

## MECHANIZMY FUNKCJONOWANIA I REGULACJI SYSTEMÓW POBIERANIA HEMU U PATOGENNYCH BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Karolina Jaworska\*, Adrianna Raczkowska, Julia Frindt, Joanna Wachowicz, Katarzyna Brzostek

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

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano we wrześniu 2019 r.

**Streszczenie:** Żelazo jest jednym z istotniejszych mikroelementów wykorzystywanych przez bakterie, niezbędnym dla metabolizmu podstawowego komórki. Ponad 70% biodostępnego żelaza w organizmach ssaków znajduje się w cząsteczce hemu. Gram-ujemne bakterie patogenne podczas kolonizacji organizmu gospodarza wykorzystują hem jako główne źródło żelaza. Bakterie wykształciły dwa typy receptorów/transporterów błony zewnętrznej zaangażowanych w pobieranie cząsteczki hemu. Pierwszy z nich skupia receptory rozpoznające hem wolny lub związany w hemoproteinach i transportujące ligand przez błonę zewnętrzną. Drugi typ receptorów rozpoznaje i transportuje hem w kompleksie z hemoforem, niskocząsteczkowym białkiem uwalnianym z komórki bakteryjnej. Mikroorganizmy wykształciły transkrypcyjne i potranskrypcyjne mechanizmy kontrolujące proces transportu żelaza/hemu, chroniące przed ich toksycznym nadmiarem. Jeden z ważniejszych mechanizmów regulujących opiera się na funkcjonowaniu białka Fur, represora transkrypcji genów. Coraz więcej wiadomo o roli niekodujących RNA w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów regulonu Fur.

1. Wprowadzenie. 2. Hem i związki hemu w organizmie gospodarza. 3. Wiązanie i transport hemu przez osłony bakteryjne. 3.1. Aktywny transport hemu przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych. 3.2. Transport przez błonę cytoplazmatyczną zależny od ATP. 4. Regulacja ekspresji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu. 4.1. Charakterystyka białka Fur. 4.2. Oddziaływanie Fur-DNA. 4.3. Regulacja ekspresji *fur* u *E. coli*. 4.4. Fur jako globalny regulator ekspresji genów u *E. coli*. 4.5. Inne mechanizmy kontroli ekspresji systemów transportu i pozyskiwania hemu. 5. Podsumowanie

### MECHANISMS OF FUNCTIONING AND CONTROL OF HEME UPTAKE IN GRAM-NEGATIVE PATHOGENIC BACTERIA

**Abstract:** Iron is one of the most important micronutrients used by bacteria, essential for their basic metabolism. Over 70% of bioavailable iron in mammals is in the heme molecule. Gram-negative pathogenic bacteria during colonization and infection of the host organism use heme as the main source of iron. Bacteria have developed two types of outer membrane receptors/transporters involved in the heme uptake. The first one focuses on the receptors recognizing heme or hemoproteins and transporting the ligand through the outer membrane. The second type of receptor recognizes and takes up heme in a complex with a hemophore, a small protein released from a bacterial cell. Microorganisms have developed appropriate transcriptional and post-transcriptional mechanisms that control the iron/heme uptake, protecting against their toxic excess. One of the most important regulatory systems is based on the functioning of the Fur protein, a repressor of gene transcription. More and more is known about the role of non-coding RNAs in post-transcriptional regulation of Fur regulon gene expression.

1. Introduction. 2. Hem and heme compounds in the host organism. 3. Binding and transport of heme through bacterial wall and membranes. 3.1. Active transport of heme through the outer membrane of Gram-negative bacteria. 3.2. ATP-dependent transport across the cytoplasmic membrane. 4. Regulation of gene expression of heme uptake. 4.1. Characteristics of Fur protein. 4.2. Fur-DNA interaction. 4.3. Regulation of *fur* gene expression in *E. coli*. 4.4. Fur as a global regulator of gene expression in *E. coli*. 4.5. Other mechanisms for controlling the expression of heme uptake genes. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** hem/hemoproteiny, system transportu hemu, Gram-ujemne patogenne bakterie, regulacja ekspresji genów, represor Fur  
**Key words:** heme/hemoproteins, heme transport system, Gram-negative pathogenic bacteria, regulation of gene expression, Fur repressor

### 1. Wstęp

Żelazo to jeden z najobficiej występujących pierwiastków na Ziemi, który w historii naszej planety podlegał skomplikowanym procesom geochemicznym. Ważnym wydarzeniem w historii Ziemi była zmiana 2,5 miliarda lat temu pierwotnej atmosfery ziemskiej, pozbawionej tlenu, na atmosferę tlenową, co sprawiło, że

łatwo dostępne jony żelaza Fe (II) stały się niedostępne. Przybrały formę nierozpuszczalnych tlenków żelaza (II/III), hematytów ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) czy magnetytów ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Obecność tlenu w atmosferze miała kolosalny wpływ na powstanie tlenowych form życia. Żelazo jest mikroelementem niezbędnym do życia prawie wszystkich mikroorganizmów, gdyż pełni rolę kofaktora w wielu procesach metabolicznych, takich jak metabolizm

\* Autor korespondencyjny: Karolina Jaworska, Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa, tel. 22 55 41 310; e-mail: kjaworska@biol.uw.edu.pl

cukrów i białek, pozyskiwanie energii czy synteza DNA i RNA. Pierwiastek ten stanowi istotny czynnik w procesie wzrostu i proliferacji komórek. Dodatkowo wpływa na odpowiedź mikroorganizmów na stres oksydacyjny oraz na ekspresję genów kodujących bakteryjne czynniki wirulencji podczas infekcji organizmu gospodarza [1]. Z kolei nadmiar żelaza bywa toksyczny, a zredukowana forma Fe (II), choć rozpuszczalna, to w reakcji Fentona, generuje toksyczne rodniki hydroksylowe. Reaktywne formy tlenu (ROS, reactive oxygen species) mogą wywierać szkodliwe działanie na komórki uszkadzając ich DNA, oraz budujące je, lipidy czy białka [2].

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to pierwsze organizmy, u których zaobserwowano względną niezależność życia od tego mikroelementu. W przypadku bakterii *L. plantarum* rosnących w podłożu hodowlanym o niskiej zawartości żelaza ( $0,6 \mu\text{M Fe}$ ) szacowana ilość tego pierwiastka wynosiła średnio  $3,6 \pm 1,5$  atomu tego metalu na komórkę. Natomiast komórki *Escherichia coli*, hodowane w tych samych warunkach, zawierały średnio  $1,2 \pm 0,2 \times 10^5$  atomów żelaza na komórkę [3]. Uniezależnienie od żelaza prawdopodobnie wyjaśnia zdolność tych bakterii do wzrostu w mleku, w którym dostępność tego mikroelementu jest bardzo ograniczona ze względu na występowanie laktoferyny [3]. Innym przykładem jest *Borrelia burgdorferi*, czynnik etiologiczny boreliozy, której analiza sekwencji genomu wykazała brak genów kodujących białka związane z asymilacją żelaza. W dodatku znaczne ograniczenie żelaza w hodowli ( $< 0,1 \mu\text{M Fe}$ ) nie miało wpływu na wzrost bakterii, a wyznaczona przy zastosowaniu spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS) zawartość tego pierwiastka w komórce była niższa niż 10 atomów [4]. Również *Treponema pallidum*, czynnik etiologiczny syfilisu, wydaje się nie wymagać żelaza do sprawnego funkcjonowania. Należy jednak zauważyć, że zarówno *B. burgdorferi*, jak i *T. pallidum* są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi o zredukowanej wielkości genomu i chociaż nie wymagają żelaza, to ich funkcjonowanie opiera się na metabolizmie gospodarza zależnym od żelaza. Ścisłej mówiąc, życie obu tych patogenów zależy od tego pierwiastka, choć w minimalnym stopniu [5].

Bakterie chorobotwórcze zasiedlające komórki i/lub tkanki zwierzęce muszą korzystać z żelaza dostępnego w organizmie gospodarza, którego stężenie jest bardzo niskie, gdyż prawie cała jego pula występuje w postaci związanej. Ponadto patogeny napotykają jeszcze większe trudności w zdobyciu żelaza w wyniku indukcji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza [1]. Ta odpowiedź to przede wszystkim połączone działanie kluczowych regulatorów homeostazy żelazowej, hepcydyny i ferroportyny. Hepcydyna, peptyd syntetyzowany w wątrobie ssaków, pełni podwójną funkcję, jest chelatorem jonów żelaza oraz induktorem hypoferremii (nie-

doboru żelaza), w wyniku której następuje zmniejszenie zdolności wiązania żelaza przez surowicę, a zwiększenie poziomu ferrytyny w tkankach. Ponadto aktywność innych białek gospodarza indukowanych w odpowiedzi na infekcję bakteryjną obniża poziom żelaza. Lipokalina-2, wydzielana przez neutrofile i makrofagi, zdolna jest do wychwytu bakteryjnych sideroforów, np. enterobaktyny. Laktoferyna, glikoproteina podobna do transferyny, wiąże każde wolne żelazo. Wszystko to skutkuje osłabieniem zdolności patogenów do przewycięzania odpowiedzi immunologicznej gospodarza [6, 7].

Niskie stężenie wolnego żelaza w środowisku sprawia, że bakterie korzystają z różnych strategii/mechanizmów pozyskiwania tego pierwiastka. Co więcej, lokalizacja bakterii w organizmie gospodarza (wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowa) wpływa na strukturę chemiczną żelaza dostępnego dla bakterii. Głównym jego źródłem dla bakteryjnych patogenów, ale także dla niepatogennych symbiontów, jest wolny hem i hemoproteiny [1, 8].

## 2. Hem i związki hemu w organizmie gospodarza

Ponad 70% biodostępnego żelaza w organizmach ssaków znajduje się w cząsteczce hemu. Hem jest grupą prostetyczną zawierającą żelazo, wchodzącą w skład wielu białek. U zwierząt synteza hemu zachodzi w konserwowanym ewolucyjnie ośmioetapowym szlaku biosyntezy [9]. Hem jest syntetyzowany w prawie wszystkich typach komórek ludzkich, choć zdecydowanie najwięcej hemu produkują komórki erytroidalne, w dalszej kolejności hepatocyty. Hem może być także dostarczany z pożywieniem. Cząsteczka hemu jest biologicznie aktywnym chelatorem żelaza, wolny hem (niezwiązany z białkiem) może generować ROS, a ze względu na swoje właściwości hydrofobowe może interkalować do błony lipidowej niszcząc jej strukturę. Dlatego też biosynteza hemu jak i jego degradacja są w komórce ściśle regulowane. Ponad 95% hemu jest związana w organizmie człowieka z białkami (hemoproteiny). Większość hemoprotein zlokalizowana jest wewnątrzkomórkowo, a około 67% hemu w organizmie człowieka jest związana w hemoglobinie obecnej w erytrocytach. Inne główne hemoproteiny to mioglobina występująca w komórkach mięśniowych, a także cytochromy, cytoglobina i neuroglobina [6, 7].

Pula zewnątrzkomórkowego hemu to około  $0,1 \mu\text{M}$ , co stanowi mniej niż 0,1% całego hemu komórkowego. Ograniczona ilość sprawia, że hem jest trudno dostępny dla patogenów zewnątrzkomórkowych. Głównym jego źródłem jest hemoglobina obecna w osoczu krwi (około 80–800 nM w surowicy). Hemoglobina pochodząca ze zlizowanych erytrocytów jest wiązana przez haptoglobinę, natomiast wolny hem, pochodzący z uszkodzonej hemoglobiny, jest wiązany przez hemopeksyny suro-

wicy i w mniejszym stopniu przez albuminy surowicy. W układzie pokarmowym hem dostarczany z pożywieniem może być biodostępny jako cząsteczka wolna lub związana z hemopeksyną. W organizmie gospodarza, gdzie stężenie hemu jest niskie, hem i hemoproteiny mogą być dostępne w wyniku uszkodzenia komórek podczas infekcji bakteryjnej. W tym celu bakterie produkują egzotoksyny, które uwalniają hem z hemoprotein, są to hemolizyny, cytolizyny czy proteazy bakteryjne. Wśród tych ostatnich dobrze scharakteryzowane zostały proteazy cisteinowe *Porphyromonas gingivalis*, gingipainy, jak również autotransportujące białko Hbp (hemoglobin-binding protein) o aktywności proteazy występujące u patogennych szczepów *E. coli* [1, 6, 10].

Hem jest doskonałym źródłem żelaza dla bakterii. Patogeny pozyskują żelazo z hemu dzięki aktywności oksygenazy hemowej (HO) katalizującej konwersję hemu do biliwerdyny z uwolnieniem żelaza i dwutlenku węgla. Ponadto cząsteczka hemu po pobraniu przez komórkę bakteryjną może być włączona do cząsteczki białka i jako kofaktor w hemoproteinach pełnić ważną rolę w procesie: oddychania (transport tlenu, transport elektronów), fotosyntezy, transdukcji sygnału, detoksykacji ksenobiotyków, odpowiedzi na stres oksydacyjny czy produkcji i unieszkodliwiania toksycznych nadtlenków. Hem jest grupą prostetyczną także katalazy, peroksydazy oraz enzymów z grupy cytochromu P450. Hem może również pełnić rolę regulatorową w procesie transkrypcji DNA, translacji, stabilności białek oraz różnicowania komórek [8, 10, 11].

Jak już wspomniano, nadmiar wolnego hemu jest toksyczny dla komórek dlatego bakterie wykształciły kilka mechanizmów pozwalających na niwelowanie jego szkodliwego działania przez wyrzut na zewnątrz komórki (pompy typu efflux), sekwestrację, konwersję hemu w nietoksyczne związki czy degradację (między innymi przy użyciu oksygenazy hemowej) [1].

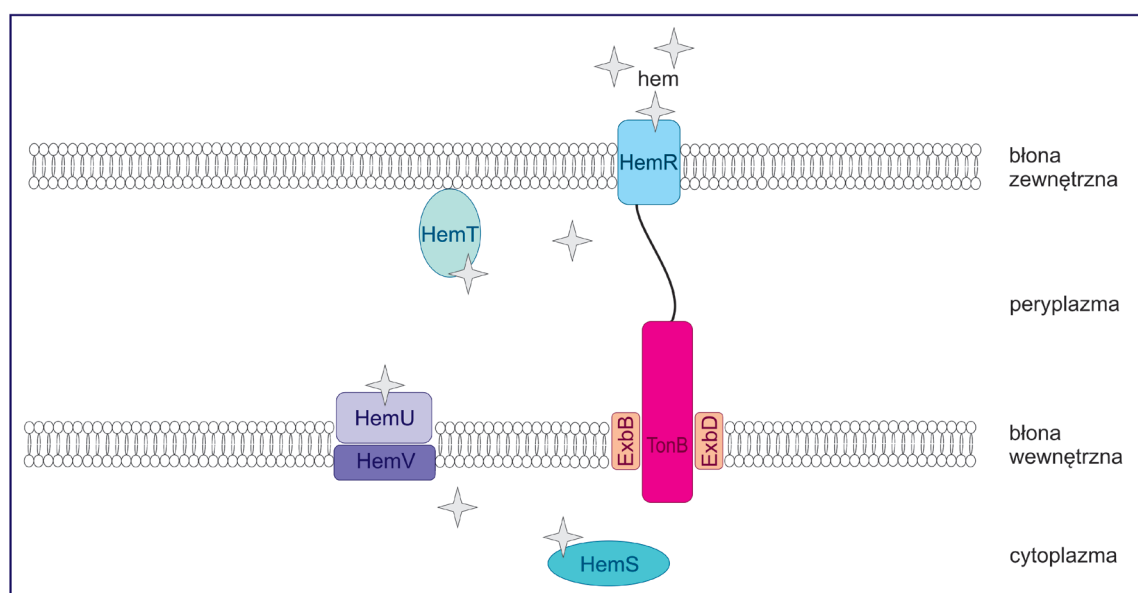
### 3. Wiązanie i transport hemu przez osłony bakteryjne

Bakterie, w celu pozyskania żelaza/hemu wykształciły specyficzne transportery błonowe pozwalające na transport hemu przez błonę zewnętrzną (OM) i cytoplazmatyczną (bakterie Gram-ujemne) oraz przez grubą warstwę mureiny ściany komórkowej (bakterie Gram-dodatnie). Dodatkowo bakterie mogą wydzielac krótkie peptydy zwane hemoformami, które wiążą wolny hem, a następnie dostarczają go do komórek [1, 8].

#### 3.1. Aktywny transport hemu przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych

Mechanizm wychwytu hemu jest bardzo podobny dla większości Gram-ujemnych bakterii. Ogólny proces pobierania hemu przedstawiono na przykładzie systemu transportu hemu u *Yersinia enterocolitica*, ludzkiego enteropatogenu (Ryc. 1).

Zidentyfikowano i dobrze scharakteryzowano ponad 30 różnych transporterów hemu, które funkcjonują



Ryc. 1. Schemat transportu hemu u *Y. enterocolitica*

W pierwszym etapie tego procesu następuje rozpoznanie hemu, w postaci wolnej lub związanej w hemoproteinach, przez specyficzny receptor błony zewnętrznej, białko HemR. Cząsteczka hemu, w tym także ta uwolniona z hemoprotein, po przedostaniu się do peryplazmy ulega związaniu przez białko HemT, a następnie jest transportowana przez błonę wewnętrzną poprzez kompleks transporterów ABC (HemU/HemV). Energię do transportu przez błonę dostarcza kompleks białkowy TonB/ExbB/ExbD. Po przedostaniu się do cytoplazmy, hem może być degradowany w wyniku aktywności białka HemS, bądź przechowywany w komórce patogenu.

w błonie zewnętrznej patogenów Gram-ujemnych. Transportery hemu można podzielić na dwie klasy. Do pierwszej należą te, które rozpoznają hem i specyficzne kompleksy białkowe zawierające hem, np. hemoglobinę. Niektóre gatunki bakterii posiadają wiele różnych receptorów tej klasy dla odmiennych hemoprotein. Receptory te mogą być syntetyzowane w ściśle określonych warunkach środowiskowych/niszach ekologicznych organizmu gospodarza (np. u *Haemophilus influenzae*). Inne gatunki bakterii posiadają jeden typ receptora OM charakteryzujący się zdolnością do wiązania wielu hemoprotein, co świadczy o tym, że rozpoznanie substratu ma miejsce na poziomie cząsteczki hemu. Dobrym przykładem takiego receptora jest HemR u *Y. enterocolitica*, który jest zdolny do wiązania hemu, hemoglobiny, mioglobiny, kompleksu hemoglobina-haptoglobina, hem-hemopeksyny, hem-albuminy [12, 13]. W ostatnim czasie wykazano, iż *Y. enterocolitica* koduje dwa receptory hemu, które nazwano HemR1 oraz HemR2. Obydwa geny zlokalizowane są w różnych miejscach w genomie i wchodzi w skład dwóch operonów, *hemPRSTUV-1* oraz *hemPRST-2*. Z prowadzonych badań wynika, iż obydwa receptory są funkcjonalne, chociaż HemR2 wydaje się być mniej efektywny niż HemR1, co może wynikać z niższej ekspresji *hemPRST-2* w porównaniu do *hemPRSTUV-1* [14].

Wszystkie cząsteczki transporterów hemu bakterii Gram-ujemnych tworzą w błonie zewnętrznej strukturę  $\beta$ -baryłki zbudowanej z 22 łańcuchów aminokwasowych przyjmujących formę antyrównoległych  $\beta$ -kartek. Dodatkowo posiadają domenę globularną, która może blokować por transportera. Łańcuchy  $\beta$ -kartek tworzą w peryplazmie krótkie pętle, natomiast na powierzchni komórki długie hydrofilowe pętle służące do oddziaływań białko-białko i wiązania hemu bądź hemoprotein. Niezależnie od strukturalnego podobieństwa oraz sekwencji aminokwasowej, wszystkie znane receptory hemu posiadają dwie konserwowane reszty histydyny (np. His128 oraz His461 u HemR *Y. enterocolitica*), które koordynują hem i są zlokalizowane w konserwowanych domenach niezbędnych dla funkcjonowania receptora, np. w domenie FRAP/NPNL [1, 10]. Proponowany model działania HemR postuluje istnienie TonB-zależnego transferu hemu z His461 do His128, co pozwala na przejście hemu przez kanał w błonie zewnętrznej [12].

Wiele receptorów hemowych wiąże wolny hem lub hem związany z kompleksem białkowym, takim jak hemoglobina lub hemopeksyna. Przykładem są białka FrpB1 *Helicobacter pylori* i ChuA *Campylobacter jejuni*, które jak wykazano za pomocą spektrofotometrii UV-VIS, wiążą się z hemem i/lub hemoglobina [15, 16]. Szczególnym przypadkiem wśród znanych receptorów hemowych jest receptor HpuAB występujący u bakterii z rodzaju *Neisseria* dla haptoglobiny-hemoglobiny i hemoglobiny [17]. Składa się on z dwóch białek

o wielkości 42 kDa (HpuA) i 89 kDa (HpuB). HpuB jest białkiem zależnym od TonB. HpuA jest zewnętrzną lipoproteiną błonową. Oba białka są wymagane do wiązania hemoprotein [18].

Do drugiej klasy transporterów należą te białka, które rozpoznają i pobierają hem w kompleksie z hemofoforem. Hemofofory to niskocząsteczkowe białka bakteryjne wydzielane z komórki do środowiska. Ich rolą jest wiązanie hemu i dostarczanie go do specyficznych receptorów w błonie zewnętrznej. Główną klasą hemofoforów są białka HasA, które zidentyfikowano u wielu patogenów bakteryjnych, w tym *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa* [19–21]. Badania struktury HasA [22, 23], wykazały, że białko to występuje jako monomer o wielkości 19 kDa [22]. Po związaniu hemu hemofor HasA wiąże się z receptorem błony zewnętrznej HasR, co skutkuje przeniesieniem hemu na HasR [19, 24]. Nie do końca wiadomo jakie zmiany strukturalne występują podczas przenoszenia kompleksu HasA/hemu na receptor HasR. Wiadomo jedynie, że proces zachodzi nawet w nieobecności ATP, co sugeruje, że transfer ten nie wymaga energii [24].

Jak wspomniano wcześniej, do transportu cząsteczki hemu przez osłony komórkowe, potrzebna jest energia. W procesie tym bierze udział system transportu TonB/ExbB/ExbD. Chociaż nie określono całkowitego zapotrzebowania na energię potrzebną do transportu, to ustalono, że podczas transportu protonów przez błonę wewnętrzną, z peryplazmy do cytoplazmy, tworzona jest siła protonomotoryczna. W procesie tym bierze udział białko ExbB, którego helisy tworzą w błonie wewnętrznej strukturę poru. Por ma strukturę pentameru utworzonego z helis białka ExbB oraz jednej helisy białka ExbD. Pozostałe hydrofobowe helisy ExbD prawdopodobnie znajdują się w błonie wewnętrznej, poza strukturą utworzonego pentameru [25]. Nie wiadomo, w jaki sposób siła protonomotoryczna jest przekształcana w energię potrzebną do transportu hemu przez błonę, ale zaproponowano dwa mechanizmy. Według jednej hipotezy może to być ruch rotujący białka ExbD, albo działanie białka ExbD jako tłok, wzdłuż centralnej osi ExbB. Ten mechaniczny ruch odbierany jest przez białko TonB, wywołując jego interakcję z receptorem błony zewnętrznej [25]. C-końcowa domena TonB oddziałuje z „TonB box”, tj. z N-końcowym regionem receptora błony zewnętrznej, skierowanym do peryplazmy, który może być odpowiedzialny za transfer energii z kompleksu TonB do receptora hemowego [26].

Często bywa tak, iż w komórce bakteryjnej funkcjonuje kilka różnych systemów wychwytu hemu [10, 27]. Przykładem jest *P. aeruginosa*, który posiada receptor hemu w błonie zewnętrznej (PhuR), system transporterów ABC (PhuTUV), jak i hemofor HasA wraz z receptorem HasR rozpoznającym kompleks hemofor/hemu [1]. System transportu warunkujący pobieranie



hemu związanego w żelazoproteinach u *P. aeruginosa* jest kodowany przez geny operonu *phu* (*Pseudomonas* heme uptake). Gen *phuR* koduje receptor PhuR, którego funkcja zależy od aktywności TonB. Geny *phuTUV* kodują system transportujący zależny od peryplazmatycznego białka wiążącego hem, niezbędny do transportu przez błonę cytoplazmatyczną. System transportu *P. aeruginosa* kodowany przez operon *phuSTUV* jest homologiczny do systemu obecnego u *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis* [28, 29].

### 3.2. Transport przez błonę cytoplazmatyczną zależny od ATP

Kluczową rolę w przenoszeniu hemu przez peryplazmę do błony cytoplazmatycznej pełni rozpuszczalne peryplazmatyczne białko wiążące substrat (PBP, periplasmic binding protein). Mechanizm uwalniania hemu z receptora błony zewnętrznej do PBP jest nieznany. Możliwe, że powinowactwo hemu do receptora maleje w wyniku oddziaływania z PBP. Białka PBP zostały podzielone na trzy klasy w zależności od liczby połączeń międzydomenowych. Wszystkie trzy klasy białek charakteryzują się obecnością N-końcowych i C-końcowych globularnych domen, które tworzą szczelinę pomiędzy domenami odpowiedzialną za wiązanie ligandu. Białka należące do klasy I i II mają dwa z trzech połączeń międzydomenowych. Do klasy I należy między innymi białko PBP wiążące maltozę, a do klasy II reduktaza rybonukleotydu. Oba te białka podlegają dużym zmianom strukturalnym niezbędnym do związania i uwolnienia substratu. Białka klasy III mają jedno połączenie międzydomenowe, które ulega małym zmianom konformacyjnym. Do tej klasy należy między innymi białko wiążące witaminę B<sub>12</sub> (BtuF). Białko PhuT *P. aeruginosa* ma podobną budowę do BtuF, gdzie domeny C- i N-końcowe zawierają pięcioniciowe β-kartki oflankowane α-helisami. Hem jest związany przez tyrozynę w N-końcowej domenie znajdującej się w szczelinie wiążącej hem [1]. Podczas gdy większość odkrytych PBP wiąże się z hemem w stosunku 1:1 HmuT *Y. pestis* wiąże dwie cząsteczki hemu jednocześnie [30]. Białko to posiada dwie β-kartki połączone α-helisą, jednakże odległość pomiędzy resztami Tyr70 i Arg167 jest większa w porównaniu z innymi PBP. Może to wyjaśniać zdolność HmuT do wiązania więcej niż jednej cząsteczki hemu [30].

Transportery ABC błony cytoplazmatycznej stanowią jedną z większych białkowych superrodzin i są odpowiedzialne za transport substratów przez błonę zależny od ATP. Białka są zbudowane z dwóch transbłonowych domen tworzących kanał translokacyjny oraz dwóch domen cytoplazmatycznych odpowiedzialnych za wiązanie i hydrolizę ATP. Domena transbłonowa

transporterów różni się długością i sekwencją aminokwasową, co zapewnia specyficzność substratową. Domena wiążąca ATP jest silnie konserwowana. Transport ten przebiega według modelu „ATP-switching” [1]. W tym modelu peryplazmatyczne białko wiążące hem oddziałuje z domeną transbłonową transportera ABC indukując zmianę jego konformacji. Zmiana ta prowadzi do obniżenia energii aktywacji wymaganej do wiązania ATP z domeną cytoplazmatyczną. Wiązanie ATP indukuje tworzenie zamkniętej formy dimerycznej domeny transbłonowej i skutkuje uwolnieniem hemu do kanału transportowego. Dzięki hydrolizie ATP, następuje translokacja hemu do cytoplazmatycznego białka wiążącego hem. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej transporterów ABC wykazało, że wszystkie posiadają dwie konserwowane reszty histydyny zlokalizowane w domenie tworzącej kanał [1].

Cząsteczka hemu obecna w cytoplazmie może powodować efekt cytotoksyczny, dlatego w komórce uruchamiany jest mechanizm katabolizmu cząsteczki. Polega on na degradacji pierścienia protoporfirynowego hemu za pomocą oksygenazy hemowej, co prowadzi do otrzymania labilnego żelaza, biliwerdyny oraz dwutlenku węgla. Bakteryjne oksygenazy są funkcjonalnymi i strukturalnymi homologami eukariotycznych oksygenaz [7, 11, 31].

## 4. Regulacja ekspresji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu

Bakterie patogenne podczas kolonizacji i infekcji organizmu gospodarza wykorzystują hem/hemoproteiny jako źródło żelaza, jednakże w nadmiarze pierwiastek ten jest wysoce toksyczny, dlatego też mikroorganizmy wykształciły odpowiednie mechanizmy kontrolujące importowanie hemu lub białek zawierających żelazo do wnętrza komórek [8]. Jeden z ważniejszych systemów regulacyjnych występujący powszechnie u bakterii Gram-ujemnych opiera się na funkcjonowaniu globalnego regulatora transkrypcji genów, białka Fur. Chociaż regulator ten zidentyfikowano i najlepiej zbadano u *E. coli*, jego homologi odnaleziono u innych Gram-ujemnych patogenów, w tym *H. pylori*, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *Y. pestis* oraz *Y. pseudotuberculosis* [29, 32–35].

### 4.1. Charakterystyka białka Fur

Białko cytoplazmatyczne Fur u *E. coli* jest zbudowane z 148 reszt aminokwasowych o łącznej masie 16,8 kDa. W strukturze Fur wyróżnia się dwie domeny: N-terminalną domenę wiążącą DNA (2–84 aa) oraz C-terminalną domenę dimeryzacyjną (85–148 aa).

Domena wiążąca zbudowana jest z czterech  $\alpha$ -helis ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ), które tworzą motyw uskrzydłonej helisy (motyw WH, winged helix) oraz z dwóch antyrównoległych  $\beta$ -katek ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). Za wiązanie DNA odpowiedzialne są glicyna w pozycji 50 oraz alanina w pozycji 64, będące aminokwasami helisy  $\alpha_4$ . C-terminalna domena dimeryzacyjna zbudowana jest z trzech ułożonych antyrównolegle  $\beta$ -katek ( $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$ ), otoczonych pojedynczą  $\alpha$ -helisą ( $\alpha_5$ ). Za dimeryzację odpowiedzialne są  $\beta$ -kateki, które łączą monomery. Co ciekawe, między helisami  $\alpha_5$  monomerów, tworzą się liczne oddziaływania hydrofobowe i hydrofilowe. Umożliwiają one uformowanie konserwowanych mostków solnych między asparaginą w pozycji 103 i arginina w pozycji 109 helisy  $\alpha_5$  jednego monomeru, a tymi samymi aminokwasami helisy  $\alpha_5$  drugiego monomeru. Wszystkie pozostałe aminokwasy helisy  $\alpha_5$  odpowiedzialne są za wiązanie się z  $\beta$ -katekami domeny dimeryzacyjnej drugiego monomeru [36, 37].

W budowie białka Fur wyróżnia się dwa miejsca, które charakteryzują się zdolnością do wiązania dwuwartościowych jonów metali, takich jak cynk, mangan, żelazo czy kobalt [38]. W przypadku dużej dostępności jonów  $\text{Fe}^{2+}$  w środowisku, oba monomery białka wiążą po jednym jonie. Taka sytuacja prowadzi do zmiany pozycji domen wiążących DNA w białku, co zwiększa jego powinowactwo do DNA nawet 1000-krotnie. Kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur wiąże się do regionów promotorowych genów związanych z asymilacją żelaza, uniemożliwiając tym samym przyłączenie się polimerazy RNA i hamując transkrypcję. Można zatem stwierdzić, iż żelazo jest niezbędne do hamowania ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą Fur [5]. Co ciekawe, białko Fur zawiera przynajmniej jedno miejsce w dimerze, które może wiązać wyłącznie dwuwartościowe jony cynku [39]. W 1998 roku Jacquamet i wsp., posługując się metodą spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X, wykazali obecność takiego miejsca w białku Fur *E. coli*, zlokalizowanego w obrębie cystein w pozycji 92 i 95 na C-końcu [40]. Miejsce to nie jest konserwowane i nie występuje u wszystkich bakterii. Cynk wiązany w tych miejscach odpowiedzialny jest za utrzymanie integralności dimeru, nie pełni on natomiast funkcji regulatorowej [36].

#### 4.2. Oddziaływanie Fur-DNA

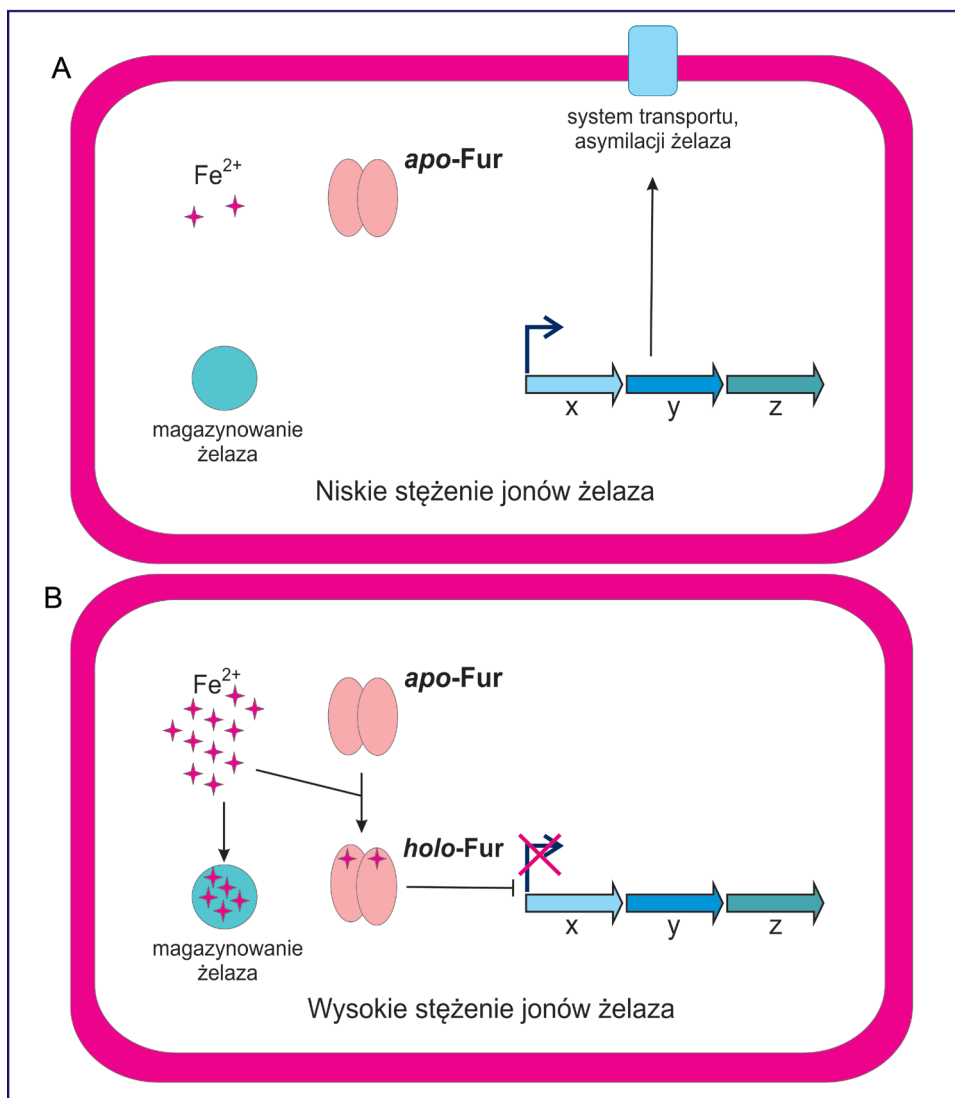
Do represji genów, związanych z asymilacją jonów żelaza, dochodzi w przypadku dużego stężenia tego mikroelementu w środowisku. To właśnie wtedy białko Fur wiąże jony  $\text{Fe}^{2+}$ , co powoduje zmianę jego konformacji i umożliwia przyłączenie do regionów promotorowych genów, hamując ich ekspresję. W odwrotnej sytuacji, kiedy stężenie jonów żelaza w środowisku jest zbyt niskie, aby bakterie mogły się namnażać dochodzi

do odblokowania ekspresji genów, których produkty są odpowiedzialne za ich asymilację. Ze względu na zbyt małą ilość żelaza nie powstaje kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur i nie dochodzi do zahamowania transkrypcji regulowanych genów [41] (Ryc. 2).

Kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur przyłącza się zazwyczaj między sekwencjami -35 i -10 w obszarze promotorów regulowanych genów. U *Y. enterocolitica* miejsce wiązania dla tego represora pokrywa się z sekwencją -10 promotora operonu *hemPRSTUV-1*, jak również *hemPRST-2*. Wykazano, iż Fur kontroluje w sposób negatywny aktywność obydwu operonów w warunkach nadmiaru żelaza w środowisku [14]. Dodatkowo, wewnętrzny promotor przed genami *hemSTUV* zidentyfikowano u *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* oraz *Y. pseudotuberculosis*, ale transkrypcja tego operonu pozostaje niezależna od Fur [13, 28, 29].

Pierwotnie twierdzono, iż miejsce wiązania Fur do DNA to palindromiczna sekwencja konsensus o długości 19 pz, zwana „Fur box” lub „Iron box” (5'-GATA-ATGAT(A/T)ATCATTATC-3'). Jednakże, w 2000 roku, dzięki analizom footprinting, Escolar i wsp. wykazali, że białko Fur może wiązać fragment DNA większy niż 19 pz [42]. Dzieje się tak, ponieważ często dochodzi do sytuacji, kiedy dwie lub więcej sekwencji typu „Iron box” sąsiaduje ze sobą lub zachodzi na siebie, co sugeruje wiązanie DNA przez wiele kompleksów  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur jednocześnie. W rzeczywistości, do promotorów niektórych genów potrafi przyłączyć się kilka kompleksów, które łącznie obejmują obszar o długości nawet 100 pz. Takie sytuacje doprowadziły do reinterpretacji miejsca „Fur box”, jako sekwencji trzech powtórzeń, składających się z motywów o długości 6 pz (5'-NAT(A/T)AT-3'); NAT(A/T)AT; N; AT(A/T)ATN-3'). Powtórzone motywy zwiększają siłę wiązania białka Fur do DNA [5]. Jednakże wspomniane badania nie wyjaśniają dokładnie jak poszczególne dimery Fur są rozmieszczone wzdłuż podwójnej helisy DNA oraz ile sześcionukleotydowych powtórzeń jest wymaganych do związania pojedynczego dimeru. Z kolei Lavrrar i wsp. (2002) sugerowali, iż białko Fur wiąże się z 13 pz motywem typu 6-1-6 [43]. Taki układ pozwala obu dimerom białka Fur wiązać się do miejsc „Fur box”, znajdujących się po przeciwnych stronach podwójnej nici DNA i przesuniętych o około pół skrętu helisy. Zgodnie z tym modelem, każdy kolejny 6 pz motyw pozwala na przyłączenie kolejnego dimeru białka Fur. Dodatkowo, taki układ potwierdza słuszność badań, które wskazują, że dimery Fur owijają się wokół podwójnej helisy [44].

Klasyczny model regulacji z udziałem białka Fur opiera się na wiązaniu z DNA dimerów tego białka w kompleksach z żelazem ( $\text{Fe}^{2+}$ ) jako kofaktorem (holo-Fur). Udowodniono również, że aktywacja jak i represja genów jest możliwa z udziałem dimeru apo-Fur (bez udziału  $\text{Fe}^{2+}$ ) [45]. U *H. pylori* Fur może



**Ryc. 2. Schemat regulacji ekspresji genów z udziałem represora Fur**

(A) Przy niskim stężeniu jonów żelaza, nie powstaje kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur (holo-Fur) w komórce bakteryjnej. Dimery apo-Fur nie oddziałują z DNA, co umożliwia wiązanie polimerazy RNA i transkrypcję genów kodujących białka odpowiedzialne za transport i asymilację żelaza. (B) W warunkach wysokiego stężenia jonów żelaza, kofaktor ( $\text{Fe}^{2+}$ ) wiąże się z apo-Fur, co prowadzi do wiązania dimerów holo-Fur w obszarze promotorowym regulowanych genów. Przyłączenie represora do DNA uniemożliwia wiązanie polimerazy RNA, blokując transkrypcję genów. x, y, z – geny, których ekspresja jest zależna od Fur.

hamować ekspresję genów zarówno indukowanych obecnością żelaza ( $\text{FeON}$ ), jak i tych, których ekspresja jest hamowana nadmiarem tego pierwiastka ( $\text{FeOFF}$ ). Wykazano, że Fur w zależności od tego czy jest związany z żelazem czy nie, preferencyjnie wiąże się z konkretnymi motywami operatorów, i tak odwrócone powtórzenia TAA są istotne dla wiązania holo-Fur, podczas gdy motyw  $\text{TCAT}_{n10}\text{TT}$  jest rozpoznawany przez apo-Fur [46]. Co ciekawe obydwa typy sekwencji mogą występować jednocześnie w tych samych operatorach, a przykładem promotora zawierającego taką sekwencję jest promotor genu *fur*, który wiąże zarówno apojak i holo-Fur z takim samym powinowactwem [47]. Eksperyment przeprowadzony metodą chromatografii

wykluczania (Size Exclusion Chromatography – SEC) pokazał, że w zależności od stężenia żelaza w środowisku Fur może tworzyć również formy multimeryczne. W roztworze Fur występuje jako dimer, a w obecności  $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  wiąże się z DNA jako dimer, tetramer, a nawet jako podwójny tetramer. Preferencyjnie apo-Fur wiąże się z DNA jako dimer, a holo-Fur jako tetramer [46]. Fur po przybraniu odpowiedniej konformacji wiąże się z DNA dzięki domenie wiążącej. Wykazano, że helisy H4 i H4' oddziałują z dużym rowkiem DNA [36]. Badania z wykorzystaniem dystamycyny A, antybiotyku wiążącego się w małym rowku DNA w regionach bogatych w pary AT, wykazały wpływ tego leku na wiązanie holo-Fur już w małych ilościach. Duże

stężenia dystamycyny A powodowało całkowite zahamowanie wiązania tej formy białka. Takiego efektu nie zaobserwowano dla apo-Fur. Regulacja typu FeOFF, ale nie FeON, jest podporządkowana wiązaniu do małego rowka DNA, co nie wyklucza możliwości wiązania Fur również w dużym rowku DNA. Wiązanie dwóch form białka Fur (apo- i holo-Fur), do różnych motywów w operatorach, w zależności od struktury przestrzennej DNA, może wyjaśniać udział Fur w regulacji ekspresji wielu genów zarówno w sposób negatywny jak i pozytywny [46].

### 4.3. Regulacja ekspresji genu *fur* u *E. coli*

Ilość białka Fur w komórce *E. coli* jest zaskakująco wysoka. Liczba cząsteczek białka sięga bowiem 5000 w fazie logarytmicznego wzrostu i dochodzi do aż 10000 w fazie stacjonarnej. Tak duże stężenie Fur jest prawdopodobnie związane z ilością genów (ponad 90 u *E. coli*), których ekspresja znajduje się pod jego kontrolą. W genomie *E. coli* gen *fur* zlokalizowany jest w obrębie bicistronowego operonu *fldA-fur*. Taki układ obecny jest również u innych patogenów, np. *Klebsiella pneumoniae*, *H. influenzae* czy *Y. pestis*. Gen *fldA* jest bardzo istotny dla życia bakterii, koduje on bowiem flawodoksynę – białko zawierające flawiny, które zaangażowane są w reakcje typu redoks. Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż flawodoksyny odgrywają znaczącą rolę w utrzymywaniu odpowiedniego stężenia zredukowanych jonów żelazowych w cytoplazmie, co ułatwia tworzenie kompleksów  $Fe^{2+}$ -Fur [5]. Ekspresja genów operonu *fldA-fur* jest indukowana poprzez system SoxRS w odpowiedzi na stres, wynikający z podwyższonego stężenia nadtlenu, powstałych w wyniku reakcji redoks [48]. Dodatkowo, gen *fur* posiada własny promotor, z którego zachodzi indukcja ekspresji w obecności regulatora OxyR, w odpowiedzi na zwiększone stężenie nadtlenu wodoru, co również związane jest z zachodzeniem reakcji utleniania i redukcji [49]. Okazuje się jednak, iż pomimo tak wyraźnej regulacji reakcje redoks zwiększają poziom ekspresji genu *fur* tylko dwukrotnie. Taki wynik ukazuje ciekawą zależność między reakcjami redoks a homeostazą żelazową. Zwiększenie liczby kopii białka Fur podczas zachodzenia tego rodzaju reakcji skutkuje wiązaniem większej ilości jonów  $Fe^{2+}$ , zmniejszeniem wydajności transportu żelaza oraz indukcją systemów związanych z jego magazynowaniem. W efekcie dochodzi do znacznego zmniejszenia stężenia wolnego żelaza w komórce wywołanego zachodzeniem reakcji redoks [48]. Okazało się również, że gen *fur* podlega również słabej autoregulacji, a miejscem oddziaływania jest „Fur box” zlokalizowany w regionie międzygenowym operonu *fldA-fur*. Dodatkowo, wykazano udział kompleksu cAMP/CRP w regulacji ekspresji *fur* [44].

### 4.5. Inne regulatory kontrolujące proces transkrypcji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu

Proces adaptacji bakterii do zmieniających się parametrów fizykochemicznych środowiska możliwy jest dzięki funkcjonowaniu różnorodnych mechanizmów regulacyjnych. U *E. coli* oraz innych bakterii Gram-ujemnych, w efektywnym odbiorze, przekazywaniu i przetwarzaniu sygnałów biorą udział dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału, w tym szlak sygnałowy EnvZ/OmpR. EnvZ jest białkiem o aktywności kinazy i fosfatazy, zlokalizowanym w błonie cytoplazmatycznej i pełniącym funkcje sensora odbierającego sygnały środowiskowe. OmpR to cytoplazmatyczny regulator odpowiedzi, który w wyniku fosforylacji przez partnerską kinazę EnvZ, a co za tym idzie zmian konformacyjnych w białku, nabiera zdolności do przyłączania się do sekwencji regulatorowych w genach kontrolujących pozytywnie lub negatywnie ich transkrypcję. U *E. coli* wykazano, iż białko OmpR pełni funkcję globalnego regulatora, który kontroluje różne procesy życiowe tej bakterii [50]. Analizy ekspresji promotorów dwóch operonów *hemPRSTUV-1* i *hemPRST-2* kodujących składowe systemy transportu hemu u *Y. enterocolitica* wykazały, iż OmpR, obok Fur, hamuje transkrypcję obu operonów poprzez bezpośrednie oddziaływanie z DNA w obrębie motywu -35 sekwencji promotorowej. Ponadto, wpływ OmpR na aktywność promotora *hemPRSTUV-1* obserwowano zarówno w warunkach niedoboru, jak i nadmiaru żelaza [14].

Przeprowadzono szereg badań dotyczących regulacji systemów pozyskiwania żelaza/hemu *in vitro* oraz *in vivo*, tj. w zależności od lokalizacji patogenu w organizmie gospodarza i dostępności do różnych źródeł żelaza. U *Y. enterocolitica* wykazano, iż ekspresja genu kodującego receptor hemu HemR jest specyficzna tkankowo. Ekspresja *hemR* jest wyższa w śledzionie i otrzewnej, a niższa w wątrobie i jelitach. Ponadto ekspresja *hemR in vivo*, w otrzewnej jest wyższa niż ekspresja w warunkach *in vitro*, w podłożu pozbawionym żelaza. Badania te sugerują, iż mogą istnieć dodatkowe specyficzne sygnały, poza spadkiem stężenia jonów żelaza, pochodzące z organizmu gospodarza, które regulują transkrypcję *hemR* [10, 51].

W przypadku *Y. pseudotuberculosis* w kontroli ekspresji *hmuRSTUV* biorą udział co najmniej dwa globalne regulatory, Fur i IscR. U *E. coli* białko IscR (iron-sulphur cluster regulator), bezpośrednio lub pośrednio kontroluje ekspresję ~40 genów [52, 53]. U *Y. pseudotuberculosis* IscR, kontroluje ekspresję systemu sekrecji III typu (T3SS) związanego z wirulencją, a także bierze udział w pozytywnej regulacji ekspresji *hmuRSTUV* [29, 54]. Ponieważ u *E. coli* stres oksydacyjny, a także ograniczenie dostępności tlenu i żelaza regulują aktyw-



ność IscR, to wydaje się, iż zarówno tlen jak i żelazo mogą stanowić ważne czynniki regulujące wychwyt hemu/hemoprotein ze środowiska, również u gatunków z rodzaju *Yersinia* [52, 55, 56]. U *Vibrio vulnificus* zaobserwowano natomiast współzawodnictwo między represorem Fur a pozytywnym regulatorem HupR. W środowisku o niskiej zawartości żelaza, gdy obecny jest hem, HupR może wiązać się z promotorem genu *hupA*, kodującym receptor hemowy błony zewnętrznej, aby indukować jego ekspresję. W warunkach wysokiego stężenia żelaza  $Fe^{+2}$ -Fur wiąże się z promotorem *hupA*, hamując jego ekspresję, tym samym zapobiegając wiązaniu HupR [57].

#### 4.6. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów związanych z pobieraniem hemu

Indukowane termicznie zmiany strukturalne w mRNA pełnią fundamentalną rolę w termoregulacji ekspresji czynników zjadliwości u wielu bakterii chorobotwórczych [58–60]. Jak sugerują badania, pobieranie hemu przez bakterie może być regulowane w odpowiedzi na zmianę temperatury otoczenia. Termoregulację ekspresji genów transportu hemu opisano u niektórych bakterii chorobotwórczych, które są zdolne do przeżycia wewnątrz organizmu gospodarza (~37°C) jak i na zewnątrz, tj. w temp. ok. 25°C. Ponieważ organizm gospodarza jest środowiskiem bogatym w hem, w 37°C u bakterii zachodzi ekspresja genów niezbędnych do wychwytu hemu, natomiast w 25°C, w środowisku pozbawionym tego związku, ekspresja genów jest wyciszona, gdyż byłaby zbędnym wydatkiem energetycznym. Potranskrypcyjny mechanizm termoregulacji dotyczy m. in. ekspresji genu *shuA*, kodującego receptor hemu zlokalizowany w błonie zewnętrznej *Shigella dysenteriae*. Za proces ten odpowiada fragment regionu 5'UTR mRNA *shuA* pełniący funkcję swoistego termometru [61]. Termosensory w komórkach bakteryjnych, poprzez tworzenie wiązań pomiędzy zasadami mRNA (model zamka błyskawicznego), regulują ekspresję genów wirulencji i szoku cieplnego w odpowiedzi na zmiany temperatury w środowisku [62]. W niskiej temperaturze obecność struktury II-rzędowej w mRNA, w miejscu wiązania rybosomu, hamuje proces translacji. Z chwilą wzrostu temperatury, dochodzi do rozwinięcia struktury II-rzędowej, co prowadzi do uruchomienia translacji. Dane literaturowe wskazują, iż w wyniku funkcjonowania opisanego mechanizmu potranskrypcyjnej regulacji u *S. dysenteriae* w 37°C obserwuje się zwiększoną ekspresję genu *shuA*, a co za tym idzie zwiększony poziom syntezy receptora ShuA. Za tę regulację jest odpowiedzialny fragment 5'UTR mRNA *shuA* złożony z ciągu czterech uracyli (FourU). Taki typ termosensora zidentyfikowano także w genie *chuA* receptora hemu *E. coli* UPEC oraz udowodniono

termoregulację syntezy receptora ChuA, co sugeruje iż ten mechanizm potranskrypcyjnej regulacji może występować także w innych gatunkach bakterii [61]. Chociaż w 5'UTR mRNA *hemR* *Y. enterocolitica* zidentyfikowano ciąg FourU to poziom HemR w komórce tego patogenu nie podlega termoregulacji [14].

Inny mechanizm potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów wiąże się z obecnością/aktywnością małych regulatorowych RNA (sRNA), które pełnią istotną funkcję w szybkiej odpowiedzi komórek na zmiany zachodzące w środowisku. W ciągu ostatniej dekady wiele sRNA zostało zidentyfikowanych jako regulatory różnych procesów komórkowych, takich jak synteza białek błony zewnętrznej [63], metabolizm [64], patogenesa [65–67], ruchliwość/produkcja biofilmu [68, 69]. W regulacji ekspresji genów związanych z transportem żelaza u *E. coli* zidentyfikowano mały regulatorowy sRNA RyhB. Udowodniono, że RyhB pełni kluczową rolę w homeostazie żelaza regulując ekspresję co najmniej 50 różnych genów kodujących białka zaangażowane w transport i wykorzystanie tego pierwiastka [70]. RyhB może działać na dwa sposoby, przede wszystkim wyciszając ekspresję genów poprzez hamowanie translacji i destabilizację/degradację docelowego mRNA, oraz rzadziej promując ekspresję genów [71]. Regulacja negatywna z udziałem RyhB polega na parowaniu sRNA/mRNA, które zazwyczaj zachodzi w miejscu inicjacji translacji (na odcinku ok. 50 nt, zawierającym RBS oraz kodon start translacji regulowanego genu). Przyłączenie tego sRNA prowadzi do zahamowania inicjacji translacji i degradacji dupleksów sRNA/mRNA przez RNazę E [72, 73]. Aby zaszło parowanie RyhB z mRNA wymagane jest białko chaperonowe Hfq [74]. Homologi RyhB zostały opisane u wielu gatunków bakterii, głównie w rodzinie *Enterobacteriaceae* [66, 70, 75, 76]. Co ciekawe niektóre gatunki bakterii kodują dwa sRNA RyhB w swoim genomie, a rola każdego z nich może być podobna bądź zupełnie różna. Do takich gatunków należą *Salmonella* sp. [77, 78], *Y. pestis* [79] i *K. pneumoniae* [80]. RyhB-zależna regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za transport żelaza wynika głównie z oddziaływania dwóch regulatorów, RyhB i Fur, na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego, gdzie (i) ekspresja *ryhB* jest hamowana przez Fur [81], (ii) ekspresja *fur* jest hamowana przez RyhB [82]. Poza tym, że RyhB uczestniczy w kontroli ekspresji genów poprzez modulowanie transkrypcji represora Fur, ma również wiele bezpośrednich celów wśród genów kodujących białka odpowiedzialne za transport i pozyskiwanie żelaza, tj. (i) *shiA* – gen transportera kwasu szikimowego [83], (ii) *cirA* – gen receptora w błonie zewnętrznej [84], (iii) *bfr* – gen bakterioferrytyny [81], (iv) *febB* – gen białka wiążącego enterobaktynę [84], (v) *hemH*, *hemB*, *hemN* – geny białek zaangażowanych w biosyntezę hemu [85].

## 5. Podsumowanie

Od czasu odkrycia systemów transportu i pobierania żelaza w postaci hemu u bakterii poczyniono ogromne postępy w identyfikowaniu kluczowych komponentów zaangażowanych w wychwyt tego związku, jak również charakteryzowaniu struktur białek zaangażowanych w procesy przenoszenia hemu ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki bakteryjnej. Szczególnie ważne jest poznawanie tych systemów w różnych mikroorganizmach, ze względu na konieczność zrozumienia ich funkcjonowania, aby w przyszłości stały się celem działania nowych terapii antybakteryjnych.

### Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska) przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2016/21/B/NZ6/01009.

### Piśmiennictwo

- Smith A.D., Wilks A.: Extracellular heme uptake and the challenges of bacterial cell membranes. *Curr. Top. Membr.* **69**, 359–392 (2012)
- Guan L., Liu Q., Li C., Zhang Y.: Development of a Fur-dependent and tightly regulated expression system in *Escherichia coli* for toxic protein synthesis. *BMC Biotechnol.* **13**, 25 (2013)
- Weinberg E.D.: The Lactobacilli anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 1–6 (1997)
- Posay J.E., Gherardini F.C.: Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, **288**, 1651–1653 (2000)
- Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F.: Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215–237 (2003)
- Cassat J.E., Skaar E.P.: Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 509–519 (2013)
- Gozzelino R., Soares M.P.: Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1754–1769 (2014)
- Anzaldi L.L., Skaar E.P.: Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **78**, 4977–4989 (2010)
- Hamza I., Dailey H.A.: One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 1617–1632 (2012)
- Runyen-Janecky L.J.: Role and regulation of heme iron acquisition in Gram-negative pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 55 DOI: 10.3389/fcimb.2013.00055 (2013)
- Wilks A., Ikeda-Saito M.: Heme utilization by pathogenic bacteria: not all pathways lead to biliverdin. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2291–2298 (2014)
- Bracken C.S., Baer M.T., Abdur-Rashid A., Helms W., Stojiljkovic I.: Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J. Bacteriol.* **181**, 6063–6072 (1999)
- Stojiljkovic I., Hantke K.: Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359–4367 (1992)
- Jaworska K., Niecarz M., Ludwiczak M., Raczkowska A., Brzostek K.: OmpR-mediated transcriptional regulation and function of two heme receptor proteins of *Yersinia enterocolitica* bio-Serotype 2/O:9. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 333, DOI: 10.3389/fcimb.2018.00333 (2018)
- Carrizo-Chávez M.A., Cruz-Castañeda A., Olivares-Trejo J.J.: The *frpB1* gene of *Helicobacter pylori* is regulated by iron and encodes a membrane protein capable of binding haem and haemoglobin. *FEBS Lett.* **586**, 875–879 (2012)
- Ridley K.A., Rock J.D., Li Y., Ketley J.M.: Heme Utilization in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **188**, 7862–7875 (2006)
- Lewis L.A., Gray E., Wang Y.P., Roe B.A., Dyer D.W.: Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 737–749 (1997)
- Rohde K.H., Gillaspay A.F., Hatfield M.D., Lewis L.A., Dyer D.W.: Interactions of haemoglobin with the *Neisseria meningitidis* receptor HpuAB: the role of TonB and an intact proton motive force. *Mol. Microbiol.* **43**, 335–354 (2002)
- Dent A.T., Mourinho S., Huang W., Wilks A.: Post-transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* heme assimilation system (Has) fine-tunes extracellular heme sensing. *J. Biol. Chem.* **294**, 2771–2785 (2019)
- Kumar R., Qi Y., Matsumura H., Lovell S., Yao H., Battaile K.P., Im W., Moënné-Loccoz P., Rivera M.: Replacing arginine 33 for alanine in the hemophore HasA from *Pseudomonas aeruginosa* causes closure of the H32 loop in the apo-protein. *Biochemistry*, **55**, 2622–2631 (2016)
- Yukl E.T., Jepkoror G., Alontaga A.Y., Pautsch L., Rodriguez J.C., Rivera M., Moënné-Loccoz P.: Kinetic and spectroscopic studies of hemin acquisition in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **49**, 6646–6654 (2010)
- Izadi N., Henry Y., Haladjian J., Goldberg M.E., Wandersman C., Delepierre M., Lecroisey A.: Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, Involved in Heme Iron Acquisition. *Biochemistry*, **23**, 7050–7057 (1997)
- Jepkoror G., Rodriguez J.C., Rui H., Im W., Lovell S., Battaile K.P., Alontaga A.Y., Yukl E.T., Moënné-Loccoz P., Rivera M.: Structural, NMR spectroscopic, and computational investigation of hemin loading in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9857–9872 (2010)
- Izadi-Pruneyre N., Huché F., Lukat-Rodgers G.S., Lecroisey A., Gilli R., Rodgers K., Wandersman C., Deleplaire P.: The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *J. Biol. Chem.* **281**, 25541–25550 (2006)
- Celia H., Noinaj N., Zakharov S.D., Bordignon E., Botos I., Santamaria M., Barnard T.J., Cramer W.A., Lloubes R., Buchanan S.: Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature*, **538**, 60–65 (2016)
- Shultis D.D., Purdy M.D., Banchs C.N., Wiener M.C.: Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science*, **312**, 1396–1399 (2006)
- Santander J., Golden G., Wanda S., Curtiss R.: Fur-regulated iron uptake system of *Edwardsiella ictaluri* and its influence on pathogenesis and immunogenicity in the Catfish Host. *Infect. Immun.* **80**, 2689–2703 (2012)
- Thompson J.M., Jones H.A., Perry R.D.: Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect. Immun.* **67**, 3879–3892 (1999)
- Schwiesow L., Mettert E., Wei Y., Miller H.K., Herrera N.G., Balderas D., Kiley P.J., Auerbuch V.: Control of *hmu* heme uptake genes in *Yersinia pseudotuberculosis* in response to iron sources. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 47, DOI: 10.3389/fcimb.2018.00047 (2018)

30. Mattle D., Zeltina A., Woo J., Goetz B.A., Locher K.P.: Two stacked heme molecules in the binding pocket of the periplasmic heme-binding protein HmuT from *Yersinia pestis*. *J. Mol. Biol.* **404**, 220–231 (2010)
31. Farhana A., Saini V., Kumar A., Lancaster J.R., Steyn A.J.C.: Environmental heme-based sensor proteins: implications for understanding bacterial pathogenesis. *Antiox. Redox Signal.* **17**, 1232–1245 (2012)
32. Van Vliet A.H.M., Stoof J., i wsp.: The role of the ferric uptake regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*, **7**, 237–244 (2002)
33. Butcher J., Sarvan S., Brunzelle J.S., Couture J., Stinzi A.: Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. *PNAS*, **109**, 10047–10052 (2012)
34. Sun F., Gao H., Zhang Y., Wang L., Fang N., Tan Y., Guo Z., Xia P., Zhou D., Yang R.: Fur is a repressor of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *PLoS One*, **7**, e52392, DOI: 10.1371/journal.pone.0052392 (2012)
35. Visca P., Imperi F.: An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur. *Future Microbiol.* **13**, 853–856 (2018)
36. Pohl E., Haller J.C., Mijovilovich A., Meyer-Klaucke W., Garman E., Vasil M.L.: Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**, 903–915 (2003)
37. Deng Z., Wang Q., i wsp.: Mechanistic insights into metal iron activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat. Commun.* **6**, 7642 (2015)
38. Pecqueur L., D'Autréaux B., Dupuy J., Nicolet Y., Jacquamet L., Brutscher B., Michaud-Soret I., Bersch B.: Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**, 21286–21295 (2006)
39. Althaus E.W., Outten C.E., Olson K.E., Cao H., O'Halloran T.V.: The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochem.* **38**, 6559–6569 (1999)
40. Jacquamet L., Aberdam D., Adrait A., Hazemann J.L., Latour J.M., Michaud-Soret I.: X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **37**, 2564–2571 (1998)
41. Bagg A., Neilands J.B.: Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **26**, 5471–5477 (1987)
42. Escolar L., Pérez-Martín J., De Lorenzo V.: Evidence of an unusually long operator for the Fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24709–24714 (2000)
43. Lavrrar J.L., Christoffersen C.A., McIntosh M.A.: Fur-DNA interactions at the bi-directional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **322**, 983–995 (2002)
44. De Lorenzo V., Herrero M., Giovannini F., Neilands B.: Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **173**, 537–546 (1988)
45. Carpenter B.M., Whitmire J.M., Marell D.S.: This is not your mother's repressor: the complex role of Fur in pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**, 2590–2601 (2009)
46. Agriesti F., Roncarati D., Musiani F., Del Campo C., Iurlaro M., Sparla F., Ciurli S., Danielli A., Scarlato V.: FeON-FeOFF: the *Helicobacter pylori* Fur regulator commutates iron-responsive transcription by discriminative readout of opposed DNA grooves. *Nucleic Acid Res.* **42**, 3138–3151 (2014)
47. Delany I., Spohn G., Pacheco A.F., Ieva R., Alaimo C., Rappuoli R., Scarlato V.: Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol. Microbiol.* **46**, 1107–1122 (2002)
48. Zheng M., Doan B., Schneider T.D., Storz G.: OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* **181**, 4639–4643 (1999)
49. Varghese S., Wu A., Park S., Imlay K.R., Imlay J.A.: Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **64**, 822–830 (2007)
50. Oshima T., Aiba H., Masuda Y., Kanaya S., Sugiura M., Wanner B.L., Mori H., Mizuno T.: Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **46**, 281–291 (2002)
51. Jacobi C.A., Gregor S., Rakin A., Heesemann J.: Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* *in vitro* and *in vivo* using the reporter for green fluorescent protein and luciferase. *Infect. Immun.* **69**, 7772–7782 (2001)
52. Giel J.L., Rodionov D., Liu M., Blattner F.R., Kiley P.J.: IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1058–1075 (2006)
53. Nesbit A.D., Giel J.L., Rose J.C., Kiley P.J.: Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation. *J. Mol. Biol.* **387**, 28–41 (2009)
54. Miller H.K., Kwuan L., i wsp.: IscR is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion and virulence. *PLoS Pathog.* **10**, e1004194 (2014)
55. Yeo W., Lee J., Lee K., Roe J.: IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* **61**, 206–218 (2006)
56. Wu Y., Outten F.W.: IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *J. Bacteriol.* **191**, 1248–1257 (2009)
57. Litwin C.M., Quackenbush J.: Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb. Pathog.* **31**, 295–307 (2001)
58. Narberhaus F., Waldminghaus T., Chowdhury S.: RNA thermometers. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 3–16 (2006)
59. Narberhaus F.: Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol.* **7**, 84–89 (2010)
60. Böhme K., Steinmann R., i wsp.: Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog.* **8**, e1002518 (2012)
61. Kouse A.B., Righetti F., Kortmann J., Narberhaus F., Murphy E.R.: RNA-mediated thermoregulation of iron-acquisition genes in *Shigella dysenteriae* and pathogenic *Escherichia coli*. *PLOS One*, **8**, e63781 (2013)
62. Kortmann J., Narberhaus F.: Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 255–265 (2012)
63. Guillier M., Gottesman S., Storz G.: Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes. Dev.* **20**, 2338–2348 (2006)
64. Görke B., Yogel J.: Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes. Dev.* **22**, 2914–2925 (2008)
65. Romby P., Vandenesch F., Wagner E.G.: The role of RNAs in the regulation of virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 229–236 (2006)
66. Murphy E.R., Payne S.M.: RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect. Immun.* **75**, 3470–3477 (2007)
67. Porcheron G., Dozois C.M.: Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as a major regulator of bacterial pathogenicity. *Vet. Microbiol.* **31**, 2–14 (2015)



68. Mika F, Hengge R.: Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4560–4579 (2013)
69. Kim J.N., Kwon Y.M.: Identification of target transcripts regulated by small RNA RyhB homologs in *Salmonella*: RyhB-2 regulates motility phenotype. *Microbiol. Res.* **168**, 621–629 (2013)
70. Massé E., Vanderpool C.K., Gottesman S.: Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971 (2005)
71. Chareyre S., Mandin P.: Bacterial iron homeostasis regulation by sRNAs. *Microbiol. Spectrum*. **6**, RWR-0010-2017, DOI: 10.1128/microbiolspec (2018)
72. Massé E., Escorcia F.E., Gottesman S.: Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes. Dev.* **17**, 2374–2383 (2003)
73. Morita T, Maki K, Aiba H.: RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes. Dev.* **19**, 2176–2186 (2005)
74. De Lay N., Schu D.J., Gottesman S.: Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J. Biol. Chem.* **288**, 7996–8003 (2013)
75. Oglesby A.G., Murphy E.R., Iyer V.R., Payne S.M.: Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and YdeP. *Mol. Microbiol.* **58**, 1354–1367 (2005)
76. Davis B.M., Quinones M., Pratt J., Ding Y., Waldor M.K.: Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **187**, 4005–4014 (2005)
77. Kim J.N.: Roles of two RyhB paralogs in the physiology of *Salmonella enterica*. *Microbiol. Res.* **186–187**, 146–152 (2016)
78. Calderon I.L., Morales E.H., Collao B., Calderon P.F., Chahuan C.A., Acuna L.G., Gil F., Saavedra C.P.: Role of *Salmonella* Typhimurium small RNAs RyhB-1 and RyhB-2 in the oxidative stress response. *Res. Microbiol.* **165**, 30–40 (2013)
79. Deng Z., Meng X., Su S., Liu Z., Ji X., Zhang Y., Zhao X., Wang X., Yang R., Han Y.: Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar *microtus* expressed *in vivo* have differential Hfq-dependent stability. *Res. Microbiol.* **163**, 413–418 (2012)
80. Huang S.H., Wang C.K., Peng H.L., Wu C.C., Chen Y.T., Hong Y.M., Lin C.T.: Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **24**, DOI:10.1186/1471-2180-12-148 (2012)
81. Massé E., Gottesman S.: A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4620–4625 (2002)
82. Večerek B., Moll I., Bläsi U.: Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J.* **26**: 965–975 (2007)
83. Prévost K., Desnoyers G., Jacques J.F., Lavoie F., Massé E.: Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes. Dev.* **25**, 385–396 (2011)
84. Salvail H., Caron M., Bélanger J., Massé E.: Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *EMBO J.* **32**, 2764–2778 (2013)
85. Li F., Wang Y., Gong K., Wang Q., Liang Q., Qi Q.: Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **350**, 209–215 (2014)