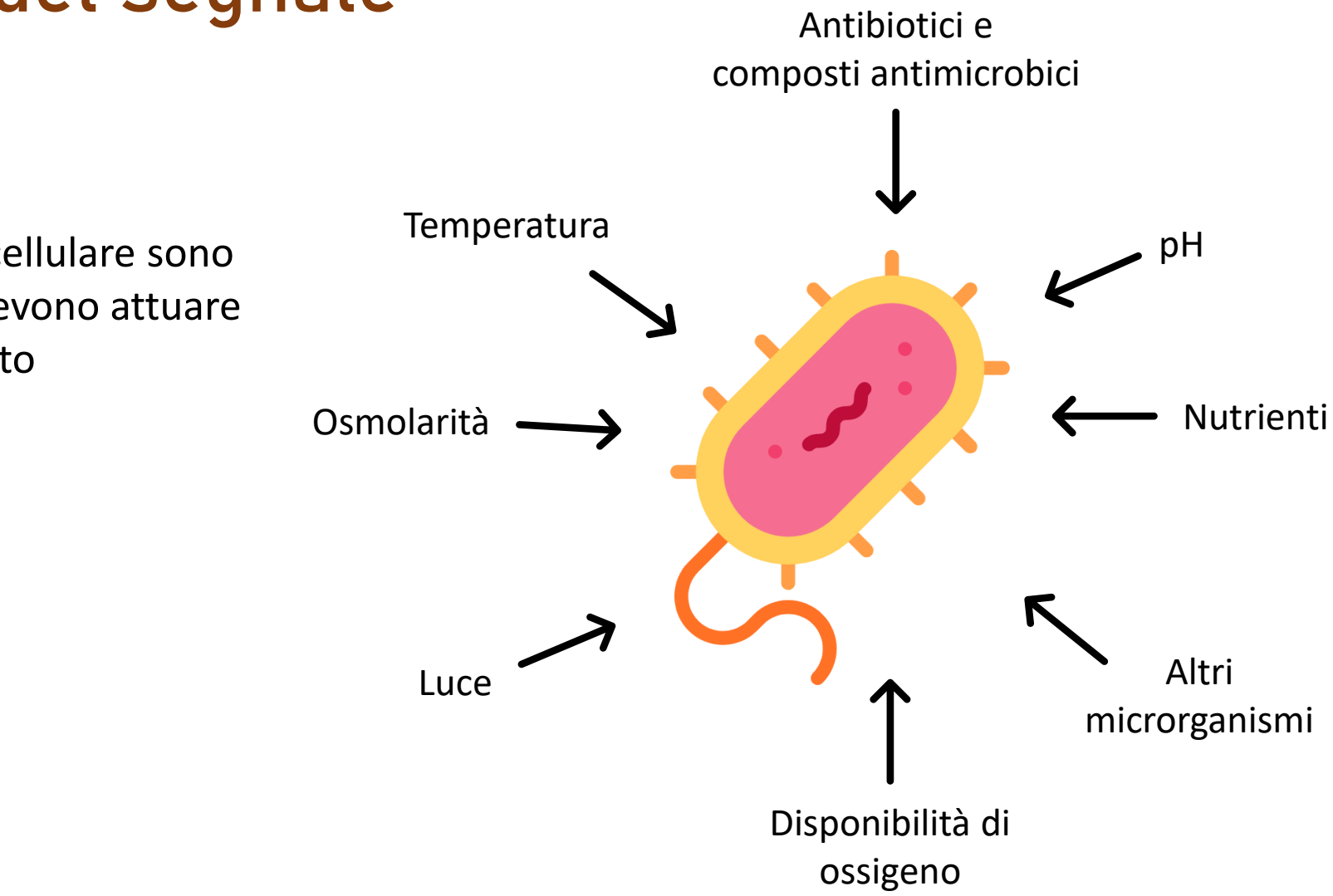
Percezione e adattamento: two-component systems

Marco Coluccia
Sapienza Università di Roma

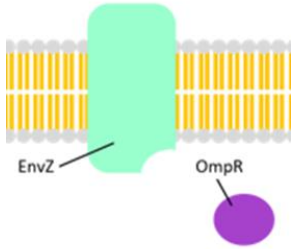
1. La trasduzione del segnale nei batteri

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

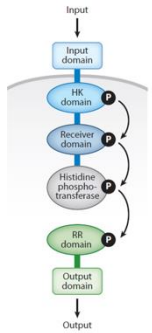


Anni ‘30
A. M. Pappenheimer studia la produzione di tossina difterica in relazione alla disponibilità di ferro.

Anni ‘50-’60
Jacob e Monod caratterizzano l’operone *lac*, il batterio risponde con la modulazione dell’espressione genica a stimoli ambientali.



Anni ‘80
Scoperta del sistema EnvZ-OmpR, fosforilazione in risposta a stimoli ambientali.
→ Concetto di TCS



Anni ’90-2000
Espansione dei TCS noti, TCS non canonici, phosphorelay.

Anni 2000-oggi
Crosstalking fra TCS
Inibizione
Applicazioni cliniche e biotecnologiche

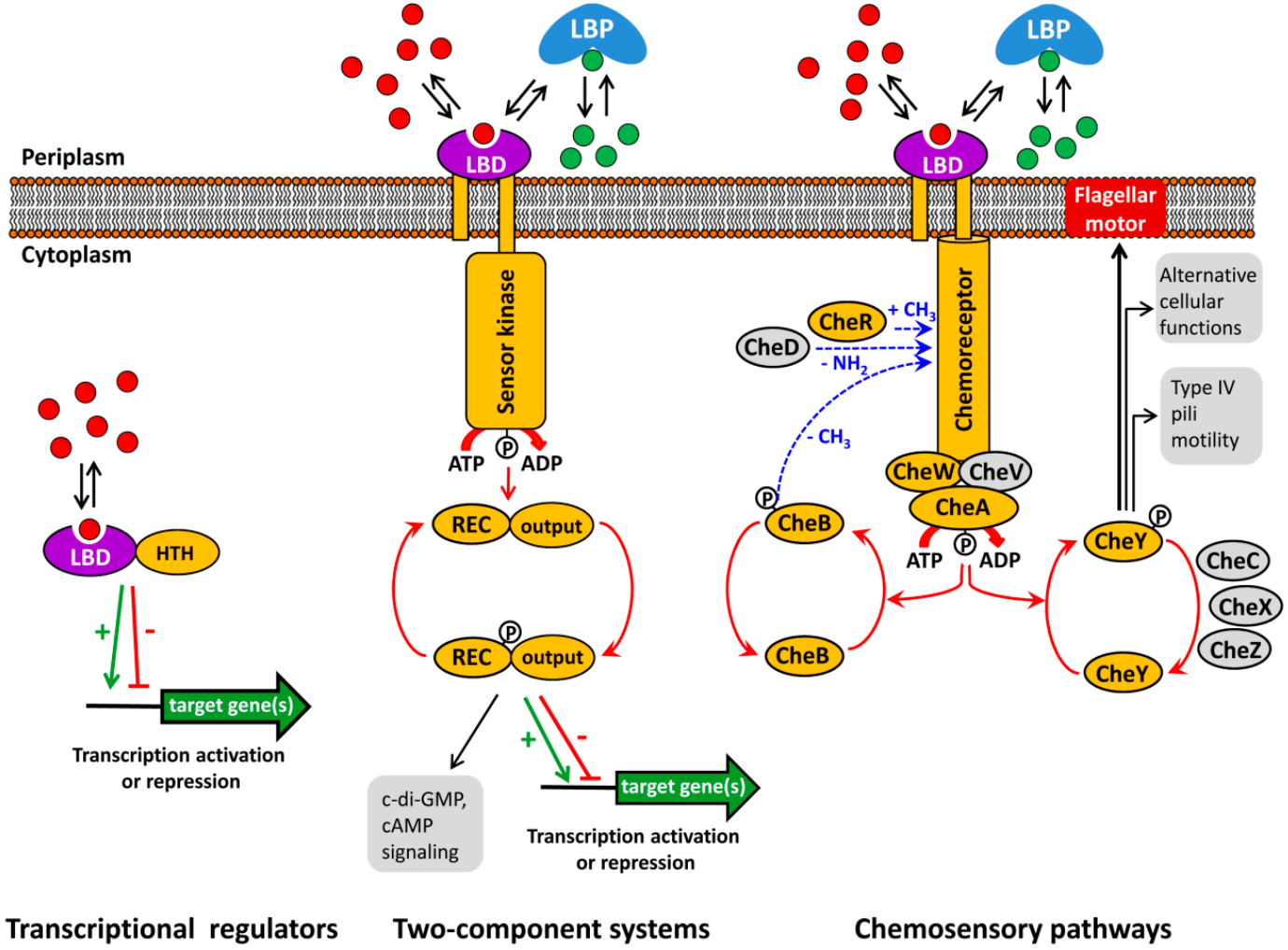
Per rispondere ai segnali sono necessarie quindi 2 funzioni:

- Percezione (sensing)
- Regolazione

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

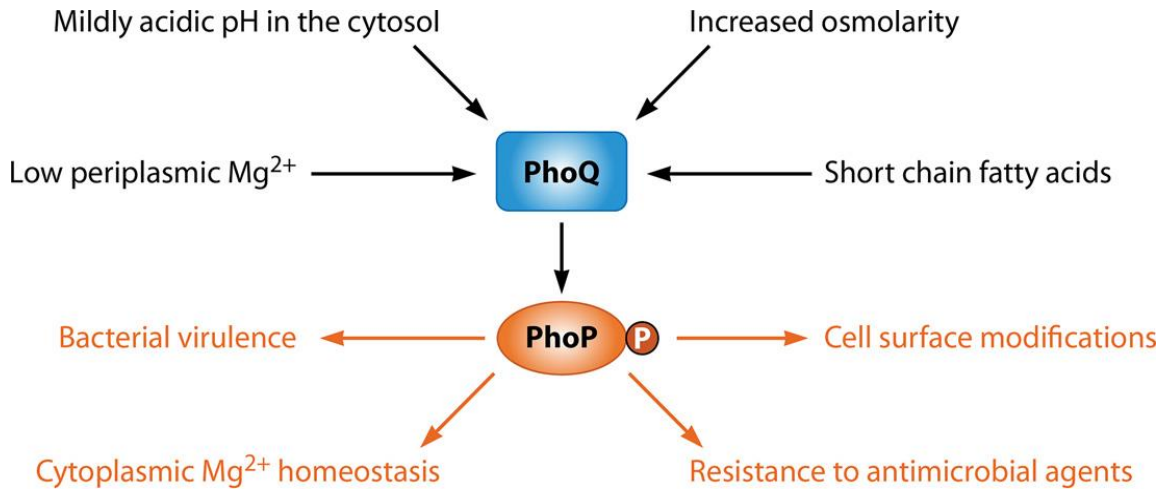
- Regolatori trascrizionali
- Sistemi a due componenti
- chemosensori

Il risultato è generalmente la regolazione dell'espressione genica.



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

2. Two-component systems (TCS)



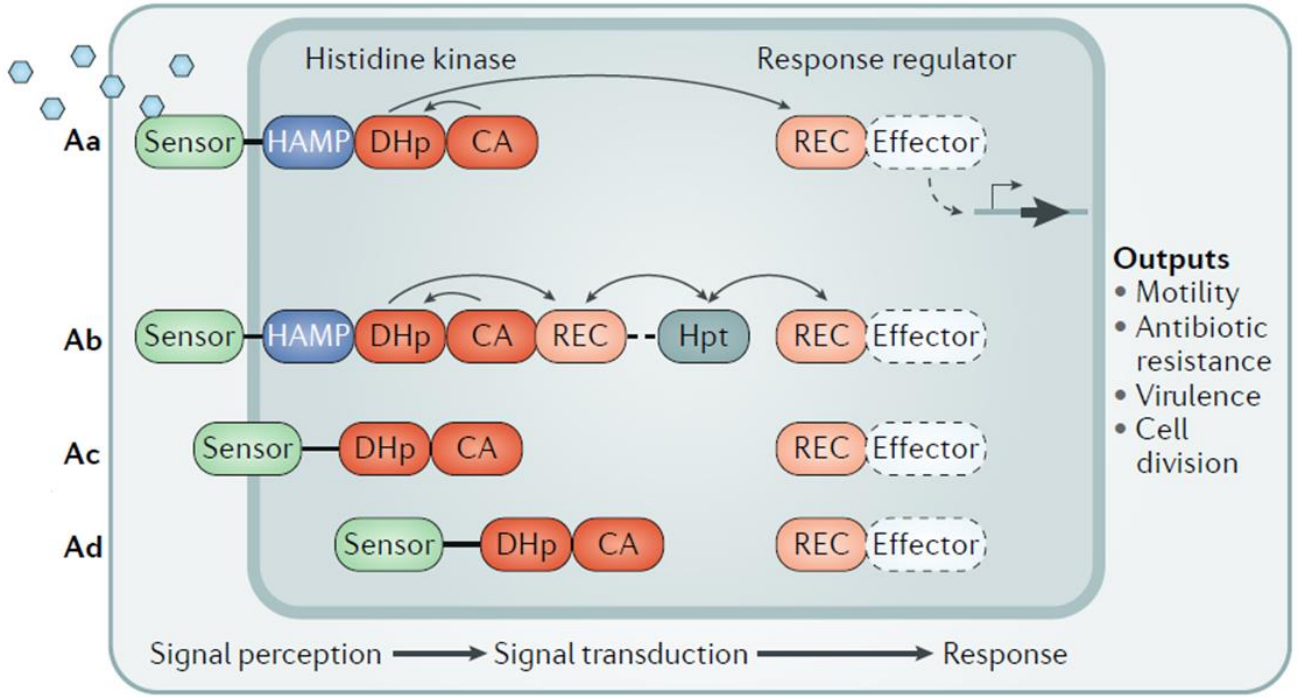
Famiglia di proteine di trasduzione del segnale presente in **tutti i domini** della vita.

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**.

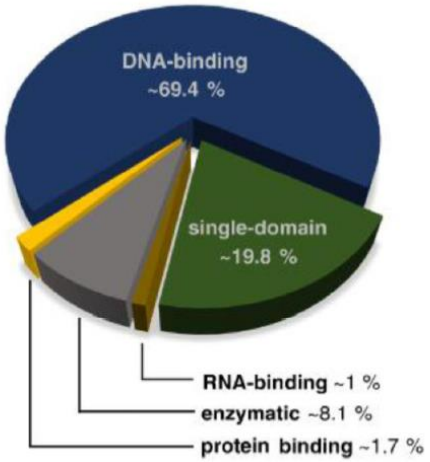
Generalmente la fosforilazione del regolatore aumenta l'affinità per il DNA target.

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

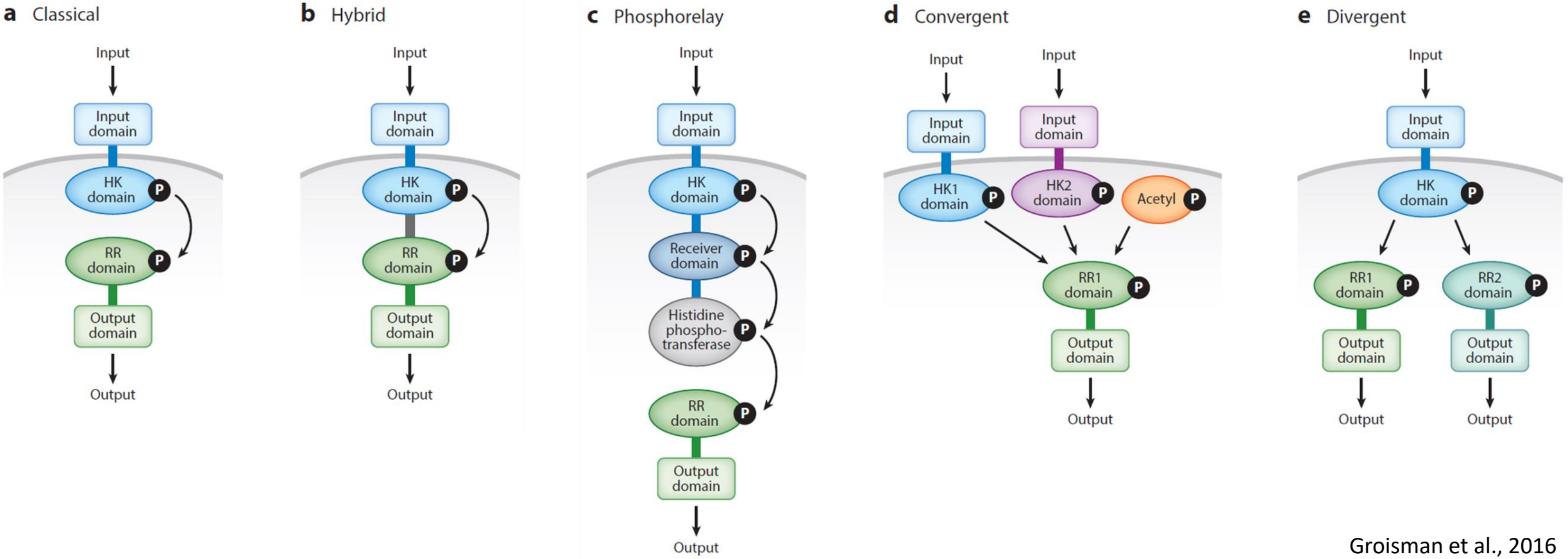


La superfamiglia RR viene suddivisa in base al tipo di dominio effettore:

- Legame al DNA: regolatori trascrizionali
- Legame all'RNA
- Attività enzimatica
- Legame a proteine
- 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



Groisman et al., 2016

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**.

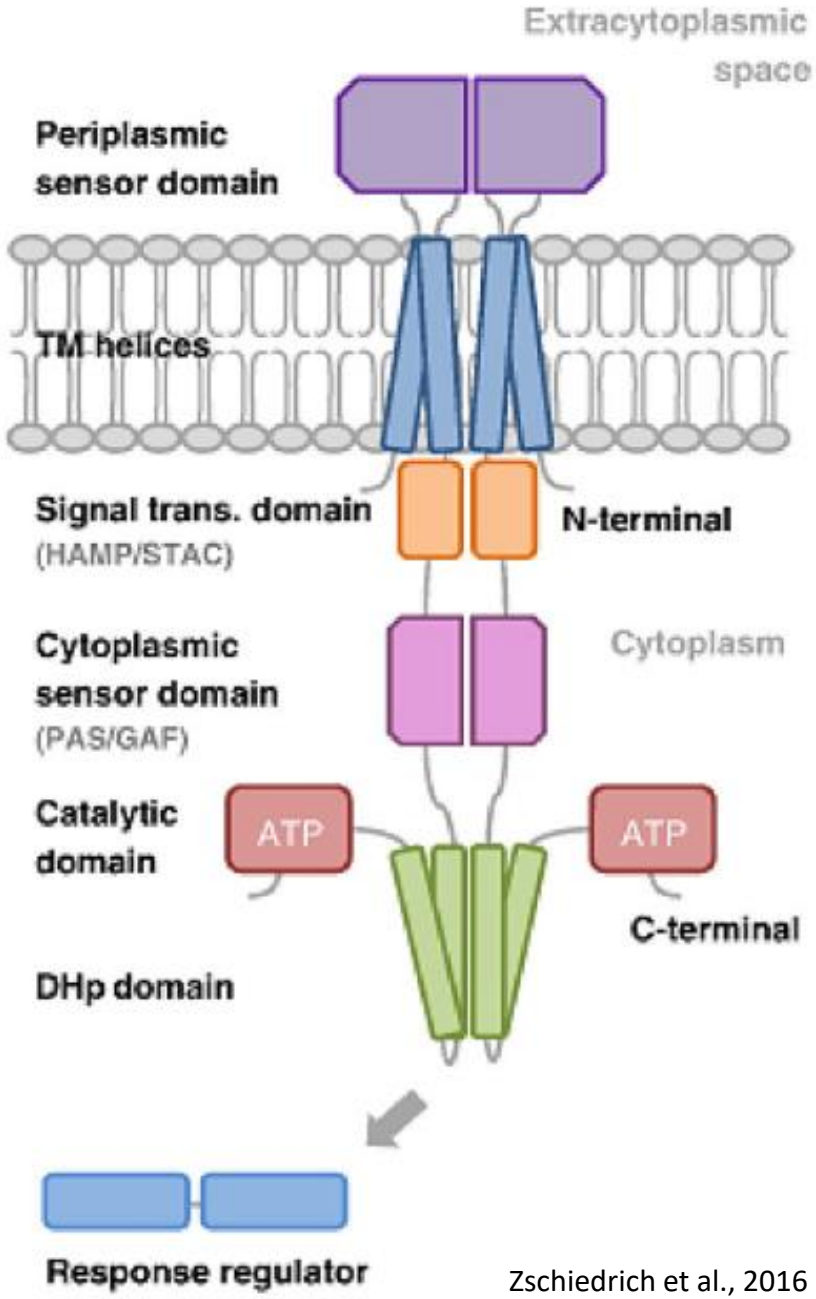
2. Il dominio **HAMP** trasduce il segnale con cambiamenti conformazionali.

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 nucleofilico di una molecola di H2O al gruppo fosfato.



Zschiedrich et al., 2016

3. I TCS non canonici: sistema ArcAB

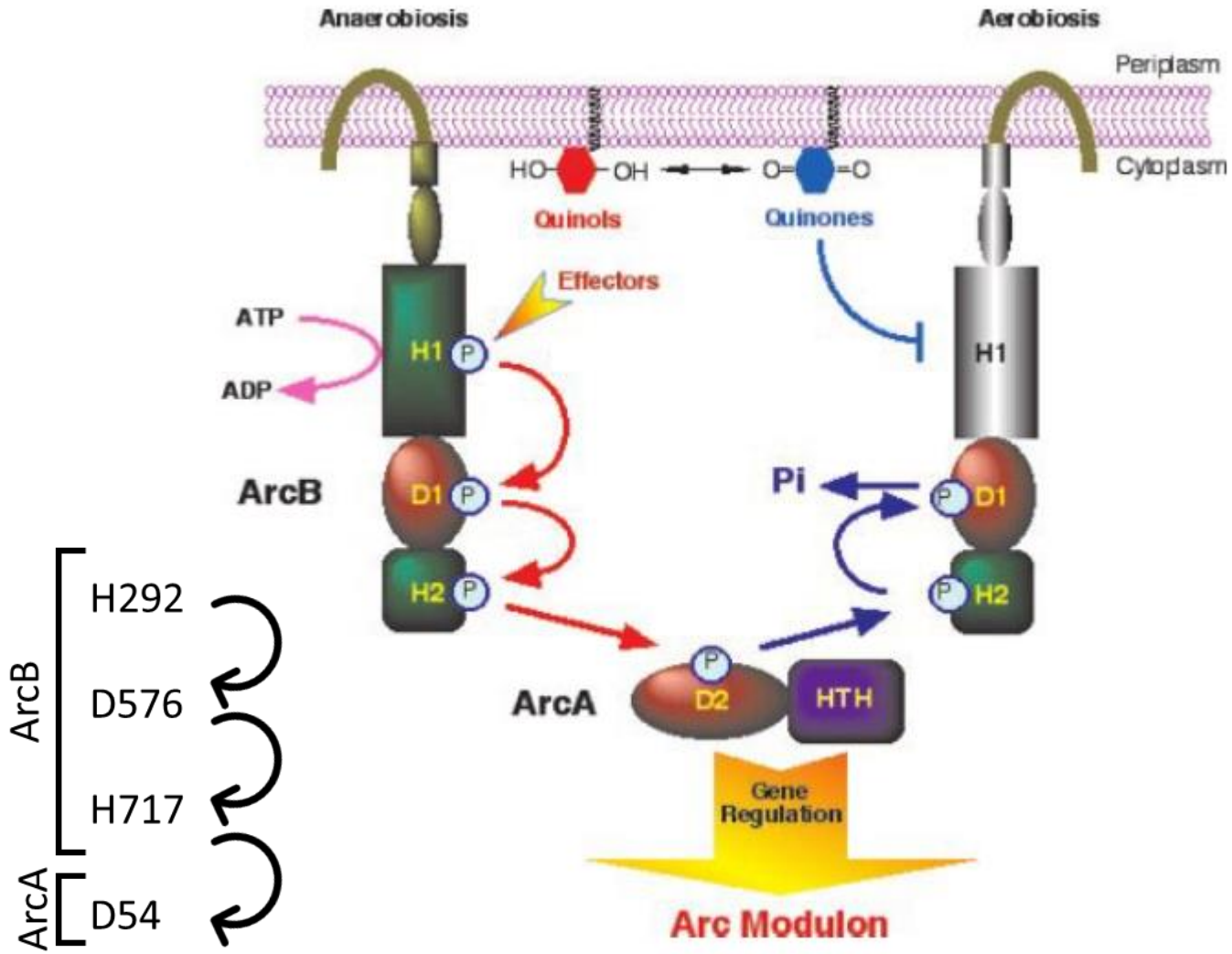
Kwon et al., 2003

Un esempio di **phosphorelay** è il sistema **ArcAB**.
In *E. coli* regola oltre 30 geni in risposta alle condizioni redox della crescita.

Il sensore ArcB è un sensore tripartito con 3 domini catalitici: transmitter (H1), receiver (D1) e secondary transmitter (H2). Il salto da H292 a D54 avviene con un tasso molto basso.

Viene attivato in condizioni riducenti (anaerobiosi)
→ Inibizione metabolismo respiratorio, attivazione metabolismo fermentativo

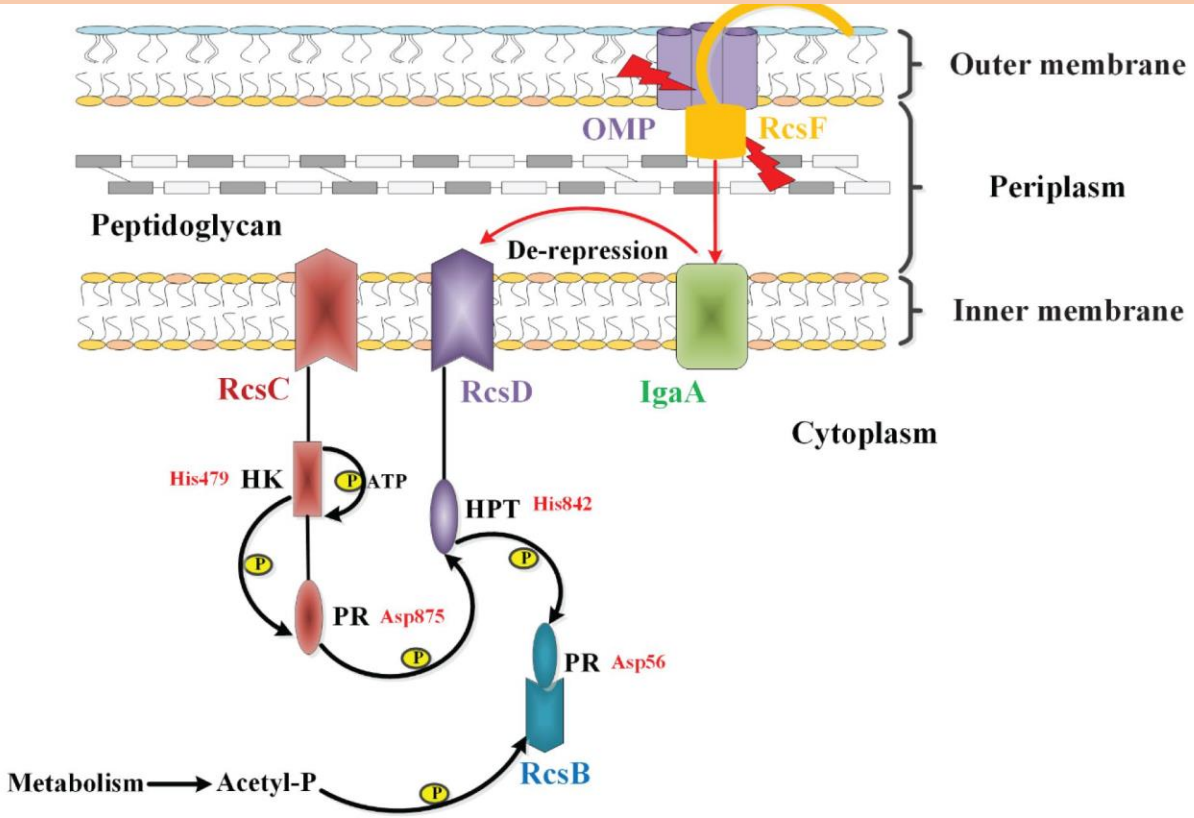
L'ancoraggio di ArcB alla IM permette all'ubichinone in forma ridotta od ossidata di regolare l'attività del TCS.

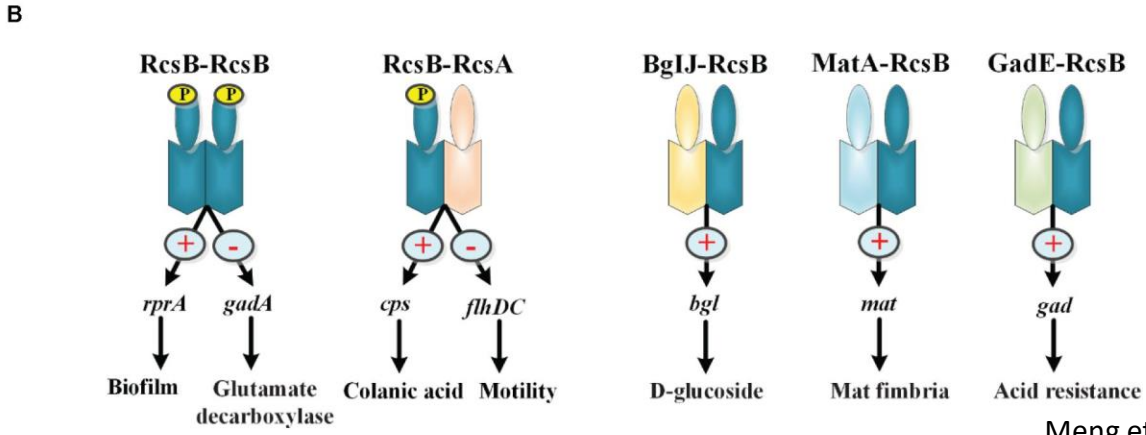


Sistema Rcs

Il sistema Rcs (Regulator of capsule synthesis) è un **phosphorelay** coinvolto nella risposta allo stress dell'envelope batterico.

- **RcsF:** lipoproteina transmembrana ancorata al foglietto esterno della OM con il dominio N-term. Complesso con le OMP.
- **IgaA:** proteina accessoria transmembrana. Essenziale per la vitalità batterica. Repressore post-traduzionale sistema Rcs.
- **RcsC:** HK ibrida. Dominio PR con Asp che viene fosforilato.
- **RcsD:** fosfotransferasi.
- **RcsB:** RR citoplasmatico. Attività come etero e omodimero e fosforilazione-dipendente o indipendente.
- **RcsA:** proteina accessoria. Eterodimero con RcsB per regolare l'espressione di ceni della capsula (*cps*) e flagello (*flh*)

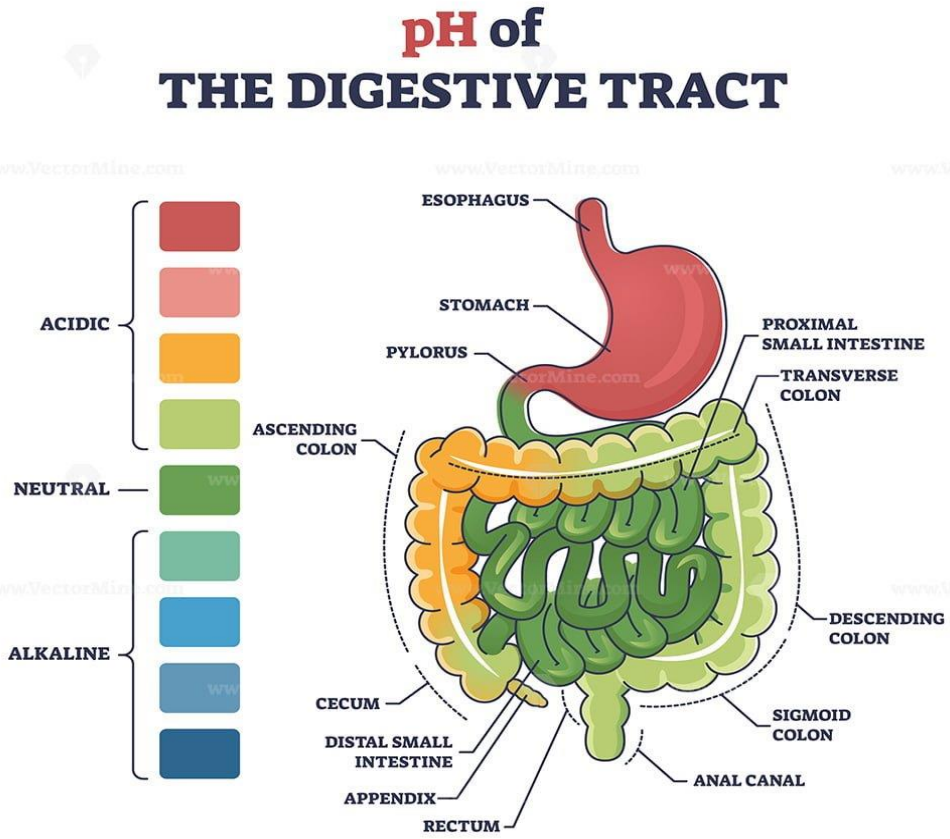


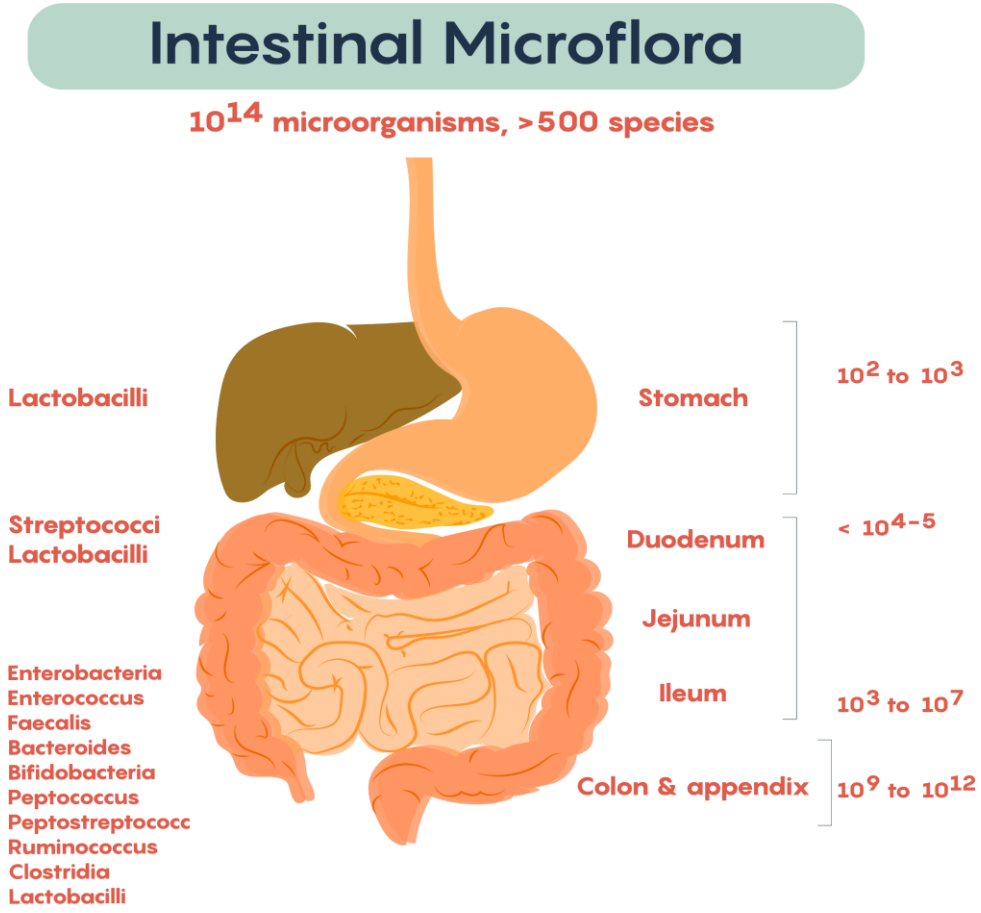


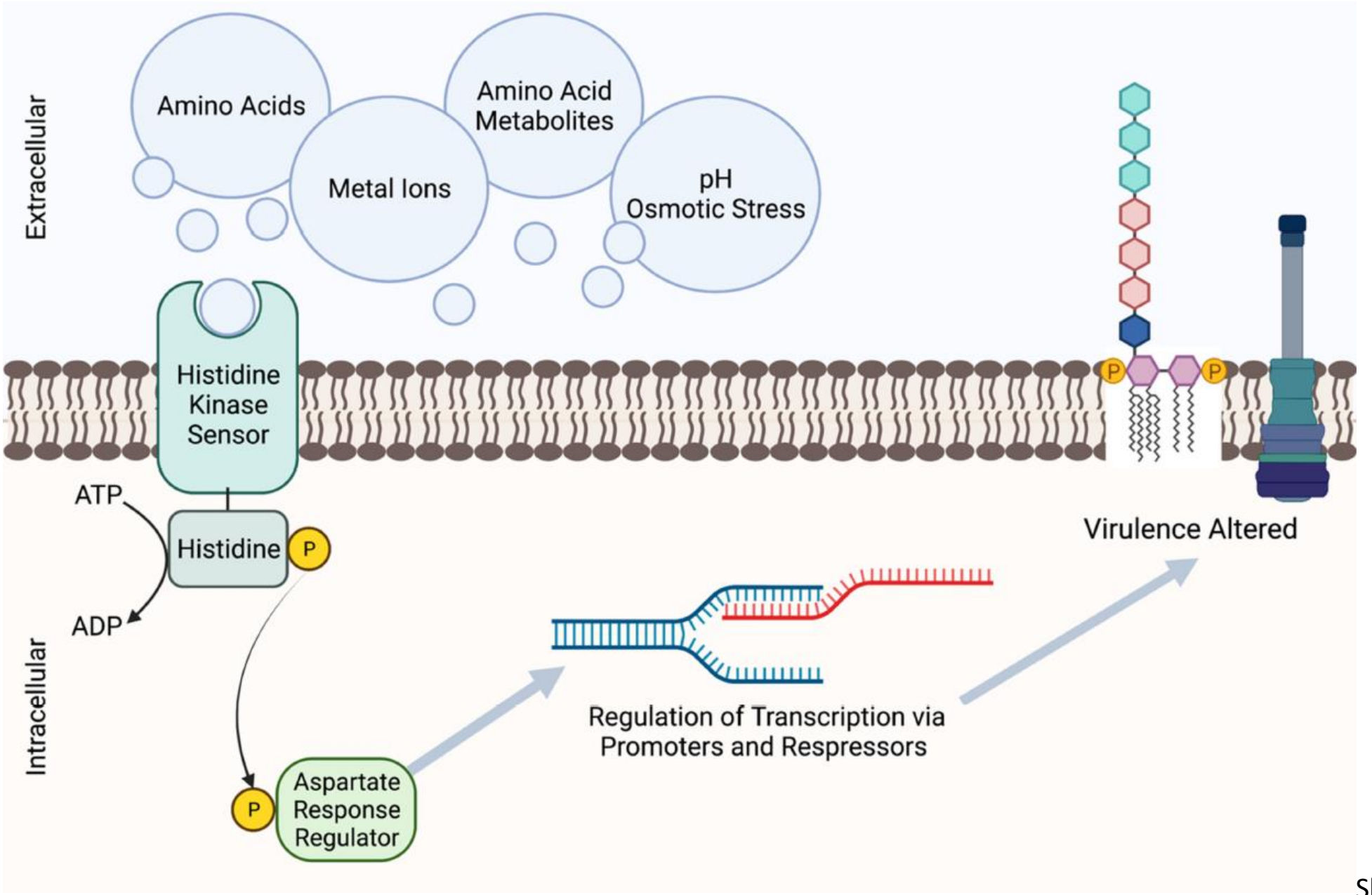
Meng et al., 2021

4. Cosa attiva i TCS?

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







Shaw et al., 2022

	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

Shaw et al., 2022

Approfondiamo alcuni degli stimoli…

Input: Ioni metallici

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

Bilanciamento fra:

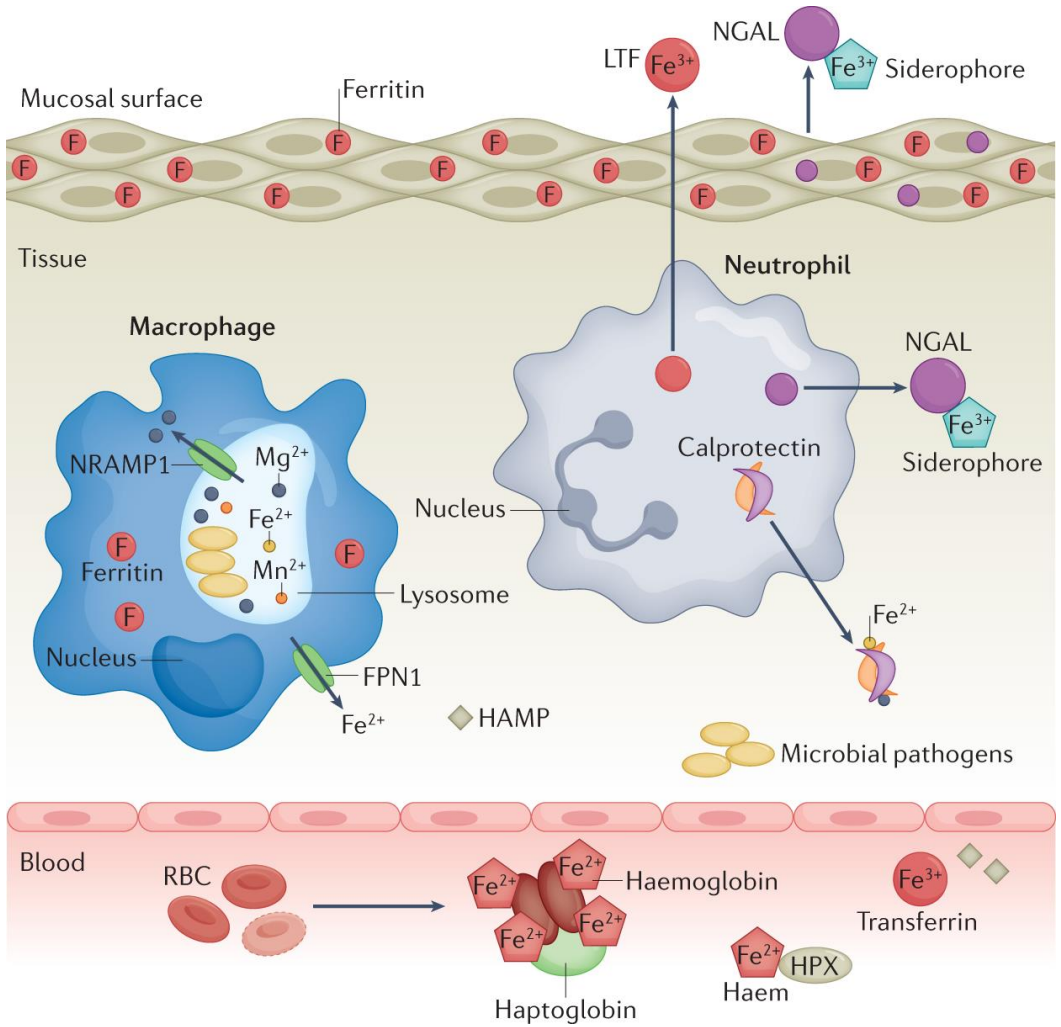
- **Funzioni essenziali** (es. cofattori)
  → Strategie batteriche per il sequestro degli ioni
- **Tossicità e attività battericida**
  → Nutritional immunity, trasportatori batterici

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.

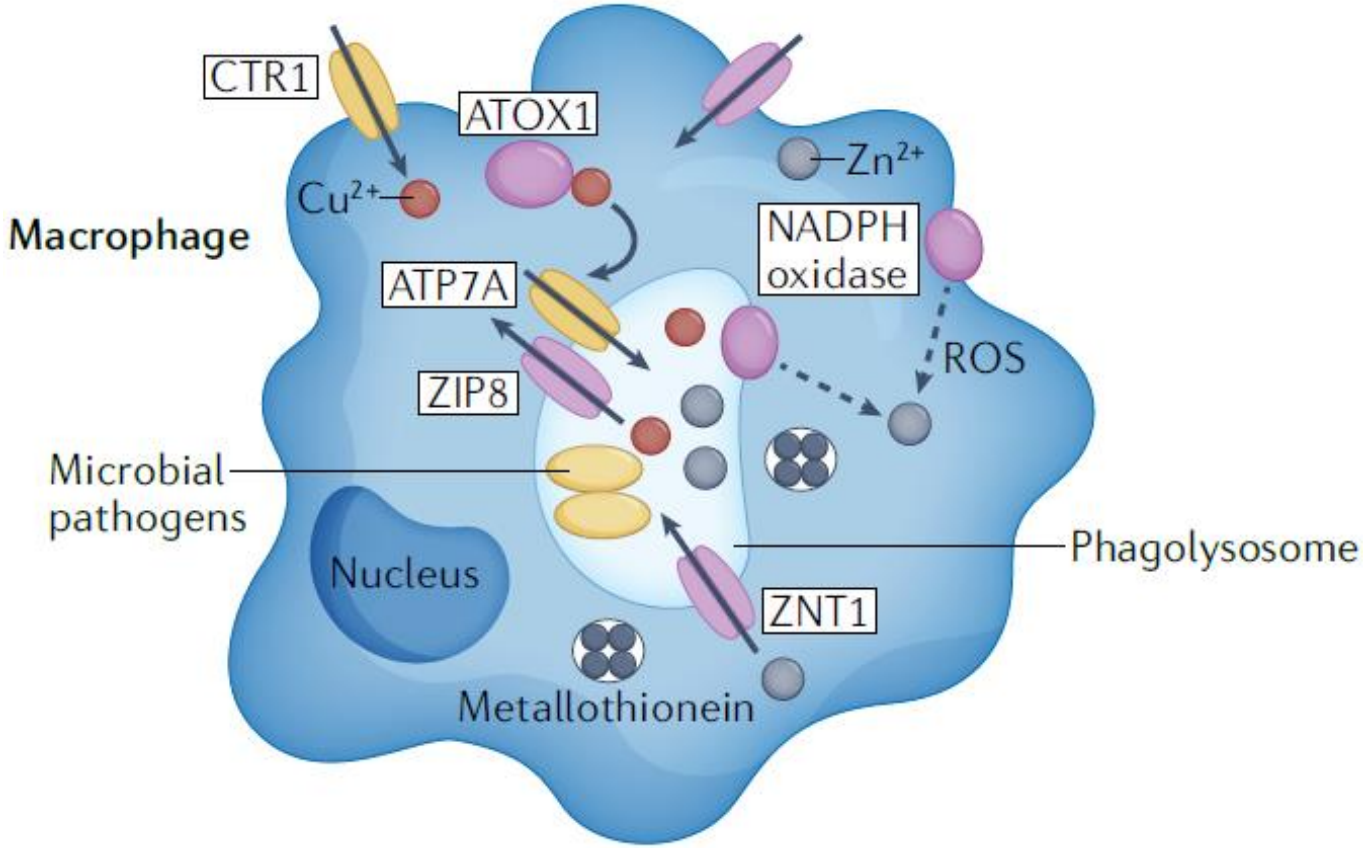
→ **Nutritional Immunity**

Esempi di nutritional immunity:

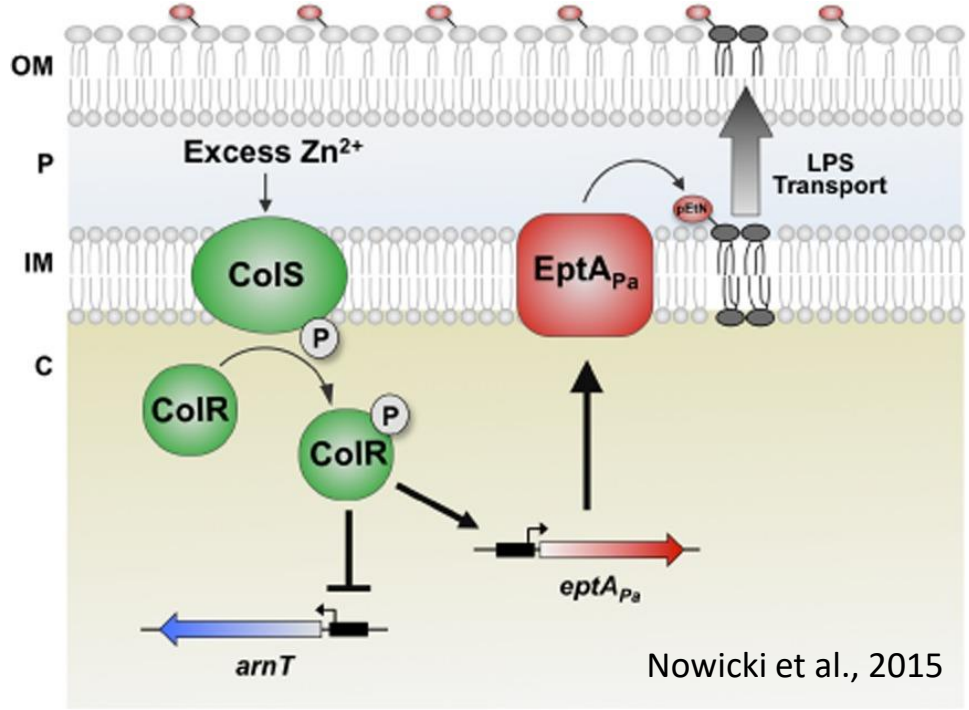
Fe^{++} starvation



Zn^{++} intoxication



Murdoch et al., 2022



Nowicki et al., 2015

Zn++

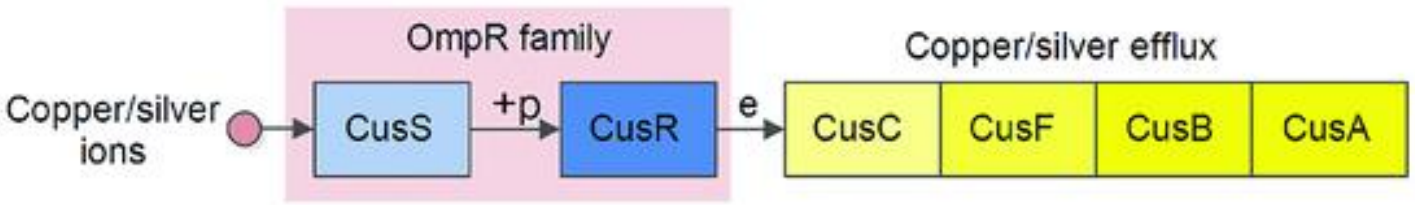
L'eccesso di zinco induce l'aggiunta di pEtN al 4' del gruppo fosfato del lipide A mediante l'espressione della transferasi codificata da *eptA*. Viene invece repressa l'espressione della transferasi codificata da *arnT.*

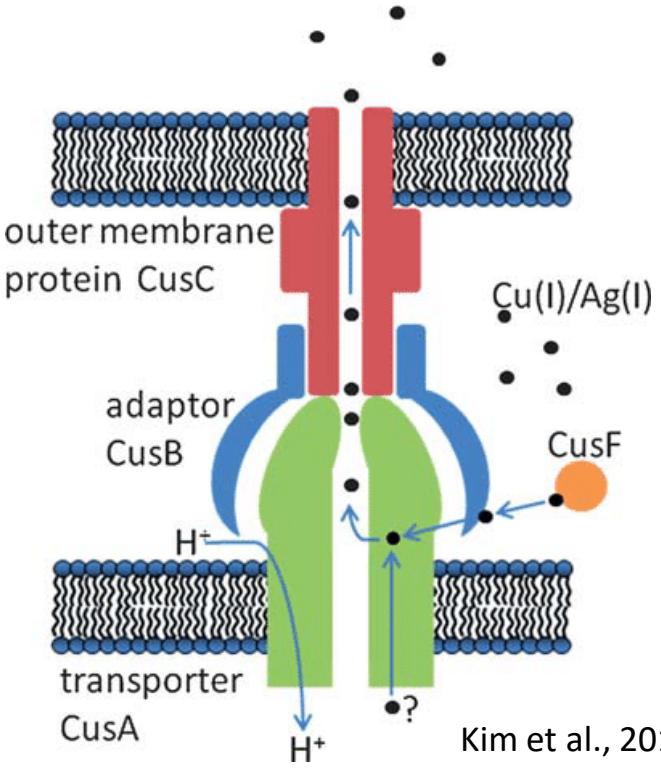
→ Sistema **ColRS** in *P. aeruginosa* e mantenimento del controllo sulla struttura dell'LPS.

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*

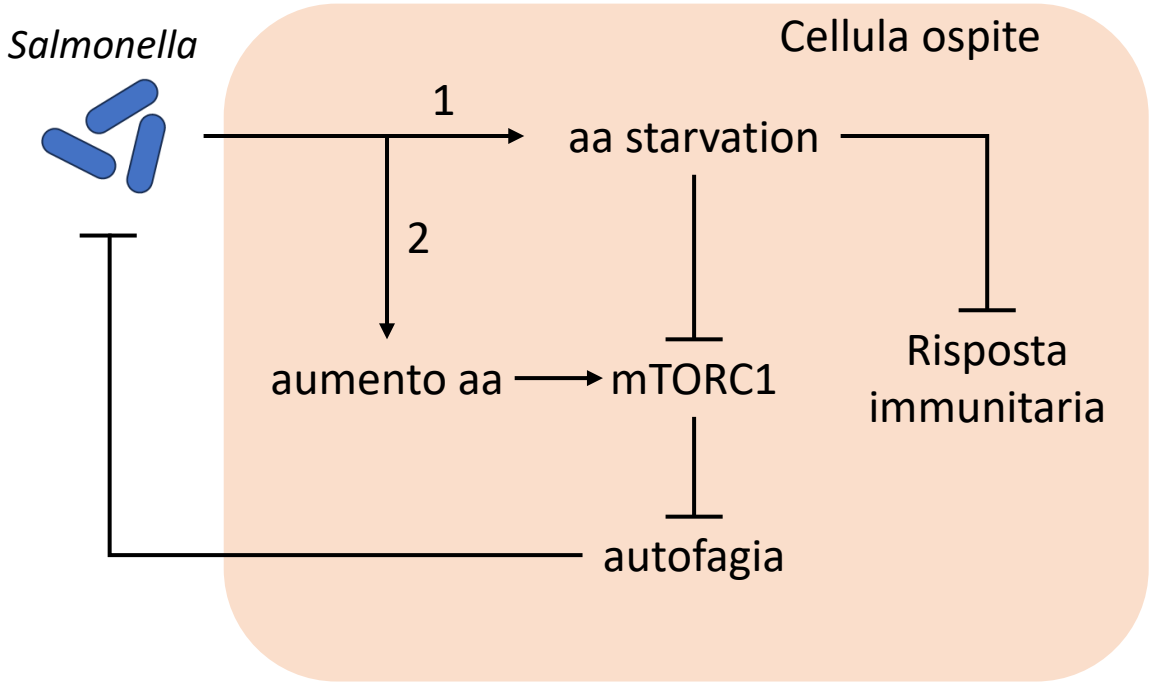




Kim et al., 2010

Input: amminoacidi

Ospite e patogeno condividono i substrati nutrizionali e molti dei prodotti metabolici sono comuni.
→ **Cross-talk metabolico**



Ren et al., 2018

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

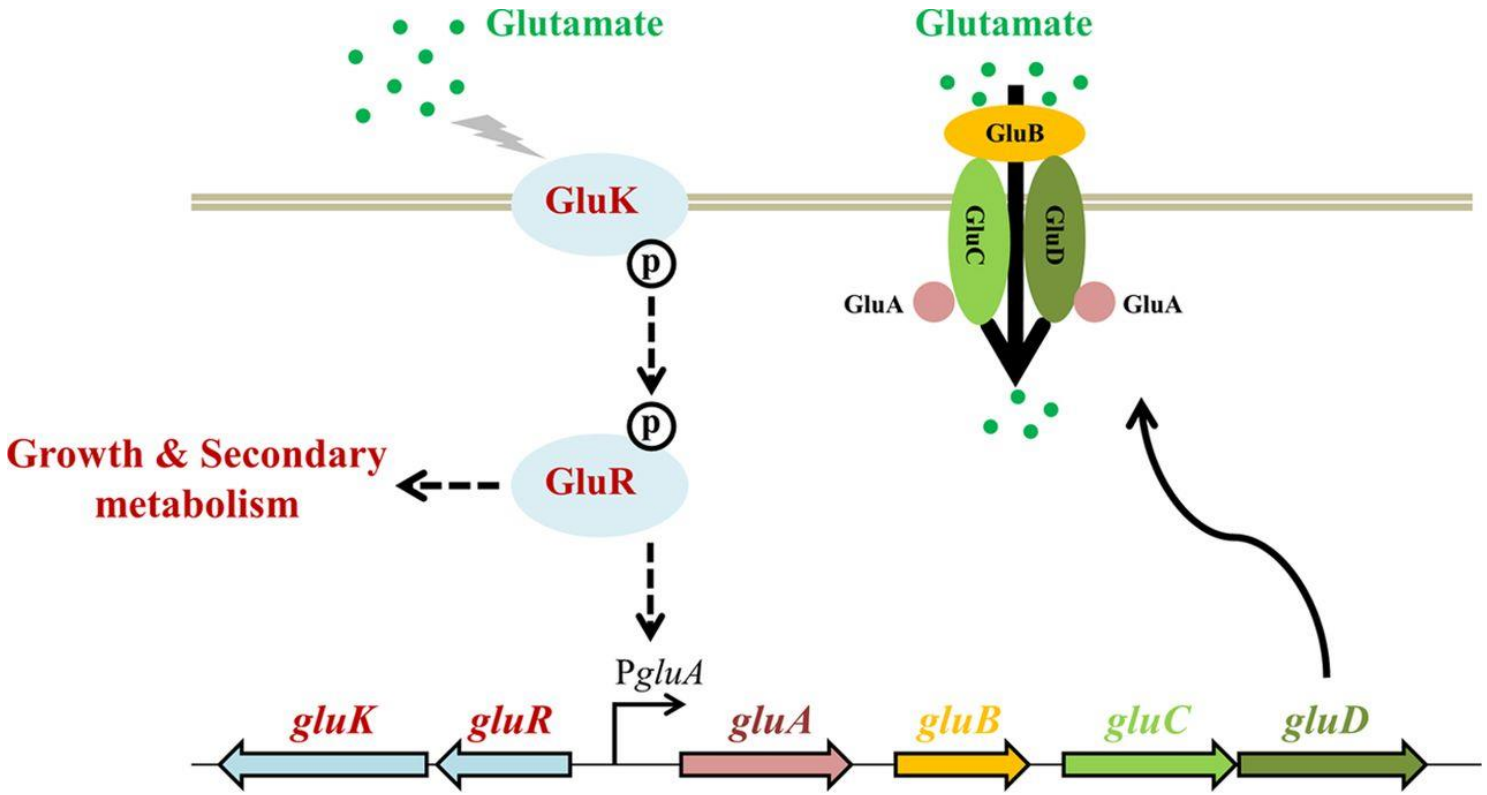
- Fonte di energia
- Substrato per la sintesi proteica
- Produzione di molecole regolatorie
- Pathway di cell-signaling
- Regolazione del metabolismo e del microbiota
- Immunità innata e adattativa

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*.

Li et al., 2017



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:

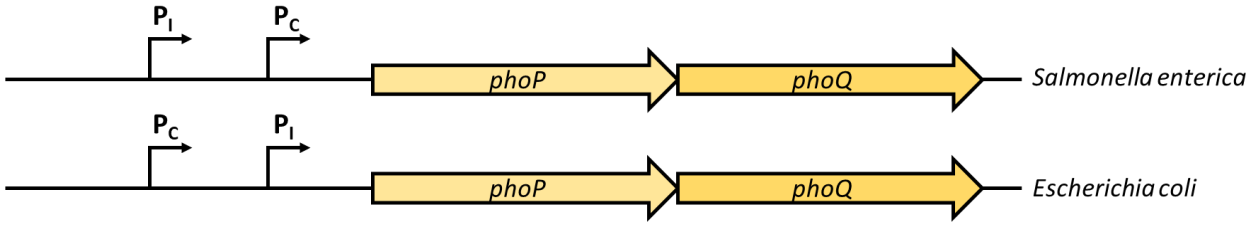
- Trasportatore GluABCD
- Geni di resistenza agli antibiotici

5. 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



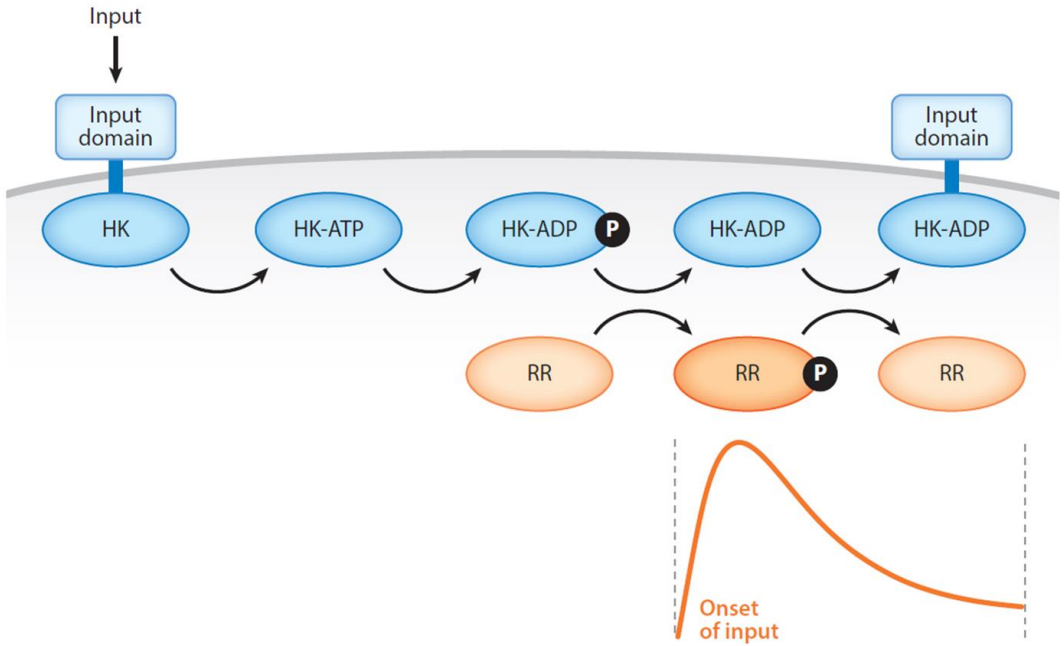
Fra i geni regolati dal RR fosforilato vi è anche l'operone del TCS stesso, con un meccanismo di **autoregolazione a feedback** basato su una gerarchia di promotori con diversa affinità per il RR.

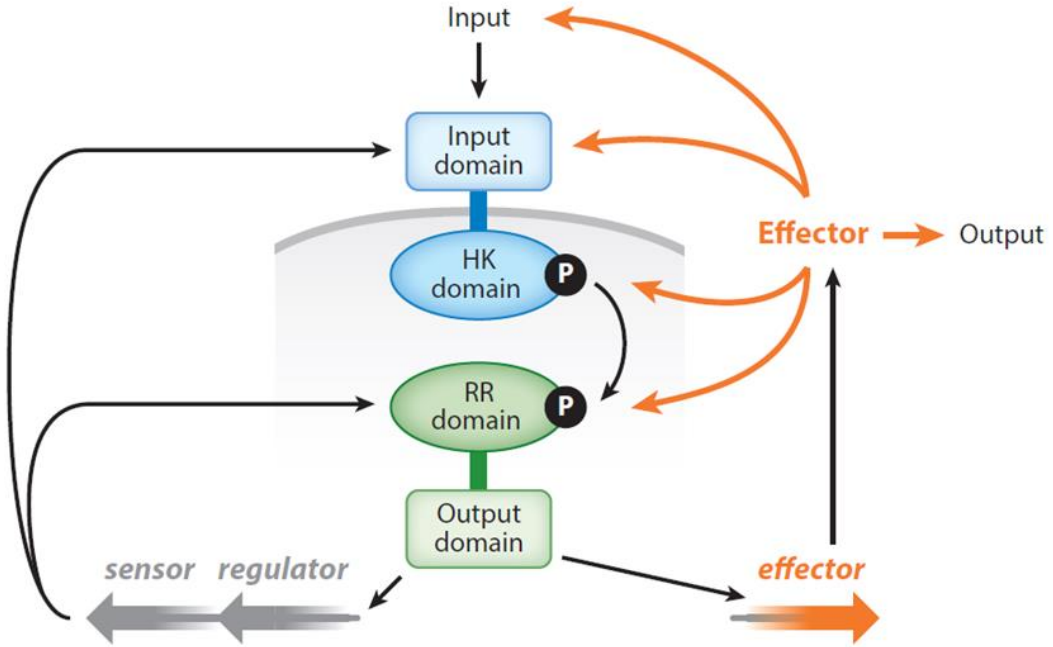
Condizioni NON-INDUCING
Poco RR fosforilato
→
Condizioni INDUCING
Aumento RR fosforilato
→
Legame del RR fosforilato ai promotori ad alta affinità
→
Aumento quantità sensore e regolatore
→
Legame promotori bassa affinità

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



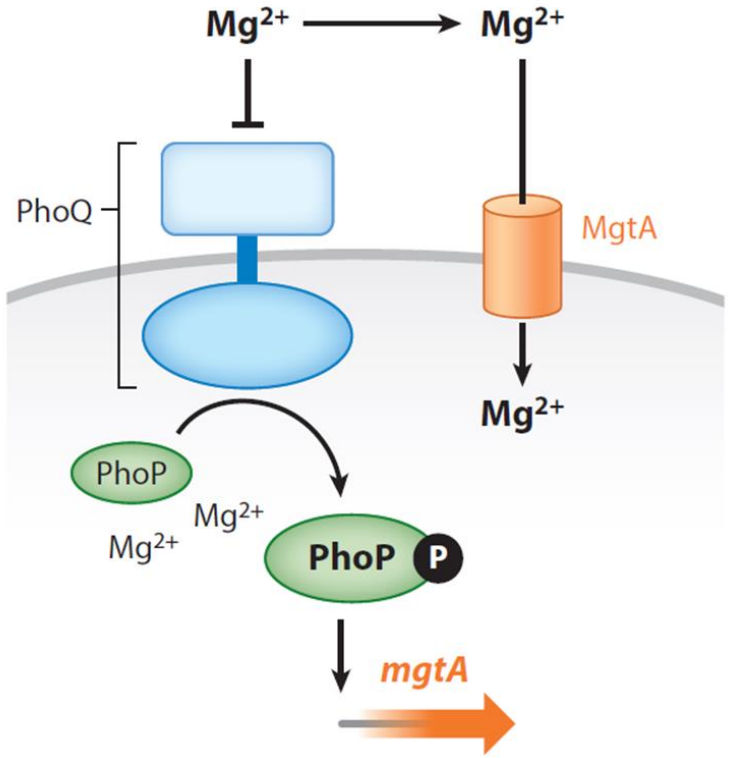


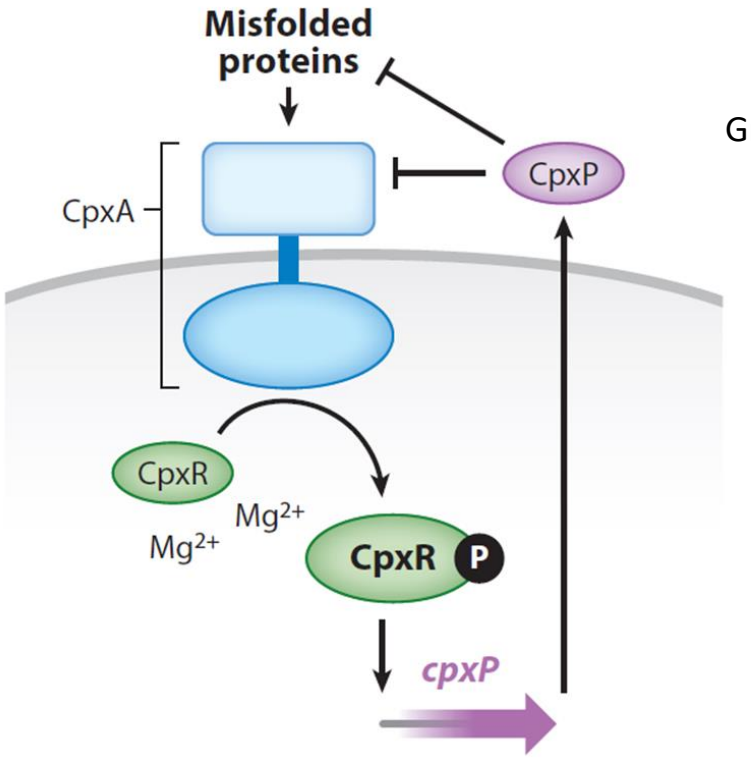
Groisman et al., 2016

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.





Groisman et al., 2016

PhoPQ: bassa [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

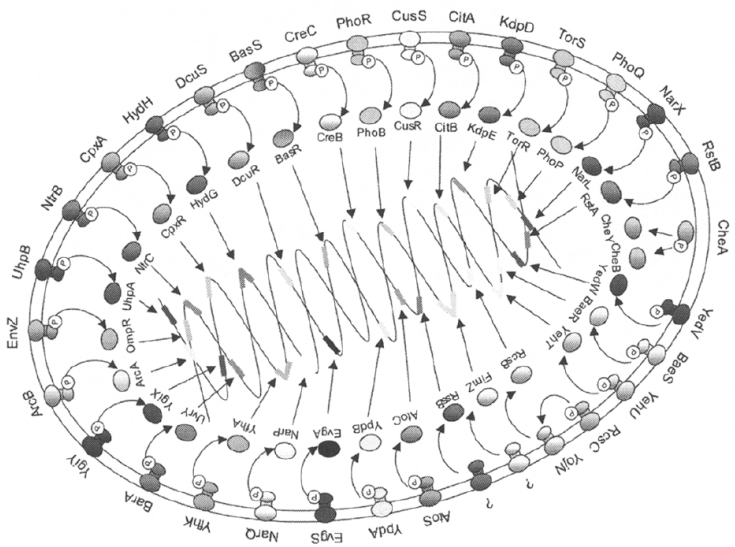
Il sistema induce la trascrizione di *cpxP,* codificante per una proteina periplasmatica in grado di legarsi a CpxA e alle proteine misfolded.

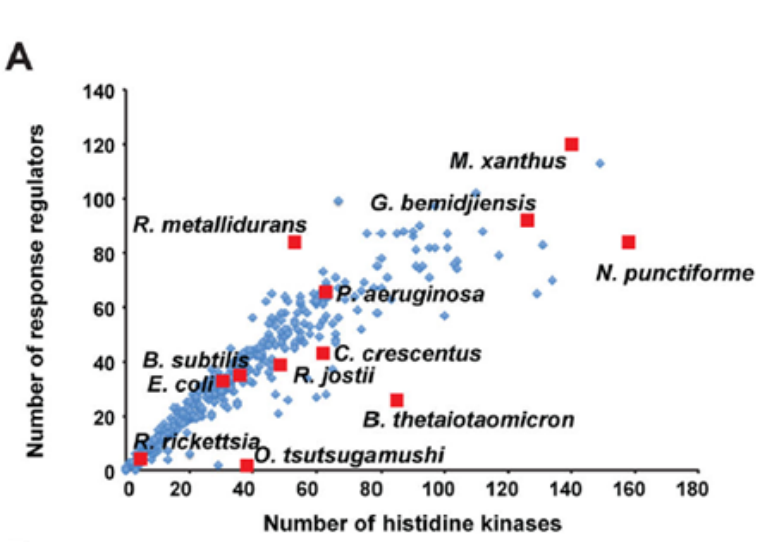
Quando le proteine misfolded aumentano, CpxP viene completamente sequestrato e non si lega più a CpxA, riattivando il sistema.

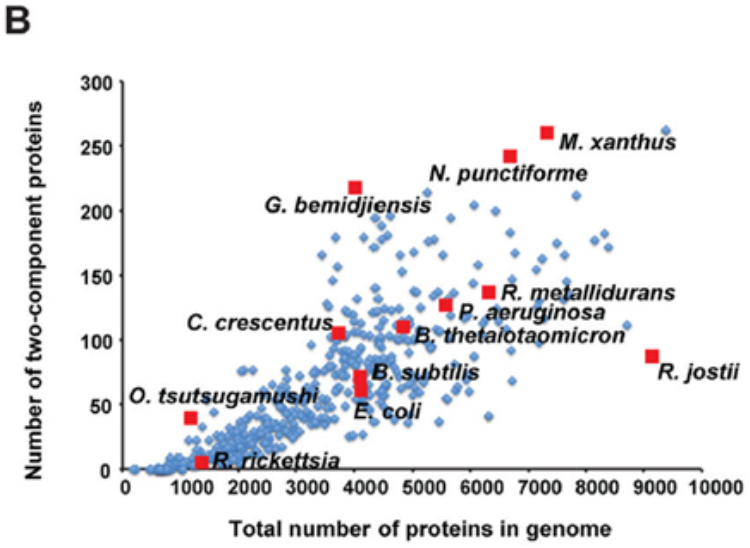
6. Evoluzione dei TCS

Geni codificanti per i TCS sono stati trovati nella **quasi totalità dei genomi batterici** sequenziati. Il loro numero è così elevato che le famiglie degli HK e dei RR sono le due famiglie di geni paraloghi più numerosi nei batteri.

Il numero di TCS codificato in ogni genoma varia da alcune **decine a centinaia di elementi**, il loro numero varia con il quadrato della dimensione del genoma con una relazione lineare fra HK e RR.







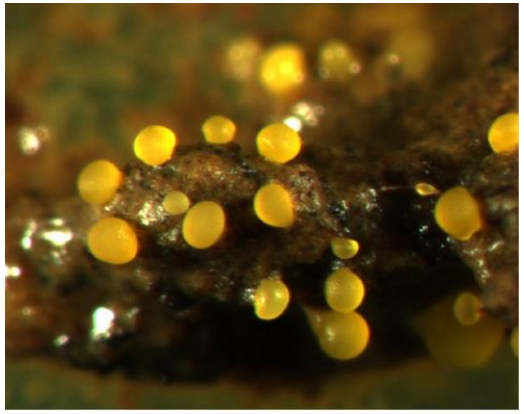
Eguchi and Utsumi, 2008

Capra and Laub, 2012

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 puntiforme:* 160 HK, 98 RR

Mycoplasma



M. xanthus

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 toposisomerasi di tipo II
- RR: ancora non si hanno informazioni

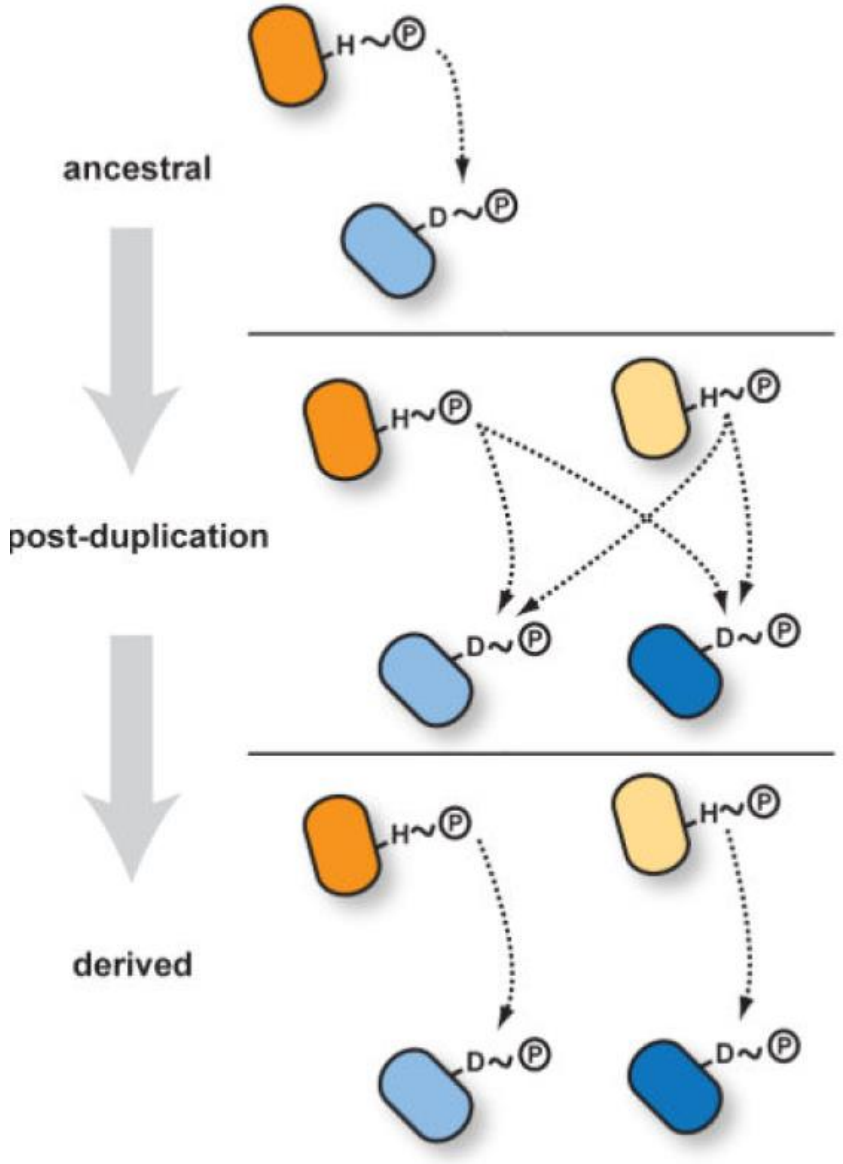
La diversificazione dei TCS è avvenuta mediante:

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

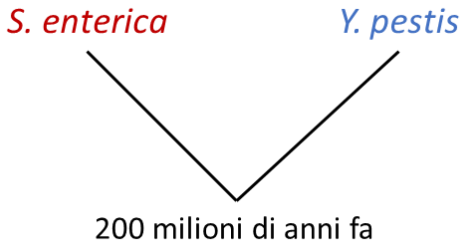
Il bilancio fra gli eventi di duplicazione-divergenza e HGT varia da specie a specie.

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

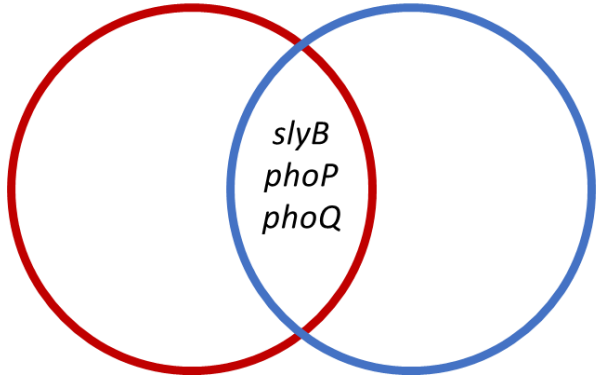
- Domain shuffling fra HK e altre proteine
- Sostituzioni: per esempio la sostituzione di Leu con Ile cambia la specificità di NorX da nitrati a nitriti

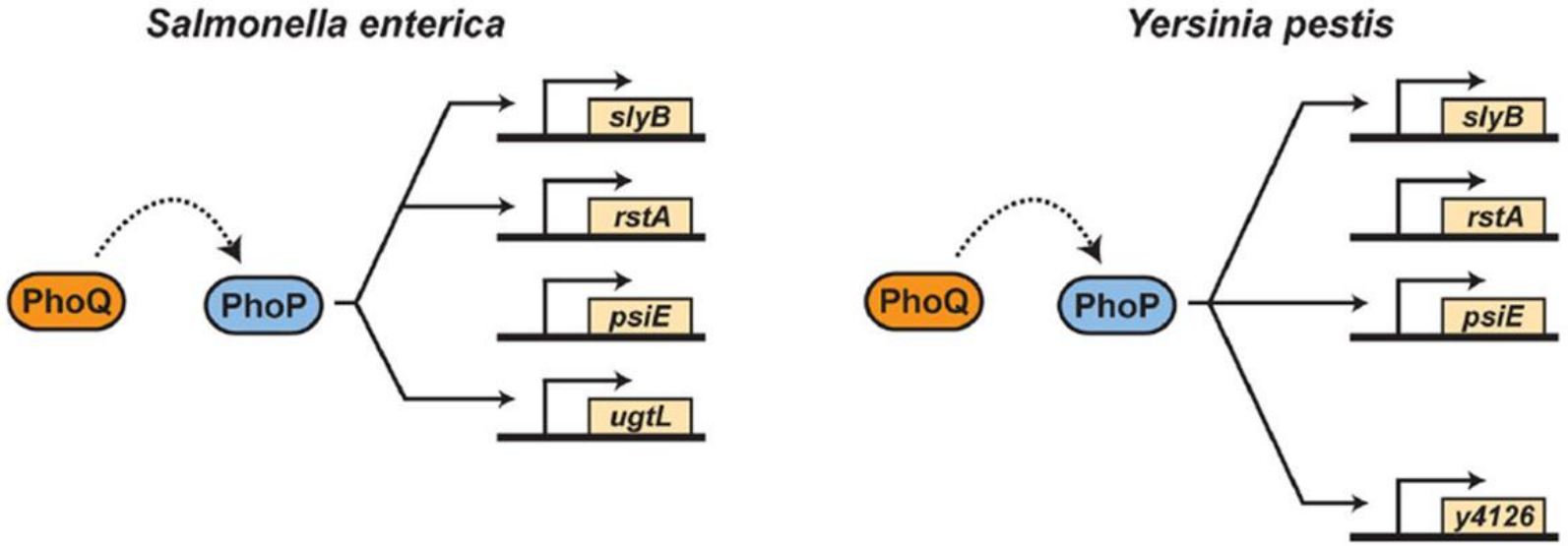


Capra and Laub, 2012



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

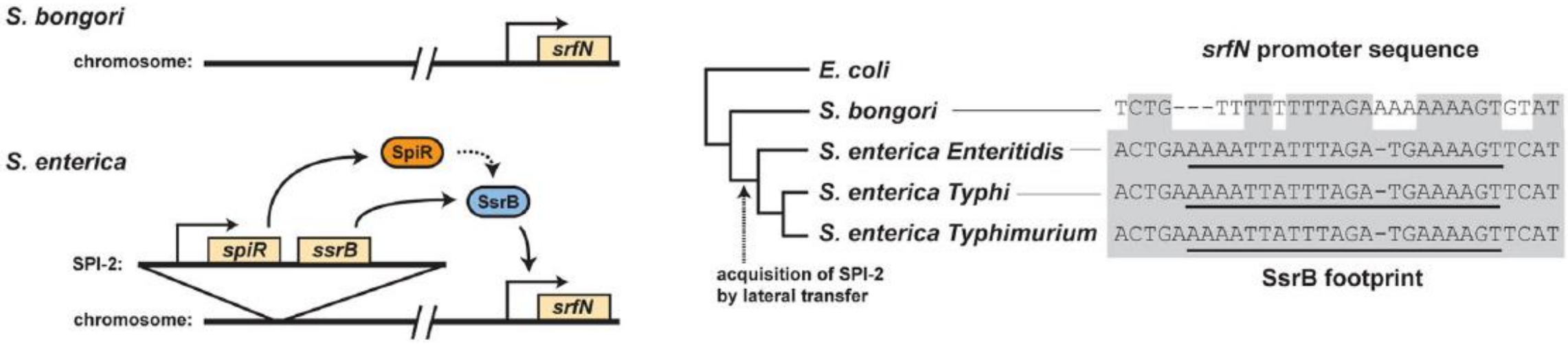




Capra and Laub, 2012

La divergenza si manifesta anche nella **differenziazione degli output dei TCS**, come nel caso del sistema PhoPQ in *S. enterica* e *Y. pestis.* Solo 3 geni sono conservati nei reguloni 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



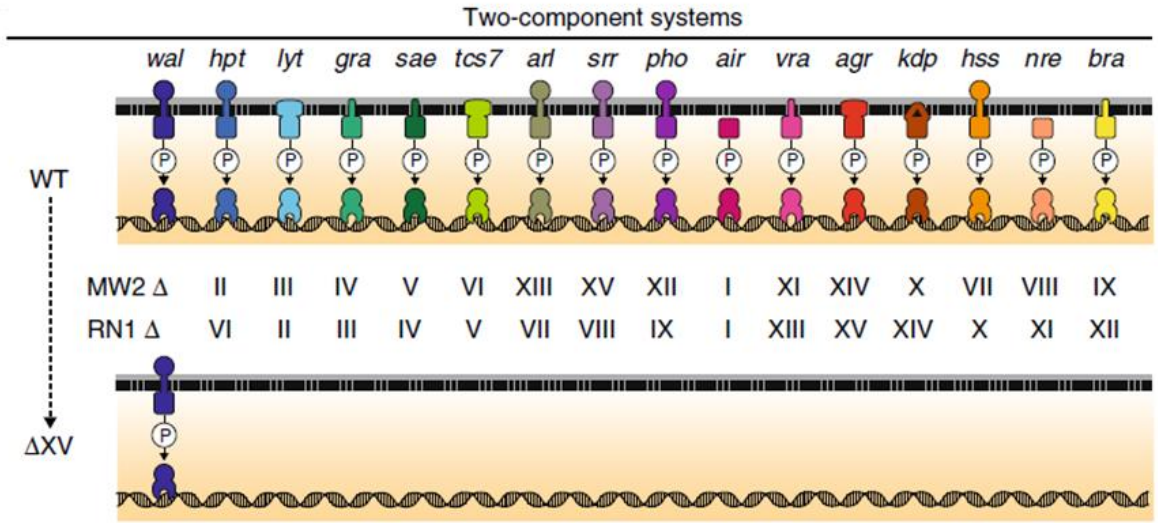
Capra and Laub, 2012

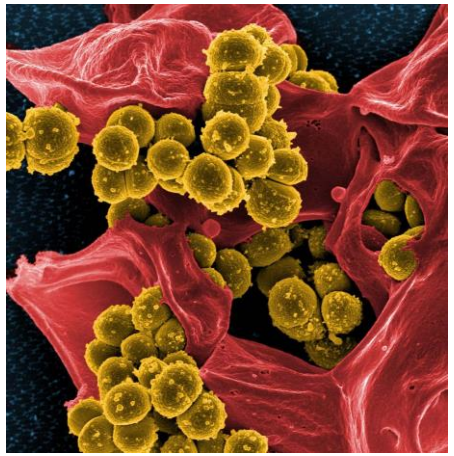
Un altro esempio: la **formazione *de novo* di siti per il regolatore** SsrB in *S. enterica.*

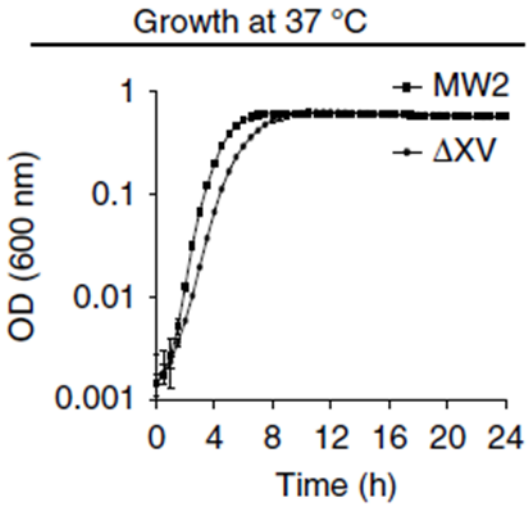
L'ampliamento e la diversificazione dei pathway regolatori può conferire un **vantaggio evolutivo** e permettere la colonizzazione di nuove nicchie ecologiche.

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

7. I TCS sono autonomi e autosufficienti?







Villanueva et al., 2018

L'aumento dei TCS in un organismo aumenta anche le nicchie ecologiche in cui esso è in grado di sopravvivere.

La rimozione di un TCS dovrebbe quindi ridurre il numero di condizioni nelle quali il batterio può crescere.

Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*

Maite Villanueva[1], Begoña García[1,2], Jaione Valle[1,2], Beatriz Rapún[1,2], Igor Ruiz de los Mozos[1,5], Cristina Solano[1,2], Miguel Martí[3,6], José R. Penadés[3,4], Alejandro Toledo-Arana[1] & Iñigo Lasa[1,2]

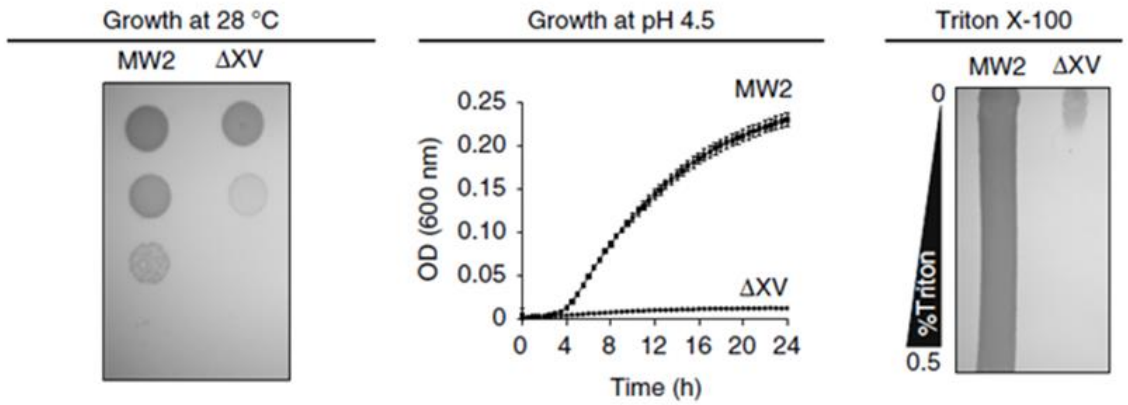
Esperimento con approccio **riduzionista** nel patogeno ***Staphylococcus aureus***, che vive in varie nicchie del corpo umano: pelle, narici, mucose.

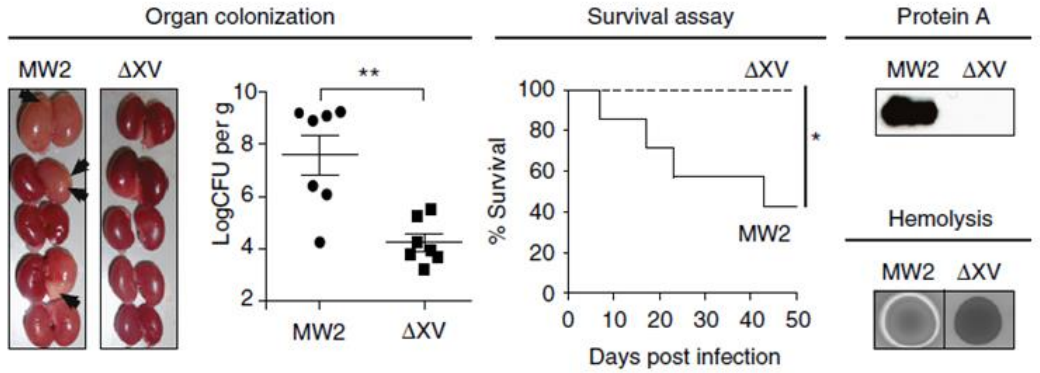
Delezione di tutti i TCS tranne WalkR, che è essenziale.
→ Ceppo ΔXV

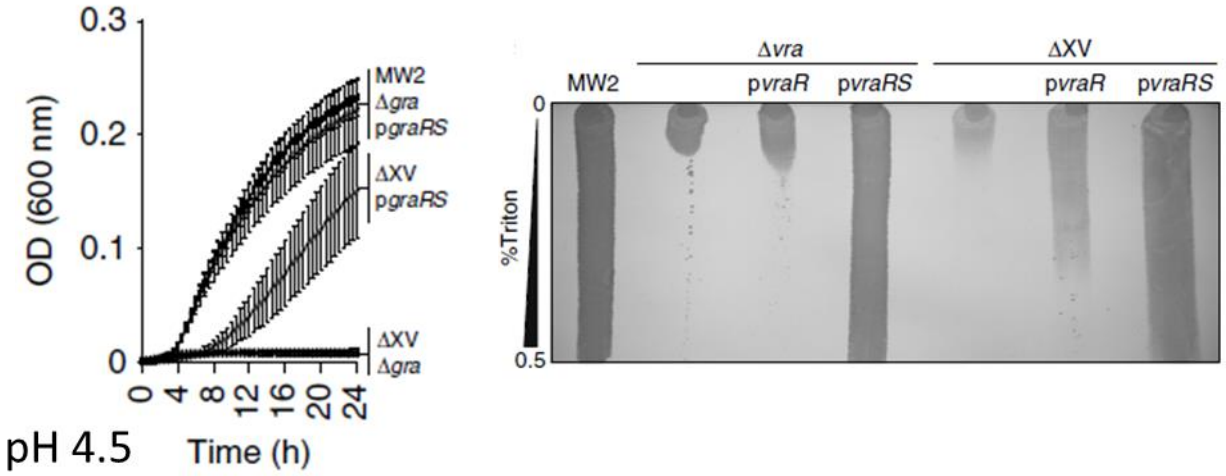
S. aureus mantiene la capacità di crescere a 37°C in aerobiosi, poche differenze nel metaboloma.

Il ceppo ΔXV ha difetti di crescita solo in **condizioni specifiche**: pH4.5, detergenti, basse temperature,…
Mostra anche attenuazione della virulenza.

→ I TCS sono necessari ai batteri per l'**adattamento a specifiche nicchie ecologiche**.

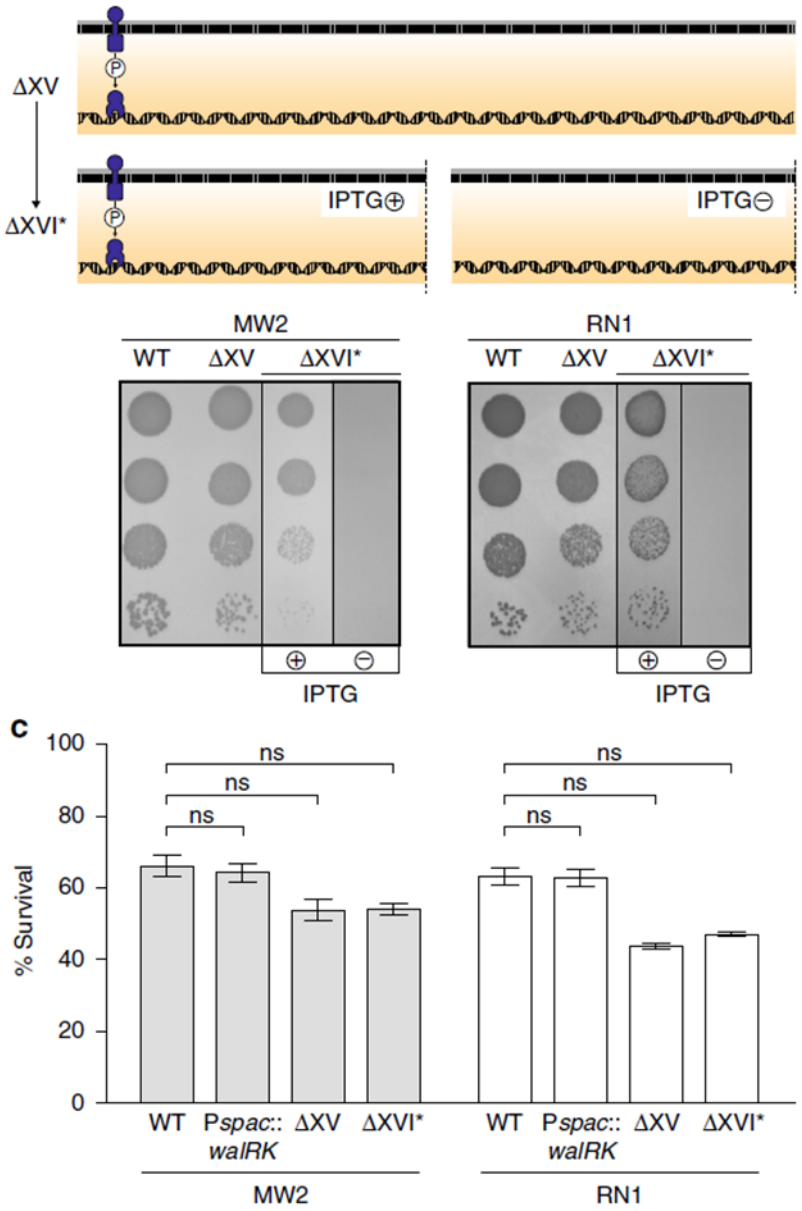






I TCS sono **entità regolatorie autosufficienti**, la complementazione con un TCS recupera solo il fenotipo associato a tale TCS.
→ **Autonomia funzionale**

Villanueva et al., 2018



Villanueva et al., 2018

WalKR è l'unico TCS di *S. aureus* **essenziale** per la crescita.

Ceppo **ΔXV*** con espressione di *walKR* indotta da IPTG.

Colture di ΔXV e ΔXV* overnight, sospensione in PBS, essiccamento su plastica per 7 giorni.
I due ceppi hanno vitalità comparabile.

→ WalKR non è essenziale per la sopravvivenza in essiccamento, durante l'arresto della crescita, ma solo durante l'attiva replicazione.

Il ceppo ΔXV è quasi in «senseless bacterium», anche se ha ancora qualche sistema di trasduzione del segnale (solo uno transmembrana).
Potrebbe essere simile all'antenato del moderno *S. aureus*, prima dell'acquisizione dei TCS e quindi della capacità di colonizzare nuove nicchie ecologiche.

Ottimo esempio di approccio genetico per la simulazione di una condizione evolutiva, acquisizione di conoscenze di base e applicative.

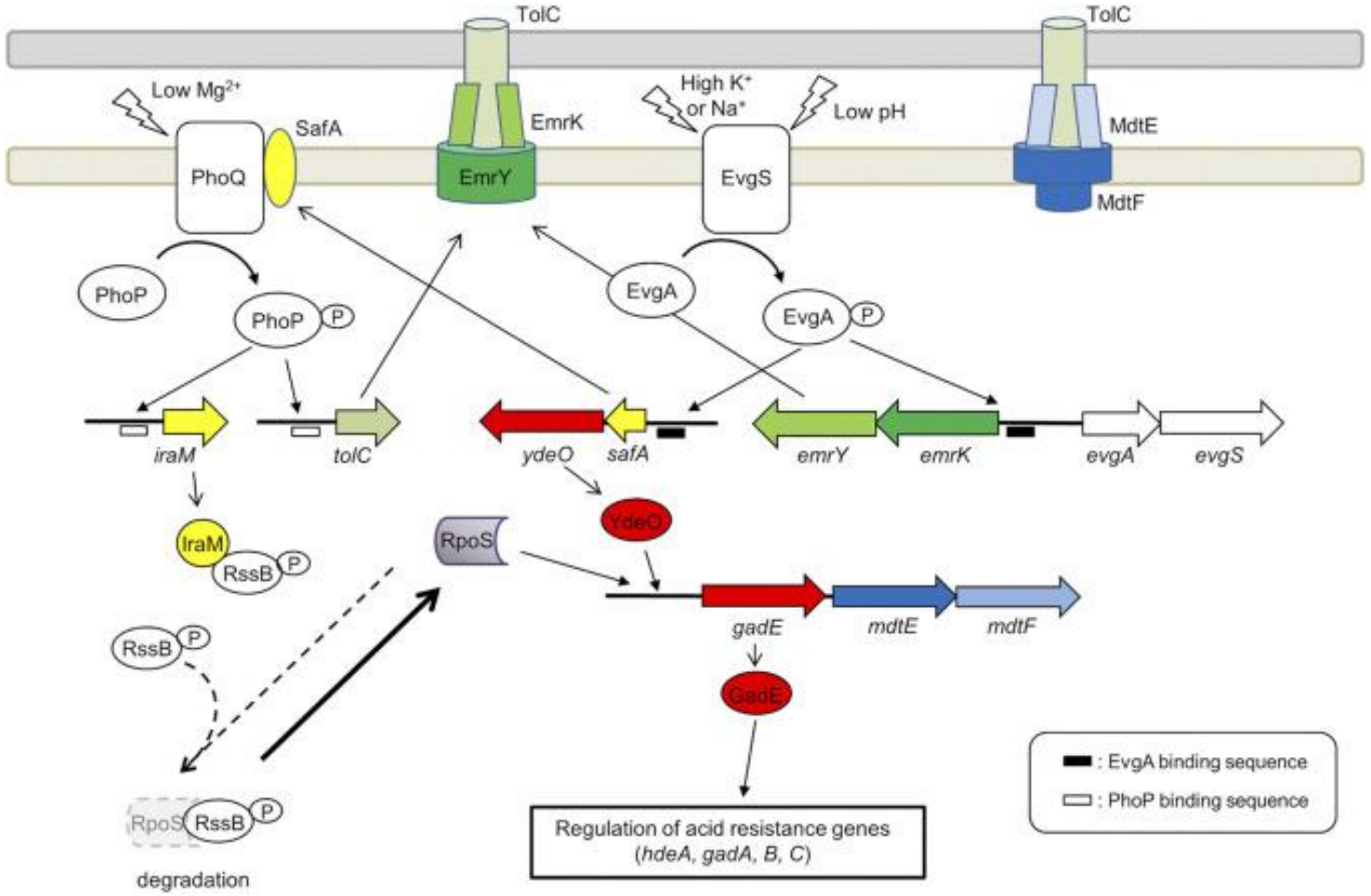
Sistemi interconnessi

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.*



Ma PhoPQ interagisce anche con il sistema Rcs in *Salmonella.*

Il gene *ugd* è regolato sia da PhoPQ che da Rcs.

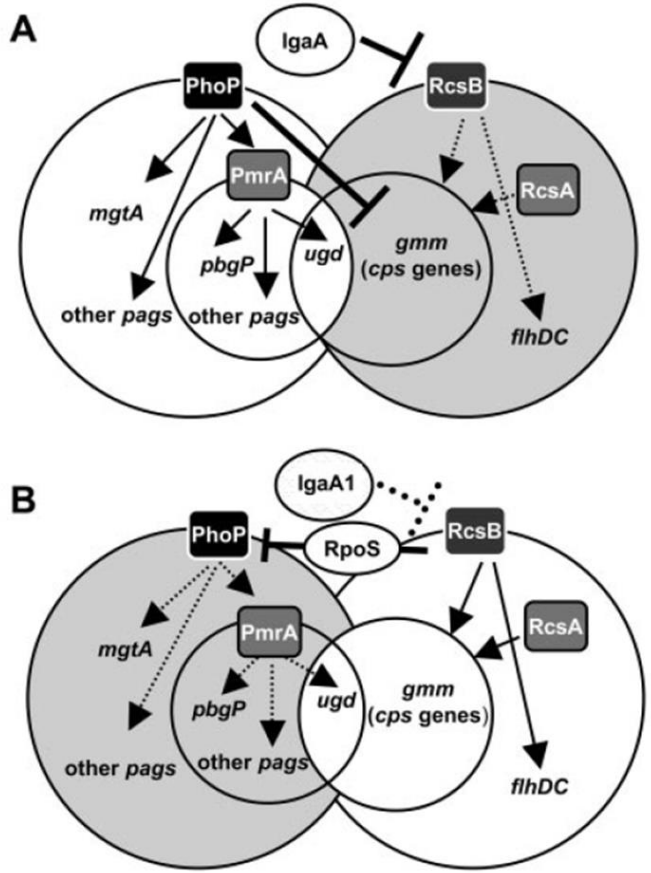
ugd → UDP-glucosio-deidrogenasi → Sintesi lipide A; Sintesi acido colanico per capsula

A) IgaA reprime Rcs:

Il gene *ugd* è indotto solo da PhoPQ via PmrA.
I geni del regulone *cps* sono inibiti da PhoP.
→ I prodotti del gene *ugd* sono usati per modifica del lipide A.
→ Condizione simile all'ambiente intracellulare, resistenza ai peptidi antimicrobici.

B) IgaA non reprime Rcs:

Il sistema Rcs è attivo e reprime via RpoS il sistema PhoPQ. RcsA/RcsB promuove l'espressione di *ugd* ed è attiva l'espressione dei geni del regulone *cps.*
→ I prodotti di *ugd* sono usati per la sintesi dell'acido colanico della capsula.
→ Ambiente extracellulare, sintesi della capsula per resistere agli stress ambientali.

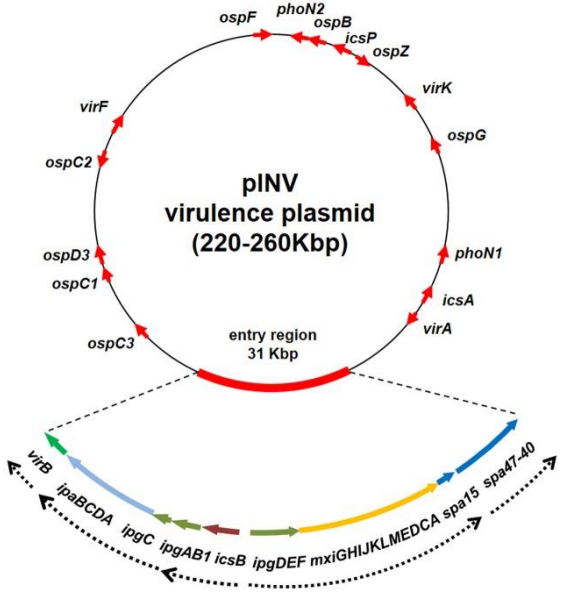


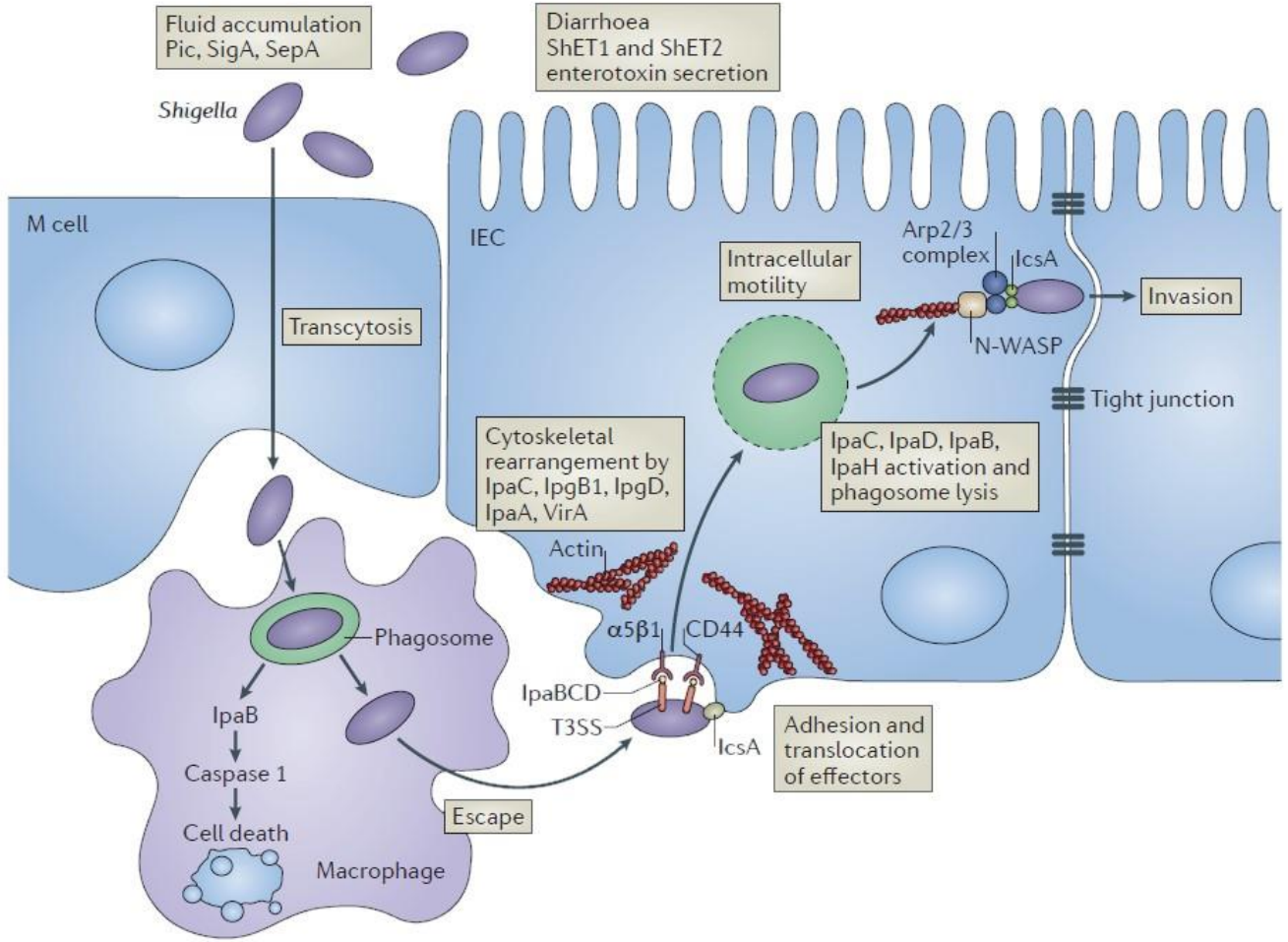
Tierrez and Garcia-Del Portillo, 2004

8. Virulenza e TCS: *Shigella flexneri*

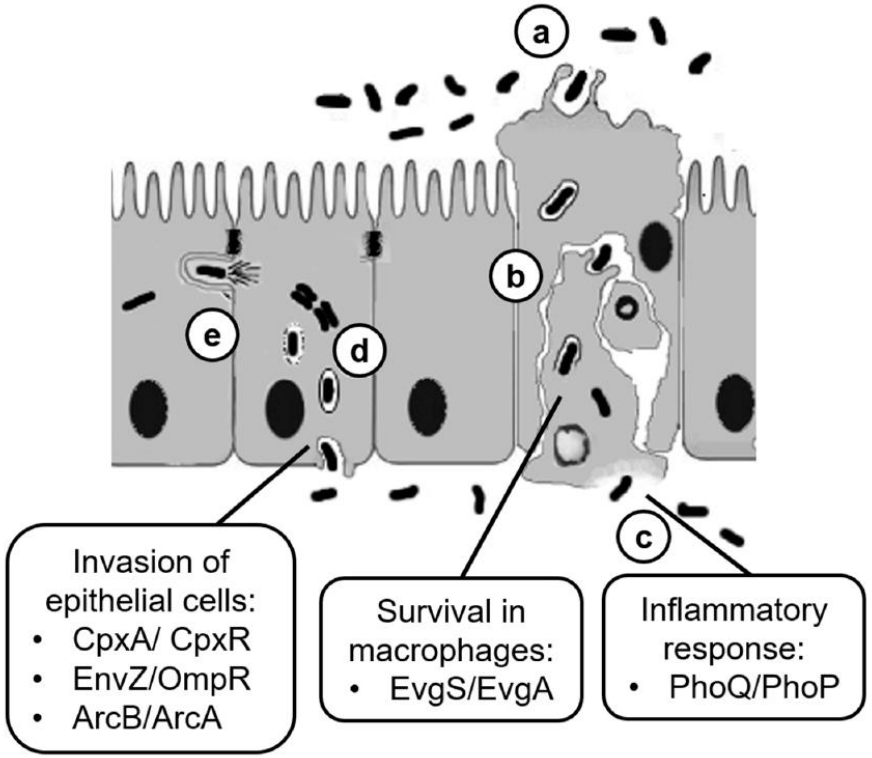
Shigella è un **patogeno enterico umano**. Agente eziologico della shigellosi.

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	*virF*, *virB*	T3SS [a] and its effectors
	EnvZ/OmpR	*ompC*	OmpC porin
	ArcB/ArcA	*iuc*, *sit* and *feo* [b] operons	Iron transport systems
Survival within macrophages	EvgS/EvgA	*emrKY*	EmrKY efflux pump
Inflammatory response and resistance to CAMPs [c]	PhoQ/PhoP	*virK*, *msbB2*, membrane biosynthesis genes	Synthesis and modification of cell envelope

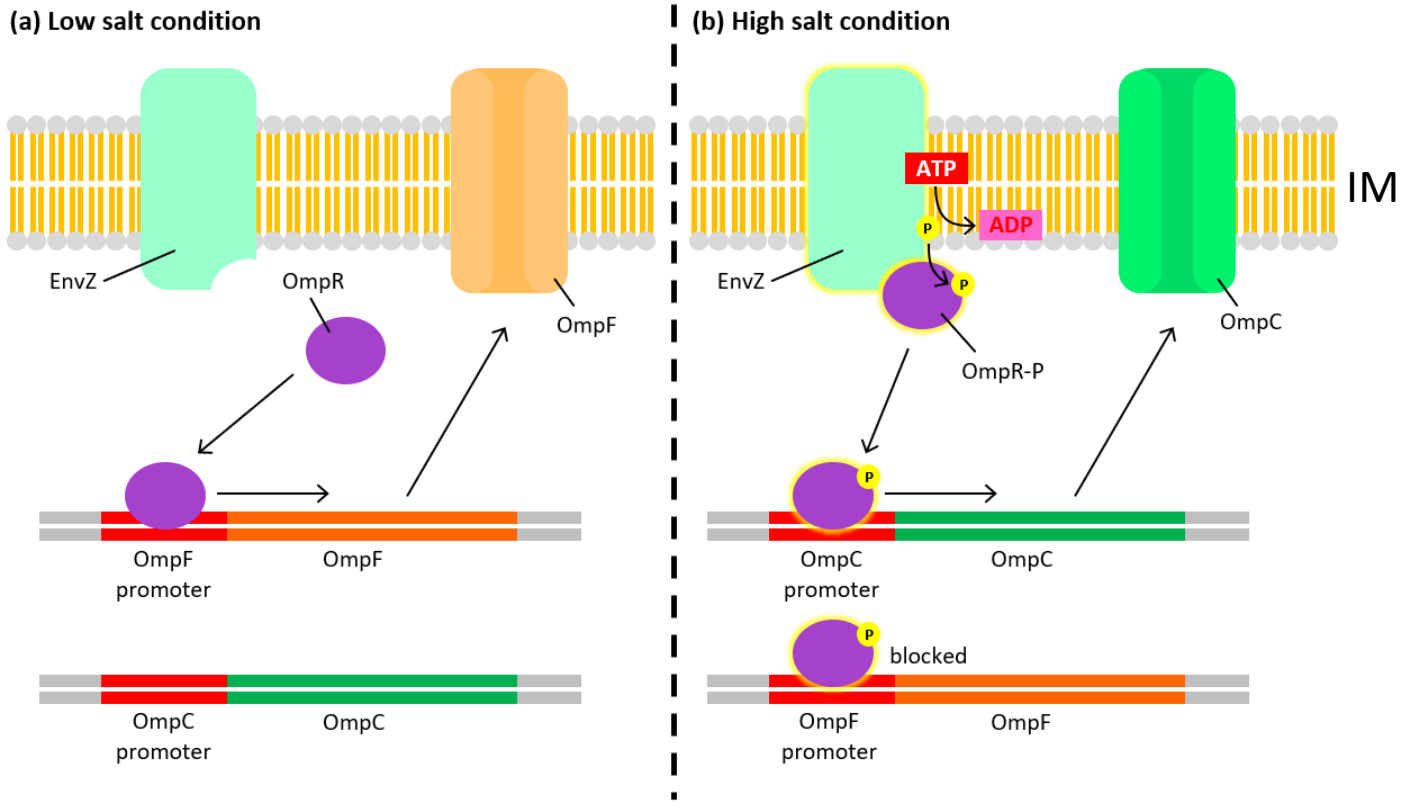
EnvZ/OmpR: osmolarità

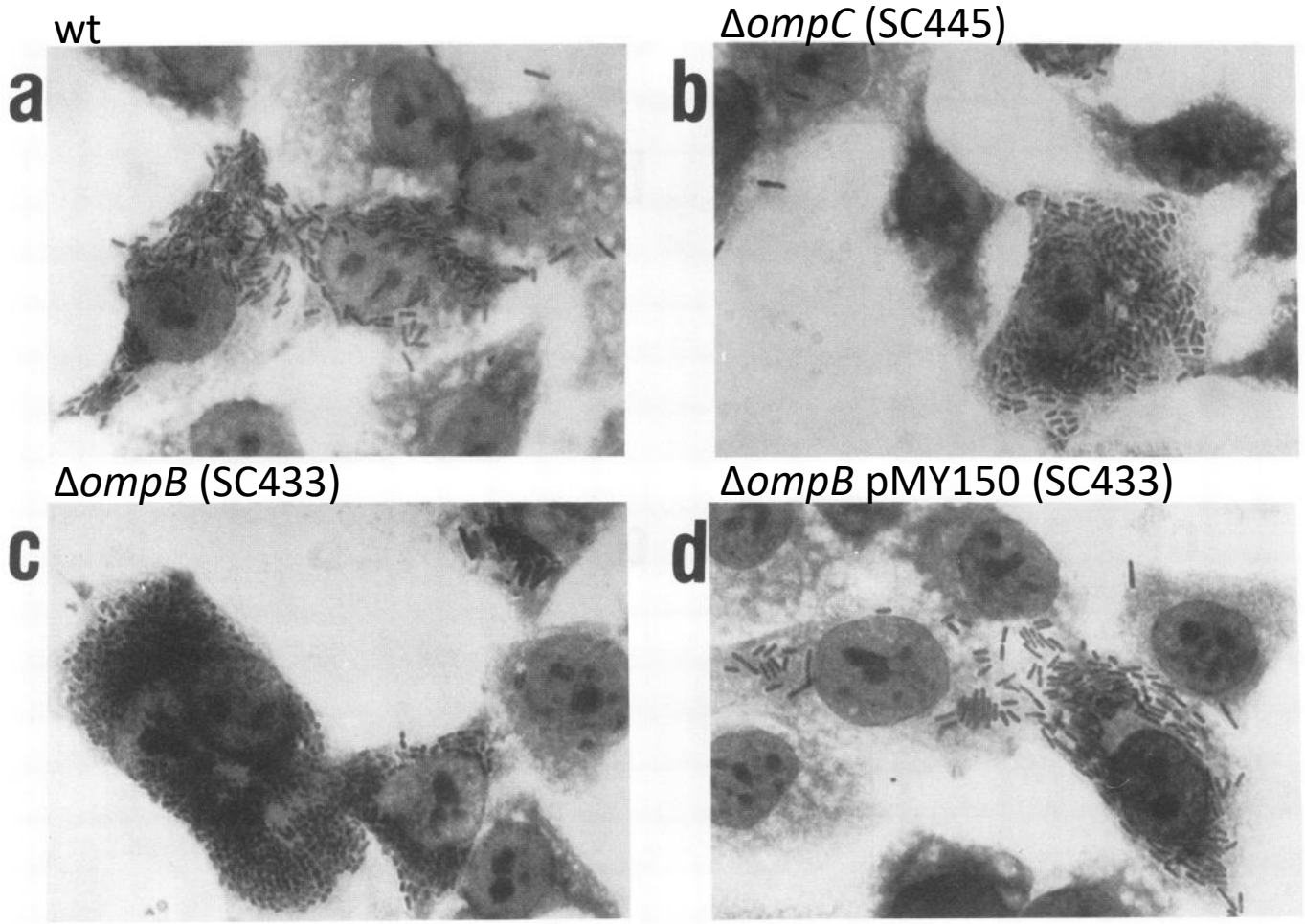
Il locus *ompB* codifica per:

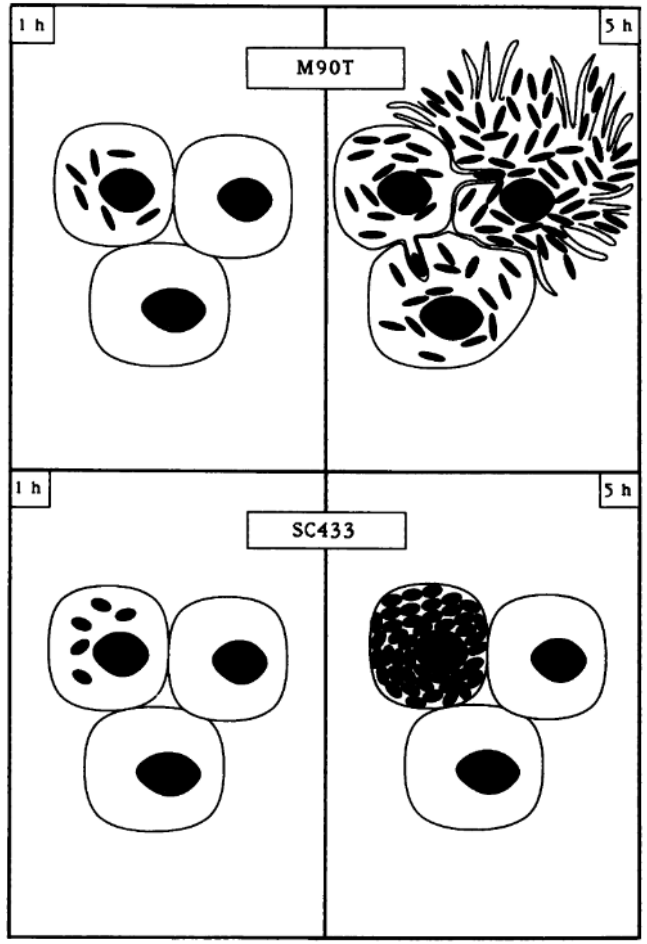
- **EnvZ**: HK della membrana interna
- **OmpR**: RR citoplasmatico, legame al DNA

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 potenzialmente dannose







Bernardini et al., 1993

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 do 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.**

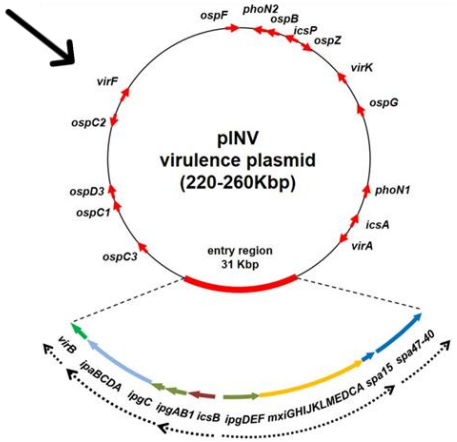
CpxA/CpxR: pH

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

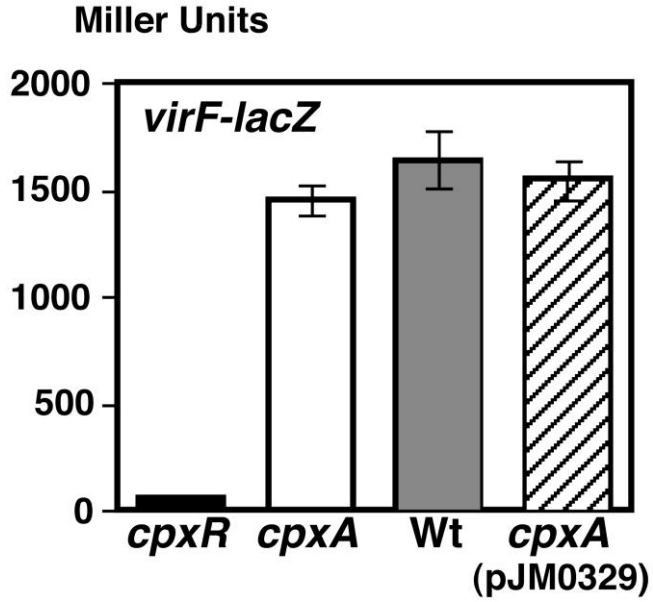
Il **pH acido** promuove l'attività **fosfatasica** di CpxA.

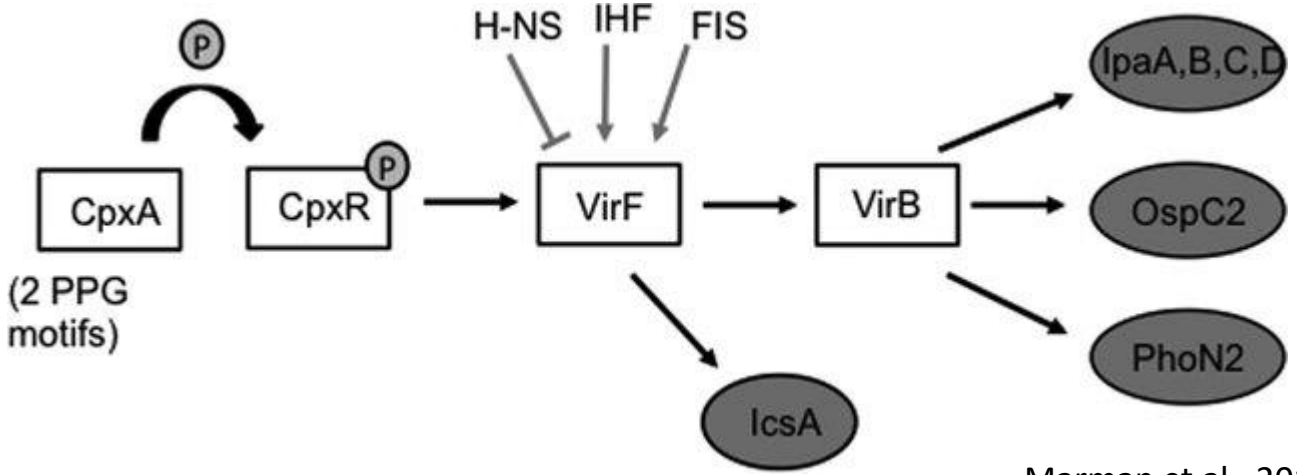
Il RR CpxR fosforilato è in grado di legarsi a una regione del promotore di *virF*, il regolatore principale della virulenza di *Shigella*.

→ **Attivazione di *virF* a pH alcalino**.



Mitobe et al., 2005





Marman et al., 2014

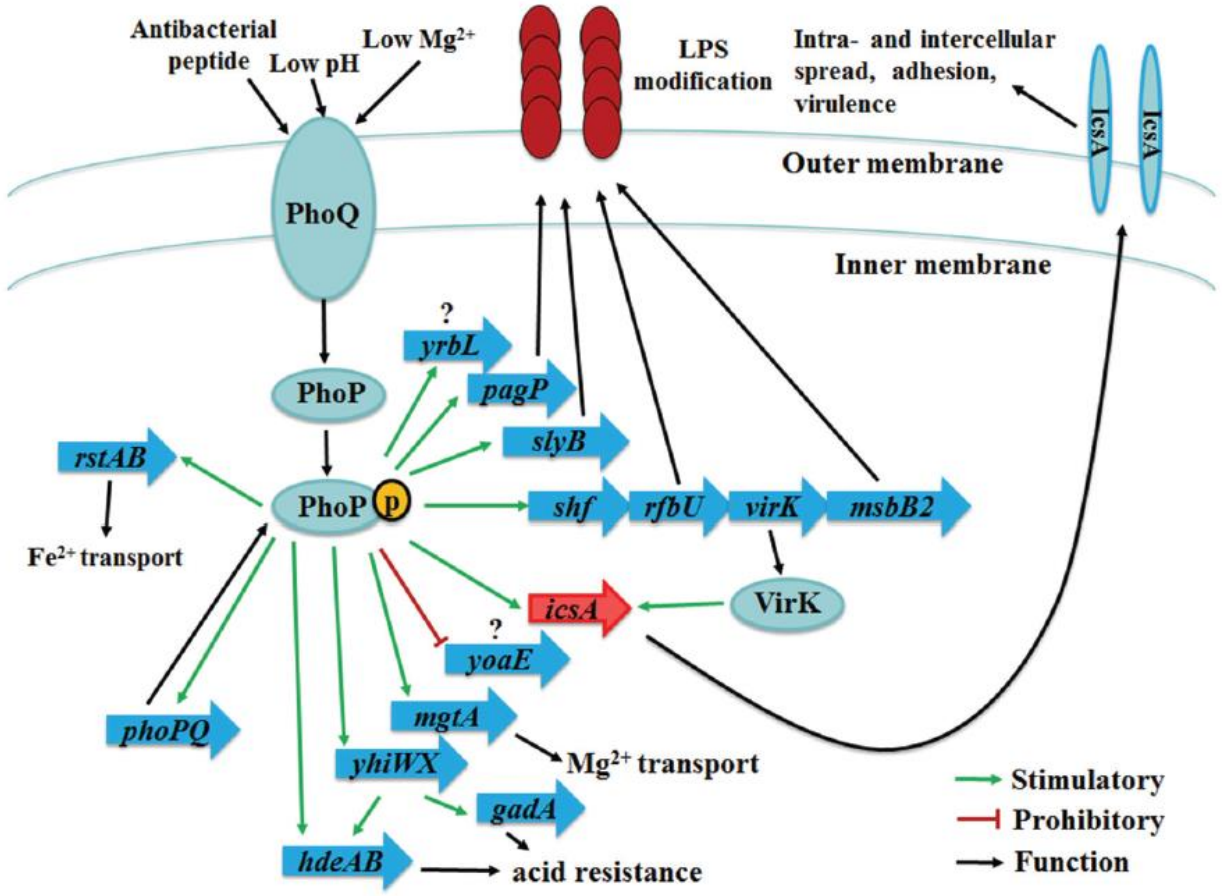
PhoP/PhoQ: ioni divalenti

PhoP: sensore HK nella IM
PhoQ: RR citoplasmatico, legame al DNA (PhoP box)

Segnali:

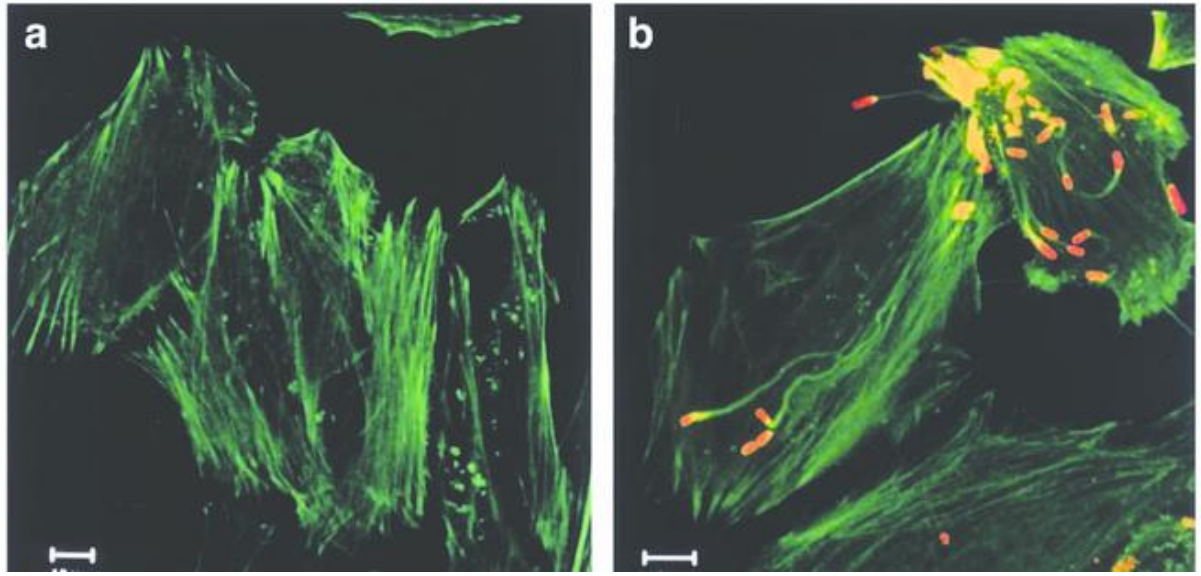
- Concentrazioni micromolari di Mg++, Ca++, Mn++
- pH leggermente acido
- Peptidi cationici antimicrobici (CAMPs)
- Stress iperosmotico (NaCl> 150 mM)

Monsieurs et al., 2005



Lin et al., 2018

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



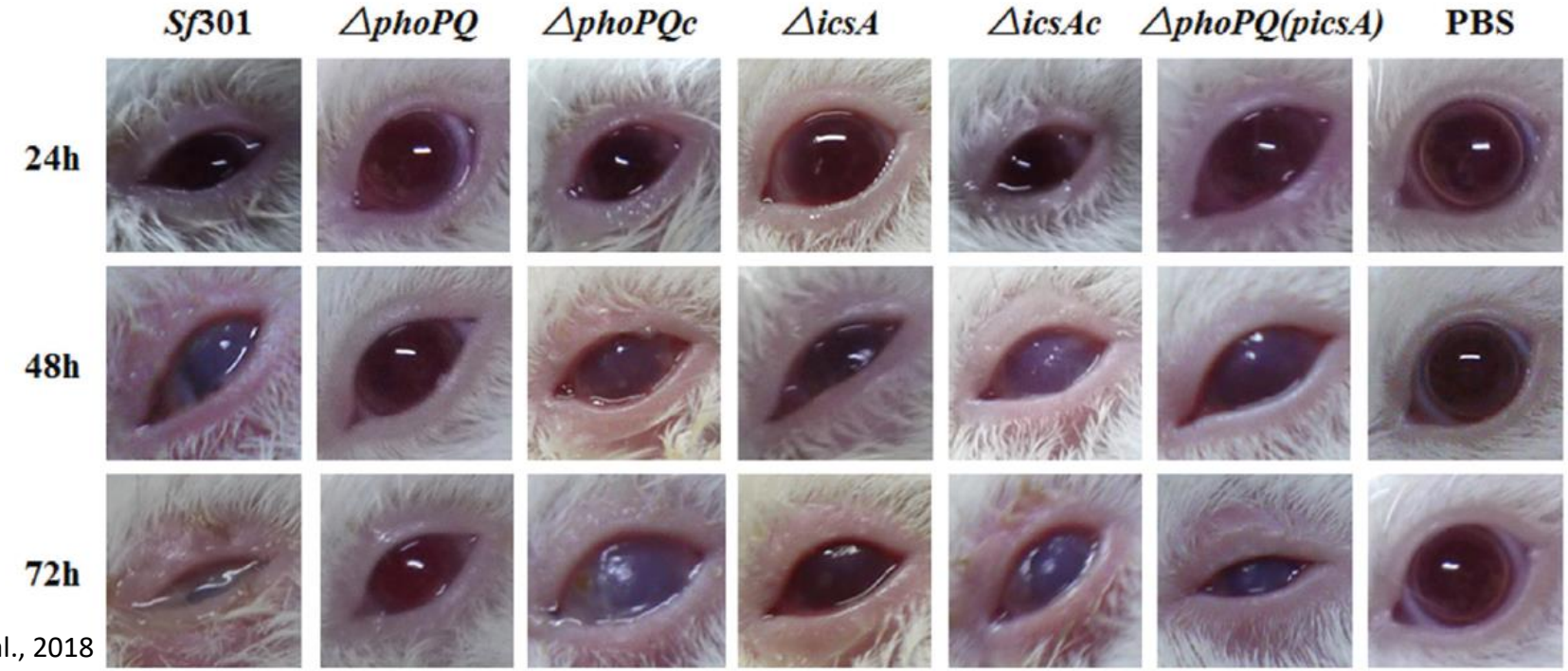
Mounier et al., 1999

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.

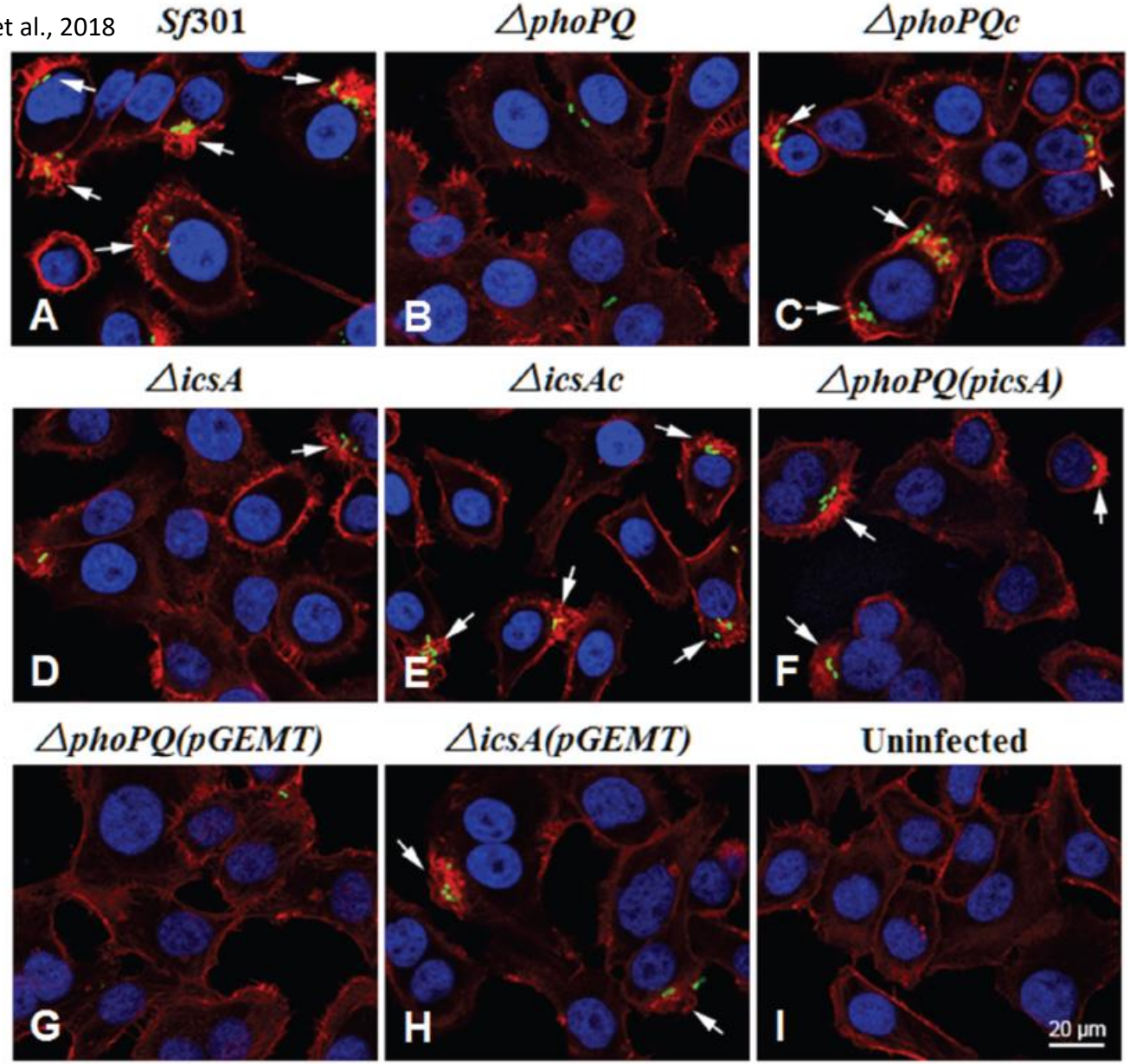
Sereny Test:
La delezione di *phoPQ* inibisce la capacità di *Shigella* di causare cheratocongiutivite nel modello porcellino d'india.

Il fenotipo è recuperato con la complementazione di IcsA.



Lin et al., 2018

Lin et al., 2018

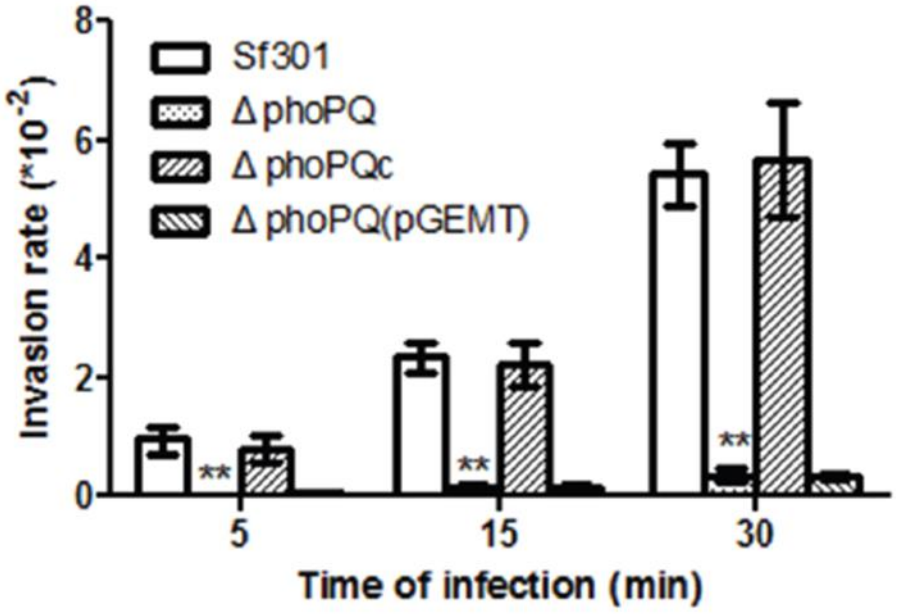


A livello microscopico…

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*.

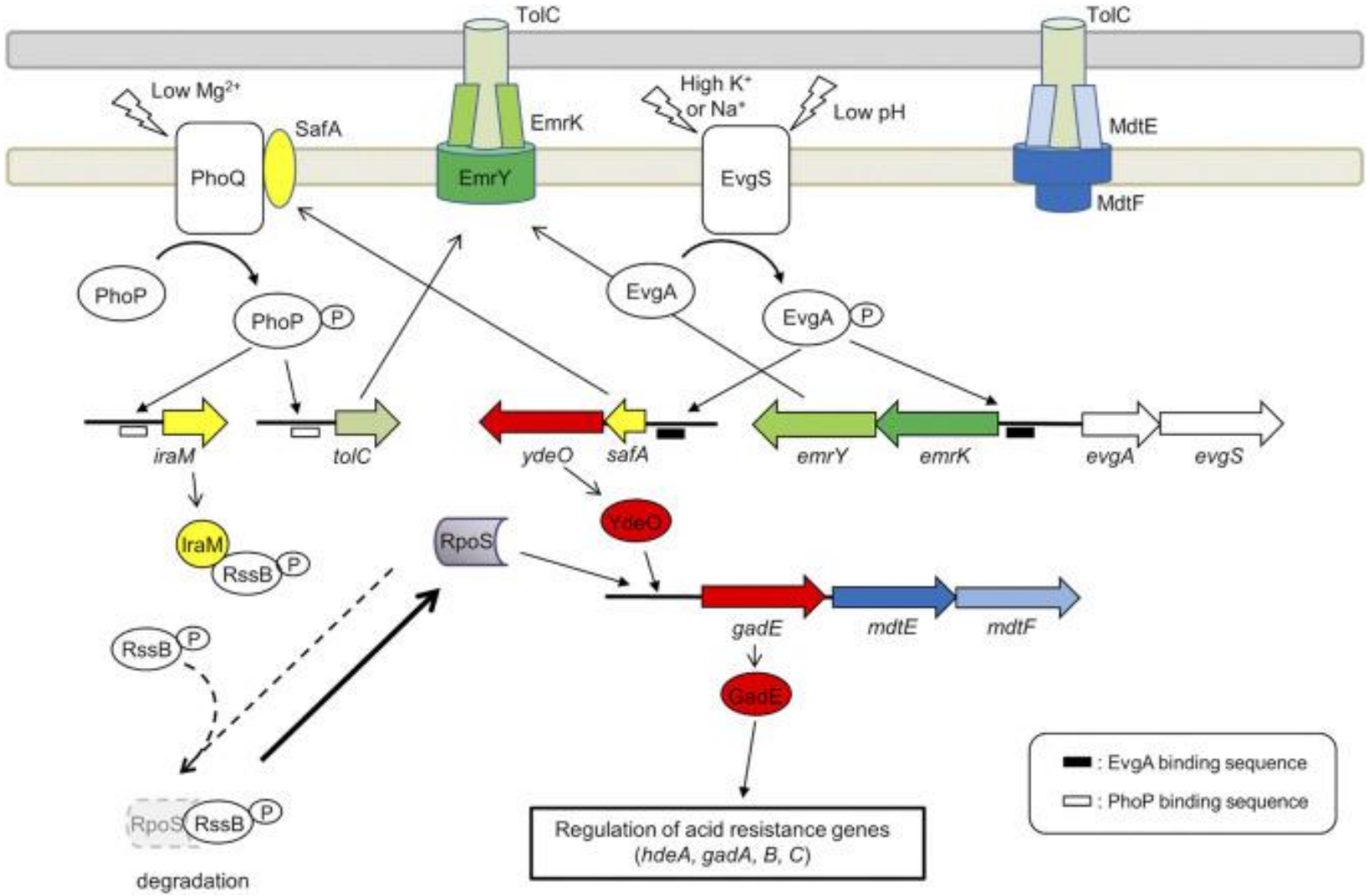
Regolazione diretta operone ***emrKY*** codificante per una pompa a efflusso **MDR**.

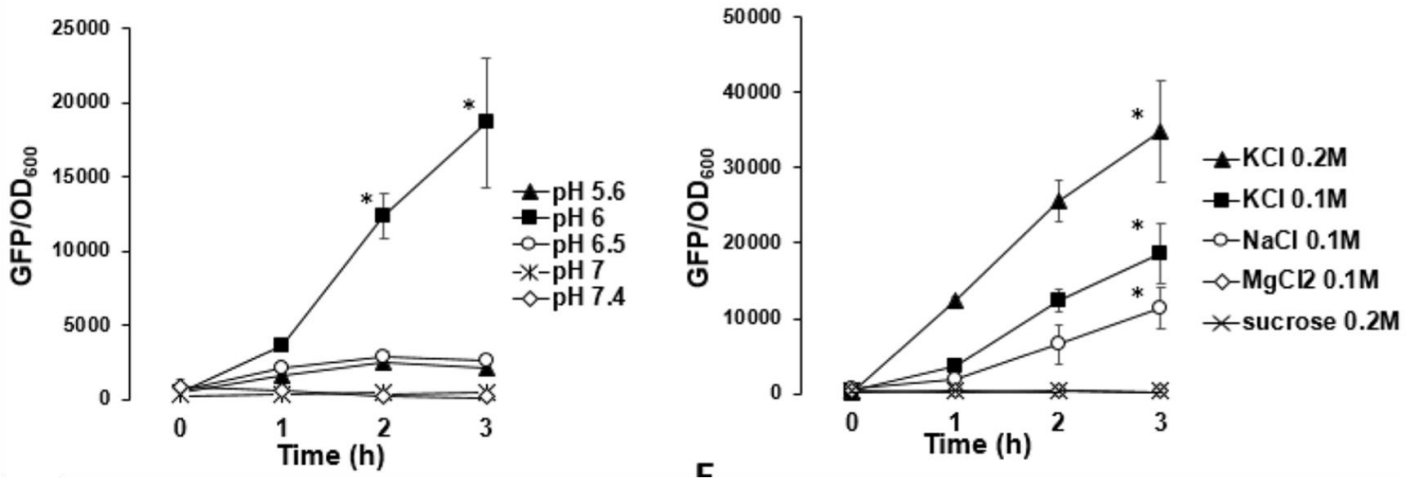
Il regulone di EvgA include anche altre pompe MDR e geni per **l'acid resistance**.

Segnali:

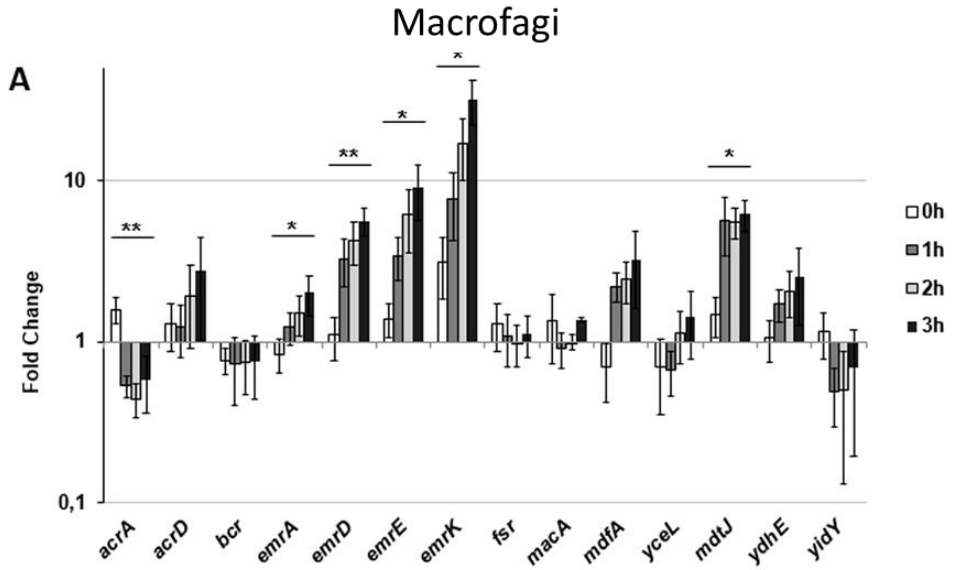
- **pH legg. Acido (5-6)**
- Aerobiosi
- Na^+/K^+>100 mM

→ Repressione nel colon





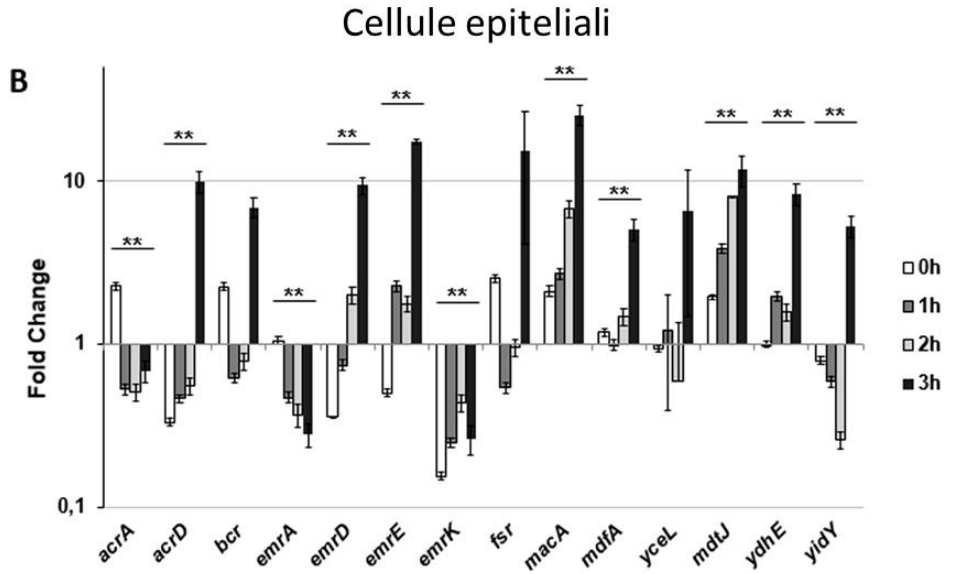
Pasqua et al., 2019



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

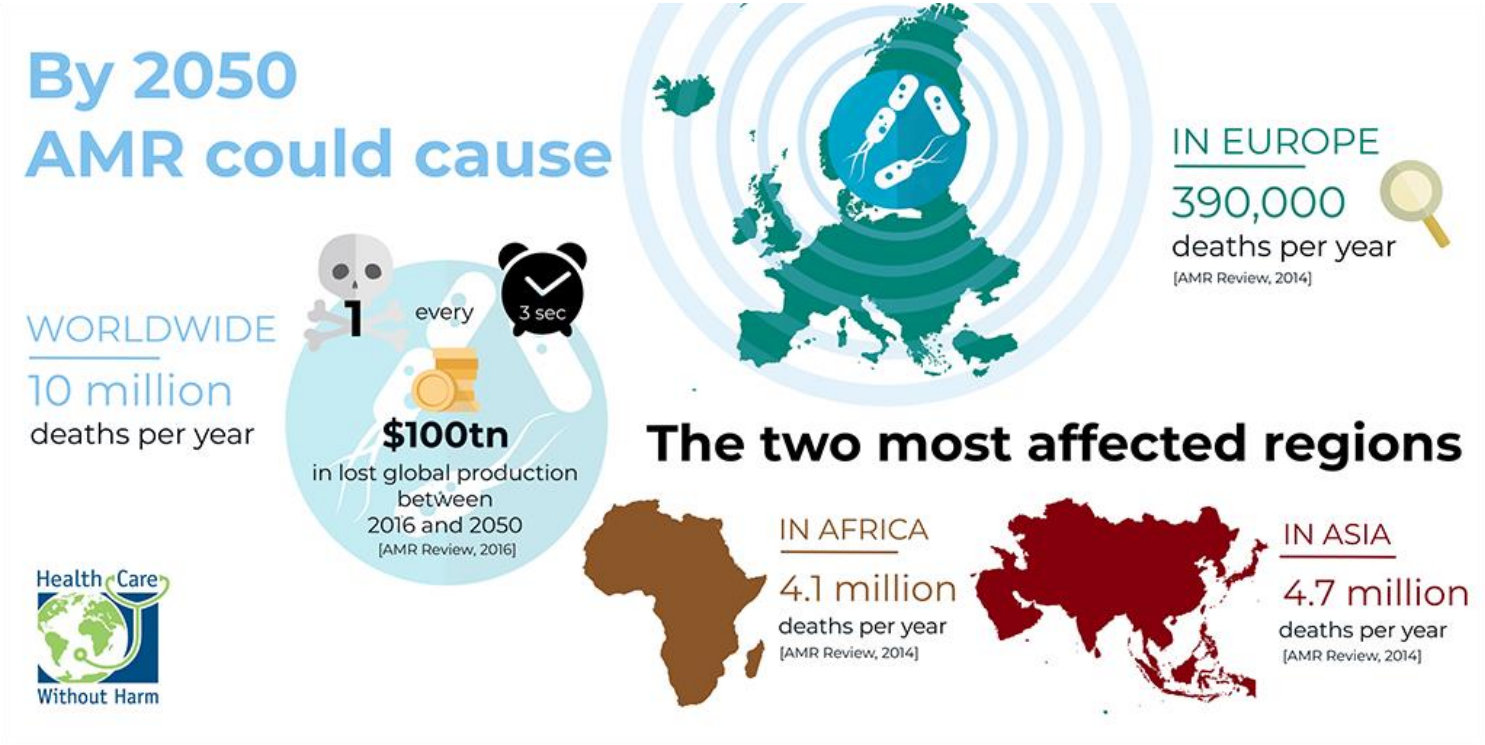
Ambiente intrac. Epiteliale:
- pH neutro



9. Inibitori dei TCS

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

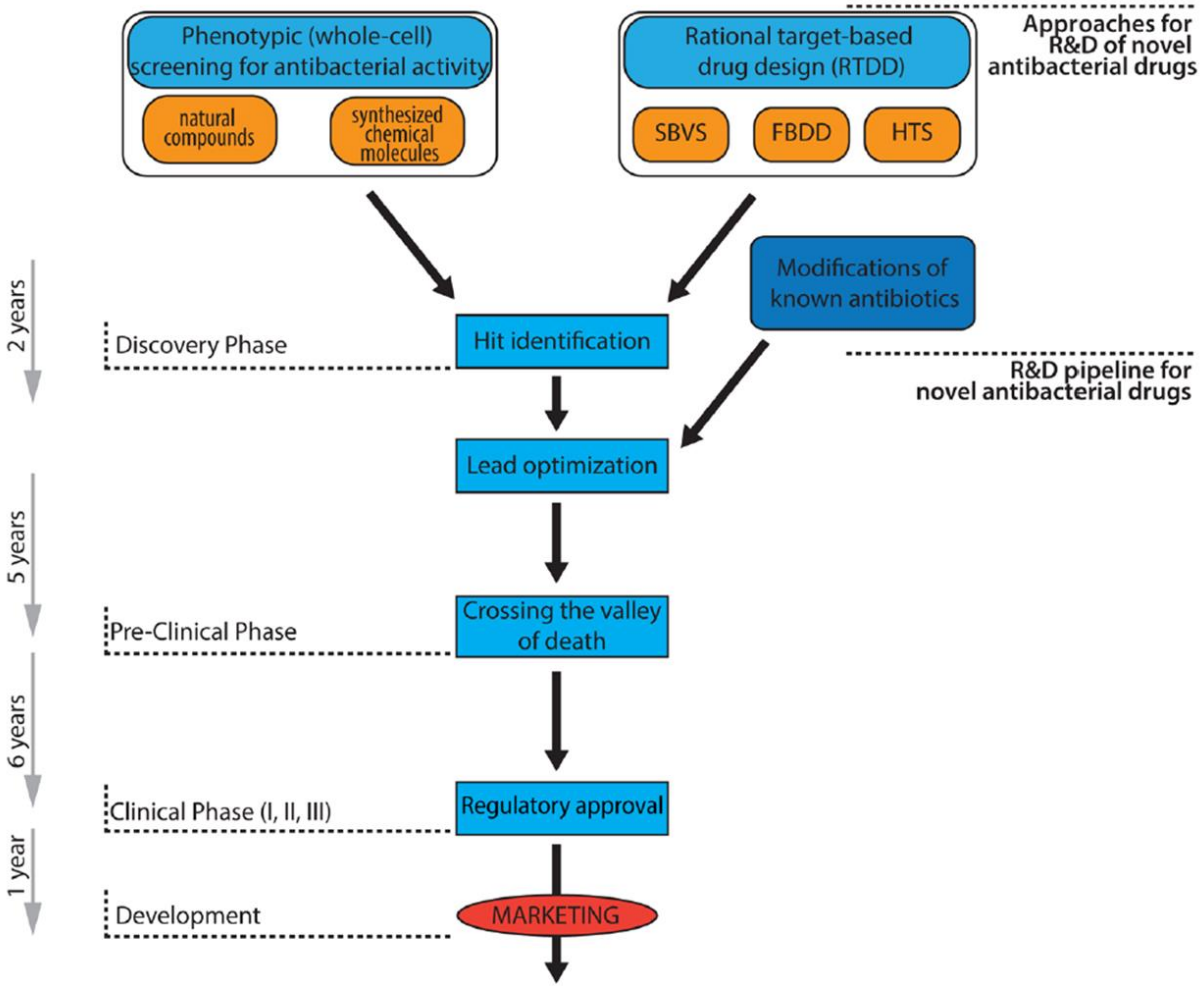
- Aumento ceppi MDR
- Terapie prolungate
- Co-morbidità con malattie immunosoppressive
- Fase di latenza batterica con stato dormiente
- Lento sviluppo di nuovi antibiotici

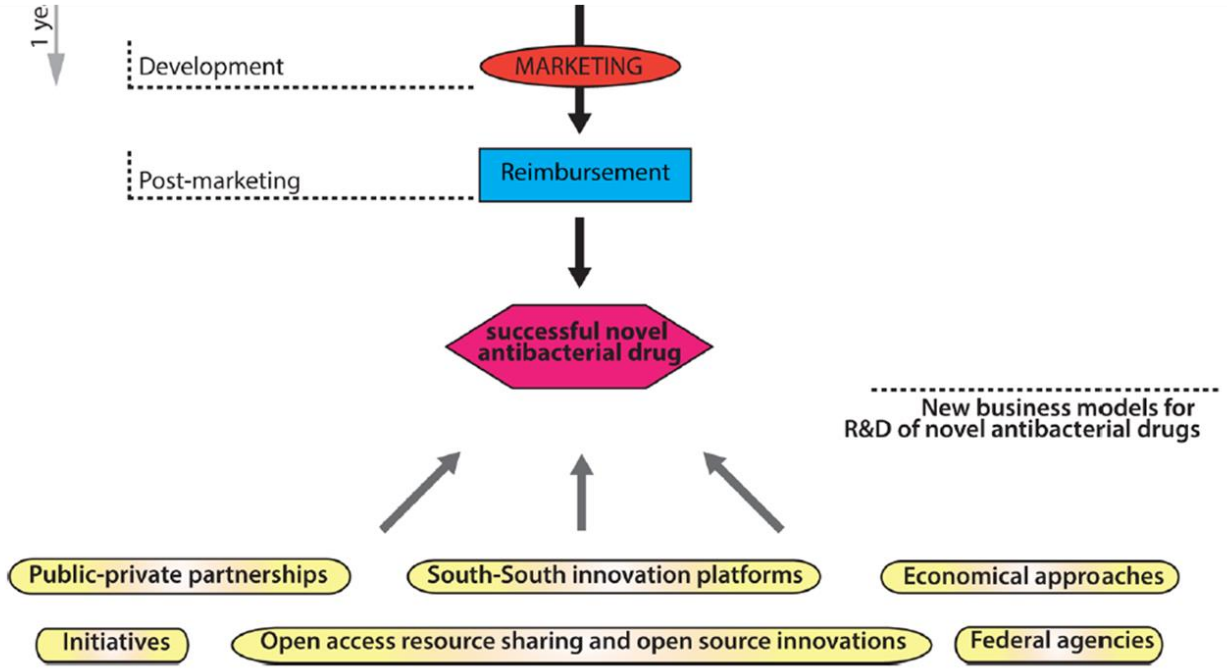


Trovare nuovi target batterici, ma con quali caratteristiche?

- 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



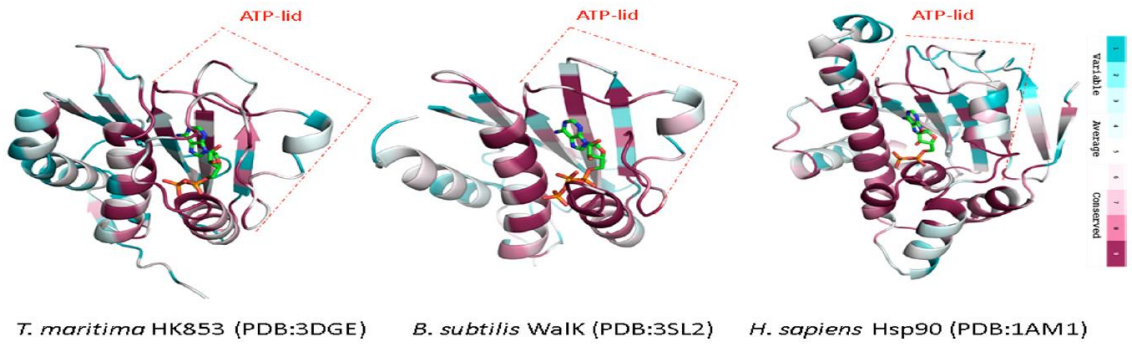


PRO

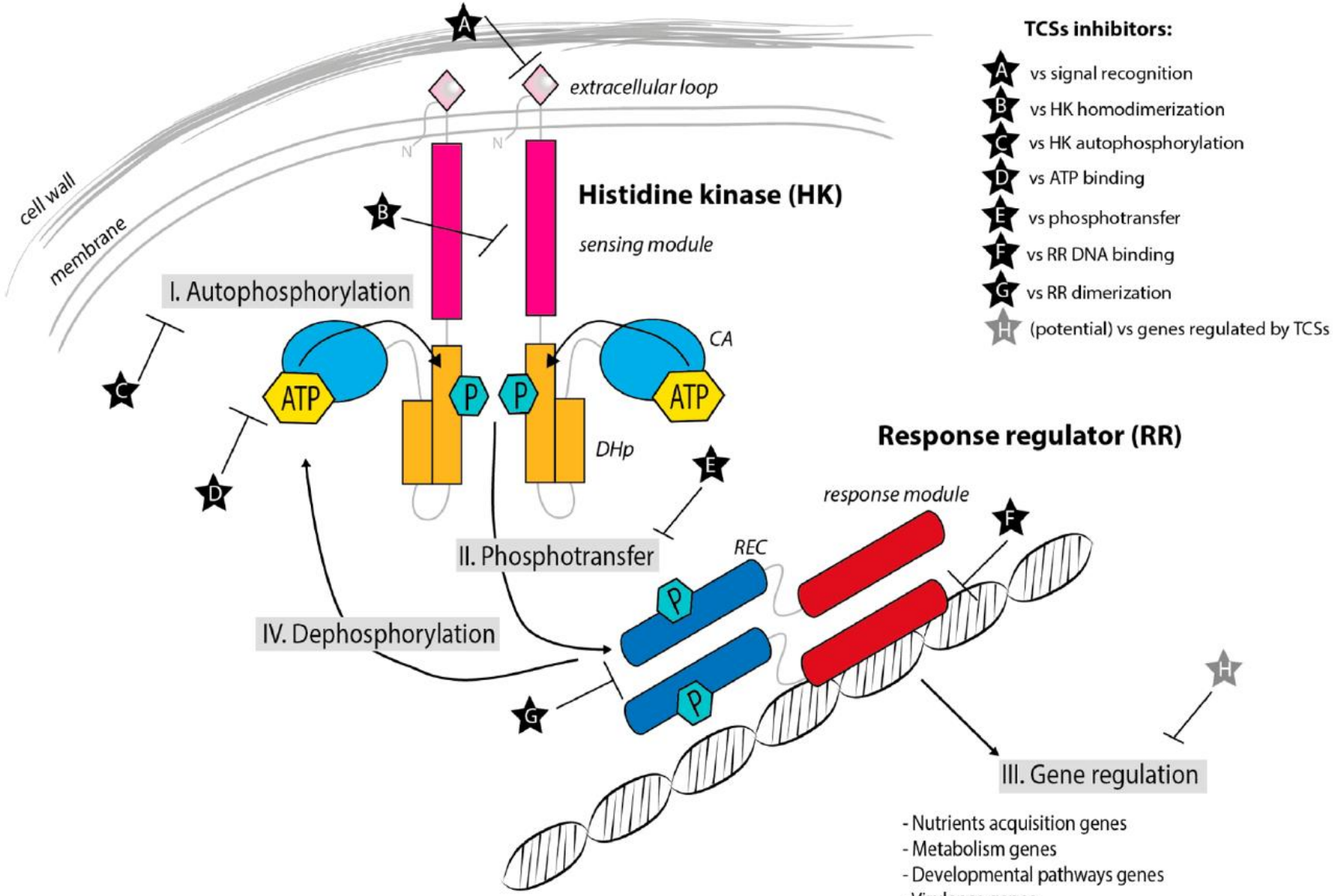
- Gli HK sono molto conservati
  → targeting simultaneo di più TCS e più patogeni
  → insorgenza più lenta di resistenze
- Non esistono HK negli esseri umani
- Molti fenotipi di virulenza e di antibiotico resistenza sono regolati da TCS
- Molti TCS sono essenziali per crescita e sopravvivenza
- Disponibilità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



T. maritima HK853 (PDB:3DGE) *B. subtilis* WalK (PDB:3SL2) *H. sapiens* Hsp90 (PDB:1AM1)



Bem et al., 2015

Sequestro del segnale

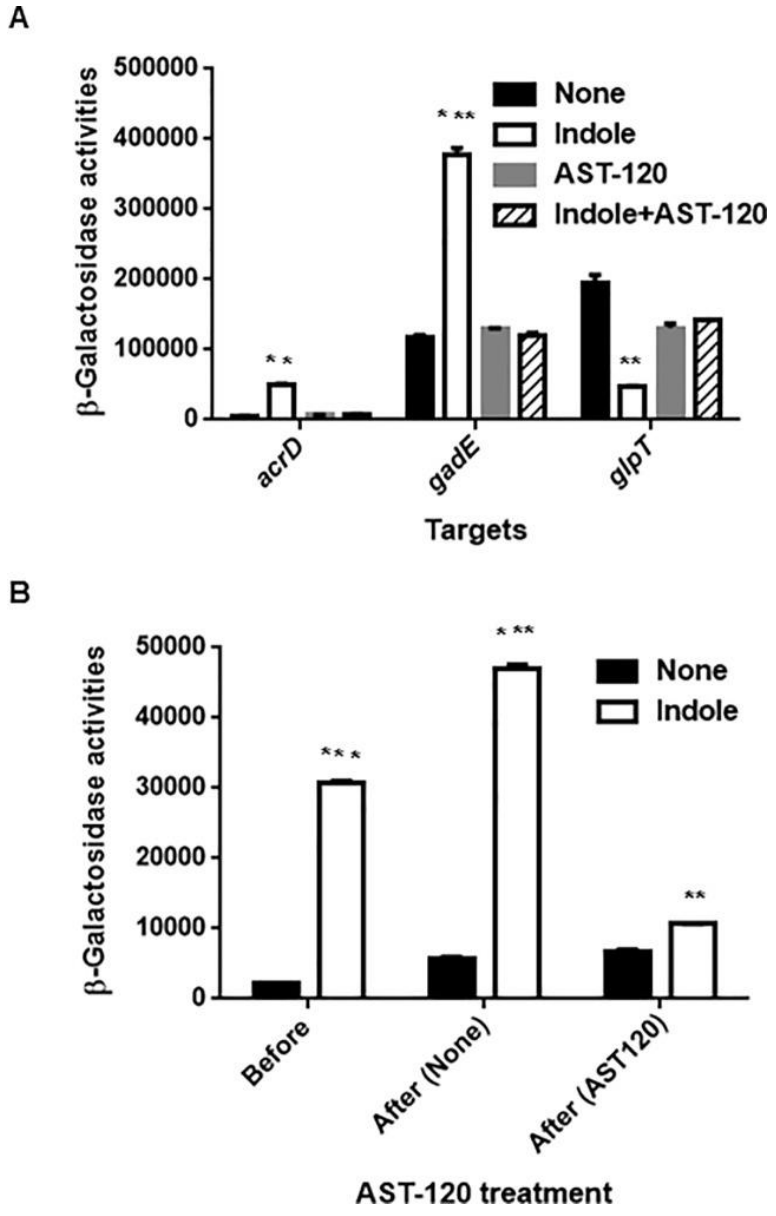
Inattivare il TCS senza colpirlo.

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.

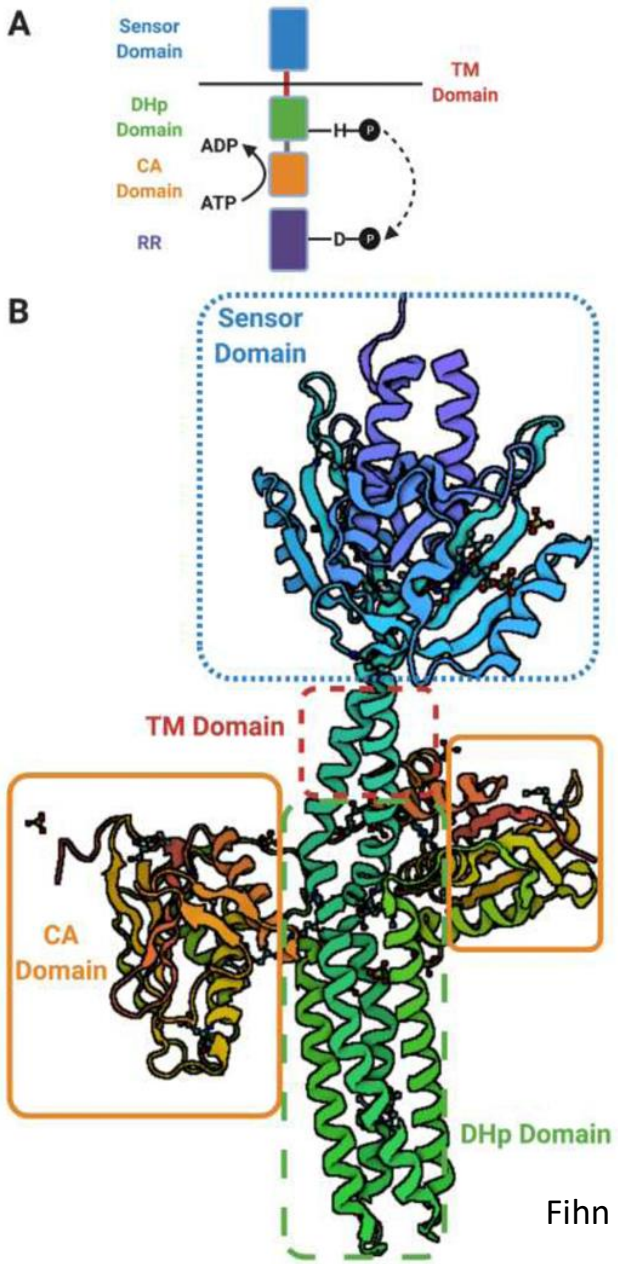
L'indolo è percepito da **CpxA e BaeS** → attivazione di CpxR e BaeR.

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.



Hirakawa et al., 2020



Fihn et al., 2021

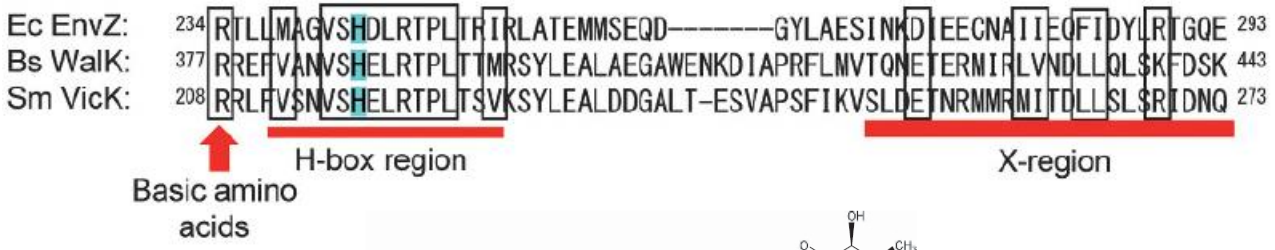
Inibizione del sensore

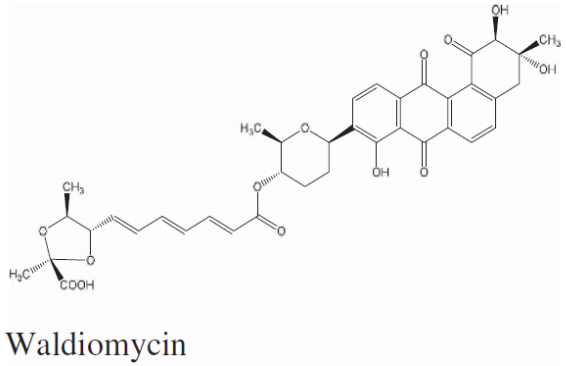
L'attività del sensore dipende dalla fosforilazione con il gruppo fosfato dell'ATP e da un residuo conservato di istidina, differentemente dalle chinasi di mammifero che si basano su serina o treonina.

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**.

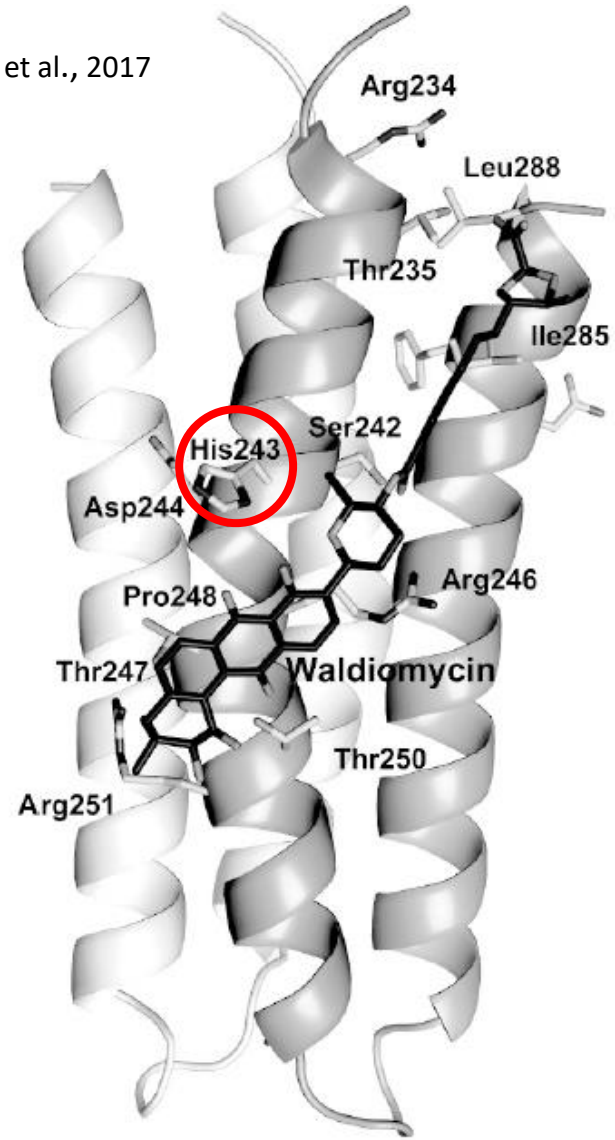
→ **Waldiomicina**

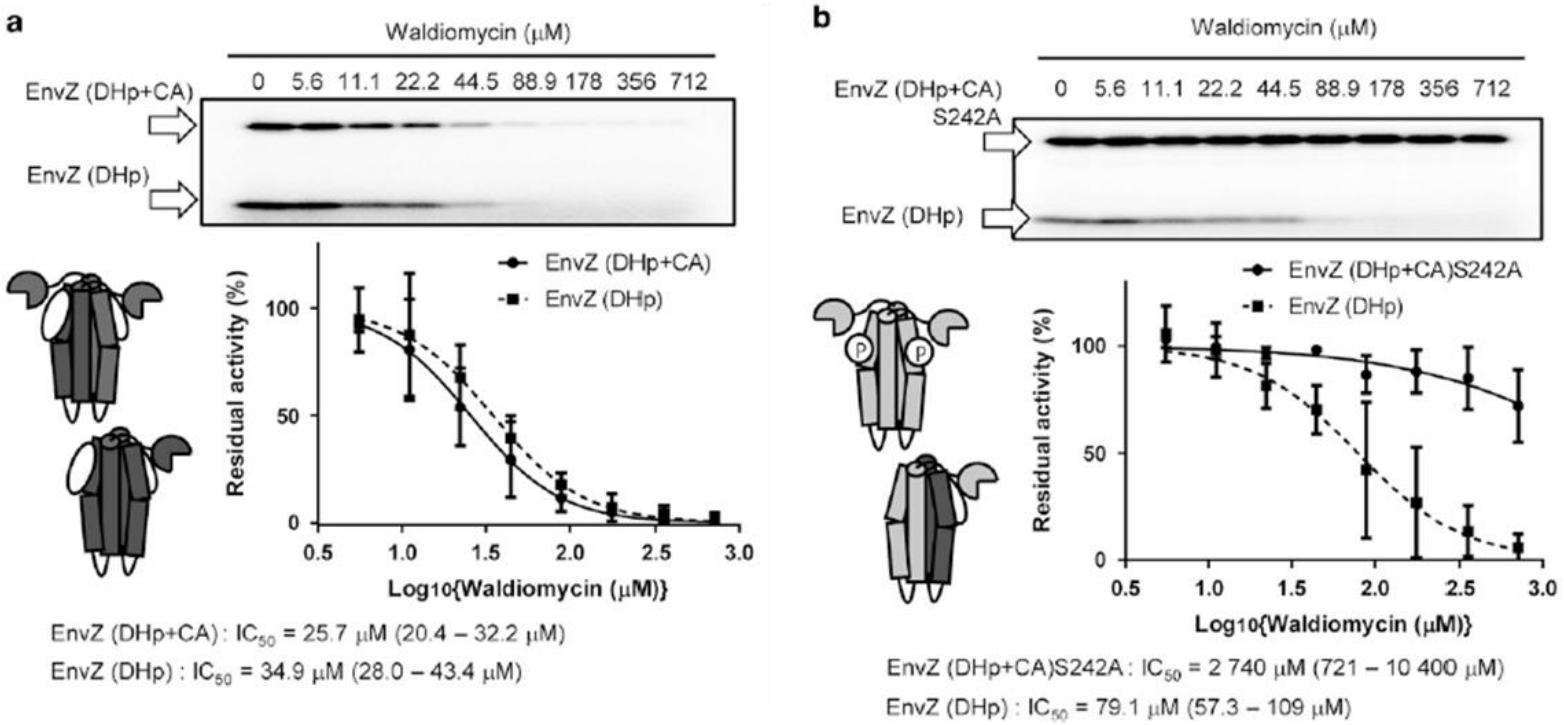




Eguchi et al., 2017

Eguchi et al., 2017





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*.

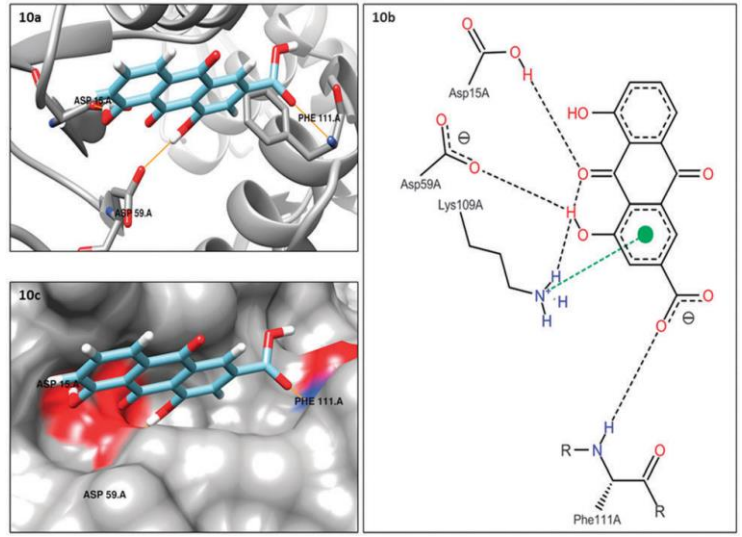
Attivo anche contro molte HK di Gram-negativi, incluso *E. coli*.

Inibizione del regolatore

I più comuni meccanismi di azione sono:

- Inibizione della **fosforilazione su Asp**

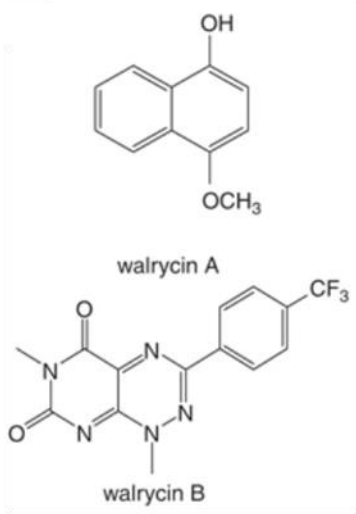
  La rheina, un composto appartenente agli antrachinoni estratto da alcune piante, impedisce la fosforilazione di Asp59 del RR PhoP in *Corynebacterium pseudotubercolosis.*

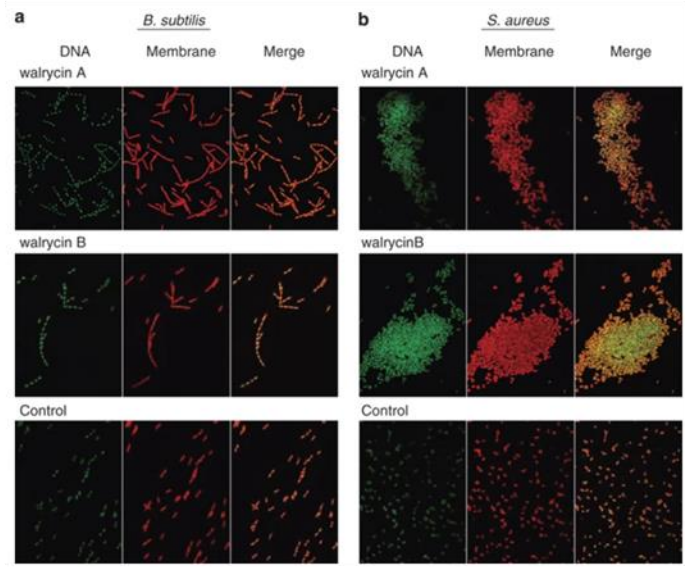


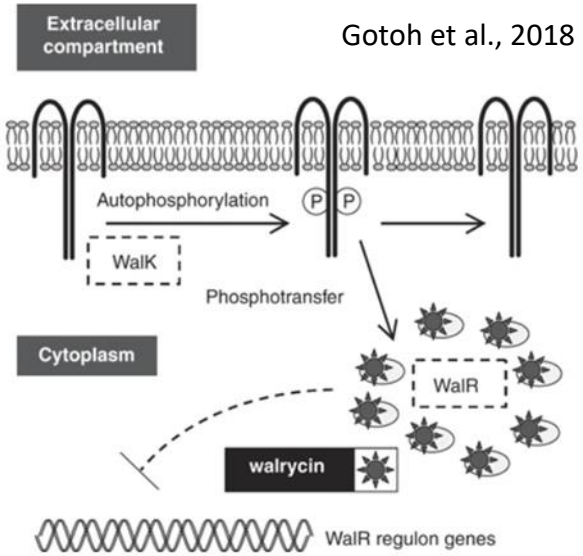
Tiwari et al., 2014

- 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*).







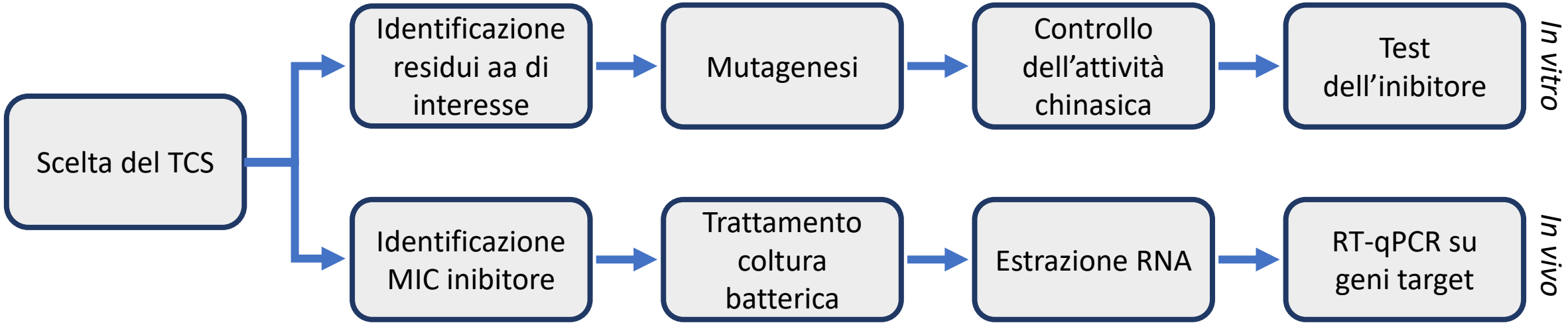
Gotoh et al., 2018

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

10. Come si studia un TCS?

SANKEN 大阪大学 産業科学研究所

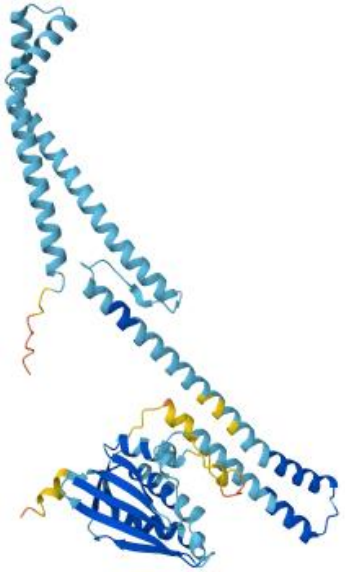
大阪大学 OSAKA UNIVERSITY



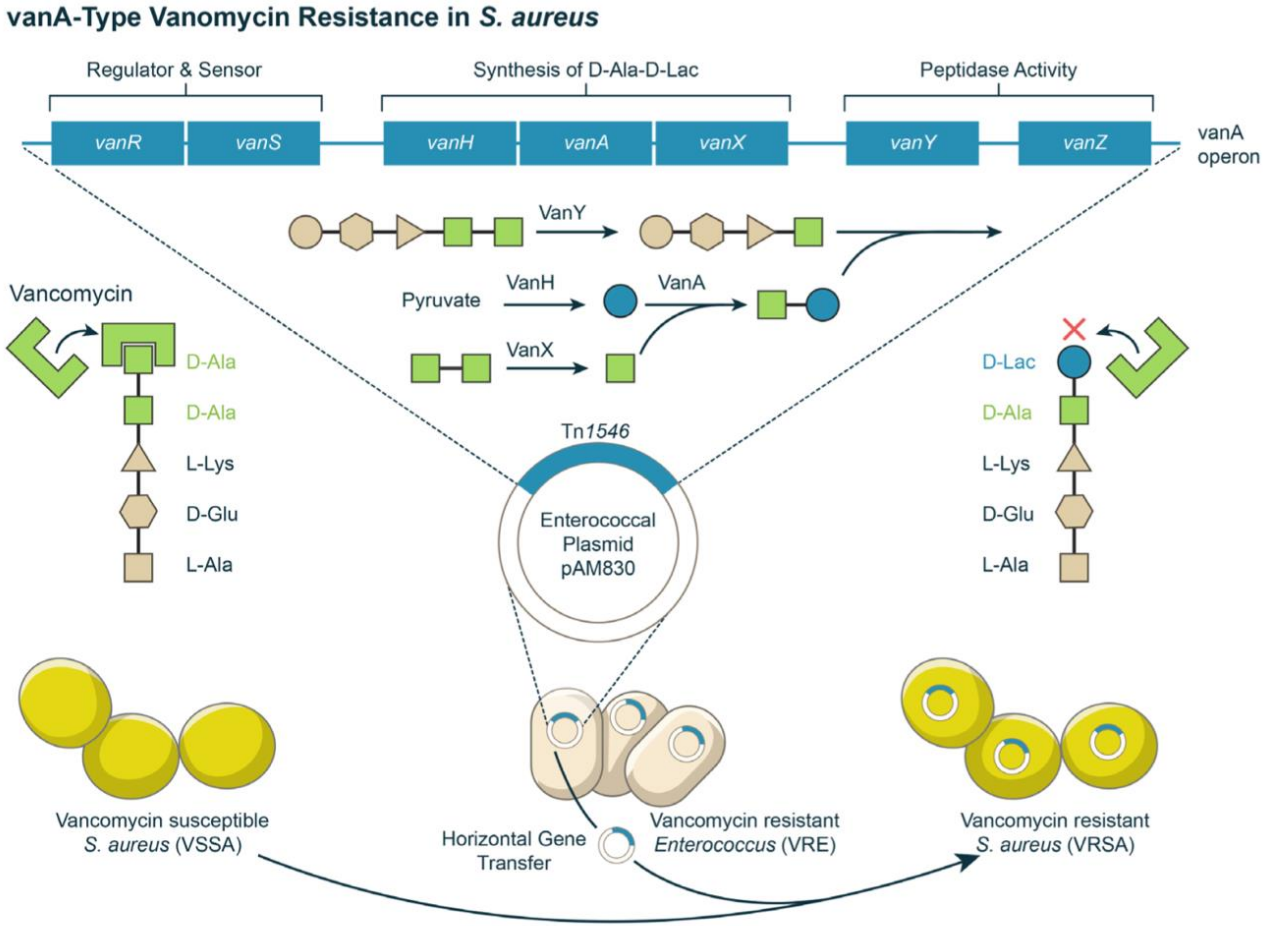
Scelta del TCS → Identificazione residui aa di interesse → Mutagenesi → Controllo dell'attività chinasica → Test dell'inibitore

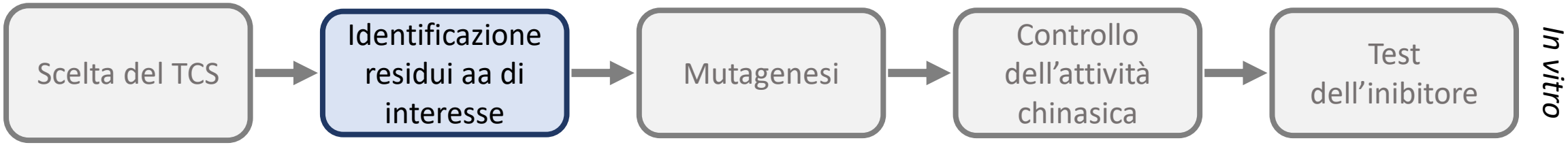
In vitro

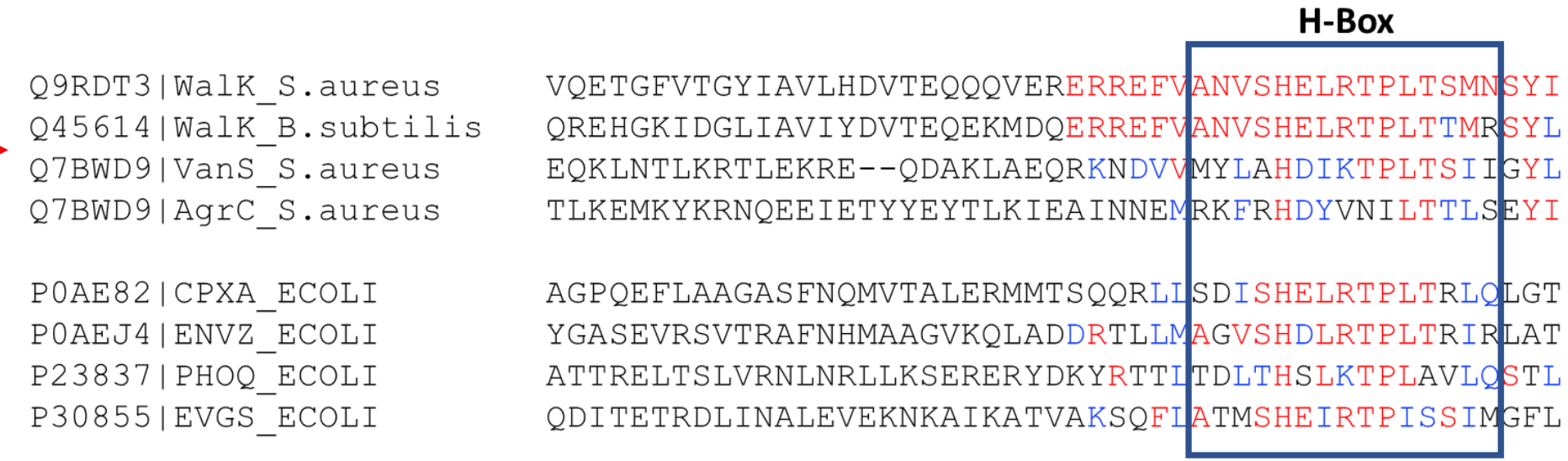
Staphylococcus aureus



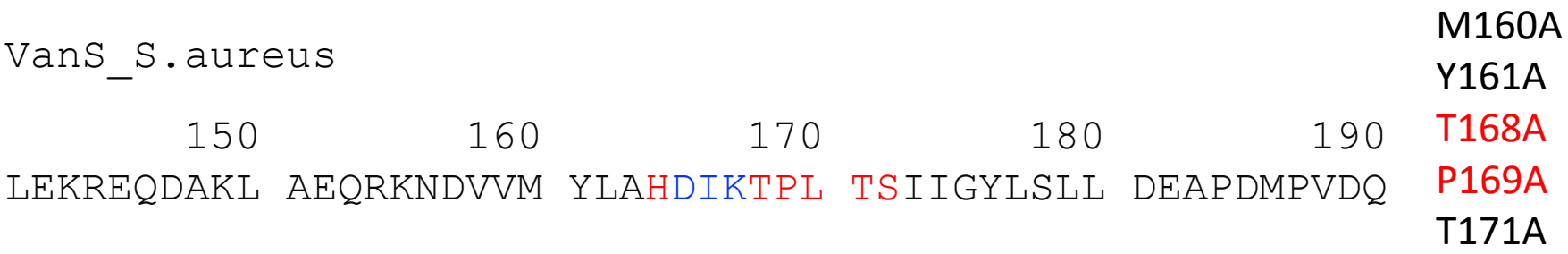
VanS (HK)
Struttura da AlphaFold







La H-box è estremamente conservata anche in istidina chinasi di batteri filogeneticamente lontani e con diversi stili di vita.

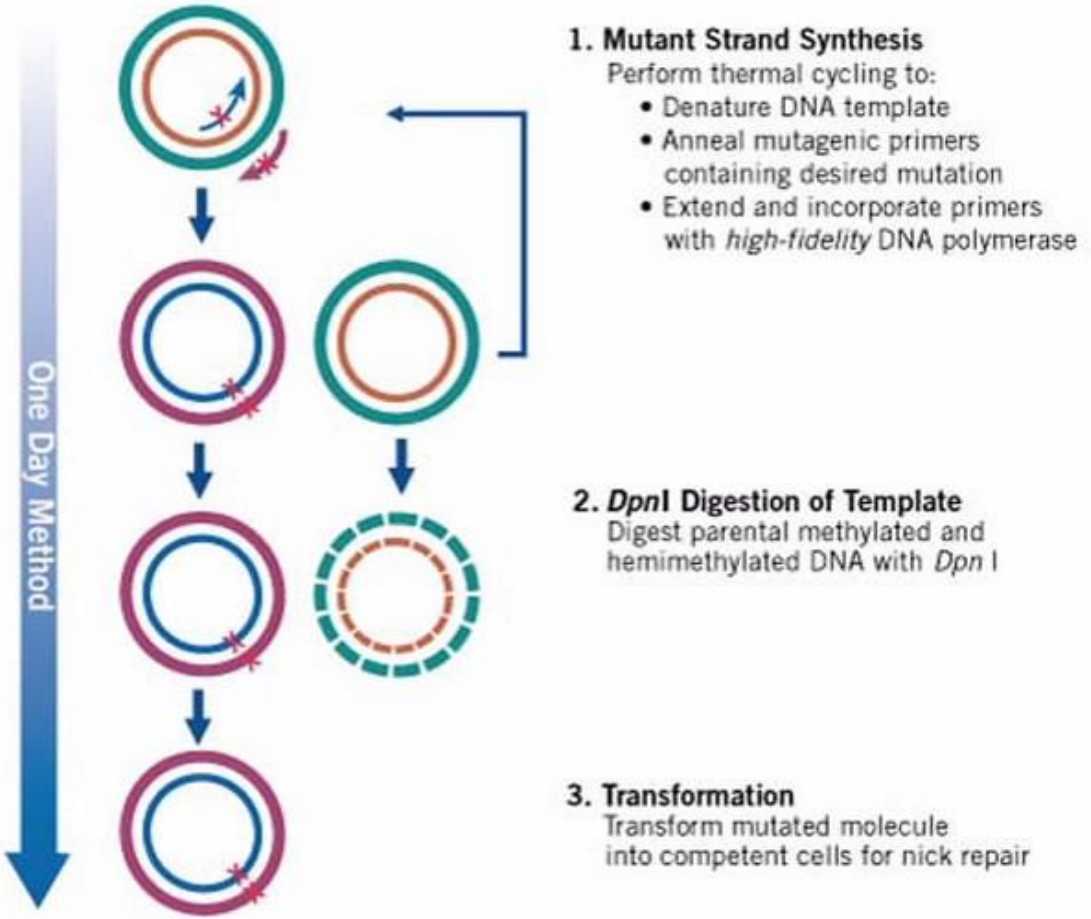


M160A
Y161A
T168A
P169A
T171A

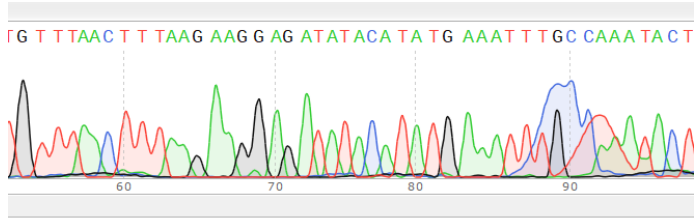
Scelta dei residui che potrebbero essere coinvolti nell'interazione con un inibitore che interagisce con l'H-box.

Scelta del TCS → Identificazione residui aa di interesse → **Mutagenesi** → Controllo dell'attività chinasica → Test dell'inibitore

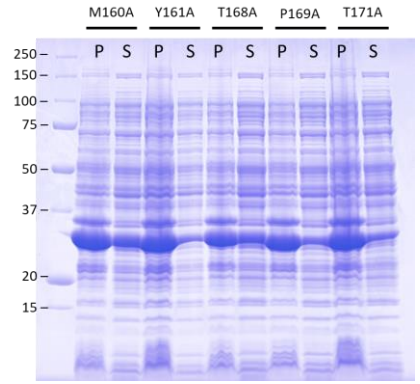
In vitro



1. Clonaggio del gene *vanS* in un plasmide (pET) a monte di un His tag.
2. Mutagenesi con kit **QuikChange** (Agilent)
3. Controllo della mutagenesi mediante sequenziamento



4. Trasformazione dei plasmidi in un ceppo di *E. coli* e controllo dell'estratto proteico da coltura batterica

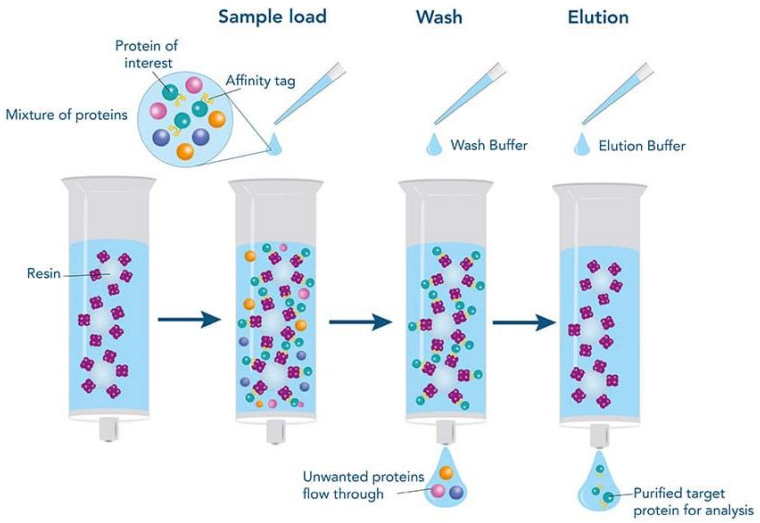


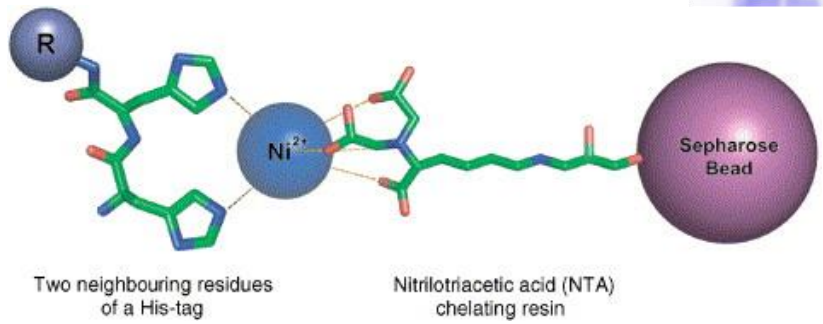
Scelta del TCS → Identificazione residui aa di interesse → Mutagenesi → **Controllo dell'attività chinasica** → Test dell'inibitore

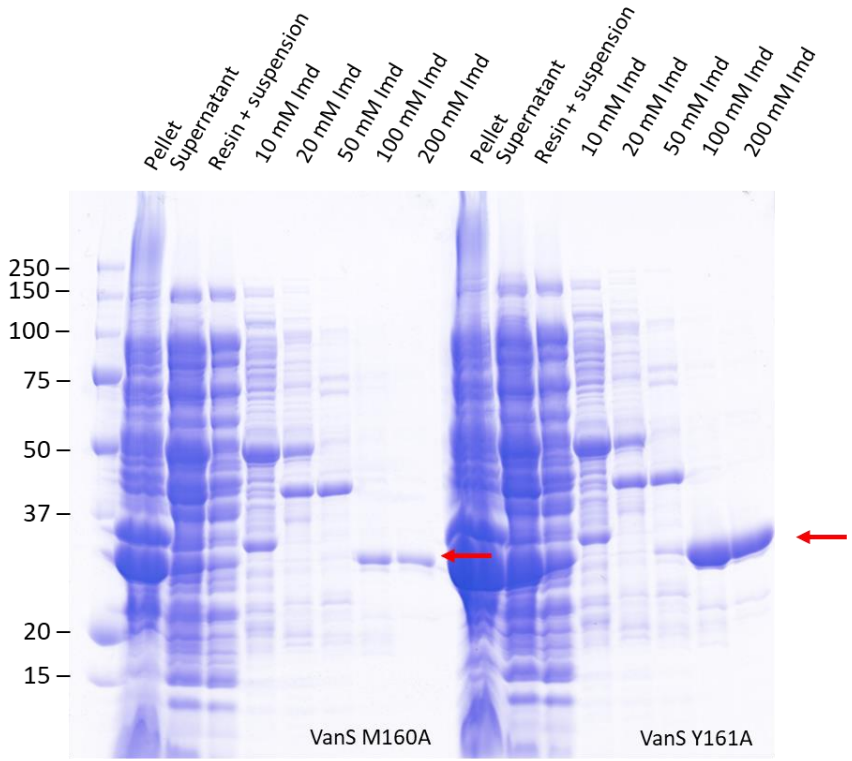
In vitro

Purifica di VanS sfruttando il tag His:

1. Induzione dell'espressione di *vanS* con IPTG, il gene è clonato a valle del promotore *lac*
2. Centrifuga per ottenere il pellet
3. Sonicazione per lisare le cellule
4. Centrifuga e raccolta del surnatante
5. Purifica con colonne di resina Ni-Sepharose FF
6. Lavare con concentrazioni crescenti di imidazolo e raccogliere l'eluato
7. Controllo con SDS-PAGE





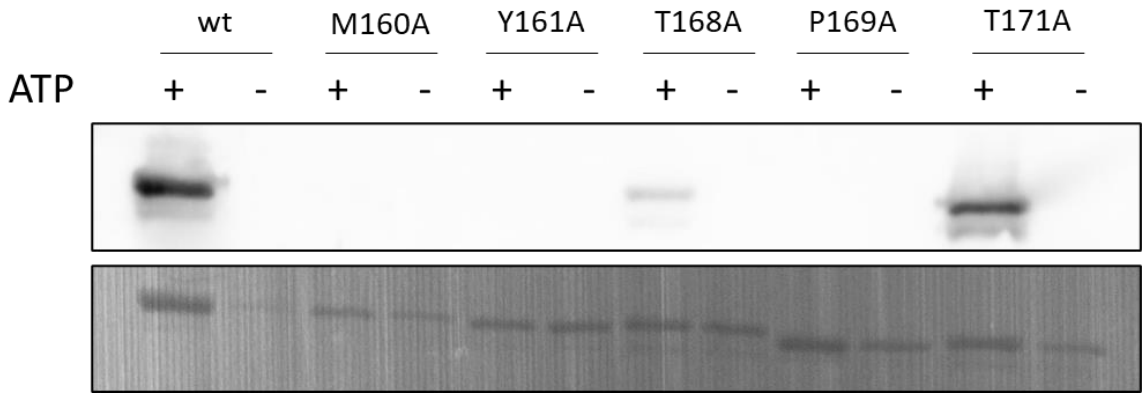


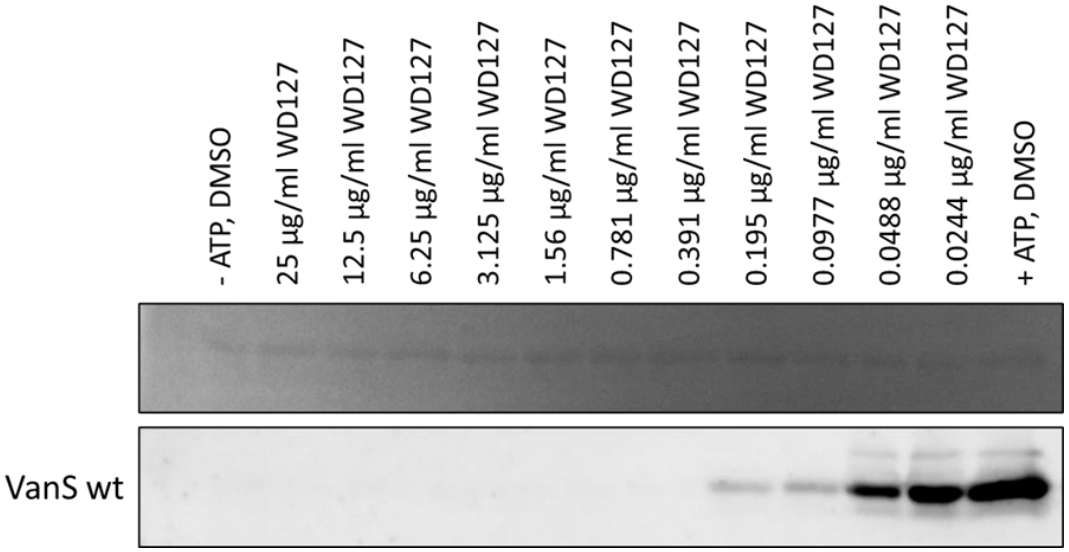
Scelta del TCS → Identificazione residui aa di interesse → Mutagenesi → Controllo dell'attività chinasica → Test dell'inibitore

In vitro

Saggio di autofosforilazione: incubazione della proteina purificata con o senza ATP, poi si procede con un western blot e ibridazione con anticorpo diretto contro fosfoistidina.

Capiamo se la proteina con la mutazione mantiene la capacità di autofosforilarsi.



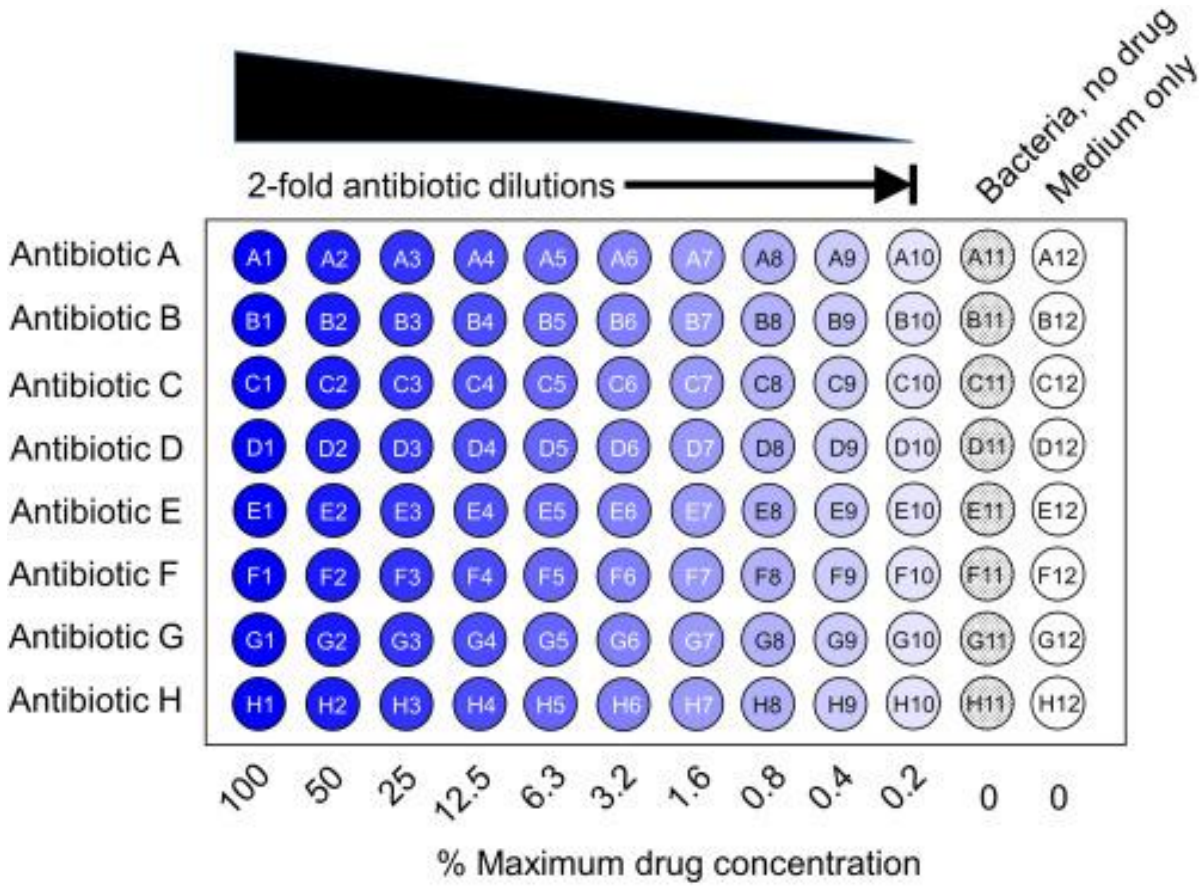


Test inibitore: si valuta l'autofosforilazione in presenza di un inibitore in grado di interagire con i residui dell'H-box.

Si può determinare l'**IC_{50}**, la concentrazione di inibitore necessaria per inibire il 50% della proteina.

Scelta del TCS → Identificazione MIC inibitore → Trattamento coltura batterica → Estrazione RNA → RT-qPCR su geni target

In vivo

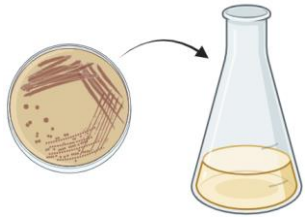


Per determinare la concentrazione di inibitore da utilizzare, in modo da non influenzare negativamente la crescita batterica e non introdurre altre variabili confondenti, dobbiamo determinare la MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

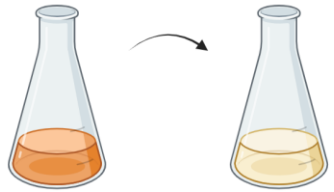
1. Coltura batterica overnight
2. Diluizione in terreno fresco
3. Crescita fino alla fase esponenziale
4. Diluizione in terreno con concentrazioni crescenti di composto da testare
5. Crescita a 37°C per 24h
6. Controllo della torbidità

Scelta del TCS → Identificazione MIC inibitore → Trattamento coltura batterica → Estrazione RNA → RT-qPCR su geni target

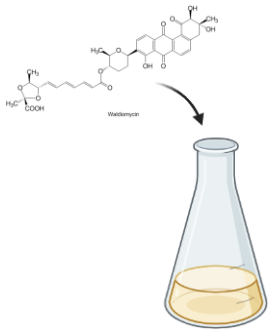
In vivo



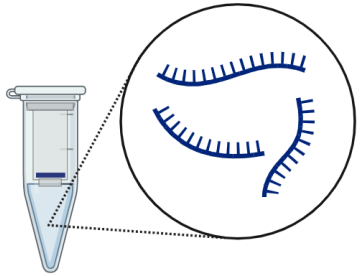
Crescita coltura batterica overnight



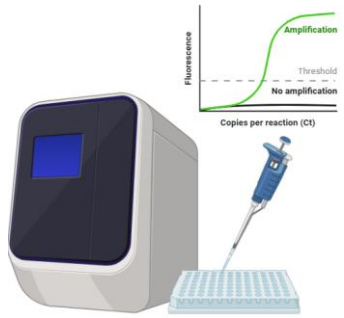
Diluizione in terreno fresco



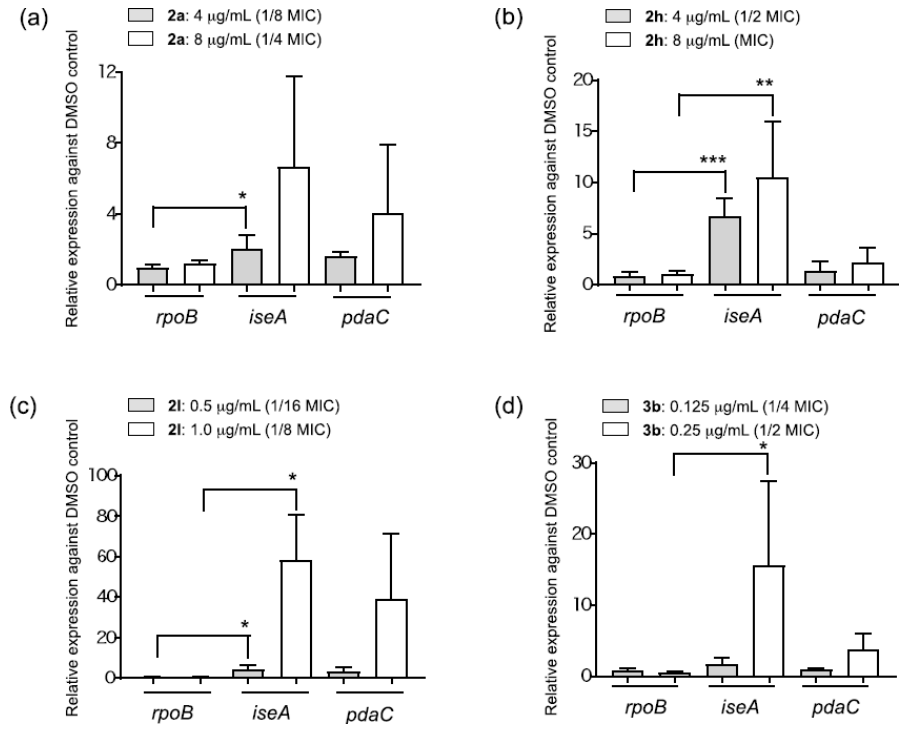
Trattamento con composto (5 min)



Estrazione RNA, trattamento Dnasi e retrotrascrizione



qRT-PCR



Normalizzazione e analisi dei dati

11. 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

12. Bibliografia per approfondire

- Bem AE, Velikova N, Pellicer MT, Baarlen Pv, Marina A, Wells JM. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. ACS Chem Biol. 2015 Jan 16;10(1):213-24. doi: 10.1021/cb5007135. Epub 2014 Dec 26. PMID: 25436989.
- Capra EJ, Laub MT. Evolution of two-component signal transduction systems. Annu Rev Microbiol. 2012;66:325-47. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150039. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22746333; PMCID: PMC4097194.
- Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. Annu Rev Microbiol. 2016 Sep 8;70:103-24. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095331. PMID: 27607549; PMCID: PMC8380452.
- Groisman EA, Duprey A, Choi J. How the PhoP/PhoQ System Controls Virulence and Mg^{2+} Homeostasis: Lessons in Signal Transduction, Pathogenesis, Physiology, and Evolution. Microbiol Mol Biol Rev. 2021 Aug 18;85(3):e0017620. doi: 10.1128/MMBR.00176-20. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34191587; PMCID: PMC8483708.
- Pasqua M, Coluccia M, Eguchi Y, Okajima T, Grossi M, Prosseda G, Utsumi R, Colonna B. Roles of Two-Component Signal Transduction Systems in Shigella Virulence. Biomolecules. 2022 Sep 18;12(9):1321. doi: 10.3390/biom12091321. PMID: 36139160; PMCID: PMC9496106.
- Villanueva M, García B, Valle J, Rapún B, Ruiz de Los Mozos I, Solano C, Martí M, Penadés JR, Toledo-Arana A, Lasa I. Sensory deprivation in Staphylococcus aureus. Nat Commun. 2018 Feb 6;9(1):523. doi: 10.1038/s41467-018-02949-y. PMID: 29410457; PMCID: PMC5802764.