

Percezione e adattamento: two-component systems

Marco Coluccia

26/03/2024

Sapienza Università di Roma

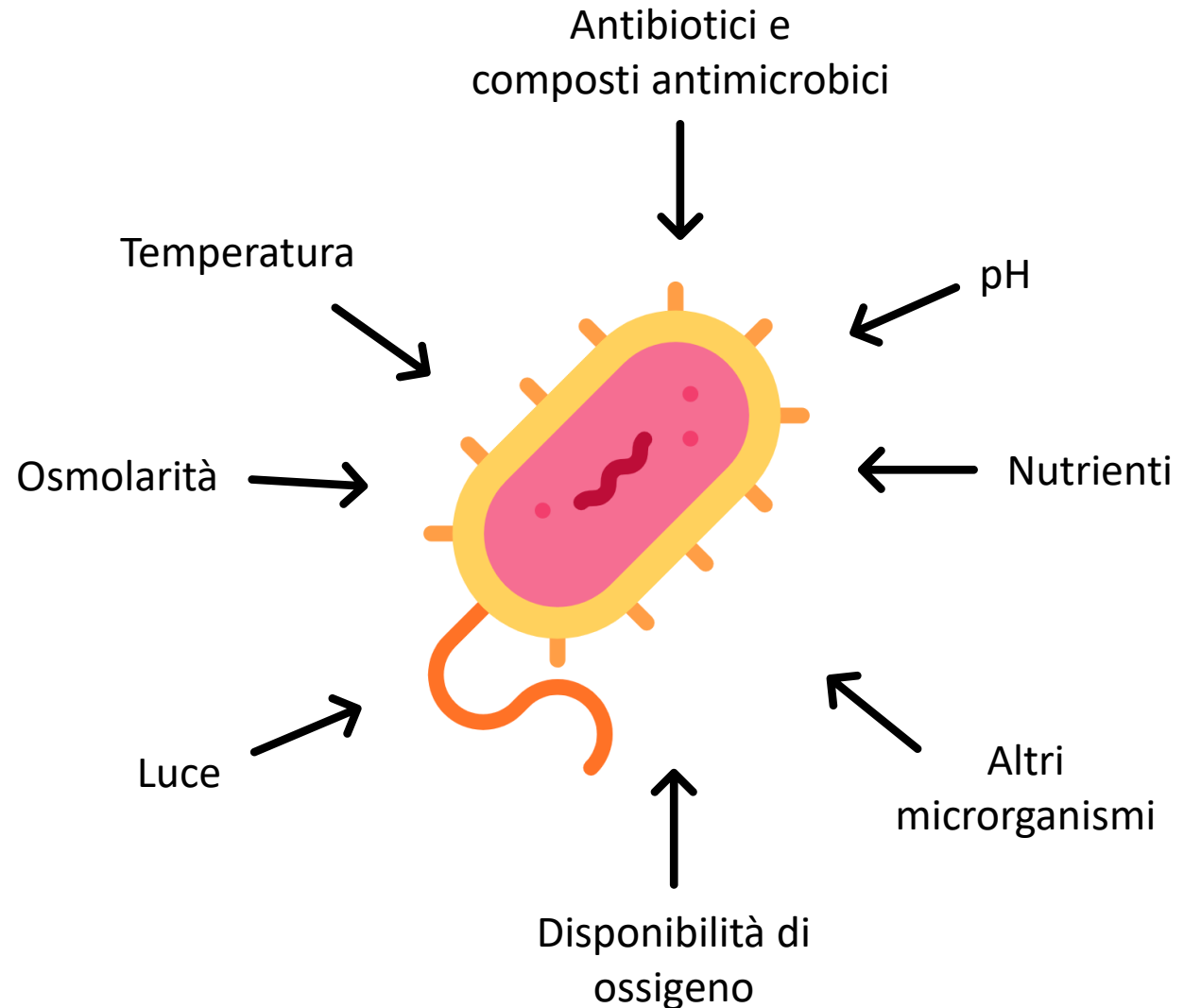
Corso di Microbiologia Cellulare e Vaccinologia

La trasduzione del segnale nei batteri

Gli ambienti intracellulare ed extracellulare sono diversi e in **disequilibrio**. I batteri devono attuare strategie diverse per il mantenimento dell'**omeostasi**.



Negli anni '30 A. M. Pappenheimer studia la produzione di tossina difterica in relazione alla disponibilità di ferro.



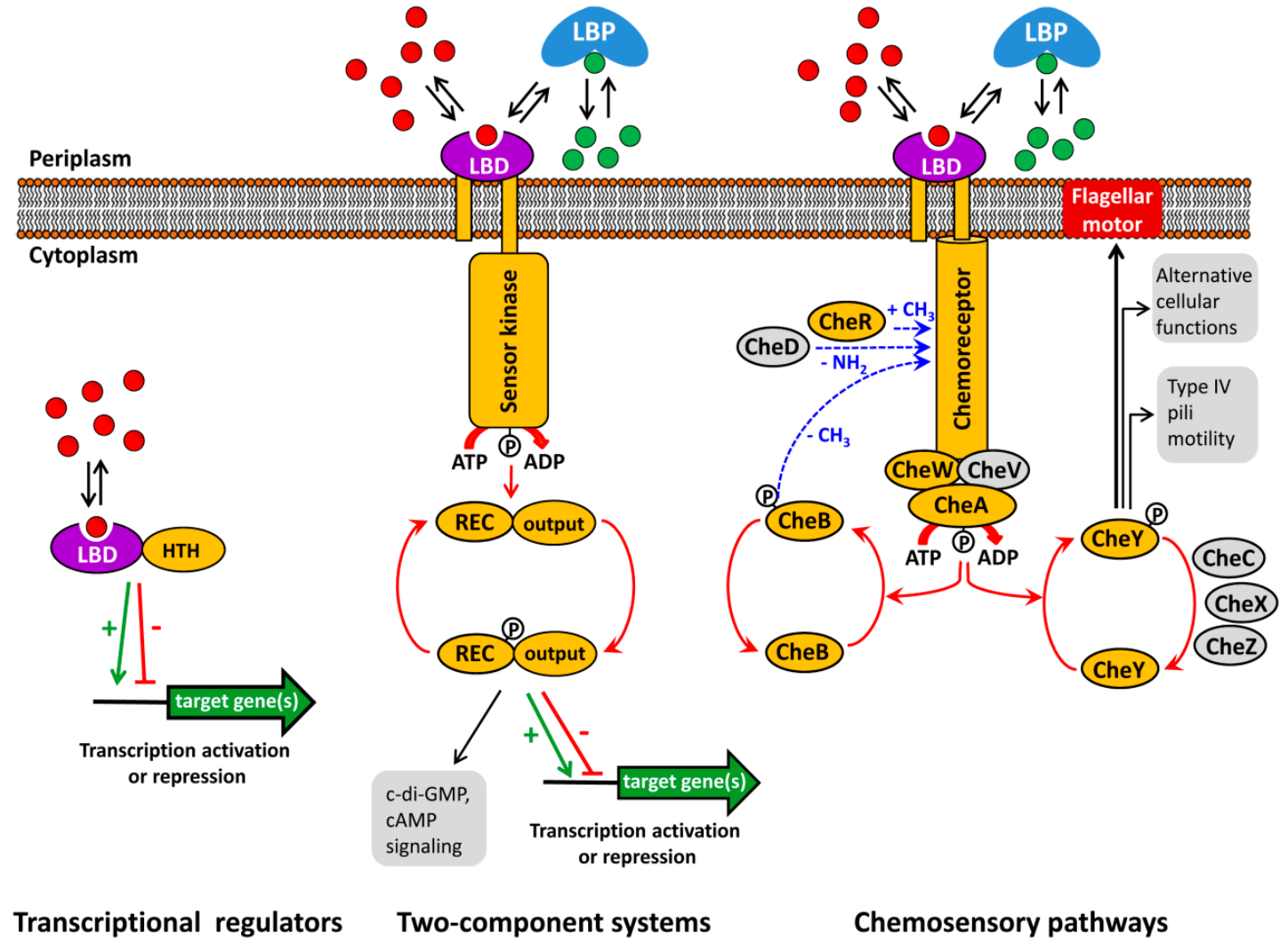
Per rispondere ai segnali sono necessarie quindi 2 funzioni:

- Percezione (sensing)
- Regolazione

Sistemi basati sul riconoscimento di **molecole segnale**.

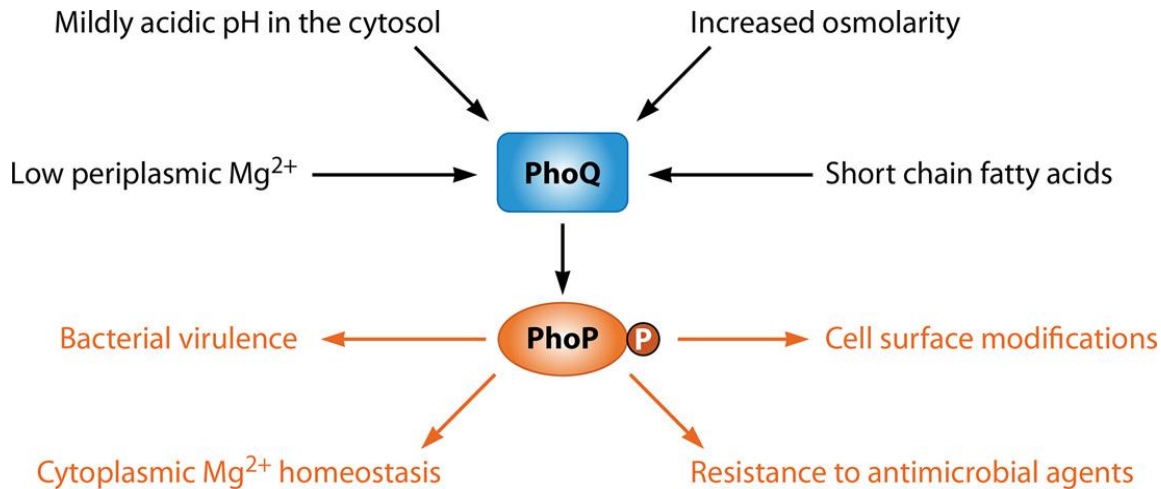
- Regolatori trascrizionali
- Sistemi a due componenti
- chemosensori

Il risultato è generalmente la regolazione dell'espressione genica.



- **LBD:** Ligand Binding Domain
- **HTH:** Helix-Turn-Helix (DNA binding)
- **LBP:** Ligand Binding Protein
- **REC:** Receiver Domain

Two-component systems (TCS)



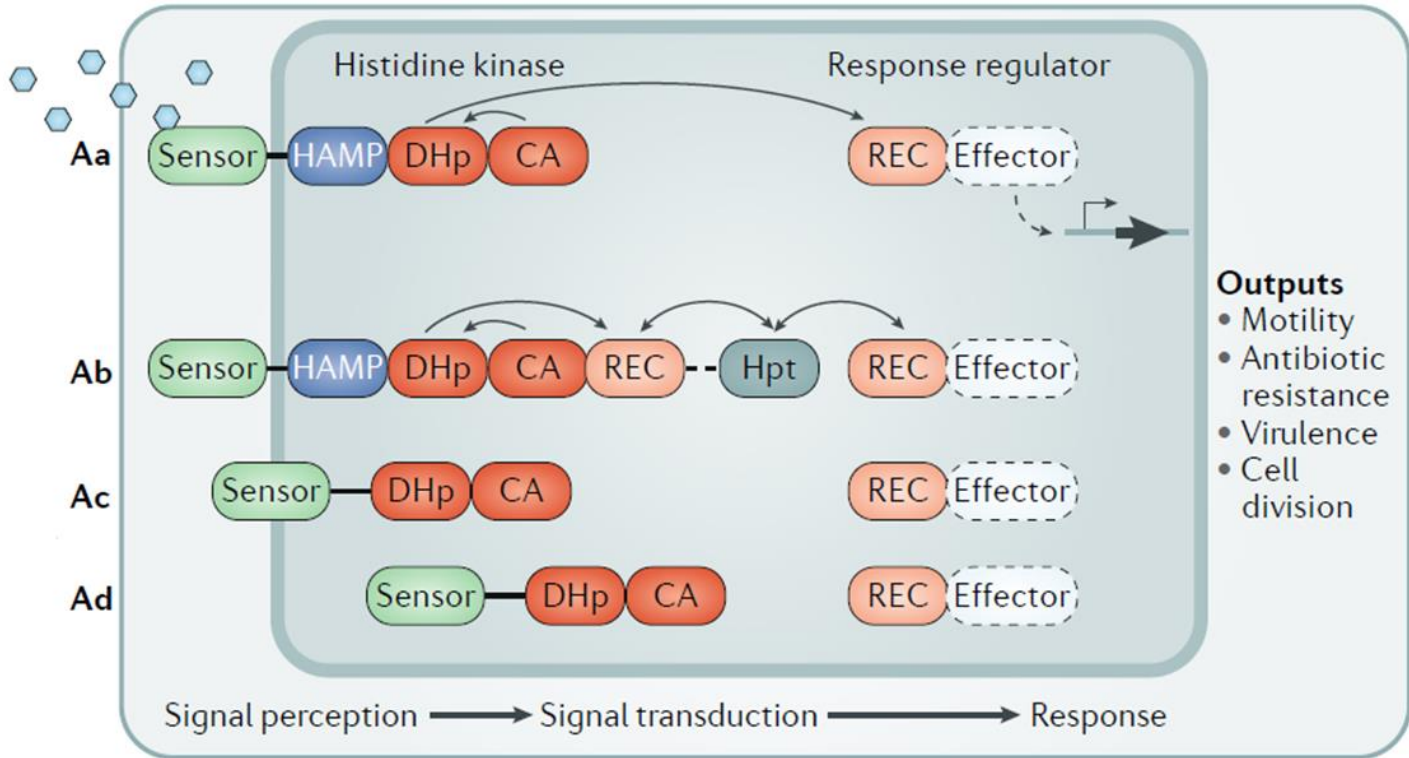
Famiglia di proteine di trasduzione del segnale presente in **tutti i domini** della vita.

Basati sulla modifica dello stato di fosforilazione di una **proteina sensore** in risposta alla percezione di un segnale fisico/chimico e successiva modifica dello stato di fosforilazione di una **proteina regolatrice**.

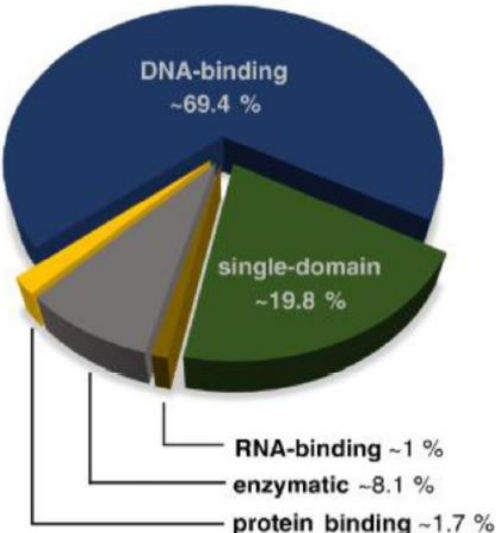
Generalmente la fosforilazione del regolatore aumenta l'affinità per il DNA target.

Un TCS canonico è spesso **dimerico** ed è formato da due elementi:

- **Sensore istidina chinasi (HK)**
 - **Sensore** extracitoplasmatico
 - **HAMP/PAS**: signal relay module
 - **Linker** ricco in residui polari
 - **DHp**: dimerization and histidine phosphotransfer
 - **CA**: catalytic-ATP binding
- **Regolatore citoplasmatico (response regulator RR)**
 - **REC**: receiver
 - **Effettore** (Legame al DNA, RNA, proteine)



Jacob-Dubuisson et al., 2018



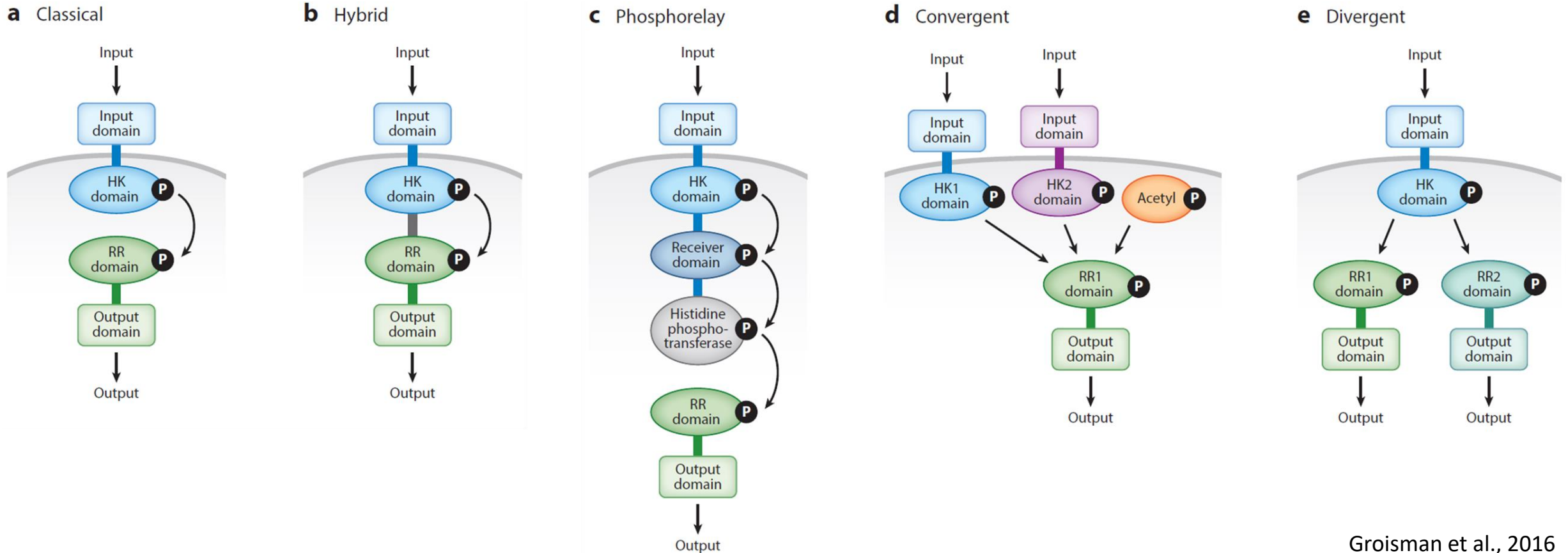
Zschiedrich et al., 2016

La superfamiglia RR viene suddivisa in base al tipo di dominio effettore:

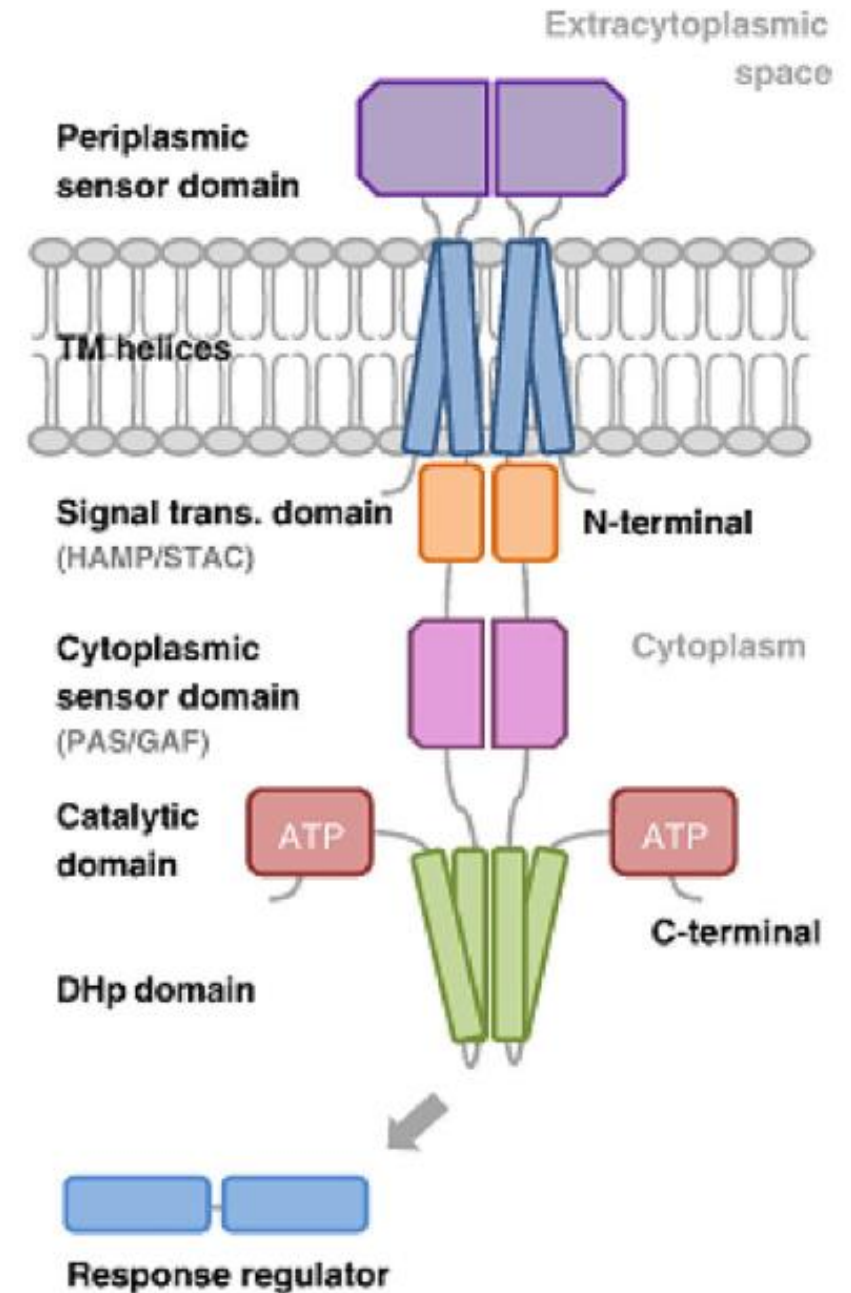
- Legame al DNA: regolatori trascrizionali
- Legame all'RNA
- Attività enzimatica
- Legame a protein
- Proteine a singolo dominio

Esistono molti tipi di TCS non classici:

- **TCS ibridi**: sensore e regolatore fusi
- **TCS phosphorelay**: una serie di autofosforilazioni a catena
- **TCS convergenti**: diversi sensori convergono in un unico regolatore
- **TCS divergenti**: un singolo sensore induce la fosforilazione di più regolatori

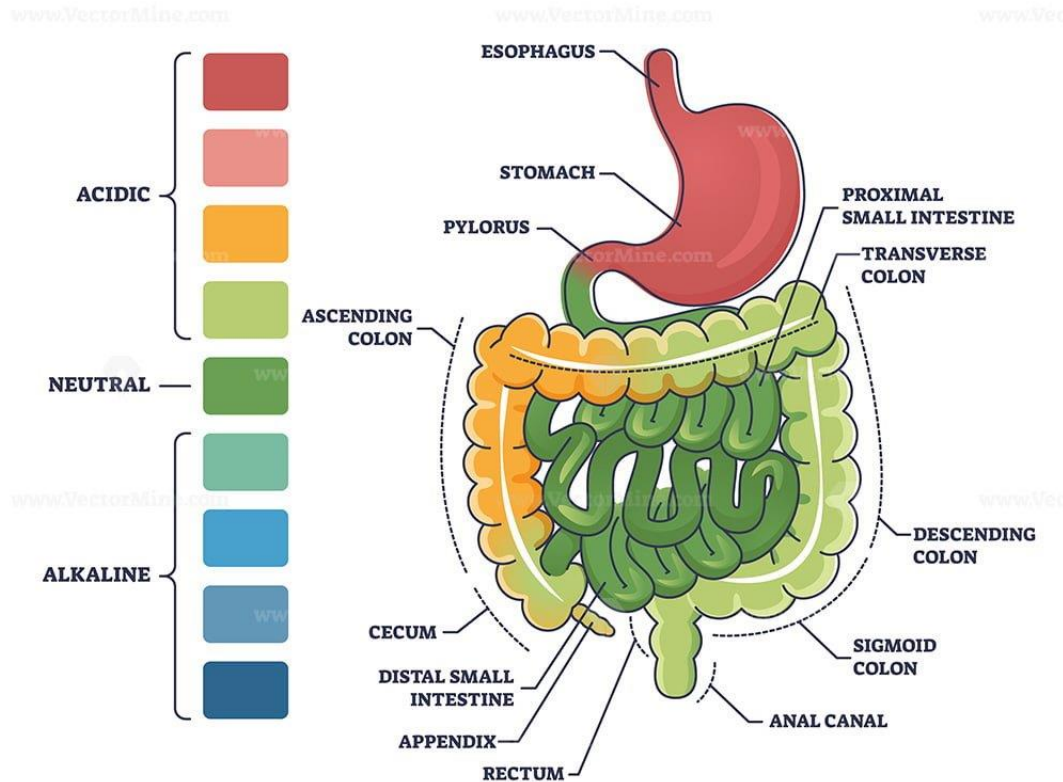


1. Il **segnale** viene percepito da domini variabili all'estremità N-terminale dell'HK. Il legame del ligando altera la conformazione di una specifica elica situata all'interfaccia del dimero e si estende dal dominio sensore alle **eliche transmembrana**.
2. Il dominio **HAMP** trasduce il segnale con cambiamenti conformazionali.
3. L'interazione dei domini **DHp** e **CA** del core catalitico permette la fosforilazione di uno specifico residuo di **istidina** estremamente conservato.
4. L'istidina fosforilata è usata dal regolatore, che si avvicina al dominio DHp della HK e catalizza la propria autofosforilazione su un residuo di **aspartato** del dominio REC.
5. Il dominio N-terminale REC è legato con un linker a **domini effettori** C-terminali di natura variabile in base al TCS preso in considerazione.
6. Il dominio REC viene **defosforilato** da un attacco nucleofilo di una molecola di H₂O al gruppo fosfato.



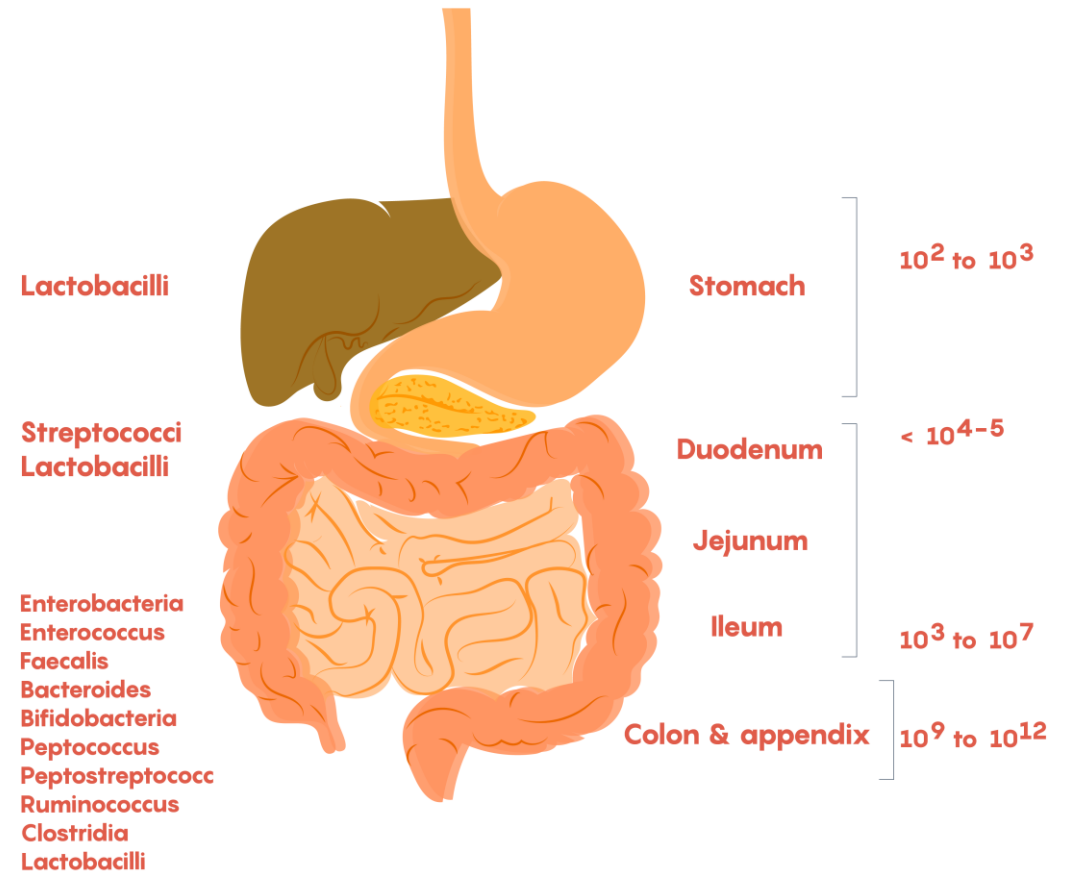
Pensando a un batterio commensale o patogeno nel tratto gastrointestinale umano...

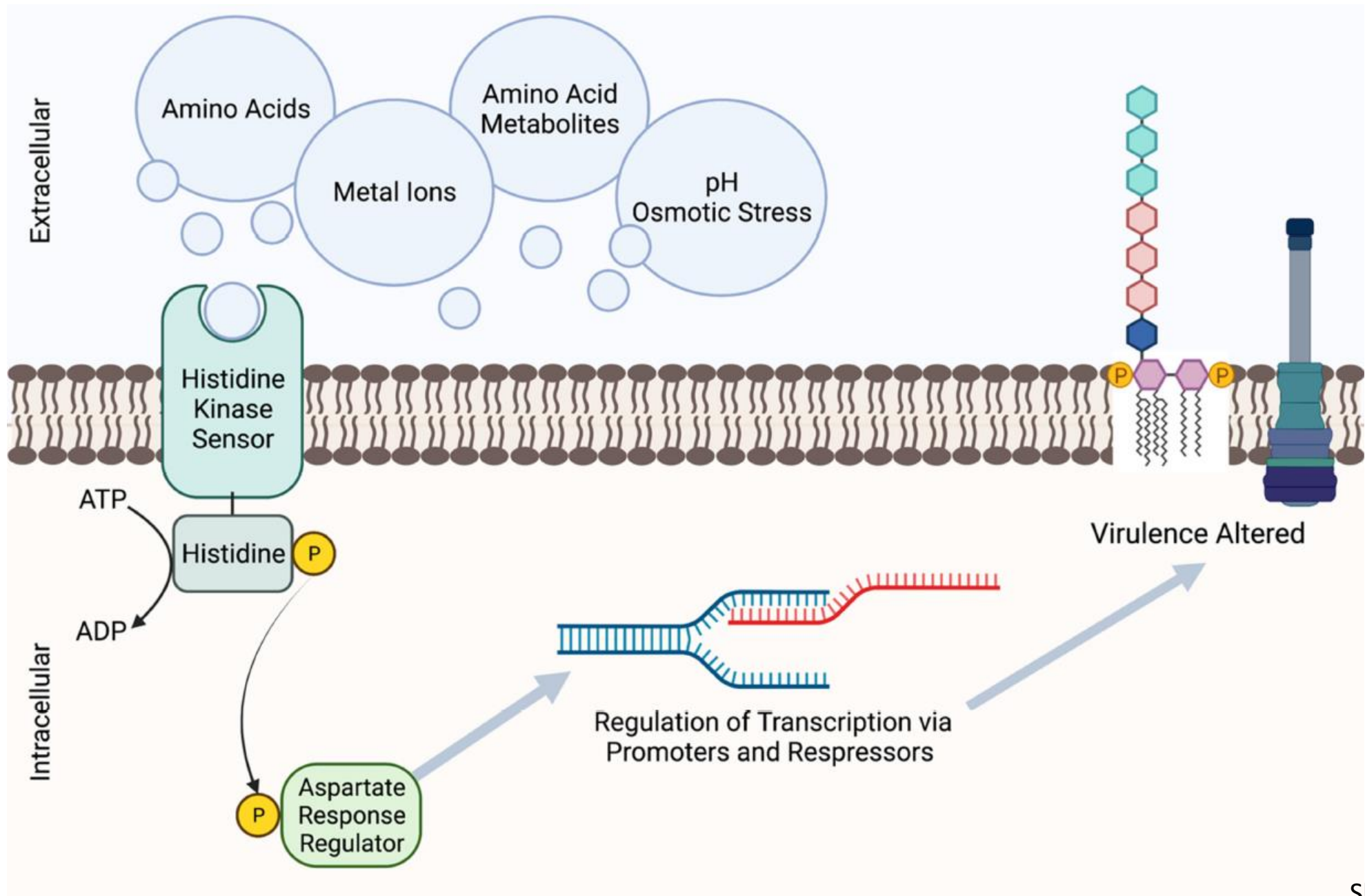
pH of THE DIGESTIVE TRACT



Intestinal Microflora

10^{14} microorganisms, >500 species





	Signal	HK-RR Pair	Result
Metal Ions	Zn ²⁺	ColS-ColR	LPS modification
	Cu ⁺ /Ag ⁺	CusS-CusR	Tripartite efflux pumps
	Mg ²⁺	CsrR-CsrS	Activation of virulence repertoire
	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	PhoQ- PhoP*	LPS modification, Low Mg ²⁺ adaptation, Antimicrobial resistance, PmrAB cross talk
	Mg ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺	PmrB- PmrA* BasS- BasR	Stress response, Antimicrobial resistance, PhoPQ cross talk
Amino Acids	Glutamate	GluK-GluR	Antibiotic synthesis
	Glutamate, Aspartate	AauS-AauR	Swarming, Motility, Biofilm formation
Amino Acid Derived Molecules	Serotonin (Via Tryptophan)	CpxA-CpxR	Type 3 Secretion System
	Epinephrine/Norepinephrine (Via Tyrosine)	QseC-QseB	Biofilm formation, Flagellar motility
	Epinephrine (Via Tyrosine)	QseE-QseF	Type 3 Secretion System
	Nitrate/Nitrite (Via Arginine)	NarX-NarL NarQ- NarP	Motility, Biofilm formation, Nitrate Sensing and Reduction
Environment & Other	Acidic pH	EvgS-EvgA	Multidrug Transporter
	Acidic pH	TrxR-TrxS	Biofilm formation
	Acidic pH	HK11-RR11	Biofilm formation
	Osmolarity	EnvZ-OmpR	Intracellular iron regulation

Approfondiamo alcuni degli stimoli...

Input: Ioni metallici

Fe, Zn, Mg, Co, Mo → utilizzato fino dal 36% delle proteine in ogni classe di enzimi.

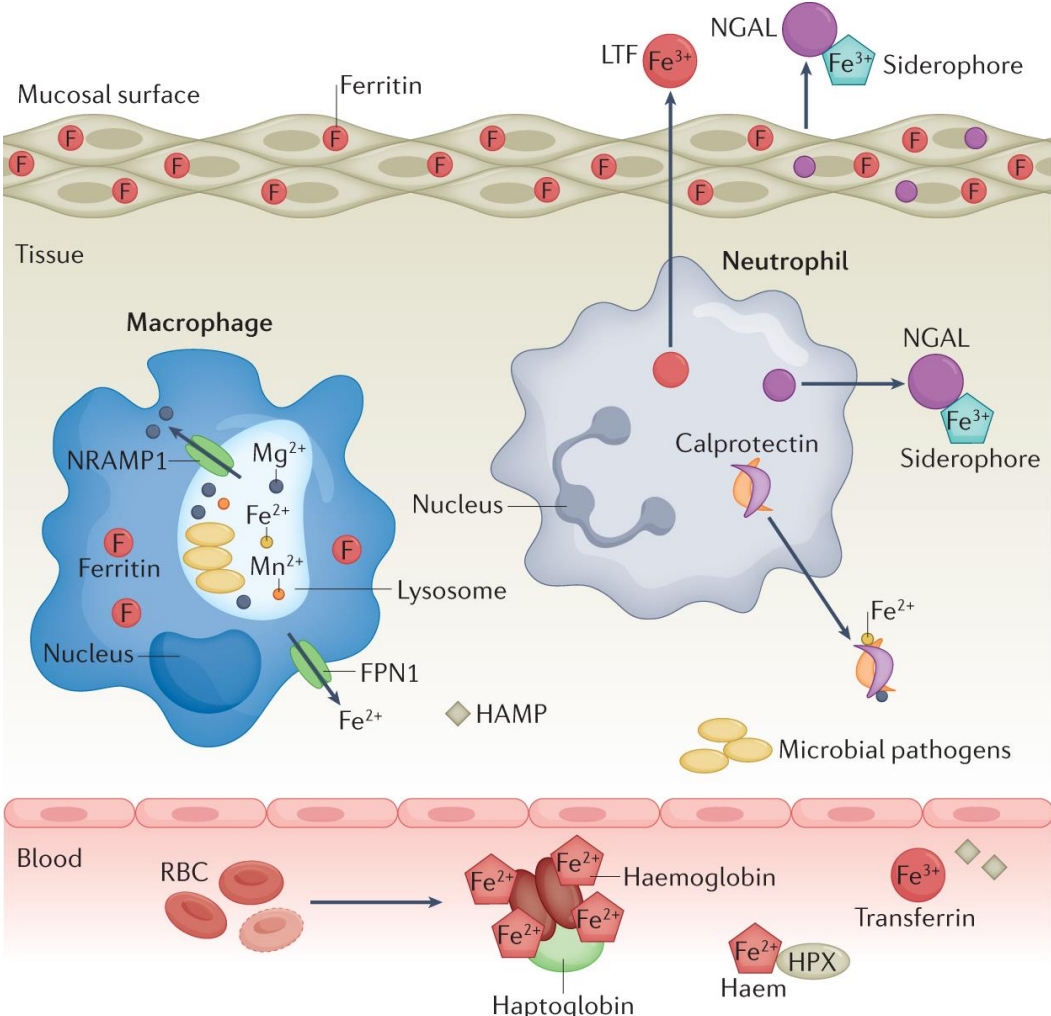
- Bilanciamento fra:
- **Funzioni essenziali** (es. cofattori)
→ Strategie batteriche per il sequestro degli ioni
 - **Tossicità e attività battericida**
→ Nutritional immunity, trasportatori batterici

L'infezione induce una drastica alterazione del metabolismo dei metalli da parte dell'ospite. La biodisponibilità dei metalli è un elemento importante nel determinare la pressione selettiva sui patogeni.

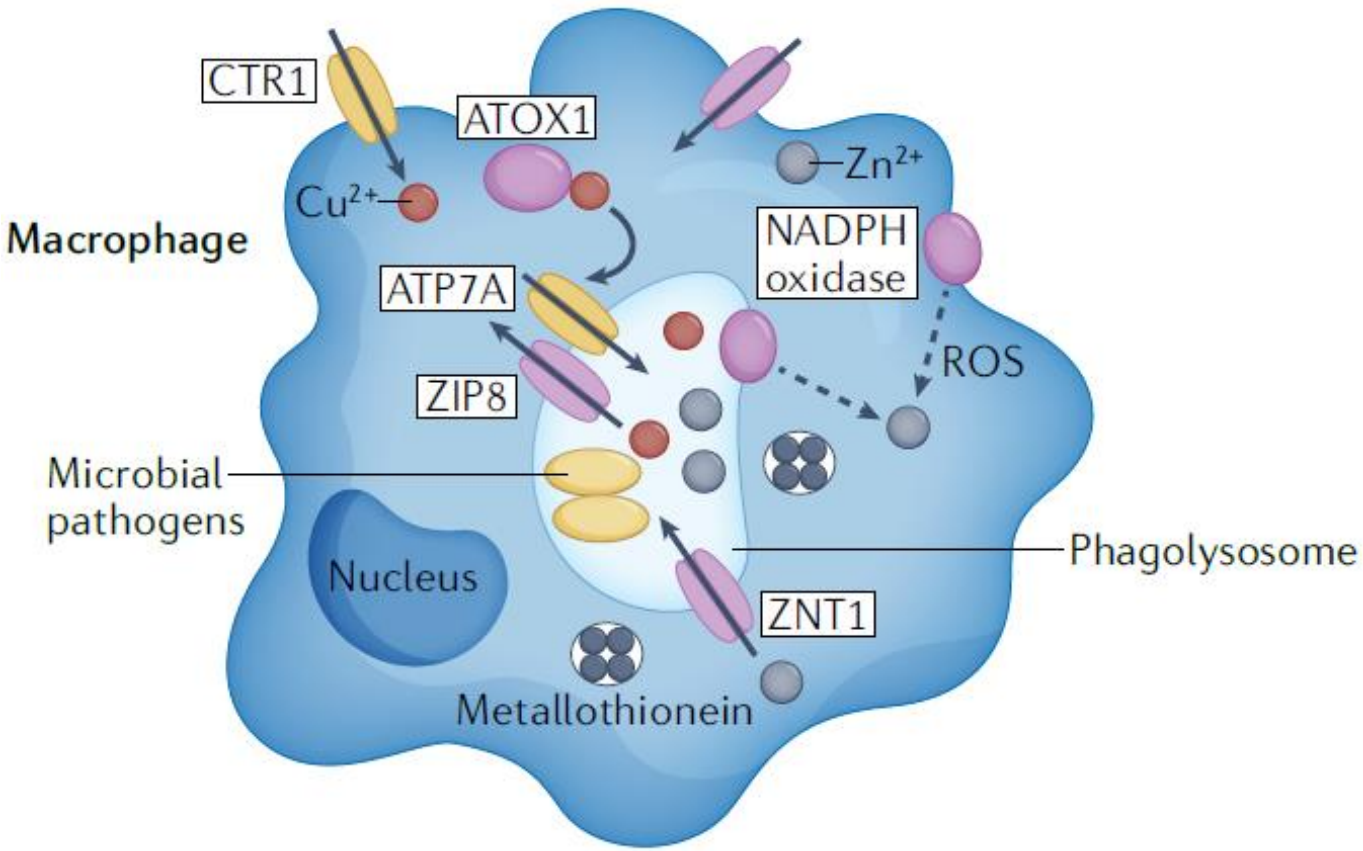
→ **Nutritional Immunity**

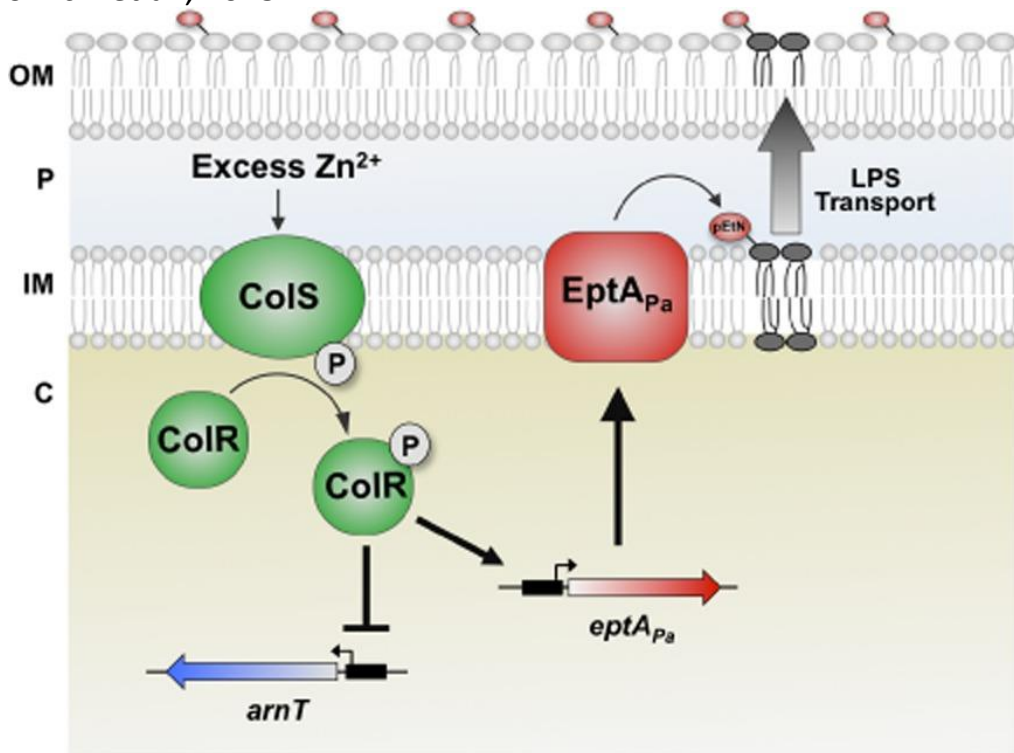
Esempi di nutritional immunity:

Fe⁺⁺ starvation



Zn⁺⁺ intoxication





Zn⁺⁺

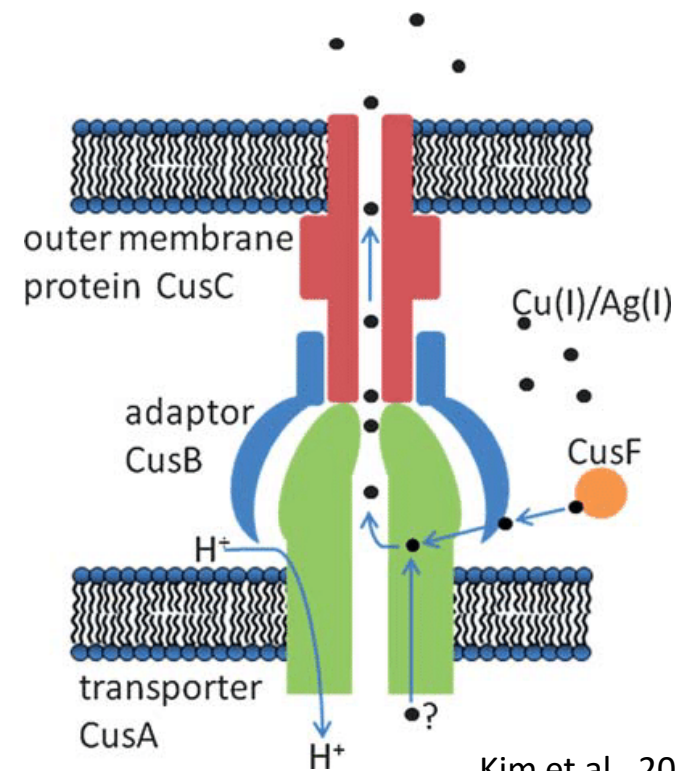
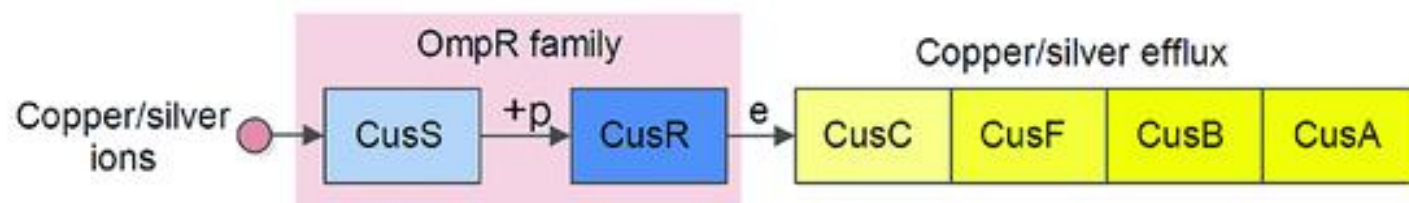
L'eccesso di zinco induce l'aggiunta di pEtN al 4' del gruppo fosfato del lipide A mediante l'attivazione della transferasi EptA. Viene invece repressa l'espressione della transferasi *arnT*.

→ Sistema **CoIRS** in *P. aeruginosa* e mantenimento del controllo sulla struttura dell'LPS.

Cu⁺⁺

Il rame viene trasferito nel sito dell'infezione e l'aumento della concentrazione ne determina l'attività **battericida**.

→ Sistema **CusRS** in *E. coli* e *K. Pneumoniae*



Input: amminoacidi

Ospite e patogeno condividono i substrati nutrizionali e molti dei prodotti metabolici sono comuni.

→ **Cross-talk metabolico**

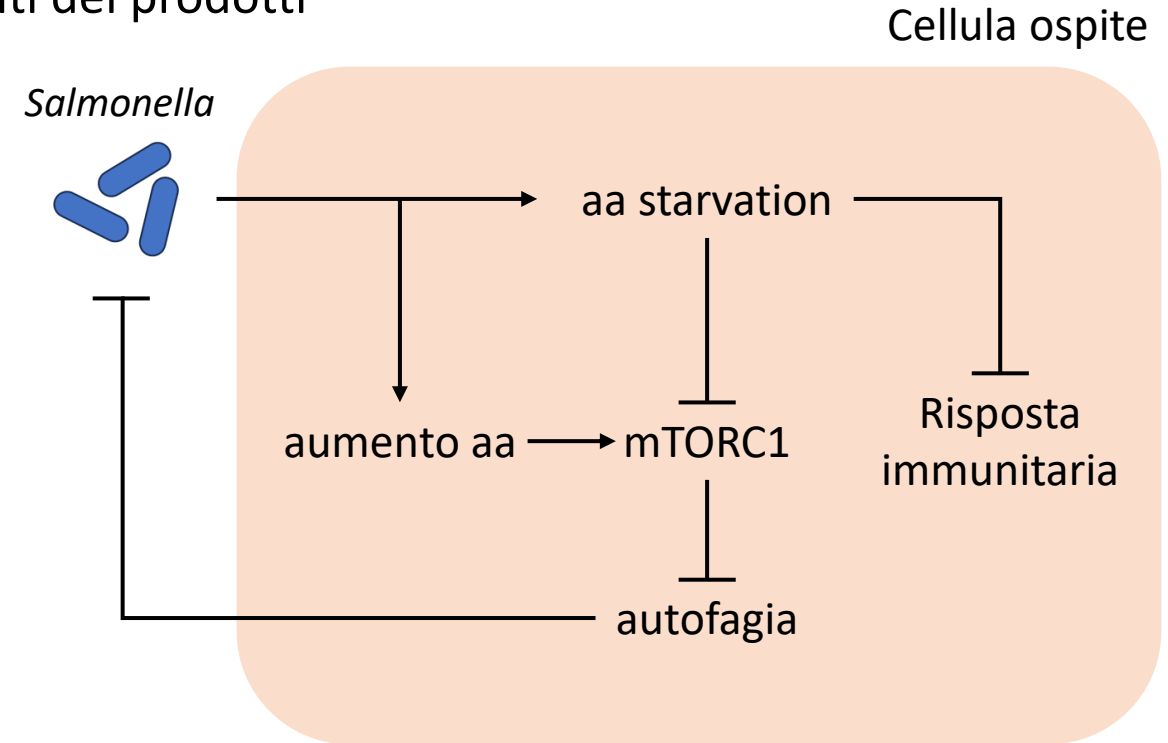
Gli aa supportano le **funzioni fisiologiche nell'ospite**:

- Fonte di energia
- Substrato per la sintesi proteica
- Produzione di molecole regolatorie
- Pathway di cell-signaling
- Regolazione del metabolismo e del microbiota
- Immunità innata e adattativa

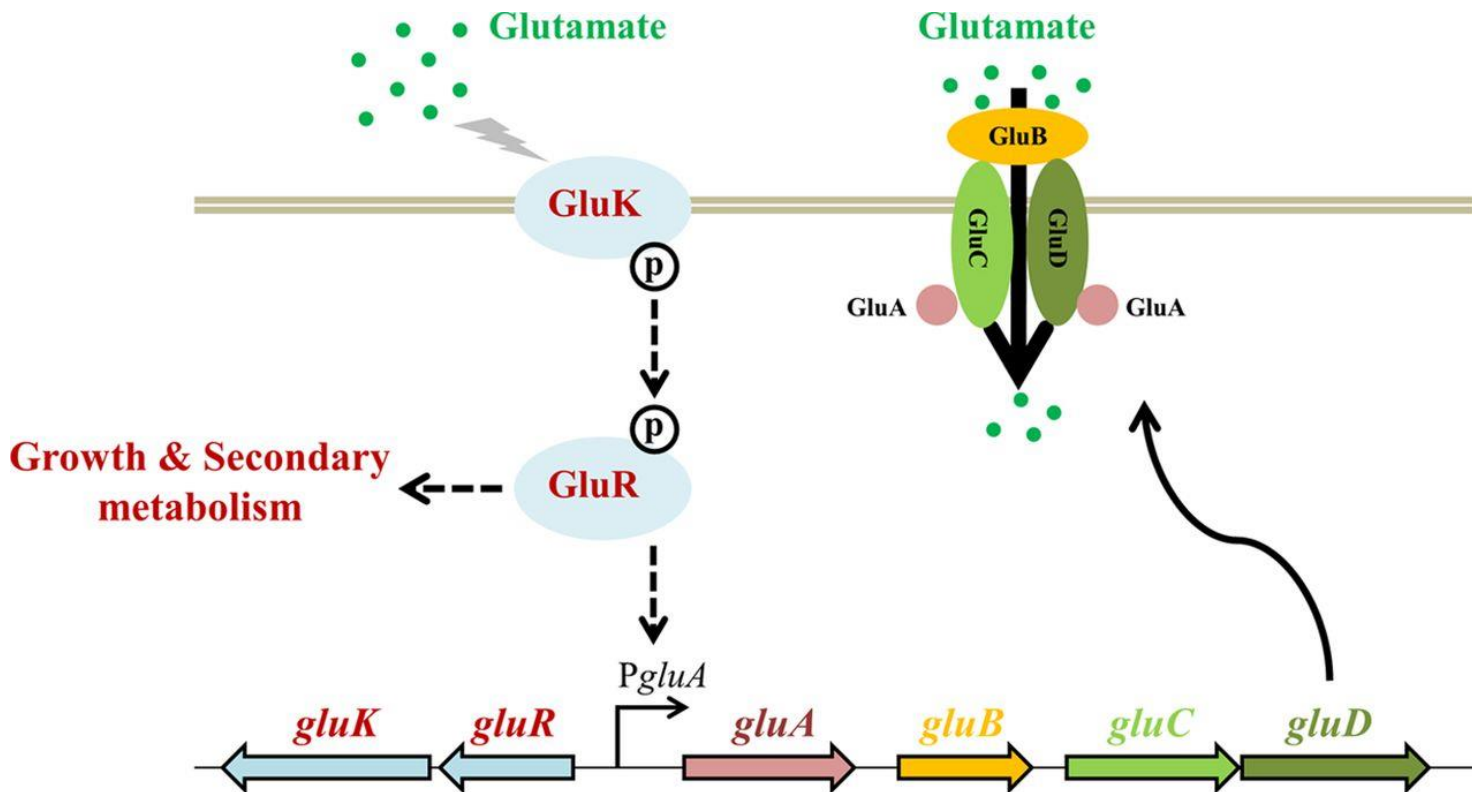
Ma anche nei **patogeni**:

- Virulenza di *L. monocytogenes*
- Switch metabolico da glicolisi ad aa come fonte energetica in *S. aureus*

Un buon esempio di cross-talk metabolico fra ospite e patogeno è durante l'infezione dei macrofagi da parte di *Salmonella*.



Ren et al., 2018



Streptomyces coelicolor è stato il primo *actinobacterium* nel quale è stato identificato un **TCS per il glutammato**. È un batterio ambientale, ma nello stesso genere sono presenti anche patogeni umani e il pathway potrebbe essere quindi conservato.

→ Sistema **GluKR**

Fra i geni controllati direttamente da GluR:

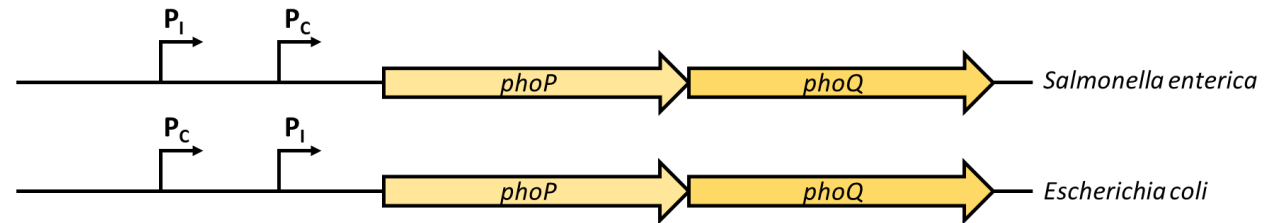
- Trasportatore GluABCD
- Geni di resistenza agli antibiotici

Come viene regolata l'attività dei TCS?

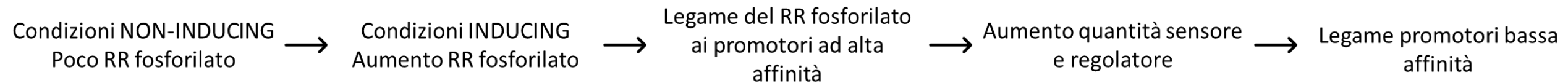
La maggior parte dei TCS è codificata da due geni posti in un **operone**.

Tipicamente sono presenti due promotori:

- **Promotore costitutivo** per l'espressione basale
- **Promotore inducibile** autoregolato



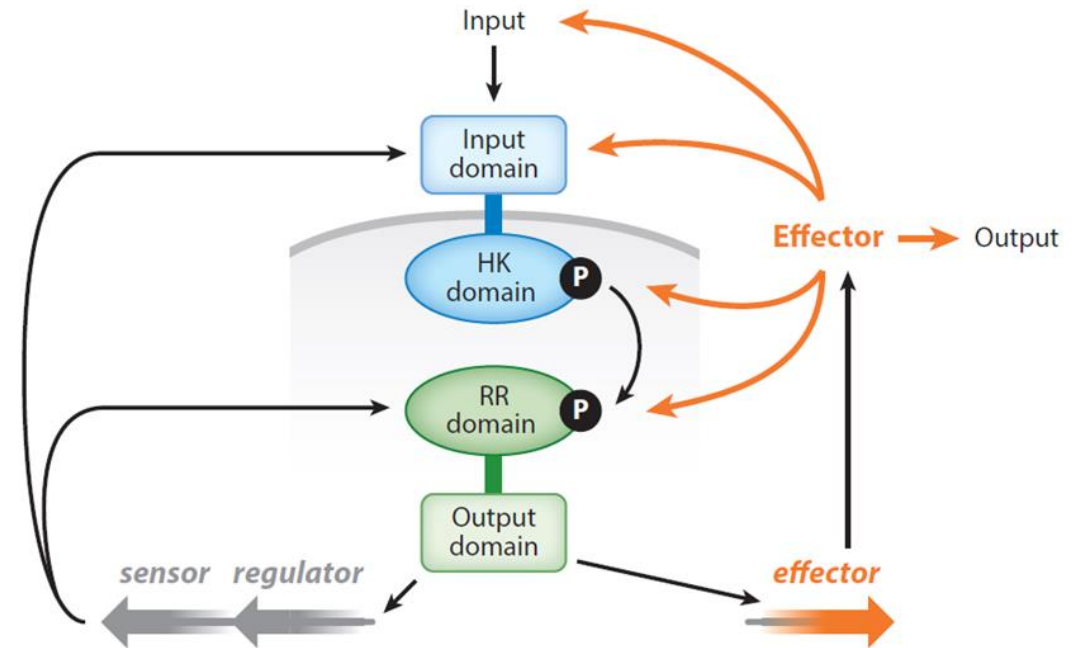
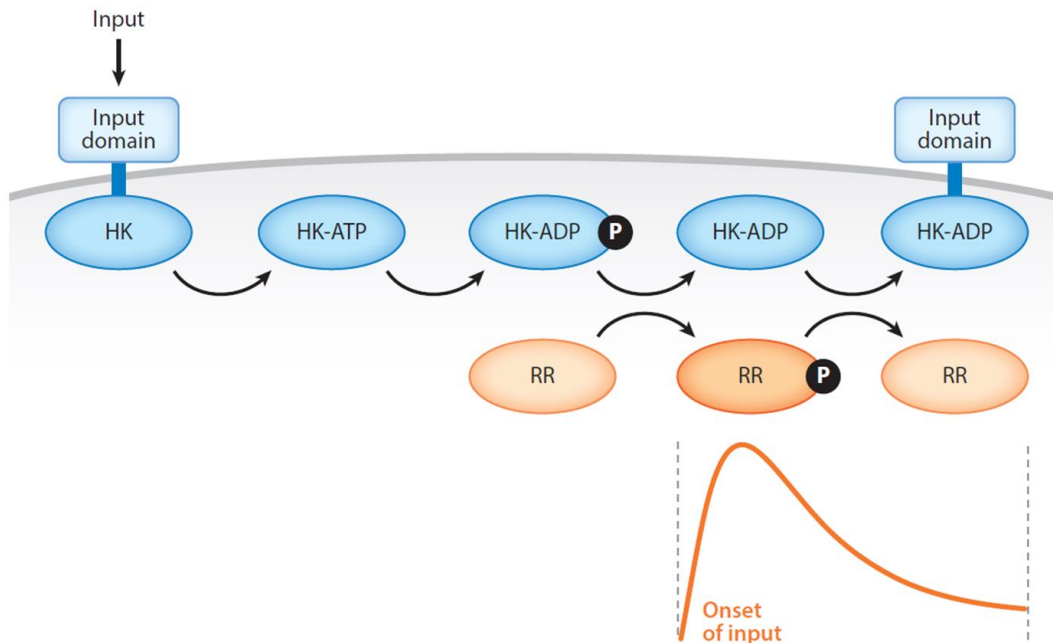
Fra i geni regolati dal RR fosforilato vi è anche l'operone del TCS stesso, con un meccanismo di **autoregolazione a feedback** basato su una gerarchia di promotori con diversa affinità per il RR.



Regolazione estrinseca

Regolazione da parte di elementi esterni al TCS.

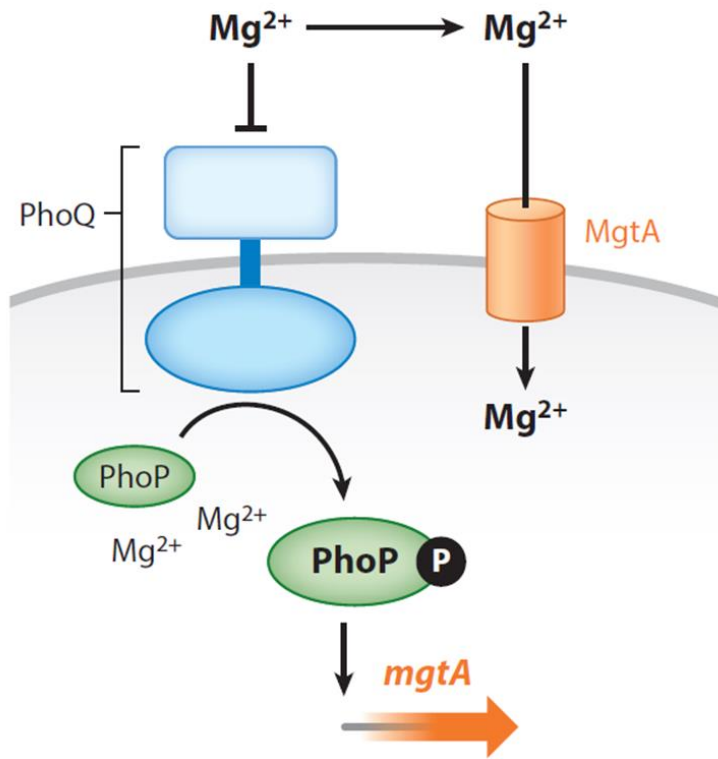
- Regolazione trascrizionale dei geni di HK e RR
- Regolazione da parte degli effettori
 - Accesso del segnale al sensore
 - Modifica dell'attività enzimatica
 - Modifica dello stato di fosforilazione



Regolazione intrinseca

Basata sull'interazione diretta delle proteine che compongono il TCS e sulla loro interazione con i nucleotidi.

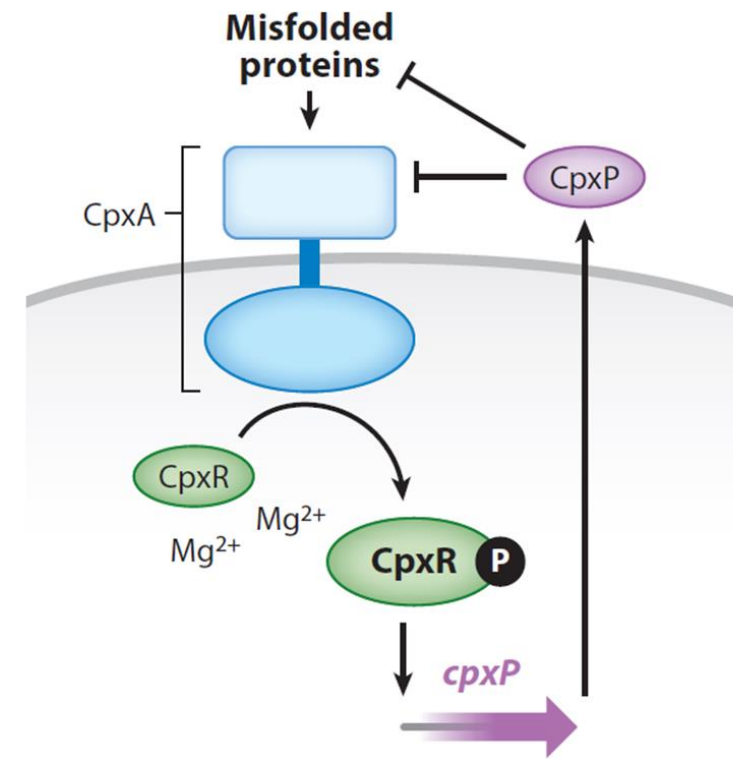
Il legame di ATP o ADP influenza l'attività enzimatica del sensore, passando da chinasi/fosfotransferasi quando è legato ATP ad attività fosfatasica quando è legato ADP.



PhoPQ: basse [Mg⁺⁺] nel periplasma

Il gene *mgtA* codifica per un trasportatore di Mg⁺⁺ ed è attivato da PhoP, ma è regolato anche da un riboswitch che risponde a bassi livelli citosolici di Mg⁺⁺.

Il trasporto da parte di MgtA induce ancora di più il sistema PhoPQ.



CpxAR: presenza di proteine mal ripiegate

Il sistema induce la trascrizione di *cpxP*, codificante per un proteina periplasmatica in grado di legarsi a CpxA e alle proteine misfolded.

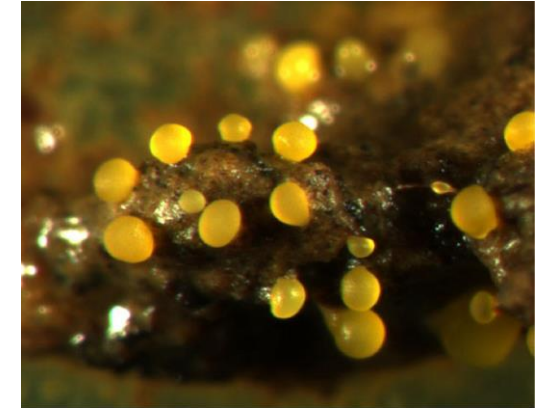
Quando le proteine misfolded aumentano, CpxP viene completamente sequestrato e non si lega più a CpxA, riattivando il sistema.

Il **numero di TCS** è influenzato dalla stabilità dell'ambiente nel quale il batterio vive.

- **Ambienti stabili:** pochi o nessun TCS
 - *Mycoplasma*, *Amoebophilus*
- **Ambienti mutevoli:** molti TCS
 - *Myxococcus xanthus*: 136 HK, 127 RR
 - *Nostoc punctiforme*: 160 HK, 98 RR



Mycoplasma



M. xanthus

Trends in Microbiology

I TCS sono presenti in **tutti i domini della vita**, anche se in Archea ed Eucarioti sono meno numerosi e sono completamente **assenti nei metazoi**.

Ma da dove si sono originati?

- HK: probabilmente da ATPasi della famiglia GHKL, che comprende Hsp90, MutL e la topoisomerasi di tipo II
- RR: ancora non si hanno informazioni

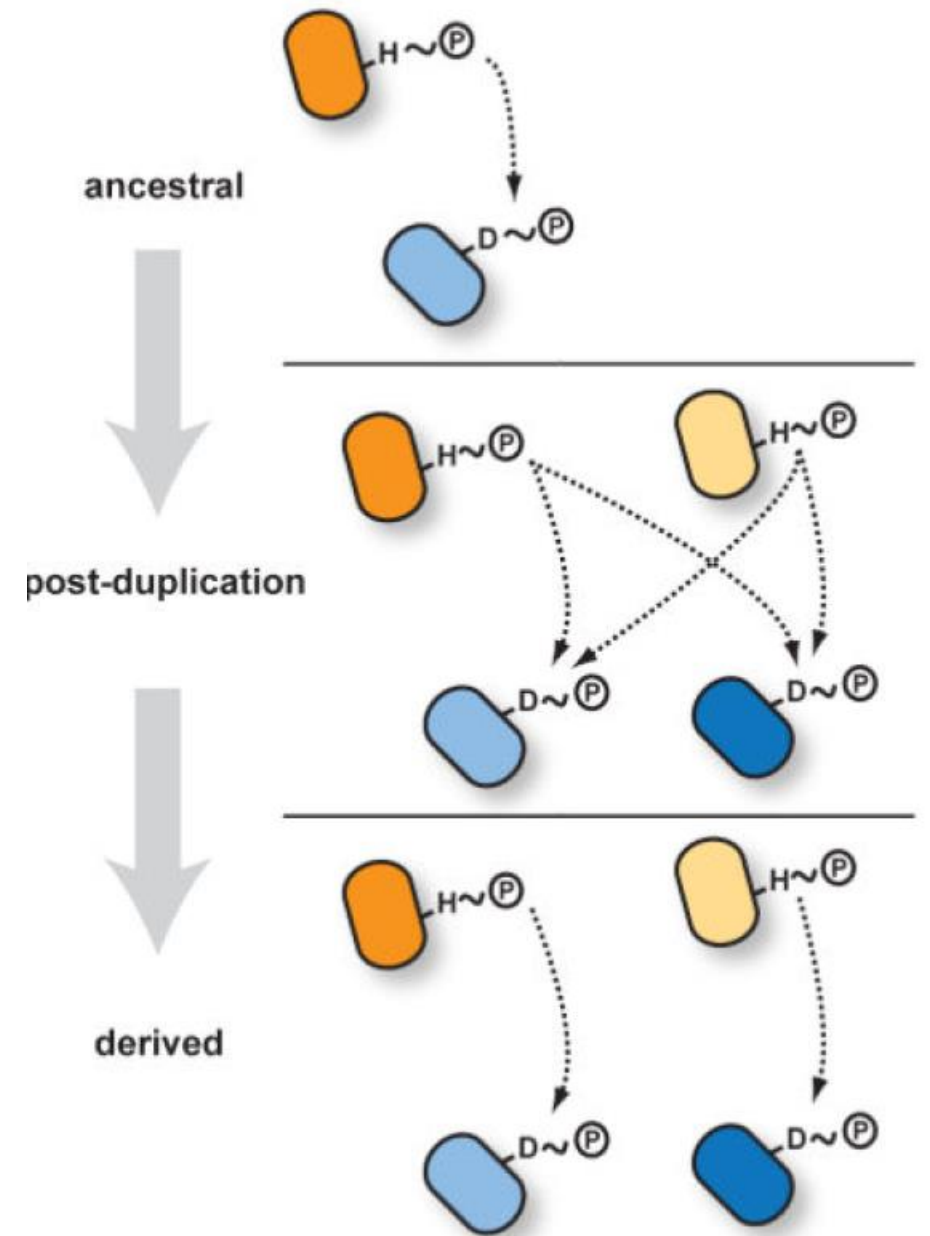
La diversificazione dei TCS è avvenuta mediante:

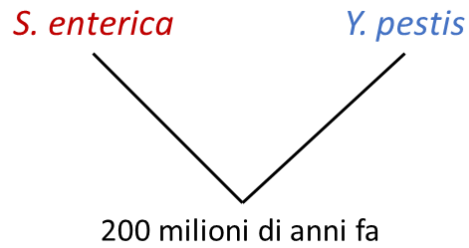
- **Duplicazione genica** e divergenza
- Trasferimento genico orizzontale (**HGT**)

Il bilancio fra gli eventi di duplicazione-divergenza e HGT varia da specie a specie.

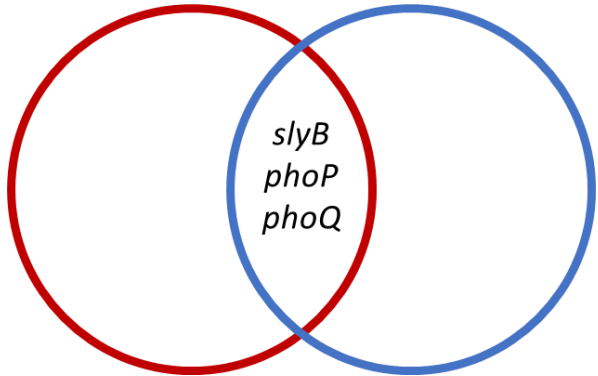
La **divergenza** in seguito alla duplicazione avviene principalmente con 2 meccanismi:

- Domain shuffling fra HK e altre proteine
- Sostituzioni: per esempio la sostituzione di Leu con Ile cambia la specificità di NorX da nitrati a nitriti

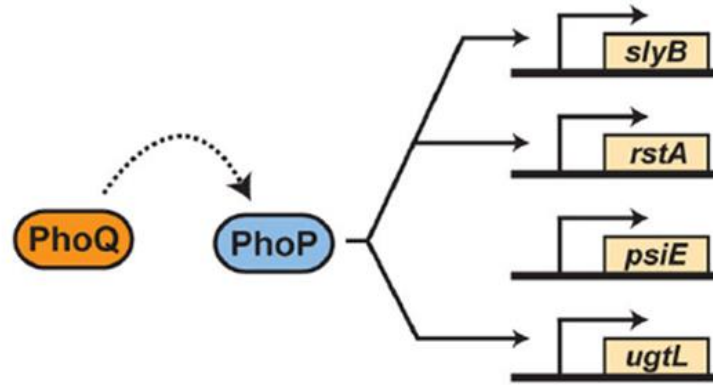




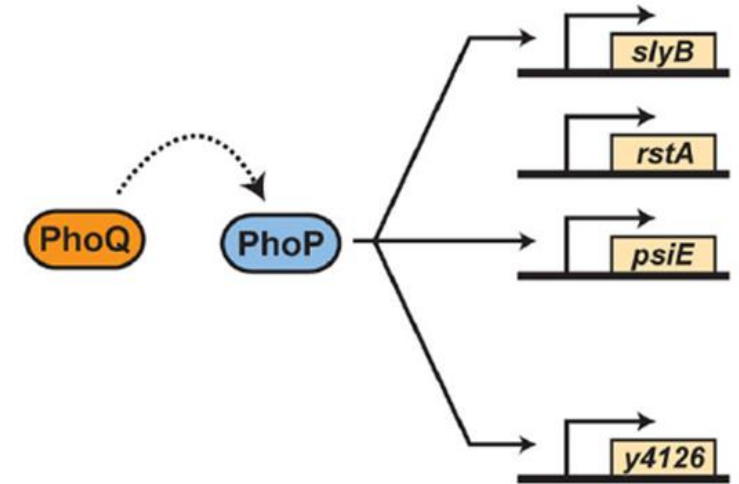
Regulone di PhoP in *S. enterica* e *Y. pestis*



Salmonella enterica



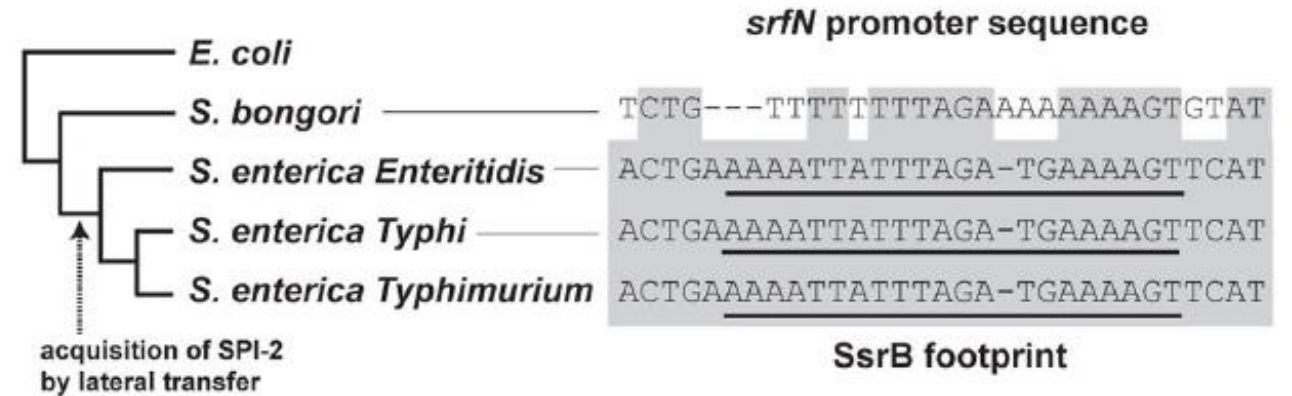
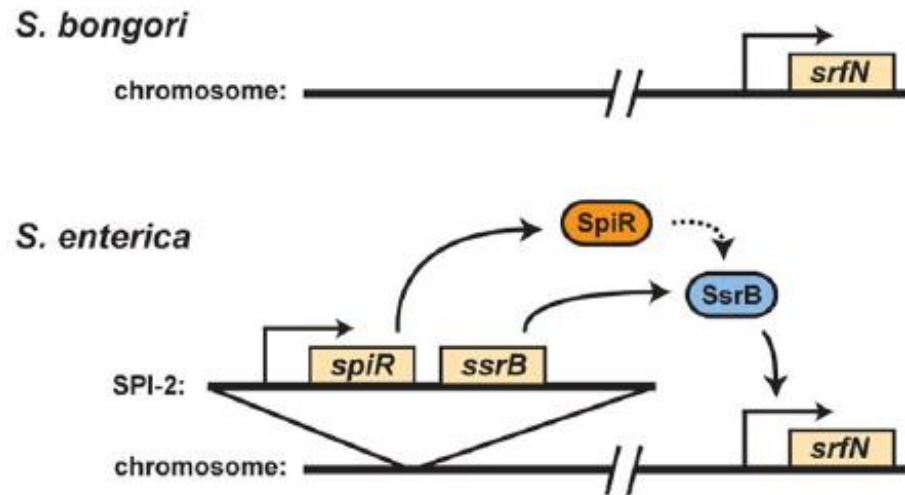
Yersinia pestis



Capra and Laub, 2012

La divergenza di manifesta anche nella **differenziazione degli output dei TCS**, come nel caso del sistema PhoPQ in *S. enterica* e *Y. pestis*. Solo 3 geni sono conervati nei regoloni di PhoP in entrambe le specie nonostante le sequenze del DNA riconosciute da PhoP siano le stesse.

- Spostamento dei binding sites
- Modifica dell'interazione con RNA polimerasi



Capra and Laub, 2012

Un altro esempio: la **formazione *de novo* di siti per il regolatore SsrB** in *S. enterica*.

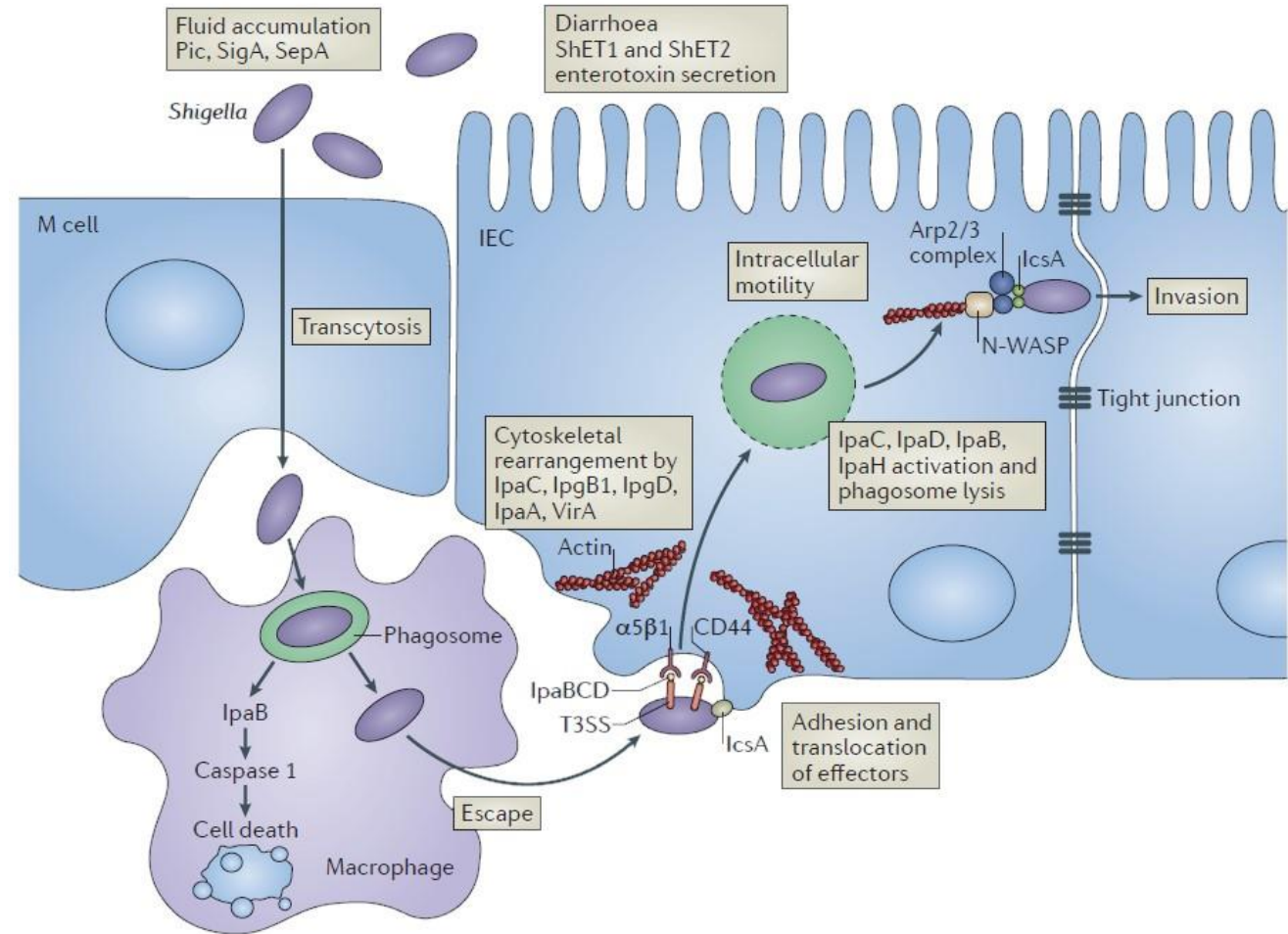
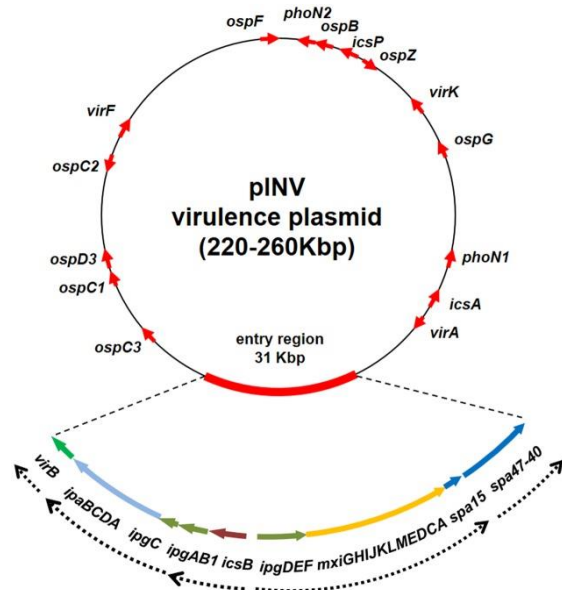
L'ampliamento e la diversificazione dei pathway regolatori può conferire un **vantaggio evolutivo** e permettere la colonizzazione di nuove nicchie ecologiche.

→ **Grande plasticità dei genomi batterici**. Possibilità di riprogrammare artificialmente i circuiti trascrizionali.

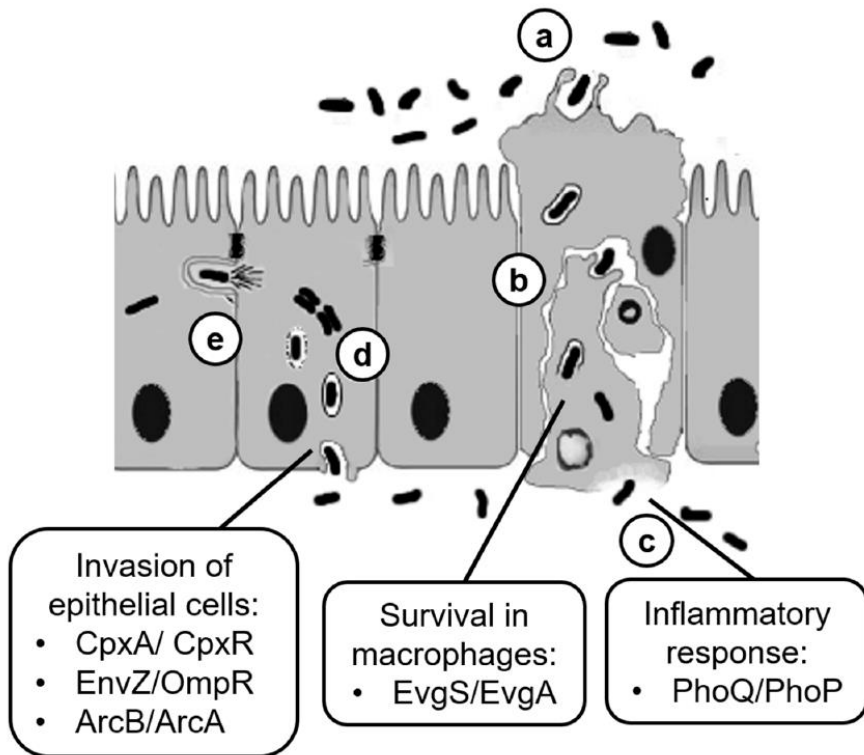
Virulenza e TCS: *Shigella flexneri*

Shigella è un **patogeno enterico umano**. Agente eziologico della shigellosi.

Evolutivamente appartiene alla specie *E. coli*, ma durante il processo di patoadattamento ha acquisito un **plasmide di virulenza** e modificato profondamente il proprio genoma.



The et al., 2016



I TCS presenti in *E. coli* hanno un **buon livello di conservazione** fra i 4 tipi di *Shigella*:

- *S. flexneri*
- *S. boydii*
- *S. dysenteriae*
- *S. sonnei*

Fra i TCS conservati, 5 sono noti per essere coinvolti nella virulenza.

Effect on	TCS	Gene Regulated by TCS	Targets
Invasion of epithelial cells	CpxA/CpxR	<i>virF, virB</i>	T3SS ^a and its effectors
	EnvZ/OmpR	<i>ompC</i>	OmpC porin
	ArcB/ ArcA	<i>iuc, sit</i> and <i>feo</i> ^b operons	Iron transport systems
Survival within macrophages	EvgS/EvgA	<i>emrKY</i>	EmrKY efflux pump
Inflammatory response and resistance to CAMPs ^c	PhoQ/PhoP	<i>virK, msbB2</i> , membrane biosynthesis genes	Synthesis and modification of cell envelope

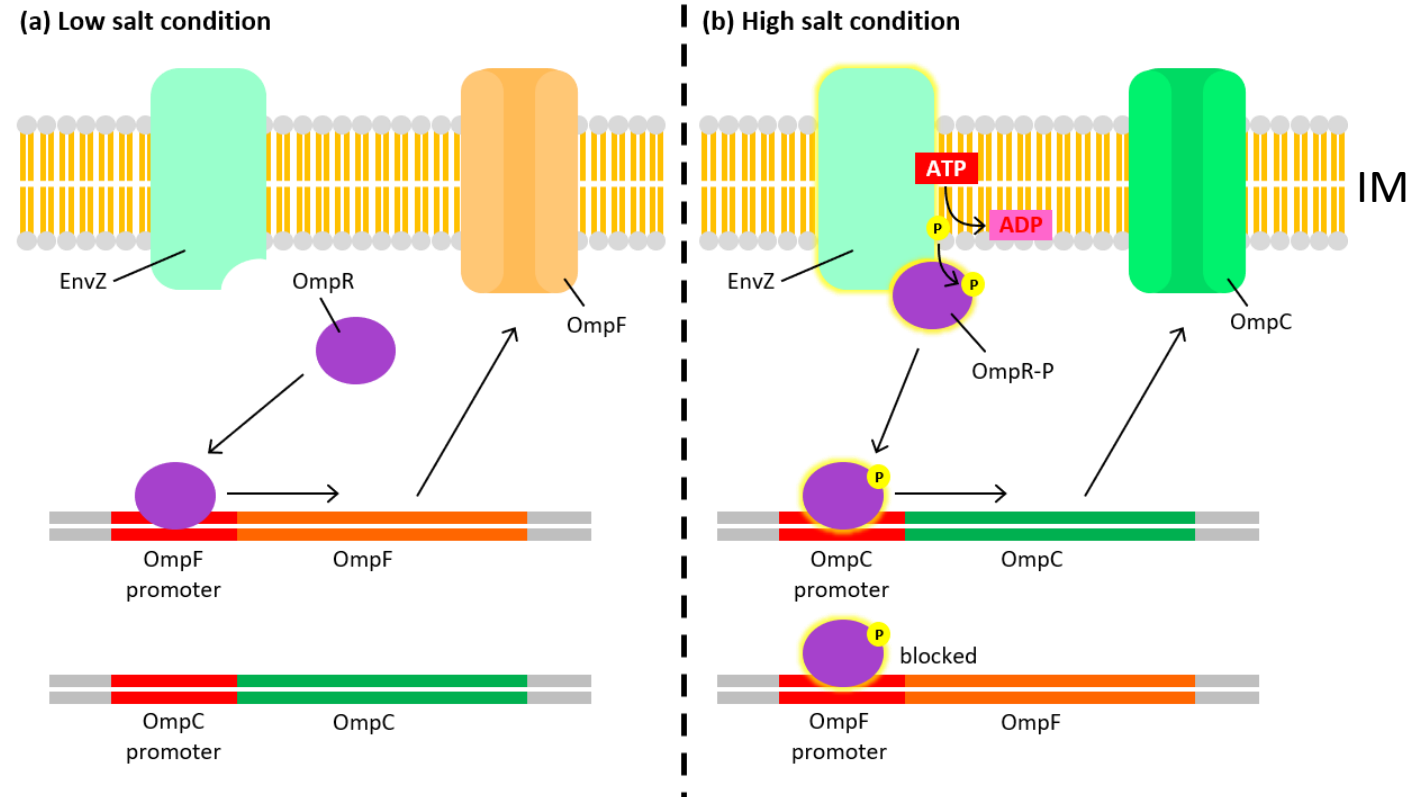
EnvZ/OmpR: osmolarità

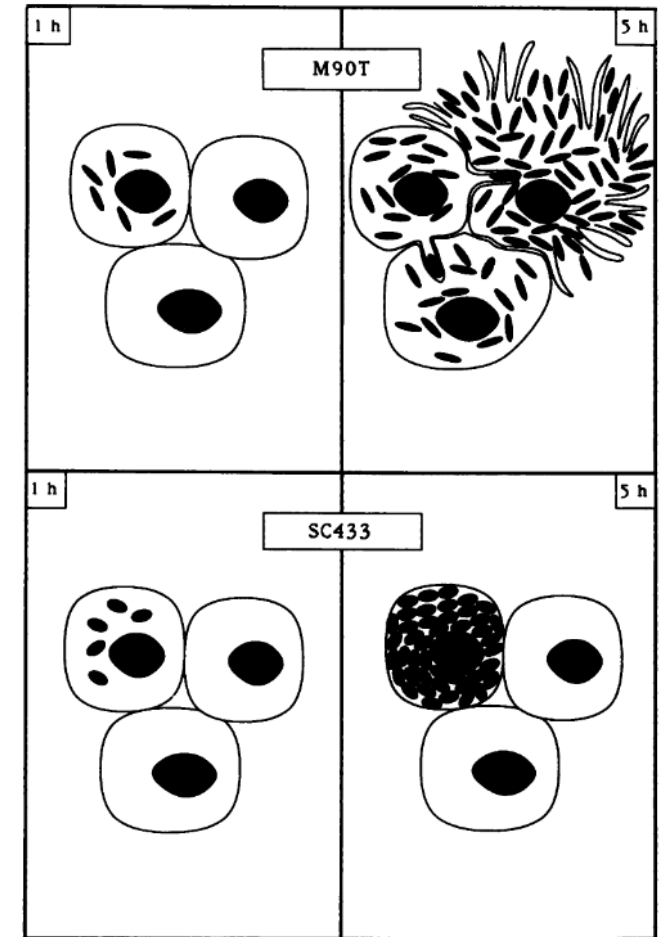
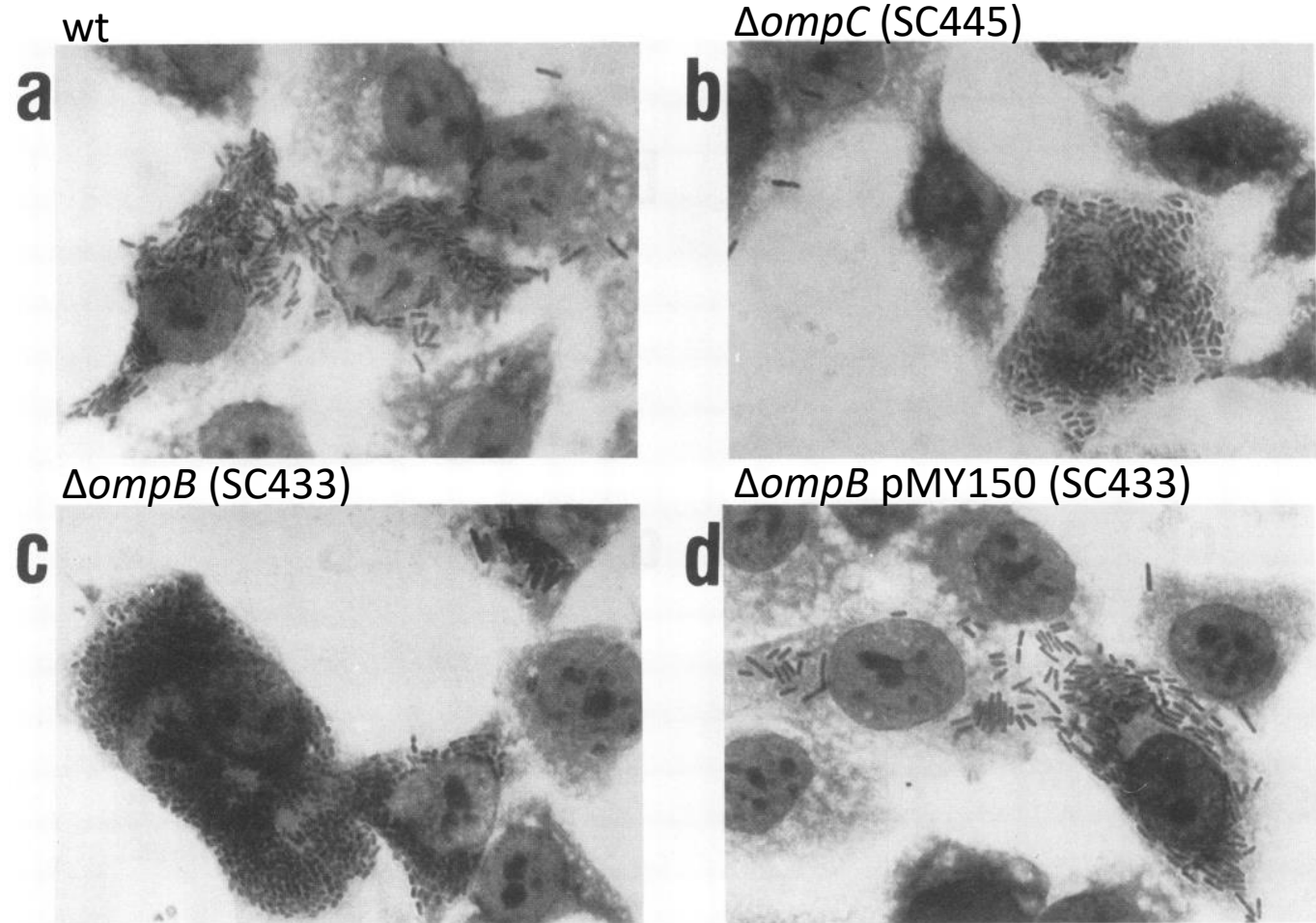
Il locus *ompB* codifica per:

- **EnvZ**: HK della membrana interna
- **OmpR**: RR citoplasmatico, legame al DNA

EnvZ/OmpR regola il rapporto delle **porine OmpC e OmpF** nella membrana esterna in risposta a cambi di **osmolarità**.

- **Bassa osmolarità** (ambiente esterno): sistema inattivo, trascrizione *ompF* → Ingresso nutrienti
- **Alta osmolarità** (ambiente intracellulare): sistema attivo, trascrizione di *ompC* → Blocco ingresso di grandi molecole





Le delezioni del locus *ompB* o del singolo gene *ompC* danno lo stesso fenotipo, l'incapacità di *Shigella* di evadere dalla cellula epiteliale.

Complementando la mancanza di OmpC con il plasmide pMY150 si recupera il fenotipo wt, suggerendo che **OmpC** sia necessaria per l'uccisione della cellula ospite e il movimento intercellulare.

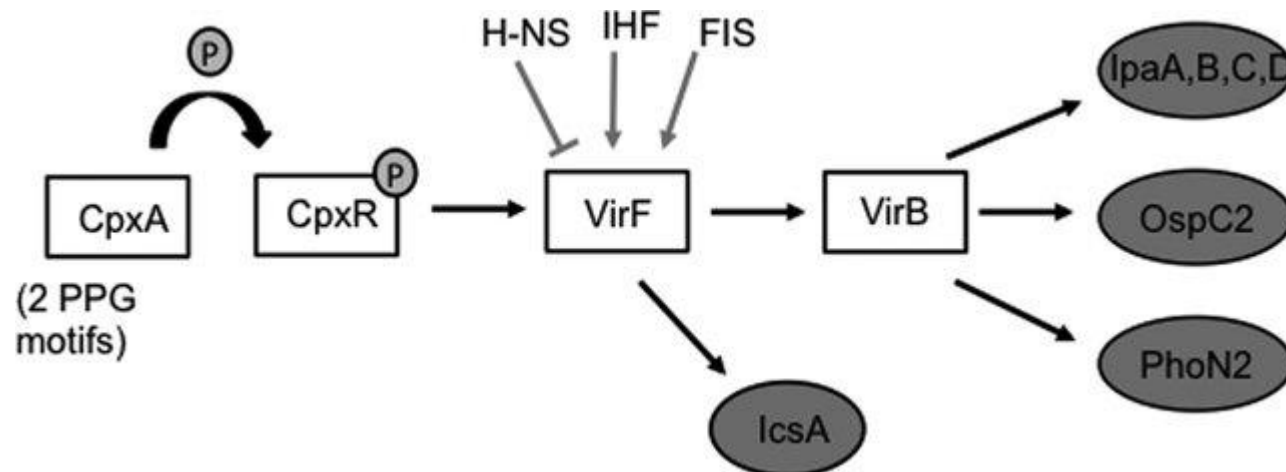
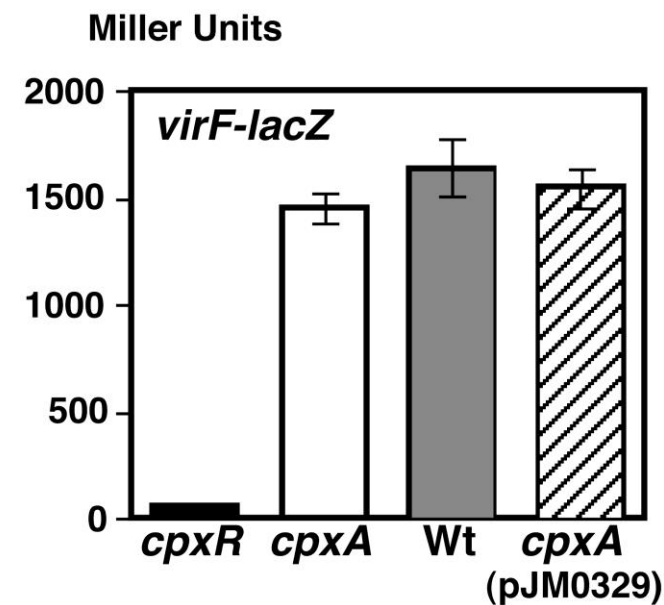
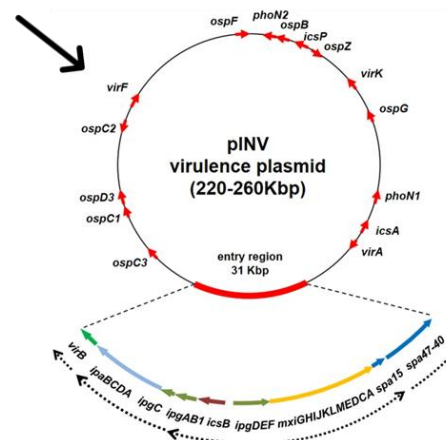
CpxA/CpxR: pH

Il sensore CpxA è attivato dal **pH alcalino**.

Il **pH acido** promuove l'attività **fosfatase** di CpxA.

Il RR CpxR fosforilato è in grado di legarsi a una regione del promotore di *virF*, il regolatore principale della virulenza di *Shigella*.

→ **Repressione di *virF* a pH acido.**



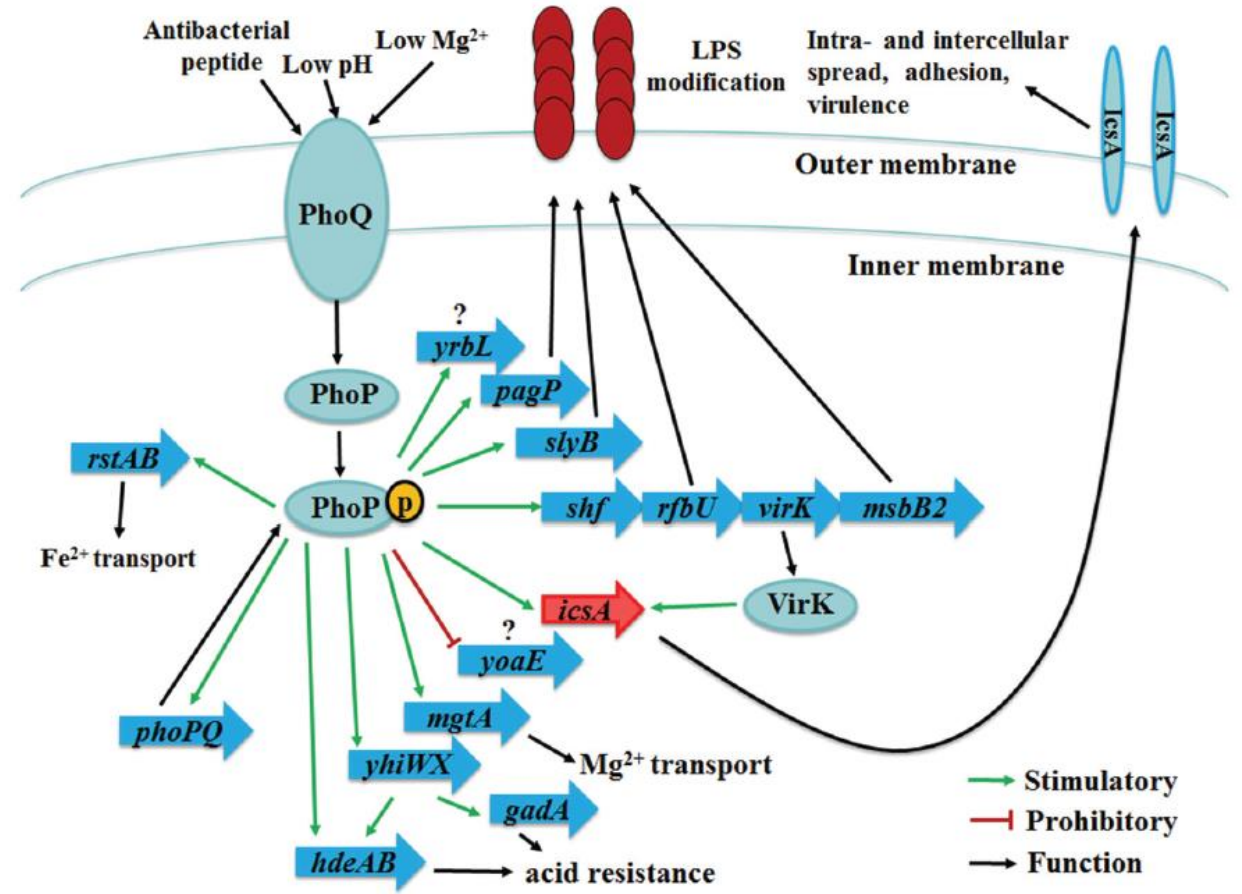
PhoP/PhoQ: ioni divalenti

PhoP: sensore HK nella IM

PhoQ: RR citoplasmatico, legame al DNA (PhoP box)

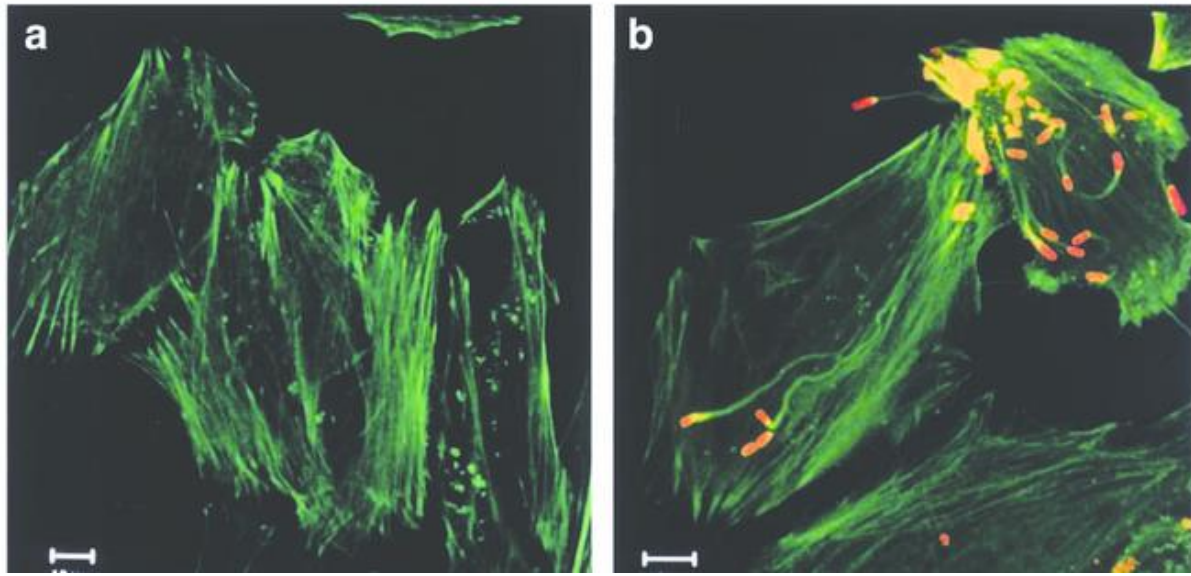
Segnali:

- Concentrazioni micromolari di Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺
- pH leggermente acido
- Peptidi cationici antimicrobici
- Stress iperosmotico (NaCl > 150 mM)



<i>slyB</i>	AATAATCATCATGAATGTTTGGTTTATAATTGGTTG
<i>acrA</i>	GCAGCAATGGGTTTATTAACCTTTGACCATTGACCA
<i>ybaD</i>	TGCGCCTTTGTGTATCGTCAGTTCAGGGTAAAATA
<i>malS</i>	AAATCTGAAACTATGTCACGTGTTAACGATTCAGAT
<i>yeaD</i>	AGCGACTTCGGTCGCTCTTTTTCCTGATAAAA
<i>napF</i>	AAATGGCTTATTAATTATGCGGTTTATTTGGTCGCT
<i>yhcL</i>	CATCGTTGTTTCAATCTGCCGTTTATGGGATTGAC
<i>cchB</i>	GTCACGCTCTCTCCTTTTTCATTTACCTTCTGCGG
<i>nlp</i>	TTCACACTCTTACAGGAACTTTTACAGCAATAGG
<i>ygfF</i>	TCTAAAGGCGCTTCGGCGCCTTTTATGTCAGATGAC

Il regulone di PhoQ include geni coinvolti nel metabolismo generale e nelle **modifiche all'envelope**



Fra i geni regolati da PhoPQ c'è **IcsA**, coinvolto nella nucleazione delle *comet tails* di **actina** per il movimento intra e intercellulare.

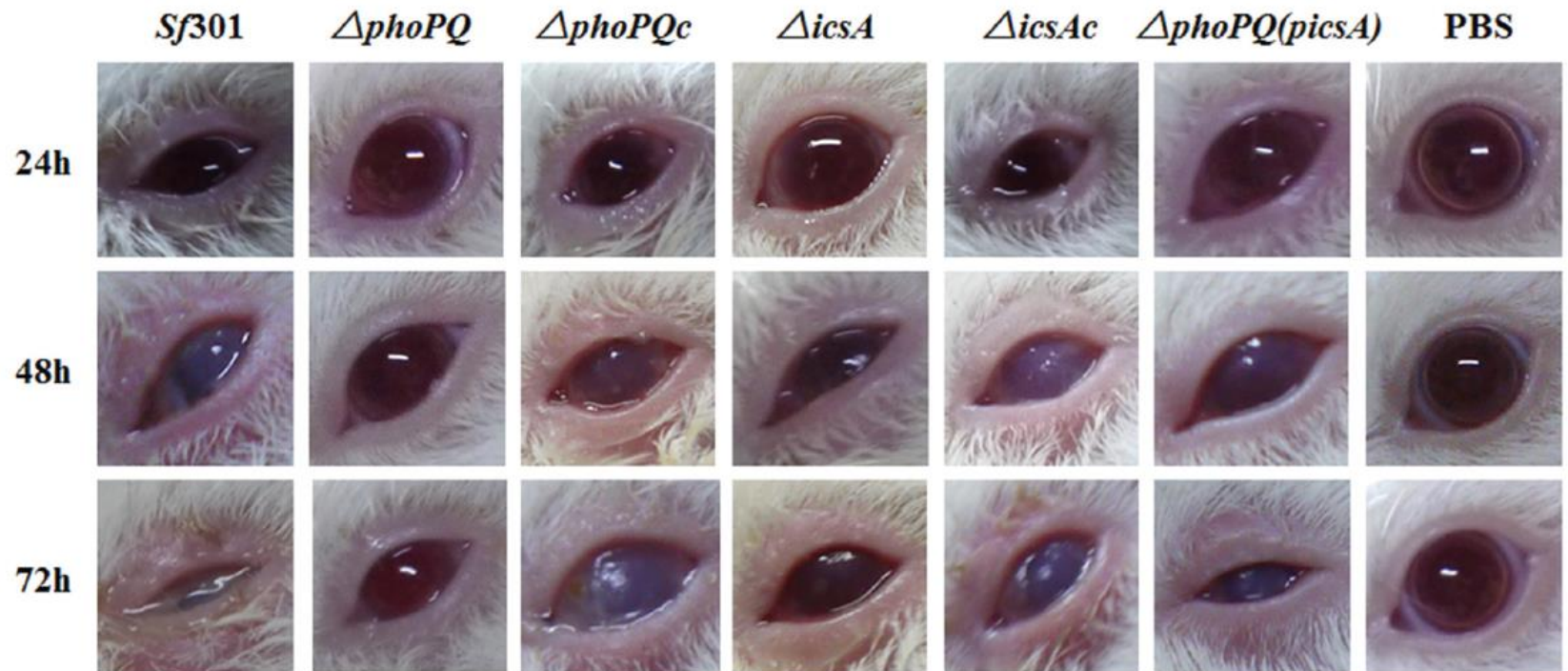
Legame **diretto** di PhoP al promotore di *icsA*, ma anche regolazione **indiretta** mediante il fattore VirK.

Mounier et al., 1999

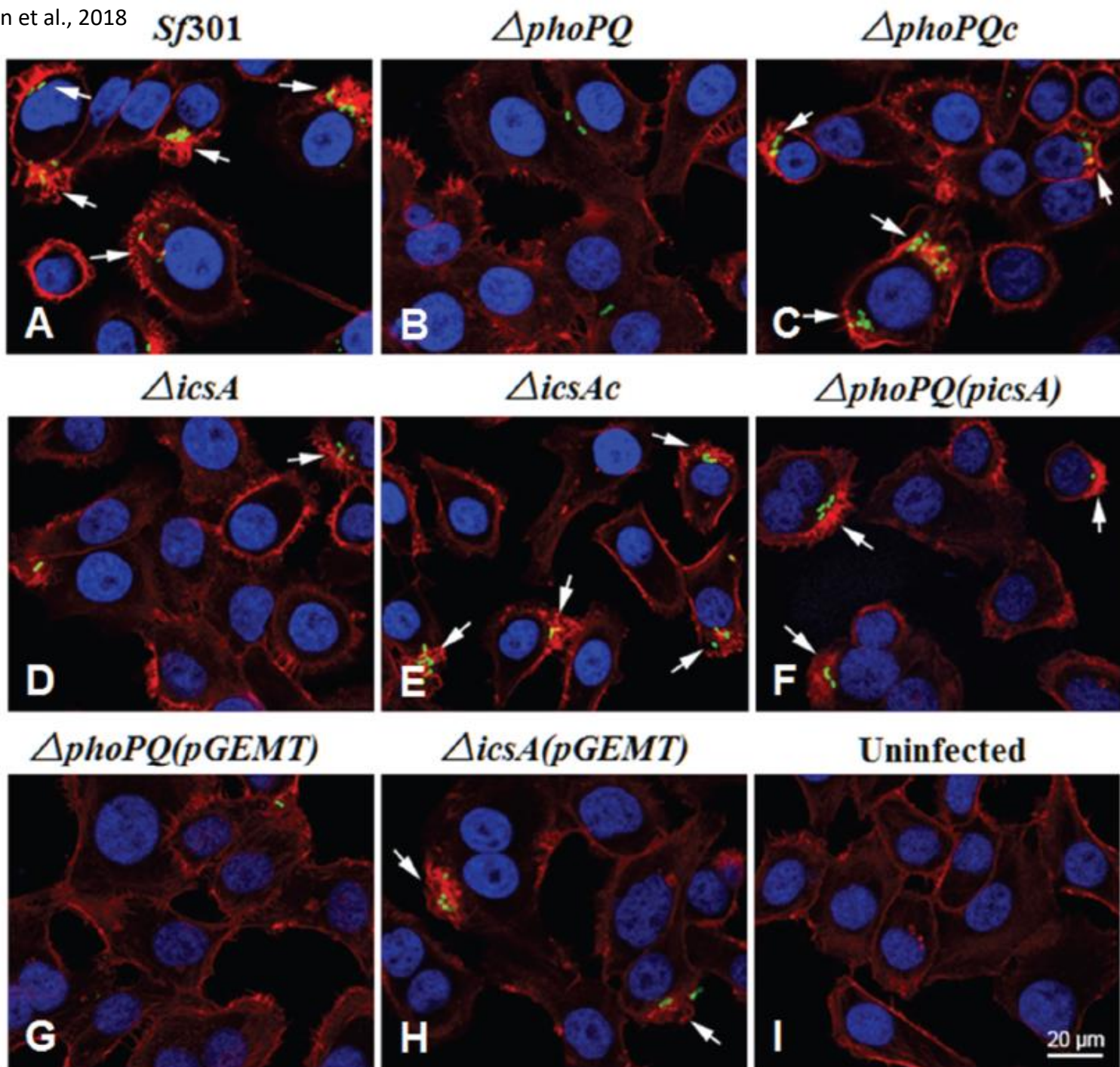
Sereny Test:

La delezione di *phoPQ* inibisce la capacità di *Shigella* di causare cheratocongiuntivite nel modello porcellino d'india.

Il fenotipo è recuperato con la complementazione di *IcsA*.



Lin et al., 2018

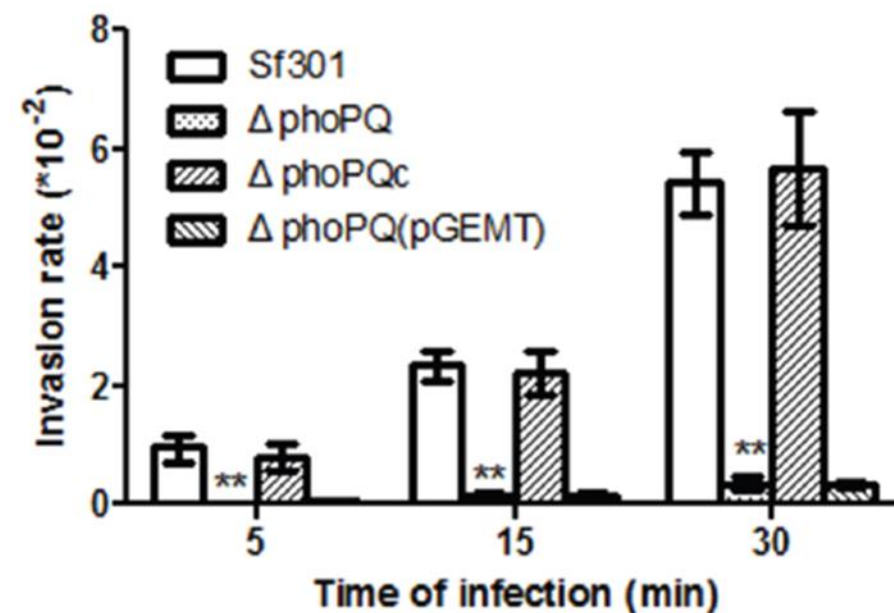


A livello microscopico...

L'assenza del sistema PhoPQ:

- Inibisce la formazione di actina
- Diminuisce l'invasion rate
- Diminuisce il membrane ruffling

Anche in questo caso il fenotipo wild type è recuperato con la complementazione di IcsA.



EvgA/EvgS: pH acido

Conservato **solo in *E. coli* e *Shigella***.
 Simile a BvgA/BvgS di *B. pertussis*.

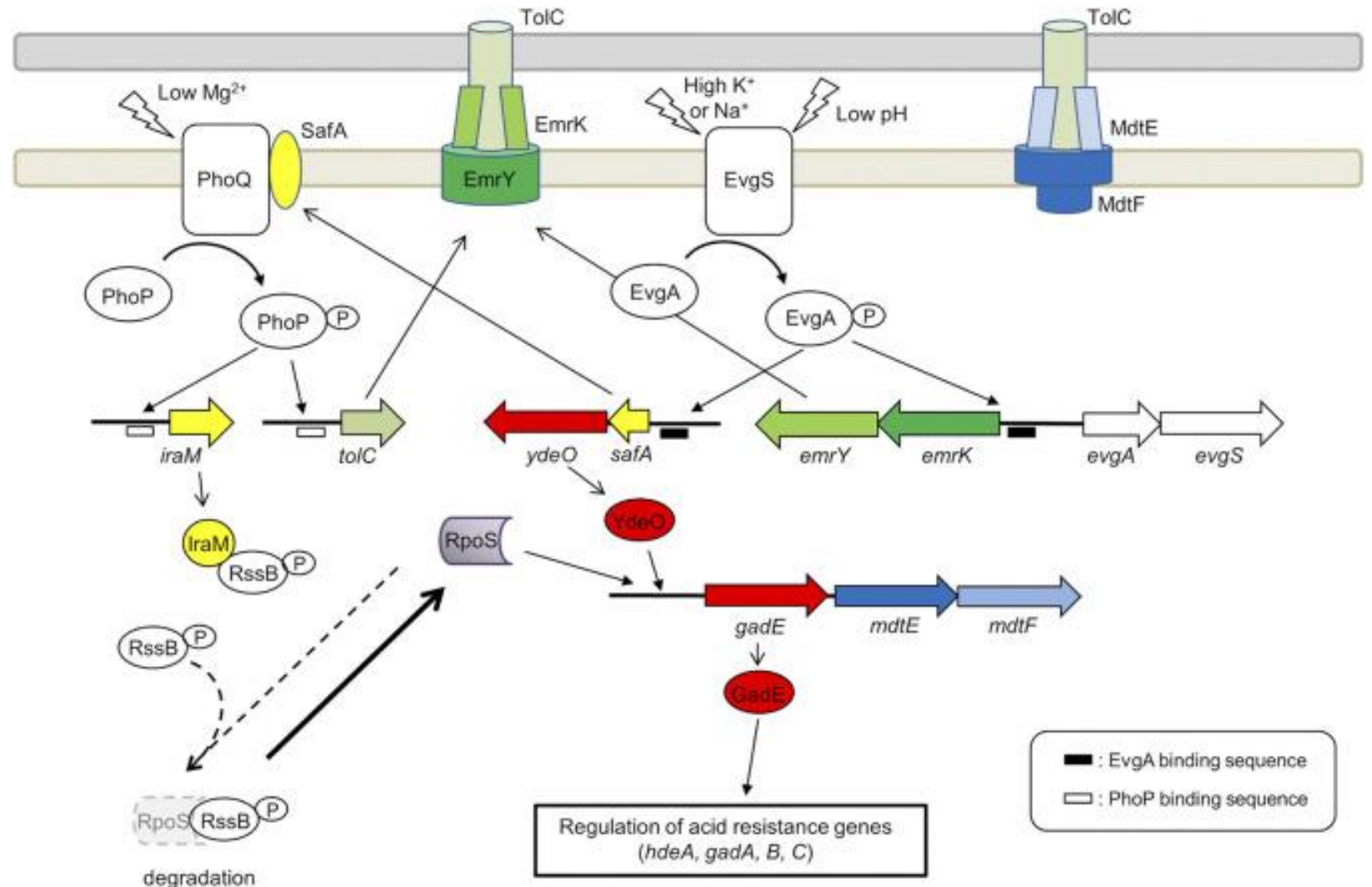
Regolazione diretta operone ***emrKY***
 codificante per una pompa a efflusso
MDR.

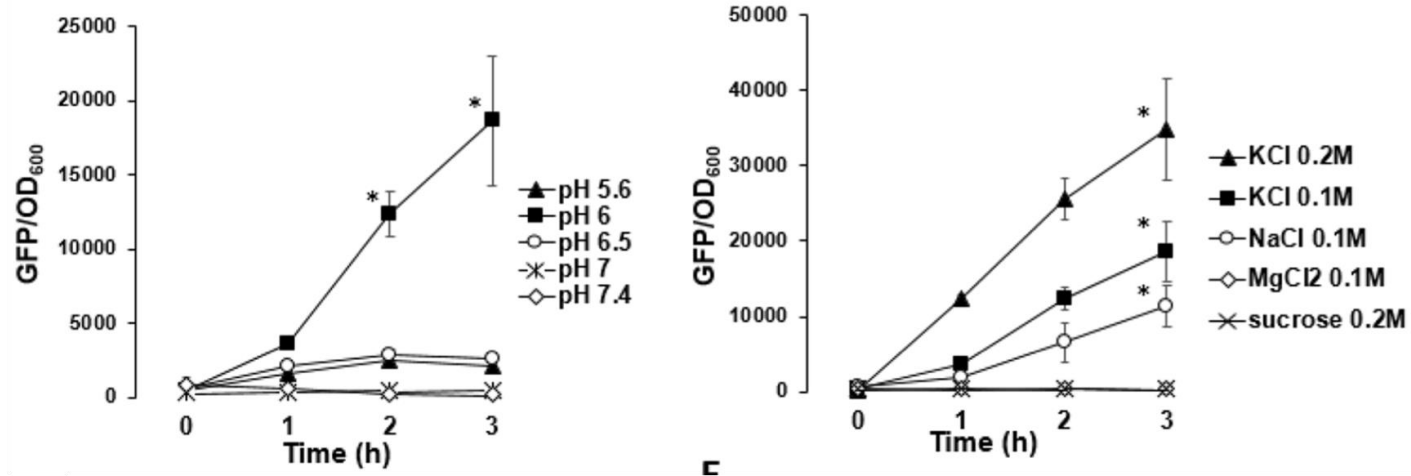
Il regulone di EvgA include anche
 altre pompe MDR e geni per **l'acid
 resistance**.

Segnali:

- **pH legg. Acido (5-6)**
- Aerobiosi
- $\text{Na}^+/\text{K}^+ > 100 \text{ mM}$

→ Repressione nel colon





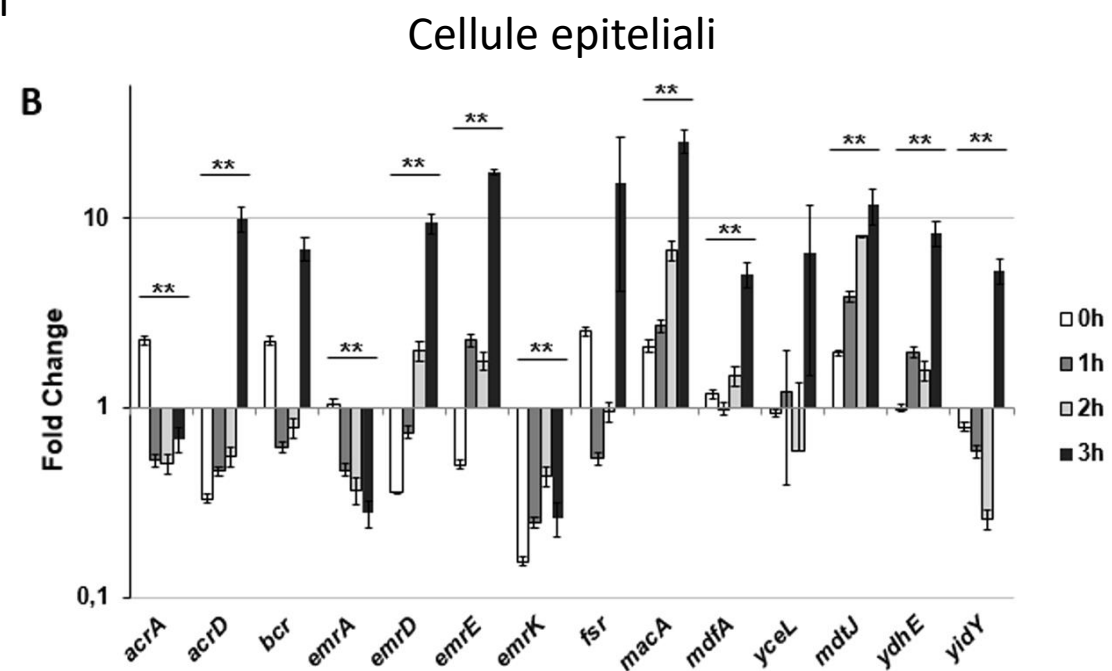
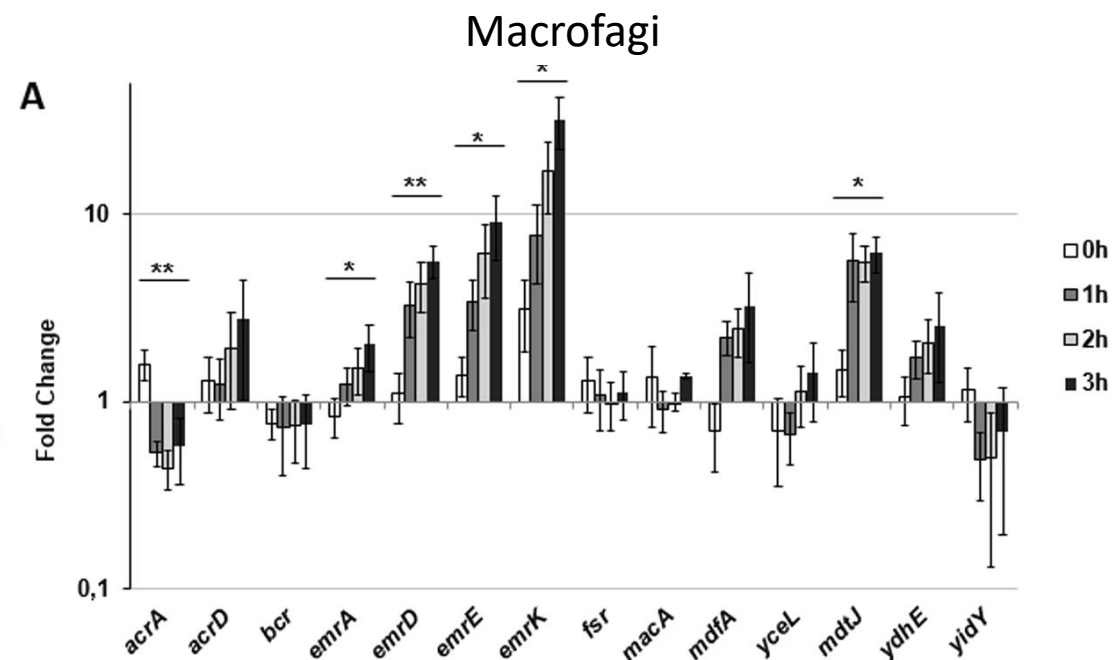
Durante l'infezione dei **macrofagi**, ma non delle cellule epiteliali, i geni *emrKY* vengono indotti.

Ambiente intrac. macrofagico:

- Elevata [K⁺]
- Il pH scende a 6 dopo l'infezione

Ambiente intrac. Epiteliale:

- pH neutro



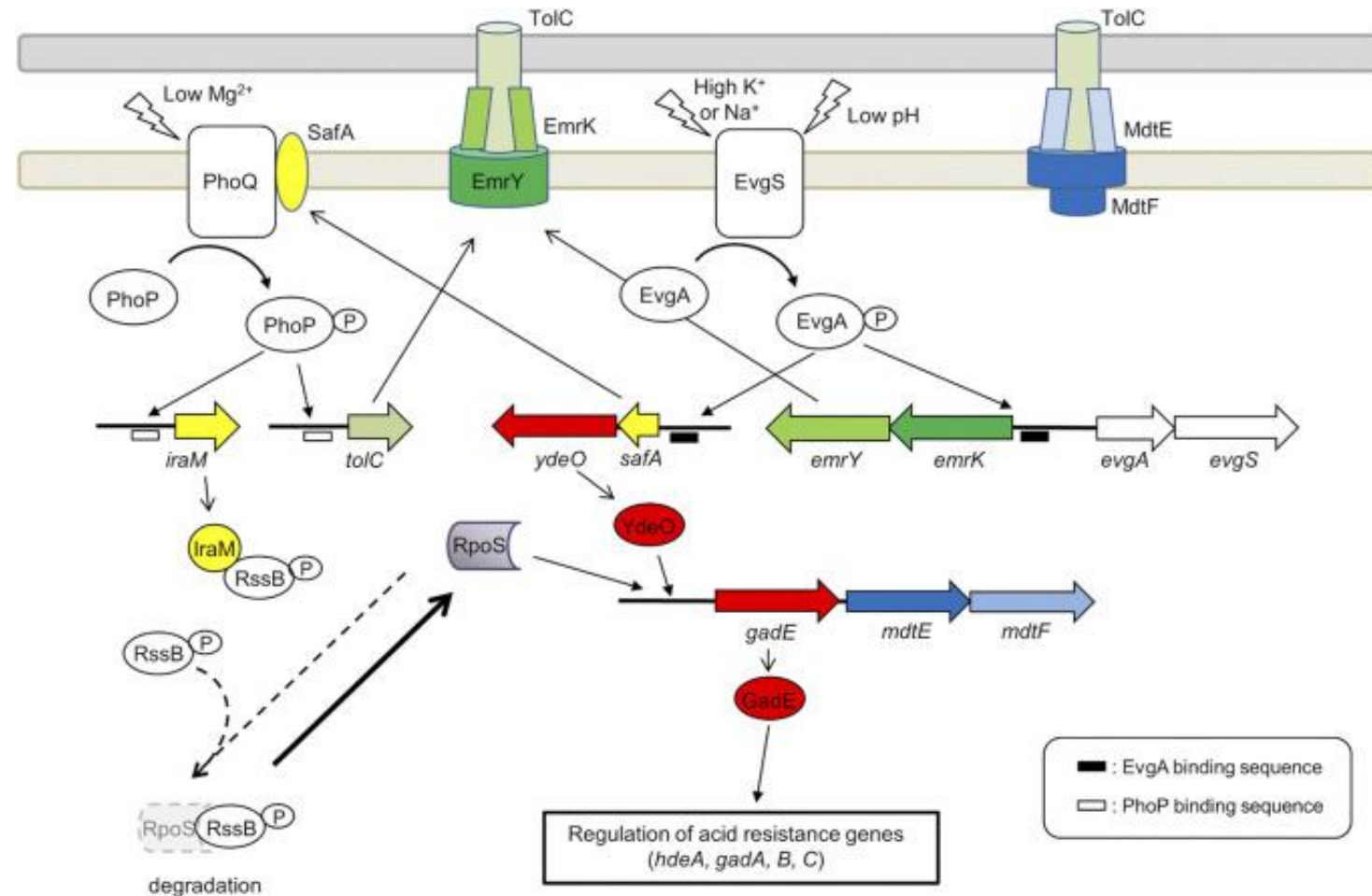
Sistemi interconnessi

In *E. coli* è stata studiata la proteina della IM **SafA**, che connette il sistema **EvgA/EvgS** a **PhoP/PhoQ**.

La porzione C-terminale di SafA induce autofosforilazione di PhoQ.

SafA è presente solo in *E. coli* e *Shigella*.

Probabilmente il meccanismo è conservato anche in *Shigella*.



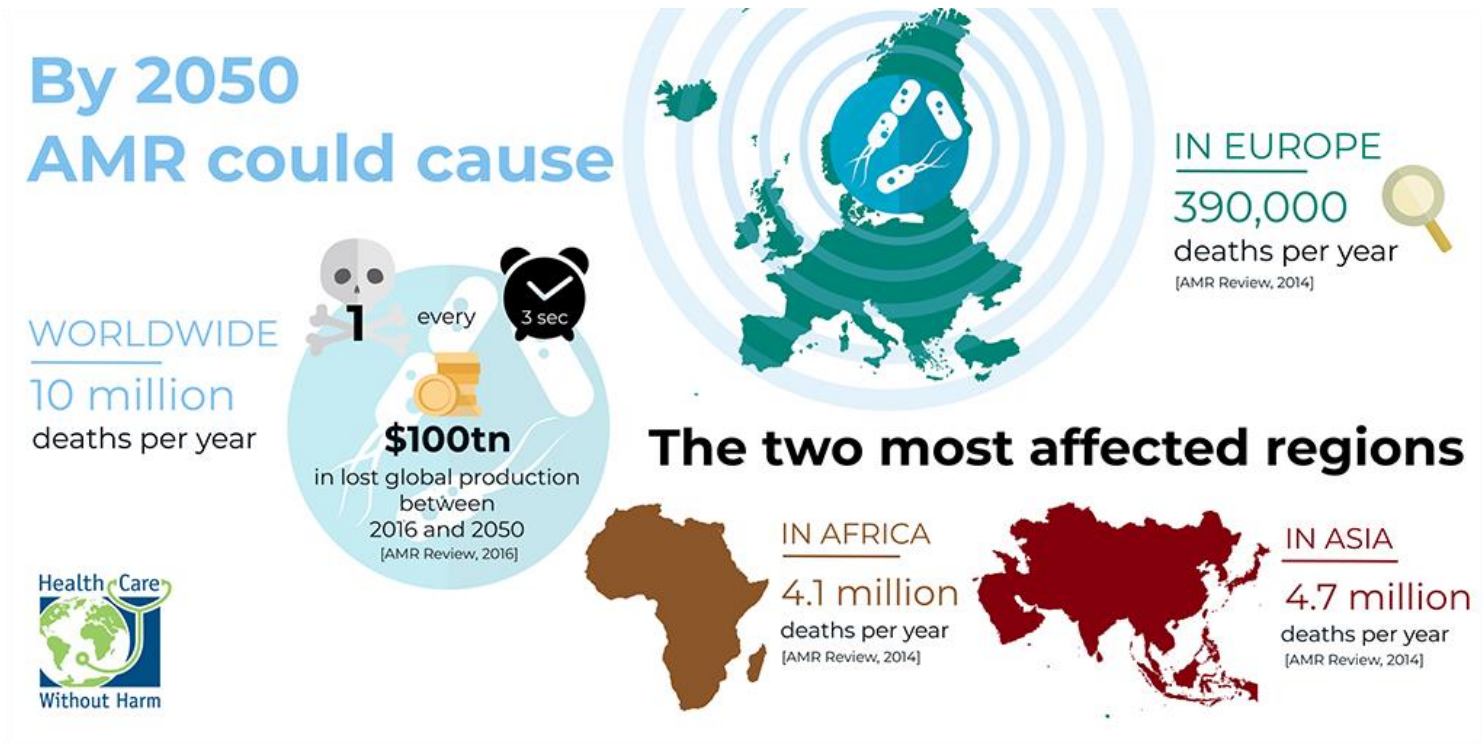
Inibitori dei TCS

Abbiamo la necessità di trovare **alternative agli antibiotici**:

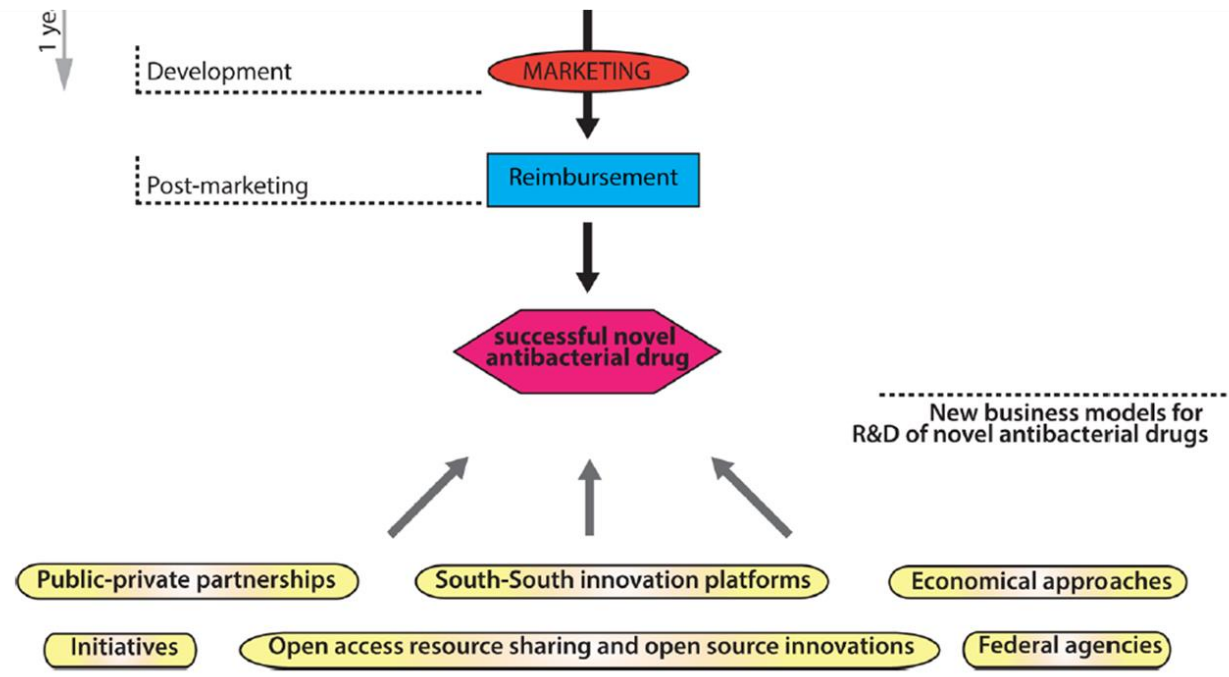
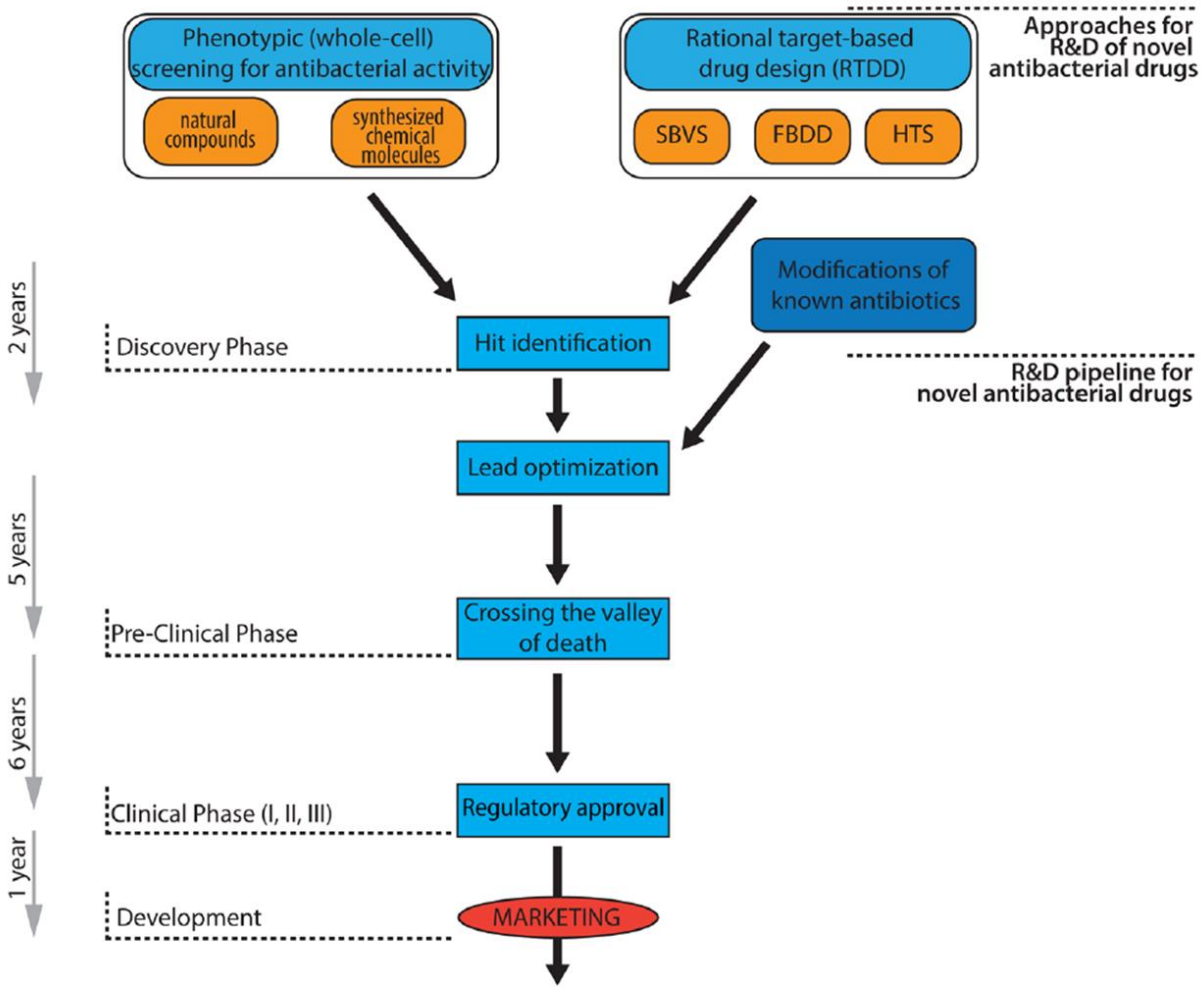
- Aumento ceppi MDR
- Terapie prolungate
- Co-morbidity con malattie immunosoppressive
- Fase di latenza batterica con stato dormiente
- Lento sviluppo di nuovi antibiotici

Trovare nuovi target batterici, ma con quali caratteristiche?

- No omologhi nell'umano o proteine strutturalmente simili
- Alto livello di conservazione
- Essenziali per la sopravvivenza batterica
- Attività misurabile
- Disponibilità di dati strutturali



Il lungo percorso per lo sviluppo di nuovi antibiotici

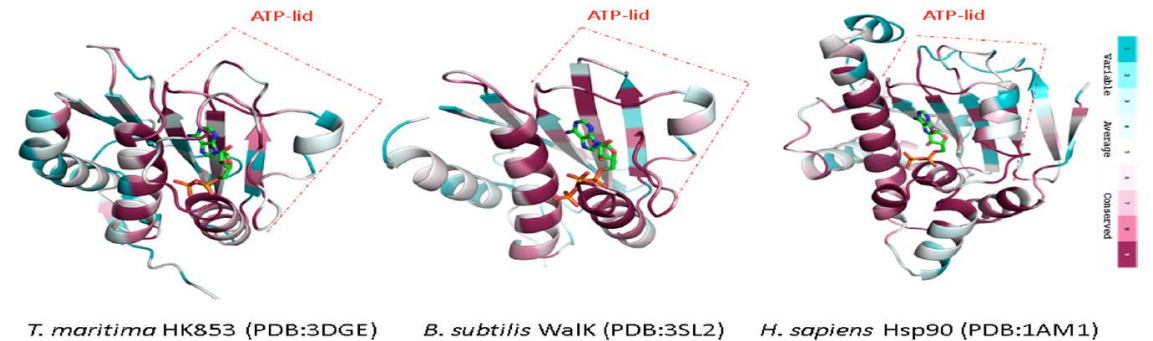


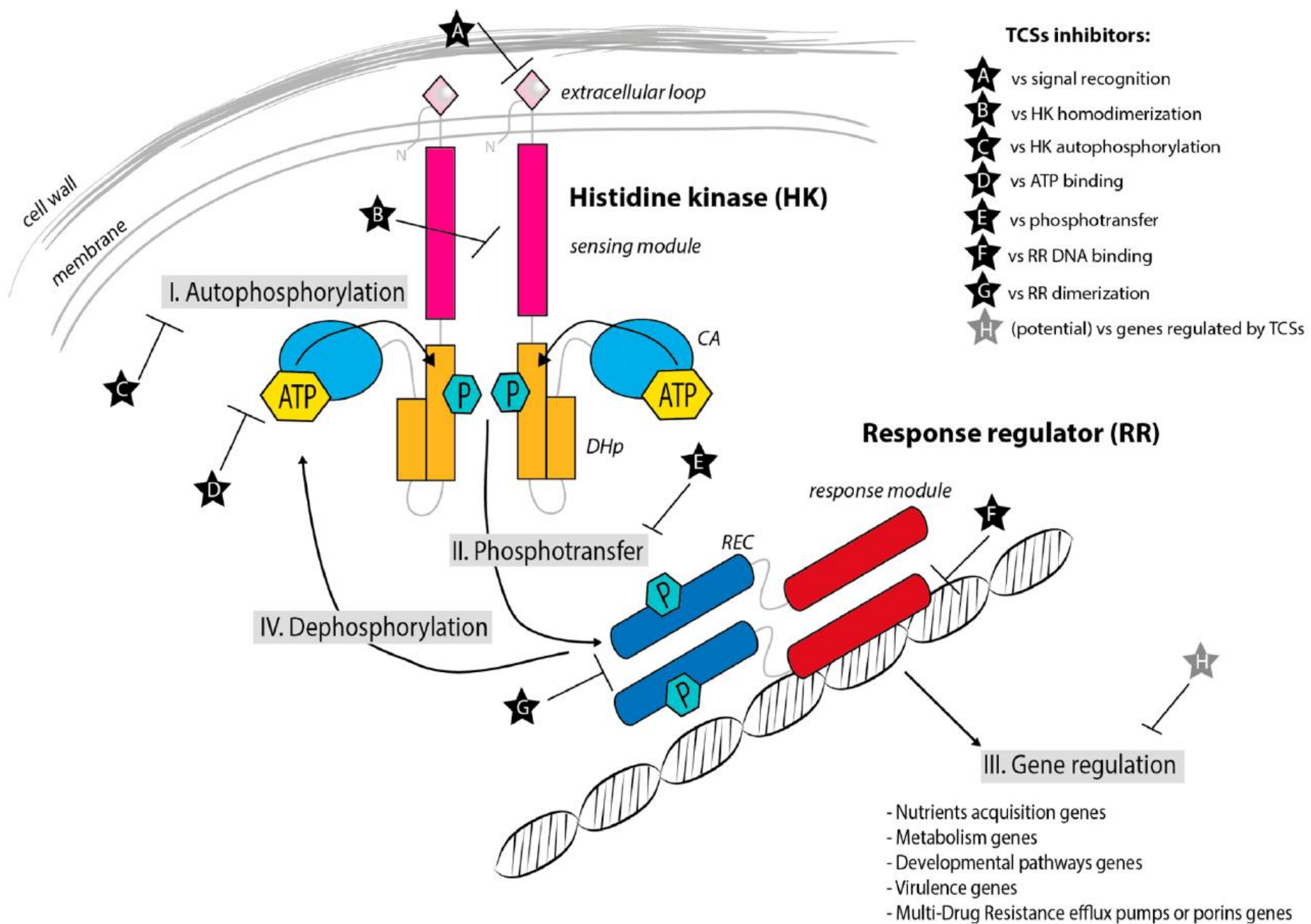
PRO

- Gli HK sono molto conservati
→ targeting simultaneo di più TCS e più patogeni
→ insorgenza più lenta di resistenze
- Non esistono HK negli esseri umani
- Molti fenotipi di virulenza e di antibiotico resistenza sono regolati da TCS
- Molti TCS sono essenziali per crescita e sopravvivenza
- Disponibilità di saggi per misurarne l'attività
- Disponibilità di dati strutturali

CONTRO

- Gli HK sono molto conservati
→ effetto sul microbiota
- Le proteine GHKL (DNA girasi, Hsp90, MutL) e alcune proteine mitocondriali hanno una Bergerat fold strutturalmente simile alle HK
- Ancora non disponibili per l'uso clinico





Sequestro del segnale

Inattivare il TCS senza colpirlo.

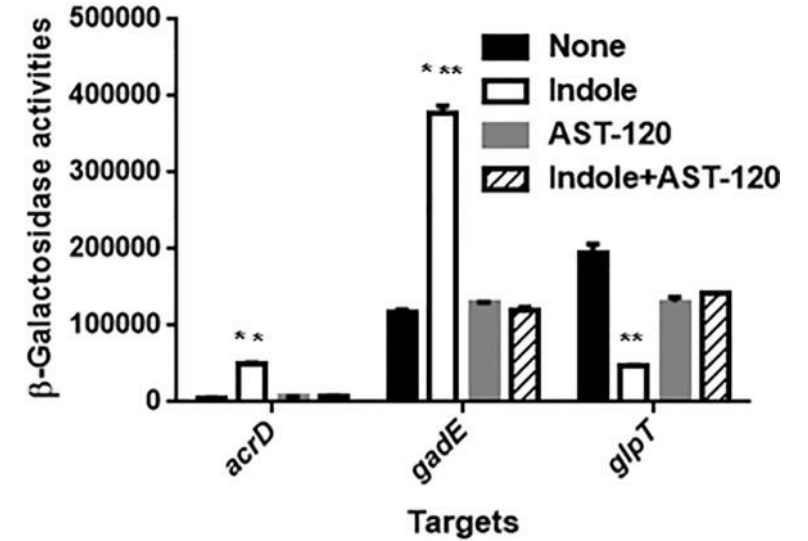
L'**AST-120** è costituito da particelle sferiche di carbonio con funzione assorbente. Usato nel trattamento di disturbi renali cronici per la sua capacità di adsorbire l'**indolo**, precursore della tossina uremica prodotta da batteri enterici.

L'indolo è percepito da **CpxA e BaeS** → attivazione di CpxR e BaeR.

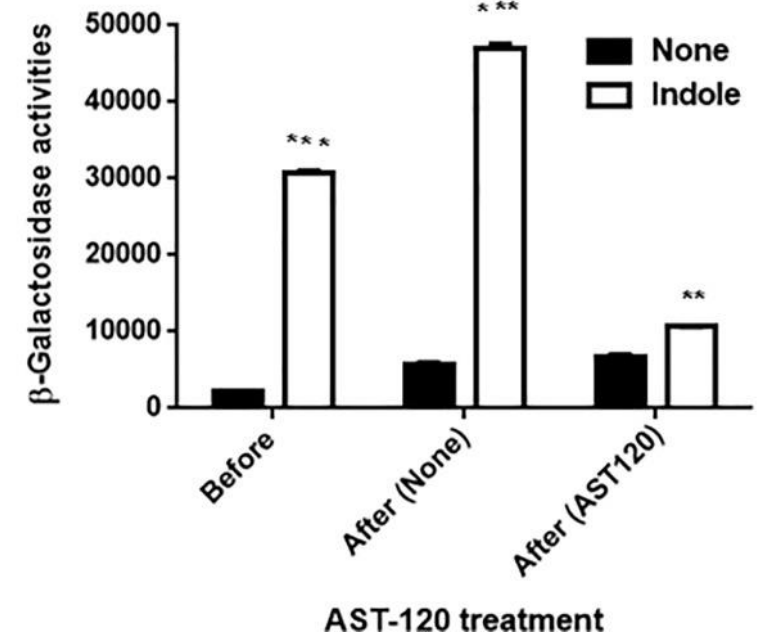
Aumento dell'antibiotico resistenza in *E. coli*, *Shigella* e altri ceppi patogeni di *E. coli*.

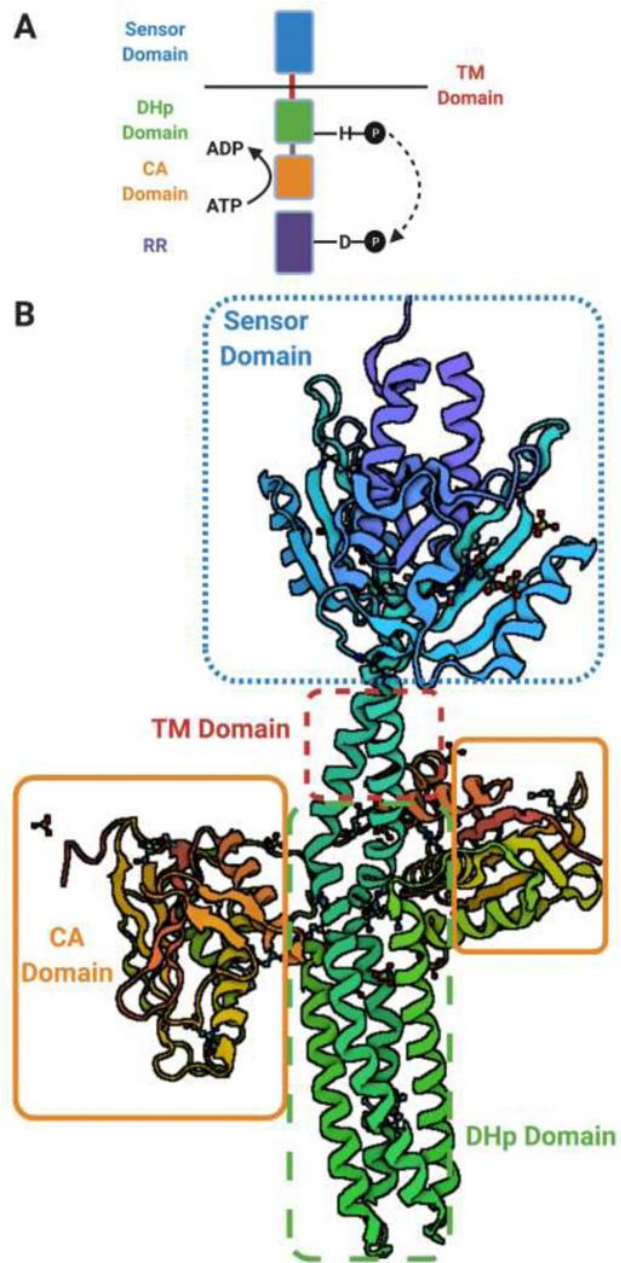
L'adsorbimento dell'indolo impedisce l'attivazione di CpxA e BaeS.

A



B





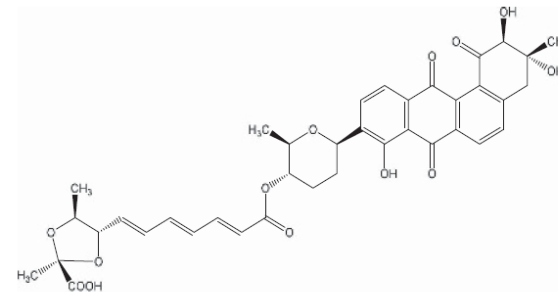
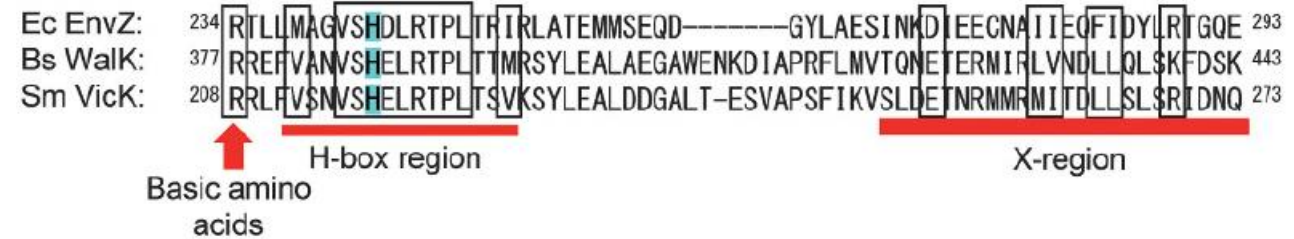
Inibizione del sensore

L'attività del sensore dipende dalla fosforilazione con il gruppo fosfato dell'ATP e da un residuo conservato di istidina, differentemente dalle chinasi di mammifero che si basano su serina o treonina.

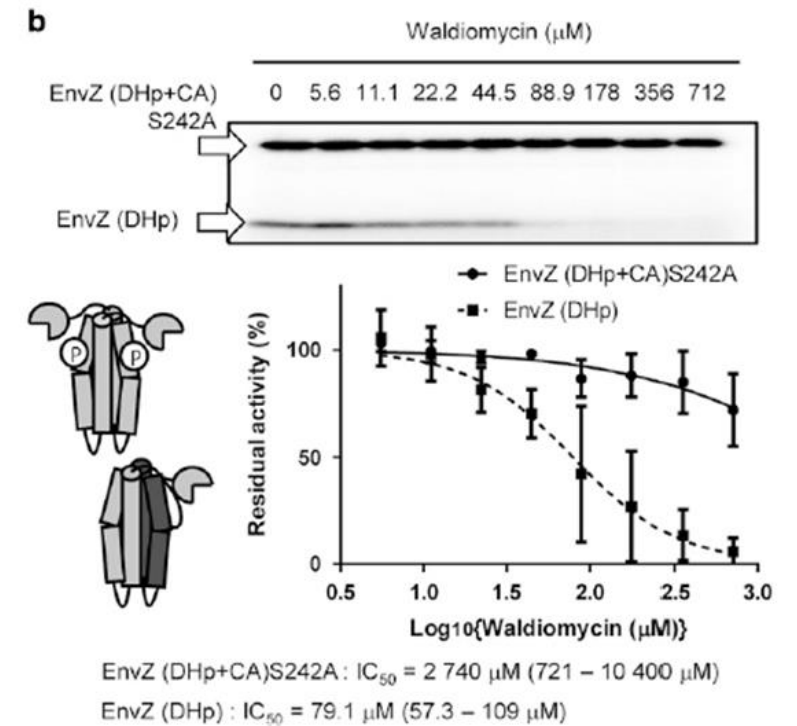
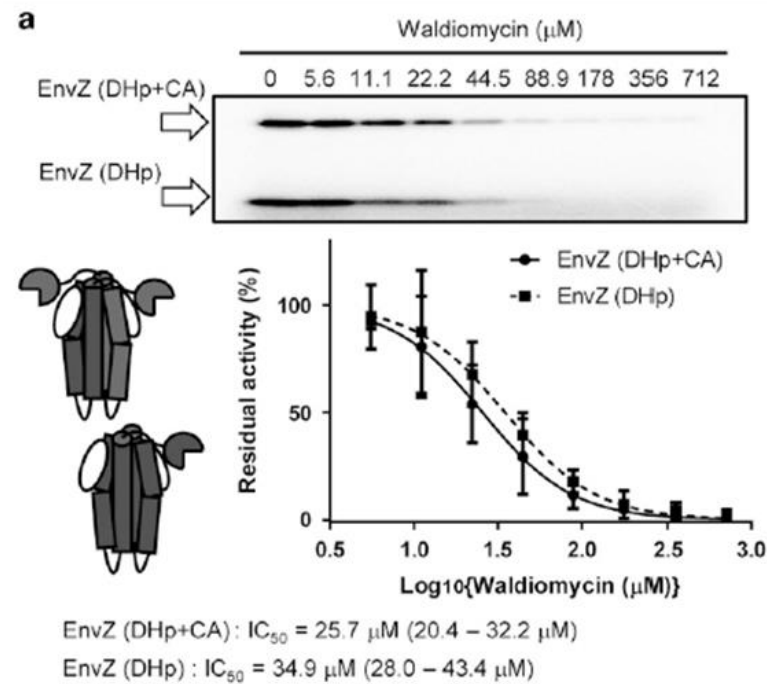
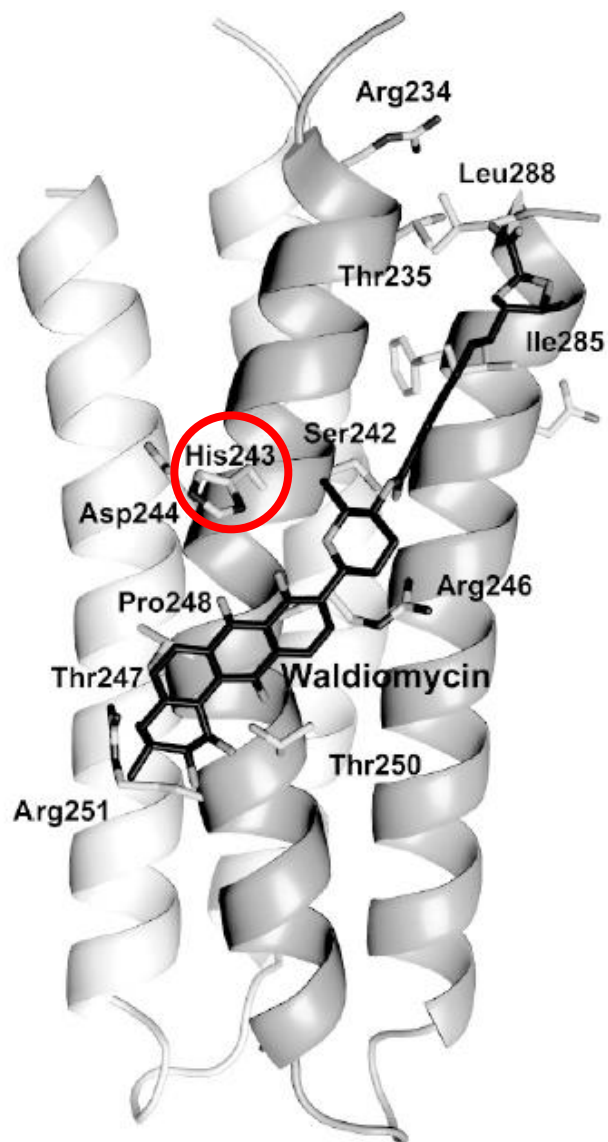
Alcuni inibitori agiscono come **ATP competitors** legandosi al dominio CA.

Altri inibitori possono legarsi alla porzione del dominio DHp contenente il residuo conservato di istidina, la **Hbox**.

→ **Waldiomicina**



Waldiomicin



La **waldiomicina** è stata isolata da un ceppo ambientale di *Streptomyces*.

Il nome deriva dal sistema **WalkR**, essenziale in batteri Gram-positivi come *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

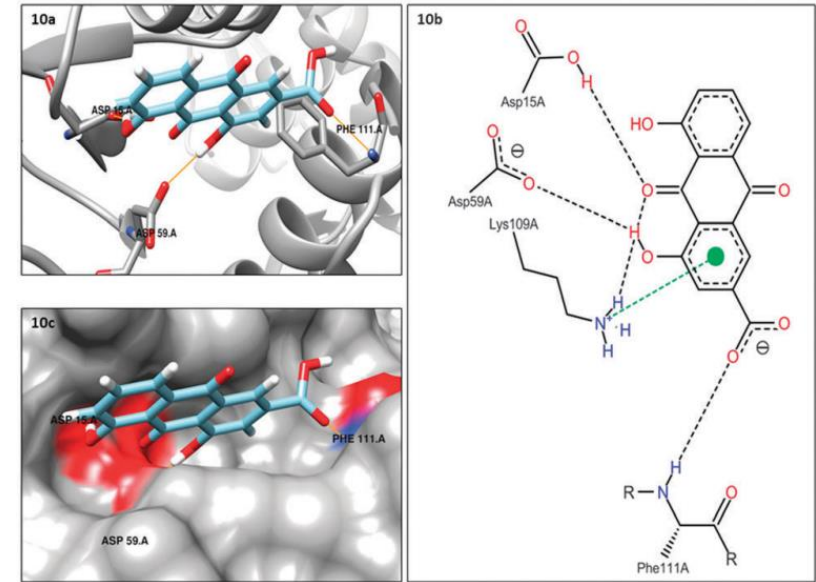
Attivo anche contro molte HK di Gram-negativi, incluso *E. coli*.

Inibizione del regolatore

I più comuni meccanismi di azione sono:

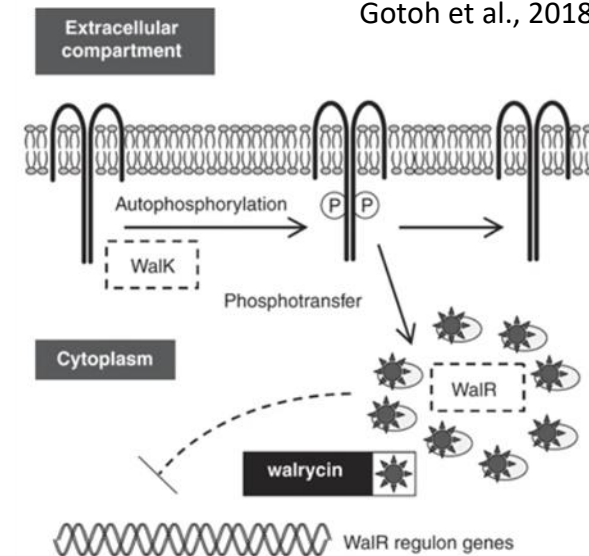
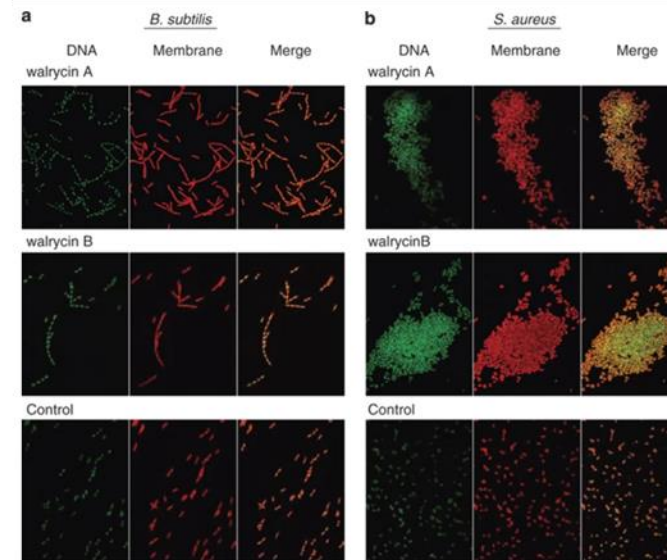
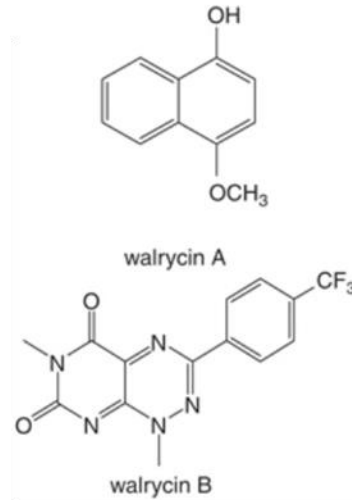
- Inibizione della **fosforilazione su Asp**

La rheina, un composto appartenente agli antrachinoni estratto da alcune piante, impedisce la fosforilazione di Asp59 del RR PhoP in *Corynebacterium pseudotuberculosis*.



- Inibizione del **legame al DNA**

La walricina A e la walricina B colpiscono il regolatore WalR del sistema WalKR con un effetto fenotipico diverso in base alla specie analizzata (*B. subtilis* e *S. aureus*).



Non sempre i regolatori sono fedeli al loro sensore, per questo colpire un sensore potrebbe non inattivare il regolatore associato.

Prospettive future

- Miglioramento strutturale
 - Rimozione degli anelli aromatici e strutture eterocicliche per **ridurre l'idrofobicità**
- Studi di citotossicità e studi ***in vivo***
- Studio delle fasi **ADME** (Adesione, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) della farmacocinetica
- **Terapie combinate** con antibiotici noti
- Analisi ***in silico*** per identificare nuovi composti