



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dipartimento di Farmacia

Laboratori di Biochimica e Biologia Molecolare

**Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare
XXVIII Ciclo**

**Dalla catalisi all'inibizione della crescita
da contatto: le molteplici funzioni di
O-acetilserina sulfidrilasi batterica.**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Andrea Mozzarelli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Stefano Bettati

Chiar.ma Prof.ssa Barbara Campanini

Dottorando:

Roberto Benoni

2013-2015

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUZIONE..... | 1 |
| Biosintesi <i>de novo</i> della cisteina in batteri e piante..... | 3 |
| Regolazione della biosintesi della cisteina | 4 |
| Ruolo della via biosintetica della cisteina nello sviluppo del biofilm | 7 |
| O-Acetilserina sulfidrilasi..... | 8 |
| Serina acetiltransferasi..... | 11 |
| Moonlighting di CysK..... | 13 |
| Inibizione della crescita da contatto..... | 13 |
| SCOPI DELLA RICERCA..... | 15 |
| RUOLO DI CysK NELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DA CONTATTO BATTERICA | 19 |
| Materiali e metodi..... | 24 |
| Risultati..... | 31 |
| Discussione | 48 |
| INIBITORI DI O-ACETILSERINA SULFIDRILASI | 51 |
| Materiali e metodi..... | 57 |
| Risultati..... | 63 |
| Discussione | 82 |
| CONCLUSIONI | 87 |
| BIBLIOGRAFIA | 93 |

INTRODUZIONE

Biosintesi *de novo* della cisteina in batteri e piante

La cisteina gioca un ruolo essenziale nel metabolismo dello zolfo organico sia nei procarioti che negli eucarioti: la mobilizzazione dello zolfo dalla cisteina è infatti il primo passaggio della biosintesi di importanti metaboliti quali, ad esempio, metionina, glutatione, coenzima A, tiamina, biotina [1, 2]. Mentre i mammiferi ottengono la cisteina da aminoacidi solforati, soprattutto dall'aminoacido essenziale metionina, gran parte dei batteri e delle piante compiono una serie di reazioni che portano alla sua sintesi *de novo*. La biosintesi della cisteina nei batteri avviene attraverso due percorsi interconnessi. In uno di questi il solfato inorganico viene ridotto a bisolfuro (HS^-) attraverso più reazioni con consumo di energia, nell'altro la L-serina viene attivata, tramite *O*-acetilazione, dall'enzima serina acetiltransferasi (SAT, o CysE) per ottenere *O*-acetilserina (OAS). I due rami convergono a livello dell'enzima *O*-acetilserina sulfidrilasi (OASS), un enzima piridossal 5'-fosfato (PLP)-dipendente che catalizza la sostituzione del gruppo β -acetossi dell'OAS con il bisolfuro (Figura 1).

Nei batteri l'OASS è presente in due isoforme: CysK e CysM. CysK è stata la prima isoforma ad essere identificata, isolata e caratterizzata, inizialmente da *Salmonella Typhimurium* [3]. Il secondo isoenzima, il cui ruolo biologico non è ancora perfettamente chiaro [3], è stato identificato in diversi batteri. CysM è meno abbondante rispetto CysK [4] e può utilizzare donatori di zolfo alternativi al bisolfuro, come il tiosolfato [4-6]. Alcuni rapporti suggeriscono che CysM sia maggiormente espressa in condizioni anaerobiche di crescita [4, 7], ma questi risultati non sono stati supportati da studi più recenti (<http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom.pl? HL>, [8]).

Diversi studi hanno dimostrato che CysK può interagire con CysE (Figura 1). Insieme, i due enzimi formano un complesso eteromero noto come cisteina sintasi (CSC) [9, 10]. Successivi studi hanno identificato omologhi di CysK e CysE anche nelle piante [11, 12] e nei micobatteri [13]. In contrasto con CysK, CysM non interagisce con CysE [14, 15],

suggerendo che i due isoenzimi svolgano ruoli distinti nella regolazione della biosintesi della cisteina.

Regolazione della biosintesi della cisteina

La cisteina svolge un ruolo importante in diversi processi cellulari come la prevenzione dello stress ossidativo nelle cellule batteriche [16, 17]. A causa del ruolo centrale di questo aminoacido nella fisiologia batterica, è stato proposto che gli enzimi coinvolti nella sua biosintesi [18, 19], e gli isoenzimi dell'OASS in particolare [20, 21], potrebbero essere sfruttati come bersagli per lo sviluppo di nuovi antibiotici.

Alti livelli di cisteina intracellulare sono potenzialmente tossici per la cellula. Pertanto, la sua biosintesi e degradazione devono essere attentamente bilanciate. La cisteina in eccesso viene degradata a piruvato, ammoniaca e bisolfuro dalla cisteina desulfidrilasi [5, 22]. La biosintesi della cisteina è strettamente controllata a tre livelli: i) la regolazione dell'espressione genica, ii) l'inibizione a feed-back dell'attività di CysE e iii) la formazione del complesso CysE/CysK (Figura 1):

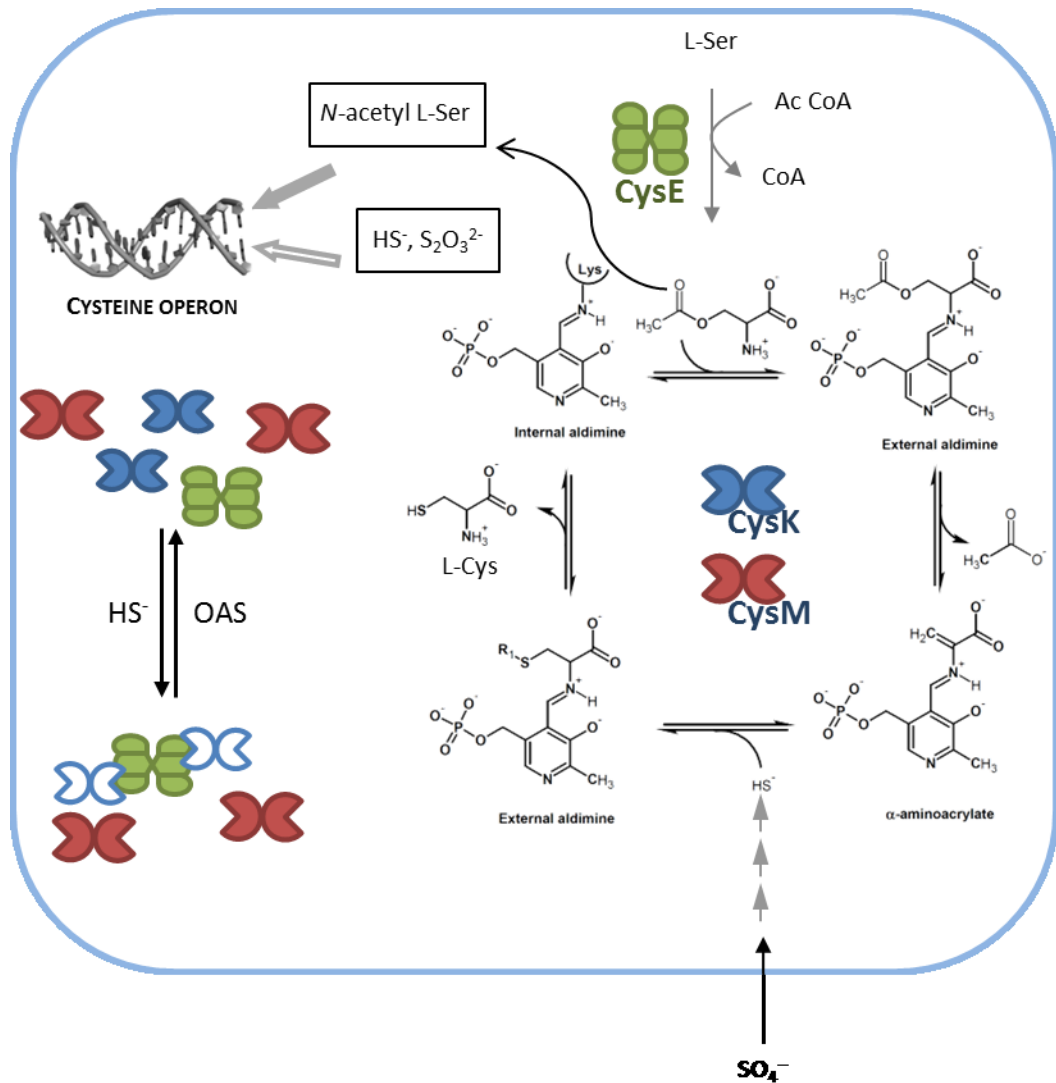


FIGURA 1: Biosintesi della cisteina nei batteri.

Sulla destra sono rappresentati gli ultimi due step del passaggio da L-serina a cisteina catalizzati da CysE e dalle due isoforme di OASS (CysK e CysM). Sulla sinistra sono rappresentati alcuni livelli di regolazione di questa via biosintetica. Le frecce piene rappresentano l'attivazione, quelle vuote l'inibizione della trascrizione (Immagine adattata da [23]).

i) Tutti i geni coinvolti nella biosintesi della cisteina, con l'eccezione di *cysE* e *cysB*, sono organizzati nel regulone della cisteina, la cui trascrizione è sotto il controllo dell'attivatore trascrizionale CysB [24]. CysB è un fattore di trascrizione stimolato dall'induttore *N*-acetilserina (NAS). La NAS viene generata in modo non enzimatico dall'OAS attraverso la migrazione spontanea del gruppo acetile dall'ossigeno all'azoto [24]. Pertanto, un aumento delle concentrazioni di NAS riflette l'accumulo di OAS, che è a sua volta determinato dalla concentrazione intracellulare di bisolfuro. L'effetto positivo di NAS sul regulone della cisteina viene neutralizzato da bisolfuro e tiosolfato, che agiscono entrambi come anti-induttori (Figura 1) [24].

ii) La regolazione della biosintesi della cisteina a livello post-trascrizionale è focalizzata sulle attività di CysK e CysE. La cisteina agisce come un inibitore competitivo a feed-back per bloccare l'attività di CysE [25, 26]. Nelle piante la K_i della cisteina su CysE è di 2 μM , ben al di sotto delle concentrazioni intracellulari medie di cisteina (10-20 μM) [27]; la K_i aumenta sostanzialmente, a 70 μM , quando CysE è legata a CysK [27], il che indica la minor sensibilità dell'enzima all'inibizione da cisteina quando si trova nel CSC (Figura 1).

iii) Il ruolo della formazione del CSC nel metabolismo della cisteina non è del tutto chiaro e tende a differire tra batteri e piante. Essendo il complesso stabilizzato dal bisolfuro e destabilizzato da OAS (Figura 1) [9, 28], la sua formazione è responsabile dello stato dello zolfo all'interno della cellula batterica. L'OAS dissocia il complesso per competizione diretta con CysE nel sito attivo di CysK [29], mentre il bisolfuro stabilizza il complesso, anche in presenza di OAS, presumibilmente occupando un sito di legame allosterico che è stato descritto per CysK da *Salmonella Typhimurium* (StCysK) [30]. CysK all'interno del complesso viene inibita perché il suo sito attivo è occupato dalla porzione C-terminale di CysE. Tuttavia, il complesso protegge CysE dall'aggregazione e dalla proteolisi [31, 32]. È importante sottolineare che l'espressione di CysE è indipendente da CysB e dal regulone della cisteina. Pertanto, l'induzione del regulone per carenza di zolfo influenza la formazione di CSC alterando il rapporto tra la concentrazione cellulare di CysK e CysE.

Ruolo della via biosintetica della cisteina nello sviluppo del biofilm

Il biofilm batterico è un aggregato di cellule microbiche (circa il 15% del volume) associate ad una superficie e incluse in una matrice polimerica extracellulare da esse prodotta (circa l'85%). La capacità dei batteri di crescere in biofilm gli conferisce l'abilità di sopravvivere in condizioni ambientali avverse e colonizzare una varietà di superfici [33, 34]. La matrice del biofilm contiene in genere polisaccaridi, proteine e DNA, che insieme forniscono un ambiente protetto e permettono l'aderenza alle superfici. La produzione di un biofilm dipende dalla capacità dei batteri di riconoscere e rispondere ad appropriati stimoli ambientali e produrre ed esportare una varietà di sostanze che vengono assemblate per consentire una architettura tridimensionale. Il biofilm formato da *Escherichia coli* e altri patogeni può creare seri problemi per la salute umana. Le cellule batteriche che producono biofilm resistono più facilmente agli antibiotici e sono spesso responsabili di sintomi ricorrenti e insuccessi nel trattamento di alcune patologie [35-38]. Poiché le cellule batteriche in un biofilm sono incorporate in una matrice polisaccaridica, hanno bassi livelli di ossigeno e bassa attività metabolica. Dal momento che molte cellule in un biofilm vivono per tempi prolungati senza andare incontro a divisione, queste sono resistenti agli antibiotici efficaci principalmente su cellule in divisione [35, 37]. Inoltre, si è riscontrato che il 40% delle proteine della parete batterica nei biofilm sono diverse da quelle delle cellule planctoniche; quindi, alcuni antibiotici possono perdere i loro target [35, 37]. Nonostante vi siano pochi composti naturali noti che inibiscono la formazione del biofilm poiché non agiscono sulla crescita delle cellule, è noto come molte proteine coinvolte nella via biosintetica della cisteina, come CysH, CysJ, CysK, e CysN, siano coinvolte nella formazione di un biofilm stabile [39]. In particolare è stato dimostrato che in *Vibrio fischeri* CysK gioca un ruolo fondamentale per la formazione di biofilm e i mutanti deleti del gene che codifica per questo enzima non sono capaci di aderire alle

superfici nemmeno dopo l'aggiunta di cisteina, ad indicare l'azione specifica dell'enzima [39].

O-Acetilserina sulfidrilasi

L'OASS è un enzima PLP-dipendente, appartenente alla famiglia β e al *fold type II* [40, 41], che catalizza la sintesi della cisteina da OAS e solfuro. La reazione procede in modo irreversibile verso la formazione della cisteina tramite un meccanismo a Ping-Pong costituito da due semi-reazioni (Figura 2) [42-44]:

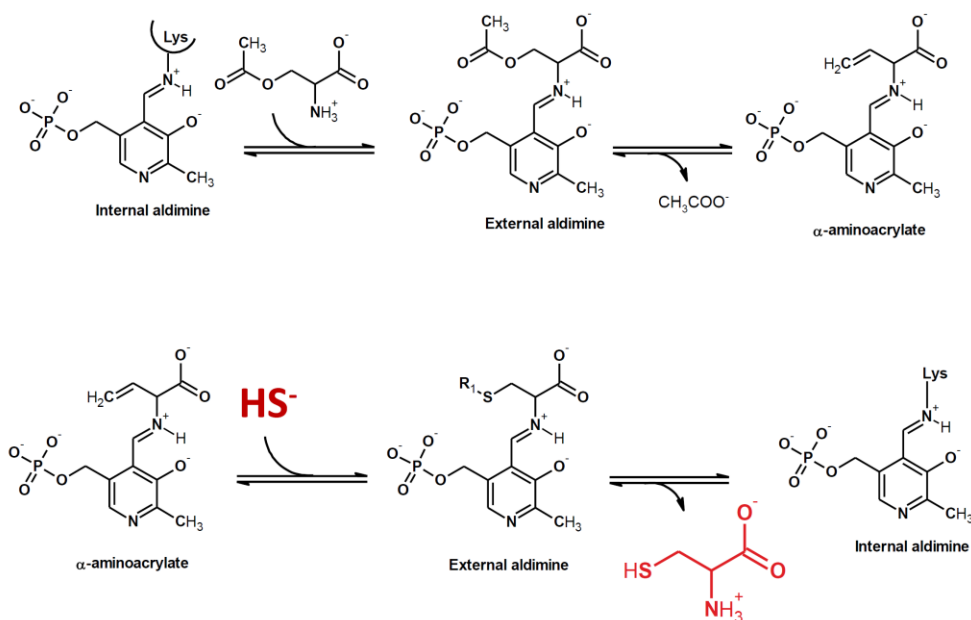


FIGURA 2: Meccanismo di reazione dell'OASS.

Reazione a Ping-Pong dell'interconversione dell'OAS in cisteina, catalizzata da CysK e CysM. In alto la prima semi-reazione: reazione tra OAS e PLP con formazione dell'intermedio α -aminoacrilato. In basso la seconda semi-reazione con il legame del bisolfuro e la formazione della cisteina (immagine modificata da Benoni et al., articolo inviato per la pubblicazione).

Per le piante, è riportata la presenza di diverse isoforme di OASS in diversi compartimenti cellulari [45]. Nei γ -proteobatteri, invece, sono presenti due isoforme, CysK e CysM.

La struttura delle due isoforme di OASS da *S. Typhimurium* è stata determinata mediante studi cristallografici [44, 46]. L'enzima è un omodimero costituito da due subunità identiche di 34500 Da per CysK e 32600 Da per CysM (Figura 3A). Ciascuna subunità è a sua volta formata da un dominio maggiore e uno minore, con una struttura secondaria simile costituita da una regione centrale a β -foglietto circondata da α -eliche. Ciascun dimero lega una molecola di PLP ed il sito attivo si trova all'interfaccia tra i due domini. Le due isoforme presentano un 43% d'identità di sequenza ed una struttura molto simile, anche nelle variazioni conformazionali che conseguono all'interazione con ligandi del sito attivo (Figura 3B).

La differenza maggiore tra le due isoforme si osserva nel loop di CysM attorno al residuo G208 nella parte anteriore del PLP che subisce cambiamenti conformazionali minori durante la catalisi rispetto a CysK. In particolare, la sostituzione in CysM del residuo Q227 (numerazione di CysK) con P207 rende più accessibile una porzione della tasca del sito attivo (Figura 3C) [47].

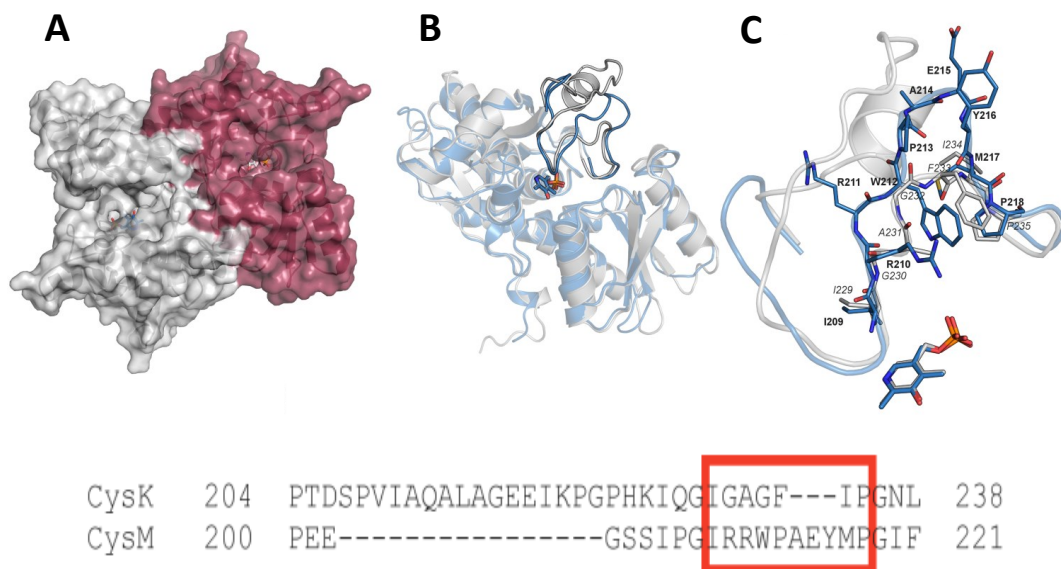


FIGURA 3: Struttura di CysK e CysM.

A) Omodimero di CysK tratto dalla struttura cristallografica 1OAS; i due monomeri sono evidenziati con colori differenti. **B)** Sovrapposizione di CysK (1OAS, catena A, in grigio chiaro) e CysM (2JC3, catena A, in blu). Le maggiori differenze strutturali sono nel loop vicino al sito attivo. **C)** Zoom del loop evidenziato nel pannello B: CysK in grigio chiaro con i residui numerati in corsivo; CysM in blu con i residui numerati in grassetto. Nella parte bassa della figura è riportato l'allineamento della sequenza amminoacidica del loop nelle due isoforme (Pieroni et al., articolo inviato per la pubblicazione).

Inoltre CysM presenta la sostituzione del residuo G230 con R210 che in alcuni microrganismi determina la selettività di CysM per il substrato *O*-fosfoserina. Entrambe le isoforme hanno una elevata mobilità conformazionale. In particolare, nel sito attivo è presente un sottosito specifico per il legame del gruppo carbossilico del substrato che forma legami ad idrogeno e interazioni elettrostatiche con amminoacidi del *substrate binding loop*. Tali interazioni determinano una profonda variazione conformazionale in seguito al legame con il substrato che stabilizza una conformazione chiusa dell'enzima. Il confronto tra i siti attivi delle due isoforme rivela la presenza di una regione molto ben conservata tra i domini minori e una maggiore variabilità nei domini maggiori [44]. La presenza in CysM dei due residui R210 e W212, che sostituiscono rispettivamente G230 e G232 in CysK, rende la tasca di legame più polare e apparentemente meno accessibile

rispetto a CysK. La diversa orientazione di M119 contribuisce alla chiusura del sito attivo, accessibile attraverso uno stretto canale [44, 47, 48]. Nonostante ciò, CysM mostra un sito attivo più ampio di CysK, una minore selettività di substrato e una velocità di catalisi generalmente più elevata specialmente con analoghi del substrato ingombranti.

In entrambe le isoforme è stata identificata una tasca nel sito attivo strutturalmente adatta a legare il gruppo carbossilico dell'OAS, attraverso legami ad idrogeno ed interazioni elettrostatiche. L'identificazione di questa tasca di legame per un gruppo carbossilico ha suggerito una strategia per la sintesi di composti attivi sull'enzima. Infatti, in gran parte degli inibitori dell'enzima ad oggi sviluppati è presente un acido carbossilico che si inserisce nella tasca e potrebbe determinare la chiusura del sito.

In CysK è stato inoltre identificato [30] e caratterizzato [49] un sito allosterico per piccoli anioni, localizzato all'interfaccia tra i due monomeri. Si pensa che questo sito venga occupato dal solfuro, inibitore fisiologico di OASS. Il legame dello ione cloruro a questo sito induce una variazione strutturale dell'enzima che assume una conformazione intermedia tra quella aperta e quella chiusa, definita "inibita".

Serina acetiltransferasi

CysE è una proteina di 175 kDa che catalizza una reazione acetil-transferasica dall'acetilCoA alla serina tramite un meccanismo di reazione con un complesso ternario ad ordine casuale [25].

Nelle piante ci sono differenti isoforme di CysE presenti nei diversi compartimenti, mentre nei batteri è presente un'unica isoforma. La struttura di CysE, che è stata risolta per le proteine da *E. coli* ed *Haemophilus influenzae*, è quella di un esamero formato da sei monomeri identici disposti come dimeri di trimeri (Figura 4).

CysE mostra il tipico dominio a β -elica sinistrorsa degli enzimi acetiltransferasici, altamente conservato nelle piante e nei batteri. La porzione C-terminale di ciascun monomero è flessibile e gli ultimi 26 aminoacidi non sono stati risolti nelle strutture cristallografiche [50, 51].

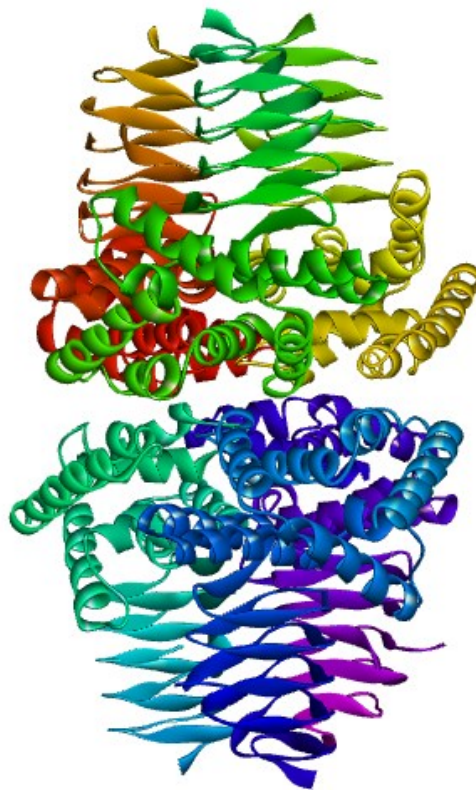


FIGURA 4: Struttura cristallografica di HiCysE.

Struttura del dimero di trimeri di HiCysE (codice PDB: 1SST).

CysE batterica è inibita dalla cisteina, il prodotto finale della via biosintetica, con una K_i di $1 \mu\text{M}$, e dall'Acetil Coenzima A con una K_i di 0.1 mM .

È stato proposto [52], e successivamente dimostrato [29, 53, 54], che la coda C-terminale di CysE si inserisce nel sito attivo di CysK durante la formazione del CSC. La struttura tridimensionale del CSC non è stata ancora determinata. Tuttavia, la struttura di CysK da *H. influenzae* (HiCysK) in complesso con un decapeptide corrispondente al C-terminale di HiCysE supporta l'idea che il sito attivo di CysK serve come punto di ancoraggio per la formazione del complesso [29]. È interessante notare che CysE di organismi diversi mostra un alto grado di variabilità di sequenza al C-terminale, ma è mantenuta invariata l'Ile C-terminale. L'Ile gioca un ruolo fondamentale nella formazione del complesso e la sua rimozione impedisce completamente l'associazione del CSC [14].

Moonlighting di CysK

L'interazione tra CysK e CysE per la formazione del CSC sfrutta una modalità apparentemente abbastanza unica. In realtà, un meccanismo analogo sembra caratterizzare le interazioni tra CysK e alcune altre proteine partner. Queste varie interazioni sono alla base delle diverse funzioni (moonlighting), oltre a quella enzimatica direttamente legata alla sintesi della cisteina, esplicate da CysK all'interno delle cellule batteriche [23]. In *Bacillus subtilis*, CysK modula l'affinità di un fattore di trascrizione del tipo Rrf2 per le sequenze dell'operatore, regolando così l'espressione del regulone della cisteina. In *E. coli*, CysK agisce come un cosiddetto fattore "permissivo" per attivare una tossina antibatterica (CdiA) coinvolta nell'inibizione della crescita da contatto (CDI) [55]. Anche se i partner alternativi legano CysK per "nuove" funzioni, queste interazioni potrebbero anche influenzare indirettamente la biosintesi della cisteina inibendo l'attività di CysK.

Inibizione della crescita da contatto

Le cellule batteriche sono spesso considerate come entità isolate e autonome. Tuttavia presentano un certo grado di cooperazione e comportamenti competitivi. I batteri collaborano per assemblarsi in comunità nei biofilm e secernono piccole molecole segnale per coordinare varie attività [56, 57]. Alcuni fattori solubili sono utilizzati anche per la competizione intercellulare. Ad esempio alcuni batteri rilasciano batteriocine per inibire la crescita dei concorrenti [58]. Altri sistemi inibitori richiedono il contatto diretto cellula-cellula come il sistema di inibizione della crescita contatto-dipendente (CDI) che è stato studiato in *E. coli*. Questo sistema di inibizione è mediato da CdiA, una proteina di circa 319 kDa sintetizzata da alcuni ceppi patogeni di *E. coli*. È stato proposto che CdiA assuma una struttura a β -elica estesa per diverse centinaia di angstrom in lunghezza verso l'esterno della cellula per interagire con le cellule da inibire [59]. A contatto con queste cellule, CdiA viene tagliata dal recettore BamA [60] e solamente la porzione C-terminale

(CdiA-CT), contenente circa 250 residui, viene traslocata all'interno della cellula ospite. Questa porzione proteica possiede attività tRNAAsica [61]. Questa attività, assente *in vitro* per la proteina isolata, viene riacquisita in seguito all'aggiunta di lisato cellulare. Ulteriori studi hanno dimostrato come il fattore cellulare necessario per l'attivazione di CdiA-CT sia la presenza di CysK, in quanto solo in seguito all'interazione tra queste due proteine viene riacquisita l'attività tRNAAsica della tossina [55]. Per garantire l'immunità alle cellule che esprimono CdiA, esse esprimono un piccolo peptide di circa 9 kDa (CdiI) che va a legarsi al complesso CdiA-CT:CysK inibendo l'attività tRNAAsica [62].

SCOPI DELLA RICERCA

Gli scopi del presente lavoro sono stati principalmente la caratterizzazione di un sistema di inibizione della crescita da contatto di *E. coli* e identificazione e sviluppo di nuovi inibitori di OASS come potenziali antibiotici.

È stato recentemente scoperto che l'isoforma CysK è responsabile dell'attivazione di una tossina ad attività tRNAsica espressa da *E. coli* (CdiA-CT). In questo progetto è stata analizzata l'interazione tra le due proteine determinando l'affinità e la velocità di formazione del complesso attraverso studi allo stato pre-stazionario, spettroscopia di fluorescenza e saggi d'attività enzimatica. La stessa caratterizzazione è stata effettuata anche sull'interazione tra CysK da *E. coli* (EcCysK) ed EcCysE, per meglio determinare il ruolo fisiologico, finora scarsamente delineato, del complesso CSC, e l'eventuale possibile competizione tra CysE e CdiA-CT per il legame a CysK, che potrebbe rivelare un coinvolgimento della tossina nella regolazione del pathway biosintetico della cisteina. È stata poi determinata la selettività del legame tra CdiA-CT e CysK di diverse specie, ed investigato il ruolo dell'inibitore fisiologico (CdiI) sulla formazione del complesso tossina:EcCysK. Chiarimenti su questo meccanismo di attivazione potrebbero essere utili per capire meglio il complesso meccanismo di regolazione della sintesi della cisteina nei batteri, che è oggetto di studio da molto tempo anche con l'intento di guidare lo sviluppo di inibitori dell'enzima CysK. Diversi studi hanno infatti dimostrato come l'OASS sia un potenziale target per lo sviluppo di nuovi inibitori ad azione antibiotica. Precedenti studi hanno caratterizzato il ruolo degli enzimi coinvolti nel metabolismo dello zolfo nella virulenza di alcuni batteri [63], nel recupero dallo stress ossidativo [64, 65] e nella formazione di biofilm [39]. Il blocco di questa via metabolica pare non avere alcun effetto sui batteri in condizioni di crescita normali, in quanto questi possono assumere la cisteina dall'ambiente esterno. Tuttavia inibitori specifici potrebbero essere usati in associazione ad altri antibiotici per superare l'aumento della resistenza nei batteri e per ridurre l'infettività e la virulenza di essi. Un altro vantaggio di questi inibitori è che nei mammiferi OASS non è presente.

Nel corso di questo progetto di dottorato sono stati testati inibitori di entrambe le isoforme di OASS da *Salmonella Typhimurium*, StCysK e StCysM, sintetizzati nel

laboratorio del prof. Gabriele Costantino dell'Università di Parma. È necessario che i ligandi inibiscano entrambe le isoforme in quanto non è noto se vi è una loro espressione differenziale durante le fasi dell'infezione. Partendo dallo studio di pentapeptidi che mimano la regione C-terminale di CysE, inibitore fisiologico di CysK, sono stati sintetizzati ligandi di sintesi. Queste molecole hanno una struttura ciclopropanica che mantiene in configurazione trans un gruppo carbossilico e una porzione lipofila. Attraverso studi di docking e analisi con Saturation Transfer Difference-NMR (STD-NMR) e tecniche spettrofluorimetriche si è ottimizzato la struttura di questi inibitori.

**RUOLO DI CysK NELL'INIBIZIONE
DELLA CRESCITA DA CONTATTO
BATTERICA**

Caratterizzazione biochimica del complesso tra *O-acetilserina sulfidrilasi* e una tossina coinvolta nel sistema di inibizione della crescita da contatto in *E. coli*

Molti patogeni Gram-negativi presentano dei sistemi di inibizione della crescita da contatto (CDI). Questo fenomeno ha un ruolo importante nella colonizzazione di determinati ambienti da parte di batteri diversi e si avvale della produzione di tossine proteiche contro determinati organismi [66, 67]. In alcuni ceppi patogeni di *E. coli* la CDI è mediata da due proteine di secrezione, CdiB e CdiA. CdiB è una proteina trasportatrice di membrana che espone la proteina effettrice CdiA sulla superficie esterna delle cellule CDI⁺. CdiA è una grande proteina con dimensioni variabili da circa 180 kDa a oltre 600 kDa e si ritiene che formi una β -elica che si estende per centinaia di angstrom dalla superficie cellulare [59]. CdiA lega un recettore specifico (BamA) sui batteri sensibili ed in seguito a questo legame la sua porzione C-terminale (CdiA-CT) viene tagliata e traslocata all'interno delle cellule bersaglio dove svolge la sua attività tossica. Le cellule isogeniche sono protette dall'espressione di un peptide (CdiI), che si lega a CdiA-CT e ne neutralizza l'attività (Figura 5) [62, 66, 68-70].

Il sistema CDI viene quindi utilizzato per sopprimere la crescita di batteri non isogenici, fornendo completa immunità alle cellule isogeniche. La tossina CdiA-CT del ceppo uropatogenico 536 (UPEC 536) di *E. coli* ha un'attività tRNAsica in vivo (Figura 5) [66], ma sorprendentemente, una volta purificata, presenta un'attività tRNAsica solo quando è incubata in presenza di lisato cellulare [55]. Questi dati suggeriscono che la tossina richieda un co-fattore cellulare per essere attivata. Sulla base di queste osservazioni,

Diner et al. hanno identificato come fattore di attivazione per CdiA-CT l'enzima CysK [55]. La necessità di un'interazione con CysK per l'attivazione di CdiA-CT è stata dimostrata con mutanti di *E. coli* $\Delta cysK$ che sono completamente resistenti al sistema CDI. Inoltre, CysK come enzima purificato è sufficiente per attivare CdiA-CT in vitro.

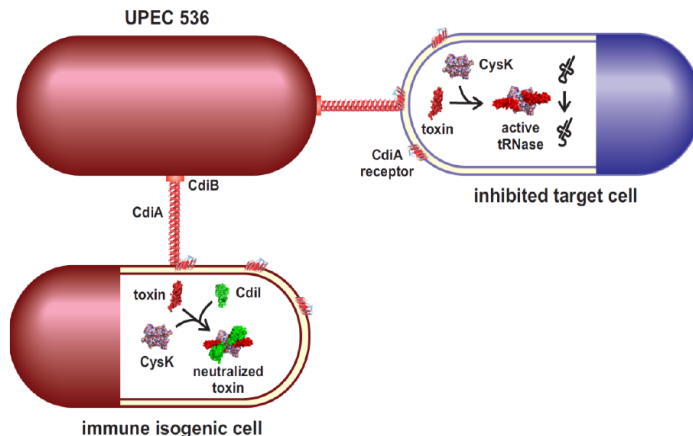


FIGURA 5: Schema del sistema di inibizione della crescita batterica da contatto.

Schema dell'attività tRNAseica di CdiA-CT in complesso con CysK e della sua inibizione dovuta alla presenza di CdiI [23].

L'esatto meccanismo di attivazione di CdiA-CT è sconosciuto, ma è interessante notare che la tossina non si lega a CysM e non viene attivata da questo enzima [55]. Questa specificità è simile alla selettività di interazione e di legame di CysE, suggerendo che il dominio CdiA-CT può interagire con CysK in modo simile. Infatti, CdiA-CT ha una sequenza C-terminale Gly-Tyr-Gly-Ile che è simile alla sequenza Gly-Asp-Gly-Ile C-terminale di EcCysE.

In questa parte del lavoro di tesi abbiamo caratterizzato da un punto di vista biochimico l'interazione tra CdiA-CT e CysK e l'influenza di CdiI sulla formazione di questo complesso, e la formazione del complesso cisteina sintasi tra CysE e CysK. I due complessi hanno un'affinità paragonabile, con costanti di dissociazione nell'ordine del basso nanomolare. Tuttavia, vi è una grande diversità nelle cinetiche necessarie per raggiungere l'equilibrio. La formazione del complesso tra tossina e CysK è due ordini di grandezza più lenta e non

viene influenzata in alcun modo dalla presenza di CdiI. Si è poi anche analizzata la specificità di interazione di CdiA-CT con CysK provenienti da diversi organismi, e si è osservato che CdiA-CT forma un complesso stabile anche con CysK da *Salmonella Typhimurium*, ma non con CysK da *Haemophilus influenzae* e da *Neisseria lactamica*. CysK agisce quindi come un fattore permissivo per la CDI, fornendo un meccanismo potenziale per modulare la crescita in cellule bersaglio e d'altro canto CdiA-CT può regolare la produzione di cisteina nelle cellule isogeniche funzionando come messaggero tra batteri della stessa specie.

Materiali e metodi

Reattivi e tamponi: I reattivi, acquistati da Sigma-Aldrich, sono stati utilizzati come ricevuti. Gli esperimenti, se non diversamente indicato, sono stati effettuati in tampone A, contenente fosfato di sodio 20 mM, NaCl 85 mM, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanololo 10 mM, pH 7.

Espressione e purificazione di proteine: I geni codificanti per CysK da *Escherichia coli* (EcCysK, [55]), da *Salmonella enterica* sierotipo *Typhimurium* (StCysK, [71]), da *Haemophilus influenzae* (HiCysK, [29]) e da *Neisseria lactamica* (NICysK, C. Hayes, dati non pubblicati) sono stati espressi in plasmidi ricombinanti e transfettati in *E. coli* BL21(DE3). Le proteine espresse sono state purificate mediante cromatografia di affinità con ioni metallici (IMAC), utilizzando ioni Co^{2+} immobilizzati sulla resina (Talon™, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), seguendo il protocollo riportato da Tian et al. [71], con piccole modifiche. L'His-tag è stata rimossa da HiCysK utilizzando la trombina [29] e da StCysK con una incubazione di 5 ore a 37 °C utilizzando il Fattore Xa in un rapporto 1:200 con l'enzima, in Hepes 20 mM, NaCl 100 mM e CaCl_2 4 mM, pH 7.5. La purezza delle proteine è stata valutata tramite SDS-PAGE ed è risultata superiore al 95%. La concentrazione delle proteine è stata determinata sfruttando il coefficiente di estinzione del PLP legato, calcolato con il metodo della denaturazione degli alcali [72]. I coefficienti di estinzione a 412 nm sono $7.600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per HiCysK, $9040 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per StCysK, $9370 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per EcCysK e $8280 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per NICysK.

Il gene che codifica per l'enzima CysE da *E. coli* (EcCysE) ha nel costrutto il tag contenete tioredossina-His₆ ed è posto nel plasmide pSH21. L'enzima è stato espresso in BL21(DE3) Tuner™ (Novagen, Merck Biosciences, Billerica, MA, USA) e indotto con 1 mM IPTG. Le cellule sono state lisate per sonicazione e l'estratto grezzo caricato su FPLC con una colonna impaccata con resina Talon. La proteina è stata eluita con 1 M imidazolo e dializzata contro Tris 20 mM, NaCl 50 mM, glicerolo 1%, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5. La proteina di fusione EcCysE-tioredossina-His₆ è stata incubata con TEV proteasi-His₆,

espressa in questo laboratorio, a 25 °C per 4 ore. La tioredossina e la TEV proteasi sono state rimosse tramite una colonna IMAC. La preparazione di EcCysE (pura all'80%) è stata caricata su una colonna per FPLC Ultrogel AcA44 (limite di esclusione 200 kDa, campo di lavoro 17-175 kDa, volume della colonna di 63 ml e volume morto di 20.4 ml), eluita con tampone A ad un flusso di 0.2 ml/min. EcCysE è eluita dopo 28 ml, ben separata dai contaminanti ad alto peso molecolare, con una massa apparente di 167.200 Da, che indica la struttura quaternaria esamerica prevista. La preparazione ha una purezza >95%. La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione a 278 nm di $26.900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

I geni che codificano per CdiA-CT e CdiI sono stati clonati in pET21d e le proteine espresse in BL21(DE3) Tuner™ come complesso. CdiA-CT e CdiI sono stati purificati come descritto da Aoki et al. [66]. Una volta rinaturata, CdiA-CT è stata ulteriormente purificata con IMAC. Per entrambe le proteine è stata effettuata un'ulteriore purificazione tramite cromatografia ad esclusione dimensionale, utilizzando le stesse condizioni sperimentali descritte per EcCysE. Questo ulteriore step di purificazione è stato introdotto per rimuovere i contaminanti di elevato peso molecolare e tracce di complesso tossina-inibitore. La concentrazione proteica è stata stimata utilizzando il coefficiente di estinzione molare a 278 nm di $13.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $8480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ per CdiA-CT e CdiI rispettivamente.

Peptidi: i peptidi YGDGI e YGYDI sono stati sintetizzati da Sigma Genosys con una purezza superiore al 95%, come valutato mediante spettrometria di massa associata ad HPLC. I peptidi sono stati ottenuti come polvere liofilizzata, sciolti in acqua o in tampone e dializzati contro tampone HEPES prima dell'uso [73]. YGDGI è la sequenza wt della regione C-terminale di EcCysE e YGYDI è un peptide ad alta affinità di legame per StCysK [48].

Spettroscopia di assorbimento e di dicroismo circolare: Gli spettri di assorbimento sono stati raccolti utilizzando uno spettrofotometro Varian CARY400, equipaggiato con una cella termostata a 20.0 ± 0.5 °C. Gli spettri sono stati corretti per il contributo del tampone. Le misurazioni di dicroismo circolare sono state effettuate utilizzando uno

spettropolarimetro JASCO J-715. Ogni spettro rappresenta la media di tre misurazioni, sottratte del contributo del tampone.

Spettroscopia di fluorescenza: L'interazione dei ligandi con CysK è stata studiata tramite spettrofluorimetria, monitorando l'aumento di emissione di fluorescenza del PLP a 500 nm dopo eccitazione a 412 nm [54, 74]. Gli spettri di emissione sono stati raccolti utilizzando un fluorimetro FluoroMax-3 (HORIBA), dotato di una cella termostata a 20 ± 0.5 °C. Gli spettri sono stati corretti per il contributo del tampone. Le slit utilizzate sono state impostate per ottimizzare il rapporto segnale-rumore. Per gli esperimenti di legame la dipendenza dell'intensità di fluorescenza a 500 nm dalla concentrazione del ligando all'equilibrio è stata analizzata con una isoterma di legame:

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [L]}{K_d + [L]} \quad (1)$$

o con un'equazione quadratica che descrive un'interazione forte (tight binding):

$$I = I_0 + \Delta I \cdot \frac{[P] + [L] + K_D - \sqrt{([P] + [L] + K_D)^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]}}{2} \quad (2)$$

dove I è l'intensità di fluorescenza a 500 nm in presenza del ligando, I_0 è l'intensità di fluorescenza a 500 nm in assenza del ligando, I_{\max} è la massima variazione di fluorescenza a concentrazioni saturanti di ligando, ΔI è la variazione totale di fluorescenza dovuta al ligando, $[L]$ è la concentrazione totale del ligando, $[P]$ è la concentrazione totale di proteina e K_d è la costante di dissociazione del complesso ligando:CysK.

Saggi di attività:

Attività specifica delle proteine. L'attività specifica di CysK è stata calcolata con un saggio spettrofotometrico continuo utilizzando come substrato nucleofilo il tionitrobenzoato (TNB) [43]. L'attività specifica di CysE è stata valutata mediante un test indiretto con il DTNB [25]. Per entrambi i saggi si è utilizzato il coefficiente di estinzione del TNB a 412 nm di $13.660 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [75].

Saggi di attività di CysE. Le cinetiche di reazione allo stato stazionario di CysE sono state seguite con un adattamento del metodo pubblicato da Hama et al. [76] in tampone fosfato 20 mM, NaCl 85 mM, EDTA 2 mM, pH 7 a 20 °C. In questo saggio l'acetilazione di L-serina è eseguita in una soluzione contenente CysE 6.8 nM e L-serina 20 mM variando la concentrazione di acetilCoA e monitorando la diminuzione del segnale spettroscopico a 232 nm, in corrispondenza dell'assorbimento del legame tioesterico ($\Delta\epsilon_{232}=4.440 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La dipendenza della velocità iniziale (v_0) dalla concentrazione di acetilCoA è stata analizzata con l'equazione di Michaelis-Menten (3):

$$v_0 = \frac{V_{max}\cdot[AcCoA]}{K_{M,AcCoA}+[AcCoA]} \quad (3)$$

Saggi di inibizione di CysK. Le cinetiche di reazione allo stato stazionario di CysK sono state misurate con un saggio discontinuo che sfrutta la quantificazione della cisteina con il metodo di Gaitonde [77], adattato allo sviluppo in piastre da 96 pozzetti. In breve, la reazione sulfidrilasica è avviata con l'aggiunta di Na_2S 0.6 mM ad una soluzione contenente EcCysK 3 nM, BSA 30 nM e concentrazioni variabili di OAS in tampone A. Aliquote da 60 μl sono state prelevate ad intervalli di tempo fissi (in modo da effettuare circa 7 misurazioni per ogni cinetica) e la reazione è stata fermata in strip di eppendorf da PCR contenenti 60 μl di acido acetico. Alla fine 60 μl di reattivo alla ninidrina [77] sono stati aggiunti con una pipetta multicanale; la miscela è stata riscaldata a 100°C per 10' in un termociclatore. La soluzione è stata raffreddata e 46 μl della miscela di reazione sono stati aggiunti ai pozzetti di una piastra contenenti 154 μl di etanolo freddo per diluire la soluzione. La successiva quantificazione dell'addotto di colorazione rosa è stata effettuata

tramite la lettura dell'assorbimento delle soluzioni a 550 nm con un lettore di piastre (Halo LED 96, Dynamic Scientific, Newport Pagnell, UK). I contributi del background sono stati sottratti e ogni cinetica è stata determinata come media di almeno due replicati. La quantità di cisteina prodotta è stata calcolata tramite l'utilizzo di una curva di calibrazione ed i dati sono stati descritti con un'equazione lineare per calcolare la velocità iniziale di produzione di cisteina. I parametri cinetici sono stati calcolati applicando l'equazione di Michaelis-Menten (3). L'effetto della presenza di CysE o di CdiA-CT sulla velocità iniziale di reazione di CysK è stato misurato in miscele di reazione contenenti concentrazioni variabili delle due proteine, OAS 2 mM e Na₂S 0.6 mM. I dati sono stati analizzati con l'equazione di Morrison (4) per calcolare la K_i degli inibitori caratterizzati da tight binding [78]:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_T + [I]_T + IC_{50}) - \sqrt{([E]_T + [I]_T + IC_{50})^2 - 4 \cdot [E]_T \cdot [I]_T}}{2 \cdot [E]_T} \quad (4)$$

Dove [E]_T è la concentrazione totale dell'enzima, [I]_T è la concentrazione totale dell'inibitore (CysE o CdiA-CT) e v_i/v₀ è il rapporto tra la velocità in presenza (v_i) e in assenza (v₀) di ligando.

Per inibitori competitivi [78]:

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[OAS]}{K_{M,OAS}} \right) \quad (5)$$

È importante ottenere come parametro inibitorio di un composto anche la K_i perché mentre l'IC₅₀ è influenzata dalla concentrazione di substrato relativa rispetto alla K_M, la K_i è indipendente da questo parametro e quindi la si può utilizzare per paragonare inibitori valutati in differenti condizioni. Per inibitori di tipo competitivo la K_i e la K_d coincidono.

Cinetiche di interazione allo stato pre-stazionario di CysK con i suoi partner di

legame: Le cinetiche di legame allo stato pre-stazionario sono state determinate per mezzo di uno spettrometro stopped-flow in condizioni simili a quelle riportate in [79], misurando la fluorescenza emessa in seguito all'eccitazione diretta del cofattore PLP a 412 nm con un apparato SX-18MV (Applied Photophysics) dotato di una lampada allo xeno da 75 watt come sorgente luminosa e di un fotomoltiplicatore come rivelatore. Il segnale di emissione è stato raccolto a 90° rispetto alla sorgente di eccitazione. La temperatura delle siringhe di carico e del vano portacampione dello spettrometro è stata mantenuta costante a 20.0 ± 0.5 °C. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone A in condizioni di pseudo-primo ordine, a concentrazioni fisse di proteina di 200 nM per EcCysK, 270 nM per CdiA-CT, 400 nM per EcCysE. 3-5 cinetiche di legame sono state misurate in media per ogni concentrazione di proteina testata, ed i dati sono stati analizzati con una equazione mono-esponenziale:

$$I_t = I_0 + I \cdot e^{\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)} \quad (6)$$

dove I_t e I_0 sono i valori di fluorescenza rispettivamente a tempi fissi e al tempo zero, I è la variazione di fluorescenza totale, e τ è il tempo di rilassamento, tale che la costante osservata k_{obs} è uguale a $1/\tau$. Le dipendenze di k_{obs} dalla concentrazione delle proteine sono state analizzate con una equazione lineare:

$$k_{obs} = k_4 + \left(\frac{k_3}{K_d}\right) \cdot [P] \quad (7)$$

dove $K_d = \frac{k_2}{k_1}$, per tenere conto di un meccanismo di formazione del complesso che prevede due fasi, di cui una corrispondente ad un cambiamento conformazionale lento di CysK conseguente alla formazione del complesso (schema 1) [79], dove il plateau non può essere raggiunto nelle condizioni sperimentali testate [80]:



Schema 1

Il complesso CysK:CdiA-CT rappresenta il complesso d'incontro mentre CysK:CdiA-CT* rappresenta il complesso in cui almeno una delle proteine ha subito una variazione conformazionale.

Risultati

Espressione e purificazione delle proteine: La purezza della proteine espresse, EcCysK, StCysK, HiCysK e NiCysK, è stata valutata mediante SDS-PAGE ed è risultata essere superiore al 95% (Figura 6A). Tutti gli enzimi hanno mostrato il tipico spettro di assorbimento degli enzimi PLP-dipendenti di fold-type II [81, 82] con picchi a 278 e 412 nm e una attività specifica di 0.025 U/mg, 0.064 U/mg, 0.013 U/mg e 0.016 U/mg per EcCysK, StCysK, HiCysK e NiCysK rispettivamente, in accordo con dati precedentemente pubblicati [43]. La purezza di EcCysE è del 98% (Figura 6A) e la proteina ha mostrato una attività specifica di 290 U/mg, in accordo con i dati pubblicati [83, 84]. Per le proteine CdiA-CT e CdiI è stato necessario esprimerle come complesso e purificarle in condizioni denaturanti a causa della difficoltà ad esprimere CdiA-CT in ceppi cellulari deleti del gene *cysK* e per l'alta sensibilità al taglio della regione C-terminale di questa proteina quando è libera in soluzione. Per risolvere queste problematiche si sono co-espresse CdiA-CT e CdiI in ceppi cellulari in cui era presente *CysK*, ma essendo presente anche l'inibitore si è rimossa l'inibizione della crescita cellulare. Con questa tecnica si sono ottenute proteine con una purezza del 98% (Figura 6A). Gli spettri di dicroismo circolare nel lontano-UV per CdiI e CdiA-CT indicano che, dopo purificazione in condizioni denaturanti e successivo refolding, entrambe le proteine hanno raggiunto una struttura nativa (Figura 6B).

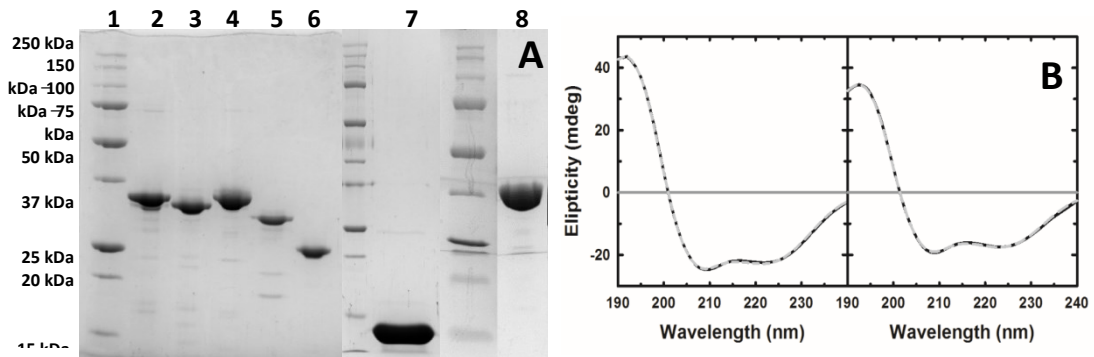


FIGURA 6: Purezza e struttura secondaria delle proteine purificate.

Pannello A. SDS-PAGE delle proteine utilizzate in questo progetto. 1: MWM; 2: EcCysK; 3: StCysK; 4: HiCysK; 5: EcCysE; 6: CdiA-CT; 7: MWM; 8: CdiI; 9: MWM; 10: NiCysK.

Pannello B. Struttura secondaria di CdiA-CT e CdiI. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di CdiA-CT (sinistra) e CdiI (destra), misurati su una soluzione contenente la proteina ad una concentrazione di 0.23 mg/ml in tampone sodio fosfato 20 mM, pH 7. Le linee grigie tratteggiate rappresentano gli spettri risultanti dalla deconvoluzione effettuata usando il software disponibile su Dichroweb analysis Webserver [85], che ha dato i seguenti risultati: per CdiA-CT 37% di α -elica, 32% di foglietti β e β -turns e 31% di random coil, per CdiI 45 % di α -elica, 27 % di foglietti β e β -turns e 27 % di random coil.

Un dimero di CysK lega due monomeri di CdiA-CT: E' noto da test microbiologici e da saggi pull-down che l'attivazione di CdiA-CT sia in colture batteriche che in vitro avviene tramite l'interazione tra CysK e CdiA-CT [55, 66]. CdiA-CT è in grado di causare un forte aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza del cofattore di CysK (Figura 7A), come precedentemente osservato per il legame di quest'ultima con CysE, peptidi e piccole molecole ad azione inibitoria [3, 47, 48, 54]. Questo risultato supporta indirettamente l'idea che l'interazione CdiA-CT:CysK coinvolga l'occupazione del sito attivo e/o la sua chiusura [55]. L'aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza è accompagnato da uno spostamento verso il blu del massimo di emissione da 505 nm a 498, che indica una diminuzione della polarità nel sito attivo di CysK. La stechiometria del complesso, la cui struttura tridimensionale non è stata ancora risolta, è stata determinata per mezzo di esperimenti eseguiti a concentrazione fissa di CysK e concentrazioni variabili

di CdiA-CT (Figura 7B). Il rapporto stechiometrico calcolato per il complesso è 1.1, cioè ogni dimero di CysK lega due molecole di tossina. Un esperimento di legame simile è stato effettuato nelle stesse condizioni sperimentali, utilizzando CysE come titolante (Figure 7C e 7D). Anche CysE causa un aumento nella emissione di fluorescenza di CysK e uno spostamento verso il blu del massimo di emissione paragonabile a quello di CdiA-CT [54, 86]. Il rapporto stechiometrico del complesso CysE/CysK è di 1.6, cioè un esamero di CysE lega due dimeri di CysK, come precedentemente osservato per il complesso da *Haemophilus influenzae* [54]. Per entrambe le proteine, CdiA-CT e CysE, l'intensità di emissione di fluorescenza di CysK aumenta di circa 5 volte, indicando che i due complessi hanno proprietà fluorimetriche sovrapponibili, cioè che il legame di CdiA-CT e CysE produce effetti simili sul microambiente del cofattore PLP di CysK.

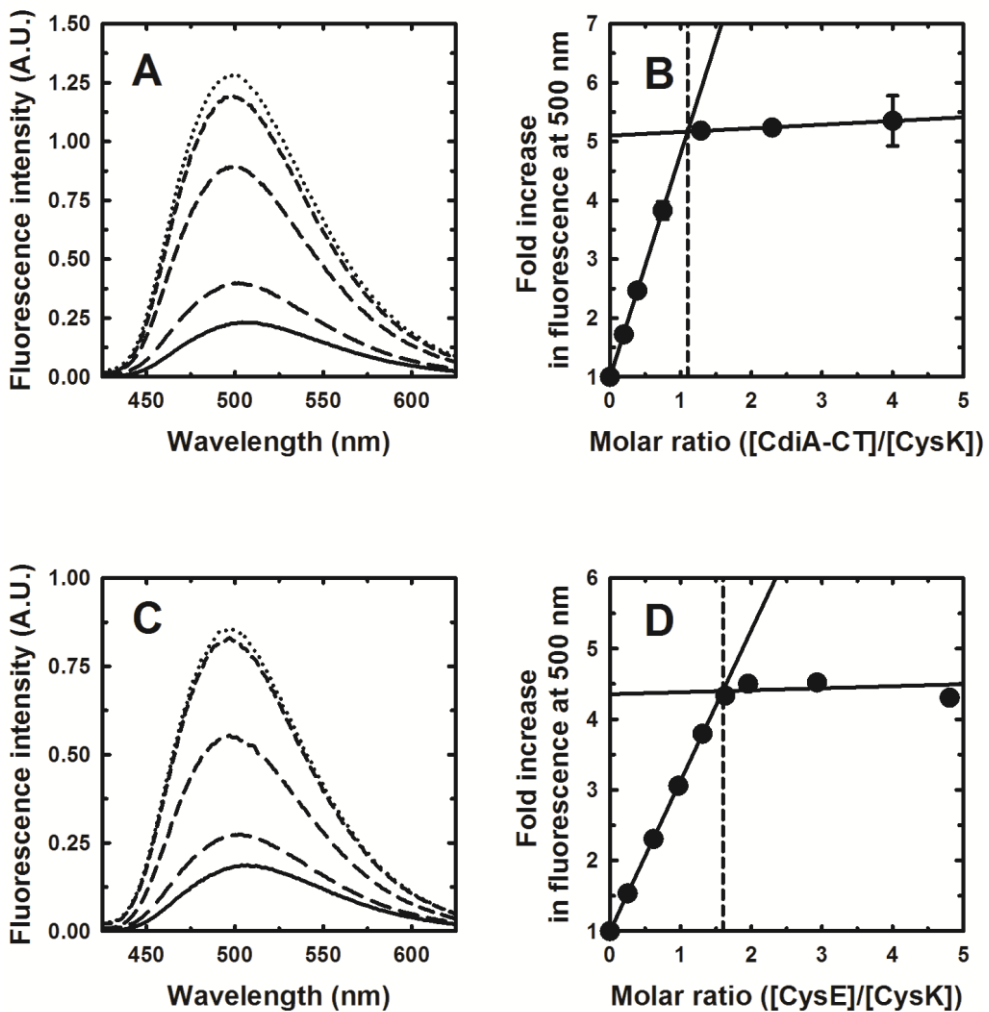


FIGURA 7: Stechiometria di legame dei complessi tra CdiA-CT o CysE e CysK.

Pannello A. Spettri di emissione di fluorescenza per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente CysK 1.15 μM in tampone A in assenza (linea continua) e in presenza di concentrazioni crescenti di CdiA-CT (225 nM, linea a tratteggio lungo; 860 nM, linea a tratteggio medio; 1.5 μM, linea a tratteggio corto; 4.6 μM, linea punteggiata).

Pannello B. Aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza di CysK a 500 nm per eccitazione a 412 nm in funzione del rapporto stechiometrico CdiA-CT/CysK. L'intersezione tra le linee definisce un rapporto stechiometrico di 1.1 (linea tratteggiata).

Pannello C. Spettri di emissione di fluorescenza per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente CysK 0.9 μ M in tampone A in assenza (linea continua) e in presenza di concentrazioni crescenti di CysE (226 nM, linea a tratteggio lungo; 873 nM, linea a tratteggio medio; 1.75 μ M, linea a tratteggio corto; 6.85 μ M, linea punteggiata).

Pannello D. Aumento dell'intensità di emissione di fluorescenza di CysK a 500 nm per eccitazione a 412 nm in funzione del rapporto stechiometrico CysE/CysK. L'intersezione tra le linee definisce un rapporto stechiometrico di 1.6 (linea tratteggiata).

CdiA-CT ha un'alta affinità per CysK: E' stato ipotizzato che il complesso tossina:CysK abbia un'affinità paragonabile a quella del complesso CysE:CysK, cioè nell'intervallo del basso nM. La titolazione di CysK con la tossina in condizioni di equilibrio comporta le stesse modifiche spettroscopiche osservate nella titolazione stechiometrica, con un forte aumento dell'intensità di emissione ed un piccolo spostamento verso il blu del massimo di emissione (dati non mostrati). L'emissione di fluorescenza in presenza di tossina varia nel tempo, raggiungendo un valore stabile dopo circa 20' alle concentrazioni più basse di tossina valutate (Figura 8A). Analizzando i dati all'equilibrio (dopo 20' di incubazione) con l'equazione per il tight-binding (Eq. 2), si ottiene una K_d di circa 16 ± 9 nM; questo ampio errore è dovuto all'alta affinità delle due molecole, che impedisce di raccogliere dati sperimentali accurati a concentrazioni di ligando inferiori della K_d . Lo stesso esperimento di titolazione è stato condotto per il complesso cisteina sintasi e si è ottenuto un valore di costante di dissociazione molto simile, 17 nM, ancora con un elevato errore associato al fitting.

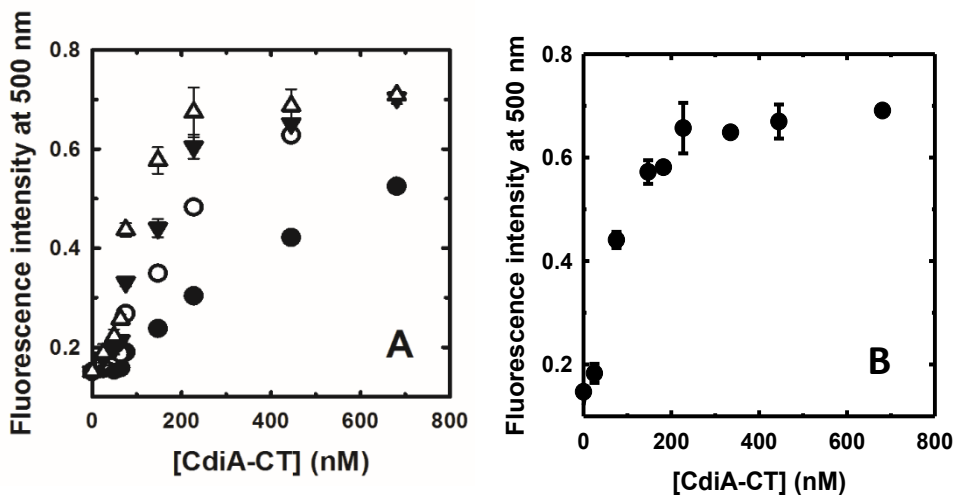


FIGURA 8: Legame di CdiA-CT a CysK.

Pannello A. Dipendenza dalla concentrazione di tossina dell'intensità di emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente CysK 80 nM in tampone A dopo 30'' (cerchi pieni), 2' (cerchi vuoti), 5' (triangoli pieni) e 20' (triangoli vuoti) dall'aggiunta di CdiA-CT.

Pannello B. Dipendenza dalla concentrazione di tossina dell'intensità di emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente CysK 80 nM in tampone A dopo 20' dall'aggiunta di CdiA-CT. La linea continua rappresenta il fitting con un'equazione quadratica in condizioni di tight binding con una $K_d = 17 \pm 9$ nM.

Nonostante l'elevato errore associato al fitting, le costanti di dissociazione sono in accordo con le affinità di CysE e CdiA-CT per CysK calcolate attraverso un saggio di inibizione dell'attività (Figura 9), con una K_i di 6.2 nM e 11.0 nM, rispettivamente.

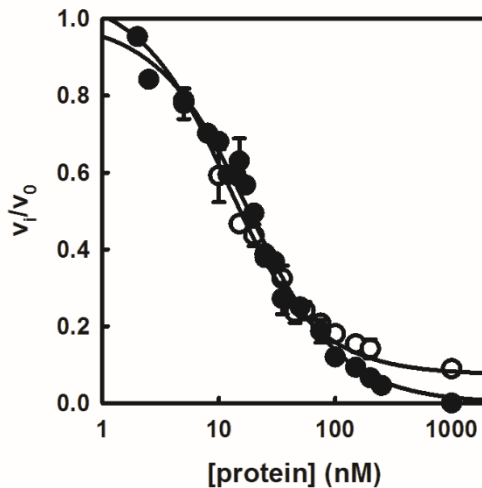


FIGURA 9: Inibizione dell'attività di CysK da parte di CdiA-CT e CysE.

L'effetto di CdiA-CT (cerchi pieni) e CysE (cerchi vuoti) sull'attività sulfidrilasica di CysK è stato misurato in presenza di OAS 2 mM e Na_2S 0.6 mM in tampone A a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), variando la concentrazione di CdiA-CT e CysE e mantenendo fissa la concentrazione di CysK a 6 nM. Il fitting della dipendenza di v_i/v_0 dalla concentrazione di proteina con l'equazione di Morrison (Eq. 4) fornisce una IC_{50} apparente, da cui attraverso l'equazione 5 si può ricavare una K_i di 6.2 ± 0.7 nM e 11.0 ± 0.4 nM rispettivamente per CysE e CdiA-CT.

Come osservato per la titolazione diretta della tossina su CysK, anche nei saggi di inibizione l'equilibrio è raggiunto lentamente (Benoni et al., dati non pubblicati). È interessante notare come il legame di CysE a CysK sia più rapido di quello di CdiA-CT: ad una concentrazione vicina alla costante di dissociazione, la reazione con CysE richiede meno di 5 minuti per raggiungere l'equilibrio, contrariamente a CdiA-CT che richiede circa 20 minuti. Questa differente cinetica ha portato ad analizzare la formazione del complesso in condizioni di stato pre-stazionario, come è stato fatto in precedenza per il complesso cisteina sintasi di *Haemophilus influenzae* [79, 86]. Gli esperimenti cinetici allo stato pre-stazionario permettono di calcolare le costanti microscopiche di velocità della formazione del complesso. Gli esperimenti sono stati eseguiti con lo stesso tampone e nelle stesse condizioni di temperatura utilizzati per i saggi all'equilibrio. Negli esperimenti allo stato pre-stazionario viene variata la concentrazione di uno tra CysK e CdiA-CT, mentre è mantenuta costante la concentrazione dell'altro ligando per essere in condizioni di pseudo-primo ordine (Figura 10A).

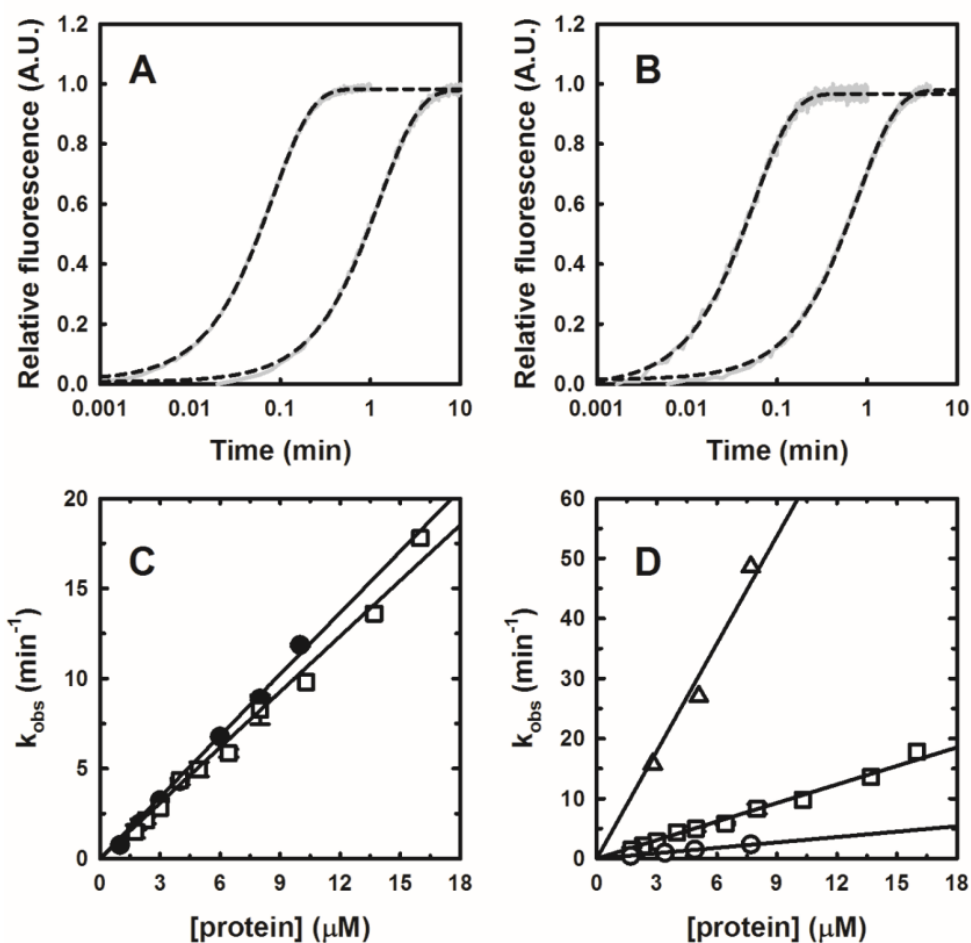


FIGURA 10: Studio della formazione del complesso CysK:CdiA-CT allo stato pre-stazionario.

Pannelli A e B. Monitoraggio nel tempo dell'interazione di CdiA-CT con CysK attraverso l'aumento dell'intensità di fluorescenza emessa a 500 nm per eccitazione a 412 nm. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone A a concentrazioni fisse di CysK (200 nM, pannello A) e di CdiA-CT (270 nM, pannello B). Le tracce nel pannello A sono state raccolte a concentrazioni di CdiA-CT di 1 e 10 μM , le tracce nel pannello B sono state raccolte a concentrazioni di CysK di 1.7 and 16 μM . La linea tratteggiata rappresenta il fitting con l'equazione 6.

Pannello C. Dipendenza della k_{obs} dalla concentrazione di CysK (quadrati vuoti) e CdiA-CT (cerchi pieni). Gli esperimenti sono stati condotti in tampone A a 20 $^{\circ}\text{C}$, variando la concentrazione di CysK e mantenendo fissa quella di CdiA-CT a 270 nM oppure variando la concentrazione di CdiA-CT e mantenendo costante quella di CysK a 200 nM. Le linee continue rappresentano il fitting con un'equazione lineare (Eq. 7) con un coefficiente angolare di $0.019 \pm 0.007 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0.017 \pm 0.007 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pannello D. Dipendenza della k_{obs} dalla concentrazione di CdiA-CT, a concentrazione costante di CysK, a tre diverse temperature. Le condizioni sperimentali sono le stesse riportate nel pannello A, con l'eccezione della temperatura che è stata settata a 37 °C (triangoli vuoti), 20 °C (quadrati vuoti, come i dati nel pannello A) e 5 °C (cerchi vuoti). Le linee rappresentano i fitting con un'equazione lineare con una pendenza di $0.099 \pm 0.019 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (a 37 °C) e $0.005 \pm 0.0003 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (a 5 °C).

In entrambi i casi le dipendenze della k_{obs} dalla concentrazione di proteina ligando sono lineari, con un coefficiente angolare di circa $0.02 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Rispetto alle cinetiche allo stato pre-stazionario osservate per il complesso CysE:CysK di *H. influenzae* [79] o *E. coli* (Figura 11), la formazione del complesso tossina:CysK è molto più lenta. Il coefficiente angolare per la dipendenza di k_{obs} dalla concentrazione delle proteine per la formazione del CSC di *E. coli* è di circa $4 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, quindi 200 volte superiore a quello calcolato per la formazione del complesso CysK:tossina. Le dipendenze di k_{obs} dalla concentrazione delle proteine sono lineari in tutte le condizioni testate e quindi non è possibile valutare se la formazione del complesso tossina:CysK sia un processo multifasico, con un cambiamento conformazionale che ne limita la velocità, come è stato dimostrato per la formazione del CSC [79]. Tuttavia, la formazione di un complesso con una cinetica rapida di incontro seguita da un riarrangiamento lento (Schema 1) rappresenta il modello più probabile, come suggerito dal lento aumento della fluorescenza del complesso nelle titolazioni all'equilibrio (Figura 8A). Quindi il coefficiente angolare della retta che descrive la dipendenza di k_{obs} dalla concentrazione delle proteine corrisponde al rapporto k_3/K_d (Eq. 7), che per il complesso CdiA-CT:CysK da *E. coli* è di $2\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, e per la cisteina sintasi di $4\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 11).

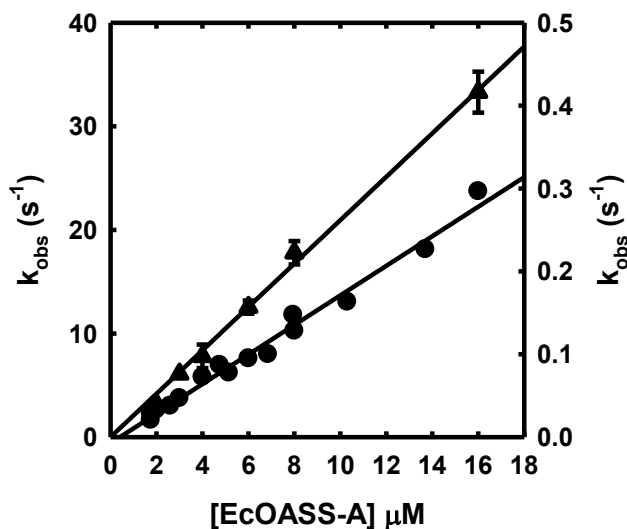


FIGURA 11: Confronto delle cinetiche di formazione del complesso cisteina sintasi e del complesso CdiA-CT:EcCysK allo stato pre-stazionario.

Dipendenza della k_{obs} dalla concentrazione di CysK per la formazione del complesso EcCysK:EcCysE (triangoli, asse di sinistra) e del complesso EcCysK:CdiA-CT (cerchi, asse di destra). Gli esperimenti sono stati condotti in tampone A a 20 °C, variando la concentrazione di CysK e mantenendo fissa quella di CdiA-CT (270 nM) o EcCysE (400 nM). Le linee rappresentano il fitting con un'equazione lineare (Eq. 7) con un coefficiente angolare di $4.1 \pm 0.1 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ per il complesso cisteina sintasi e di $0.02 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ per il complesso tossina:CysK.

L'attività di CysE viene influenzata dal legame con CysK: È noto come CysE, legandosi al sito attivo di CysK, ne inibisce l'attività sulfidrilasica, ma non è altrettanto scontato come CysK vada a sua volta ad influenzare l'attività di CysE nel complesso cisteina sintasi. L'effetto di CysK sull'attività enzimatica di CysE è stato studiato mantenendo costante la concentrazione di L-serina a 20 mM e variando la concentrazione di acetilCoA tra 0.08 e 5 mM circa (Figura 12). Il fitting con l'equazione di Michaelis-Menten (Eq. 3) della dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione di acetilCoA ha permesso di calcolare la K_M che risulta essere di 2.2 mM in assenza di CysK e di 0.43 mM in presenza di una concentrazione fissa di CysK dieci volte in eccesso rispetto a CysE. In entrambe le condizioni non sembra variare la V_{max} dell'enzima che è circa di 60

$\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Quindi la presenza di CysK influenza l'attività di CysE aumentando la sua efficienza catalitica, principalmente attraverso una diminuzione della K_M dell'acetilCoA.

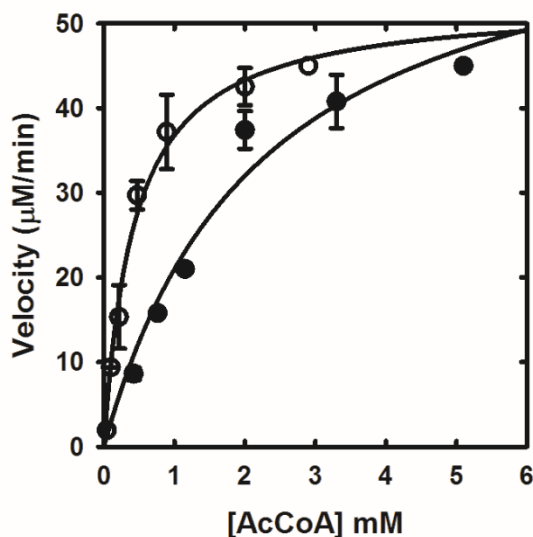


FIGURA 12: Influenza di EcCysK sull'attività di EcCysE.

Dipendenza della velocità di reazione di EcCysE dalla concentrazione di AcCoA in assenza (cerchi pieni) e in presenza (cerchi vuoti) di una concentrazione fissa e saturante di EcCysK. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone A in assenza di 2-mercaptoetanololo a 20 °C, variando la concentrazione di AcCoA e mantenendo fissa quella di L-serina a 20 mM. La concentrazione di EcCysE è mantenuta costante in entrambe le condizioni a 6.8 nM e quella di EcCysK è di 45 nM. Le linee rappresentano il fitting all'equazione di Michaelis-Menten e forniscono una K_M di 2.2 ± 0.7 mM e una V_{\max} di $67 \pm 9 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ in assenza di CysK e una K_M di 0.43 ± 0.07 mM e una V_{\max} di $53 \pm 2 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ in presenza di CysK.

L'inibizione dell'attività di CysK da parte di CdiA-CT non è influenzata dalla presenza di CdiI: Oltre all'attivazione dell'attività tRNA_{sica} di CdiA-CT, alla formazione del complesso tra tossina e CysK consegue verosimilmente l'inibizione competitiva della seconda, vista la peculiare modalità di interazione che vede, come per CysE, l'inserzione della porzione C-terminale della sequenza nel sito attivo di CysK. Per verificare tale inibizione, l'effetto di CdiA-CT sull'attività di CysK è stato misurato usando come substrati OAS e HS⁻ e variando la concentrazione della tossina tra 2 e 1000 nM (Figura 13).

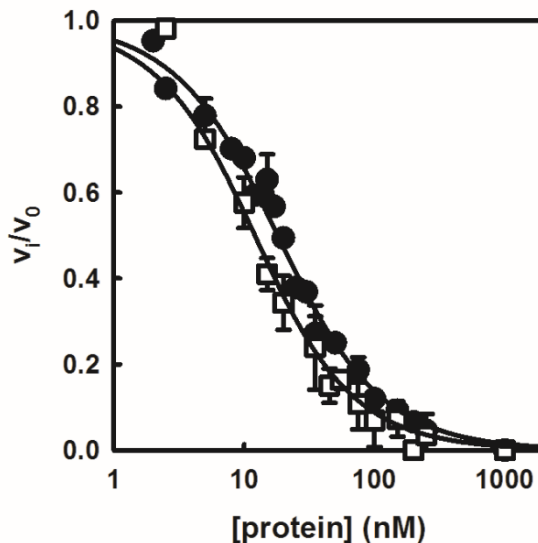


FIGURA 13: Inibizione dell'attività di CysK da parte di CdiA-CT, in assenza ed in presenza di CdiI.

L'effetto di CdiA-CT sull'attività sulfidrilasica di CysK è stato testato in assenza (cerchi pieni) e in presenza (quadrati vuoti) di CdiI. Gli esperimenti sono stati svolti in presenza di OAS 2 mM e Na_2S 0.6 mM in tampone A a temperatura ambiente (22 ± 2 °C), variando la concentrazione di CdiA-CT e mantenendo fissa quella di CysK a 6 nM e quella di CdiI a 2.4 μM . Il fitting della dipendenza di v_i/v_0 dalla concentrazione di CdiA-CT con l'equazione di Morrison (Eq. 4) fornisce una IC_{50} apparente da cui per mezzo dell'equazione 5 si può ottenere per la K_i un valore di 11.0 ± 0.4 nM e 6.4 ± 0.5 nM rispettivamente in assenza e in presenza di CdiI.

Nelle condizioni utilizzate per questi test la K_M per l'OAS è 5.1 ± 0.4 mM, la k_{cat} è $483 \pm 10/\text{s}$ (dati non riportati). Il fitting della dipendenza di v_i/v_0 dalla concentrazione di tossina utilizzando l'equazione di Morrison (Eq. 4) ha permesso di calcolare una IC_{50} apparente di 15 ± 1 nM che, tenendo conto della concentrazione di substrato utilizzato e della sua K_M per l'enzima, permette di ottenere, applicando l'Eq. 5, una K_i di 11 nM. Il valore di K_i è in accordo con la K_d calcolata per via fluorimetrica (Figura 8). È interessante notare che il valore della K_i non varia significativamente (6.4 nM) se misurato in presenza di un eccesso molare di 10 volte di CdiI rispetto alla tossina. Questo indica che CdiA-CT inibisce l'attività

di CysK anche all'interno di cellule batteriche isogeniche, sostenendo in tal modo l'idea che la tossina potrebbe essere utilizzata come fattore di comunicazione tra i batteri.

Specificità di legame di CdiA-CT e sua attivazione in diverse specie: Nella Figura 14 vengono confrontate le sequenze di CysK e CysE da *E. coli*, *S. Typhimurium*, *H. influenzae* e *N. lactamica*.

Si pensa che in tutte le specie CysE sia in grado di formare un complesso cisteina sintasi con la corrispondente CysK. Infatti in tutti i casi CysE reca un residuo Ile al C-terminale che è fondamentale per l'ancoraggio al sito attivo di CysK [29, 53]. Tuttavia, mentre le sequenze C-terminali di StCysE ed EcCysE sono identiche, quelle di NiCysE e HiCysE sono molto diverse. Di conseguenza, a seconda delle specie considerate ci si aspetta una diversa affinità di legame tra CysK e CysE della stessa specie o di specie diverse, e tra CysK e la tossina CdiA-CT di *E. coli*. Nel corso del progetto abbiamo studiato l'interazione tra la tossina CdiA-CT e CysK da differenti specie batteriche.

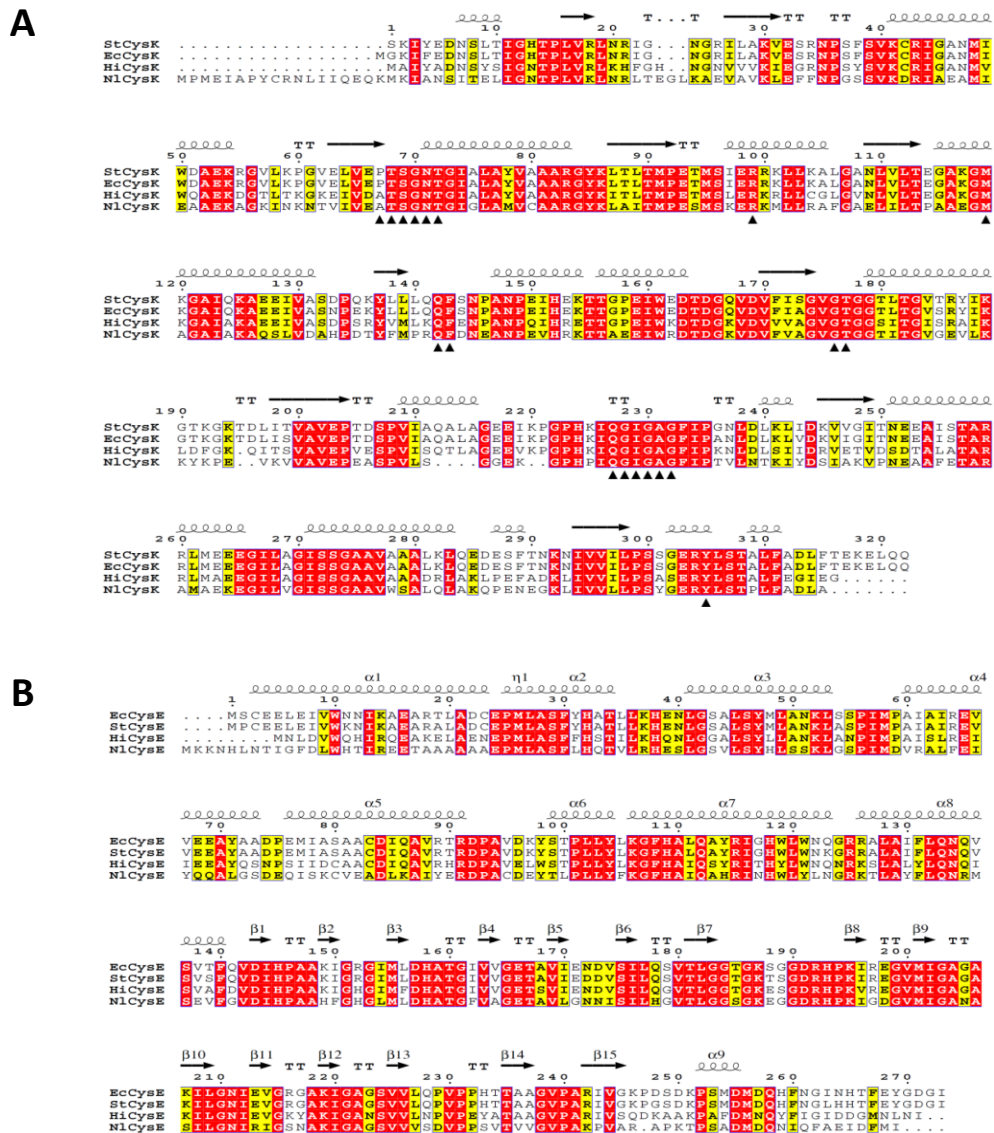


FIGURA 14: Allineamento delle sequenze di CysK e CysE da specie batteriche diverse.

Le sequenze sono state allineate usando ClustalW con matrice Blosum mantenendo i parametri di default (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Gli score di similarità sono stati calcolati con il programma ESPript [87] usando la matrice Blosum62 e settando uno score globale di 0.2. I residui del primo guscio del sito attivo di CysK sono evidenziati da triangoli neri sotto l'allineamento (pannello A). Gli elementi strutturali posti sopra gli allineamenti derivano dalle strutture tridimensionali di StCysK (PDB code: 1 OAS, pannello A) e EcCysE (PDB code: 1T3D, pannello B).

L'affinità di CdiA-CT per StCysK è paragonabile a quella per EcCysK (dati non mostrati). Al contrario, la tossina ha un'affinità molto più bassa per HiCysK, con una costante di dissociazione di circa 3 μ M (Figura 15A) e NiCysK, con una costante di dissociazione di circa 6 μ M (Figura 15B).

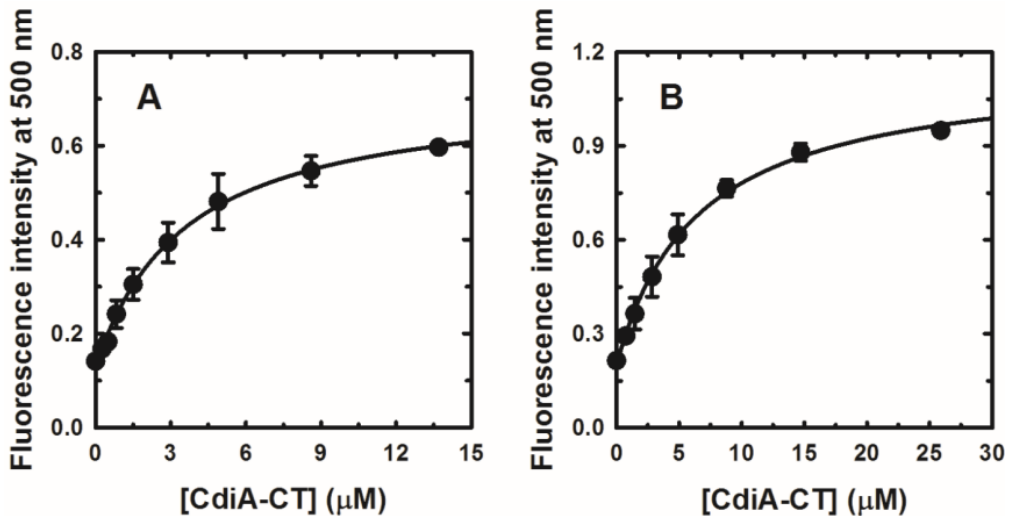


FIGURA 15: Legame della tossina CdiA-CT con CysK da specie batteriche diverse.

Pannello A. Dipendenza dalla concentrazione di tossina dell'intensità dell'emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente HiCysK 300 nM in tampone A a 20 ± 0.5 °C. La linea tra i punti sperimentali rappresenta il fitting con l'equazione 1 e fornisce una $K_d = 3.3 \pm 0.3 \mu$ M.

Pannello B. Dipendenza dalla concentrazione di tossina dell'intensità dell'emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente NiCysK 860 nM in tampone A a 20 ± 0.5 °C. La linea tra i punti sperimentali rappresenta il fitting con l'equazione 1 e fornisce una $K_d = 6.4 \pm 0.6 \mu$ M.

Saggi pull-down condotti per verificare l'interazione tra CdiA-CT e CysK da specie batteriche diverse hanno confermato i dati precedenti, mostrando come CdiA-CT non sia capace di formare un complesso stabile con NiCysK e HiCysK (Figura 16).

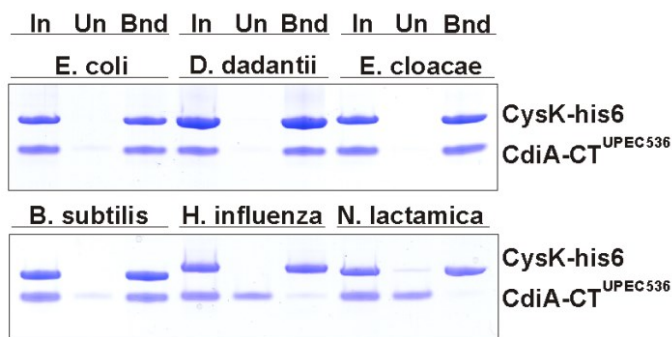


FIGURA 16: Saggi pull-down tra differenti CysK e CdiA-CT.

Una soluzione di CdiA-CT è stata aggiunta a soluzioni di differenti CysK-His₆ in rapporti equimolari e caricata su colonne al Ni²⁺. Le frazioni non legate (Un) e legate (Bnd) alla colonna sono state raccolte e analizzate tramite SDS-PAGE. Si nota come HiCysK e NiCysK non formino un complesso stabile (per gentile concessione di Christina M. Beck del Dipartimento di Biologia molecolare, cellulare e di sviluppo dell'Università della California, Santa Barbara, CA, USA)

Da un punto di vista strutturale tale risultato può essere spiegato con le diverse sequenze C-terminali delle CysE, che riflettono una diversa selettività del sito attivo di CysK a dispetto dell'identità dei residui appartenenti al primo guscio del sito attivo (Figura 14A). Questa osservazione è confermata dalla constatazione che il pentapeptide wt della regione C-terminale di EcCysE (YGDGI) ha una costante di dissociazione di 2.1 μM per EcCysK (Figura 17A) e 680 μM per HiCysK [47], ed una variante di questo pentapeptide ad alta affinità di legame (YGYDI) ha una costante di dissociazione di 570 nM per EcCysK (Figura 17B) e 42 μM per HiCysK [47].

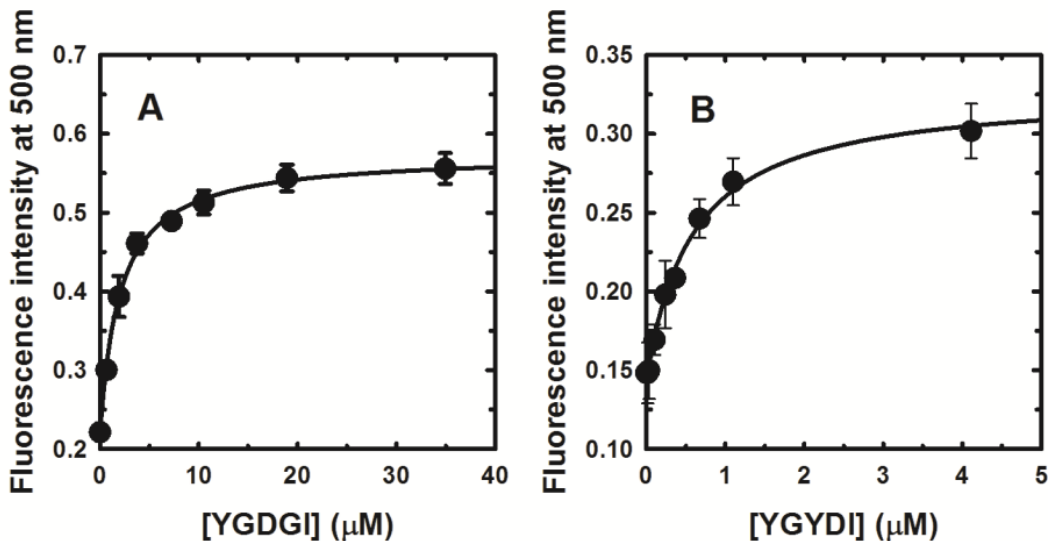


FIGURA 17: Legame dei peptidi YGDGI e YGYDI a EcCysK.

Pannello A: Dipendenza dalla concentrazione del peptide YGDGI (wt EcCysE-CT) dell'intensità dell'emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente EcCysK 100 nM in tampone A a 20 ± 0.5 °C. La linea tra i punti sperimentali rappresenta il fitting con l'equazione 1 e fornisce una $K_d = 2.1 \pm 0.2$ μM.

Pannello B: Dipendenza dalla concentrazione del peptide YGYDI dell'intensità dell'emissione di fluorescenza a 500 nm per eccitazione a 412 nm di una soluzione contenente EcCysK 100 nM in tampone A a 20 ± 0.5 °C. La linea tra i punti sperimentali rappresenta il fitting con l'equazione 1 e fornisce una $K_d = 0.57 \pm 0.07$ μM.

Discussione

In questa parte del progetto di dottorato è stata caratterizzata l'interazione tra CysK, l'enzima che catalizza l'ultimo passaggio della biosintesi della cisteina in piante e batteri [5], e due partner proteici fisiologici: CysE e CdiA-CT. Il primo è l'enzima che precede CysK nella via biosintetica della cisteina, e forma con CysK il complesso cisteina sintasi, in cui l'attività sulfidrilasica è inibita [74]. CdiA-CT è invece una tossina espressa da ceppi uropatogenici di *E. coli* e coinvolta nell'inibizione della crescita da contatto, che richiede l'interazione con CysK per l'attivazione della sua attività tRNAsica [55]. Nonostante le funzioni dei due partner siano apparentemente non correlate tra loro, motivando la definizione di attività "moonlighting" di CysK, in realtà le modalità di legame nella formazione dei complessi CysE:CysK e CdiA-CT:CysK sono analoghe, il che porta a supporre che gli effetti dell'interazione con CysE e CdiA-CT convergano a livello di regolazione del metabolismo della cisteina. Abbiamo determinato le affinità di legame e studiato le cinetiche di formazione dei due diversi complessi, e i risultati suggeriscono che in entrambi i casi la formazione veloce di un complesso d'incontro è seguita da un riarrangiamento conformazionale che porta alla formazione di un complesso ad alta affinità. Inoltre, CdiA-CT può competere con CysE per il legame a CysK, essendo le affinità molto simili, ma non è detto che possa spiazzarla, anche in considerazione della minore efficienza/velocità di formazione del complesso. Risultano quindi critiche le concentrazioni relative delle diverse proteine e gli aspetti cinetici della formazione dei complessi interproteici. Ciò mette in evidenza il fatto che la tossina può assumere un ruolo fisiologicamente significativo soprattutto in condizioni dove CysK viene sovraespressa rispetto a CysE, e può quindi legare entrambe le proteine. A questo riguardo è interessante notare come dai dati presenti in letteratura risulti che in estratti di *S. Typhimurium* è presente un largo eccesso di CysK rispetto a CysE [9, 88]. Ciò suggerisce che la frazione di CysK libera, piuttosto che quella coinvolta nella formazione del complesso cisteina sintasi, sarebbe responsabile dell'attivazione della tossina. Tuttavia, recenti dati di trascrittomica suggeriscono che durante la fase di crescita

esponenziale il numero di trascritti di *cysE* e *cysK* sia paragonabile e solo in condizioni di stress (ad esempio stress ossidativo) si abbia un forte aumento della trascrizione di *cysK*, che porta ad uno squilibrio nel rapporto dei trascritti di *cysK* e *cysE* [89]. Quindi, solo in condizioni di stress si avrebbe un'ampia frazione di CysK libera, disponibile per l'attivazione della tossina e quindi dell'inibizione della crescita da contatto.

Oltre all'attivazione dell'inibizione della crescita da contatto, l'eventuale competizione tra CysE e CdiA-CT potrebbe avere un effetto fisiologico ad un altro livello, quello della regolazione della biosintesi della cisteina. Mentre è già noto come l'attività enzimatica di CysK sia inibita nel complesso cisteina sintasi, non era stato ad oggi ben determinato se vi è una variazione dell'attività di CysE in questo complesso. Dai dati ottenuti durante questo lavoro si è notato come l'efficienza catalitica di CysE aumenti di circa 4 volte in seguito al legame con CysK, indicando che questa interazione porta ad una doppia regolazione sulla biosintesi della cisteina. Quanto all'effetto dell'interazione tra CdiA-CT e CysK, abbiamo osservato che la tossina inibisce efficacemente l'attività enzimatica di CysK, anche in seguito alla formazione di un complesso ternario con l'inibitore (CdiI), che reprime invece l'attività tRNAsica della tossina. Quindi nelle cellule isogeniche, che sono resistenti a CdiA-CT grazie all'azione di CdiI, la prima può legare ugualmente CysK, eventualmente in complesso anche con CdiI, e alterare il metabolismo della cisteina a due diversi livelli: quello diretto, occupando il sito attivo di CysK e inibendone l'attività catalitica, ed in modo indiretto competendo con CysE per il legame a CysK ed impedendone l'attivazione che si osserva nel complesso cisteina sintasi. Ciò porta ad una riduzione nella sintesi di OAS, che oltre ad essere il precursore della cisteina svolge anche un ruolo di attivatore genico nella sua via biosintetica. Non è quindi casuale che sia proprio CysK, un enzima altamente conservato nei batteri, il partner responsabile dell'attivazione di questa tossina, che può avere un ruolo nella comunicazione batterica[90].

INIBITORI DI O-ACETILSERINA SULFIDRILASI

Inibitori della via biosintetica dello zolfo nei batteri patogeni come nuovi farmaci ad azione antibiotica

La cisteina è l'aminoacido precursore di tutte le biomolecole contenenti zolfo che sono vitali per la maggior parte degli organismi [91]. Nei mammiferi sono assenti i meccanismi biosintetici che portano alla sintesi *de novo* della cisteina dallo zolfo inorganico, mentre i batteri, le piante, i nematodi e altri parassiti hanno enzimi altamente conservati che permettono la biosintesi della cisteina. Gli ultimi due passaggi della biosintesi della cisteina (Figura 18) sono catalizzati dagli enzimi serina acetiltransferasi (CysE) ed *O*-acetilserina sulfidrilasi (OASS) [5].

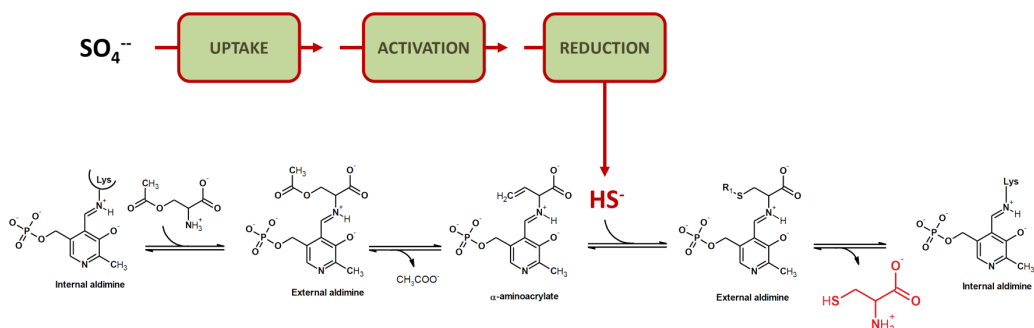


FIGURA 18: Biosintesi della cisteina nei batteri.

In alto: lo zolfo inorganico entra nelle cellule come solfato; qui viene attivato e ridotto a bisolfuro. In basso: il bisolfuro viene utilizzato da CysK e CysM (due isoenzimi dell'OASS) per sintetizzare L-cisteina da *O*-acetilserina attraverso un meccanismo catalitico multi-step che coinvolge il coenzima PLP.

L'OASS è un enzima piridossal 5'-fosfato (PLP)-dipendente che catalizza l'ultimo step della biosintesi della cisteina ed è stato identificato nei batteri, protozoi, micobatteri e piante [11-13, 92-94]. Diverse isoforme di OASS sono state identificate e sono espresse diversamente a seconda delle condizioni di crescita [13, 43, 95-97]. La maggior parte dei proteobatteri, tra cui *Salmonella enterica* del sierotipo *Typhimurium* ed *Haemophilus influenzae*, esprimono due isoforme di OASS: CysK e CysM. Le strutture tridimensionali di queste due isoforme [13, 29, 44, 46, 98, 99] mostrano una struttura dimerica e ciascuna subunità è organizzata in due domini; i siti attivi, ognuno contenente una molecola di PLP, sono rivolti verso il solvente. CysK e CysM mostrano il 43% di identità di sequenza e il 56% di similarità [48]; per i residui del sito attivo l'identità di sequenza è del 70% [48, 73]. Il folding è molto simile, appartenente alla famiglia degli enzimi PLP-dipendenti di tipo II [81, 82].

Entrambi gli isoenzimi possono sintetizzare cisteina da *O*-acetilserina e bisolfuro ma CysM, grazie ad un sito attivo più ampio, può anche utilizzare il tiosolfato come nucleofilo [7, 100, 101]. Entrambi gli enzimi hanno un meccanismo di reazione a Ping-Pong. La prima semi-reazione consiste nella β -eliminazione della L-serina β -sostituita e porta alla formazione dell'intermedio α -aminoacrilato (Figura 18). Nella seconda semi-reazione, l' α -aminoacrilato viene attaccato dal solfuro, o dal tiosolfato, con la formazione di cisteina [43]. In condizioni di crescita basale CysK è sovraespressa rispetto a CysM, la cui espressione pare essere maggiore in condizioni di anaerobiosi [7, 101]. Tuttavia, è ancora poco conosciuta l'espressione differenziale delle due isoforme durante i processi fisiologicamente rilevanti e durante la sopravvivenza nell'ospite nelle infezioni a lungo termine [89].

Fin dalla sua scoperta, è noto che CysK sia coinvolta nella biosintesi della cisteina, ma di recente sono state identificate un numero crescente di attività "moonlighting" [23]. Infatti, le sue attività spaziano dalla regolazione della trascrizione di alcuni geni in batteri e nematodi [102, 103] all'attivazione di una tossina in *E. coli* [55]; ha anche un ruolo nella motilità in *Proteus mirabilis* [104] e *S. Typhimurium* [105], nella resistenza agli antibiotici [16, 17], ed è coinvolta nella formazione del biofilm batterico [39]. Considerando le

molteplici funzioni di questo enzima, la scoperta di molecole che interagiscono con entrambe le isoforme di OASS e ne inibiscono l'attività sarebbe un valido strumento di indagine per capire come OASS può influenzare la fisiologia degli organismi unicellulari [18]. Inibitori di questi enzimi sarebbero anche utili come potenziali antibiotici innovativi che potrebbero interferire con la capacità dei batteri di svolgere funzioni essenziali per l'infezione e la sopravvivenza a lungo termine [18, 106].

Tra i vari aspetti funzionali di CysK non ancora ben caratterizzati vi è la formazione di un complesso con CysE, l'enzima che catalizza il passaggio precedente in questa via metabolica, cioè l'attivazione della L-serina in *O*-acetilserina [9]. Quando i due enzimi interagiscono all'interno della cellula batterica CysE si lega al sito attivo di CysK e ne inibisce l'attività. Il complesso che si forma è molto stabile, con una costante di dissociazione nel range del basso nanomolare [29, 52-54, 79]. In assenza della struttura tridimensionale del complesso CysK:CysE, Salsi et al. hanno analizzato a livello molecolare l'interazione del peptide C-terminale di CysE col sito attivo di CysK [74]. Questi studi hanno dimostrato che solo gli ultimi cinque aminoacidi della porzione C-terminale di HiCysE (MNLNI) sono principalmente responsabili dell'interazione con CysK e, in particolare, l'isoleucina C-terminale è essenziale per questa interazione [14, 29, 74]. Infatti, anche se la struttura primaria della porzione C-terminale di CysE nei batteri è specie-specifica, presenta sempre una isoleucina terminale [54]. Queste osservazioni hanno portato a progettare potenziali inibitori peptidici per CysK e CysM [74]. Purtroppo, solo un numero limitato di inibitori specifici per entrambe le isoforme, a relativamente bassa affinità, sono stati identificati finora [13, 18, 19, 47, 48, 74, 107-113]. Per un numero ancora inferiore sono state determinate le strutture tridimensionali in complesso con l'enzima [29, 74, 111], e di questi nessuno in complesso con l'isoforma CysM, un target apparentemente più difficile, per il quale ligandi ad alta affinità non sono ancora stati identificati [47, 48].

Con l'obiettivo di contribuire allo sviluppo di inibitori peptidici per CysK e CysM, in questa parte del progetto di Dottorato di Ricerca abbiamo utilizzato la tecnica di Saturation Transfer Difference (STD) NMR per caratterizzare l'interazione di StCysK o StCysM con

MNYDI, un pentapeptide ad alta affinità per CysK, ottenuto da una analisi computazionale e sperimentale da una libreria di pentapeptidi [74]. La tecnica STD-NMR misura il trasferimento di saturazione magnetica da una proteina al suo ligando, e permette di determinare la vicinanza spaziale tra i gruppi funzionali di un ligando e la matrice proteica all'interno di un sito di legame [114]. Il complesso tra MNYDI e HiCysK, per cui la struttura tridimensionale è già stata risolta [74], è stato analizzato e utilizzato per l'ottimizzazione del metodo. I dati sperimentali sono in eccellente accordo con quelli strutturali e confermano le modalità di legame ottenute precedentemente con studi computazionali di docking [48, 74]. Con i dati ottenuti dagli studi sui peptidi si sono potuti sintetizzare piccoli ligandi ad azione inibitoria al fine di eludere i difetti di ligandi peptidici come la bassa stabilità e la bassa biodisponibilità [115]. Queste nuove molecole di sintesi contengono un gruppo carbossilico e una porzione alchilica, che imita la catena laterale dell'isoleucina e viene posta ad una distanza appropriata dal gruppo acido, posti in configurazione trans tramite un anello ciclopropanico. Grazie a vari esperimenti di legame e con l'utilizzo di tecniche computazionali di docking e STD-NMR i ligandi sono stati progressivamente ottimizzati. E' stata anche determinata la stereoselettività di legame degli enzimi verso questi inibitori. Il composto più affine che si è ottenuto finora presenta un'affinità per entrambe le isoforme dell'OASS nel basso nanomolare. Alcuni di questi composti sono stati anche testati su colture di cellule batteriche, ma dai risultati preliminari ottenuti finora non sembrano efficaci nell'inibirne la crescita.

Materiali e metodi

Reattivi e tamponi: I reattivi, acquistati da Sigma-Aldrich, sono stati utilizzati come ricevuti. Gli esperimenti, se non diversamente indicato, sono stati effettuati in tampone B contenente Hepes 100 mM, DMSO 1%, pH 7.0.

Espressione e purificazione di proteine: CysK e CysM da *Salmonella enterica* sierotipo *Typhimurium* (StCysK, StCysM, [47, 54, 71, 79]) e CysK da *Haemophilus influenzae* (HiCysK, [29]) sono state espresse in plasmidi ricombinanti transfettati in *E. coli* BL21(DE3) e purificate mediante cromatografia di affinità con ioni metallici (IMAC) utilizzando ioni Co^{2+} immobilizzati sulla resina (Talon™, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), seguendo il protocollo riportato da Tian et al. [71], con piccole modifiche. L'His-tag è stata rimossa da HiCysK utilizzando la trombina [29] e da StCysK e StCysM con una incubazione di 5 e 72 ore, rispettivamente, a 37 °C utilizzando Fattore Xa in un rapporto 1:200 con l'enzima in Hepes 20 mM, NaCl 100 mM e CaCl_2 4 mM, pH 7.5. La purezza delle proteine è stata valutata tramite SDS-PAGE ed è risultata superiore al 95%. La concentrazione delle proteine è stata determinata sfruttando il coefficiente di estinzione del PLP legato, calcolato con il metodo di denaturazione degli alcali [72]. I coefficienti di estinzione a 412 nm sono $7.600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per HiCysK, $9040 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per StCysK e $6800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ per StCysM. L'attività specifica di tutte le proteine sintetizzate è paragonabile a quella delle preparazioni precedenti [43].

Sintesi peptidica: Il peptide MNYDI è stato sintetizzato dalla Dott.ssa S. Pellegrino, Università degli Studi di Milano. Il peptide purificato è stato liofilizzato e conservato a 0 °C. L'identità del peptide è stata valutata mediante analisi MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa MALDI TOF/TOF ABSciex 4800 e NMR.

Spettri d'assorbimento: Gli spettri di assorbimento sono stati raccolti utilizzando uno spettrofotometro Varian CARY400, equipaggiato con una cella termostata a 20.0 ± 0.5 °C. Gli spettri sono stati corretti per il contributo del tampone.

Spettroscopia di fluorescenza: L'interazione dei ligandi con CysK e CysM è stata studiata tramite spettrofluorimetria, monitorando l'aumento di emissione di fluorescenza del PLP a 500 nm dopo eccitazione a 412 nm [54, 74]. Gli spettri di emissione sono stati raccolti utilizzando un fluorimetro FluoroMax-3 (HORIBA), dotato di una cella termostata a 20 ± 0.5 °C. Gli spettri sono stati corretti per il contributo del tampone. Le slit utilizzate sono state impostate per ottimizzare il rapporto segnale-rumore. Per gli esperimenti di legame la dipendenza dell'intensità di fluorescenza a 500 nm dalla concentrazione del ligando all'equilibrio è stata analizzata con una isoterma di legame:

$$I = \frac{I_{\max} \cdot [L]}{K_d + [L]} \quad (1)$$

o con un'equazione quadratica che descrive un'interazione forte (tight binding):

$$I = I_0 + \Delta I \cdot \frac{[P] + [L] + K_D - \sqrt{([P] + [L] + K_D)^2 - 4 \cdot [P] \cdot [L]}}{2} \quad (2)$$

dove I è l'intensità di fluorescenza a 500 nm in presenza del ligando, I_0 è l'intensità di fluorescenza a 500 nm in assenza del ligando, I_{\max} è la massima variazione di fluorescenza a concentrazioni saturanti di ligando, ΔI è la variazione totale di fluorescenza dovuta al ligando, $[L]$ è la concentrazione totale del ligando, $[P]$ è la concentrazione totale di proteina e K_d è la costante di dissociazione del complesso ligando:CysK.

Saggi di attività

Saggi di inibizione di CysK e CysM. Le cinetiche di reazione allo stato stazionario di CysK e CysM sono state misurate con un saggio discontinuo che sfrutta la quantificazione della cisteina con il metodo di Gaitonde [77] adattato allo sviluppo in piastra da 96 pozzetti. In breve, la reazione sulfidrilasica è avviata con l'aggiunta di Na_2S 0,6 mM ad una soluzione contenente StCysK o StCysM 3 nM, BSA 30 nM e concentrazioni variabili di OAS in tampone B. Aliquote da 60 μl sono state prelevate a intervalli di tempo fissi (in modo da effettuare circa 7 misurazioni per ogni cinetica) e la reazione è stata fermata in strip di

ependorf da PCR contenenti 60 μl di acido acetico. Alla fine 60 μl di reattivo alla ninidrina [77] sono stati aggiunti con una pipetta multicanale; la miscela è stata riscaldata a 100°C per 10' in un termociclatore. La soluzione è stata raffreddata e 46 μl della miscela di reazione sono stati aggiunti ai pozzetti di una piastra contenente 154 μl di etanolo freddo per diluire la soluzione. La successiva quantificazione dell'addotto di colorazione rosa è stata effettuata tramite la lettura dell'assorbimento delle soluzioni a 550 nm con un lettore di piastre (Halo LED 96, Dynamic Scientific, Newport Pagnell, UK). I contributi del background sono stati sottratti e ogni cinetica è stata determinata come media di almeno due replicati. La quantità di cisteina prodotta è stata calcolata tramite l'utilizzo di una curva di calibrazione ed i dati sono stati analizzati con un'equazione lineare per calcolare la velocità iniziale di produzione di cisteina. I parametri cinetici sono stati calcolati applicando l'equazione di Michaelis-Menten (Eq. 3).

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [AcCoA]}{K_{M,AcCoA} + [AcCoA]} \quad (3)$$

L'effetto della concentrazione dei ligandi sulla velocità iniziale di reazione di CysK è stato misurato in miscele di reazione contenenti concentrazioni variabili dei ligandi, OAS 1 mM e Na_2S 0.6 mM. I dati sono stati analizzati con l'equazione di Morrison (Eq. 4) per calcolare la costante di inibizione K_i degli inibitori caratterizzati da tight binding [78]:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_T + [I]_T + IC_{50}) - \sqrt{([E]_T + [I]_T + IC_{50})^2 - 4 \cdot [E]_T \cdot [I]_T}}{2 \cdot [E]_T} \quad (4)$$

Dove $[E]_T$ è la concentrazione totale dell'enzima, $[I]_T$ è la concentrazione totale dell'inibitore e v_i/v_0 è il rapporto tra la velocità in presenza (v_i) e in assenza (v_0) di ligando. Per inibitori competitivi [78]:

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[OAS]}{K_{M,OAS}} \right) \quad (5)$$

È importante ottenere come parametro inibitorio di un composto anche la K_i perché mentre l' IC_{50} è influenzata dalla concentrazione di substrato relativa rispetto alla K_M , la K_i

è indipendente da questo parametro e quindi la si può utilizzare per paragonare inibitori testati in differenti condizioni. Per inibitori di tipo competitivo la K_i e la K_d coincidono.

Spettroscopia NMR: Tutti gli spettri NMR sono stati registrati a 20.0 ± 0.1 °C con uno spettrometro Varian INOVA 600AS operante a 599,730 MHz per la frequenza ^1H , con la collaborazione della Dr. Thelma Perthinez, CIM, Università di Parma. L'assegnazione dei protoni del peptide MNYDI è stata effettuata su una soluzione di peptide 3 mM, in 5% D_2O /95% tampone fosfato 5 mM a pH 4.0. Gli esperimenti bidimensionali omonucleari del ^1H , TOCSY e ROESY, sono stati eseguiti utilizzando le sequenze standard di impulsi [116] e i chemical shifts dei protoni sono stati riferiti al segnale dell'acqua. I dati sono stati elaborati utilizzando gli algoritmi NMRPipe/NMRView [117, 118]. I sistemi di spin sono stati identificati, e l'assegnazione sequenziale è stata ottenuta con il metodo standard [119]. Le assegnazioni sono state confermate a pH 8.0, nelle stesse condizioni sperimentali degli esperimenti di legame.

STD-NMR: Gli esperimenti di STD-NMR sono stati eseguiti su una soluzione contenente tampone potassio fosfato 5 mM, D_2O 5%, a pH 8.0, e un rapporto molare enzima/ligando pari a 1:300. Gli spettri NMR per gli esperimenti di STD sull'interazione proteina/peptide sono stati acquisiti con 32K punti sperimentali e 3500 scansioni in una finestra spettrale di 9000 Hz. Per le interazioni tra enzima e piccoli ligandi invece gli spettri sono stati acquisiti con 64K punti sperimentali e 512 scansioni in una finestra spettrale di 7000 Hz. In entrambi i casi per la saturazione selettiva è stata utilizzata una sequenza di impulsi con una lunghezza di 30 ms e 46 dB di attenuazione e un ritardo tra un impulso e l'altro di 1 ms per un tempo di saturazione di 3 s. La saturazione selettiva per gli spettri on-resonance è stata eseguita per irraggiamento a -0.2 ppm di frequenza per i peptidi e a -0.9 ppm per gli inibitori, mentre per lo spettro di riferimento (off-resonance) i campioni sono stati irradiati a 26.6 ppm. Gli spettri sono stati elaborati ed analizzati con il software MestReNova 8.1.

Per ricavare il *group epitope mapping* (GEM) del ligando, cioè la mappa delle interazioni dei singoli protoni con il sito di legame dell'enzima, il fattore di amplificazione STD (ASTD) è stato calcolato come:

$$\text{ASTD} = I_{\text{STD}} / I_0 * \text{MR}$$

dove MR è il rapporto molare, I_{STD} è l'intensità del picco di ciascun protone ottenuta dallo spettro STD e I_0 è l'intensità del picco di ciascun protone nello spettro di riferimento (off-resonance). I valori di ASTD dati sono stati corretti per gli artefatti generati dai segnali di saturazione parziale del ligando nello spettro on-resonance. Infatti, in queste condizioni si dovrebbero saturare solamente i protoni della proteina, ma nel caso dei peptidi, essendo formati da aminoacidi, e per alcuni piccoli ligandi contenenti gruppi metilici che hanno dei segnali NMR a frequenze vicine a quella di saturazione adottata, si generano piccole influenze dovute ad una saturazione diretta e non per il trasferimento del segnale dalla proteina. Per rimuovere questo artefatto dagli spettri STD del complesso ligando:enzima è stato acquisito uno spettro on-resonance del solo ligando, che è stato sottratto dagli spettri del complesso. La saturazione dei singoli protoni è stata normalizzata assumendo il segnale più elevato come 100% e su questi valori è stato generato un GEM per avere informazioni sulla prossimità di ciascun protone alla superficie del sito di legame nella proteina.

Modellistica molecolare: Gli esperimenti di docking in silico sono stati condotti nel laboratorio del Prof. G. Costantino, Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma.

Test microbiologici su *E. coli*: L'efficacia dei composti nell'inibire la biosintesi della cisteina nelle cellule batteriche è stata misurata su crescite di *E. coli* in terreno minimo, dove i batteri per replicarsi devono sintetizzare la cisteina a partire da zolfo inorganico. Si

è utilizzato un terreno minimo M9 composto da $MgSO_4$ 2 mM, glucosio 0.4%, $CaCl_2$ 0.1 mM e sali M9 (i sali M9 sono preparati come soluzione concentrata 5X e si ottengono sciogliendo in un litro di acqua 64 g di $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g di K_2PO_4 anidro, 2.5 g di NaCl, 5 g di NH_4Cl). L'altro terreno utilizzato, il terreno ricco LB, è composto da 1 L di H_2O in cui sono disciolti 10 g di triptone, 5 g di estratto di lievito e 10 g di NaCl. I ceppi di *E. coli* utilizzati sono: NK3 e BL21 (DE3) (Tabella 1).

Tabella 1: Caratteristiche principali e genotipo dei ceppi utilizzati per testare gli inibitori di CysK e CysM.

| Ceppo | Caratteristiche | Genotipo |
|-----------|---|---|
| NK3 | Auxotrofo per cisteina. | DtrpE5 leu-6 thi rbs ⁺ hsdR hsdM ⁺ cysK cysM |
| BL21(DE3) | Lisogeno del fago T7. Usato per l'espressione di proteine ricombinanti. | F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) |

Per l'allestimento delle colture batteriche gli inoculi sono stati effettuati partendo da colonie batteriche cresciute su terreno solido risospese in 1 ml del terreno in seguito utilizzato per la coltura. Si determina l'OD₆₀₀ della sospensione cellulare che indica una concentrazione cellulare della sospensione, tale per cui una coltura di 0.8×10^9 cellule/ml dà una densità ottica a 600 nm di circa 1 OD. Si diluisce la risospensione per avere un OD₆₀₀ di 0.1 e si aggiunge l'inibitore da testare. La sospensione ottenuta viene messa in incubazione a 37°C sotto intensa agitazione e vengono effettuate misure della torbidità ogni ora.

Risultati

In questa parte del lavoro di Dottorato è stata studiata inizialmente l'interazione di HiCysK con un pentapeptide ad alta affinità, dalla sequenza MNYDI. Questo complesso è già stato studiato mediante spettroscopia di fluorescenza e studi cristallografici [47] ed è stato usato come modello per validare la tecnica STD-NMR utilizzata successivamente per studiare la diversa interazione dello stesso peptide con StCysK e StCysM.

Interazioni del peptide MNYDI con HiCysK, StCysK e StCysM: L'interazione del peptide MNYDI con HiCysK è stata già analizzata e studiata anche tramite tecniche computazionali [47]. Da questi studi è risultato che questa interazione avviene principalmente attraverso legami ad H che coinvolgono il carbossilato C-terminale e interazioni idrofobiche che coinvolgono le catene laterali di Ile5 e Tyr3. Da questi dati si è partiti per calibrare e validare la tecnica STD-NMR, al fine di studiare l'interazione tra la proteina e altri ligandi. Prima di tutto sono state calcolate le affinità di legame tra il peptide MNYDI ed i tre enzimi HiCysK, StCysK e StCysM in tampone potassio fosfato 5 mM, pH 8.0, che è il tampone utilizzato per le successive misure STD-NMR, poiché è noto che gli anioni, come i solfati, riducono significativamente l'affinità dei peptidi per CysK [74].

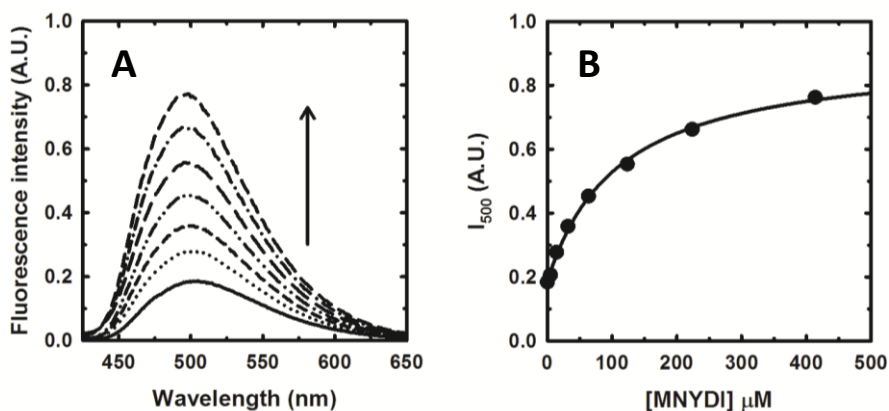


FIGURA 19: Legame di MNYDI a HiCysK.

Pannello A. Spettri di emissione di fluorescenza per eccitazione a 412 nm di una soluzione di HiCysK 1 μM in tampone potassio fosfato 5 mM, pH 8.0, a 20 °C, con concentrazioni crescenti di MNYDI.

Pannello B. Dipendenza dell'intensità dell'emissione di fluorescenza a 500 nm dalla concentrazione del peptide. La linea tra i punti sperimentali rappresenta il fitting con l'equazione 1, con $K_d = 109 \pm 10 \mu\text{M}$.

Una titolazione fluorimetrica di HiCysK con MNYDI è riportata in Figura 19 e le costanti di dissociazione per i tre complessi sono riportate in Tabella 2.

TABELLA 2: Costanti di dissociazione di MNYDI per HiCysK, StCysK e StCysM, determinate in una soluzione di tampone potassio fosfato 5 mM, pH 8.0, a 20 ± 0.5 °C.

| Complesso | K_d (μM) |
|----------------|-------------------------|
| HiCysK - MNYDI | 109 ± 10 |
| StCysK - MNYDI | 4.4 ± 0.3 |
| StCysM - MNYDI | 275 ± 40 |

L'affinità di legame del peptide MNYDI a tutti e tre gli enzimi considerati rientra in un intervallo che permette di effettuare esperimenti di STD-NMR, poiché l'efficienza del trasferimento di saturazione al ligando dipende dalla sua costante di dissociazione per la proteina [120, 121]. I chemical shift del ^1H del peptide MNYDI sono stati attribuiti come riportato in Tabella 3.

TABELLA 3: Chemical shifts (ppm) del ^1H del peptide MNYDI, in tampone potassio fosfato 5 mM, pH 4.0, a 20 ± 0.5 °C. L'assegnazione dei protoni è stata confermata anche a pH 8.0.

| Residuo | NH | H α | H β | Altri protoni |
|---------|------|------------|------------|--|
| Met1 | - | 3.77 | 1.99, 2.09 | γCH_2 2.48, 2.34 ϵCH_3 2.06 |
| Asn2 | 8.77 | 4.78 | 2.80, 2.71 | γNH_2 7.67, 6.99 |
| Tyr3 | 8.37 | 4.65 | 2.88, 3.20 | δH 7.18 ϵH 6.87 |
| Asp4 | 8.46 | 4.70 | 2.76, 2.63 | |
| Ile5 | 7.65 | 4.13 | 1.86 | γCH_2 1.44, 1.15 γCH_3 0.91 δCH_3 0.91 |

Le frequenze di saturazione degli spettri on-resonance sono vicine alle risonanze del ligando peptidico e possono generare degli artefatti. Per superare questo problema è stato acquisito lo spettro del solo peptide, che è stato usato come fattore di correzione nel calcolo dell'ASTD e del GEM. Lo spettro di differenza STD del complesso HiCysK:MNYDI è riportato in Figura 20.

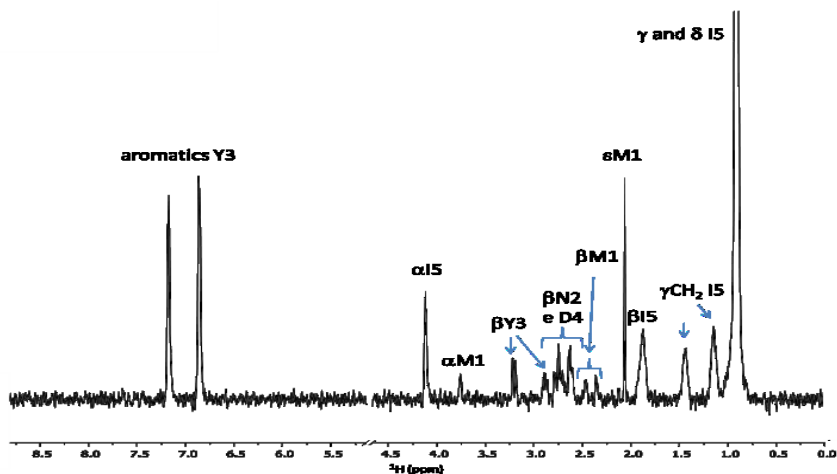


FIGURA 20: Spettro STD del complesso HiCysK:MDYDI.

Spettro STD del peptide MNYDI 2 mM in complesso con HiCysK 6.7 μ M in potassio fosfato 5 mM, D₂O 5%, pH 8

Le risonanze osservate derivano dalla saturazione del ligando legato all'enzima e dalla successiva dissociazione, che trasferisce la saturazione in soluzione. Per ottenere informazioni sulla modalità di legame del peptide e sulla vicinanza di ciascun protone alla superficie della proteina interagente, è stato calcolato il GEM per ciascun protone dallo spettro STD, come riportato in Figura 21.

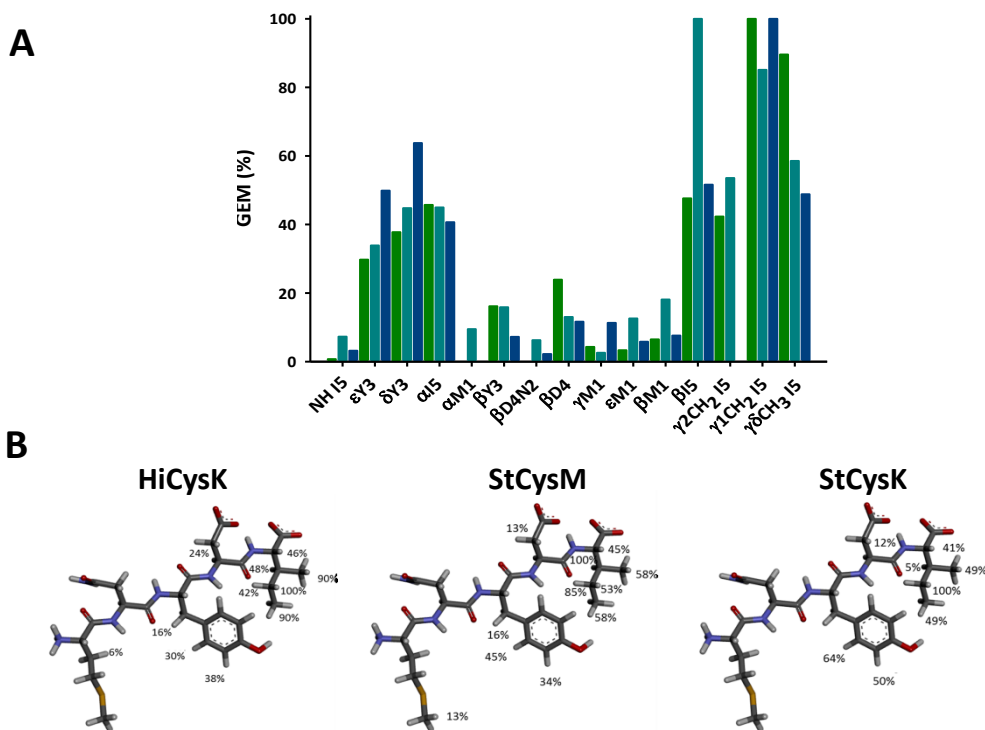


FIGURA 21: GEM del pentapeptide.

Pannello A. Group Epitope Mapping (GEM) di HiCysK (verde), StCysM (ciano) e StCysK (blu) in complesso con il peptide MNYDI. La saturazione dei singoli protoni è stata normalizzata rispetto al protone a saturazione maggiore nel peptide.

Pannello B. Rappresentazione del GEM sulla struttura del peptide.

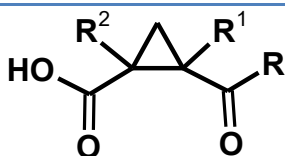
La saturazione dei singoli protoni è normalizzata per la più alta saturazione protonica nel peptide. Per tutti i tre complessi il segnale di saturazione più alto appartiene al C-terminale dell'Ile (Ile5), in particolare al protone H-β (StCysM) o H-γ₁ (StCysK, HiCysK). Questo risultato è in accordo con i precedenti dati strutturali, computazionali e funzionali [13, 14, 29, 47, 53, 74]. Per CysM questa interazione sembra dare il contributo preponderante alla energia di legame e suggerisce che il sito di legame per questa

isoforma, che lega substrati più ingombranti rispetto a CysK [99, 100], non è in grado di stabilire altri contatti forti con la catena laterale di Ile5. Questo potrebbe spiegare l'affinità costantemente inferiore dimostrata da peptidi e altre molecole inibitorie per CysM rispetto a CysK [47, 48]. È stato suggerito che la selettività verso l'isoforma CysK potrebbe essere una conseguenza di differenti interazioni tra la sequenza N-terminale dei peptidi e i residui che rivestono il sito attivo in ingresso di CysK e CysM [36]. I risultati degli studi di STD-NMR confermano questa osservazione e mostrano contatti tra Met e Asn N-terminale del pentapeptide e il sito di legame di StCysM. Nel caso di StCysK, che mostra la più alta affinità per il peptide MNYDI, un significativo contributo di legame è fornito dai protoni arilici, come si osserva nello spettro STD-NMR (Figura 21). In particolare l' ^1H di Tyr3 contribuisce per più del 60% del GEM. Questo risultato è in ottimo accordo con un'analisi in silico [47] che prevede una maggiore affinità del peptide per StCysK, probabilmente a causa di un diverso orientamento della catena laterale di Tyr3.

Screening di una libreria di possibili ligandi biacidi: Viste le possibili limitazioni all'impiego in vivo di inibitori enzimatici di natura peptidica, si è pensato di sfruttare le informazioni ottenute e sopra descritte sull'interazione tra CysK o CysM e ligandi peptidici per lo sviluppo di piccole molecole ad azione inibitoria. Come punto di partenza, è stata utilizzata una libreria di composti ciclopropanici contenenti due gruppi acidi, sintetizzati dal laboratorio del Prof. Costantino del Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma. Di tutti i composti è stata determinata la costante di affinità per entrambe le isoforme StCysK e StCysM mediante esperimenti di binding in fluorescenza. I risultati ottenuti (Tabella 4) indicano per i composti con le due funzioni acide libere (composti UPAR-19 e UPAR-26) una maggiore affinità dell'isomero con i due sostituenti R^1 e R^2 in posizione cis rispetto al composto trans. Se si esterifica uno dei due gruppi carbossilici si vede una inversione del trend (composti UPAR-20 e UPAR-27); come dimostrano gli altri composti testati si hanno delle buone affinità di legame mettendo in posizione trans l'acido carbossilico ed il sostituente idrofobico, separati da un anello ciclopropanico che mantiene una rigida geometria spaziale e rende i ligandi adatti all'interazione con il sito attivo dell'enzima [107]. I composti legano entrambe le isoforme e mostrano

sistematicamente una affinità più elevata per CysK. I composti UPAR-232 e UPAR-233 presentano le più alte affinità per entrambi gli enzimi, con costanti di dissociazione nel range del basso micromolare.

TABELLA 4: Costanti di dissociazione dei derivati ciclopropanici testati per StCysK e StCysM.



| Ligando | Stereo-chimica | R | R ¹ | R ² | StCysK K _d (μM) | StCysM K _d (μM) | SI ^a |
|----------|----------------|-----|----------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| UPAR-19 | <i>trans</i> | OH | H | H | 1100 ± 100 | 640 ± 110 | 0.58 |
| UPAR-20 | <i>trans</i> | OEt | H | H | 245 ± 14 | 675 ± 9 | 2.8 |
| UPAR-26 | <i>cis</i> | OH | H | H | 215 ± 9 | 900 ± 90 | 4.2 |
| UPAR-27 | <i>cis</i> | OEt | H | H | > 1000 | > 1000 | na ^b |
| UPAR-229 | <i>cis</i> | OH | Me | Me | 42 ± 3 | 350 ± 32 | 8.3 |
| UPAR-230 | <i>cis</i> | OH | Me | H | 49 ± 1 | 320 ± 20 | 6.5 |
| UPAR-231 | <i>cis</i> | OH | Et | H | 8.1 ± 0.5 | 173 ± 8 | 21 |
| UPAR-232 | <i>cis</i> | OH | Ph | Me | 9 ± 1 | 40 ± 2 | 4.4 |
| UPAR-233 | <i>cis</i> | OH | Ph | H | 7.4 ± 0.4 | 55 ± 3 | 7.4 |
| UPAR-234 | <i>cis</i> | OH | Bn | Me | 48 ± 2 | 368 ± 47 | 7.7 |

^a SI: indice di selettività calcolato come il rapporto $K_{d,CysM}/K_{d,CysK}$; ^b non attendibile.

Sintesi razionale di ligandi monoacidi: Grazie alle considerazioni ricavate dall'analisi del legame degli inibitori peptidici ed ai dati ottenuti sulla serie dei composti biacidi si è potuto passare al disegno razionale di piccole molecole inibitrici di CysK e CysM, la cui struttura generale mantiene la presenza di un solo acido carbossilico legato ad un gruppo che mima la catena laterale dell'isoleucina attraverso un linker ciclopropanico, che li mantiene ad una corretta distanza e in configurazione trans (Figura 22).

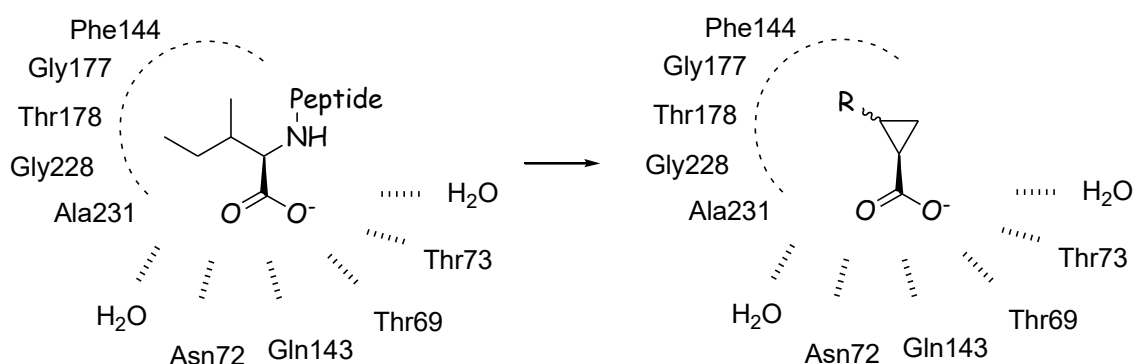
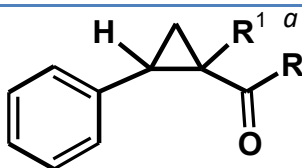


FIGURA 22: Disegno razionale degli acidi carbossilici ciclopropanici.

A sinistra sono rappresentate le interazioni tra l'isoleucina del peptide che mima la regione C-terminale di CysE con i residui del sito attivo di HiCysK. A destra sono riportate le stesse interazioni con un ligando generico tra quelli testati.

Si è ipotizzato che i composti biacidi, essendo molto polari, potrebbero avere dei problemi nel penetrare la parete cellulare dei batteri Gram-negativi. Quindi è stato sintetizzato il composto UPAR-136 che ha la stessa struttura dell'UPAR-233, uno dei più attivi composti biacidi della serie precedente, ma presenta un solo gruppo acido. Il composto UPAR-136 mostra una buona affinità verso StCysK, con una K_d di 9.2 μM (Tabella 5).

TABELLA 5: Costanti di dissociazione dei ligandi monocarbossilici per StCysK e StCysM.



| Ligando | Stereo- chimica | R | R ¹ | StCysK | StCysM | SI ^b |
|-----------------------|--------------------|-----|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| | | | | K _d (μM) | | |
| UPAR-136 | <i>trans</i> | OH | H | 9.2±0.9 | 148±16 | 16 |
| UPAR-315 | <i>trans</i> | OH | Et | 15±1 | 720±100 | 48 |
| UPAR-316 ^d | <i>trans</i> | OH | Bn | 0.20±0.02 | 4.1±0.2 | 21 |
| UPAR-391 | <i>trans</i> | OEt | Bn | no bind ^e | nd ^f | na ^c |
| UPAR-393 | 1R,2S | OH | Et | 12.1±0.5 | 860±90 | 71 |
| UPAR-421 | 1S,2R | OH | Et | 1200±300 | >2000 | na ^c |
| UPAR-394 ^g | 1S,2S | OH | Bn | 0.067±0.007 | 1.66±0.07 | 25 |
| UPAR-419 | 1R,2R | OH | Bn | 50±8 | 197±27 | 4 |
| UPAR-414 | <i>trans</i> | OH | 4-CH ₃ -Bn | 0.077±0.011 | 1.2±0.2 | 16 |
| UPAR-415 | 1S,2S | OH | 4-CH ₃ -Bn | 0.028±0.005 | 0.49±0.05 | 18 |
| UPAR-422 | 1R,2R | OH | 4-CH ₃ -Bn | 81±17 | 121±12 | 1.5 |
| UPAR-416 | <i>trans</i> | OH | 4-Cl-Bn | 0.156±0.007 | 0.76±0.10 | 5 |
| UPAR-417 | 1S,2S | OH | 4-Cl-Bn | 0.054±0.008 | 0.42±0.06 | 8 |
| UPAR-420 | 1R,2R | OH | 4-Cl-Bn | 84±10 | 152±19 | 1.8 |
| UPAR-423 | <i>trans</i> | OH | PhEt | 14±3 | 27±2 | 1.9 |

^a tutti i composti sono in configurazione *trans*; ^b SI: indice di selettività calcolato come il rapporto $K_{d,CysM}/K_{d,CysK}$; ^c non attendibile; ^d rapporto stechiometrico calcolato per questo composto: 2.36; ^e non c'è legame a concentrazioni < 20 μM. Il composto non è solubile nel tampone del saggio con 1% DMSO a concentrazioni > 20 μM; ^f non determinata; ^g rapporto stechiometrico calcolato per questo composto: 1.05.

Tuttavia, l'affinità verso StCysM non era ancora soddisfacente ($K_d = 148 \mu\text{M}$), ma simile a quella dell'UPAR-233. Per ottimizzare il ligando sono stati fatti esperimenti di docking in silico (G. Costantino, manoscritto inviato per la pubblicazione) e si è osservato che il gruppo carbossilico dell'UPAR-136 mantiene i legami ad idrogeno fatti dalla regione C-terminale di CysE; l'anello aromatico si trova nella piccola tasca lipofila occupata dalla porzione idrofobica dell'isoleucina (Figura 23A). Come si può apprezzare in Figura 23B, una parte considerevole della tasca di legame è vuota. Questa regione è caratterizzata dalla presenza di una piccola area lipofila circondata da residui moderatamente polari. Perciò il carbonio α dell'anello ciclopropanico potrebbe sfruttare questa regione del sito di legame, stabilendo così nuove interazioni e aumentando l'affinità dei composti. Inoltre, anche nell'isoforma CysM vi è spazio per aggiungere sostituenti in questa direzione, anche se la cavità è leggermente più polare (Figura 23C). Eventuali sostituenti nella posizione β dell'anello ciclopropanico o sull'anello fenile non sono stati considerati, poiché sembra che in questa regione della tasca non vi sia spazio sufficiente per aggiungere altri sostituenti, in particolare considerando la forma della tasca di legame di CysM.

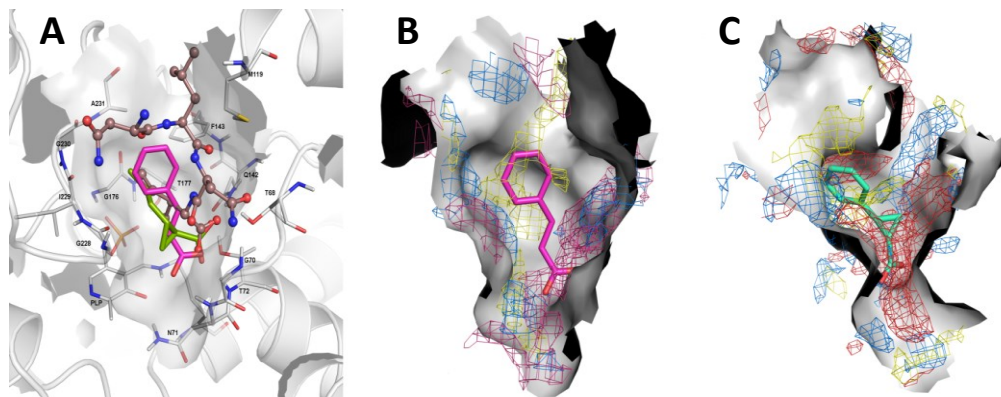


FIGURA 23: Legame dell'UPAR-136 a StCysK e StCysM.

Pannello A: Possibili interazioni di legame dell'UPAR-136 (in magenta) al sito attivo di StCysK (struttura cristallografica 1OAS, in grigio chiaro), sovrapposto con la porzione C-terminale di CysE come risolta nella struttura cristallografica 1Y7L dell'enzima da *H. influenzae* (rappresentato con ball-and-stick).

Pannello B: Mappa delle caratteristiche del sito attivo di StCysK con il composto UPAR-136 come riferimento; le aree donatrici di legami ad H sono rappresentate con maglie in blu, quelle accettrici di legami ad H in rosso e quelle idrofobiche in giallo. Una seconda piccola area idrofobica si può osservare nella parte inferiore dell'immagine, circondata da aree polari.

Pannello C: Mappa delle caratteristiche del sito attivo di StCysM con il composto UPAR-136 come riferimento: il codice colori è lo stesso del pannello B.

Il composto UPAR-315, che presenta un residuo etilico sul carbonio α , è stato preparato come miscela racemica. L'affinità per StCysK non è cambiata significativamente rispetto a quella di UPAR-136, mentre l'affinità verso CysM è diminuita considerevolmente (K_d StCysK = 15 μ M; K_d StCysM = 720 μ M). Poiché per i composti otticamente attivi solitamente la stereochimica è importante per l'interazione con gli enzimi, si è ritenuto interessante investigare quale enantiomero del composto UPAR-315 sia il più attivo, mantenendo la configurazione trans. È interessante notare che, mentre l'enantiomero UPAR-393 (1R, 2S) ha un'affinità simile alla miscela racemica, quello UPAR-421 (1S, 2R) è inattivo. Per quest'ultimo, gli esperimenti di docking mostrano una leggera differenza di orientamento nel sito attivo rispetto all'enantiomero attivo UPAR-393. Questo porta ad un'interazione meno efficace dell'acido carbossilico con i residui circostanti e ad alcuni ingombri sterici nella tasca idrofobica occupata dal fenile. Pertanto, si può supporre che

questo enantiomero non è correttamente alloggiato all'interno del sito di legame, e questo spiega la differenza nelle K_d per i due composti. Per quanto riguarda il composto UPAR-393, gli studi di docking hanno evidenziato due possibili modalità di legame. In entrambi i casi, il gruppo carbossilico è coinvolto in una rete di legami idrogeno e interazioni di van der Waals con l'anello fenilico ed il gruppo etilico. Per ottenere ulteriori informazioni a livello atomico sulle modalità di legame, sono stati effettuati esperimenti di STD-NMR sul composto UPAR-393. Con questa tecnica si possono ricavare informazioni su quali parti del ligando contribuiscano maggiormente al legame, supponendo che maggiore è l'effetto STD di un protone del ligando, più vicino è il protone alla superficie del sito di legame, e di conseguenza, più forte è l'interazione ligando-proteina. Come riportato in precedenza per l'interazione tra enzimi e peptidi, per ciascun protone del ligando UPAR-393 è stato calcolato il valore di GEM (Figura 24A). I dati sperimentali mostrano che il carbonio β dell'anello ciclopropanico rappresenta la porzione del ligando che è più profondamente inserita all'interno della cavità di legame e che gli idrogeni dell'anello hanno la saturazione più elevata. Etilico e fenilico sembrano essere solo parzialmente schermati dal solvente all'interno della tasca di legame. I valori di GEM sono stati confrontati con i dati di docking (Figura 24B).

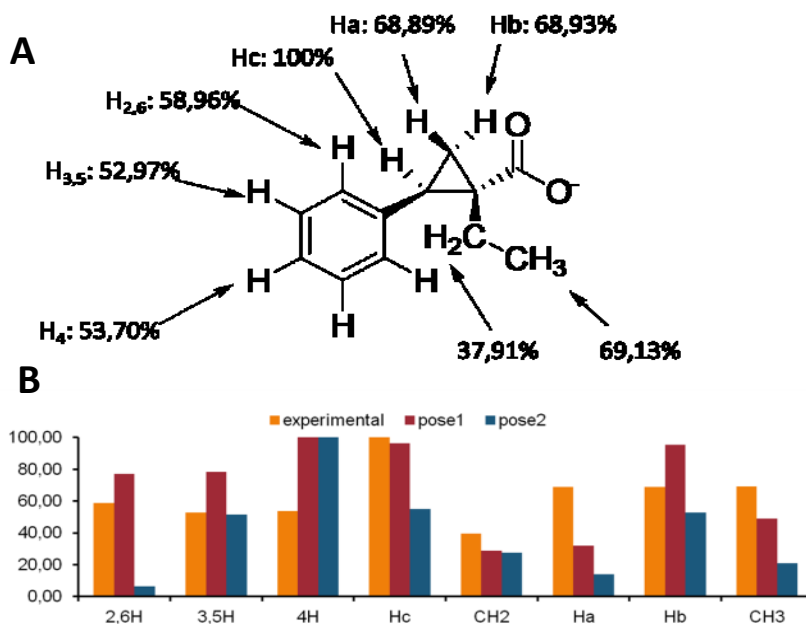


FIGURA 24: Interazioni dell'UPAR-393 con StCysK.

Pannello A: valori di GEM per l'UPAR-393 ricavati dai dati sperimentali di STD-NMR.

Pannello B: confronto tra i punteggi attribuiti in base ai dati sperimentali di STD-NMR dell'UPAR-393 (in arancione) e quelli ottenuti per mezzo di due pose di docking (in rosso e in blu).

Delle due modalità di legame ipotizzate per mezzo degli esperimenti di docking in silico, una mostra valori più consistenti con i dati sperimentali ottenuti per STD-NMR. I valori di GEM previsti per la seconda posa di legame sono sostanzialmente diversi da quelli sperimentali, suggerendo che probabilmente questa modalità di legame non è quella adottata nella formazione del complesso proteina-ligando.

Sulla base di queste osservazioni, in un ulteriore tentativo di ottimizzare l'affinità di legame è stato sintetizzato il composto UPAR-316, che porta un gruppo benzilico sul carbonio α , con l'obiettivo di sfruttare al meglio il volume disponibile all'interno del sito di legame. Si è quindi posizionato un gruppo aromatico sul carbonio α che potrebbe inserirsi in una regione caratterizzata da una piccola zona idrofobica circondata da residui polari, non occupata dai ligandi precedenti. Sia il composto UPAR-316 che i suoi analoghi puri enantiomerici UPAR-394 (1S, 2S) e UPAR-419 (1R, 2R) sono stati sintetizzati e testati. La

miscela racemica mostra una affinità decisamente maggiore rispetto al derivato etilico sia per StCysK che per StCysM, con costanti di dissociazione di circa 0.2 e 4.1 μM , rispettivamente (Tabella 5). L'enantiomero UPAR-394 ha una affinità ancora più alta sia per StCysK che per StCysM, con K_d nel range del nanomolare e basso micromolare, rispettivamente (Tabella 5). L'altro enantiomero UPAR-419, come previsto, è risultato essere circa 700 volte meno affine a StCysK. Le preferenze enantiomeriche sono state ulteriormente confermate dal calcolo della stechiometria di legame a StCysK. Nel caso della miscela racemica la stechiometria di legame è di circa 2, e diminuisce a circa 1 quando l'enzima viene titolato con il composto UPAR-394 (dati non mostrati). Esperimenti di docking del composto UPAR-394 nella tasca di legame di StCysK hanno permesso di identificare la modalità di legame dello scheletro 2-carbossi fenilciclopropanico all'interno del sito di legame, indirizzando verso un'ulteriore ottimizzazione del ligando tramite l'aggiunta all'anello 2-fenile di gruppi funzionali diversi. Gli studi di docking hanno anche portato a ipotizzare che vi sia ulteriore spazio per introdurre piccoli gruppi in posizione para dell'anello α -benzile. Pertanto, sono stati sintetizzati e testati composti contenenti in posizione para dell'anello benzilico un gruppo donatore di elettroni, come il metile (UPAR-414 composto racemo, e relativi enantiomeri UPAR-415 e UPAR-422), oppure un gruppo elettrone-attrattore, come il cloro (UPAR-416 composto racemo, e relativi enantiomeri UPAR-417 e UPAR-420). Inoltre, poiché la tasca che accoglie l'anello benzile sembra di grandi dimensioni, è stato valutato un composto in cui l'anello aromatico è collegato al carbonio α del ciclopropano attraverso un gruppo etile. I dati ottenuti dimostrano che, rispetto al UPAR-394, le affinità di UPAR-415 e UPAR-417 per StCysK sono simili. Tuttavia, entrambi i composti hanno mostrato un aumento di 3 volte dell'affinità verso StCysM, con K_d submicromolari. Il composto UPAR-417 rappresenta il ligando più forte identificato finora per CysM. Come previsto, per ciò che riguarda StCysK, l'affinità può essere classificata in base alla conformazione: 1S, 2S > rac >> 1R, 2R. Si può ipotizzare che per il composto con il sostituito feniletile il linker etilenico è troppo lungo per permettere la sistemazione dell'anello fenilico nella piccola regione lipofila occupata negli altri casi dal gruppo benzile. L'importanza del gruppo acido

e delle sue interazioni nella tasca del sito di legame è ulteriormente confermata dalla bassissima affinità del derivato estere UPAR-391 (Tabella 5), che presenta una costante di dissociazione per StCysK almeno 100 volte superiore a quella di UPAR-316.

Effetto inibitorio dei ligandi sull'attività sulfidrilasica di StCysK e StCysM: I ligandi descritti nella sezione precedente causano un aumento dell'emissione di fluorescenza del PLP. Essendo questo il cofattore dell'enzima è logico aspettarsi che i ligandi si comportino da inibitori dell'attività sulfidrilasica di CysK e CysM. Per dimostrare questo effetto inibitorio, uno dei ligandi (UPAR-232) è stato testato per mezzo di saggi d'attività discontinui. Sono stati, prima di tutto, calcolati i parametri di Michaelis-Menten di entrambi gli isoenzimi, che risultano avere una $K_M = 0.9 \pm 0.7$ mM e una $k_{cat} = 194 \pm 28$ s⁻¹ per CysK e una $K_M = 1.0 \pm 0.4$ mM e una $k_{cat} = 122 \pm 17$ s⁻¹ per Cys M (dati non mostrati), in accordo con i valori riportati in letteratura nonostante siano stati ottenuti con una metodica differente [43]. Successivamente è stata determinata l'IC₅₀ dell'UPAR-232 per entrambe le isoforme dell'enzima (Figura 25). Misurando l'attività enzimatica residua in funzione della concentrazione di ligando è possibile stimare l'IC₅₀ di un inibitore [122]. Per questo composto l'IC₅₀ per StCysK è risultata essere di 9 ± 1 μM mentre per StCysM è di 67 ± 9 μM (Figura 25).

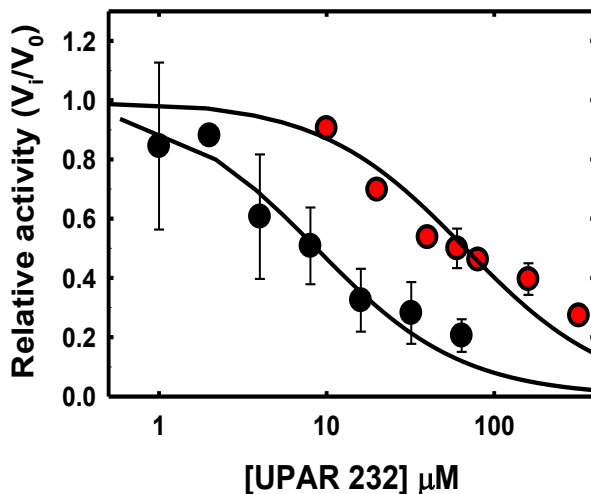


FIGURA 25: Saggio di inibizione dell'UPAR-232 su StCysK e StCysM.

Dipendenza dell'attività enzimatica relativa di StCysK (nero) e StCysM (rosso) dalla concentrazione di UPAR-232. I saggi sono stati condotti in tampone Hepes 100 mM, DMSO 1%, pH 7.0, con una concentrazione fissa di StCysK e StCysM di 3 nM; i valori di IC_{50} ottenuti analizzando i dati con l'Eq. 5 sono $9 \pm 1 \mu\text{M}$ e $67 \pm 9 \mu\text{M}$, rispettivamente.

Effetto dei ligandi sulla crescita batterica: Lo sviluppo d'inibitori dell'OASS è stato finora incentrato sulla sola identificazione di molecole attive nell'inibizione in vitro dell'attività enzimatica. Con l'identificazione di ligandi molto affini per entrambe le isoforme di OASS è stato possibile testare la loro efficacia su colture batteriche. L'effetto di questi inibitori sulle crescite batteriche non può essere quantificato tramite una tradizionale misura di MIC (minima concentrazione inibente), dal momento che da queste molecole non ci si attende un'azione direttamente battericida o batteriostatica, ma piuttosto una riduzione della resistenza del batterio allo stress ossidativo. L'efficacia di questi inibitori può essere invece misurata testandone l'effetto sulla crescita di colture batteriche in terreno minimo. Essendo il terreno minimo carente di aminoacidi, la crescita cellulare è dipendente dalla capacità di sintesi della cisteina a partire da solfato; un'inibizione della sua biosintesi dovrebbe portare ad un blocco o rallentamento della

crescita batterica. Per seguire la curva di crescita batterica è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* BL21 (DE3). Come fonte di carbonio è stato utilizzato il glicerolo 0.2%; l'inoculo è stato effettuato da una pre-coltura in terreno liquido M9 per ottenere un OD₆₀₀ iniziale pari a 0.1. Incubando le crescite a 37 °C e a 250 rpm, la fase esponenziale dura circa 6 ore. NK3, un ceppo di *E. coli* auxotrofo per la cisteina, nelle stesse condizioni sperimentali non presenta crescita batterica ed è stato quindi utilizzato come controllo negativo (Figura 26).

Per validare le condizioni sperimentali in cui effettuare i test di inibizione della crescita batterica, innanzitutto è stato effettuato un controllo utilizzando 1,2,4-triazolo, un inibitore noto della via biosintetica della cisteina, aggiunto al momento dell'inoculo ad una concentrazione di 2 mM. In queste condizioni, in accordo con i dati di letteratura [123], il triazolo non inibisce la crescita in modo permanente ma la rallenta, tanto che dopo 23 ore i valori di OD della coltura controllo e di quella trattata col triazolo sono sovrapponibili (Figura 26).

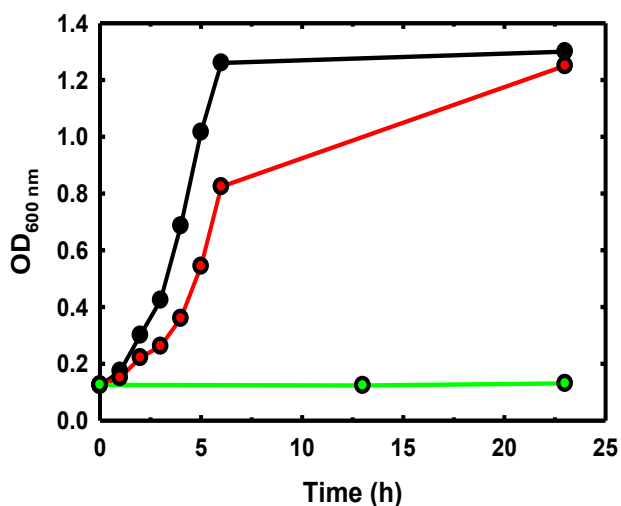


FIGURA 26: Curve di crescita di riferimento per i test biologici.

Curve di crescita batteriche in terreno minimo M9 di BL21 (DE3) in assenza (nero) e in presenza (rosso) di 1,2,4-triazolo 2 mM, e curva di crescita batterica in terreno M9 di NK3 (verde).

Questa differenza è probabilmente dovuta al fatto che il triazolo ha un effetto inibente minore se aggiunto all'inizio della fase esponenziale in colture pre-adattate alla crescita in terreno minimo.

Successivamente sono stati testati alcuni degli inibitori caratterizzati in vitro nel corso di questo progetto, iniziando dall'UPAR-232, appartenente alla serie dei composti bioacidi. Le curve di crescita batterica in assenza e in presenza del ligando ad una concentrazione di 500 μM al momento dell'inoculo (Figura 27) non mostrano alcuna differenza significativa. Quindi questo composto, pur promettente per quanto riguarda la discreta affinità di legame a CysK e CysM, non è in grado di inibire la crescita batterica, molto probabilmente per l'elevata polarità della molecola che potrebbe ostacolare l'ingresso all'interno della cellula dei batteri Gram-. Successivamente è stato quindi testato il composto UPAR-316, uno dei più affini inibitori monoacidi valutati in vitro. Tuttavia, anche l'aggiunta di questa molecola non ha avuto nessun effetto sulla crescita batterica (Figura 27). Il derivato esterificato UPAR-391 è stato ideato per ridurre ancor di più la polarità della molecola: pur essendo inattivo in vitro, una volta all'interno della cellula potrebbe essere idrolizzato dalle esterasi batteriche e generare il composto UPAR-316. Anche questo composto è stato testato ad una concentrazione di 500 μM . Subito dopo l'inoculo determina un intorbidamento del terreno provocato dalla scarsa solubilità dell'estere in ambiente acquoso, ma dopo 3 ore (tempo in cui si ha la dissoluzione del derivato estereo in soluzione) si hanno OD_{600} molto simili al controllo (Figura 27). Un ultimo tentativo è stato poi condotto con il più potente composto identificato fino ad ora per le due isoforme, UPAR-415, testato anch'esso ad una concentrazione di 500 μM , ma anche questo composto non presenta un'inibizione della crescita batterica (Figura 27).

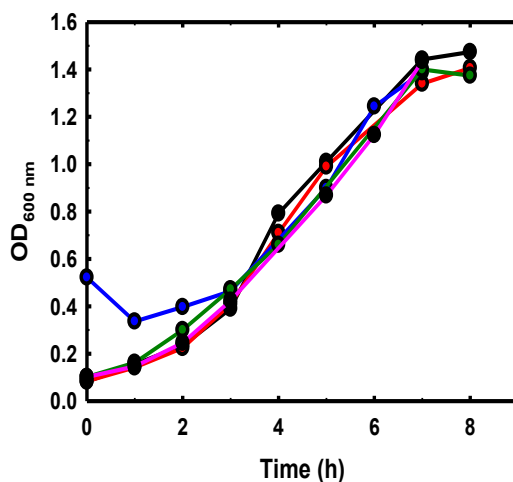


FIGURA 27: Test di inibizione della crescita batterica.

Curve di crescita batteriche in terreno minimo M9 in assenza di inibitori (nero), ed in presenza di UPAR-232 500 μM (rosso), UPAR-316 500 μM (verde), UPAR-391 500 μM (blu) e UPAR-415 500 μM (rosa).

Tutti gli inibitori di CysK e CysM testati risultano quindi non creare alcun cambiamento nella curve di crescita batteriche nonostante l'alta affinità mostrata in vitro. Possono esserci diverse spiegazioni per questa mancanza di inibizione della proliferazione cellulare come ad esempio: i) una scarsa penetrazione dei ligandi all'interno delle cellule batteriche; infatti è noto come le pareti cellulari dei batteri Gram- siano difficili da superare soprattutto per molecole cariche; ii) le molecole che riescono a penetrare nella cellula possono essere espulse dalle pompe di efflusso presenti nei batteri e causa di note resistenze ad antibiotici; iii) meccanismi intracellulari potrebbero sopperire all'inibizione enzimatica.

Per cercare di capire meglio quale di questi problemi è responsabile dell'inefficacia degli inibitori da noi sviluppati, verranno prossimamente condotti test su ceppi cellulari deleti dei geni per le più comuni pompe di efflusso. In particolare si lavorerà con ceppi cellulari deleti del gene *tolC* [124], e si sintetizzeranno nuovi composti con bioisosteri del gruppo acido o zwitterioni per aumentare la lipofilia dei composti.

Discussione

L'inibizione della biosintesi della cisteina può influenzare fortemente il ciclo di vita di molti microrganismi unicellulari e piante. L'*O*-acetilserina sulfidrilasi catalizza l'ultimo step della biosintesi della cisteina, che consente il trasferimento dello zolfo all'*O*-acetilserina. Poiché i mammiferi non sono dotati di questa via biosintetica, e sfruttano la transulfurazione per sintetizzare la cisteina dalla metionina, inibitori delle due isoforme di OASS presenti nella maggior parte dei proteobatteri, CysK e CysM, potrebbero costituire farmaci antibatterici altamente selettivi e sicuri. Essendo ancora poco conosciuta l'espressione differenziale delle due isoforme durante i processi fisiologicamente rilevanti, e durante la sopravvivenza dei batteri nell'infezione a lungo termine [89], è opportuno identificare inibitori efficaci su entrambe le isoforme per bloccare la sintesi della cisteina nelle diverse condizioni in cui il batterio può trovarsi durante l'infezione.

Tenendo conto dei dati computazionali di docking molecolare e di quelli sperimentali di STD-NMR e spettroscopia di fluorescenza, e partendo dallo studio dell'interazione con inibitori peptidici, è stata progettata una serie di acidi carbossilici 2-fenilciclopropanici che sono stati sintetizzati e testati su StCysK e StCysM. In generale, questo lavoro ha portato a derivati circa 4000 volte e 7000 volte più attivi sulle due isoforme rispetto all'inibitore peptidico MNLNI, e ad una riduzione della selettività verso i due enzimi. I composti UPAR-415 e UPAR-417 (TABELLA 5) sono i composti più attivi descritti finora verso StCysM. Data l'ampia gamma di affinità osservate, è stato delineato un accenno preliminare di studio delle relazioni struttura-attività. È interessante notare che la stereochimica è estremamente importante per conferire elevata affinità.

I composti finora ottenuti e testati non si sono mostrati in grado di inibire la crescita batterica, probabilmente a causa di una limitata penetrazione all'interno della cellula batterica, in quanto avendo un gruppo acido deprotonato a pH fisiologico il composto potrebbe non riuscire a superare la barriera cellulare, oppure a causa dell'espulsione tramite le pompe di efflusso. Partendo dagli ottimi risultati di inibizione in vitro, tuttavia, attualmente si stanno sintetizzando nuovi composti i) con bioisosteri dell'acido

carbossilico o gruppi dove la funzione acida sia mascherata, in modo da aumentare la lipofilia della molecola e migliorare l'assorbimento, oppure ii) con una porzione basica in modo da formare a pH fisiologico degli zwitterioni e aumentarne la frazione assorbita dalla cellula.

Dati preliminari di relazioni struttura-attività (SAR)

Sulla base dei ligandi finora analizzati si possono ottenere dati preliminari di SAR. Ad esempio, un solo gruppo acido è necessario e sufficiente sulla struttura ciclopropanica per l'interazione con le due isoforme StCysK e StCysM. Il posizionamento di un anello fenilico in conformazione trans rispetto all'acido carbossilico è efficace per ottenere un buon legame. La sostituzione del gruppo acido con un estere porta ad una considerevole diminuzione o addirittura alla perdita dell'attività inibitoria. Le sostituzioni al carbonio α del ciclopropano non solo sono ben tollerate, come nel caso del composto UPAR-315, ma possono aumentare notevolmente l'affinità verso CysK e CysM, come nel caso del sostituito α -benzilico. Allungare il distanziatore tra l'anello fenilico e il carbonio α del ciclopropano da una a due unità di metilene (composto UPAR-423) porta ad una diminuzione dell'affinità. Lo stesso effetto si ha se si elimina l'anello aromatico (composti UPAR-315 e UPAR-393). L'anello benzilico può essere ulteriormente sostituito con piccoli gruppi funzionali, come metile e cloro, indipendentemente dalla loro proprietà di elettrone-attrattori o elettrone-donatori. La stereochimica è risultata essere fondamentale per garantire un'elevata affinità. Nel caso dei derivati α -etil sostituiti, l'enantiomero levogiro 1R, 2S è risultato essere più di 1000 volte meno affine rispetto all'altro. Nel caso della sostituzione α -benzilica, l'enantiomero destrogiro 1S, 2S mostra un'affinità costantemente superiore a quella degli altri isomeri, secondo la seguente serie: 1S, 2S >> 1R, 2R. Pertanto, i composti più attivi sono quelli che mostrano una stereochimica 2S nella loro struttura. Questo è un dato importante da considerare nella progettazione di ulteriori derivati.

Selettività dei composti verso le due isoforme StCysK e StCysM

Come descritto sopra, l'inibizione di entrambe le isoforme è importante per una completa inibizione della biosintesi della cisteina nei batteri. In questo lavoro sono stati ottenuti inibitori con una elevata affinità per StCysM, in particolare i composti UPAR-415 e UPAR-417. Tuttavia, considerando che l'obiettivo è quello di ottenere composti efficaci verso entrambe le isoforme, abbiamo razionalizzato le informazioni raccolte sui vari inibitori sulla base del rapporto tra l'affinità per StCysK e quella per StCysM (Figura 28). Innanzitutto, va notato che in generale l'affinità per StCysM è proporzionale a quella per StCysK, anche se sempre inferiore. Questa è una osservazione confortante, considerando che studi analoghi su inibitori peptidici mostravano invece una relazione inversa tra le costanti di dissociazione per le due isoforme [47].

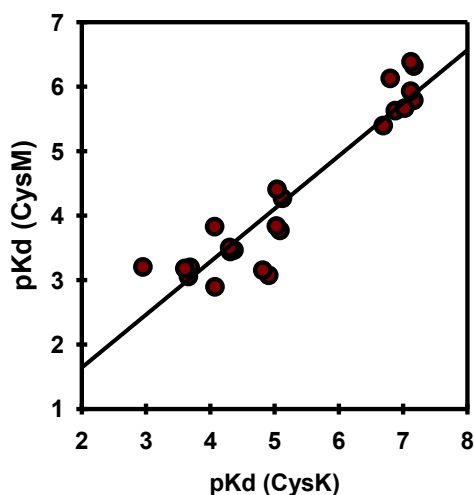


FIGURA 28: Correlazione tra le costanti di dissociazione dei composti testati per StCysK e StCysM.

I punti rappresentano i composti testati e la retta è il fitting tramite un'equazione lineare con r di 0.94.

In assenza di sostituzioni sul carbonio α , il rapporto tra le costanti di dissociazione per StCysM e StCysK è di circa 16 (es.: UPAR-136). La sostituzione con un gruppo etilico, pur mantenendo una elevata affinità per l'isoforma CysK, porta ad una forte riduzione dell'affinità per CysM (vedi i composti UPAR-315 e UPAR-393, con un rapporto tra le affinità di circa 50 e 70, rispettivamente). La sostituzione con il gruppo α -benzilico riduce il rapporto tra le affinità rispetto al gruppo α -etilico, ma tale rapporto rimane di circa 20 nel caso della miscela racemica e 25 per l'enantiomero più attivo. Ciò che sembra migliorare notevolmente il rapporto tra le affinità è l'inserimento di un sostituito lipofilo in posizione para dell'anello benzile. Infatti, per i composti recanti il cloro come sostituito in posizione para, cioè UPAR-416 e UPAR-417, la K_d per StCysM è rispettivamente solo 5 e 8 volte superiore a quella per StCysK. Sebbene la futura caratterizzazione di un numero maggiore di derivati potrà migliorare la comprensione delle relazioni struttura-attività di questi inibitori, si può già concludere che la sostituzione α -benzilica può portare non solo a composti molto affini verso entrambe le isoforme, ma anche, con opportune sostituzioni, alla perdita di selettività tra le due isoforme.

CONCLUSIONI

CysK, uno degli isoenzimi dell'*O*-acetilserina sulfidrilasi (OASS) presenti in piante e batteri, è un enzima studiato da molto tempo ed il suo ruolo fisiologico nella sintesi della cisteina è stato ben definito. In questo progetto di dottorato è stata studiata una delle attività moonlighting recentemente identificate per CysK: l'attivazione di una tossina batterica che opera nel sistema di inibizione della crescita da contatto (CDI) di ceppi patogeni di *E. coli*. CysK è infatti responsabile dell'attivazione della tossina ad attività tRNA_{sica} CdiA-CT, ed è stata comparata la sua interazione con due differenti partner proteici: CdiA-CT e CysE (serina acetiltransferasi, l'enzima che precede l'OASS nella biosintesi della cisteina). Queste due proteine agiscono in modo sorprendentemente analogo nella formazione di complessi con CysK, attraverso l'inserzione delle code C-terminali nel sito attivo di CysK. Questo meccanismo, già noto per CysE, è stato dimostrato sperimentalmente per CdiA-CT con un saggio d'attività discontinuo che ha fornito valori di K_i paragonabili a quelli di CysE, nel range del basso nanomolare. I due complessi hanno anche le stesse caratteristiche spettrofluorimetriche: entrambi generano un aumento di fluorescenza paragonabile, ma con una cinetica di raggiungimento dell'equilibrio molto più lenta, di circa 100 volte, per il complesso tossina:CysK. In entrambi i casi la formazione veloce di un complesso d'incontro è seguita da un riarrangiamento conformazionale che porta alla formazione di un complesso ad alta affinità. Un'altra caratteristica comune è la selettività per la sola isoforma CysK dell'OASS, in quanto con CysM non si osserva la formazione di un complesso stabile. Una differenza importante, oltre alla cinetica di formazione dei complessi, è la stechiometria di legame. Infatti, mentre CysE riesce a legare solo uno dei due siti attivi del dimero di CysK, nel complesso con CdiA-CT entrambi i siti attivi dell'enzima risultano essere occupati. Dal punto di vista funzionale, nel complesso CysE:CysK (cisteina sintasi) oltre all'inibizione di CysK si ha anche un aumento dell'attività catalitica di CysE. Nel caso del sistema CDI, le cellule isogeniche esprimono un inibitore della tossina (CdiI), il quale non altera la formazione del complesso con CysK, e sono quindi resistenti all'azione tRNA_{sica}. CdiA-CT esercita comunque un ruolo nella fitness batterica in quanto può interferire con la biosintesi della cisteina in due modi: da una parte inibisce CysK e dall'altra sopprime l'attivazione di CysE nel complesso cisteina

sintasi. Questa tossina viene quindi probabilmente utilizzata dalle cellule anche come messaggero.

La via biosintetica della cisteina, un precursore di molecole riducenti, risulta essere molto importante per i batteri soprattutto in condizioni avverse come all'interno dei macrofagi nelle infezioni persistenti. È stato dimostrato recentemente anche il coinvolgimento di CysK nella formazione del biofilm batterico. Infatti è proprio la presenza o l'assenza dell'enzima, e non i livelli di cisteina prodotta dalla cellula, ad influenzare la formazione di un biofilm stabile. Per queste ragioni nell'ambito di questo progetto di dottorato, in collaborazione con il laboratorio del prof. Gabriele Costantino (Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma), sono stati sviluppati anche degli inibitori selettivi per le due isoforme dell'OASS di *S. Typhimurium*, CysK e CysM, come possibili nuove molecole ad azione antibiotica. Partendo dall'analisi delle modalità di interazione dell'inibitore fisiologico di CysK, CysE, si è studiato dapprima l'interazione di pentapeptidi che mimassero la sua regione C-terminale, e in base ai dati ottenuti sono stati sviluppati piccoli ligandi sintetici. È stato necessario passare ad altri tipi di ligandi per superare i classici problemi degli inibitori peptidici come potenziali farmaci. Ad esempio i peptidi sono poco stabili e possono facilmente essere metabolizzati dall'organismo, solitamente hanno una bassa biodisponibilità, sono difficili da utilizzare in preparazioni farmaceutiche. I ligandi di sintesi che sono stati progettati e sintetizzati hanno come caratteristica principale quella di mimare l'isoleucina C-terminale di CysE, aminoacido fondamentale per la formazione del complesso cisteina sintasi. La struttura generale di questi composti è costituita da un gruppo acido e un gruppo lipofilo, un benzene, separati da un linker ciclopropanico che mantiene questi due gruppi in conformazione trans. Durante questo lavoro è stato verificato che, come molti enzimi, anche CysK e CysM hanno una spiccata stereoselettività nei confronti dei ligandi: infatti solo un enantiomero dei diversi inibitori testati è responsabile dell'interazione col sito attivo dell'enzima. Sulla base di queste considerazioni, di analisi di docking in silico e dei dati sperimentali ottenuti con STD-NMR e con saggi di binding spettrofluorimetrici, si è potuta realizzare una prima analisi di relazione struttura-attività che ha portato all'ottimizzazione dei ligandi. Il composto più

attivo ottenuto ha un'affinità nel range del nanomolare per entrambe le isoforme. Questo è il primo composto ad avere un'affinità così elevata per CysM, da sempre un target molto ostico per l'identificazione di ligandi. Inoltre questo inibitore è risultato essere poco selettivo per le due isoforme, un requisito fondamentale per lo sviluppo di inibitori della biosintesi della cisteina che siano efficaci in diverse condizioni fisiologiche ed ambientali, che paiono produrre un'espressione differenziale di CysK e CysM.

BIBLIOGRAFIA

1. Kessler, D., *Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(6): p. 825-40.
2. Mihara, H. and N. Esaki, *Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(1-2): p. 12-23.
3. Mozzarelli, A., et al., *The multifaceted pyridoxal 5'-phosphate-dependent O-acetylserine sulfhydrylase*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(11): p. 1497-510.
4. Hulanicka, M.D., et al., *Regulation of O-acetylserine sulfhydrylase B by L-cysteine in Salmonella Typhimurium*. J Bacteriol, 1979. **140**(1): p. 141-6.
5. Kredich, N.M., *Regulation of L-cysteine biosynthesis in Salmonella Typhimurium. I. Effects of growth of varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression*. J Biol Chem, 1971. **246**(11): p. 3474-84.
6. Nakamura, T., H. Iwahashi, and Y. Eguchi, *Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of Salmonella Typhimurium*. J Bacteriol, 1984. **158**(3): p. 1122-7.
7. Filutowicz, M., A. Wiater, and D. Hulanicka, *Delayed inducibility of sulphite reductase in cysM mutants of Salmonella Typhimurium under anaerobic conditions*. J Gen Microbiol, 1982. **128**(8): p. 1791-4.
8. Kroger, C., et al., *An infection-relevant transcriptomic compendium for Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(6): p. 683-95.
9. Kredich, N.M., M.A. Becker, and G.M. Tomkins, *Purification and characterization of cysteine synthetase, a bifunctional protein complex, from Salmonella Typhimurium*. J Biol Chem, 1969. **244**(9): p. 2428-39.
10. Becker, M.A., N.M. Kredich, and G.M. Tomkins, *The purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase-A from Salmonella Typhimurium*. J Biol Chem, 1969. **244**(9): p. 2418-27.
11. Smith, I.K. and J.F. Thompson, *Purification and characterization of L-serine transacetylase and O-acetyl-L-serine sulfhydrylase from kidney bean seedlings (Phaseolus vulgaris)*. Biochim Biophys Acta, 1971. **227**(2): p. 288-95.
12. Droux, M., et al., *Purification and characterization of O-acetylserine (thiol) lyase from spinach chloroplasts*. Arch Biochem Biophys, 1992. **295**(2): p. 379-90.
13. Schnell, R., et al., *Structural insights into catalysis and inhibition of O-acetylserine sulfhydrylase from Mycobacterium tuberculosis. Crystal structures of the enzyme alpha-aminoacrylate intermediate and an enzyme-inhibitor complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23473-81.
14. Zhao, C., et al., *On the interaction site of serine acetyltransferase in the cysteine synthase complex from Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(4): p. 911-6.
15. Zhao, C., et al., *Cloning, overexpression, purification, and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase-B from Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2006. **47**(2): p. 607-13.
16. Turnbull, A.L. and M.G. Surette, *L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 11): p. 3410-9.

17. Turnbull, A.L. and M.G. Surette, *Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in Salmonella Typhimurium*. Res Microbiol, 2010. **161**(8): p. 643-50.
18. Campanini, B., et al., *Inhibitors of the Sulfur Assimilation Pathway in Bacterial Pathogens as Enhancers of Antibiotic Therapy*. Curr Med Chem, 2015. **22**: p. 187-213.
19. Paritala, H. and K.S. Carroll, *New Targets and Inhibitors of Mycobacterial Sulfur Metabolism*. Infect Disord Drug Targets, 2013. **13**(2): p. 85-115.
20. Schnell, R., D. Sriram, and G. Schneider, *Pyridoxal-phosphate dependent mycobacterial cysteine synthases: Structure, mechanism and potential as drug targets*. Biochim Biophys Acta, 2015. **9**(83): p. 1175–1183.
21. Spyraakis, F., et al., *Isozyme-specific ligands for O-acetylserine sulfhydrylase, a novel antibiotic target*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77558.
22. Kredich, N.M., B.S. Keenan, and L.J. Foote, *The purification and subunit structure of cysteine desulfhydrase from Salmonella Typhimurium*. J Biol Chem, 1972. **247**(22): p. 7157-62.
23. Campanini, B., et al., *Moonlighting O-acetylserine sulfhydrylase: New functions for an old protein*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1854**(9): p. 1184-93.
24. Kredich, N.M., *The molecular basis for positive regulation of cys promoters in Salmonella Typhimurium and Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1992. **6**(19): p. 2747-53.
25. Hindson, V.J., *Serine acetyltransferase of Escherichia coli: substrate specificity and feedback control by cysteine*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 745-52.
26. Johnson, C.M., et al., *Kinetic mechanism of the serine acetyltransferase from Haemophilus influenzae*. Arch Biochem Biophys, 2004. **429**(2): p. 115-22.
27. Kumaran, S., et al., *Assembly of the cysteine synthase complex and the regulatory role of protein-protein interactions*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10268-75.
28. Hell, R. and H. Hillebrand, *Plant concepts for mineral acquisition and allocation*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 161-8.
29. Huang, B., M.W. Vetting, and S.L. Roderick, *The active site of O-acetylserine sulfhydrylase is the anchor point for hienzyme complex formation with serine acetyltransferase*. J Bacteriol, 2005. **187**(9): p. 3201-5.
30. Burkhard, P., et al., *Identification of an allosteric anion-binding site on O-acetylserine sulfhydrylase: Structure of the enzyme with chloride bound*. Journal of Molecular Biology, 2000. **303**(2): p. 279-286.
31. Droux, M., et al., *Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants--structural and kinetic properties of the free and bound enzymes*. Eur J Biochem, 1998. **255**(1): p. 235-45.
32. Mino, K., et al., *Increase in the stability of serine acetyltransferase from Escherichia coli against cold inactivation and proteolysis by forming a hienzyme complex*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(4): p. 865-74.
33. Flemming, H.C., T.R. Neu, and D.J. Wozniak, *The EPS matrix: the "house of biofilm cells"*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 7945-7.

34. Nyholm, S.V., et al., *Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10231-5.
35. Ren, D., et al., *Differential gene expression for investigation of Escherichia coli biofilm inhibition by plant extract ursolic acid*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(7): p. 4022-34.
36. Nickel, J.C., et al., *Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **27**(4): p. 619-24.
37. Potera, C., *Forging a link between biofilms and disease*: Science. 1999 Mar 19;283(5409):1837, 1839.
38. Joo, H.S. and M. Otto, *Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens*. Chem Biol, 2012. **19**(12): p. 1503-13.
39. Singh, P., et al., *CysK Plays a Role in Biofilm Formation and Colonization by Vibrio fischeri*. Appl Environ Microbiol, 2015. **81**(15): p. 5223-34.
40. Alexander, F.W., et al., *Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families*. Eur J Biochem, 1994. **219**(3): p. 953-60.
41. Bettati, S., et al., *Role of pyridoxal 5'-phosphate in the structural stabilization of O-acetylserine sulfhydrylase*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40244-51.
42. Cook, P.F. and R.T. Wedding, *A reaction mechanism from steady state kinetic studies for O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella Typhimurium LT-2*. J Biol Chem, 1976. **251**(7): p. 2023-9.
43. Tai, C.H., et al., *Kinetic mechanisms of the A and B isozymes of O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella Typhimurium LT-2 using the natural and alternative reactants*. Biochemistry, 1993. **32**(25): p. 6433-42.
44. Chattopadhyay, A., et al., *Structure, mechanism, and conformational dynamics of O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella Typhimurium : comparison of A and B isozymes*. Biochemistry, 2007. **46**(28): p. 8315-30.
45. Hell, R., et al., *Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant Arabidopsis thaliana*. Amino Acids, 2002. **22**(3): p. 245-57.
46. Burkhard, P., et al., *Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella Typhimurium* . Journal of Molecular Biology, 1998. **283**(1): p. 121-133.
47. Spyrakis, F., et al., *Fine tuning of the active site modulates specificity in the interaction of O-acetylserine sulfhydrylase isozymes with serine acetyltransferase*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(1): p. 169-81.
48. Spyrakis, F., et al., *Isozyme-Specific Ligands for O-acetylserine sulfhydrylase, a Novel Antibiotic Target*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77558.
49. Tai, C.H., et al., *Characterization of the allosteric anion-binding site of O-acetylserine sulfhydrylase*. Biochemistry, 2001. **40**(25): p. 7446-52.
50. Pye, V.E., et al., *The structure and mechanism of serine acetyltransferase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40729-36.

51. Olsen, L.R., et al., *Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor*. *Biochemistry*, 2004. **43**(20): p. 6013-9.
52. Mino, K., et al., *Effects of bienzyme complex formation of cysteine synthetase from escherichia coli on some properties and kinetics*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000. **64**(8): p. 1628-40.
53. Mino, K., et al., *Characteristics of serine acetyltransferase from Escherichia coli deleting different lengths of amino acid residues from the C-terminus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000. **64**(9): p. 1874-80.
54. Campanini, B., et al., *Interaction of serine acetyltransferase with O-acetylserine sulphydrylase active site: evidence from fluorescence spectroscopy*. *Protein Sci*, 2005. **14**(8): p. 2115-24.
55. Diner, E.J., et al., *Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI)*. *Genes Dev*, 2012. **26**(5): p. 515-25.
56. Lopez, D., H. Vlamakis, and R. Kolter, *Biofilms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. 2.
57. Ng, W.L. and B.L. Bassler, *Bacterial quorum-sensing network architectures*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 197-222.
58. Destoumieux-Garzon, D., J. Peduzzi, and S. Rebuffat, *Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action*. *Biochimie*, 2002. **84**(5-6): p. 511-9.
59. Kajava, A.V., et al., *Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins*. *Mol Microbiol*, 2001. **42**(2): p. 279-92.
60. Aoki, S.K., et al., *Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB*. *Mol Microbiol*, 2008. **70**(2): p. 323-40.
61. Hayes, C.S., et al., *Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014. **4**(2).
62. Aoki, S.K., et al., *Contact-dependent inhibition of growth in Escherichia coli*. *Science*, 2005. **309**(5738): p. 1245-8.
63. Becker, D., et al., *Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials*. *Nature*, 2006. **440**(7082): p. 303-7.
64. Wei, Y., et al., *High-density microarray-mediated gene expression profiling of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(2): p. 545-56.
65. Salmon, K.A., et al., *Global gene expression profiling in Escherichia coli K12: effects of oxygen availability and ArcA*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(15): p. 15084-96.
66. Aoki, S.K., et al., *A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria*. *Nature*, 2010. **468**(7322): p. 439-42.
67. Ruhe, Z.C., D.A. Low, and C.S. Hayes, *Bacterial contact-dependent growth inhibition*. *Trends Microbiol*, 2013. **21**(5): p. 230-7.
68. Morse, R.P., et al., *Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(52): p. 21480-5.
69. Beck, C.M., et al., *CdiA from Enterobacter cloacae delivers a toxic ribosomal RNase into target bacteria*. *Structure*, 2014. **22**(5): p. 707-18.

70. Nikolakakis, K., et al., *The toxin/immunity network of Burkholderia pseudomallei contact-dependent growth inhibition (CDI) systems*. Mol Microbiol, 2012. **84**(3): p. 516-29.
71. Tian, H., et al., *Identification of the structural determinants for the stability of substrate and aminoacrylate external Schiff bases in O-acetylserine sulfhydrylase-A*. Biochemistry, 2010. **49**(29): p. 6093-103.
72. Peterson, E.A. and H.A. Sober, *Preparation of crystalline phosphorylated derivatives of vitamin B6*. J Amer Chem Soc, 1954. **76**: p. 169-175.
73. Singh, R., et al., *Chemogenomics of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2013. **28**(1): p. 183-94.
74. Salsi, E., et al., *Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking nature*. J Med Chem, 2010. **53**(1): p. 345-56.
75. Eyer, P., et al., *Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment*. Anal Biochem, 2003. **312**(2): p. 224-227.
76. Hama, H., et al., *Enhancement of serine-sensitivity by a gene encoding rhodanese-like protein in Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo), 1994. **115**(6): p. 1135-40.
77. Gaitonde, M.K., *A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids*. Biochemical Journal, 1967. **104**(2): p. 627-633.
78. Copland, R.A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery - A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. Methods of Biochemical Analysis. Vol. 46. 2005, Hoboken: John Wiley and Sons.
79. Salsi, E., et al., *A two-step process controls the formation of the bienzyme cysteine synthase complex*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 12813-22.
80. Bernasconi, C.F., *Relaxation Kinetics* 1976, New York: Academic Press Inc.
81. Grishin, N.V., M.A. Phillips, and E.J. Goldsmith, *Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases*. Protein Sci, 1995. **4**(7): p. 1291-304.
82. Percudani, R. and A. Peracchi, *The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**(273): p. 1471-2105.
83. Baecker, P.A. and R.T. Wedding, *Purification of serine acetyltransferase, a component of a multienzyme complex, by immunoabsorption and selective dissociation of the complex*. Anal Biochem, 1980. **102**(1): p. 16-21.
84. Hindson, V.J., et al., *Serine acetyltransferase from Escherichia coli is a dimer of trimers*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 461-6.
85. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases*. Biopolymers, 2008. **89**(5): p. 392-400.
86. Wang, T. and T.S. Leyh, *Three-stage assembly of the cysteine synthase complex from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2012. **287**(6): p. 4360-7.
87. Gouet, P., et al., *ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript*. Bioinformatics, 1999. **15**(4): p. 305-8.

88. Becker, M.A. and G.M. Tomkins, *Pleiotrophy in a cysteine-requiring mutant of Salmonella Typhimurium resulting from altered protein-protein interaction*. J Biol Chem, 1969. **244**(21): p. 6023-30.
89. Kroger, C., et al., *An Infection-Relevant Transcriptomic Compendium for Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Cell Host & Microbe, 2013. **14**(6): p. 685-695.
90. Aoki, S.K., et al., *Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2009. **191**(6): p. 1777-86.
91. Sekowska, A., H.F. Kung, and A. Danchin, *Sulfur metabolism in Escherichia coli and related bacteria: facts and fiction*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000. **2**(2): p. 145-77.
92. Kredich, N.M. and G.M. Tomkins, *The enzymic synthesis of L-cysteine in Escherichia coli and Salmonella Typhimurium*. J Biol Chem, 1966. **241**(21): p. 4955-65.
93. Chinthalapudi, K., et al., *Crystal structure of native O-acetyl-serine sulfhydrylase from Entamoeba histolytica and its complex with cysteine: structural evidence for cysteine binding and lack of interactions with serine acetyl transferase*. Proteins, 2008. **72**(4): p. 1222-32.
94. Westrop, G.D., et al., *Cysteine biosynthesis in Trichomonas vaginalis involves cysteine synthase utilizing O-phosphoserine*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25062-75.
95. Bertagnolli, B.L. and R.T. Wedding, *Purification and Initial Kinetic Characterization of Different Forms of O-Acetylserine Sulfhydrylase from Seedlings of Two Species of Phaseolus*. Plant Physiol, 1977. **60**(1): p. 115-121.
96. Kuske, C.R., et al., *Purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase isoenzymes from Datura innoxia*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 6223-32.
97. Kuske, C.R., et al., *Subcellular Location of O-Acetylserine Sulfhydrylase Isoenzymes in Cell Cultures and Plant Tissues of Datura innoxia Mill.* Plant Physiol, 1996. **112**(2): p. 659-667.
98. Burkhard, P., et al., *Ligand binding induces a large conformational change in O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella Typhimurium*. Journal of Molecular Biology, 1999. **291**(4): p. 941-953.
99. Claus, M.T., et al., *Structure of the O-acetylserine sulfhydrylase isoenzyme CysM from Escherichia coli*. Biochemistry, 2005. **44**(24): p. 8620-6.
100. Maier, T.H., *Semisynthetic production of unnatural L-alpha-amino acids by metabolic engineering of the cysteine-biosynthetic pathway*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(4): p. 422-7.
101. Nakamura, T., et al., *Evidence that thiosulfate assimilation by Salmonella Typhimurium is catalyzed by cysteine synthase B*. J Bacteriol, 1983. **156**(2): p. 656-62.
102. Ma, D.K., et al., *CYSL-1 interacts with the O₂-sensing hydroxylase EGL-9 to promote H₂S-modulated hypoxia-induced behavioral plasticity in C. elegans*. Neuron, 2012. **73**(5): p. 925-40.

103. Tanous, C., et al., *The CymR regulator in complex with the enzyme CysK controls cysteine metabolism in Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35551-60.
104. Pearson, M.M., et al., *Transcriptome of Proteus mirabilis in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression*. Infect Immun, 2011. **79**(7): p. 2619-31.
105. Wang, Q., et al., *Gene expression patterns during swarming in Salmonella Typhimurium : genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes*. Mol Microbiol, 2004. **52**(1): p. 169-87.
106. Amadasi, A., et al., *Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents*. Curr Med Chem, 2007. **14**(12): p. 1291-324.
107. Amori, L., et al., *Design and synthesis of trans-2-substituted-cyclopropane-1-carboxylic acids as the first non-natural small molecule inhibitors of O-acetylserine sulfhydrylase*. MedChemComm, 2012. **3**: p. 1111-1116.
108. Zhu, X., T. Yamaguchi, and M. Masada, *Complexes of serine acetyltransferase and isozymes of cysteine synthase in spinach leaves*. Biosci Biotechnol Biochem, 1998. **62**(5): p. 947-52.
109. Bruno, A., L. Amori, and G. Costantino, *Computational Insights into the Mechanism of Inhibition of OASS-A by a Small Molecule Inhibitor*. Molecular Informatics, 2013. **2**(5-6): p. 447-457.
110. Cosconati, S., et al., *Structure-based virtual screening and biological evaluation of Mycobacterium tuberculosis adenosine 5'-phosphosulfate reductase inhibitors*. J Med Chem, 2008. **51**(21): p. 6627-30.
111. Poyraz, O., et al., *Structure-Guided Design of Novel Thiazolidine Inhibitors of O-Acetyl Serine Sulfhydrylase from Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2013. **56**(16): p. 6457-6466.
112. Kumar, J.V.U., et al., *Discovery of novel inhibitors targeting the Mycobacterium tuberculosis O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1) using virtual high-throughput screening*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(5): p. 1182-6.
113. Nagpal, I., et al., *Virtual screening, identification and in vitro testing of novel inhibitors of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase of Entamoeba histolytica*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30305.
114. Meyer, B. and T. Peters, *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(8): p. 864-890.
115. Amori, L., et al., *Design and synthesis of trans-2-substituted-cyclopropane-1-carboxylic acids as the first non-natural small molecule inhibitors of O-acetylserine sulfhydrylase*. MedChemComm, 2012. **3**(9): p. 1111-1116.
116. Stehling, E.G., et al., *Looking over toxin-K(+) channel interactions. Clues from the structural and functional characterization of alpha-KTx toxin Tc32, a Kv1.3 channel blocker*. Biochemistry, 2012. **51**(9): p. 1885-94.
117. Delaglio, F., et al., *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes*. J Biomol NMR, 1995. **6**(3): p. 277-93.
118. Johnson, B.A., *Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules*. Methods Mol Biol, 2004. **278**: p. 313-52.

119. Wüthrich, K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids* 1986, Zurich: John Wiley & Sons, Inc.
120. Angulo, J. and P.M. Nieto, *STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules-a quantitative approach*. *Eur Biophys J*, 2011. **40**(12): p. 1357-69.
121. Angulo, J., P.M. Enriquez-Navas, and P.M. Nieto, *Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates*. *Chemistry*, 2010. **16**(26): p. 7803-12.
122. Copeland, R.A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery - A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 46. 2005, Hoboken: John Wiley and Sons.
123. Hulanicka, D., T. Klotowski, and D.A. Smith, *The effect of triazole on cysteine biosynthesis in Salmonella Typhimurium*. *J Gen Microbiol*, 1972. **72**(2): p. 291-301.
124. Zhou, Y., et al., *Thinking outside the "bug": a unique assay to measure intracellular drug penetration in gram-negative bacteria*. *Anal Chem*, 2015. **87**(7): p. 3579-84.