemu CDI. Wprawdzie badania wykazały, że ekspresja żadnej z nich nie jest powiązana z pierwszymi etapami biogenezy bio-



Ryc. 4. Systemy polimorficznych toksyn

Efektory systemu CDI oraz SSTVI należą do grupy polimorficznych toksyn, które charakteryzują się homologiczną budową oraz występowaniem w komórkach białka immunoprotekcyjnego. Do działania efektorów CDI oraz SSTVI wymagany jest bezpośredni kontakt komórek, a wymiana następuje z zastosowaniem aparatu sekrecji tych systemów. Choć toksyny kodowane przez operon *sitBAI* również wymieniane są w wyniku kontaktu komórek, sekrecja zachodzi według mechanizmu Outer Membrane Exchange. Bakteriocyny wydzielane są do środowiska. Mechanizm sekrecji toksyn z rodziny Maf jest nieznan.

filmu, jak to ma miejsce w przypadku rodzaju *Escherichia* oraz *Burkholderia*, jednak odgrywają one rolę w konkurencji bakteryjnej – umożliwiają wykluczenie szczepów niespokrewnionych, co wykazano na modelu konkurencji szczepów delecyjnych ze szczepem dzikim. Co istotne, badania nad CDI w przypadku *P. aeruginosa* po raz pierwszy pokazały, że system ten stanowi czynnik wirulencji istotny w procesach infekcji dróg oddechowych [70]. Pytanie o rolę CDI w biologii bakterii nadal pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi. Najnowsze badania z wykorzystaniem szczepu *E. coli* EC93 wskazują na istotne znaczenie klastra *cdiBAI* w stabilizacji elementu genetycznego – plazmidu koniugacyjnego. Plazmid, który w warunkach naturalnych zanikał po zająciu ok. 50 podziałów komórkowych, utrzymywał się w 60% komórek z populacji szczepu EC93 przez dwukrotnie dłuższy okres po wbudowaniu do niego genów *cdiBAI* [86].

Liczne doniesienia wskazują, że SSTVI jest elementem bakteryjnej konkurencji, zarówno wewnątrz-, jak i międzygatunkowej [2, 26, 62, 81, 92]. Fakt, że SSTVI efektywnie dostarcza toksyczne efekторы pomiędzy komórkami różnych szczepów wynikać może z tego, że w przeciwieństwie do CDI, system ten nie wymaga powierzchniowego receptora do translokacji toksyn. Z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej Gerc i wsp. badali dynamikę biosyntezy aparatury SSTVI na przykładzie *S. marcescens* Db10. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że atak z zastosowaniem SSTVI nie wymaga wcześniejszej indukcji kontaktem komórek [39]. Takie obserwacje wskazują na istotę SSTVI w konkurencji o kolonizację niszy ekologicznej. Należy jednak mieć na względzie, że wykorzystanie SSTVI stanowi dla komórki wysoki koszt, przez co m.in. staje się ona bardziej wrażliwa na atak ze strony konkurujących komórek [59].

Podobnie jak CDI, także SSTVI nie jest jedynie prostym systemem konkurencji ale dodatkowo odgrywa ważną rolę w socjobiologii bakterii oraz w zjawisku dyskryminacji krewniaczej. Badania z zastosowaniem modeli matematycznych w połączeniu z eksperymentami *in vitro* wskazują, że konkurencja bakteryjna oparta na SSTVI w znacznym stopniu modeluje wzajemne oddziaływania komórek i stanowić może ważny mechanizm, który w sposób pośredni – poprzez eliminację niespokrewnionych szczepów – prowadzi do rozwoju współdziałania komórek krewniaczych [69]. System sekrecji typu VI zaangażowany jest także w powstawanie i dojrzewanie biofilmu bakteryjnego oraz w komunikację pomiędzy komórkami w biofilmie, co zaprezentowana na przykładzie szczepu *P. fluorescens* MFE01 [36] oraz w przypadku szczepu *Acidovorax citrulli* xjl12, gdy zaobserwowano, że obecność i funkcje genów kodujących rdzeń SSTVI wpływają na tworzenie biofilmu [105].

Ciekawym przykładem dyskryminacji krewniaczej warunkowanej przez SSTVI jest fenomen Dienesza szczepów *P. mirabilis* [113]. Zjawisko to polega na tworzeniu w trakcie ruchu rozpełzłego makroskopowej linii granicznej, nazywanej linią demarkacyjną, pomiędzy niespokrewnionymi szczepami *P. mirabilis*. Rozpoznanie pokrewieństwa między szczepami wynika z zależnej od SSTVI wymiany białka IdsD, kodowanego przez operon *idsABCDEF*. Białko to po wnikięciu do cytoplazmy może tworzyć kompleksy z IdsE, co stanowi informację o pokrewieństwie szczepów. Szczepy niespokrewnione – takie, dla których nie dochodzi do powstania kompleksu IdsDE, konkurują ze sobą [25, 93]. Możliwym efektem konkurencji są białka kodowane przez operon *idrABCDE*, które również są transportowane przez aparaturę SSTVI [94, 113]. Białka Ids oraz Idr stanowią przykład niekanonicznych efektorów SSTVI, co sugeruje szeroki zakres możliwości działania SSTVI. Jak wykazano, w konkurencję pomiędzy szczepami *P. mirabilis* tworzącymi linię demarkacyjną zaangażowany jest także tzw. pierwotny operon efektora *hcp-vgrG* (Primary *hcp-vgrG* Effector operon, PEF), którego aktywność hamowana jest przez specyficzne białko immunoprotekcyjne [4, 5]. Sugeruje to, że zjawisko Dienesza najprawdopodobniej warunkowane jest wieloma niezależnymi mechanizmami.

## 6. Podsumowanie

System inhibicji wzrostu zależnej od kontaktu (CDI) oraz system sekrecji typu VI (SSTVI) warunkują konkurencję bakteryjną i zjawisko dyskryminacji krewniaczej wśród bakterii Gram-ujemnych. Co istotne, pomimo licznych podobieństw strukturalnych i homologicznej funkcji biologicznej, molekularne podstawy działania obu systemów są wyraźnie różne. Zastanawiająca jest również przynależność obu tych systemów do grupy polimorficznych toksyn, które wydają się być ewolucyjnie pokrewne. Szerokie występowanie obu systemów, obecność wielu typów toksycznych efektorów oraz specyficznych względem nich immunoprotein, ale także fakt, że poszczególne gatunki, a nawet szczepy, wykazują ekspresję (będącą pod ścisłą kontrolą licznych czynników) obu systemów sugeruje, że powyższe mechanizmy odgrywają ogromną rolę w socjobiologii bakterii. Dotychczas prowadzone badania skupiały się w głównej mierze na wyjaśnieniu mechanizmów działania CDI oraz SSTVI, a pytanie o ich populacyjne znaczenie nadal pozostaje bez odpowiedzi. Ciekawym kierunkiem wydają się być badania zmierzające do wyjaśnienia hierarchii działania i potencjału obu systemów w układach z zastosowaniem dużych populacji, wykraczających poza dotychczas badane układy mutant-szczep rodzicielski lub dwa konkurujące



szczypty/gatunki. Taki kierunek wpisuje się w rosnące w ostatnim czasie zainteresowanie populacją bakteryjną rozumianą jako ściśle zależną od siebie „społeczność komórek”. Niewykluczona jest również możliwość praktycznego zastosowania wiedzy zdobytej z badania powyższych zależności, m.in. przy projektowaniu nowych metod detekcji i różnicowania drobnoustrojów oraz metod ich eradykacji, które mogłyby zastąpić coraz mniej skuteczne antybiotyki.

#### Podziękowania

Artykuł finansowany ze środków BS UJK nr 612 529.

#### Piśmienictwo

- Alcoforado Diniz J., Coulthurst S.J.: Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *J. Bacteriol.* **197**, 2350–2360 (2015)
- Alcoforado Diniz J., Liu Y.C., Coulthurst S.J.: Molecular weaponry: Diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cell. Microbiol.* **17**, 1742–1751 (2015)
- Allsopp L.P., Wood T.E., Howard S.A., Maggiorelli F., Nolan L.M., Wettstadt S., Filloux A.: RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 7707–7712 (2017)
- Alteri C.J., Mobley H.L.T. i wsp.: Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003608 (2013)
- Alteri C.J., Himpfl S.D., Zhu K., Hershey H.L., Musili N., Miller J.E., Mobley H.L.T.: Subtle variation within conserved effector operon gene products contributes to T6SS-mediated killing and immunity. *PLoS Pathogens*, **13**, e1006729 (2017)
- Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: The *Burkholderia bcpA-IOB* genes define unique classes of two-partner secretion and contact dependent growth inhibition systems. *PLoS Genetics*, **8**, e1002877 (2012)
- Anderson M.S., Garcia E.C., Cotter P.A.: Kind discrimination and competitive exclusion mediated by contact-dependent growth inhibition systems shape biofilm community structure. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004076 (2014)
- Aoki S.K., Diner E.J., de Roodenbeke C.T., Burgess B.R., Poole S.J., Braaten B.A., Low D.A.: A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature*, **468**, 439–442 (2010)
- Aoki S.K., Low D.A. i wsp.: Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein Bama (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol. Microbiol.* **70**, 323–340 (2008)
- Aoki S.K., Pamma R., Hernday A.D., Bickham J.E., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, **309**, 1245–1248 (2005)
- Aoki S.K., Poole S.J., Hayes C.S., Low D.A.: Toxin on a stick: modular CDI toxin delivery systems play roles in bacterial competition. *Virulence*, **2**, 356–359 (2011)
- Aoki S.K., Webb J.S., Braaten B.A., Low D.A.: Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 1777–1786 (2009)
- Bandara H.M., Yau J.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranyake L.P.: *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.* **10**, DOI:10.1186/1471-2180-10-125 (2010)
- Bandara H.M.H.N., Yau J.Y., Watt R.M., Jin L.J., Samaranyake L.P.: *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1623–1631 (2009)
- Basler M.: Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, DOI:10.1098/rstb.2015.0021 (2005)
- Batot G., Goulding C.W. i wsp.: The CDI toxin of *Yersinia kristensenii* is a novel bacterial member of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5013–5025 (2017)
- Beck C.M., Diner E.J., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: The F pilus mediates a novel pathway of CDI toxin import. *Mol. Microbiol.* **93**, 276–290 (2014)
- Beck C.M., Morse R.P., Cunningham D.A., Iniguez A., Low D.A., Goulding C.W., Hayes C.S.: CdiA from *Enterobacter cloacae* delivers a toxic ribosomal RNase into target bacteria. *Structure*, **22**, 707–718 (2015)
- Beck C.M., Willett J.L.E., Cunningham D.A., Kim J.J., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors from uropathogenic *Escherichia coli* use heterotrimeric osmoporins as receptors to recognize target bacteria. *PLoS Pathogens*, **12**, e1005925 (2016)
- Bingle L.E., Bailey C.M., Pallen M.J.: Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 3–8 (2008)
- Blango M.G., Mulvey M.A.: Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 177–181 (2009)
- Bondage D.D., Lin J.-S., Ma L.-S., Kuo C.-H., Lai E.-M.: VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3931–40 (2016)
- Bröms J.E., Ishikawa T., Wai S.N., Sjöstedt A.: A functional VipA-VipB interaction is required for the type VI secretion system activity of *Vibrio cholerae* O1 strain A1552. *BMC Microbiol.* **13**:96, DOI:10.1186/1471-2180-13-96 (2013)
- Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **65**, 167–176 (2011)
- Cardarelli L., Saak C., Gibbs K.A.: Two proteins form a heteromeric bacterial self-recognition complex in which variable subdomains determine allele-restricted binding. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00251-15 (2015)
- Carruthers M.D., Nicholson P.A., Tracy E.N., Munson R.S.: *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE*, **8**, e59388 (2013)
- Chou S., Bui N.K., Russell A.B., Lexa K.W., Gardiner T.E., LeRoux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system. *Cell Rep.* **1**, 656–664 (2012)
- Cianfanelli F.R., Alcoforado Diniz J., Guo M., De Cesare V., Trost M., Coulthurst S.J.: VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, **12**, e1005735 (2016)
- Coulthurst S.J.: The type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol.* **164**, 640–654 (2013)
- Diner E.J., Beck C.M., Webb J.S., Low D.A., Hayes C.S.: Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI). *Genes Dev.* **26**, 515–525 (2012)
- Dong T.G., Ho B.T., Yoder-Himes D.R., Mekalanos J.J.: Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2623–2628 (2013)
- English G., Trunk K., Rao V.A., Srikanthasan V., Hunter W.N., Coulthurst S.J.: New secreted toxins and immunity proteins encoded within the type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* **86**, 921–936 (2012)

33. Flaughnatti N., Journet L. i wsp.: A phospholipase A1 anti-bacterial type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* **99**, 1099–1118 (2016)
34. Foster K.R., Bell T.: Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.* **22**, 1845–1850 (2012)
35. Gallique M., Bouteiller M., Merieau A.: The type VI secretion system: A dynamic system for bacterial communication? *Front. Microbiol.* **8**, DOI:10.3389/fmicb.2017.01454 (2017)
36. Gallique M., Decoin V., Barbey C., Rosay T., Feuilloley M.G.J., Orange N., Merieau A.: Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. *PLoS ONE*, **12**, e0170770 (2017)
37. Garcia E.C., Anderson M.S., Hagar J.A., Cotter P.A.: *Burkholderia* BcpA mediates biofilm formation independently of inter-bacterial contact-dependent growth inhibition. *Mol. Microbiol.* **89**, 1213–1225 (2013)
38. Garcia E.C., Perault A.I., Marlatt S.A., Cotter P.A.: Interbacterial signaling via *Burkholderia* contact-dependent growth inhibition system proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8296–8301 (2016)
39. Gerc A.J., Diepold A., Trunk K., Porter M., Rickman C., Armitage J.P., Stanley-Wall N.R., Coulthurst S.J.: Visualization of the *Serratia* type VI secretion system reveals unprovoked attacks and dynamic assembly. *Cell Rep.* **12**, 2131–2142 (2015)
40. Green E.R., Meccas J.: Bacterial secretion systems – an overview. *Microbiol. Spectr.* **4**, DOI:10.1128/microbiolspec (2016)
41. Hachani A., Allsopp L.P., Oduko Y., Filloux A.: The VgrG proteins are “la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. *J. Biol. Chem.* **289**, 17872–17884 (2014)
42. Hayes C.S., Koskiniemi S., Ruhe Z.C., Poole S.J., Low D.A.: Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, DOI: 10.1101/cshperspect.a010025 (2014)
43. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B.: Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 15–25 (2010)
44. Jamet A., Jousset A.B., Euphrasie D., Mukorako P., Boucharlat A., Ducouso A., Charbit A., Nassif X.: A new family of secreted toxins in pathogenic *Neisseria* species. *PLoS Pathogens*, **11**, e1004592 (2015)
45. Jamet A., Nassif X.: Characterization of the Maf family of polymorphic toxins in pathogenic *Neisseria* species. *Microb. Cell*, **2**, 88–90 (2015)
46. Jamet A., Nassif X.: New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *mBio*, **6**, DOI:10.1128/mBio.00285-15 (2015)
47. Jones A.M., Garza-Sánchez F., So J., Hayes C.S., Low D.A.: Activation of contact-dependent antibacterial tRNase toxins by translation elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, DOI:10.1073/pnas.1619273114 (2017)
48. Jones C., Hachani A., Manoli E., Filloux A.: An *rhs* gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *J. Bacteriol.* **196**, 800–810 (2014)
49. Kapitein N., Mogk A.: Type VI secretion system helps find a niche. *Cell Host Microbe*, **16**, DOI:10.1016/j.chom.2014.06.012 (2014)
50. Khajanchi B.K., Sha J., Kozlova E.V., Erova T.E., Suarez G., Sierra J.C., Popov V.L., Horneman A. J., Chopra A.K.: N-acyl-homoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, **155**, 3518–3531 (2009)
51. Kirchberger P.C., Unterweger D., Provenzano D., Pukatzki S., Boucher Y.: Sequential displacement of type VI secretion system effector genes leads to evolution of diverse immunity gene arrays in *Vibrio cholerae*. *Sci. Rep.* **7**, DOI:10.1038/srep45133 (2017)
52. Konovalova A., Søgaard-Andersen L.: Close encounters: Contact-dependent interactions in bacteria. *Mol. Microbiol.* **81**, 297–301 (2011)
53. Koskiniemi S., Garza-Sánchez F., Edman N., Chaudhuri S., Poole S.J., Manoel C., Hayes C.S., Low D.A.: Genetic analysis of the CDI pathway from *Burkholderia pseudomallei* 1026b. *PLoS ONE*, **10**, e0120265 (2015)
54. Koskiniemi S., Lamoureux J.G., Nikolakakis K.C., t’Kint de Roodenbeke C., Kaplan M.D., Low D.A., Hayes C.S.: Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7032–7037 (2013)
55. Kube S., Wendler P.: Structural comparison of contractile nanomachines. *AIMS Biophysics*, **2**, 88–115 (2015)
56. Kung V.L., Khare S., Stehlik C., Bacon E.M., Hughes A.J., Hauser A.R.: An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1275–1280 (2012)
57. Lazzaro M., Feldman M.F., Vescovi E.G.: A transcriptional regulatory mechanism finely tunes the firing of Type VI Secretion System in response to bacterial enemies. *mBio*, **8**, DOI:10.1128/mBio.00559-17 (2017)
58. Leiman P.G., Basler M., Ramagopal U.A., Bonanno J.B., Sauder J.M., Pukatzki S., Burley S.K., Almo S.C., Mekalanos J.J.: Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4154–4159 (2009)
59. LeRoux M., Mougous J.D. i wsp.: Quantitative single-cell characterization of bacterial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 19804–19809 (2012)
60. Lesic B., Starkey M., He J., Hazan R., Rahme L.G.: Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology*, **155**, 2845–2855 (2009)
61. Li M., Le Trong I., Carl M.A., Larson E.T., Chou S., de Leon J.A., Dove S.L., Stenkamp R.E., Mougous J.D.: Structural basis for type VI secretion effector recognition by a cognate immunity protein. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002613 (2012)
62. Liu L., Ye M., Li X., Li J., Deng Z., Yao Y.-F., Ou H.-Y.: Identification and characterization of an antibacterial Type VI Secretion System in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front. Cellular Infect. Microbiol.* **7**, DOI:10.3389/fcimb.2017.00442 (2017)
63. Lyons N.A., Kraigher B., Stefanic P., Mandic-Mulec I., Kolter R.: A combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* **26**, 733–742 (2016)
64. Ma J., Pan Z., Huang J., Sun M., Lu C., Yao H.: The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*, **8**, DOI:10.1080/21505594.2017.1279374 (2017)
65. Ma J., Sun M., Dong W., Pan Z., Lu C., Yao H.: PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environment. Microbiol.* **19**, 345–360 (2017)
66. Ma L.S., Hachani A., Lin J.S., Filloux A., Lai E.M.: *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, **16**, 94–104 (2014)
67. Ma L.S., Narberhaus F., Lai E.M.: IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. *J. Biol. Chem.* **287**, 15610–15621 (2012)
68. Majerczyk C., Schneider E., Greenberg E.P.: Quorum sensing control of type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *eLife*, **5**, DOI:10.7554/eLife.14712 (2016)

69. McNally L., Bernardy E., Thomas J., Kalziqi A., Pentz J.T., Brown S., Hammer B., Yunker P.Y., Ratcliff W.: Killing by Type VI secretion drives clonal phase separation and the evolution of cooperation. *Nat. Commun.* **8**, DOI:10.1101/063487 (2017)
70. Melvin J.A., Gaston J.R., Phillips S.N., Springer M.J., Marshall C.W., Shanks R.M.Q., Bomberger M.: *Pseudomonas aeruginosa* contact-dependent growth inhibition plays dual role in host-pathogen interactions. *mSphere*, **2**, e00336-17 (2017)
71. Mercy C., Ize B., Salcedo S.P., de Bentzmann S., Bigot S.: Functional characterization of *Pseudomonas* contact dependent growth inhibition (CDI) systems. *PLoS One*, **11**, e0147435 (2016)
72. Morse R.P., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Gerrick E., Low D.A., Hayes C.S., Goulding C.W.: Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 21480–21485 (2012)
73. Morse R.P., Willett J.L.E., Johnson P.M., Zheng M., Credali A., Iniguez A., Nowick J.S., Hayes C.S., Goulding C.W.: Diversification of  $\beta$ -augmentation interactions between CDI toxin/immunity proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3766–3784 (2016)
74. Myszka K., Czaczyk K.: Mechanizm *quorum sensing* jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **64**, 582–589 (2010)
75. Nazarov S., Schneider J.P., Brackmann M., Goldie K.N., Stahlberg H., Basler M.: Cryo-EM reconstruction of Type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *The EMBO Journal*, e201797103 (2017)
76. Nguyen V.S., Cambillau C. i wsp.: Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nat. Microbiol.* **2**, DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.103 (2017)
77. Nikolakakis K.C., Low D.A. i wsp.: The toxin/immunity network of *Burkholderia pseudomallei* contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Mol. Microbiol.* **84**, 516–529 (2012)
78. Ogier J.C., Duvic B., Lanois A., Givaudan A., Gaudriault S.: A new member of the growing family of contact-dependent growth inhibition systems in *Xenorhabdus doucetiae*. *PLoS ONE*, **11**, e0167443 (2016)
79. Peng Y., Tan C. i wsp.: Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. *Sci. Rep.* **6**, DOI: 10.1038/srep26816 (2016)
80. Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T.: The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 11–17 (2009)
81. Ray A., Schwartz N., de Souza Santos M., Zhang J., Orth K., Salomon D.: Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic activities. *EMBO Reports*, e201744226 (2017)
82. Records A.R.: The Type VI Secretion System: A multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 751–757 (2011)
83. Rendueles O., Ghigo J.: Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiol. Spect.* **3**, DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.f1 (2015)
84. Røder H.L., Sørensen S.J., Burmølle M.: Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends Microbiol.* **24**, 503–513 (2016)
85. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Beck C.M., Low D.A., Hayes C.S.: The proton-motive force is required for translocation of CDI toxins across the inner membrane of target bacteria. *Mol. Microbiol.* **94** 466–481 (2014)
86. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Chen A.J., Leung N.Y., Hayes C.S., Low D.A.: CDI systems are stably maintained by a cell-contact mediated surveillance mechanism. *PLoS Genetics*, **12**, e1006145 (2016)
87. Ruhe Z.C., Nguyen J.Y., Xiong J., Koskiniemi S., Beck C.M., Perkins B.R., Low D.A., Hayes C.S.: CdiA effectors use modular receptor-binding domains to recognize target bacteria. *mBio*, **8**, DOI:10.1128/mBio.00290-17 (2017)
88. Ruhe Z.C., Townsley L., Wallace A.B., King A., Van der Woude M.W., Low D.A., Yildiz F.H., Hayes C.S.: CdiA promotes receptor-independent intercellular adhesion. *Mol. Microbiol.* **98**, 175–192 (2015)
89. Ruhe Z.C., Wallace A.B., Low D.A., Hayes C.S.: Receptor polymorphism restricts contact-dependent growth inhibition to members of the same species. *mBio*, **4**: DOI:10.1128/mBio.00480-13 (2013)
90. Ruiz F.M., Santillana E., Spínola-Amilibia M., Torreira E., Culebras E., Romero A.: Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: A component of the type VI secretion system. *PLoS ONE*, **10**, e0129691 (2015)
91. Russell A.B., Hood R.D., Bui N.K., Leroux M., Vollmer W., Mougous J.D.: Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, **475**: 343–349 (2011)
92. Russell A.B., LeRoux M., Hathazi K., Agnello D.M., Ishikawa T., Wiggins P.A., Wai S.N., Mougous J.D.: Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, **496**, 508–512 (2013)
93. Saak C.C., Gibbs K.A.: The self-identity protein IdsD is communicated between cells in swarming *Proteus mirabilis* colonies. *J. Bacteriol.* **198**, 3278–3286 (2016)
94. Saak C.C., Zepeda-Rivera M.A., Gibbs K.A.: A single point mutation in a TssB / VipA homolog disrupts sheath formation in the type VI secretion system of *Proteus mirabilis*. *PLoS ONE*, **12**, e0184797 (2017)
95. Salomon D., Orth K.: Type VI secretion system. *Curr. Biol.* **25**, DOI:10.1016/j.cub.2015.02.031 (2015)
96. Sana T.G., Hachani A., Bucior I., Soscia C., Garvis S., Termine E., Egel J., Filloux A., Blevess S.: The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 27095–27105 (2012)
97. Satpathy S., Sen S.K., Pattanaik S., Raut S.: Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **7**, 56–66 (2016)
98. Sha J., Rosenzweig J.A., Kozlova E.V., Wang S., Erova T.E., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K.: Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis. *Microbiology*, **159**, 1120–1135 (2013)
99. Shneider M.M., Buth S.A., Ho B.T., Basler M., Mekalanos J.J., Leiman P.G.: PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, **500**, 350–353 (2013)
100. Silverman J.M., Agnello D.M., Zheng H., Andrews B.T., Li M., Catalano C.E., Gonen T., Mougous J.D.: Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol. Cell*, **51**, 584–593 (2013)
101. Silverman J.M., Brunet Y.R., Cascales E., Mougous J.D.: Structure and regulation of the Type VI Secretion System. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 453–472 (2012)
102. Stubbendieck R.M., Straight P.D.: Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* **198**, 2145–2155 (2016)
103. Tan K., Johnson P.M., Stols L., Boubion B., Eschenfeldt W., Babnigg G., Hayes C.S., Joachimiak A., Goulding C.W.: The structure of a contact-dependent growth-inhibition (CDI) immunity protein from *Neisseria meningitidis* MC58. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **71**, 702–709 (2015)
104. Tang J.Y., Bullen N.P., Ahmad S., Whitney J.C.: Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *J. Biol. Chem.* **2**, 1504–1514 (2017)

105. Tian Y., Zhao Y., Wu X., Liu F., Hu B., Walcott R.R.: The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 38–47 (2015)
106. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuk B., Provenzano D., Pukatzki S.: The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* **5**, DOI:10.1038/ncomms4549 (2014)
107. Van Ulsen P., Rahman S., Jong W.S.P., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J.: Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 1592–1611 (2014)
108. Vassallo C.N., Cao P., Conklin A., Finkelstein H., Hayes C.S., Wall D.: Infectious polymorphic toxins delivered by outer membrane exchange discriminate kin in myxobacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.29397 (2017)
109. Velicer G.J., Pluain J.: Evolution: Bacterial territoriality as a byproduct of kin discriminatory warfare. *Curr. Biol.* **26**, DOI:10.1016/j.cub.2016.03.033 (2016)
110. Wang L., Qiu J. i wsp.: Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS ONE*, **8**, e73363 (2013)
111. Webb J.S., Nikolakakis K.C., Willett J.L.E., Aoki S.K., Hayes C.S., Low D.A.: Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PLoS ONE*, **8**, e57609 (2013)
112. Weber B., Hasic M., Chen C., Wai S.N., Milton D.L.: Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ. Microbiol.* **11**, 3018–3028 (2009)
113. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L.: Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *mBio*, **4**, DOI:10.1128/mBio.00374-13.Editor (2013)
114. Whitney J.C., Mougous J.D. i wsp.: Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol. Microbiol.* **92**, 529–542 (2014)
115. Whitney J.C., Chou S., Russell A.B., Biboy J., Gardiner T.E., Ferrin M.A., Brittnacher M., Vollmer W., Mougous J.D.: Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair. *J. Biol. Chem.* **288**, 26616–26624 (2013)
116. Whitney J.C., Mougous J.D. i wsp.: A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. *eLife*, **6**, DOI:10.7554/eLife.26938 (2017)
117. Willett J.L.E., Gucinski G.C., Fatherree J.P., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11341–1346 (2015)
118. Willett J.L.E., Ruhe Z.C., Goulding C.W., Low D.A., Hayes C.S.: Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiA/CdiB two-partner secretion proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 3754–4765 (2015)
119. Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., Song Z.: Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* **3**, 74–81 (2011)
120. Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind L.: Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol. Direct*, **7**, DOI:10.1186/1745-6150-7-18 (2012)
121. Zhang W., Xu S., Li J., Shen X., Wang Y., Yuan Z.: Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by ahl-dependent quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Arch. Microbiol.* **193**, 351–363 (2011)
122. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J.: Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21128–21133 (2010)
123. Zoued A., Brunet Y.R., Durand E., Aschtgen M.S., Logger L., Douzi B., Journet L., Cambillau C., Cascales E.: Architecture and assembly of the type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 1664–1673 (2014)