



## 细菌双组分系统结构特征及其信号转导机制\*

罗博煜 滕越\*\*

(军事科学院军事医学研究院, 北京 100071)

**摘要** 双组分系统 (two-component system, TCS) 是一种广泛存在于原核生物中的信号传递系统, 其由组氨酸激酶 (histidine kinase, HK) 和反应调控蛋白 (response regulator, RR) 组成, 在感知信号后通过自磷酸化和磷酸基团转移等过程实现信号的传递, 这种信号传递过程能够确保细菌对外界刺激做出正确的响应, 使得双组分系统在细菌感知与应答外界环境变化的过程中发挥重要作用。双组分系统具有多种功能, 例如信号感知范围广、可编程性和具有鲁棒性等特点, 基于双组分系统工程化构建的生物传感器已成功应用于光遗传学和环境监测等领域。本综述着重介绍了双组分系统的结构组成和信号转导机制, 阐述了信号转导过程中的特异性和方向性, 探讨了双组分系统应用于合成生物学中的鲁棒性和安全性等优势, 以期通过合成生物学技术拓展基于双组分系统的生物传感器的种类和应用范围。

**关键词** 双组分系统, 组氨酸激酶, 反应调控蛋白, 合成生物学, 细胞生物传感器

**中图分类号** Q81

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0216

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240216

细菌跨膜信号转导系统可以感应环境中的物理和化学刺激信号, 并将其转变成胞内生化信号进行传递, 然后通过调节转录调控水平, 诱导表达特定基因以适应环境变化, 进而促进细菌在环境压力下的生存与生长。细菌跨膜信号转导系统主要分为三种类型: 单组分系统 (one-component system, OCS)、胞质外功能  $\sigma$  因子 (extra cytoplasmic function  $\sigma$ , ECF- $\sigma$ ) 和双组分系统 (two-component system, TCS)<sup>[1]</sup>。OCS 一般由单跨膜蛋白组成, 仅 3% 为膜整合蛋白, 是最简单的细菌跨膜信号系统, 其广泛存在于细菌中, 例如在霍乱弧菌和创伤弧菌中发现的 CadC<sup>[2-3]</sup>、ToxR 家族<sup>[4]</sup> 等 (图 1a)。ECF- $\sigma$  是细菌调控转录起始水平的另一种方式,  $\sigma$  因子是 RNA 聚合酶的一个亚基并决定着 RNA 聚合酶对启动子的特异性识别, 不同的胞质外功能  $\sigma$  因子可以使 RNA 聚合酶选择性与启动子结合, 从而实现对特定基因的转录调控<sup>[5]</sup>。TCS 存在于细菌、古菌和一些真核生物 (包括真菌和植物) 中, 在动物等高等生物中尚未发现。TCS 因其结构的复杂性和种类的多样性, 负责感知多种物理和化学信号。

TCS 在结构上具有保守性, 通常由跨膜的组氨酸

激酶 (histidine kinase, HK) 和位于膜内的反应调控蛋白 (response regulator, RR) 组成, 通过“磷酸中继传递”系统转移磷酸基团实现跨膜的信息传递。典型的 HK 由一个胞外或胞间隙感应域、跨膜 (transmembrane, TM) 域、二聚化和组氨酸-磷酸基团转移域 (dimerization and histidine-phosphotransfer domain, DHp) 以及催化与 ATP (catalytic and ATP, CA) 结合域组成。RR 的结构大致可以分为两个主要部分: 信号接收结构域 (receiver, REC) 和效应域 (output domain)。当 HK 接收到特定的刺激时, 会在其催化核心的一个保守组氨酸残基上发生自磷酸化过程, 并将磷酸基团转移到同源的胞内 RR 上, 进而实现对不同基因的差异性调控, 响应外界环境刺激信号。

TCS 在合成生物学中具有多方面优势。本文从 TCS 的结构、磷酸化反应机制、信号感知的特异性和方向性等方面, 阐述 TCS 所具有的可编程性、模块化、灵活性与扩展性等特点, 并对 TCS 应用

\* 国家自然科学基金 (32270813) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-66948559, E-mail: yueteng@me.com

收稿日期: 2024-05-21, 接受日期: 2024-10-09

于合成生物学中的优点进行解释和说明, 以期加深对细菌跨膜信号转导系统及其分子机制的全面理解, 探索其在合成生物学中的多样性和应用潜力, 进而将其改造成有效的信号感应元件与反应模块, 并广泛应用于合成生物学领域。

## 1 双组分系统

### 1.1 双组分系统简介

TCS最早由Ninfa和Magasnik于1986年在探索大肠杆菌氮调控蛋白过程中发现<sup>[1]</sup>。典型的TCS由HK和RR组成<sup>[6]</sup>。HK在感知到外界信号后迅速二聚化, 使得特定的组氨酸残基通过催化三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate triphosphate, ATP)完成自磷酸化, 并将其组氨酸残基的磷酸基团转移至RR中的天冬氨酸残基上, 形成磷酸化RR, 使其与

下游基因的启动子或蛋白质作用, 最终实现对应反应的调控<sup>[7]</sup>(图1b)。TCS种类繁多, 目前已发现的多达几百种, 仅在大肠杆菌K-12菌株中就发现了29个HK、32个RR和1个组氨酸磷酸传递结构域(histidine phosphotransfer domain, HPt)<sup>[8]</sup>。与OCS相比, TCS可检测更为广泛的外界刺激信号, 如营养物质、温度、光线等, 并参与调控细胞分裂和分化、代谢、毒力、产孢、群体感应(quorum sensing, QS)、抗生素耐药性、生物膜形成和应激反应等复杂、重要的细胞过程<sup>[9]</sup>。例如, 在细菌中高度保守的BtsS-BtsR TCS, 其能够感知胞外低至50 μmol/L的丙酮酸浓度, 并能微调大肠杆菌菌株的碳利用率<sup>[10]</sup>(图1c)。TCS的某些特点使其成为了合成生物学元件和模块库中的关键组成部分: 感知信号的范围覆盖细胞内外且可直接检测细胞外信号; 模块化的蛋白质结构及其功能结构域

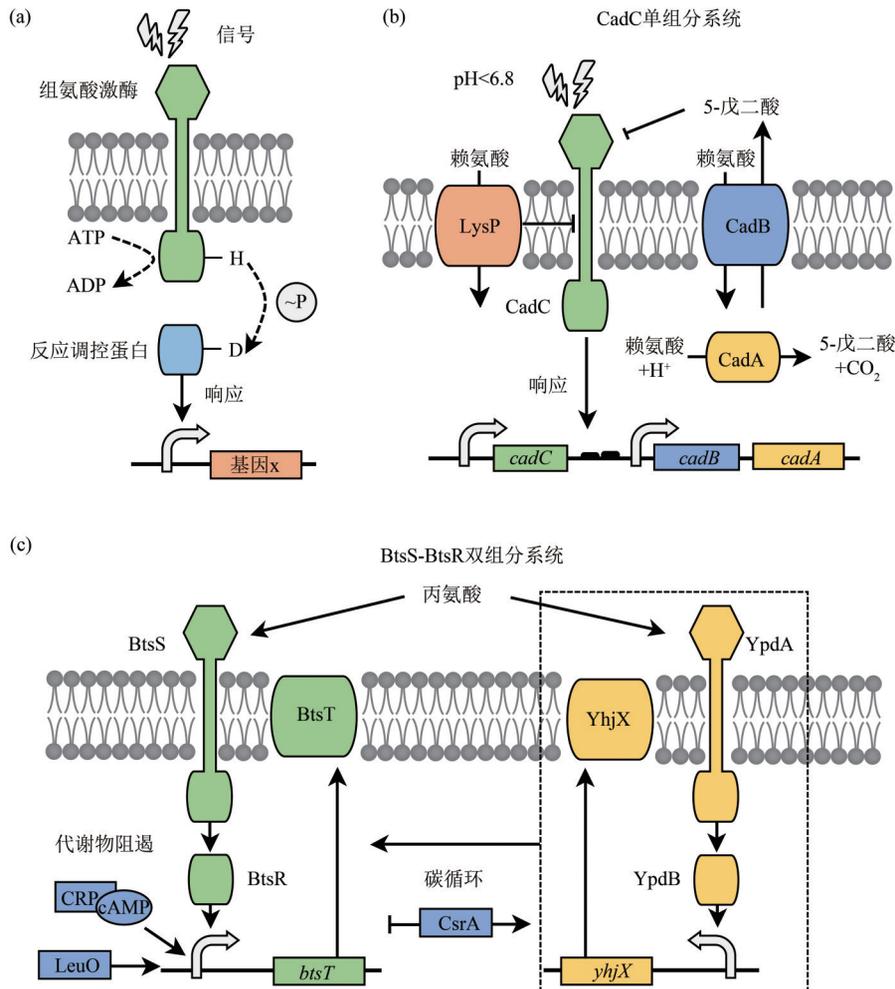


Fig. 1 Schematic diagram of response mechanism of one-component and two-component systems

图1 单组分系统及双组分系统响应机制示意图

(a) 单组分系统CadC参与低pH以及赖氨酸响应机制。(b) 双组分信号转导系统示意图, 由跨膜组氨酸蛋白激酶(HK)与胞内反应调控蛋白(RR)组成。(c) 双组分系统BtsS-BtsR的丙酮酸感应机制示意图。ATP: 三磷酸腺苷; ADP: 二磷酸腺苷。

氨基酸序列的保守性使得 TCS 成为蛋白质工程策略的理想选择。随着对细菌双组分信号转导系统的发掘, 以及对其蛋白质结构和信号响应机制的深入研究, 越来越多基于 TCS 的生物传感器被开发出来, 并广泛应用于微生物发酵、疾病监测和治疗等领域<sup>[11]</sup>。

## 1.2 组氨酸激酶

### 1.2.1 组氨酸激酶家族

HK 可以感知刺激并调节信号通路, 因此在 TCS 中常作为通路的“输入”成分。HK 可以根据其结构中的 DHp 以及组氨酸激酶结构域 (histidine kinases domain, HisKA) 分为 5 种类型: HisKA (Pfam family PF00512)、HisKA\_2 (Pfam family PF07568)、HisKA\_3 (Pfam family PF07730)、H\_kinase\_dim 以及 HWE\_HK (Pfam family PF07536)。其中, HWE\_HK 中的 HWE 是指催化结构域中的 3 个残基, 即 N-box 蛋白中的一个组氨酸 (H) 和 G1-box 蛋白附近的一个色氨酸 (W) 和一个谷氨酸 (E)。尽管不同的 HK 家族在功能/调控

方面存在差异, 但除了 HisKA\_2 之外, 其他蛋白质都具有非常相似的结构。另一种分类方法则根据 HK 的模块化设计分为 I、II、III 类。其中, I 类 HK 是由组氨酸激酶样三磷酸腺苷结构域 (histidine kinase-like adenosine triphosphate domain, HATPase\_c) 和 HisKA 两个单体组成的同源二聚体跨膜蛋白<sup>[12]</sup>, 绝大多数 HK 属于此类。I 类 HK 的 N 端 (N-terminal) 为高度可变的传感模块 (sensor module, SEN), 该模块通过跨膜螺旋连接到包含催化机制的 C 端 (C-terminal) 细胞质部分, C 端则是一个保守的信号接收域 (receiver domain, RD), 又称激酶区。I 类 HK 的传感模块面向周质/细胞外空间, 负责感应环境中的化学物质变化, 所感应到的信号通过传输模块内的跨膜段变构传导到催化模块并发挥调节作用; II 类和 III 类 HK 的传感模块则嵌入膜内, 如枯草芽孢杆菌的 DscK<sup>[13]</sup>。此外, 还有许多 HK 蛋白位于胞质内, 主要负责感知细胞内信号 (图 2)。

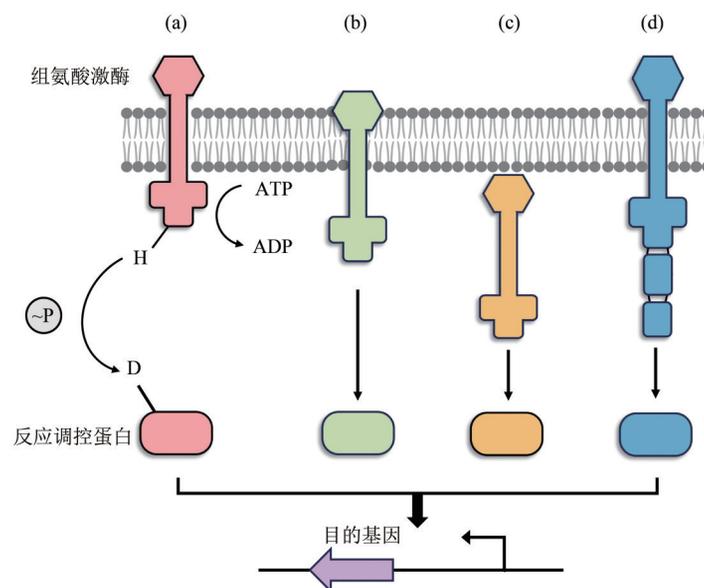


Fig. 2 Different types of histidine kinases in TCS

图2 TCS中不同类型的组氨酸激酶

(a) 跨膜组氨酸激酶; (b) 具有膜内感受域的组氨酸激酶; (c) 位于胞质内的组氨酸激酶; (d) 非典型组氨酸激酶结构。H: 组氨酸; D: 天冬氨酸。组氨酸激酶与反应调控蛋白之间的黑色箭头表示磷酸基团的转移。ATP: 三磷酸腺苷; ADP: 二磷酸腺苷。

### 1.2.2 组氨酸激酶结构——传感模块、传输/传导模块和催化模块

HK 通常由三个功能区组成: SEN、传输/转导模块 (transmission/transduction module, TRA) 和催化模块 (catalytic module, CAT)<sup>[12]</sup>。SEN 模块

位于组氨酸激酶的 N 端, 包括一个或多个高度可变的感受结构域<sup>[9, 14-15]</sup>; TRA 模块负责连接 SEN 模块和 CAT 模块, 由两个或多个跨膜螺旋片段以及一个或多个信号中继结构域组成。信号中继结构域包括 HAMP (HK、腺苷酸环化酶、甲基受体趋化

性蛋白和磷酸酶中的一个磷酸中继结构域)、PAS (Per-Arnt-Sim 蛋白) 或 GAF (cGMP 特异性磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶和 FhlA) 等<sup>[16]</sup>; CAT 模块是 I 类 HK 分子通用的最小核心结构, 包括 DHp 以及 ATP 结合域 (ATP-binding domain, ABD), 后者又称为 CA 结合域。

CAT 模块中的 DHp 结构细长, 由一个双  $\alpha$  螺旋发夹形成同源二聚体。一旦二聚体形成, DHp 就构成了一个反向平行的四螺旋束, 随后通过螺旋  $\alpha 1$  的 N 端延伸, 成为平行的双螺旋结构。可磷酸化组氨酸残基位于  $\alpha 1$  的保守基序 (H-box) 内, 大约位于 DHp 的中间位置<sup>[17-18]</sup>。CAT 中的 ABD 结构域呈 Bergerat 折叠结构, 即一个球状的  $\alpha\beta$  结构域, 其核心结构为一侧的三螺旋结构和另一侧五螺旋结构组成的  $\beta$  折叠结构<sup>[19]</sup>。ABD 结合 ATP-Mg<sup>2+</sup>, 与定义保守基序的氨基酸 (N-、G1-、F-、G2-和 G3-box) 接触<sup>[20]</sup>。含 F-box 蛋白的环 (Loop) 充当真正的 ATP 盖子 (ATP cover/ATP-lid) 结构, 形成了核苷酸结合口袋结构, 其长度在不同家族蛋白中高度可变。

除上述 SEN-TRA-CAT 结构的 HK 外, 还有一些更复杂的 HK 结构。例如, 杂合组氨酸激酶 (hybrid histidine kinase, HHK)<sup>[21]</sup>, 即包括特殊的接收结构域以及 HPt 结构域的 HK 多肽分子<sup>[22]</sup>。具有 HHK 结构的 TCS 一般称为非典型 TCS。在 HHK 中, 磷酸基团先转移到其内在的 REC 结构域, 再通过 HPt 结构域转移到末端的 RR 中。HPt 可以是 HHK 的一部分, 也可以是独立的单体。HHK 经常参与 TCS 磷酸中继过程, 可以导致多种磷酸盐的转移, 并形成比典型 TCS 磷酸盐转移过程更精细的调控机制和更多的调节检查位点。因此, HHK 参与的磷酸盐转移调控可能是细菌在异质环境中调控基因表达的关键。

### 1.2.3 组氨酸激酶中的传感模块 (SEN)

SEN 一般以二聚体的形式存在, 其由位于两侧的 TM 片段、一个螺旋连接片段和一个传导结构域组成。在感知到外界环境的刺激时, 其二聚体结构以“活塞式”的构象变化完成信号的传递。例如, Cheung 等<sup>[23]</sup>在对 HK NarX 结构的研究中发现, 当 NarX 与其配体结合时, 周质域的 N 端和 C 端螺旋之间发生了 0.1 nm 的位移。这种类似“活塞”的位移通过跨膜螺旋传递, 并将信号转导至 TRA 模块。

### 1.2.4 跨膜组氨酸激酶中的传输模块 (TRA)

大多数 HK 的信号传递都需要经历跨膜过程,

仅有 12%~27% 的细菌 HK 和 63% 的古菌 HK 没有跨膜区<sup>[24-25]</sup>。在 HK 中, TRA 模块通过构象变化将信号从 SEN 转导至 CAT, 同时能结合信号小分子或调控蛋白, 进而能够调节膜和胞质 HK 的信号发送活性<sup>[26]</sup>。感知信号并将其传递到激酶的催化核心这一过程由模块化和可变的信号中继结构域介导, 这些结构域将信号从 N 端传递到 C 端催化域, 也可作为额外的信号输入域。TRA 模块中主要的信号中继结构域有 HAMP 结构域、PAS、GAF 以及溶质载体和 TCS 转换相关结构域 (SLC and TCST-associated component, STAC)。

目前研究较多的是 HAMP 结构域<sup>[27]</sup>。HAMP 结构域在 HK 中非常常见, 由 4 个平行排列的 HB 组成, 每个 HB 单体包含由柔性连接体连接的两个螺旋 AS1 和 AS2<sup>[28-29]</sup>。现在已经有两个关于 HAMP 结构变化的模型: 双状态信号转导模型和动态束模型。双状态信号转导模型认为, 其 HAMP 结构域通过旋钮、对角线剪切、活塞移动及其组合改变堆叠状态, 在不同构象之间进行相互转换, 从而实现信号的传递<sup>[30-32]</sup>; 动态束模型认为, 其 HAMP 结构域是不同有序程度构象的组合, 通过输入信号能够改变其稳定性。两个模型并不互斥, 而且都体现出 HAMP 结构域稳定性较低的特点<sup>[33]</sup>。以大肠杆菌硝酸盐/亚硝酸盐 HK NarQ 中的 HAMP 为例, 在未激活的状态下, NarQ 的 HAMP 结构域为旋钮-旋钮的堆叠模式, 相关残基侧链相互对称。在激活的状态下, 跨膜信号传递会导致 HAMP 结构域的第二个跨膜螺旋 (transmembrane helix, TMH) 和 AS1 螺旋交界的前铰链 (pre-hinge) 处出现刚体倾斜运动。这些类似杠杆运动的旋转会导致 AS2 螺旋的羧基末端向相反方向大幅位移。因此, 在 NarQ 中, HAMP 结构域将 TMH 的对称或不对称运动输入转换为对称的构象变化, 这种变化在结构的远端最明显。HAMP 结构域在 HK 中的不同表现说明, HAMP 结构域已经演变形成各种亚型和堆叠模式, 可以将不同的输入信号转换成能量较低的对称变换<sup>[33-34]</sup>。

HAMP 结构域的构象转换也会影响 DHp 结构域前端的一个双螺旋连接体, 进而影响 DHp 结构的对称性。输入信号引起的扭矩运动破坏了双螺旋连接体的结构, 从而增加了连接体的可移动性<sup>[35]</sup>。例如, 在百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 的 HK BvgS 中, PAS 和 DHp 结构域之间的双螺旋连接体在磷酸酶状态下形成一个缠绕卷曲结构 (coiled-

coil), 在激酶状态下处于动态模式<sup>[36]</sup>。同样, 在BvgS同源物中, TRA和DHp结构域之间存在较长的两亲性双螺旋连接体, 其活性调节基于两个相对排列的缠绕卷曲段的反向移动, 即第一个缠绕卷曲的周期性七肽重复结构与第二个缠绕卷曲不同步<sup>[37]</sup>。因此, 这种连接体是理想的信号传递工具。

### 1.2.5 组氨酸激酶中的催化模块 (CAT)

在磷酸基团传递过程中, CAT中的DHp四螺旋束和N端双螺旋延伸会形成卷曲螺旋结构<sup>[38]</sup>, 其中双螺旋延伸的N端还连接有额外结构域。卷曲螺旋结构的形成与DHp构象改变有关,  $\alpha$ 螺旋每两圈跨越大约7个残基(以a~g命名)。如果a和d位有疏水侧链, 它们将从螺旋的同一侧黏附, 后续与类似七肽重复疏水模式的相邻螺旋相互作用<sup>[39]</sup>。这种并排的相互作用导致了左手超螺旋或卷曲螺旋结构的形成, 也使得侧链呈杵臼结构排列<sup>[40]</sup>。

DHp结构域的范围并不确定, 因此有时会将始终存在并与DHp并列的S螺旋作为CAT模块的一部分<sup>[38, 41-42]</sup>。较长的TRA模块也可通过额外的S螺旋连接中间结构域<sup>[37, 43-44]</sup>。S螺旋包含非典型的七肽(heptad)结构, 如果卷曲螺旋核心的特定位置被极性残基占据, 其能量稳定性会降低, 从而较易发生构象转换。不同HK的卷曲螺旋内序列变化会导致活性组氨酸附近(特别是在蛋白质N端)七肽数量变化和位置的不同偏离。七肽插入在调整疏水核心的同时, 也会产生单个螺旋旋转相位和主链痕迹的变化<sup>[45]</sup>。卷曲螺旋末端的简单运动有助于生物学信息的传递。这种运动利用了 $\alpha$ 螺旋的刚性和序列编码的七肽重复结构的偏离, 会导致远端残基的大幅位置移动<sup>[46]</sup>。由于插入位置和长度的不同, 七肽插入的准确位置必然会根据蛋白质的开/关状态而改变, 严格的七肽重复模式表现出偏离可优化疏水内核的结构, 可适应不同的卷曲螺旋长度和结构<sup>[46-47]</sup>。

### 1.3 反应调控蛋白

TCS中的RR负责信号的“输出”。RR具有模块化的体系结构, 其由N端高度保守的REC和C端的可变效应结构域组成。一个RR分子中至少有一个REC结构域包含可被磷酸化的天冬氨酸残基。RR既可能仅由REC构成, 也可能包括其他结构域, 例如DNA结合相关结构域, 以及配体结合、蛋白质结合等相关结构域<sup>[48]</sup>。小部分RR(1%)属于具有AmiR和NasR转录抗终止调控因子

(AmiR and NasR transcription antitermination regulator, ANTAR)结构域的AmiR蛋白亚家族, 因此可以与RNA相结合。RR的激活与它们的磷酸化有关, 磷酸化RR随后参与输出效应器反应(转录调控、伙伴蛋白活性的变构调节等)。目前已发现的RR多达几十种, 这些RR具有广泛的功能多样性<sup>[48]</sup>。

REC是RR的主要功能结构域, 其结构为保守的 $\alpha/\beta$ 罗斯曼样折叠( $\alpha/\beta$  Rossmann-like sheet)结构, 由5个 $\alpha$ 螺旋围绕一个 $\beta$ 折叠结构组成, REC之间的序列同一性通常为20%~30%, 其中一小部分高度保守的残基对应于活性位点和“开关”残基, 特别是磷酸化位点, 如 $\beta$ 3 C端的天冬氨酸(Asp)和 $\beta$ - $\alpha$ 环中的其他几个残基。高度保守的磷酸化位点和可变的外周序列使得RR可以将磷酸化偶联到不同的效应功能区域。除 $\beta$ 3中的Asp磷酸化位点之外, 活性位点还包含两个额外的天冬氨酸/谷氨酸(Asp/Glu)残基, 其可以协调 $Mg^{2+}$ 和赖氨酸(Lys)残基的结合并活化结构域中的磷酸盐形成盐桥。REC具有以下三种功能: a. 催化自身磷酸化; b. 将磷酸基团转移至天冬氨酸残基上; c. 调节磷酸依赖的结构域的活性。

## 2 双组分系统的信号转导机制

### 2.1 组氨酸激酶的信号感知和转导过程

TCS通过形成“磷酸中继传递”(phosphorelay)系统整合多种信号, 并根据整合的结果触发不同的输出反应<sup>[49]</sup>(图3a)。在磷酸中继传递系统中, HK主要负责感应各种输入信号, 如营养物质和金属离子的可获得性、氧化还原条件、氧化应激、光线质量等, 并通过磷酸基团转移反应传递信号。信号以变构方式调节HK的活动, 从而有效开关TCS信号通路。HK主要参与信号传递过程中的3个磷酸化反应(3个功能状态): a. 自激酶(HK自磷酸化); b. 磷酸化转移酶, 即磷酸基团(P)的转移( $P\sim HK \rightarrow P\sim RR$ 转移); c. 磷酸化酶(HK介导的 $P\sim RR$ 去磷酸化)状态(图3b)。前两个磷酸化反应呈活跃状态, 参与通路的开启; 磷酸化酶则对应HK的非活跃状态, 负责关闭通路。HK结构中的DHp和CA结构域以及RR的REC结构域共同构成了TCS的催化反应区域, 负责3个磷酸化反应<sup>[12]</sup>。

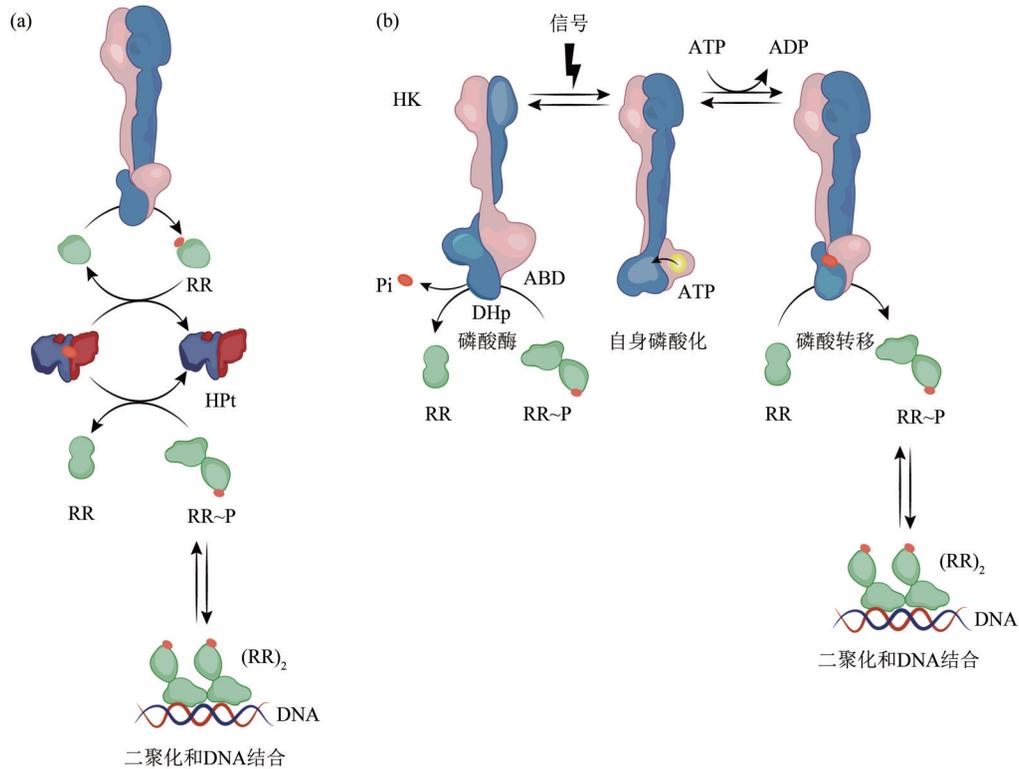


Fig. 3 The schematic diagram of two-component signal transduction mechanism

图3 双组分信号转导机制示意图

(a) 磷酸中继传递过程; (b) HK具有三种不同的结构和功能状态: 磷酸化酶、自激酶和磷酸转移酶以及RR二聚体与下游基因作用启动适应性反应的过程。Pi: 磷酸基团;  $(RR)_2$ : 反应调控蛋白二聚体; ATP: 三磷酸腺苷; ADP: 二磷酸腺苷。

### 2.1.1 组氨酸激酶自磷酸化

根据HK二聚体中的DHp结构域和CA结合域排列的研究, 以及DHp螺旋结构的发夹环的手性的不同, 自磷酸化可分为顺式自磷酸化(如HK853和VicK)和反式自磷酸化(如CpxA)<sup>[50-51]</sup>。一旦感知到信号, HK会通过消耗ATP进行自磷酸化, 形成高度不对称的构象。HK二聚体中的一个DHp螺旋会被强烈弯曲, 这使得CA结构域中的ATP分子接近DHp结构域的一个可磷酸化His残基, 使得His残基的亲核特性因存在高度保守的相邻酸性残基而得到加强<sup>[52]</sup>, 并且CA结合域的保守极性残基能够稳定酸性残基, 形成稳定的磷酸化组氨酸激酶(P~HK)<sup>[53-54]</sup>。

### 2.1.2 组氨酸激酶磷酸基团的转移

由于CAT中的CA和RR中的REC部分重叠, 因此活性CA结合域会在His残基磷酸化后移开, 与RR形成磷酸转移复合物, 从而实现HK与RR之间的磷酸基团转移反应<sup>[55]</sup>。HK在第一个原聚体上进行自磷酸化, 在另一个原聚体上通过磷酸化转移

至RR。HK与RR接触后形成不对称二聚体构象。HK的自磷酸化位点和RR磷酸化位点共同构成His-Asp接力(His-Asp relay), 磷酸基团直接从HK的His残基移动到RR的Asp残基。未转移到RR的磷酸基团可以按照回到ADP或P~His水解的方式去磷酸化<sup>[56]</sup>。此外, HHK等也可以通过HisTD→AspRD→HismeI→Asp反应调控蛋白磷酸传递链发挥作用, 即磷酸基团从发射域(transmitter domain, TD)、RD和HPt的保守组氨酸和天冬氨酸残基依次转导, 然后再转移到同源RR蛋白的RD结构域的保守天冬氨酸残基<sup>[57-58]</sup>。

磷酸基团转移不仅发生在HK和RR之间, 还发生在磷酸转移酶和REC之间。磷酸转移酶没有自激酶活性, 但在多步磷酸中继反应中可以作为REC之间的磷酸化组氨酸(P~His)中间体<sup>[59]</sup>。例如, 酿酒酵母HK YPD1的HPt结构域与其RR SLN1的REC形成复合物, 以及流产布鲁氏菌的磷酸转移酶-RR(ChpT-CtrA)复合物。磷酸转移酶ChpT是二聚体, 类似于HK, 但其CA结构域不与

ATP结合。ChpT和CtrA的REC形成的2:2复合物不是完全对称的,其DHP-REC界面的结构和动态不对称性表明,每次只有复合物的一侧具有磷酸转移能力,这与HK SEN-REC复合物的磷酸转移反应相似<sup>[60]</sup>。

HK的自磷酸化反应和磷酸基团转移反应具有动态催化周期耦合的特点。Mechaly等<sup>[61]</sup>在关于TCS CpxA-CpxR结构的研究中发现其符合变构开关机制。DHP结构域发生往复弯曲运动,导致CA结构域在活性和非活性构象之间交替变化。Cai等<sup>[62]</sup>对另一个HK蛋白WalK的DHP结构域进行了分子动态模拟,也发现了此类往复弯曲运动。

## 2.2 反应调控蛋白的去磷酸化过程

在磷酸化酶状态下,DHP和CA结构域对称排列,DHP呈直线排列<sup>[63-64]</sup>。HK具有对称的二聚体构象,DHP结构域中保守的苏氨酸/天冬酰胺(Thr/Asn)残基激活一个水分子,攻击与RR的Asp残基结合的磷酸基团,使其发生去磷酸化过程<sup>[52, 65]</sup>。与典型HK一样,在没有刺激的情况下,HHK作为磷酸酶,通过 $\text{Asp}^{\text{RR}} \rightarrow \text{His}^{\text{HP}} \rightarrow \text{Asp}^{\text{RD}} \rightarrow \text{Pi}$ 反向磷酸传递链,使同源RR去磷酸化,导致系统沉默<sup>[66]</sup>。

## 2.3 组氨酸激酶跨膜信号转导中的构象变化

HK信号转导过程中需要控制构象动态变化响应特定的信号。通常,HK的激酶状态(自激酶和磷酸转移酶)和磷酸化酶状态是互斥的,并具有不同的对称性和动态变化。多数细菌的HK有一个能够与配体结合的传感结构域,与一个胞质催化结构域相连。常见的三种跨膜信号转导机制的构象变化包括剪切式运动、活塞式位移和螺旋式旋转。无论涉及何种类型的构象运动,具有催化活性的CAT二聚体处于激酶开启状态(非对称构象),而处于上游的结构域(如HAMP结构域)施加的构象张力倾向于使激酶处于关闭状态(对称构象)<sup>[67-68]</sup>。在此类模块蛋白上增加一个传感结构域,可以产生一个双稳态的多结构域HK蛋白,能够对生理刺激的存在状态做出响应<sup>[68]</sup>。HK的模块化结构说明信号在各个结构域之间是通过离散的结构运动传递的,这些运动由螺旋连接体依次传递。

### 2.3.1 剪切模型

大肠杆菌的HK PhoQ蛋白是已知的剪切模型。Molnar等<sup>[69]</sup>通过配体依赖性二硫键交联实验得到了统计模型,预测显示PhoQ四螺旋TM束以两种状态存在,TM螺旋具有不同的对角线位移,类似

于剪切式运动。PhoQ的SEN在感知信号后,可以诱导TM螺旋的剪切式运动,导致胞质HAMP结构域的动态重新排序,并激活发送模块的激酶活性。此外,对于多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)的HK BT4663和霍乱弧菌的HK VxA的研究发现,在配体结合和不结合两种状态下,通过对细胞周质传感结构域的晶体结构进行分析发现其单体C端呈剪切式移动,表明跨膜信号转导由剪切式机制驱动<sup>[70-71]</sup>。

### 2.3.2 活塞模型

活塞模型可以解释HK DcuS的信号传输机制。Etzkorn等<sup>[72]</sup>通过测试TM螺旋中氨基酸残基的可及性,发现富马酸盐与周质DcuS中SEN的结合引发了第二个跨膜结构域(TM2)的活塞式向上位移(周质方向)。位移降低了两个DcuS原聚体之间连接体中的 $\alpha$ 螺旋的稳定性,并导致PAS结构域的重排。这些结构变化能够控制CAT的激酶活性。肺炎克雷伯菌中的HK CitA和百日咳杆菌中的HK BvgS也有类似的信号转导机制<sup>[73-74]</sup>。

### 2.3.3 螺旋式旋转模型

某些TCS的HK与RR结合时,其结构会发生变化,形成高度不对称的二聚体结构。这种不对称状态需要跨膜 $\alpha$ 螺旋的旋转,以完成信号传递的过程。例如,哈氏弧菌的HK LuxQ其周质传感结构域与其RR LuxP结合后产生了高度不对称的二聚体结构<sup>[75]</sup>。枯草芽孢杆菌HK DesK和金黄色葡萄球菌HK AgrC,其中TM螺旋和胞质螺旋的旋转运动直接传导到下游HK核心。大肠杆菌ArcB HHK的信号转导机制也依赖于其胞质部分的旋转运动。全长跨膜HK在激酶或磷酸酶活性状态下的晶体结构有助于确定信号转导的精确机制,但目前还没有相关解析工作。大肠杆菌NarQ片段(包括SEN、TM螺旋和HAMP结构域)在自由和配体结合状态下的晶体结构分析显示,当感知到信号时,HK可以同时发生活塞式位移、对角线剪切和螺旋旋转等构象变化。此外,胞质NarQ中的HAMP二聚体能够将第二个TM螺旋中的活塞式运动转换为由CAT接收信号的螺旋式旋转机制。因此,上述信号转导机制并不会相互排斥,而且可以协同发挥作用<sup>[35, 76-77]</sup>。

## 2.4 双组分系统的信号转导效率的调控

### 2.4.1 控制信号依赖性

信号以变构方式调节HK的活动,形成HK-RR复合物,从而可以有效开/关TCS信号通路。TCS

中有两种控制信号传递效率的方法: 一是对通路的开/关进行严格的信号依赖性控制; 二是使通路上的信息损失最小化, 即减少信号传递过程中磷酸盐的损失。

在信号依赖性控制方法中, 通路的开/关是由卷曲螺旋重排机制引导的。HK 通过 CAT 模块中的 S 螺旋向下游传递位置信息, 通过螺旋的旋转和螺旋轴的平移实现卷曲螺旋的重排。重排发生于活性 HK 附近区域, 并以该区域周围两个 DHp 螺旋中残基的移动为重点, 从而影响 HK 的磷酸传递过程。RR 表现为更灵活的非活性结构, 一旦被磷酸化就会变为不连续状态。同源 HK 的结构通过相互作用表面共同进化的方式进一步优化, 从而可以选择特定 RR 的活性/类似活性的构象, 促进磷酸化, 并在整体层面加强信号依赖性。

#### 2.4.2 信号传递中的磷酸盐损失

磷酸盐以共价且可逆的方式与 HK 和 RR 结合, 并可作为标签标记蛋白质在功能特性等方面的活性状态。在磷酸基从 ATP 中的  $\gamma$  位置到 RR 中 Asp 残基的过程, 有 3 个环节是潜在的磷酸盐损失点: a. HK 介导的 ATP 水解; b. P~HK 去磷酸化, 未转移到 RR 中; c. 过早的 P~RR 去磷酸化。对可能造成磷酸盐损失反应的调控可以影响 TCS 通路的效率。此外, 通过严格卷曲螺旋驱动的切换机制, HK 所介导的潜在磷酸盐损失也可通过阻碍亲核分子进入适当的攻击位置而实现最小化。

### 3 双组分系统信号转导机制的特异性和方向性

#### 3.1 双组分系统信号转导的特异性

多数细菌可编码几十种至几百种 TCS (用于响应各种输入信号), 输入信号与 TCS 的精确耦合具有高度特异性。例如, 大肠杆菌中的 NarX 蛋白和希瓦氏菌中的 ThsS 蛋白分别可以被硝酸盐 ( $\text{NO}_3^-$ ) 和硫代硫酸盐 ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) 激活, 但对相似的化合物如亚硝酸盐 ( $\text{NO}_2^-$ ) 和四硫酸盐 ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) 没有响应<sup>[78-79]</sup>。TCS 的特异性与分子识别、磷酸酶活性和底物竞争有关。研究人员对某种 HK 将磷酸转移到所有可能的调控蛋白进行了系统分析, 发现 HK 在体外对其同源 RR 具有明显的动力学偏好, 其磷酸酶活性可进一步加强 TCS 通路的特异性。大多数 HK 具有双功能, 既可以催化其同源 RR 的磷酸化, 又可以作为磷酸酶催化同源 RR 的去磷酸化。磷酸酶反应在一定程度上可以调节 TCS 通路的输出水

平, 并在激活信号消失后能够抑制 TCS 通路的活性。在同源 RR 被非同源激酶或小分子磷酸供体磷酸化时, HK 的磷酸酶活性还可以通过去磷酸化减少串扰, 提高 TCS 传感器在复杂细胞环境中的检测精度; HK 与同源 RR 的相对细胞浓度, 以及不同 RR 之间对磷酸化激酶的竞争, 也会进一步增强其特异性。在大多数 TCS 通路中, RR 的表达丰度超过了同源 HK 的表达丰度。

TCS 通路的特异性也受时间或空间限制的影响。由于 HK 和 RR 相互作用界面的序列和结构相似, 不同 TCS 的 HK 和 RR 可能在同一细胞内发生串扰。这种磷酸信号串扰可能会降低 TCS 传感器在复杂细胞环境中的检测精度。McClune 等<sup>[80]</sup>的研究显示, 由于有一个较大并且所用不多的相互作用序列空间, HK 通常对其在细胞中的同源 RR 表现出高度特异性, 磷酸信号串扰风险较低, 因此可以在一个细胞中使用多个 TCS SEN, 表明在细胞内工程化新传感器或合成新信号转导途径, 利用共进化的突变和序列空间的映射来设计大量正交的蛋白质相互作用, 提高 TCS 通路的特异性。

#### 3.2 双组分系统信号转导的方向性

在 TCS 中, 磷酸基团转移的正向性对于有效的信号转导和激活 RR 至关重要。当 HK 浓度远小于 RR 浓度时, 大多数 HK-RR 复合物系统催化磷酸化组氨酸转换至精氨酸的不可逆反应 ( $\text{P}\sim\text{His}\rightarrow\text{Asp}$ ), 此时  $\text{P}\sim\text{Asp}\rightarrow\text{His}$  的逆向转移可以忽略不计<sup>[81]</sup>。而在体外实验中, 磷酸中继传递过程却会催化可逆反应<sup>[82]</sup>。Trajtenberg 等<sup>[83]</sup>发现, 参与不可逆反应的 HK-RR 的三维结构显示, 亲和试剂和反应中心的磷酸基团供体原子之间的反应距离明显较长, 对于参与可逆反应的 HK-RR 复合物来说, 则反应距离较短。此外, Trajtenberg 等<sup>[83]</sup>发现, TCS 磷酸基团转移反应中的可逆性与共同反应距离是有联系的。这或许与  $\text{Mg}^{2+}$  有关,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的减少有利于不可逆的  $\text{P}\sim\text{Asp}\rightarrow\text{His}$  反应, 而在参与可逆反应或不可逆反应的两类复合物的反应中心, 也观察到阳离子的位置存在差异。在磷酸基团转移过程中,  $\text{Mg}^{2+}$  与 RR 结合, 因此它到 HK 的 His 残基和磷酸基团转移态的距离比在可逆中心大。进入基团和离去基团之间的不同距离表明在不可逆反应中亲和取代的解离性更强, 反之亦然<sup>[84]</sup>。

### 4 挑战与展望

TCS 广泛存在于细菌、真菌和古菌中, 通过

HK 和 RR 间的磷酸基团转移传递信号，能够以特定的方式调控各种适应性细胞应对环境变化。作为研究较为深入的信号通路模型之一，TCS 因其感知范围广、稳定性好和易于重编程等优点在合成生物学中具有良好的应用前景。具体表现在以下几个方面：第一，HK 可以与膜结合或位于细胞膜内，因此 TCS 可以感知胞外、膜内或胞内的输入信号；第二，由于 HK 具有激酶/磷酸酶双功能活性，TCS 的输出信号（通过磷酸化 RR (P~RR) 控制转录速率）对 HK 和 RR 的表达水平变化不太敏感，因此 TCS 具有更强的稳定性，使其不受噪声基因的表达或生长条件变化导致的 HK 和 RR 表达波动的影响；第三，通过调整 HK 的磷酸酶活性，可以将其作为调整 TCS 检测阈值的一个内置旋钮<sup>[85]</sup>，通过引入降低 HK 磷酸酶活性的 CAT 突变，可以将 TCS 能够感知的输入信号物质浓度降低两个数量级；第四，在大部分 (64%) HK 的 CAT 模块中，存在可变残基可以突变为不同的疏水残基的现象，可在不需要对磷酸酶突变进行表征的情况下调节 TCS 的检测阈值，这种磷酸酶调控方法比计算设计和定向进化更容易实现。

通过合成生物学方法设计相关工具，TCS 已成功应用于生物传感器。Utsumi 等<sup>[86]</sup>在 30 多年前就通过将 RR Tar 的信号接收域的一部分与 HK EnvZ 的 CAT 模块相融合，构建了一个嵌合的 HK Taz，并将其应用于大肠杆菌中，使得大肠杆菌在天冬氨酸存在的情况可以触发渗透反应。目前，研究人员已经开发出多种基于 TCS 的生物传感器，包括光应答 TCS、用于细菌编程的系统以及用于检测肠道炎症的系统。例如，光应答 TCS 可以在空间上调控整个二维菌毯的基因表达<sup>[86]</sup>，基于此对细菌进行编程，可以实现图像处理中的边缘检测<sup>[87]</sup>。大量 TCS 整合构建的细胞生物传感器还可以用于检测肠道炎症。Daeffler 等<sup>[88]</sup>通过对细菌中由硫代硫酸盐、四硫酸盐和酸性 pH 激活的 TCS 进行重编程，其能够在结肠炎 (colitis) 和克罗恩病 (Crohn's disease) 小鼠模型中感知并报告肠道炎症<sup>[88-90]</sup>。对此类具有诊断功能的肠道细菌进行改造，有助于探索创伤更小、副作用更小的长期监测和治疗炎症性肠病治疗方法。此外，Landry 等<sup>[85]</sup>通过重编程途径反应动力学，调整了 NarX-NarL TCS 对四硫代硫酸盐和硫代硫酸盐的灵敏度，并在枯草芽孢杆菌中表达来检测和报告土壤中的各种肥料浓度。说明合成生物学工程化改造 TCS 构建的全细

胞生物传感器也为检测多种环境污染物小分子提供了新的策略。此外，TCS 也可作为抗菌化疗的潜在靶点，其可能减少细菌毒力和耐药性/耐受性的负担，而不会引起细胞死亡。因此，这种方法可能有助于开发由多重耐药 (multi-drug resistant, MDR) 病原体引起的难治性感染的抗菌治疗策略<sup>[91]</sup>。合成生物学家们还通过编程细胞感知和响应细胞外和细胞内的刺激工程化细菌，使其感知异源代谢和遗传途径施加的压力，并激活酶或应激响应系统的表达，以增强工程化遗传系统的稳定性，提高工业发酵的产量。

综上所述，目前研究人员已经对 TCS 信号感知、信号转导及其自激酶和磷酸化反应、磷酸酶活性和选择性机制有了更深入的了解。随着越来越多的结构数据为 HK 信号感知和转导的分子机制提供数据支持，对 TCS 信号转导的特异性和方向性也有了更加全面的解释。然而，大多数 TCS 能够感知的信号仍然未知，细菌基因组还存在大量未表征的 TCS<sup>[92]</sup>。在未来的合成生物学研究中，TCS 将是一类重要的传感器家族，合成生物学家通过了解特定 HK 感知信号和信号转导的过程，加速未知 TCS 的发现，并进一步据其特征不断开发可对广泛刺激做出反应多功能生物传感器。

## 参 考 文 献

- [1] Galperin M Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*, 2005, **5**: 35
- [2] Merrell D S, Camilli A. The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol Microbiol*, 1999, **34**(4): 836-849
- [3] Rhee J E, Kim K S, Choi S H. CadC activates pH-dependent expression of the *Vibrio vulnificus* *cadBA* operon at a distance through direct binding to an upstream region. *J Bacteriol*, 2005, **187**(22): 7870-7875
- [4] Miller V L, Taylor R K, Mekalanos J J. Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, 1987, **48**(2): 271-279
- [5] Helmann J D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol*, 2002, **46**: 47-110
- [6] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 183-215
- [7] Gao R, Bouillet S, Stock A M. Structural basis of response regulator function. *Annu Rev Microbiol*, 2019, **73**: 175-197
- [8] Eguchi Y, Itou J, Yamane M, *et al.* B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007,

- 104(47): 18712-18717
- [9] Xie Y, Li J, Ding Y, *et al.* An atlas of bacterial two-component systems reveals function and plasticity in signal transduction. *Cell Rep*, 2022, **41**(3): 111502
- [10] Behr S, Kristoficova I, Witting M, *et al.* Identification of a high-affinity pyruvate receptor in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 1388
- [11] Gupta A, Reizman I M B, Reisch C R, *et al.* Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(3): 273-279
- [12] Buschiazzo A, Trajtenberg F. Two-component sensing and regulation: how do histidine kinases talk with response regulators at the molecular level?. *Annu Rev Microbiol*, 2019, **73**: 507-528
- [13] de Mendoza D. Temperature sensing by membranes. *Annu Rev Microbiol*, 2014, **68**: 101-116
- [14] Cheung J, Hendrickson W A. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(2): 116-123
- [15] Mascher T, Helmann J D, Unden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, **70**(4): 910-938
- [16] Bhate M P, Molnar K S, Goulian M, *et al.* Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure*, 2015, **23**(6): 981-994
- [17] Marina A, Waldburger C D, Hendrickson W A. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J*, 2005, **24**(24): 4247-4259
- [18] Tomomori C, Tanaka T, Dutta R, *et al.* Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol*, 1999, **6**(8): 729-734
- [19] Douse C H, Bloor S, Liu Y, *et al.* Neuropathic MORC2 mutations perturb GHKL ATPase dimerization dynamics and epigenetic silencing by multiple structural mechanisms. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 651
- [20] Trajtenberg F, Graña M, Ruévalo N, *et al.* Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *J Biol Chem*, 2010, **285**(32): 24892-24903
- [21] Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, *et al.* The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*, 2016, **12**(5): e1006032
- [22] Cock P J A, Whitworth D E. Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**(11): 2355-2357
- [23] Cheung J, Hendrickson W A. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure*, 2009, **17**(2): 190-201
- [24] Ulrich L E, Koonin E V, Zhulin I B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(2): 52-56
- [25] Galperin M Y, Makarova K S, Wolf Y I, *et al.* Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *J Bacteriol*, 2018, **200**(7): e00681-17
- [26] Gushchin I, Gordeliy V. Transmembrane signal transduction in two-component systems: piston, scissoring, or helical rotation?. *Bioessays*, 2018, **40**(2): 1700197
- [27] Aravind L, Ponting C P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **176**(1): 111-116
- [28] Ferris H U, Dunin-Horkawicz S, Hornig N, *et al.* Mechanism of regulation of receptor histidine kinases. *Structure*, 2012, **20**(1): 56-66
- [29] Ferris H U, Dunin-Horkawicz S, Mondéjar L G, *et al.* The mechanisms of HAMP-mediated signaling in transmembrane receptors. *Structure*, 2011, **19**(3): 378-385
- [30] Airola M V, Watts K J, Bilwes A M, *et al.* Structure of concatenated HAMP domains provides a mechanism for signal transduction. *Structure*, 2010, **18**(4): 436-448
- [31] Swain K E, Gonzalez M A, Falke J J. Engineered socket study of signaling through a four-helix bundle: evidence for a Yin-Yang mechanism in the kinase control module of the aspartate receptor. *Biochemistry*, 2009, **48**(39): 9266-9277
- [32] Zhu L, Bolhuis P G, Vreede J. The HAMP signal relay domain adopts multiple conformational states through collective piston and tilt motions. *PLoS Comput Biol*, 2013, **9**(2): e1002913
- [33] Sukomon N, Widom J, Borbat P P, *et al.* Stability and conformation of a chemoreceptor HAMP domain chimera correlates with signaling properties. *Biophys J*, 2017, **112**(7): 1383-1395
- [34] Dunin-Horkawicz S, Lupas A N. Comprehensive analysis of HAMP domains: implications for transmembrane signal transduction. *J Mol Biol*, 2010, **397**(5): 1156-1174
- [35] Saita E, Abriata L A, Tsai Y T, *et al.* A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK. *Mol Microbiol*, 2015, **98**(2): 258-271
- [36] Lesne E, Krammer E M, Dupré E, *et al.* Balance between coiled-coil stability and dynamics regulates activity of BvgS sensor kinase in *Bordetella*. *mBio*, 2016, **7**(2): e02089
- [37] Lesne E, Dupré E, Lensink M F, *et al.* Coiled-coil antagonism regulates activity of Venus flytrap-domain-containing sensor kinases of the BvgS family. *mBio*, 2018, **9**(1): e02052-17
- [38] Singh M, Berger B, Kim P S, *et al.* Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(6): 2738-2743
- [39] Lupas A N, Bässler J. Coiled coils – A model system for the 21st century. *Trends Biochem Sci*, 2017, **42**(2): 130-140
- [40] Crick F H C. The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils. *Acta Cryst*, 1953, **6**(8): 689-697
- [41] Anantharaman V, Balaji S, Aravind L. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol Direct*, 2006, **1**: 25
- [42] Möglich A, Ayers R A, Moffat K. Design and signaling mechanism

- of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol*, 2009, **385**(5): 1433-1444
- [43] Stewart V, Chen LL. The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2010, **192**(3): 734-745
- [44] Wang C, Sang J, Wang J, *et al.* Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLoS Biol*, 2013, **11**(2): e1001493
- [45] Brown J H, Cohen C, Parry D A. Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins*, 1996, **26**(2): 134-145
- [46] Schmidt N W, Grigoryan G, DeGrado W F. The accommodation index measures the perturbation associated with insertions and deletions in coiled-coils: application to understand signaling in histidine kinases. *Protein Sci*, 2017, **26**(3): 414-435
- [47] Albanesi D, Martín M, Trajtenberg F, *et al.* Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(38): 16185-16190
- [48] Galperin M Y. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(2): 150-159
- [49] Szurmant H, Hoch J A. Interaction fidelity in two-component signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(2): 190-197
- [50] Dago A E, Schug A, Procaccini A, *et al.* Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(26): E1733-E1742
- [51] Ashenberg O, Keating A E, Laub M T. Helix bundle loops determine whether histidine kinases autophosphorylate in *cis* or in *trans*. *J Mol Biol*, 2013, **425**(7): 1198-1209
- [52] Willett J W, Kirby J R. Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS Genet*, 2012, **8**(11): e1003084
- [53] Mechaly A E, Sassoon N, Betton J M, *et al.* Segmental helical motions and dynamical asymmetry modulate histidine kinase autophosphorylation. *PLoS Biol*, 2014, **12**(1): e1001776
- [54] Casino P, Miguel-Romero L, Marina A. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3258
- [55] Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton J M, *et al.* Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol*, 2018, **16**(10): 585-593
- [56] Bennett B D, Kimball E H, Gao M, *et al.* Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 2009, **5**(8): 593-599
- [57] Burbulys D, Trach K A, Hoch J A. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 1991, **64**(3): 545-552
- [58] Uhl M A, Miller J F. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the Bordetella pertussis BvgAS phosphorelay. *EMBO J*, 1996, **15**(5): 1028-1036
- [59] West A H, Stock A M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**(6): 369-376
- [60] Willett J W, Herrou J, Briegel A, *et al.* Structural asymmetry in a conserved signaling system that regulates division, replication, and virulence of an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(28): E3709-E3718
- [61] Mechaly A E, Soto Diaz S, Sassoon N, *et al.* Structural coupling between autokinase and phosphotransferase reactions in a bacterial histidine kinase. *Structure*, 2017, **25**(6): 939-944.e3
- [62] Cai Y, Su M, Ahmad A, *et al.* Conformational dynamics of the essential sensor histidine kinase Walk. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2017, **73**(pt 10): 793-803
- [63] Casino P, Rubio V, Marina A. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, 2009, **139**(2): 325-336
- [64] Liu Y, Rose J, Huang S, *et al.* A pH-gated conformational switch regulates the phosphatase activity of bifunctional HisKA-family histidine kinases. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2104
- [65] Huynh T N, Noriega C E, Stewart V. Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(49): 21140-21145
- [66] Uhl M A, Miller J F. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem*, 1996, **271**(52): 33176-33180
- [67] Fadel F, Bassim V, Francis V I, *et al.* Insights into the atypical autokinase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* GacS histidine kinase and its interaction with RetS. *Structure*, 2022, **30**(9): 1285-1297.e5
- [68] Mensa B, Polizzi N F, Molnar K S, *et al.* Allosteric mechanism of signal transduction in the two-component system histidine kinase PhoQ. *Elife*, 2021, **10**: e73336
- [69] Molnar K S, Bonomi M, Pellarin R, *et al.* Cys-scanning disulfide crosslinking and Bayesian modeling probe the transmembrane signaling mechanism of the histidine kinase, PhoQ. *Structure*, 2014, **22**(9): 1239-1251
- [70] Lowe E C, Baslé A, Czjzek M, *et al.* A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a Bacteroides hybrid two-component system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(19): 7298-7303
- [71] Tan K, Teschler J K, Wu R, *et al.* Sensor domain of histidine kinase VxrA of *Vibrio cholerae*- A hairpin-swapped dimer and its conformational change. *J Bacteriol*, 2021, **203**(11): e00643-20
- [72] Etkorn M, Kneuper H, Dünnwald P, *et al.* Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(10): 1031-1039
- [73] Salvi M, Schomburg B, Giller K, *et al.* Sensory domain contraction in histidine kinase CitA triggers transmembrane signaling in the membrane-bound sensor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(12): 3115-3120
- [74] Lesne E, Dupré E, Loch C, *et al.* Conformational changes of an interdomain linker mediate mechanical signal transmission in sensor kinase BvgS. *J Bacteriol*, 2017, **199**(18): e00114-17

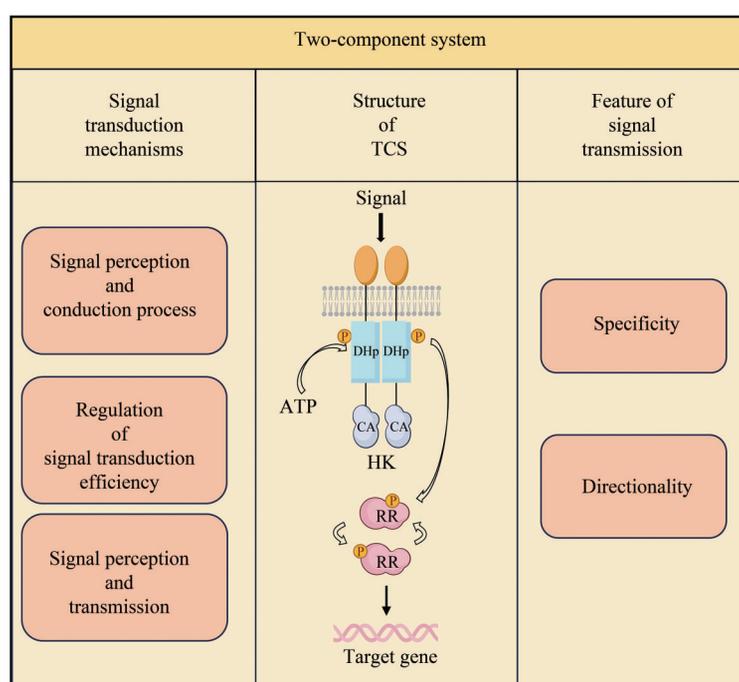
- [75] Yusof N A M, Razali S A, Mohd Padzil A, *et al.* Computationally designed anti-Lu<sub>x</sub>P DNA aptamer suppressed flagellar assembly- and quorum sensing-related gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biology*, 2022, **11**(11): 1600
- [76] Wang B, Zhao A, Novick R P, *et al.* Activation and inhibition of the receptor histidine kinase AgrC occurs through opposite helical transduction motions. *Mol Cell*, 2014, **53**(6): 929-940
- [77] Kwon O, Georgellis D, Lin E C C. Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2003, **278**(15): 13192-13195
- [78] Rabin R S, Stewart V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1993, **175**(11): 3259-3268
- [79] Mangalea M R, Borlee B R. The NarX-NarL two-component system regulates biofilm formation, natural product biosynthesis, and host-associated survival in *Burkholderia pseudomallei*. *Sci Rep*, 2022, **12**(1): 203
- [80] McClune C J, Alvarez-Buylla A, Voigt C A, *et al.* Engineering orthogonal signalling pathways reveals the sparse occupancy of sequence space. *Nature*, 2019, **574**(7780): 702-706
- [81] Potter C A, Ward A, Laguri C, *et al.* Expression, purification and characterisation of full-length histidine protein kinase RegB from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Biol*, 2002, **320**(2): 201-213
- [82] Lori C, Kaczmarczyk A, Jong I D, *et al.* A single-domain response regulator functions as an integrating hub to coordinate general stress response and development in alphaproteobacteria. *mBio*, 2018, **9**(3): e00809-18
- [83] Trajtenberg F, Imelio J A, Machado M R, *et al.* Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase: regulator complex in action. *Elife*, 2016, **5**: e21422
- [84] Lassila J K, Zalatan J G, Herschlag D. Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis. *Annu Rev Biochem*, 2011, **80**: 669-702
- [85] Landry B P, Palanki R, Dyulgyarov N, *et al.* Phosphatase activity tunes two-component system sensor detection threshold. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1433
- [86] Utsumi R, Brissette R E, Rampersaud A, *et al.* Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science*, 1989, **245**(4923): 1246-1249
- [87] Gao R, Stock A M. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*, 2009, **63**: 133-154
- [88] Daeffler K N, Galley J D, Sheth R U, *et al.* Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. *Mol Syst Biol*, 2017, **13**(4): 923
- [89] Riglar D T, Giessen T W, Baym M, *et al.* Engineered bacteria can function in the mammalian gut long-term as live diagnostics of inflammation. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**: 653-658
- [90] Cartwright I M, Dowdell A S, Lanis J M, *et al.* Mucosal acidosis elicits a unique molecular signature in epithelia and intestinal tissue mediated by GPR31-induced CREB phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(20): e2023871118
- [91] Hirakawa H, Kurushima J, Hashimoto Y, *et al.* Progress overview of bacterial two-component regulatory systems as potential targets for antimicrobial chemotherapy. *Antibiotics (Basel)*, 2020, **9**(10): 635
- [92] Lazar J T, Tabor J J. Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications. *Curr Opin Syst Biol*, 2021, **28**: 100398

## Structural Characteristics and Signal Transduction Mechanisms of Bacterial Two-component Systems\*

LUO Bo-Yu, TENG Yue\*\*

(Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

### Graphical abstract



**Abstract** The two-component system (TCS) is a signaling mechanism extensively found in prokaryotes, playing a pivotal role in bacterial environmental sensing and adaptive responses. Comprising histidine kinase (HK) and response regulator (RR) components, TCS ensures appropriate bacterial reactions to various stimuli. Understanding its structural composition, signal transduction mechanisms, and applications in synthetic biology underscores its significance in both basic research and biotechnological applications. At its core, TCS operates through a sequence of events initiated by the detection of environmental cues. When the HK senses specific signals such as temperature changes, osmolarity shifts, or the presence of ligands, it undergoes autophosphorylation at a conserved histidine residue within its kinase domain. Subsequently, this phosphoryl group is transferred to a conserved aspartate residue on the RR's receiver domain. This phosphotransfer event

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32270813).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-10-66948559, E-mail: yueteng@me.com

Received: May 21, 2024 Accepted: October 9, 2024

activates the RR, inducing a conformational change that alters its activity, often leading to changes in gene expression or other cellular responses. The specificity and fidelity of signal transduction in TCS are critical for bacteria to differentiate between various environmental cues and mount appropriate responses. This specificity is achieved through mechanisms such as unique signal molecule recognition by HKs and precise phosphotransfer from HKs to RRs. Moreover, the directional transfer of phosphoryl groups ensures tightly regulated signaling cascades, contributing to the overall robustness of bacterial response systems. Beyond its natural role, the versatility of TCS has been harnessed by engineers in synthetic biology to create tools like biosensors. By integrating TCS components into synthetic circuits, researchers can develop customized biosensors capable of highly sensitive and specific detection of environmental signals or biomolecules. These engineered biosensors find applications across diverse fields including environmental monitoring, medical diagnostics, and industrial biotechnology. The robustness of TCS-driven biosensors is particularly advantageous in synthetic biology. The modular design of TCS allows for the construction of sensor systems sensitive to a broad range of signals, adaptable to different cellular contexts. This adaptability is crucial for optimizing sensor performance under varying conditions, ensuring reliable and reproducible results. Safety considerations are paramount in synthetic biology, where TCS-based systems offer inherent safety features due to their reliance on natural signaling pathways and components. Well-characterized interactions between HKs and RRs minimize risks such as unintended cross-talk or interference with endogenous cellular processes, enhancing reliability in bioengineering applications requiring predictable and controllable cellular responses. Looking ahead, ongoing research aims to expand the capabilities of TCS-based biosensors through innovative engineering approaches. Advances in synthetic biology techniques, including genome editing and high-throughput screening, facilitate rapid design and optimization of novel sensor systems. These efforts promise next-generation biosensors with enhanced functionalities such as multiplexed sensing and real-time monitoring in complex biological environments. In summary, the TCS stands as a cornerstone of bacterial signal transduction, facilitating precise environmental sensing and adaptive responses. Its structural simplicity, coupled with robust signaling mechanisms and programmability, underpins its utility in synthetic biology for developing advanced biosensors and other bioengineering applications. By leveraging these capabilities, researchers are poised to address critical challenges in healthcare, environmental sustainability, and industrial biotechnology, shaping the future of biologically inspired technologies.

**Key words** two-component system, histidine kinase, response regulator, synthetic biology, cellular biosensor

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0216

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240216