

ROLA DWUSKŁADNIKOWYCH SZLAKÓW TRANSDUKCJI SYGNAŁU W OPORNOŚCI CHOROBTWÓRCZYCH BAKTERII GRAM-UJEMNYCH NA ZWIĄZKI ANTYBAKTERYJNE

Adrianna Raczkowska, Karolina Jaworska, Łukasz Wyrożemski, Katarzyna Brzostek*

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: Dwuskładnikowe szlaki transdukcji sygnału złożone z sensorowej kinazy histydynowej i regulatora odpowiedzi umożliwiają bakteriom adaptacyjną odpowiedź na zmieniające się warunki środowiskowe poprzez regulację ekspresji genów warunkujących przebieg wielu procesów fizjologicznych, wirulencję bakterii czy oporność na antybiotyki (związki przeciwbakteryjne). Oporność bakterii patogennych na antybiotyki jest jednym z najważniejszych problemów zdrowia publicznego na całym świecie. W pracy opisano mechanizm transdukcji sygnału oparty na fosfotransferze, charakterystyczny dla systemów dwuskładnikowych oraz indukowane przez te systemy mechanizmy oporności na antybiotyki. Scharakteryzowano kilka dwuskładnikowych szlaków regulatorowych (system PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB, ParR-ParS, CzcR-CzcS, CopR-CopS, PprB-PprA, CbrB-CbrA, BlrA-BlrB, OmpR-EnvZ), które funkcjonują u *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas*, *Salmonella* oraz *Yersinia* spp. Omówiono ich rolę w modyfikacji powierzchni komórki bakteryjnej, ograniczeniu napływu lub zwiększeniu wyrzutu leku z komórki, regulacji produkcji enzymów degradujących antybiotyki czy też w tworzeniu biofilmu.

1. Wstęp. 2. Mechanizm funkcjonowania bakteryjnych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych. 2.1. Sensorowe kinazy histydynowe. 2.2. Regulatory odpowiedzi. 2.3. Transdukcja sygnału w dwuskładnikowych systemach regulacyjnych. 3. Mechanizmy oporności na antybiotyki kontrolowane przez dwuskładnikowe systemy regulacyjne. 3.1. Modyfikacja powierzchni komórek. 3.2. Regulacja napływu i wypływu leków. 3.3. Regulacja produkcji enzymów modyfikujących/inaktywujących antybiotyki. 3.4. Inne, alternatywne formy oporności. 4. Charakterystyka niektórych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych uczestniczących w oporności na związki przeciwbakteryjne w wybranych bakterii Gram-ujemnych. 4.1. Systemy PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB. 4.2. System ParR-ParS. 4.3. Systemy CzcR-CzcS i CopR-CopS. 4.4. System PprB-PprA. 4.5. System CbrB-CbrA. 4.6. System BlrA-BlrB. 4.7. System OmpR-EnvZ. 5. Podsumowanie

ROLE OF TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION SYSTEMS IN ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENS

Abstract: Two-component signal transduction systems composed of histidine sensor kinase and response regulator are involved in adaptive response of pathogenic bacteria to environmental signals by regulating gene expression involved in many physiological processes, bacterial virulence, and antibiotic resistance (antibacterial compounds). Antibiotic resistance of pathogenic bacteria is one of the most important public health problems worldwide. The paper describes a signal transduction mechanism based on phosphotransfer, functioning in two-component systems and the mechanisms of antibiotic resistance governed by these systems. Several signal transduction pathways associated with resistance to antibacterial compounds and functioning in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas*, *Salmonella* and *Yersinia* spp. have been characterized (PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB, ParR-ParS, CzcR-CzcS, CopR-CopS, PprB-PprA, CbrB-CbrA, BlrA-BlrB and OmpR-EnvZ systems). Their role in modifying the bacterial cell surface, limiting the inflow or increasing the drug efflux from the cell, producing antibiotic-degrading enzymes or the biofilm formation is presented.

1. Introduction. 2. Mechanism of action of two-component regulatory systems. 2.1. Histidine sensor kinases. 2.2. Response regulators. 2.3. Signal transduction in two-component systems. 3. Mechanisms of antibiotic resistance controlled by two-component signal transduction systems. 3.1. Cell surface modification. 3.2. Regulation of drug inflow and outflow. 3.3. Regulation of the level of enzymes modifying/inactivating antibiotics. 3.4. Other alternative forms of resistance. 4. Characteristics of two-component signal transduction systems modulating resistance to antibacterial compounds in selected Gram-negative bacteria. 4.1. PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB systems. 4.2. ParR-ParS system. 4.3. CzcR-CzcS and CopR-CopS systems. 4.4. PprB-PprA system. 4.5. CbrB-CbrA system. 4.6. BlrA-BlrB system. 4.7. OmpR-EnvZ system. 5. Summary

Słowa kluczowe: TCS, dwuskładnikowy system transdukcji sygnału, antybiotykooporność, regulator odpowiedzi, sensorowa kinaza histydynowa

Key words: TCS, two-component transduction system, antibiotic resistance, response regulator, sensor histidine kinase

1. Wstęp

Dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnałów (Two Component transduction Systems, TCS) to szlaki regulacyjne, które umożliwiają bakteriom odbieranie

oraz reagowanie na liczne zewnętrzne sygnały poprzez modulację ekspresji odpowiednich genów. Rok 1986 był przełomowy dla badań nad dwuskładnikowymi szlakami transdukcji sygnału. Tracy Nixon, Clive Ronson i Frederick Ausubel użyli po raz pierwszy sformułowania

* Autor korespondencyjny: Katarzyna Brzostek, Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa, tel. 22 55 41 305; e-mail: kbrzostek@biol.uw.edu.pl

„dwuskładnikowe systemy regulacyjne” dla określenia prostych szlaków składających się z pary białek, których homologi posiadają silnie konserwowane ewolucyjnie domeny [92]. W tym samym roku Alex Ninfa i Boris Magasanik wykazali, że dwuskładnikowy system regulacyjny kontrolujący asymilację azotu u *Escherichia coli* wykorzystuje proces fosforylacji białek [89]. Oba odkrycia, podobieństwo aminokwasowej sekwencji odpowiednich homologów oraz mechanizm fosforylacji białek w systemach dwuskładnikowych otworzyły nowe pole do badań, które trwają po dzień dzisiejszy [15, 24, 25, 32, 55, 68, 96, 124, 131]. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne występują u organizmów trzech Domen świata żywego: Bacteria, Archea i Eucarya. Największą ilość TCS stwierdzono w domenie Bacteria, a analizy przeprowadzone w oparciu o dane pochodzące z zsekwencjonowania 555 genomów wykazały, że bakterie charakteryzujące się większym genomem kodują zazwyczaj większą liczbę białek tworzących systemy dwuskładnikowe [45, 86]. Ponadto w genomach bakterii zdolnych do bytowania w różnorodnych środowiskach, np. u *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis* czy *E. coli* zidentyfikowano więcej TCS niż w genomach bakterii zasiedlających jedną, określoną niszę ekologiczną [65]. W genomie wewnątrzkomórkowych patogenów z rodzaju *Mycoplasma* czy obligatoryjnego endosymbionta *Blochmannia floridanus* nie zaadnotowano ani jednego genu kodującego białka systemu TCS [86]. Z kolei wyjątkowo dużą liczbą genów TCS (272) charakteryzuje się genom *Myxococcus xanthus*, myksobakterii, która cechuje się złożonym cyklem życiowym, zdolnością do agregacji i tworzenia specyficznych ciał owocujących [86, 112].

Filogenetyczne drzewa komponentów TCS stworzone przez Koretke i wsp. [63] pokazują, że dwuskładnikowe systemy regulacyjne istniejące pierwotnie w bakteriach, rozprzestrzeniły się do archeonów oraz organizmów eukariotycznych w wyniku horyzontalnego transferu genów. Istnieją dwa modele charakteryzujące przebieg ewolucji TCS. Model koewolucji zakłada, że nowe systemy powstały na skutek globalnej duplikacji poszczególnych komponentów i specjacji nowych gatunków. Z kolei model rekrutacji wskazuje, że nowe TCS są skutkiem łączenia genów kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi w nowe, funkcjonalne systemy. Ewolucja TCS pod względem ich funkcjonalności i roli w modulowaniu rozmaitych odpowiedzi behawioralnych jest ściśle powiązana z wymaganiami środowiskowymi nowo powstających gatunków [27, 63, 65, 137]. U Eucarya dominują kaskady sygnalizacyjne polegające na fosforylacji reszt serynowych, tyrozynowych lub treoninowych kinaz białkowych. Klasyczne systemy dwuskładnikowe, opierające się na fosfotransferze między resztą histydynową kinazy oraz resztą asparaginową regulatora

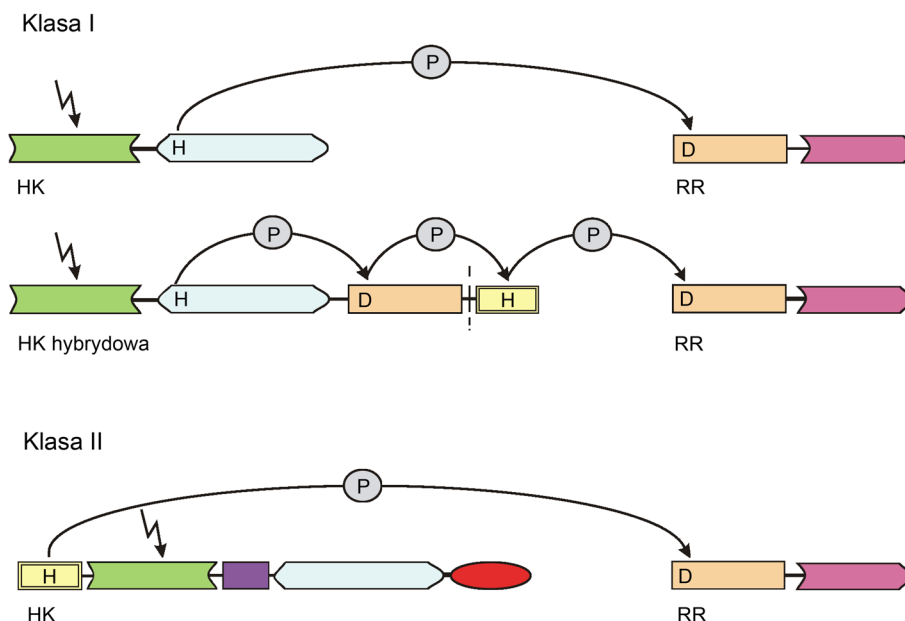
odpowiedzi występują bardzo rzadko. Zidentyfikowano je między innymi u *Saccharomyces cerevisiae*, ameby *Dictyostelium*, w niektórych grzybach, jak *Agaricus bisporus* oraz roślinach, np. *Arabidopsis thaliana*. Nie stwierdzono ich u wyższych eukariotów (w tym u człowieka) [55, 123, 131].

2. Mechanizm funkcjonowania bakteryjnych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Bakteryjne systemy dwuskładnikowe umożliwiają adaptacyjną odpowiedź komórki na dany bodziec. Stymulacja powoduje aktywację systemu, który w rezultacie doprowadza do zmiany profilu ekspresji genów. W ten sposób komórki bakteryjne przystosowują się do nowych warunków nasłonecznienia, osmolarności, wilgotności, temperatury, pH, obecności lub braku składników pokarmowych w otoczeniu, etc. TCS odgrywają ważną rolę w regulacji wielu właściwości fizjologicznych bakterii, np. w sporulacji, bioluminescencji, tworzeniu biofilmu, czy ruchliwości. U bakterii patogennych dwuskładnikowe systemy regulacyjne kontrolują ekspresję genów odpowiedzialnych za ich zjadliwość, wytwarzanie toksyn czy też oporność na antybiotyki [41, 55, 60, 101, 115].

2.1. Sensorowe kinazy histydynowe

Typowy dwuskładnikowy system regulacyjny jest zbudowany z kinazy histydynowej oraz regulatora odpowiedzi (Ryc. 1) [107]. Kinaza histydynowa jest multidomenowym białkiem transbłonowym. W jej budowie wyróżniamy domenę N-kończową oraz domenę C-kończową, które są połączone przez domenę łącznikową [41, 97]. Część N-kończowa jest określana jako domena sensorowa, gdyż jej zadaniem jest odbieranie bodźców. Domena ta może być zlokalizowana w peryplazmie, cytoplazmie lub w błonie cytoplazmatycznej. Budowa sensora zależy od rodzaju odbieranych sygnałów. Część C-kończowa białka jest nazywana domeną przekaźnikową, wykazującą aktywność kinazy. W jej budowie wyróżniamy region dimeryzacyjny oraz katalityczny. Część dimeryzacyjna posiada resztę histydynową zlokalizowaną na motywie H-box, która bierze udział w procesie fosfotransferu. Część katalityczna zawiera motywy N-, G1-, F- i G2-box, tworzące strefę wiązania ATP. Funkcją tej części jest katalizowanie reakcji przyłączenia grupy fosforanowej, pochodzącej z ATP, do reszty histydynowej. Kinazy histydynowe funkcjonują w formie dimeru i reakcja autofosforylacji zachodzi na krzyż, tj. domena katalityczna jednej podjednostki fosforyluje His w drugiej. Motywy obecne w obrębie domeny przekaźnikowej występują we wszystkich zidentyfikowanych kinazach histydy-



Ryc. 1. Organizacja domen dwuskładnikowych systemów regulacyjnych

Klasyfikacja kinazy histydynowej (HK), hybrydowa kinaza histydynowa (HK hybrydowa), regulator odpowiedzi (RR). Domeny w kinazach i w regulatorze odpowiedzi: domena sensorowa – kolor zielony, domena przekaźnikowa – kolor niebieski, domena odbiorcza – kolor pomarańczowy, domena regulatorowa – kolor różowy, domena dimeryzacyjna – kolor fioletowy, domena regulatorowa kinazy – kolor czerwony, moduł HPT fosfotransferu – kolor żółty. Konserwowana histydyna (H), reszta asparaginianowa (D) regulatora odpowiedzi (RR), grupa fosforanowa (P) [na podstawie 107].

nowych (jest ona konserwowana ewolucyjnie) [41, 55, 101, 131]. Analizy sekwencji różnych kinaz histydynowych umożliwiły wyróżnienie dwóch klas tych białek, klasy I, która występuje najczęściej oraz klasy II. Klasa I kinaz posiada podstawowy typ budowy, scharakteryzowany powyżej. Przykładowym białkiem tej klasy jest kinaza EnvZ, która bierze udział w osmoregulacyjnej ekspresji genów *ompC/ompF*, kodujących poriny u *E. coli*. W klasie I kinaz histydynowych wyróżniamy też kinazy hybrydowe, u których za domeną przekaźnikową (katalityczną) występuje domena regulatorowa (odbiornikowa) z resztą asparaginową. Do skutecznego fosfotransferu z kinazy hybrydowej na domenę odbiornika regulatora odpowiedzi wymagany jest dodatkowy moduł HPT (His-containing phosphotransfer domain). HPT zawiera resztę histydynową, która uczestniczy w transferze grupy fosforanowej, ale nie wykazuje aktywności kinazy ani fosfatazy. W niektórych kinazach moduł HPT jest integralną częścią białka, np. sensorowa kinaza ArcB i taka kinaza nazywana jest niekonwencjonalną (unorthodox) [107]. Wszystkie białka typu HPT zawierają motyw poczwórnej helisy (four-helix bundle). Klasa II kinaz została wyodrębniona w oparciu o strukturę białka CheA, składowej systemu dwuskładnikowego CheA-CheY, regulującego chemotaksję m.in. u *E. coli*. CheA wyróżnia się budową złożoną z pięciu domen. Domena P1 zawiera resztę histydynową podlegającą fosforylacji. Domena P2 wiąże regulator odpowiedzi. Domena P3 uczestniczy w dimeryzacji i przyłączeniu grupy fosforanowej do P1. Domena P4 (katalityczna) wiąże ATP, domena P5 regu-

luje aktywność kinazy w odpowiedzi na bodziec [14, 41, 131]. Tak więc, charakterystyczna dla kinazy CheA lokalizacja reszty His podlegającej fosforylacji (P1) w stosunku do katalitycznej domeny (P4) różni się od tej w klasie I kinaz histydynowych.

2.2. Regulatory odpowiedzi

Regulatory odpowiedzi to cytoplazmatyczne białka znajdujące się na końcu szlaku fosfotransferu (Ryc. 1). Aktywowane (ufosforylowane) białka funkcjonują jako efekторы adaptacyjnej odpowiedzi komórki na dany czynnik [131]. Regulatory odpowiedzi są zwykle zbudowane z dwóch domen: ewolucyjnie konserwowanej regulatorowej (odbiornikowej) domeny N-końcowej oraz efektorowej domeny C-końcowej, wykazującej dużą zmienność w zakresie swojej budowy u różnych gatunków bakterii. Domena regulatorowa z reguły współdziała z ufosforylowaną histydyną kinazy i katalizuje transfer grupy fosforanowej na własny asparaginian, dodatkowo może katalizować reakcję autodefosforylacji, limitując w ten sposób czas swojej aktywacji. Fosforylacja domeny regulatorowej pociąga za sobą jej zmianę konformacyjną, dzięki czemu może występować w dwóch formach strukturalnych. Poprzez możliwość występowania w dwóch formach konformacyjnych, domena regulatorowa działa jako przełącznik aktywności regulatora odpowiedzi, przykładowo, nieufosforylowana domena regulatorowa białka NarL blokuje dostęp domeny efektorowej do DNA. Fosforylacja reszty asparaginowej powoduje

zmianę konformacyjną domeny regulatorowej, która dzięki temu odsłania ułożony na domenie efektorowej strukturalny motyw wiązania DNA. Istnieją różne sposoby kontroli domen efektorowych przez spokrewnione domeny regulatorowe. Obejmują one m.in. inhibicję domeny efektorowej przez nieufosforylowaną domenę regulatorową oraz aktywację allosteryczną domeny efektorowej przez ufosforylowaną domenę regulatorową [41, 131]. Domena efektorowa posiada zdolność wiązania się z regionami promotorowymi DNA (DNA-binding domain), regulując transkrypcję genów umożliwiających adaptację do zmiennych czynników środowiskowych, jednakże istnieją przypadki, w których jej celem jest białko [41, 101, 131]. Tylko kilka regulatorów odpowiedzi zawiera domenę C-kończącą funkcjonującą jako enzym, np. fosfodiesteraza białka RegA u *Dictyostelium discoideum* [111]. Donorem grup fosforanowych mogą być również małe molekuly, takie jak acetylofosforan ($\text{CH}_3\text{COPO}_4^{2-}$), jednakże stopień tego typu fosfotransferu jest niski. Do stworzenia wydajnego szlaku transferu grup fosforanowych konieczne są oba białka systemu dwuskładnikowego. Homologia regionów domen efektorowych wiążących się z DNA posłużyła do wyodrębnienia trzech grup/rodzin regulatorów odpowiedzi: OmpR/PhoB, NarL/FixL i NtrC. Razem stanowią one prawie 60% wszystkich regulatorów odpowiedzi. Rodzina białek OmpR to czynniki transkrypcyjne. Posiadają możliwość wiązania się z DNA oraz interakcji z polimerazą RNA w celu aktywacji lub represji transkrypcji (OmpR funkcjonuje jako aktywator i represor transkrypcji w odróżnieniu od PhoB, innego białka zaliczanego do tej klasy, które działa tylko jako aktywator). Ponadto białka te cechują się motywem uskrzydłona helisa-skręt-helisa (winged helix-turn-helix), którym wiążą się z DNA. OmpR, reprezentatywne białko całej grupy, zostało pierwotnie zidentyfikowane u *E. coli* [44, 57, 62, 76]. Białka z grupy NarL stanowią czynniki transkrypcyjne mogące aktywować lub hamować transkrypcję kontrolowanych przez siebie genów. Wyróżniają się motywem poczwórnej helisy (four-helix domain), który zawiera typowy układ wiązania do DNA: helisa-skręt-helisa. NarL reguluje m.in. transkrypcję genów *E. coli* związanych z metabolizmem azotanów i azotynów [9, 31]. Trzecia rodzina reprezentowana jest przez białko NtrC, które jest wzmacniaczem ekspresji genów niezbędnych w metabolizmie azotu u *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Część efektorowa białek tej rodziny składa się z dwóch domen: domeny helisa-skręt-helisa oraz ATP-azy. W przypadku NtrC, pod wpływem fosforylacji dochodzi do oligomeryzacji, a następnie do połączenia się z podjednostką σ^{54} polimerazy RNA oraz hydrolizy ATP lub GTP. Uwolniona energia służy do uformowania kompleksu aktywującego transkrypcję [99].

2.3. Transdukcja sygnału w dwuskładnikowych systemach regulacyjnych

Transfer grupy fosforanowej w obrębie systemu dwuskładnikowego zależy od jego budowy. Najczęściej występujące systemy dwuskładnikowe mają prostą budowę, złożoną z jednej kinazy histydynowej i jednego regulatora odpowiedzi. W takim przypadku odebranie bodźca przez domenę sensorową HK powoduje autofosforylację domeny przekaźnikowej. Następnie grupa fosforanowa jest przenoszona na regulator odpowiedzi, który wywołuje pożądaną odpowiedź [41, 115, 131]. Oczywiście w obrębie tego prostego szlaku fosfotransferu mogą występować różne wariacje. Jedna kinaza histydynowa może regulować kilka regulatorów odpowiedzi lub odwrotnie, kilka kinaz histydynowych reguluje ten sam regulator odpowiedzi, przykładowo pojedyncza kinaza CheA fosforyluje dwa regulatory odpowiedzi, CheY oraz CheB u *E. coli* [14]. W bardziej skomplikowanych systemach dwuskładnikowych spotykamy się ze sztafetowym transferem grupy fosforanowej [115]. Przykładem czteroetapowego systemu sztafetowego transferu grupy fosforanowej jest system KinA-Spo0F-Spo0B-Spo0A, który reguluje inicjację sporulacji *Bacillus subtilis* [6]. Powszechnie występujący „cross-talk” między różnymi systemami dwuskładnikowymi sprawia, że działanie poszczególnych systemów należy rozpatrywać pod kątem różnorodnych interakcji w złożonej sieci oddziaływań wewnątrzkomórkowych. Tylko wtedy możliwe jest precyzyjne określenie całkowitego wkładu konkretnego dwuskładnikowego systemu regulacyjnego w obrębie interaktomu komórki bakteryjnej.

W dobie dynamicznie rozwijających się badań genomicznych powiększa się lista TCS u bakterii, w tym u wielu gatunków bakterii chorobotwórczych. Lista kinaz histydynowych i regulatorów odpowiedzi (udowodnionych oraz potencjalnych) zidentyfikowanych w genomach 555 gatunków bakterii i archeonów jest dostępna w bazie danych [86]. Lista jest uzupełnieniem do pracy „Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems” [45].

Organizacja genów kodujących białkowe komponenty TCS bywa różna. Genom *P. aeruginosa* PA01 koduje 127 białek systemów dwuskładnikowych (64 regulatorów odpowiedzi i 63 kinaz histydynowych). Najczęstszy typ organizacji genów (29 systemów TCS) zawiera gen regulatora odpowiedzi zlokalizowany powyżej genu partnerskiej kinazy sensorowej. Prawie wszystkie operony z tą organizacją zawierają regulator odpowiedzi typu OmpR, i prawdopodobnie systemy te koewoluowały poprzez duplikację wyjściowej pary genów *ompR-envZ* [27]. Dwadzieścia jeden systemów zawiera gen kinazy sensorowej przed genem kodującym regulator odpowiedzi (geny oddzielone są trzema lub

mniejszą liczbą genów). Regulatory odpowiedzi typu NarL funkcjonują zarówno z klasycznym, hybrydowym jak i niekonwencjonalnym sensorem, dlatego prawdopodobnie ewoluowały rekrutując białka dla konkretnej funkcjonalnej pary białek [27]. Geny kolejnych 13 sensorów i 15 regulatorów to tzw. geny „sieroce”, które nie są fizycznie powiązane z żadnymi innymi genami systemu dwuskładnikowego. Taka lokalizacja genów utrudnia identyfikację pary funkcjonalnej białek.

3. Mechanizmy oporności na antybiotyki kontrolowane przez dwuskładnikowe systemy regulacyjne

TCS mogą reagować bezpośrednio na obecność antybiotyków nadając komórce bakteryjnej fenotyp oporności. Istnieją jednakże przypadki gdy to globalne zmiany kontrolowane przez TCS, w odpowiedzi na stresy środowiskowe, prowadzą do zmian fizjologicznych, które pośrednio zwiększają oporność bakterii na antybiotyki. O ile sygnały środowiskowe aktywujące TCS mogą być bardzo różne to indukowane przez te systemy mechanizmy oporności na antybiotyki można zaliczyć do kilku podstawowych kategorii: (1) modyfikacja powierzchni komórki bakteryjnej, (2) zmniejszenie napływu lub zwiększony wypływ leku, (3) zwiększenie produkcji enzymów degradujących antybiotyki oraz (4) inne, alternatywne formy antybiotykoporności, w tym produkcja biofilmu i oporność na antybiotyki wywołana reakcją na stres.

3.1. Modyfikacja powierzchni komórek

Antybiotyki zaliczane do różnych klas działają na komórkę bakteryjną poprzez odmienne mechanizmy prowadząc do śmierci komórki (efekt bakteriobójczy) lub hamując jej podział (działanie bakteriostatyczne). Wszystkie antybiotyki zanim dotrą do miejsca działania muszą pokonać zewnętrzną strukturę komórki bakterii Gram-ujemnych, którą jest błona zewnętrzna (OM, outer membrane). Wiele antybiotyków działa bezpośrednio na OM lub proces biogenezy błony, co prowadzi do jej destabilizacji i w konsekwencji do śmierci komórki. Silnie dodatnio naładowane antybiotyki, takie jak polimyksyna B, kolistyna, aminoglikozydy, a także kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (CAMPs, cationic antimicrobial peptides) wykorzystują ujemny ładunek netto OM. System pobierania polimyksyny B, kolistyny i CAMPs wykorzystuje mechanizm autopromowania, w którym antybiotyki oddziałują z OM tworząc neutralne łatki (patches), co prowadzi do pęknięcia błony i umożliwia w ten sposób przejście leku lub peptydu do peryplazmy. Tutaj amfipatyczna część kationowych cząsteczek interkaluje do błony cytoplazmatycznej, tworząc pory, co prowadzi

do rozpadu błony i śmierci komórki. Taka insercja leku może dotyczyć także błony zewnętrznej [8, 51]. Aminoglikozydy aby przejść przez błonę i osiągnąć swój cel, którym jest rybosom bakteryjny wykorzystują różnicę ładunku [59]. Anionowa natura OM wynika z obecności lipopolisacharydu (LPS), który zawiera ujemnie naładowaną cząsteczkę lipidu A. Bakterie mogą odwrócić ten stan poprzez kowalencyjną modyfikację lipidu A, w wyniku czego OM zostaje naładowana dodatnio, co prowadzi do zmniejszenia lub zniesienia działania antybiotyku. Do trzech najczęstszych modyfikacji lipidu A należy dodanie: (1) 4-aminoarabinozy (4-AA), (2) fosfoetanolaminy (PEtN) lub (3) kwasu palmitynowego, który w tym przypadku nie wpływa na ładunek OM tylko zmniejsza płynność błony [94, 104]. TCS odgrywają główną rolę w modyfikacji lipidów A błony zewnętrznej. Dwa najbardziej znane i najlepiej scharakteryzowane TCS, PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB występują u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych, w tym między innymi u *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Yersinia pestis* [2, 4, 10, 11, 22, 47, 48, 79, 83, 106, 140]. Wreszcie w kilku organizmach Gram-ujemnych, w tym gatunkach *E. coli* i *Salmonella*, TCS Rcs również znany jako system fosfoprzekazywania Rcs, reguluje ekspresję genu *ugd*, którego produkt jest niezbędny do syntezy i włączenia 4-AA do lipopolisacharydu [29, 50, 84, 106]. Ponadto u *E. coli* wykazano, że system Rcs zwiększa ekspresję *pagP* w dojrzałym biofilmie, co prowadzi w efekcie do zwiększenia palmitoilacji lipidu A, a w konsekwencji do zwiększenia oporności na leczenie dodatnio naładowanymi antybiotykami [118].

3.2. Regulacja napływu i wypływu leków

Bakterie regulują procesy wejścia i wyjścia wielu cząsteczek poprzez modulowanie ekspresji poryn i pomp wyrzutu (efflux pump) [28, 40]. Poryny są to białka błony zewnętrznej (OMP), o strukturze β -baryłki, które pozwalają na pasywną dyfuzję cząsteczek. Antybiotyki hydrofilowe, takie jak β -laktamy, aminoglikozydy i fluorochinolony mogą wnikać do komórek przez poryny, a zatem obniżenie poziomu syntezy poryn może zmniejszyć przenikanie antybiotyków [69, 95].

Pompy wyrzutu to aktywne białka transportowe, występujące we wszystkich typach bakterii, niezbędne do utrzymania homeostazy bakteryjnej poprzez wydalanie toksycznych substancji. Oczywiście bakterie wykorzystują je również do usuwania antybiotyków i dlatego często lekooporność jest wynikiem zwiększonej ekspresji lub aktywności pomp wyrzutu [28, 117]. Niektóre typy pomp transportują szeroką gamę związków różniących się strukturalnie, i to one powodują powstanie oporności na wiele leków (MDR, Multi Drug

Resistance). Zwiększona ekspresja pomp wyrzutu jest często pierwszym krokiem do wystąpienia wysokiego poziomu oporności, ponieważ pozwala bakteriom poradzić sobie z niskim lub średnim poziomem antybiotyku, tym samym dając szansę na selekcję mutantów o zwiększonej oporności [40]. Zidentyfikowano wiele pomp wyrzutu aktywowanych przez TCS wśród wielu gatunków bakterii typu MDR [54, 90].

3.3. Regulacja produkcji enzymów modyfikujących/inaktywujących antybiotyki

Mechanizm oporności na antybiotyki, z którym klinicyści spotkali się wkrótce po wprowadzeniu do terapii medycznej penicyliny, polega na syntezie enzymów działających na cząsteczkę antybiotyku. β -laktamazy są to enzymy, które inaktywują antybiotyki β -laktamowe w wyniku hydrolizy pierścienia β -laktamowego. Obecnie β -laktamazy dzieli się na wiele podklas, w tym między innymi penicylinazy, cefalosporynazy czy karbapenemazy [21, 58]. Inne typy enzymów dezaktywują antybiotyki w wyniku bezpośredniej modyfikacji cząsteczki, należą do nich acetylotransferazy aminoglikozydowe i chloramfenikolowe [108].

Jak wykazały badania u *P. aeruginosa* TCS CreBC aktywuje ekspresję chromosomalnego genu *ampC* kodującego β -laktamazę, a kinaza sensorowa CreB bezpośrednio wykrywa aktywność β -laktamu [139]. System BlrAB *Aeromonas* spp. aktywuje trzy β -laktamazy: cefalosporynazę, penicylinazę i karbapenemazę [119]. Innym przykładem jest udział kinazy sensorowej AarG w oporności wielolekopornego (MDR) patogenu szpitalnego *Providencia stuartii* na aminoglikozydy. Mechanizm oporności opiera się na regulacji ekspresji genu kodującego acetylotransferazę aminoglikozydową. Co więcej, mutacja w genie kinazy *aarG* dała początek kilku dodatkowym naturalnym opornościom na tetracyklinę, chloramfenikol i ciprofloksacynę. Fenotyp MDR jest prawdopodobnie efektem derepresji genu *aarP*, kodującego globalny regulator transkrypcji genów związanych z MDR [105].

3.4. Inne, alternatywne formy oporności

Zwiększona produkcja biofilmu

Biofilmy są strukturalnie złożonymi społecznościami bakteryjnymi, które stanowią poważną przeszkodę w leczeniu wielu infekcji [80, 110]. Obecność biofilmu zwiększa tolerancję lub oporność bakterii na antybiotyki na kilka sposobów, w tym poprzez zmniejszenie penetracji leku przez macierz, zróżnicowaną ekspresję genów w biofilmie czy obecność uśpionych populacji komórek lub subpopulacji komórek przetrwałych (*persisters*), które nabyły przejściowy fenotyp antybiotykoodporności [56, 113, 125]. Tworzenie biofilmu

jest procesem złożonym, wieloetapowym oraz ściśle kontrolowanym, m.in. przez systemy TCS [70, 93].

P. aeruginosa jest bakterią dobrze znaną ze swojej roli w zakażeniach płuc pacjentów chorych na mukowiscydozę i ogromnych trudnościach napotykanych w leczeniu z powodu nieprzenikalności biofilmu tworzonego przez tę bakterię. *P. aeruginosa* koduje kilka TCS, które ułatwiają tworzenie biofilmu i przejście z planktonowej do osiadłej formy życia poprzez regulację produkcji egzopolisacharydów Pel i Psl oraz rzęsek czy fimbrii typu IV oraz Cup [81]. Wyjątkowym wśród TCS jest GacSA u *P. aeruginosa* niezbędny do tworzenia biofilmu, ponieważ kinaza sensorowa GacS nie podlega autofosforylacji. Zamiast tego GacS jest aktywowana przez sierocą kinazę sensorową RetS, działającą jako kinaza i fosfataza dla GacS. Systemy Roc1, Rcs/Pvr, PprAB i PilRS regulują ekspresję fimbrii Cup i pilusów typu IV biorących udział w adhezji, w pierwszych etapach tworzenia biofilmu. Kilka kolejnych TCS u *P. aeruginosa* odgrywa istotną rolę w tworzeniu biofilmu na różnych etapach jego rozwoju. BfiSR uczestniczy w inicjacji produkcji biofilmu, BfmSR w dojrzewaniu, a MifSR w tworzeniu mikrokolonii [81].

TCS BfmRS u *A. baumannii*, również reguluje produkcję biofilmu, prawdopodobnie w odpowiedzi na subletalne stężenia chloramfenikolu co prowadzi do zwiększenia oporności na leczenie [42, 68]. System Rcs jest również niezbędny do tworzenia biofilmu m.in. przez szczep *E. coli*, *Proteus mirabilis* i *S. Typhimurium* [29].

Oporność na antybiotyki związana z reakcją na stres

Wiele TCS indukuje komórkową reakcję na stres w odpowiedzi na zmiany środowiskowe wywołane brakiem substancji odżywczych, zmianą temperatury, przerwaniem integralności błony czy stresem oksydacyjnym. Reakcje na stres często skutkują globalnymi zmianami transkrypcyjnymi, niektóre z nich mogą zmienić skuteczność działania antybiotyku. Uważa się, że wiele TCS, w tym PhoPQ, CpxAR, BaeSR, i ParRS działa w ten sposób [30, 102]. Z kolei TCS AmgRS u *P. aeruginosa* aktywowany w odpowiedzi na stres błonowy wywołany akumulacją błędnie zsyntetyzowanych peptydów, utworzonych w wyniku działania aminoglikozydu, zwiększa produkcję niektórych proteaz i uruchamia mechanizmy chroniące błonę [66, 67].

4. Charakterystyka niektórych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych uczestniczących w oporności na związki przeciwbakteryjne w wybranych bakteriach Gram-ujemnych

Oporność bakterii na antybiotyki jest jednym z najważniejszych problemów zdrowia publicznego na całym świecie [58, 135]. Ilość oraz różnorodność

opornych mikroorganizmów rośnie w zastraszającym tempie, utrudniając leczenie zainfekowanych osób. Poniżej przedstawiono charakterystykę kilku gatunków bakterii patogennych, które posiadają dobrze scharakteryzowane TCS modulujące naturalną i gatunkowo specyficzną oporność na antybiotyki.

P. aeruginosa występuje w różnorodnych środowiskach, m.in. glebie i wodzie, jak również w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Jest oportunistycznym patogenem człowieka, wywołującym poważne infekcje u osób z obniżoną odpornością immunologiczną. Przyczynia się do wielu szpitalnych zakażeń, wliczając w to zapalenie płuc pacjentów podłączonych do respiratorów, bakterie ofiar poparzeń oraz wysoką śmiertelność chorych na mukowiscydozę [13, 46, 107, 116]. Trudności w leczeniu infekcji płuc *P. aeruginosa* u osób chorych na mukowiscydozę wynikają z wyjątkowo nieprzenikliwego biofilmu tworzonego przez komórki tego patogenu. Genom *P. aeruginosa* koduje kilka TCS, które ułatwiają tworzenie biofilmu [81]. Ponadto przyczyną braku skuteczności leczenia infekcji wywołanych przez tę bakterię jest wysoka naturalna oporność *P. aeruginosa* na wiele klas antybiotyków. Przeszukiwanie genomu *P. aeruginosa* PAO1 ujawniło kilka genów kodujących enzymy oporności na chloramfenikol, antybiotyki aminoglikozydowe i β -laktamowe [116]. Naturalna oporność wynika także z niskiej przepuszczalności OM oraz wydajnego działania pomp wyrzutu [52]. Poryny to klasa białek OM, które tworzą kanały umożliwiające dopływ substancji odżywczych i usuwanie z komórki produktów odpadowych [88]. Od właściwości poryn zależy poziom naturalnej oporności bakterii Gram-ujemnych na antybiotyki. Główną poryną błony zewnętrznej *P. aeruginosa* jest OprF, która transportuje substancje co najmniej dwa razy wolniej w porównaniu z tymi u np. *E. coli* [88].

Bakteryjne pompy wyrzutu stanowią ważny mechanizm ograniczający działania przeciwbakteryjnych cząsteczek wewnątrz komórki [117]. U *P. aeruginosa* udowodniono rolę pomp typu RND (resistance modulation cell division family) MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN i MexXY-OprM w oporności na antybiotyki [3]. Genom *P. aeruginosa* PAO1, liczący 6,3 Mbp, zawiera około 5,800 potencjalnych otwartych ramek odczytu wśród których około 10% stanowią geny kodujące białka regulatorowe [133]. Należą do nich 64 regulatory odpowiedzi i 63 kinazy histydynowe, które mogą tworzyć 127 dwuskładnikowych systemów regulacyjnych (jedna z najwyższych liczb TCS wśród bakterii) [64, 86]. Warunkują one dużą behawioralną plastyczność tego patogenu oraz pełnią podstawową rolę w procesie wirulencji i oporności na antybiotyki [27, 46, 107, 111].

Acinetobacter baumannii jest Gram-ujemną, niefermentującą pałeczką. Stanowi poważne zagrożenie

dla osób z obniżoną odpornością, doprowadzając do posocznicy, zapalenia opon mózgowych, wsierdza oraz płuc, zakażenia dróg moczowych i ran otwartych. Genom *A. baumannii* ATCC17978 liczy średnio nieco ponad 3,9 Mbp. Część kodująca stanowi 88% genomu i zawiera około 3,700 otwartych ramek odczytu (ORF). Adnotowano 17 kinaz histydynowych i 18 regulatorów odpowiedzi TCS [64, 83, 86].

S. Typhimurium jest podstawowym jelitowym patogenem ludzi oraz zwierząt, wywołującym stany zapalne oraz niezbyt żołądka i jelit. Infekcja organizmu zachodzi zwykle poprzez spożycie zakażonego pożywienia lub wody. Salmonelloza od lat znajduje się na liście najważniejszych zoonoz w Unii Europejskiej [35]. Rozprzestrzenianie się bakterii z przewodu pokarmowego w głąb organizmu może zachodzić z udziałem fagocytów, gdzie *Salmonella* zdolna jest do namnażania [38]. Genom *S. Typhimurium* LT2 liczy 4,8 Mbp. W jego obrębie zidentyfikowano około 4,500 ORF oraz 32 kinazy histydynowe i 33 regulatory odpowiedzi TCS [7, 64, 77, 86].

Do rodzaju *Yersinia* należą dwa enteropatogeny, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*, które są czynnikami etiologicznymi jersinozy, odzwierzęcej choroby zakaźnej, która może przyjmować różne postaci kliniczne, najczęściej żołądkowo-jelitowe [34, 43]. Do zakażenia pałeczkami jersinia (*Y. pseudotuberculosis* znacznie rzadsze niż *Y. enterocolitica*) dochodzi w wyniku spożycia zanieczyszczonej wody lub żywności [71]. Jersinoza zajmowała przez ostatnie lata trzecie miejsce na wykazie najważniejszych zoonoz w Europie, zaraz za salmonellozą oraz kamylobakteriozą, w 2018 roku prevalencja zakażeń zmalała [35]. Większość infekcji wywołanych *Y. enterocolitica* dotyczy jelit i ma charakter samoograniczający, nie wymaga terapii antybiotykowej. Jednakże u osób z obniżoną odpornością immunologiczną dochodzi do posocznicy lub infekcji inwazyjnej, które kończą się 50% śmiertelnością. Cechą charakterystyczną pałeczek *Y. enterocolitica* jest naturalna oporność na penicylinę, ampicylinę oraz pierwszą generację cefalosporyn. Oporność na te antybiotyki β -laktamowe jest spowodowana produkcją dwóch β -laktamaz kodowanych przez zlokalizowane na chromosomie geny *blaA* i *blaB* [12, 114].

W genomie *Y. enterocolitica* (szczep 8081 o wielkości ponad 4,6 Mbp, i 4037 ORF) zidentyfikowano 30 kinaz histydynowych i 34 regulatory odpowiedzi TCS [64, 86, 120].

Y. pseudotuberculosis jest obiektem intensywnych badań naukowych na świecie gdyż jest bezpośrednim przodkiem *Y. pestis* (pałeczki dżumy), gatunku który wyewoluował stosunkowo niedawno tj. około 1,500–20 000 lat temu [1]. Genom *Y. pseudotuberculosis* (szczep IP32953) ma wielkość ponad 4,7 Mbp, posiada 4,100 ORF, zidentyfikowano w nim 26 kinaz histydynowych i 28 regulatorów odpowiedzi TCS [37, 64, 86].

Aeromonas hydrophila jest bakterią izolowaną z różnorodnych środowisk wodnych, wliczając do tego butelkowaną, chlorowaną oraz studniową wodę. Pierwotnie gatunki *Aeromonas* postrzegane były jako bakterie oportunistyczne, infekujące pacjentów z obniżoną odpornością, jednakże ostatnie doniesienia o wywoływaniu chorób jelitowych i pozajelitowych sugerują, że możemy mieć do czynienia z nowym chorobotwórczym patogenem, niezależnie od stanu odporności organizmu gospodarza. Liczący 4,7 Mbp genom *A. hydrophila* ATCC 7966 wykazuje duże możliwości przystosowawcze do wodnego trybu życia, jak również zdolność do wywoływania wielu różnych chorobotwórczych procesów. Wśród ponad 4,100 genów kodujących białka zidentyfikowano 46 kinaz histydynowych i 48 regulatorów odpowiedzi TCS [64, 86, 109].

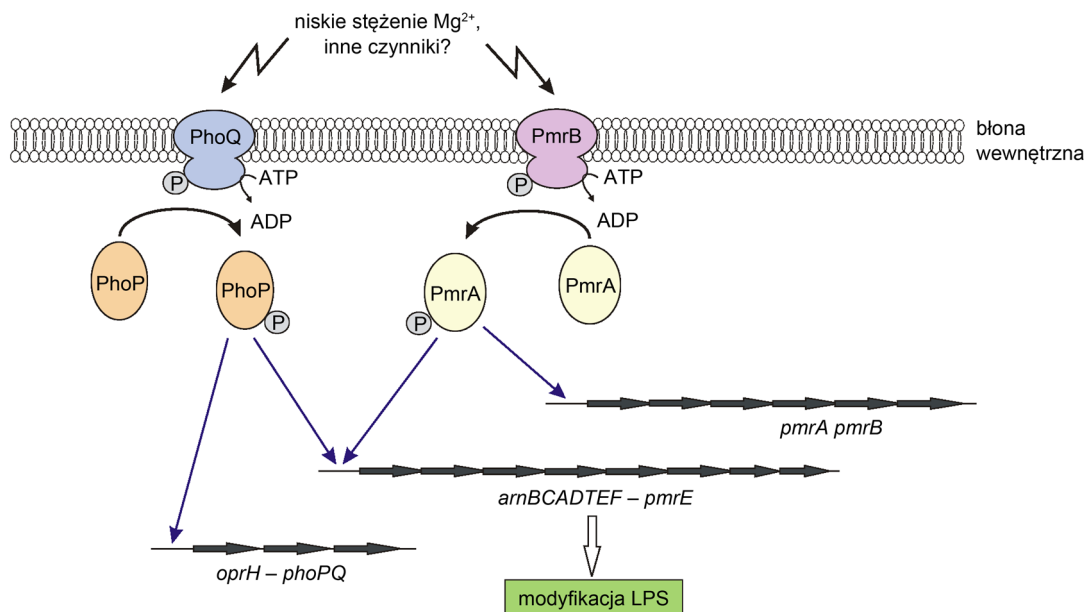
4.1. Systemy PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne PhoP-PhoQ (PhoPQ) oraz PmrA-PmrB (PmrAB) są jednymi z najlepiej scharakteryzowanych TCS i odgrywających główną rolę w modyfikacji lipid A lipopolisacharydu, zlokalizowanego w OM. Systemy te zidentyfikowano u wielu bakterii Gram-ujemnych, m.in. *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *A. baumannii* czy *Yersinia* spp., chociaż szlak prowadzący do modyfikacji lipid A jest różny w zależności od gatunku [47]. Oba te systemy u *P. aeruginosa* uczestniczą w adaptacyjnej odpowiedzi na niskie stężenie jonów Mg^{2+} oraz warunkują oporność na antybiotyki i CAMPs [46]. PhoQ i PmrA to kinazy zlokalizowane w błonie wewnętrznej podlegające

autofosforylacji w środowisku o niskim stężeniu Mg^{2+} . Aktywowane kinazy sensorowe fosforylują partnerskie regulatory odpowiedzi PhoP i PmrA, które z kolei pozytywnie regulują transkrypcję swoich operonów, jak również operon *arnBCADTEF* (w literaturze opisywany także jako *pmrHFIIJKLM*) (Ryc. 2) [46].

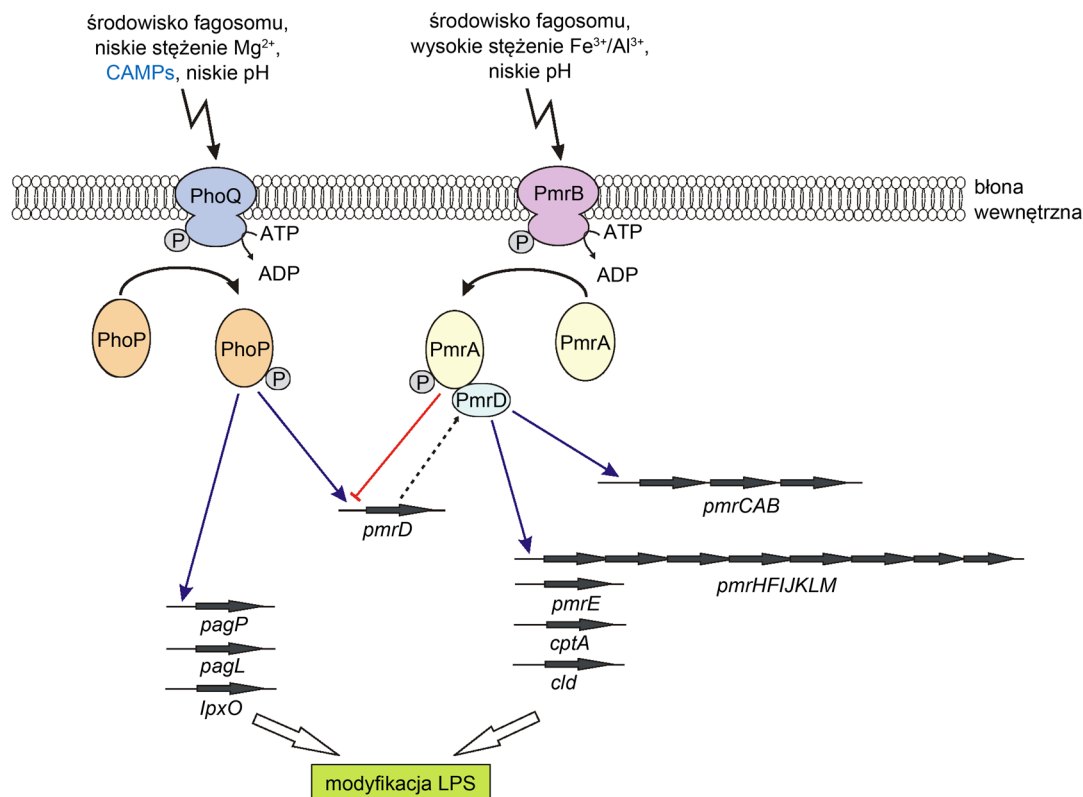
Szlak ArnBCADTEF modyfikuje lipid A poprzez dodanie 4-aminoarabinozy (4-deoksy-4-amino-L-arabinozy), redukując ładunek ujemny LPS. Efektem tej modyfikacji jest zmniejszenie przenikania przez błonę zewnętrzną CAMPs, polimiksyne B czy aminoglikozydów (m.in. streptomycyny, kanamycyny i amikacyny), co prowadzi do zwiększenia oporności na te związki [46, 72, 73, 78, 83]. I odwrotnie, w warunkach wysokiego stężenia Mg^{2+} regulatory PhoP i PmrA są defosforylowane i uznaje się je za nieaktywne. Wydaje się jednak, że niskie stężenie Mg^{2+} nie jest jedynym sygnałem środowiskowym, który ma wpływ na aktywację/fosforylację PhoP. Badania wykazały, że regulator PhoP, w obecności spermidyny, ale niezależnie od stężenia Mg^{2+} jest niezbędny do zwiększenia oporności *P. aeruginosa* na polimiksyne B, kolistyne, aminoglikozydy i chinolony [46].

System PhoPQ obecny w *S. Typhimurium* jest aktywowany podczas procesu fagocytozy bakterii przez makrofagi. Poza tym, czynnikami aktywującymi kinazę PhoQ i szlak fosfotransferu z kinazy na białko regulatora PhoP jest małe stężenie Mg^{2+} , niskie pH i niektóre peptydy przeciwdrobnoustrojowe (Ryc. 3) [47]. System PhoPQ *S. Typhimurium* pełni rolę w modulowaniu procesu wirulencji u zwierząt (w tym człowieka), ale też w oporności na peptydy antybakteryjne oraz warunkuje



Ryc. 2. Model funkcjonowania TCS PhoPQ i PmrAB *P. aeruginosa*

Kinazy sensorowe PhoQ i PmrB oraz ich partnerskie regulatory odpowiedzi PhoP i PmrA. Operon *arnBCADTEF* koduje szlak enzymatycznej modyfikacji lipid A w LPS. Ufosforylowane regulatory (PhoP-P, PmrA-P) aktywują ekspresję odpowiednich operonów. Wygięta czarna strzałka – fosforylacja regulatora przez partnerską kinazę histydynową, strzałka niebieska – pozytywna regulacja [na podstawie 46].



Ryc. 3. Model działania i interakcji pomiędzy TCS PhoPQ i PmrAB u *Salmonella* spp.

Kinazy sensorowe PhoQ i PmrB oraz ich partnerskie regulatory odpowiedzi PhoP i PmrA. Ufosforylowane PhoP i PmrA zwiększają ekspresję genów/operonów biorących udział w modyfikacji lipidu A w LPS. Białko PmrD wiążąc regulator PmrA-P stabilizuje go w stanie ufosforylowanym (aktywacja). Aktywowany PmrA hamuje transkrypcję genu *pmrD* (wskaźnik czerwony). Wygięta czarna strzałka – fosforylacja regulatora przez kinazę histydynową. Strzałka niebieska – pozytywna regulacja [na podstawie 47].

przeżywalność bakterii wewnątrz makrofagów. Razem z systemem PmrAB uczestniczy w modyfikacji LPS przez dodanie 4-aminoarabinozy do lipidu A. Regulator PhoP aktywuje transkrypcję genów *pag* w fagosomach makrofagów, których produkty są niezbędne w warunkowaniu oporności na kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Gen *pagB* koduje palmitoilotransferazę, która modyfikuje lipid A poprzez dodanie kwasu palmitylowego [106]. Ponadto PhoP kontroluje TCS PmrAB w wyniku regulacji ekspresji genu *pmrD* [47, 48]. Dwuskładnikowy system regulacyjny PmrAB jest kodowany przez geny *pmrA* (regulator odpowiedzi, PmrA) oraz *pmrB* (kinaza histydynowa, PmrB), które razem z genem *pmrC* (fosfotransferaza fosfoetanolaminowa; pEtN) tworzą operon *pmrCAB*. PmrAB reguluje ekspresję ponad 20 genów, których liczba prawdopodobnie jest znacznie większa i może wynosić nawet około 100. Wśród nich znajdują się geny odpowiadające za wirulencję oraz oporność na antybiotyki (polimyksynę B) i peptydy antybakteryjne [47, 49, 75]. System PmrAB może być aktywowany w sposób bezpośredni lub pośredni. Sygnałami bezpośrednio odbieranymi przez domenę sensorową kinazy histydynowej PmrB są jony żelaza (Fe^{3+}), glinu (Al^{3+}), niskie pH oraz proces fagocytozy bakterii przez makrofagi. Wszystkie wymienione czynniki prowadzą do aktywacji (autofosforyla-

cji) białka PmrB, rozpoczynając tym samym proces transdukcji sygnału (fosforylację regulatora PmrA), w wyniku czego dochodzi do regulacji ekspresji odpowiednich genów [136]. Pośrednia aktywacja systemu PmrAB zachodzi na drodze aktywacji genu *pmrD* przez system PhoPQ. W wyniku ekspresji tego genu powstaje 9,6 kDa białko PmrD, które wiążąc się do regulatora odpowiedzi PmrA stabilizuje jego ufosforylowaną formę (zapobiega defosforylacji) (Ryc. 3) [47, 61]. Ufosforylowany PmrA aktywuje ekspresję operonu *pmrCAB*, a ponadto może hamować transkrypcję *pmrD*, tworząc układ regulatorowy oparty na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [36]. Możliwość współdziałania systemów PhoPQ z PmrAB poprzez białko PmrD jest unikatowe dla *Salmonella*. Przykładowo, białko PmrD znajdujące się w *E. coli* jest zupełnie odmienne, bowiem nie wykazuje zdolności do pośredniczenia w aktywacji PmrAB [132]. Modyfikacje LPS, w których pośredniczą oba TCS, pomagają przeżyć bakteriom w komórkach gospodarza jak i w środowisku zewnętrznym.

Y. pseudotuberculosis posiada siedmiogenowy operon *pmrF* (*pmrHFIIJKLM*), który wykazuje homologię z odpowiednikiem występującym u *S. Typhimurium* [74]. Operon ten jest odpowiedzialny za addycję 4-aminoarabinozy do lipidu A, skutkującą wzrostem oporności *Y. pseudotuberculosis* na polimyksynę B oraz

cecropinę B. Genetyczne podstawy ekspresji operonu *pmrF* są inne u *S. Typhimurium* i *Y. pseudotuberculosis*. Podczas gdy regulacja jego ekspresji u *Salmonella* zachodzi z udziałem systemów PmrAB oraz PhoPQ, tak u *Y. pseudotuberculosis* jest kontrolowany bezpośrednio przez dwuskładnikowy system PhoPQ. System PmrAB obecny u *Y. pseudotuberculosis* nie uczestniczy w kontroli operonu *pmrF*. Białka tego systemu wykazują niskie podobieństwo z odpowiednikami u *S. Typhimurium*, ponadto nie tworzą one operonu z genem *pmrC*, który nie występuje w jej genomie [74].

Adams i wsp. [2] wykazali, że dwuskładnikowy system regulacyjny PmrAB jest zaangażowany w kontrolę oporności na kolistynę u bakterii *A. baumannii*. Potwierdzono doświadczalnie, iż mutacja w genie *pmrA* prowadzi do jego konstytutywnej ekspresji, w rezultacie warunkując obserwowaną oporność. W genomie *A. baumannii* nie stwierdzono obecności zarówno genów *phoPQ*, jak i *pmrD*, ponadto brak jest genów odpowiedzialnych za biosyntezę i addycję 4-aminoarabinozy do lipidu A. Sugeruje to, że mechanizm działania PmrAB *A. baumannii* jest inny od analogów obecnych u *P. aeruginosa* oraz *S. Typhimurium*. Molekularny cykl przemian aktywowanych działaniem PmrAB pozostaje nieznan [2].

4.2. System ParR-ParS

Oporność wielolekowa jest poważnym problemem w leczeniu infekcji *P. aeruginosa*, stąd coraz częściej w praktyce klinicznej stosowane są polimyksyna B i kolistyna. Jak wykazują badania, w odpowiedzi na stres selekcyjny, jakim jest ekspozycja bakterii na niskie, subinhibitorowe stężenia polimyksyn i niektórych peptydów antydrobnoustrojowych może dojść do wykształcenia mechanizmów warunkujących zmniejszoną wrażliwość na te czynniki antybakteryjne. Wiadomo, że modyfikacja lipidu A lipopolisacharydu jest kluczowym składnikiem adaptacyjnej oporności na peptydy antydrobnoustrojowe, ale mechanizm leżący u podstaw tej regulacji u *P. aeruginosa* długo pozostawał nieznan. Dwuskładnikowe systemy PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB, które u *Salmonella* kontrolują modyfikację LPS w warunkach niskiej zawartości Mg^{2+} i w obecności CAMPs nie odgrywają istotnej roli w tej adaptacyjnej oporności *P. aeruginosa*. Dopiero w 2010 roku zidentyfikowano i scharakteryzowano nowy dwuskładnikowy system wpływający na oporność adaptacyjną *P. aeruginosa* na polimyksynę, tj. system ParR-ParS [39]. System ParR-ParS (ParRS) w odróżnieniu od systemów PhoPQ i PmrAB *P. aeruginosa* reagujących na niskie stężenie Mg^{2+} , jest aktywowany w obecności subinhibitorowych stężeń polimyksyny, kolistyny czy indolicydyny. Oporność na polimyksynę B i kolistynę oraz peptydy antybakteryjne jest skutkiem modyfikacji LPS

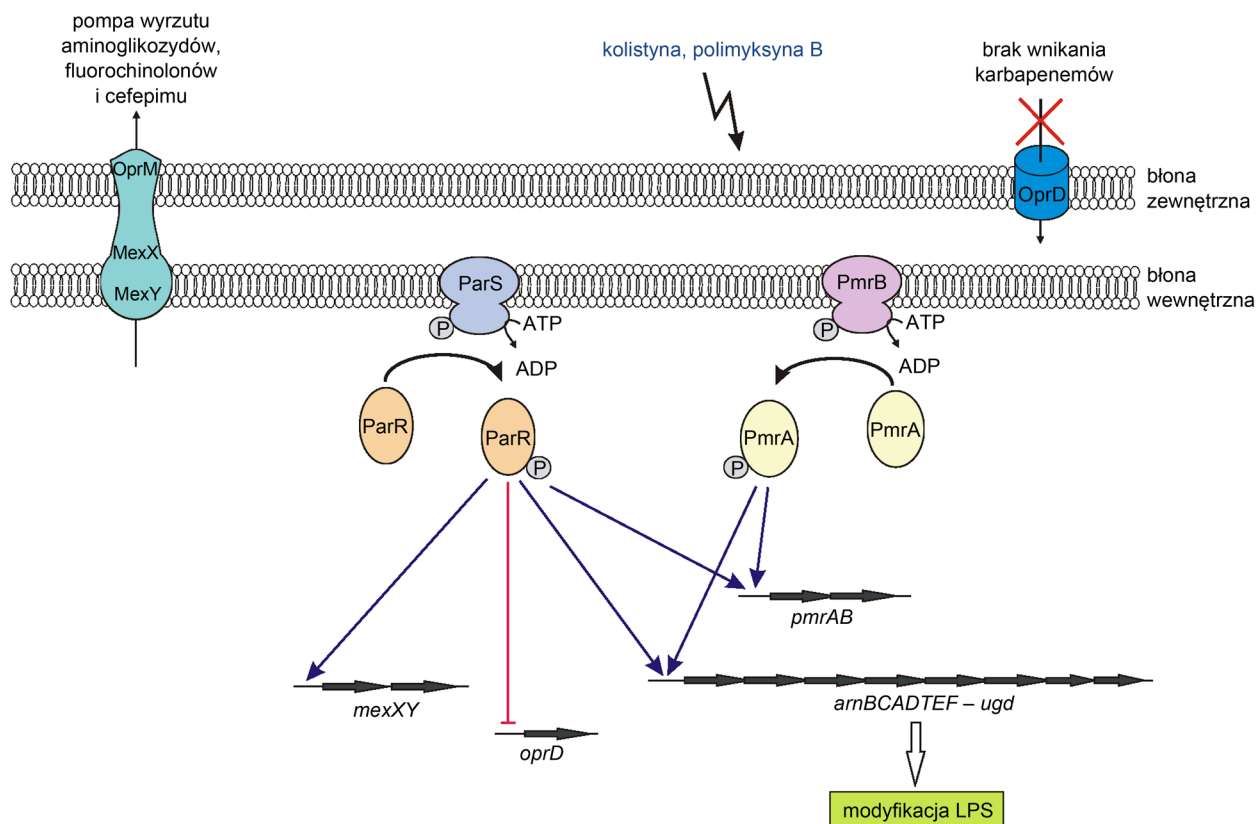
na drodze addycji 4-aminoarabinozy do lipidu A, a jej molekularny mechanizm polega na kontroli aktywacji operonu *arnBCADTEF* przez ufosforylowany regulator odpowiedzi ParR [39]. Operon ten wydaje się warunkować oporność *P. aeruginosa* na wiele związków antybakteryjnych, co znajduje potwierdzenie w jego regulacji aż przez trzy dwuskładnikowe systemy. Odkrycie molekularnych podstaw oporności na kolistynę i polimyksynę B stanowi przełom w leczeniu pacjentów chorych na mukowiscydozę, którzy wykazują objawy zakażenia *P. aeruginosa*. Wyniki badań sugerują, że system ParRS może modulować także oporność na aminoglikozydy, fluorochinolony i β -laktamy na drodze zahamowania ekspresji genu *oprD* oraz aktywacji operonu *mexXY* [85, 130]. Represja *oprD* skutkuje obniżeniem ilości poryny OprD, przez którą do komórki dostają się karbapenemy. Ekspresja *mexXY* umożliwia syntezę dwóch białek: MexX i MexY, które wraz z kodowanym oddzielnie białkiem OprM tworzą pompę MexXY/OprM usuwającą aminoglikozydy, fluorochinolony i cefepim (Ryc. 4) [85].

4.3. Systemy CzcR-CzcS i CopR-CopS

Wśród dwuskładnikowych systemów regulacyjnych występujących u *P. aeruginosa* odkryto dwa, które warunkują krzyżową oporność na metale ciężkie oraz antybiotyki. Są nimi system CzcR-CzcS (CzcRS) oraz CopR-CopS (CopRS) [23, 100]. System CzcRS nadaje oporność na jony cynku oraz antybiotyk imipenem z grupy karbapenemów [127]. Jego aktywacja w obecności Zn^{2+} prowadzi do transkrypcji operonu *czcCBA* kodującego pompę wyrzutu. Dzięki niej bakterie wykazują wysoką tolerancję na jony cynku. Jednocześnie regulator odpowiedzi CzcR wpływa negatywnie na ekspresję genu *oprD* kodującego porynę, przez którą wnikają do komórki karbapenemy [100]. Z kolei, system CopRS indukuje oporność na jony miedzi, cynku oraz imipenem. W obecności Cu^{2+} dochodzi do aktywacji tego systemu, który może wpływać na spadek ilości poryny OprD lub aktywować ekspresję operon *czcRS*, wywołując efekt oporności na cynk oraz imipenem [23].

4.4. System PprB-PprA

Dwuskładnikowy system PprB-PprA (PprBA) jest odpowiedzialny za kontrolę przepuszczalności błony zewnętrznej *P. aeruginosa*. Geny kodujące kinazę histydynową PprA oraz regulator odpowiedzi PprB tworzą operon *pprAB*. Zmniejszona przepuszczalność osłon komórkowych powoduje dużą oporność na antybiotyki aminoglikozydowe (wliczając w to kanamycynę, streptomycynę, gentamycynę, amikacynę i tobramycynę). Antybiotyki te ze względu na hamowanie translacji białek poprzez łączenie się z podjednostką 30S rybo-



Ryc. 4. Model funkcjonowania TCS ParSR i PmrAB *P. aeruginosa*

Kinazy sensorowe ParS i PmrB oraz ich partnerskie regulatory odpowiedzi ParR i PmrA. Operon *mexXY* koduje komponenty pompy wyrzutu MexXY-OprM, operon *arnBCADTEF-ugd* odpowiada za modyfikację lipidu A w LPS, operon *pmrAB* koduje składowe TCS PmrAB, gen *oprD* koduje porynę OprD. Wygięta czarna strzałka – fosforylacja regulatora przez kinazę histydynową. Strzałka niebieska – pozytywna regulacja, wskaźnik czerwony – negatywna regulacja [na podstawie 85].

somu są stosowane w szerokim zakresie wobec różnych infekcji bakteryjnych. Zwykle u *P. aeruginosa* oporność na aminoglikozydy jest dodatkowo warunkowana przez aktywność pompy wyrzutu MexXY/OprM. Molekularny mechanizm kontroli przepuszczalności błony warunkujący oporność jest nieznan [129]. Badania ostatnich lat wykazały, że system PprA-PprB reguluje poziom syntezy pilusów typu IV, adhezyny BapA i fimbrii CupE, zaangażowanych w tworzenie biofilmu oraz, że w warunkach głodu węglowego dochodzi do indukcji ekspresji *pprB*, a także genów regulonu PprB [128].

4.5. System CbrB-CbrA

Dwuskładnikowy system CbrB-CbrA (CbrBA) jest przede wszystkim powiązany z metabolicznym wykorzystaniem węgla i azotu przez *P. aeruginosa*. Yeung i wsp. [138] wykazali, że dodatkowo uczestniczy on w procesie wirulencji oraz kilku innych powiązanych procesach fizjologicznych, takich jak formowanie biofilmu, cytotoksyczność, ruch rozpełzliwy oraz oporność na antybiotyki. Analizy funkcjonalne kinazy sensorowej CbrA u *P. putida* KT2440 dowiodły, że CbrA posiada kilka domen, silnie konserwowanych we wszystkich gatunkach *Pseudomonas*. Na N-końcu białka zlokaliz-

owana jest nietypowa dla kinaz TCS domena transbłonowa o funkcji transportera (symportera), która prawdopodobnie pełni funkcję ko-sensora [82, 134].

W regulacji oporności na antybiotyki, kinaza histydynowa CbrA najprawdopodobniej nie współdziała z powiązaniem regulatorem odpowiedzi CbrB, lecz pośredniczy w transferze grupy fosforanowej na inne regulatory odpowiedzi (cross-talk). W ten sposób CbrA reguluje ekspresję wielu genów, w tym operonów *phoPQ*, *pmrAB* oraz *arnBCADTEF*, które są odpowiedzialne za oporność na peptydy antybakteryjne i antybiotyki (m.in. polimiksynę B, kolistynę, ciprofloksacynę i tobramycynę). Dotychczas nie dokonano jednoznacznej analizy powiązania białka CbrA z potencjalnymi regulatorami odpowiedzi [138].

4.6. System BlrA-BlrB

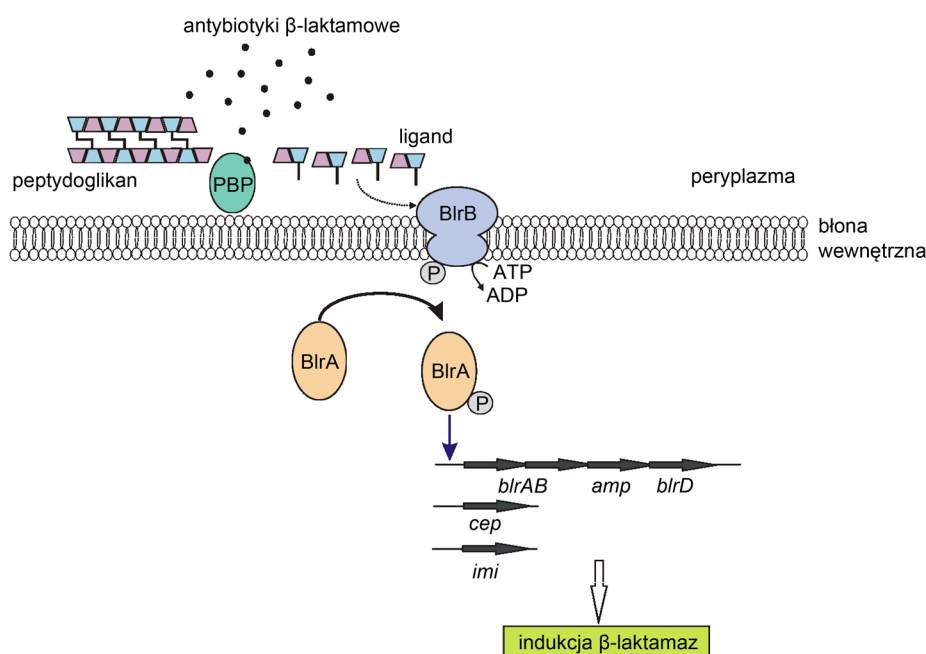
Oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe wynika najczęściej z produkcji β -laktamaz, enzymów które hydrolizując cząsteczkę antybiotyku prowadzą do jego inaktywacji. U wielu organizmów obecność w chromosomie genów β -laktamaz jest naturalna, a ich ekspresja jest indukowana w obecności cząsteczki β -laktamu, tj. wtedy gdy synteza peptydoglikanu ulega

zahamowaniu. Klasycznym mechanizmem regulującym produkcję β -laktamaz u bakterii Gram-ujemnych jest system AmpR, zidentyfikowany u wielu przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* [53]. Głównym regulatorem w tym systemie jest białko AmpR, czynnik transkrypcyjny z rodziny LysR aktywujący lub hamujący transkrypcję genu β -laktamazy w zależności od obecności aktywatorów (anhydro-muramylo-tri, tetra lub penta-peptydy – produkty degradacji peptydoglikanu) oraz represora (UDP-muramylo-pentapeptyd – intermediat w szlaku biosyntezy peptydoglikanu). System AmpR nie funkcjonuje u przedstawicieli rodzaju *Aeromonas*, syntetyzujących różne rodzaje β -laktamaz [126]. W większości gatunków zidentyfikowano trzy odrębne enzymy, tj. karbapenemazy klasy B (CphA lub Imi), cefalosporynazy klasy C (Cep) oraz penicylinazy klasy D hydrolizujące oksacyliny i kloksacylina (Amp). Wszystkie trzy typy enzymów znajdują się pod kontrolą dwuskładnikowego systemu regulacyjnego BlrA-BlrB (BlrAB) [91]. Badania przeprowadzone na *A. hydrophila* wykazały, że kinaza histydynowa BlrB nie wyczuwa cząsteczki β -laktamu bezpośrednio (podobnie jak to ma miejsce w systemie AmpR) a jest najprawdopodobniej aktywowana przez ligand akumulujący się w peryplazmie w wyniku hamowania przez β -laktam białek wiążących penicylinę (penicillin binding proteins; PBPs), [119]. Białka PBP to grupa enzymów biorących udział w syntezie, modyfikacji i dojrzewaniu peptydoglikanu (PG). Wielkocząsteczkowe PBP są transglikozylazami, wiążącymi disacharydopentapeptydy (podstawowe jednostki

budulcowe PG) oraz transpeptydazami, które uczestniczą w tworzeniu peptydowych wiązań poprzecznych pomiędzy pentapeptydami podjednostek budulcowych (tworzenie wiązania pomiędzy D-alaniną, czwartym aminokwasem w peptydzie donorowym a kwasem diaminopimelinowym (DAP), tj. trzecim aminokwasem w peptydzie będącym akceptorem, co skutkuje usunięciem końcowej D-alaniny (piąty aminokwas w peptydzie donorowym)). Nie wszystkie pentapeptydy uczestniczą w tworzeniu wiązań krzyżowych ponieważ w wyniku aktywności karboksypeptydaz, niskocząsteczkowych PBP, usuwana jest terminalna D-alanina w pentapeptydzie, a powstający tetrapeptyd nie jest substratem dla transpeptydaz. Tak więc zahamowanie aktywności PBP skutkuje akumulacją disacharydopentapeptydów, które reagując z kinazą BlrB prowadzą do jej autofosforylacji. Następnie grupa fosforanowa jest przenoszona na regulator odpowiedzi BlrA, który aktywowany (ufosforylowany) wiąże się do specyficznej sekwencji w obszarze promotorowym genów kodujących β -laktamazy Amp, Cep i Imi aktywując ich transkrypcję. Skutkuje to zwiększoną produkcją enzymów oraz wydzieleniem ich na zewnątrz komórki (Ryc. 5) [119].

4.7. System OmpR-EnvZ

Archetypem prostego szlaku sygnałowego TCS, składającego się z pary białek uczestniczących w transdukcji sygnału ze środowiska, jest szlak sygnałowy OmpR-EnvZ. Po raz pierwszy opisany u niepatogen-

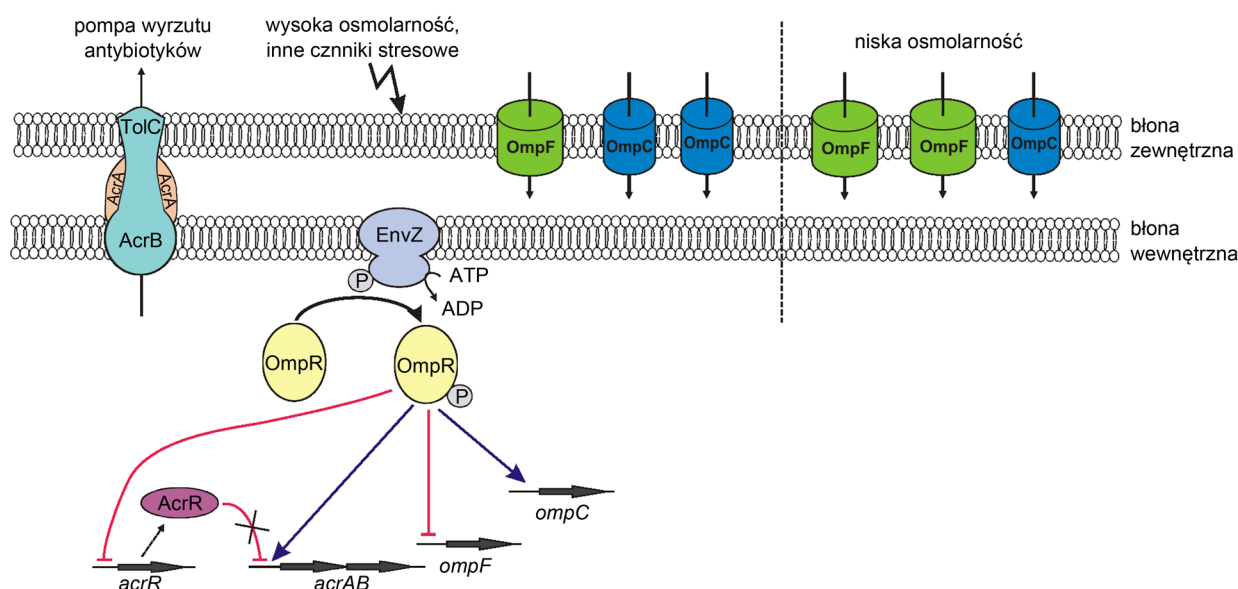


Ryc. 5. Model prezentujący rolę TCS BlrA-BlrB w indukcji β -laktamaz u *Aeromonas* spp.

BlrB – kinaza sensorowa, BlrA – regulator odpowiedzi, PBP – białka wiążące penicylinę, ligand – disacharydopentapeptyd wiążący się z BlrB. Geny *amp*, *cep*, *imi* kodują enzymy hydrolizujące antybiotyki β -laktamowe, odpowiednio: cefalosporynazę, penicylinazę i karbapenemazę. Wygięta czarna strzałka – fosforylacja regulatora przez kinazę histydynową. Strzałka niebieska – pozytywna regulacja, strzałka z linią przerywaną – wiązanie ligandu z kinazą BlrB [na podstawie 119].

nej *E. coli* K-12 stał się modelowym obiektem badań nad procesami fosforylacji i defosforylacji białek TCS, a także osmoregulacją ekspresji genów białek porynowych OmpC i OmpF [5]. System ten składa się z transbłonowej kinazy histydynowej EnvZ, która odbierając sygnał ze środowiska (zmiany w osmolarności, pH, temperatury, obecności substancji odżywczych) przenosi go w postaci grupy fosforanowej na partnerskie białko cytoplazmatyczne – regulator odpowiedzi OmpR. Ufosforylowane białko OmpR wiąże się z regionem promotorowym genów i w sposób pozytywny lub negatywny reguluje ich transkrypcję. Funkcja systemu OmpR-EnvZ w regulacji ekspresji genów jest od lat przedmiotem intensywnych badań u różnych gatunków bakterii [26]. Wyniki sugerują, że białko OmpR może regulować transkrypcję wielu genów, często specyficznych dla określonego gatunku bakterii i tym samym modulować różne funkcje fizjologiczne. System OmpR-EnvZ scharakteryzowano u różnych gatunków bakterii chorobotwórczych, w tym *S. enterica*, *A. baumannii* [33, 121] oraz patogennych gatunków *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*) [20]. Badania wykazały, że obniżony poziom produkcji OmpC i OmpF prowadzi do zwiększenia oporności na β -laktamy u *E. coli* i *S. enterica*. Wyniki badań dowiodły także znaczenia białek błony zewnętrznej (poryn OmpC i OmpF) w oporności *Y. enterocolitica* na antybiotyki β -laktamowe i tetracyklinę [16, 19]. Analiza parametrów przepuszczalności OM, jak i badania w sztucznej dwuwarstwie lipidowej (black lipid bilayers), wykazały znaczenie obu poryn

OmpC i OmpF jako kanałów dyfuzyjnych dla niskocząsteczkowych antybiotyków β -laktamowych oraz jonów [17, 18]. Prace nad osmotyczną regulacją ekspresji poryn OmpC i OmpF *Y. enterocolitica*, dowiodły, że w podłożu o niskiej osmolarności preferencyjnie syntetyzowana jest poryna OmpF, podczas gdy w warunkach wysokiej osmolarności w OM dominuje OmpC [17, 19]. Modułacja poziomu syntezy poryny OmpC i OmpF jest klasycznym przykładem odpowiedzi adaptacyjnej komórki, gdyż zwiększenie syntezy poryny OmpC (o mniejszej średnicy) w warunkach wysokiej osmolarności (np. jelita) i zmniejszenie równocześnie OmpF (poryna o większej średnicy) pozwala na ograniczenie dyfuzji substancji szkodliwych do wnętrza komórki. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z dzikim szczepem *Y. enterocolitica* oraz jego izogenicznym mutantem defektywnym w produkcji OmpR ($\Delta ompR$) dostarczyły danych wskazujących na znaczenie regulatora OmpR w regulacji poryn, a także w procesie tworzenia biofilmu [20, 87]. Dalsze analizy genetyczne i proteomiczne wykazały, że AcrB, białkowy składnik pompy wyrzutu typu MDR AcrAB-TolC znajduje się pod pozytywną kontrolą OmpR, który ponadto negatywnie reguluje ekspresję genu *acrR* kodującego represor operonu *acrAB* [103]. OmpR działając jako represor *acrR* oraz aktywator *acrAB* uczestniczy w pozytywnej regulacji ekspresji genów kodujących komponenty pompy wielolekowej AcrAB-TolC, odpowiedzialnej za wypływ z komórki bakteryjnej wielu antybiotyków, soli żółciowych oraz detergentów (Ryc. 6). Otrzymane dane pozwoliły na



Ryc. 6. Model funkcjonowania systemu OmpR-EnvZ w regulacji syntezy poryn OmpC i OmpF oraz pompy wyrzutu AcrAB-TolC u *Y. enterocolitica*

EnvZ – kinaza sensorowa, OmpR – regulator odpowiedzi. Operon *acrAB* koduje białka AcrA i AcrB, komponenty pompy wielolekowej AcrAB-TolC. Ekspresja operonu *acrAB* znajduje się pod kontrolą represora AcrR. OmpR pozytywnie reguluje ekspresję *acrAB*, a negatywnie *acrR*. OmpR w warunkach wysokiej osmolarności indukuje ekspresję genu *ompC*, a hamuje *ompF*. OmpC – poryna o mniejszej średnicy, OmpF – poryna o większej średnicy. Wygięta czarna strzałka – fosforylacja regulatora OmpR przez kinazę EnvZ. Strzałka niebieska – pozytywna regulacja, wskaźnik czerwony – negatywna regulacja [na podstawie wyników badań autorów niniejszej pracy przeglądowej].

wysunięcie wniosków o konsekwencjach funkcjonalnych wynikających z aktywności OmpR i przyczyniły się do zrozumienia molekularnych mechanizmów, które mają wpływ na wrażliwość *Y. enterocolitica* na związki antybakteryjne.

5. Podsumowanie

Oporność bakterii na związki antybakteryjne opiera się na kilku głównych strategiach, do których należą: inaktywacja związku, mechanizm jego aktywnego usuwania z komórki, modyfikacja miejsca działania oraz zmiany w przepuszczalności osłon komórkowych. Dwuskładnikowe szlaki sygnałowe regulują pozytywnie ekspresję genów warunkujących oporność, w odpowiedzi na specyficzne bodźce środowiskowe, m.in. obecność określonych antybiotyków oraz jonów. Duża liczba oraz różnorodność systemów TCS u chorobotwórczych bakterii Gram-ujemnych świadczy o roli jaką odgrywają w adaptacji do niesprzyjającego środowiska organizmu gospodarza. W dobie dynamicznie rozwijających się badań genomicznych i proteomicznych wiedza o systemach TCS nieustannie wzrasta. Coraz więcej jest dowodów na obecność mechanizmów autoregulacyjnych, a także zjawiska wymiany informacji między systemami (cross talk) w wyniku bezpośrednich interakcji pomiędzy białkami tworzącymi szlak sygnałowy, co prowadzi do zwiększenia efektywności ich działania.

Systemy TCS ze względu na powszechność występowania, wysoką konserwatywność komponentów tych systemów oraz ich nieobecność w komórkach ssących mogą być celem dla działania naturalnych lub syntetycznych inhibitorów [122, 124]. Efektywna inhibicja TCS mogłaby jeśli nie zastąpić, to w przyszłości uzupełnić klasyczną antybiotykoterapię i przyczynić się do skutecznego zwalczania infekcji wywołanych przez bakterie wielolekooporne.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska) przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2011/01/B/NZ6/01845

Piśmiennictwo

- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E.: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 14043–14048 (1999)
- Adams M.D., Nickel G.C., Bajaksouzian S., Lavender H., Rekha A.R., Jacobs M.R., Bonomo R.A.: Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3628–3634 (2009)
- Aeschlimann J.R.: The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* **23**, 916–924 (2003)
- Ah Y.M., Kim A.J., Lee J.Y.: Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44**, 8–15 (2014)
- Aiba H., Mizuno T., Mizushima S.: Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 8563–8567 (1989)
- Appleby J.L., Parkinson J.S., Bourret R.B.: Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*. **86**, 845–848 (1996)
- Ashby M.K.: Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 277–281 (2004)
- Bahar A.A., Ren D.: Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575 (2013)
- Baikalov I., I. Schroder M. Kaczor-Grzeskowiak D. Cascion R.P., Gunsalus R.E. Dickerson: NarL dimerisation? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry*, **37**, 3665–3676 (1998)
- Band V.I., Crispell E.K., Napier B.A. i wsp.: Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nat. Microbiol.* **1**, 16053. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.53 (2016)
- Beceiro A., Llobet E., Aranda J. i wsp.: Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3370–3379 (2011)
- Bent Z.W., Young G.M.: Contribution of BlaA and BlaB beta-lactamases to antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4000–4003 (2010)
- Bentzmann S., Plesiat P.: The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ. Microbiol.* **13**, 1655–1665 (2011)
- Bilwes A.M., Quezada C.M., Croal L.R., Crane B.R., Simon M.I.: Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 353–360 (2001)
- Bourret R.B., Silversmith R.E.: Two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 113–115 (2010)
- Brzostek K., Hrebenda J.: Outer membrane permeability to β -lactam antibiotics in *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1634–1540 (1988)
- Brzostek K., Hrebenda J., Benz R., Boos W.: The OmpC protein of *Yersinia enterocolitica*: purification and properties. *Res. Microbiol.* **140**, 599–614 (1989)
- Brzostek K., Nichols W.W.: Outer membrane permeability and porin proteins of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 275–278 (1990)
- Brzostek K., Raczowska A.: The YompC protein of *Yersinia enterocolitica*: molecular and physiological characterization. *Folia Microbiol.* **52**, 73–80 (2007)
- Brzostek K., Skorek K., Raczowska A.: OmpR, a central integrator of several cellular responses in *Yersinia enterocolitica*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **954**, 325–334 (2012)
- Bush K., Jacoby G. A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010)
- Cabot G., Zamorano L., Moya B. i wsp.: Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1767–1778 (2016)
- Callie O., Rossier C., Perron K.: A copper-activated Two-Component System interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 4561–4568 (2007)

24. Capra E.J., Laub M.T.: Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 325–347 (2012)
25. Cardona S.T., Choy M., Hogan A.M.: Essential Two-Component Systems regulating cell envelope functions: Opportunities for novel antibiotic therapies. *J. Membr. Biol.* **251**, 75–89 (2018)
26. Chakraborty S., Kenney L.J.: A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*. *Front Microbiol.* **22**, 2656. doi: 10.3389/fmicb.2018.02656 (2018)
27. Chen Y-T., Chang H.Y., Lu C.L., Peng H-L.: Evolutionary analysis of the Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J. Mol. Evol.* **59**, 725–737 (2004)
28. Chitsaz M., Brown M.H.: The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem.* **61**, 127–139 (2017)
29. Clarke D.J.: The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway. *Future Microbiol.* **5**, 1173–1184 (2010)
30. Dam S., Pages J.M., Masi M.: Stress responses, outer membrane permeability control and antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae*. *Microbiology*, **164**, 260–267 (2018)
31. Darwin A.J., Stewart V.: Expression of the *narX*, *narL*, *narP*, and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators. *J. Bacteriol.* **177**, 3865–3869 (1995)
32. De Silva P.M., Kumar A.: Signal Transduction Proteins in *Acinetobacter baumannii*: Role in antibiotic resistance, virulence, and potential as drug targets. *Front Microbiol.* **10**:49. doi: 10.3389/fmicb.2019.00049 (2019)
33. Dorman C.J., Chatfield S., Higgins C.F., Hayward C., Dougan G.: Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* **57**, 2136–2140 (1989)
34. Dube P.: Interaction of *Yersinia* with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **337**, 61–91 (2009)
35. EFSA Journal 2018, 17 (12): 5926
36. Eguchi Y., Utsumi R.: A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 70–72 (2006)
37. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C., Lindler L.E., Carniel E., Ravel J.: The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet – ike fever. *PLoS Genet.* **3**, e142 (2007)
38. Fàbrega A., Vila J.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 308–341 (2013)
39. Fernandez L., Gooderham W.J., Bains M., McPhee J.B., Wiegand I., Hancock R.E.W.: Adaptive resistance to the „Last Hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel Two-Component Regulatory System ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3372–3382 (2010)
40. Fernandez L., Hancock R.E.: Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 661–681 (2012)
41. Foussard M., Cabantous S., Pedelacq J.D., Guillet V., Tranier S., Mourey L., Birck C., Samama J.P.: The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**, 417–424 (2001)
42. Gaddy J.A., Actis L.A.: Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* **4**, 273–278 (2009)
43. Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K.: Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in human yersiniosis. *J. Pathog.* 182051. 10.4061/2011/182051 (2011)
44. Galperin M.Y.: Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**, 4169–4182 (2006)
45. Galperin M. Y., Higdon R., Kolker E.: Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems *Mol. Bio. Syst.* **6**, 721–728 (2010)
46. Gooderham W.J., Hancock R.E.W.: Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 279–294 (2008)
47. Gunn J.S.: The *Salmonella* PmrAB regulon lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* **16**, 284–290 (2008)
48. Gunn J.S., Ernst R.K., McCoy A.J., Miller S.I.: Constitutive mutations of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transcriptional virulence regulator *phoP*. *Infect. Immun.* **68**, 3758–3762 (2000)
49. Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I.: PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-amino-arabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171–1182 (1998)
50. Guo X., Sun Y.C.: New insights into the non-orthodox two component rcs phosphorelay system. *Front. Microbiol.* **8**, 2014 (2017)
51. Hancock R.E.W., Chapple D.S.: Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317–1323 (1999)
52. Hancock R.E.W., Speert D.P.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* **3**, 247–255 (2000)
53. Hanson N.D., Sanders C.C.: Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des.* **5**, 881–894 (1999)
54. Hirakawa H., Nishino K., Hirata T., Yamaguchi A.: Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 1851–1856 (2003)
55. Hoch J.A.: Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 165–170 (2000)
56. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 (2010)
57. Itou H., Tanaka I.: The OmpR-family of proteins: Insight into the tertiary structure and functions of Two-component regulator proteins. *J. Biochem.* **129**, 343–350 (2001)
58. Jacoby G.A., Bush K.: β -Lactam Resistance in the 21st Century: w Frontiers in Antimicrobials Resistance pod redakcją D.G. White, M.N Alekshun P.F., McDermott ASM Press, Washington, D.C. (2005)
59. Jana S., Deb J.K.: Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 140–150 (2006)
60. Juda M., Dadas E., Malm A.: Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotworczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* **46**, 237–247 (2007)
61. Kato A., Groisman E.A.: Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev.* **18**, 2302–2313 (2004)
62. Kenney L.J.: Structure/function relationships in OmpR and other winged helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 135–141 (2002)
63. Koretke K.K., Lupas A.N., Warren P.V., Rosenberg M., Brown J.R.: Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1956–1970 (2000)

64. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (18.04. 2020)
65. Kyriakidis D.A., Tiligada E.: Signal transduction and adaptive regulation through bacterial two-component systems: the *Escherichia coli* AtoSC paradigm. *Amino Acids*. **37**, 443–458 (2009)
66. Lau C.H., Fraud S., Jones M., Peterson S.N., Poole K.: Mutational activation of the AmgRS two-component system in aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2243–2251 (2013)
67. Lee S., Hinz A., Bauerle E. i wsp.: Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 14570–14575 (2009)
68. Lee C.R., Lee J.H., Park M. i wsp.: Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infection Microbiol.* **7**, 55 (2017)
69. Lingzhi L., Haojie G., Dan G., Hongmei M., Yang L., Mengdie J., Chengkun Z., Xiaohui Z.: The role of two-component regulatory system in beta-lactam antibiotics resistance. *Microbiol. Res.* **215**, 126–129 (2018)
70. Liu C., Sun D., Zhu J., Liu W.: Two-Component Signal Transduction Systems: A major strategy for connecting input stimuli to biofilm formation. *Front. Microbiol.* **9**:3279. doi: 10.3389/fmicb.2018.03279 (2018)
71. Long C., Jones T.V., Vugia D.J., Scheftel J., Strockbine N., Ryan P., Shiferaw B., Tauxe R.V., Gould L.H.: *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996–2007. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 566–567 (2010)
72. Macfarlane E.J.A., Kwasnicka A., Hancock R.E.W.: Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology*, **146**, 2543–2554 (2000)
73. Macfarlane E.J.A., Kwasnicka A., Ochs M.M., Hancock R.E.W.: PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* **34**, 305–316 (1999)
74. Marceau M., Sebbane F., Ewann F., Collyn F., Lindner B., Campos M.A., Bengoechea J.A., Simonet M.: The *pmrF* polymyxin-resistance operon of *Yersinia pseudotuberculosis* is up-regulated by the PhoP-PhoQ two-component system but not by PmrA-PmrB, and is not required for virulence. *Microbiology*, **150**, 3947–3957 (2004)
75. Marchal K., Keersmaecker S.D., Monsieurs P., van Boxel N., Lemmens K., Thijs G., Vanderleyden J., Moor B.D.: *In silico* identification and experimental validation of PmrAB targets in *Salmonella typhimurium* by regulatory motif detection. *Genome Biol.* **5**, R9 (2004)
76. Martinez-Hackert E., Stock A.M.: Structural Relationships in the OmpR Family of Winged – Helix Transcription Factors. *J. Mol. Biol.* **269**, 301–312 (1997)
77. McClelland M., Wilson R.K. i wsp.: Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, **413**, 852–856 (2001)
78. McPhee J.B., Bains M., Winsor G., Lewenza S., Kwasnicka A., Brazas M.D., Brinkman F.S.L., Hancock R.E.W.: Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg²⁺ induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 3995–4006 (2006)
79. McPhee J.B., Lewenza S., Hancock R.E.W.: Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**, 205–217 (2003)
80. Mihai M.M., Holban A.M., Giurcaneanu C., Popa L.G., Oanea R.M., Lazar V., Chifiriuc M.C., Popa M., Popa M.I.: Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**:1552–1576. doi: 10.2174/1568026615666150414123800 (2015)
81. Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A.: Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **13**, 1666–1681 (2011)
82. Monteagudo-Cascales E., Garcia-Maurino S.M., Santero E., Canosa I.: Unraveling the role of the CbrA histidine kinase in the signal transduction of the CbrAB two-component system in *Pseudomonas putida*. *Sci. Rep.* **9**, 9110. doi: 10.1038/s41598-019-45554-9 (2019)
83. Moskowitz S.M., Ernst R.K., Miller S.I.: PmrAB, a Two-Component Regulatory System of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* **186**, 575–579 (2004)
84. Mouslim C., Groisman E.A.: Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol. Microbiol.* **47**, 335–344 (2003)
85. Muller C., Plesiat P., Jeannot K.: A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1211–1221 (2011)
86. National Center for Biotechnology Information: Census of bacterial signal transduction proteins, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html (18.04.2020)
87. Nieckarz M., Raczowska A., Dębski J., Kistowski M., Dadlez M., Heesemann J., Rossier O., Brzostek K.: Impact of OmpR on the membrane proteome of *Yersinia enterocolitica* in different environments: repression of major adhesin YadA and heme receptor HemR. *Environ Microbiol.* **18**, 997–1021 (2016)
88. Nikaido H.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003)
89. Ninfa A.J., Magasanik B.: Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5909–5913 (1986)
90. Nishino K.: Regulation of the expression of bacterial multidrug exporters by Two-Component Signal Transduction Systems. *Methods Mol. Biol.* **1700**, 239–251. doi: 10.1007/978-1-4939-7454-2_13 (2018)
91. Niumsup P., Simm A.M., Nurmahomed K., Walsh T.R., Bennett P.M., Avison M.B.: Genetic linkage of the penicillinase gene, *amp*, and *blrAB*, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1351–1358. doi: 10.1093/jac/dkg247 (2003)
92. Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M.: Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7850–7854 (1986)
93. Nowak A., Tyski S.: Dwuskładnikowe systemy regulacyjne ziarenkowców Gram-dodatnich i ich rola w tworzeniu biofilmu. *Post. Mikrobiol.* **51**, 265–276 (2012)
94. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M.: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 643 (2014)
95. Pages J.M., James C.E., Winterhalter M.: The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 893–903 (2008)
96. Papon N., Stock A.M.: What do archaeal and eukaryotic histidine kinases sense? F1000Res. doi: 10.12688/f1000research.20094.1. (2019)

97. Park H., Inouye M.: Mutational analysis of the linker region of EnvZ an osmosensor in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 4382–4390 (1997)
98. Park J.Y., Kim S., Kim S.M., Cha S.H., Lim S.K., Kim J.: Complete genome sequence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain 1656–2, which forms sturdy biofilm. *J. Bacteriol.* **193**, 6393–6394 (2011)
99. Pelton J.G., Kustu S., Wemmer D.E.: Solution structure of the DNA-binding domain of NtrC with three alanine substitutions. *J. Mol. Biol.* **292**, 1095–1110 (1999)
100. Perron K., Caille O., Rossier C., Delden C., Dumas J-L., Kohler T.: CzcR-CzcS, a two-component System involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **279**, 8761–8768 (2004)
101. Pirrung M.C.: Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. Biol.* **6**, 167–175 (1999)
102. Poole K.: Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **20**, 227–234 (2012)
103. Raczowska A., Trzos J., Lewandowska O., Nieckarz M., Brzostek K.: Expression of the AcrAB components of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump of *Yersinia enterocolitica* is subject to dual regulation by OmpR. *PLoS One*, **10**, e0124248. doi: 10.1371/journal.pone.0124248 (2015)
104. Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E.: Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Bio.* **76**, 295–329 (2007)
105. Rather P.N., Paradise M.R., Parojcic M.M., Patel S.: A regulatory cascade involving AarG, a putative sensor kinase, controls the expression of the 2₋N-acetyltransferase and an intrinsic multiple antibiotic resistance (Mar) response in *Providencia stuartii*. *Mol. Microbiol.* **28**, 1345–1353 (1998)
106. Richards S.M., Strandberg K.L., Gunn J.S.: Salmonella-regulated lipopolysaccharide modifications. *Subcell. Biochem.* **53**, 101–122 (2010)
107. Rodrigue A., Quentin Y., Lazdunski A., Mejean V., Foglino M.: Two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **8**, 498–504 (2000)
108. Santajit S., Indrawattana N.: Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed. Res. Int.* 2475067, doi:10.1155/2016/2475067 (2016)
109. Seshadri R., Heidelberg J.F. i wsp. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J. Bacteriol.* **188**, 8272–8282 (2006)
110. Sharma D., Misba L., Khan A.U.: Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **8**: 76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3 (2019)
111. Shaulsky G., Escalante R., Loomis W.F.: Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15260–15265 (1996)
112. Shi X., Wegener-Feldbrügge S., Huntley S., Hamann N., Hedderich R., Søgaard-Andersen L.: Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**, 613–624. doi: 10.1128/JB.01502-07 (2008)
113. Singh S., Singh S.K., Chowdhury I., Singh R.: Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol. J.* **11**, 53–62 (2017)
114. Stock I., Heisig P., Wiedemann B.: Expression of β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4 and 5. *J. Med. Microbiol.* **48**, 1023–1027 (1999)
115. Stock J.B., Ninfa A.J., Stock A.M.: Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.* **53**, 450–490 (1989)
116. Stover C.K., Olson M.V. i wsp.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**, 959–964 (2000)
117. Sun J., Deng Z., Yan A.: Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 254–267 (2014)
118. Szczesny M., Beloin C., Ghigo J.M.: Increased osmolarity in biofilm triggers RcsB-dependent lipid A palmitoylation in *Escherichia coli*. *mBio* **9**, pii:e01415–18 (2018)
119. Tayler A.E., Ayala J.A., Niumsup P., Westphal K., Baker J.A., Zhang L., Walsh T.R., Wiedemann B., Bennett P.M., Avison M.B.: Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology*. **156**, 2327–2335 (2010)
120. Thomson N.R., Prentice M.B. i wsp. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* **2**, e206. doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006)
121. Tipton K.A., Rather P.N.: An *ompR/envZ* two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J. Bacteriol.* **199**, doi: 10.1128/JB.00705-16 (2017)
122. Tiwari S., Jamal S.B., Hassan S.S., Carvalho P.V.S.D., Almeida S., Barh D., Ghosh P., Silva A., Castro T.L.P., Azevedo V.V.: Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: an overview. *Front. Microbiol.* **10**: 8:1878. doi: 10.3389/fmicb.2017.01878 (2017)
123. Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.: Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **5**, 67–74 (2000)
124. Utsumi R.: Bacterial signal transduction networks via connectors and development of the inhibitors as alternative antibiotics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 1663–1669 (2017)
125. Van Acker H., Van Dijck P., Coenye T.: Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* **22**, 326–333 (2014)
126. Walsh T.R., Stunt R.A., Nabi J.A., MacGowan A.P., Bennett P.M.: Distribution and expression of b-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 171–178 (1997)
127. Wang D., Chen W., Chen H. i wsp.: Structural basis of Zn (II) induced metal detoxification and antibiotic resistance by histidine kinase CzcS in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **13**:e1006533. 10.1371/journal.ppat.1006533 (2017)
128. Wang C., Chen W., Xia A., Zhang R., Huang Y., Yang S., Ni L., Jin F.: Carbon starvation induces the expression of PprB-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**: e01705-19. doi: 10.1128/AEM.01705-19 (2019)
129. Wang Y., Ha U., Zeng L., Jin S.: Regulation of membrane permeability by a Two-Component Regulatory System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 95–101 (2003)
130. Wang D., Seeve C., Pierson L.S., Pierson E.A.: Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* **14**, 618. 10.1186/1471-2164-14-618 (2013)
131. West A.H., Stock A.M.: Histidine kinases and response regulator proteins in two – component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–376 (2001)
132. Winfield M.D., Groisman E.A.: Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17162–17167 (2004)

133. Winsor G.L., Griffiths E.J., Lo R., Dhillon B.K., Shay J.A., Brinkman F.S.L.: Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas genome* database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646–D653. 10.1093/nar/gkv1227 (2016)
134. Wirtz L., Eder M., Schipper K., Rohrer S., Jung H.: Transport and kinase activities of CbrA of *Pseudomonas putida* KT2440. *Sci Rep.* **10**, 5400. doi: 10.1038/s41598-020-62337-9 (2020)
135. World Health Organization. Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017; p. 12.
136. Wosten M.M.S.M., Kox L.F.F., Chamnongpol S., Soncini F.C., Groisman E.A.: A Signal Transduction System that Responds to Extracellular Iron. *Cell.* **103**: 113–125 (2000)
137. Wuichet K., Cantwell B.J., Zhulin I.B.: Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 219–25 10.1016/j.mib.2009.12.011 (2010)
138. Yeung A.T.Y., Bains M., Hancock R.E.W.: The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **193**, 918–931 (2011)
139. Zamorano L., Moya B., Juan C., Mulet X., Blazquez J., Oliver A.: The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to beta-lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5084–5095 (2014)
140. Zhou D., Han Y., Qin L., Chen Z., Qiu J., Song Y., Li B., Wang J., Guo Z., Du Z., Wang X., Yang R.: Transcriptome analysis of the Mg²⁺-responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 85–95 (2005)