

**BIAŁKA UCZESTNICZĄCE W TRANSPORCIE
JONÓW ŻELAZA(II) W BAKTERIACH
GRAM-UJEMNYCH**

**PROTEINS INVOLVED IN THE FERROUS IONS
TRANSPORT IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

Karolina Kierpiec, Kamila Stokowa-Soltys*

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: kamila.stokowa-soltys@chem.uni.wroc.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. System Feo

1.1. Organizacja systemu Feo

1.2. Operon *feoABC*

1.3. Białko FeoA

1.4. Białko FeoB

1.5. Białko FeoC

1.6. Mechanizm wychwytu jonów Fe²⁺

2. Transportery ABC

2.1. Ogólny podział i mechanizm działania transporterów ABC

2.2. Białka transportujące Hmu

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Karolina Kierpiec studentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego na kierunku Chemia Medyczna. Pracę magisterską wykonuje w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej pod opieką dr Kamili Stokowej-Sołtys.



<https://orcid.org/0000-0001-9128-6750>

Dr Kamila Stokowa-Sołtys w roku 2013 z wyróżnieniem obroniła pracę doktorską i obecnie jest Adiunktem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Przez wiele lat współpracowała z prof. dr hab. Małgorzatą Jeżowską-Bojczuk i pod Jej kierunkiem i opieką rozpoczęła swoją pracę naukową. Obecnie pracuje w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej, którego Kierownikiem jest dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka, prof. UW.

Zainteresowania naukowe dr Kamili Stokowej-Sołtys skupiają się wokół chemii koordynacyjnej jonów metali, zwłaszcza miedzi i żelaza. W swojej pracy naukowej zajmuje się badaniem transportu i homeostazy jonów metali, stresem oksydacyjnym oraz generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT) przez kompleksy. Ponadto, określa wpływ tworzących się RFT na ważne biologiczne makromolekuły, w tym cząsteczki kwasów deoksyrybonukleinowych. W ramach realizacji projektu NCN, którego była Kierownikiem, wykazała, iż białka błonowe komensalnej bakterii *F. nucleatum* oraz ich kompleksy z jonami metali są czynnie zaangażowane w inicjację i progresję nowotworów jelita grubego.



<https://orcid.org/0000-0003-4723-0658>

ABSTRACT

Continuous increase in the number of multidrug-resistant strains forces us to look for drugs with completely new mode of action. One of the bacterial property determining the pathogenicity of these microorganisms is their ability to obtain iron. Because in the living environment of these single-celled individuals, its concentration is much lower than this necessary for their growth. For this reason, bacteria created various type of iron aquisition systems, including the Feo system, which mechanism of Fe^{2+} ion uptake is not fully understood, and protein from the Hmu family belonging to ABC transporters. The Feo transport system is one of the most common systems that is exclusively responsible for importing Fe^{2+} ions. It consists of three proteins: FeoA, FeoB and FeoC. FeoB is a transmembrane protein that is believed to play a key role in the mechanism of Fe^{2+} ion uptake. The other two components are cytoplasmic proteins. Both, FeoA and FeoC, are cytoplasmic proteins resembling the construction of transcription regulators. ABC transporters play an equally important role in maintaining iron homeostasis. These include proteins from Hmu family. HmuUV complex catalyses the import of these ions in hem iron form. The structure of this complex consists of TMD dimer (HmuU) and NBD dimer (HmuV). The HmuU is considered to be a permease - just like the FeoB described earlier while HmuV is the ATP binding protein.

Keywords: ferrous ions transport, gram-negative bacteria, Feo, Hmu

Słowa kluczowe: transport jonów żelaza(II), bakterie gram-ujemne, Feo, Hmu

WPROWADZENIE

Infekcje bakteryjne stanowią poważny problem współczesnego świata ze względu na znaczący wzrost liczby antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych. Osłabienie lub utrata aktywności dotychczas stosowanych antybiotyków zmusza do ciągłego poszukiwania innowacyjnych rozwiązań i nowych punktów uchwytu działania leków. Z tego względu, z coraz większym zainteresowaniem badane są mechanizmy kontrolujące pobieranie przez bakterie składników niezbędnych dla ich wzrostu i rozwoju.

Jedną z właściwości bakterii, która odpowiada za patogenność tych jednokomórkowców, jest zdolność do pozyskiwania żelaza. W środowisku życia drobnoustrojów stężenie żelaza jest dużo niższe, niż to niezbędne dla ich wzrostu. W związku z tym bakterie wykształciły wiele systemów odpowiedzialnych za transport żelaza oraz mechanizmów utrzymujących homeostazę tego jonu. Jedną z najbardziej powszechnych metod pozyskiwania tego pierwiastka przez bakterie jest wytwarzanie sideroforów. Są one niskocząsteczkowymi czynnikami chelatującymi żelazo, które po zsyntezowaniu zostają wydzielane do środowiska. Siderofory możemy podzielić na dwie główne grupy: pochodne fenoli i kwasy hydroksamowe. Chelatory te rozpoznawane są przez specyficzne receptory i przenoszone zarówno przez błonę zewnętrzną, jak i wewnętrzną, do wnętrza komórki bakterii. W cytoplazmie następuje uwolnienie jonu, np. poprzez obniżenie pH, które skutkuje redukcją jonu Fe^{3+} do Fe^{2+} . Tworzy się mniej trwały kompleks, ponieważ zmniejsza się powinowactwo chelatora do metalu na niższym stopniu utlenienia. Prowadzi to do uwolnienia jonu metalu. Jak już wcześniej wspomniano, ze względu na konieczność utrzymania homeostazy żelazowej, istnieje wiele systemów spełniających analogiczną funkcję [1]. W niniejszym artykule uwagę skupiono na omówieniu innych niż siderofory dróg transportu jonów Fe^{2+} w bakteriach gram-ujemnych.

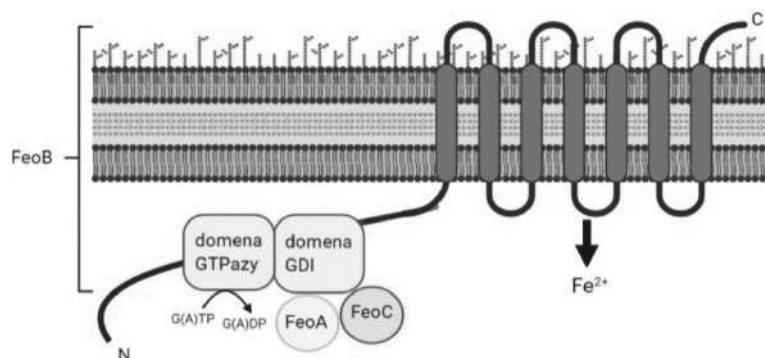
1. SYSTEM FEO

1.1. ORGANIZACJA SYSTEMU FEO

W warunkach beztlenowych oraz w niskim pH żelazo występuje w formie jonu dwudodatniego Fe^{2+} . Jon ten jest lepiej rozpuszczalny, ale kinetycznie mniej trwały, niż jon Fe^{3+} dominujący w warunkach tlenowych. Dzięki systemowi Feo (ang. *Ferrous iron transport*), który stanowi główną drogę transportu jonów Fe^{2+} w bakteriach, mogą one pozyskiwać żelazo niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki [2].

System Feo zbudowany jest z trzech białek: FeoA, FeoB i FeoC. Zarówno FeoA, jak i FeoC są małymi białkami cytoplazmatycznymi, a ich dokładna rola nadal pozostaje niejasna. Zaobserwowano jednak, że FeoA pojawia się w licznej grupie gatunków, podczas gdy FeoC występuje głównie w γ -proteobakteriach [3].

Z kolei FeoB, jest dużym transbłonowym białkiem składającym się z trzech domen: domeny białka G, domeny inhibitora dysocjacji GDP (ang. *guanosine 5'-diphosphate*) tj. domeny GDI (ang. *guanine-nucleotide dissociation inhibitor*) i domeny transbłonowej [[3]-[5]]. Zakwalifikowanie FeoB do permeaz, czyli białek transportujących m.in. jony przez błony komórkowe bakterii zazwyczaj na drodze transportu aktywnego, dostarcza nam podstawowych informacji na temat jego budowy i funkcji w procesie pobierania jonów Fe^{2+} [4].



Rysunek 1. Schematyczna organizacja kompleksu FeoABC z uwzględnieniem podziału FeoB na dwie domeny cytoplazmatyczne (domenę białka G i domenę GDI) oraz domenę transbłonową. Opracowanie własne na podstawie [6]

Figure 1. Schematic organization of FeoABC complex, including division of FeoB into two cytoplasmic domains and transmembrane domain. Own figure based on [6]

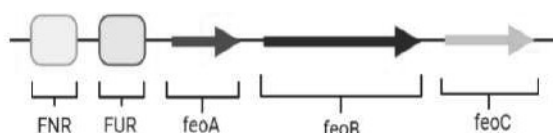
Wyniki badań przeprowadzonych w 2016 roku przez Stevenson *et al.* dowiodły, iż wszystkie białka wchodzące w skład systemu Feo oddziałują ze sobą tworząc funkcjonalny kompleks. Jednakże, w procesie składania tego złożonego systemu, kluczową rolę odgrywa białko FeoA oraz domena białka G stanowiąca fragment FeoB. [[4]]. Schematyczna organizacja całego układu Feo została przedstawiona na Rysunku 1.

Wykazano także, że system Feo jest istotnym czynnikiem wirulencji bakterii patogennych oraz determinuje zdolność przeżycia bakterii komensalnych. Stojiljkovic *et al.* wykorzystując myszy model kolonizacji jelit wykazał, iż mutanty *Afeo* bakterii *E. coli* nie są w stanie pobierać jonów żelaza i kolonizować jelit. W przeciwieństwie do szczepów z wadliwym systemem siderofora entrobaktyny, które mimo ograniczenia transportu jonów Fe^{3+} są zdolne do zasiedlania tkanek tego narządu. Tym samym wykazano, iż zdolność kolonizacji *E. coli* zależy od możliwości poboru jonów Fe^{2+} ze środowiska. Ponadto, białka FeoB i FeoA są wyznacznikiem zjadliwości patogennych bakterii gram-ujemnych m.in. *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori* czy *Porphyromonas gingivalis*. Co więcej, sugeruje się, że dla zjadliwości *P. gingivalis* pobieranie jonów żelaza jest ważniejsze niż

pozyskiwanie manganu. Jednakże, nie dla wszystkich patogenów obserwowana jest taka zależność. W przypadku *Streptococcus suis*, *Xanthomonas*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium* i *Pseudomonas aeruginosa*, zjadliwość bakterii nie zależy wyłącznie od systemu Feo. Wykazano, iż delekcja operonu *feoB* u *S. suis*, znacząco osłabiła jego zjadliwość u myszy, ale nie znosi jej całkowicie. Zaobserwowano również, że *S. suis* w warunkach *in vitro* nie wymaga do wzrostu jonów żelaza. Sugeruje to, że główną rolą FeoB może być transport innych dwuwartościowych jonów metali [7].

1.2. OPERON *FEOABC*

Locus *feo* stanowią trzy ściśle powiązane geny, które mogą tworzyć operon *feoABC* kodujący wszystkie trzy białka składające się na system Feo. Pierwotnie został on zidentyfikowany w bakteriiach *Escherichia coli* [8]. Wysoki odsetek operonów zawierających zarówno *feoA*, jak i *feoB* (~89%) sugeruje, że podjednostki kodowanych przez nie białek wzajemnie ze sobą oddziałują. Z tego względu uznaje się, że FeoA pojawia się, by wspomagać FeoB w systemie transportu [7]. Kontrola ekspresji genów kodujących niniejsze białka zachodzi poprzez regulator transkrypcji wychwyty żelaza (FUR, ang. *Ferric uptake regulation protein*) [9, 10], który tłumí ekspresję *feoABC* w przypadku obecności żelaza. Z kolei regulator transkrypcji reduktazy azotanowej i fumaranu (FNR, ang. *Fumarate and nitrate reduction regulatory protein*) [11] aktywuje ekspresję *feoABC* w warunkach beztlenowych [8].



Rysunek 2. Schemat operonu *feoABC* w *E. coli*

Figure 2. Scheme of the *feoABC* operon in *E. coli*

1.3. BIAŁKO FEOA

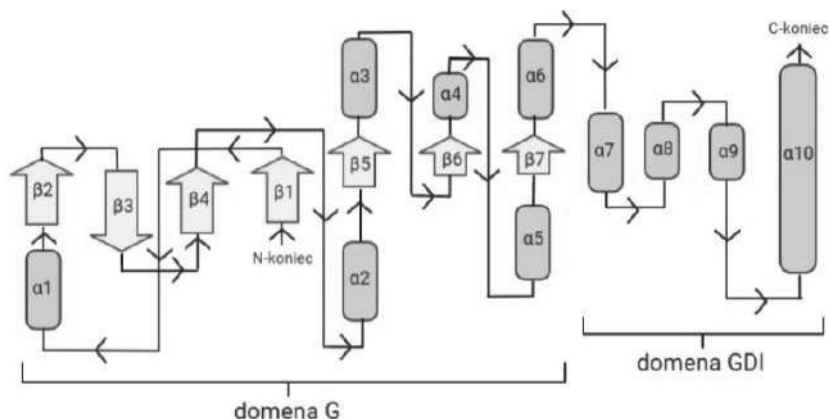
FeoA jest małym, zawierającym zaledwie 75-85 reszt aminokwasowych, białkiem cytoplazmatycznym. Co niespotykane, ma niezwykle wysoką wartość punktu izoelektrycznego, a mianowicie około 9 [[3], 8]. Z tego też powodu przypuszcza się, że FeoA może być powierzchniowym białkiem błonowym [3], co potencjalnie ułatwia oddziaływanie z FeoB. Przeprowadzone badania rentgenostrukturalne kryształów oraz NMR w roztworze wodnym w dużej

mierze pozwoliły określić strukturę tego białka. Jednak ze względu na fakt, iż w obu metodach analizowano różne stany skupienia, uzyskane wyniki nieco od siebie odbiegają. Wyniki badań NMR wskazują na tworzenie się wyłącznie struktur monomerycznych, podczas gdy wyniki badań kryształów dowodzą tworzenia się zarówno dimerów, jak i oktamerów. Najprawdopodobniej jest to związanie z zastosowanymi warunkami krystalizacji. Ponadto niewielkie różnice w uzyskanych strukturach pojawiają się na *N*- oraz *C*-końcu białka. Dotyczą one m.in. uporządkowania struktury i pojawienia się dodatkowej połowy helisy 3_{10} na *N*-końcu prowadzącej do pierwszej β -harmonijki (m.in. u bakterii *Chlorobium tepidum* i *Stenotrophomonas maltophilia*). Zidentyfikowano także nadprogramową helisę 3_{10} na końcu karboksylowym (u *Thermococcus thio-reducens*). Jednak pomimo wspomnianych różnic, główna struktura białka jest taka sama i zawiera 2-3 α -helisy oraz 5-6 β -harmonijek, które dzięki wiązaniom wodorowym tworzą β -baryłkę [7].

Wyniki uzyskanych badań sugerują, że struktura FeoA przypomina regulatory transkrypcji wiązania metalu ScaR (ang. *the streptococcal coaggregation regulator*), IdeR (ang. *iron-dependent regulator*) i DtxR (ang. *diphtheria toxin repressor*). Wszystkie z tych białek są zaangażowane w regulację transkrypcji oraz wiązanie metalu. Omawiane regulatory zawierają trzy domeny: domenę wiązania DNA, domenę dimeryzacji i domenę podobną do SH3 [12]. Białko FeoA charakteryzuje się strukturalnym podobieństwem do domeny SH3. Jednak ze względu na brak konserwatywnych sekwencji zawierających reszty aminokwasowe zdolne do wiązania metali (np. His czy Cys) wydaje się mało prawdopodobne, aby bezpośrednio chelatoowało jony metali [7]. Pomimo tego, że nie potwierdzono czy FeoA jest w stanie wiązać jon Fe^{2+} , ani jaką dokładnie funkcję sprawuje w transporcie, wykazano, że jest ono niezbędne podczas pobierania tych jonów w *Vibrio cholerae* i *Salmonella enterica* [13].

1.4. BIAŁKO FEOB

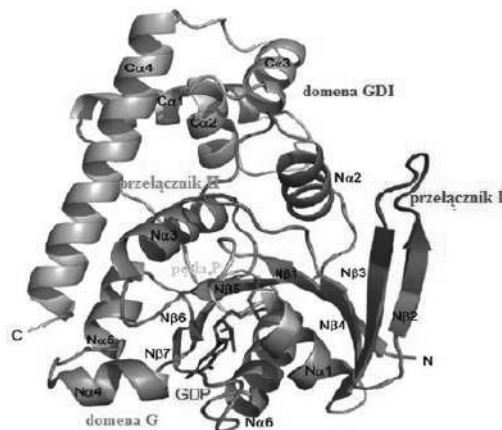
FeoB to duże, zbudowane z 773 reszt aminokwasowych, transbłonowe białko posiadające trzy domeny: domenę białka G, domenę inhibitora dysocjacji GDP (domena GDI) i domenę transbłonową zlokalizowaną na *C*-końcu [3, 6, 14]. Pierwszych około 170 aminokwasów domeny G charakteryzuje się strukturą składającą się z 7 β -harmonijek i 6 α -helis (Rys. 3) [7]. Z kolei domena transbłonowa prawdopodobnie składa się z 8-12 helis i jest regionem, który transportuje jon Fe^{2+} z peryplazmy do cytoplazmy [6].



Rysunek 3 Diagram topologiczny NFeoB (N-końcowej domeny FeoB) z *T. maritima* (PDB id: 3a1s). Opracowanie własne na podstawie [7]

Figure 3. Topology diagram of NFeoB (N-terminus domain of FeoB) from *T. maritima* (PDB id: 3a1s). Own figure based on [7]

Bazując na homologii sekwencji z miejscami wiążącymi ATPaż sędzono, że FeoB hydrolizuje ATP [8]. Siedem lat później, w roku 2000, przypuszczenia te zostały potwierdzone przez zespół D.J. Kelly. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że po dodaniu inhibitorów hydrolizy ATP, transport żelaza w *Helicobacter pylori* został zahamowany [15]. Ostatnie badania wykonane na *Vibrio cholerae* potwierdziły, że FeoB może funkcjonować jako ATPaża. Mutanty motywu G4, odpowiedzialnego za wiązanie guaniny, nie wykazują aktywności GTPaży. Mimo to zachowują aktywność hydrolizy ATP i transportu Fe^{2+} , co wskazuje, że hydroliza ATP jest wystarczająca by transportować żelazo. Ponadto założono, że za aktywność ATPaży mogą odpowiadać reszty seryny i asparaginy w motywie G5. Potwierdziły to badania przeprowadzone w 2019 roku przez zespół Payne na *Helicobacter pylori*. FeoB tej bakterii wykazuje aktywność ATPaży oraz posiada te same reszty aminokwasowe w motywie G5, co FeoB z *Vibrio cholerae* [6]. Inne badania wykazały jednak, że N-końiec FeoB *E. coli* składa się z sekwencji G1-G4 i przełącznika I/II, charakterystycznych dla białek G [5, 14]. Wykazano także, że hydrolizuje on GTP, ale ani nie wiąże, ani nie hydrolizuje ATP [5]. Z tego też powodu uznano FeoB za GTPażę. Wykazano również, że FeoA i FeoC wpływają na aktywność hydrolizy nukleotydów FeoB [6].



Rysunek 4. Widok przestrzenny miejsca wiązania GDP domeny cytozolowej FeoB. Wyróżniono domenę G (zielona), domenę GDI (niebieska), pętlę P (żółta), przelacznik I (czerwony) i przelacznik II (pomarańczowy) [16]

Figure 4. Stereoview of the GDP-bound FeoB cytosolic domain. Highlighting the G domain (green), the GDI domain (blue), the P loop (yellow), switch I (red) and switch II (orange) [16]

Zmiany konformacyjne spowodowane wiązaniem nukleotydów do regionów przelacznika powodują zmianę powinowactwa białko-białko pomiędzy domeną G i efektem, umożliwiając tym samym regulację sygnałów. Funkcjonalne znaczenie domeny G FeoB w transporcie jonów Fe^{2+} zbadano za pomocą ukierunkowanej mutagenyzy FeoB *E. coli* [5]. Mutacja Asp123 do Asn w motywie G4 doprowadziła do zahamowania transportu jonów żelaza Fe^{2+} . W ten sposób Marlovits *et al.* potwierdził w 2002 roku, że ta reszta aminokwasowa jest niezbędna w procesie pobierania jonów żelaza(II) [5].

Region łącznika, zlokalizowany pomiędzy domeną G i domeną transbłonową, został zidentyfikowany jako domena inhibitora dysocjacji GDP (GDI) [18]. Hydrofilowe reszty aminokwasowe (w liczbie ~100) znajdują się w cytoplazmie wraz z domeną G FeoB [7]. Odkryto, że region ten oddziałuje z regionem przelacznika I zlokalizowanym w domenie G, który wzmacnia wiązanie GDP. Nie ma on jednak znaczącego wpływu na wiązanie GTP lub aktywność enzymatyczną. Ponadto obecność heterogenicznego regionu błonowego dodatkowo zwiększa, o około 150 razy, powinowactwo domeny G do GDP w porównaniu do samej domeny GDI [18]. Wyniki uzyskanych badań sugerują, że wychwyt jonów Fe^{2+} przez FeoB jest ściśle regulowany i zależy od wzajemnych zależności między domenami [7].

Trzecią domeną obecną w FeoB jest domena transbłonowa. Prawdopodobnie zbudowana jest z 8-12 transbłonowych helis znajdujących się w błonie cytoplazmatycznej [4]. Mimo że jest to najprawdopodobniej najważniejsza spośród trzech domen, jest ona najmniej poznana. Domena ta odpowiada za przenoszenie

jonów Fe^{2+} z peryplazmy do cytoplazmy. Niestety dokładny mechanizm tego procesu nie jest poznany. W domenie tej możemy wyróżnić motywy bramkowe o konserwatywnej sekwencji aminokwasowej RExLE, w której „x” oznacza dowolny aminokwas. Motywy te funkcjonują jako kanał dla substratów, pozwalający im „wejść” do komórki. Reszty argininy w tych motywach są ważne dla zamknięcia klastrów glutaminowych i uczynienia błony cytoplazmatycznej przepuszczalnej dla żelaza [19]. Oba motywy bramkowe posiadają również kilka reszt cysteinowych (C403, C432, C1775 w *E. coli*), które mogą być istotne podczas przenoszenia jonów Fe^{2+} przez błonę [3, 7].

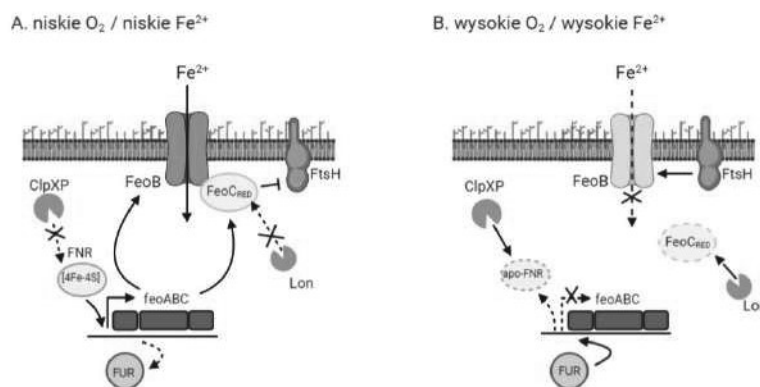
Następnym motywem jest domena rdzenia CFeoB. Jest ona „wciśnięta” pomiędzy dwa motywy bramkowe wewnątrz transbłonowej części FeoB. Motyw ten tworzy transbłonową helisę szóstą, a pozostałe reszty aminokwasowe prawdopodobnie zlokalizowane są w cytoplazmie pomiędzy helisą szóstą i siódmą, tworząc pętlę łączącą. Funkcja tej domeny nie jest jeszcze znana. Przypuszcza się jednak, że może ona odgrywać rolę wspierającą w transporcie jonów Fe^{2+} przez błonę [7]. Z kolei C-końcowy fragment FeoB zawiera region bogaty w reszty Cys i His, który może być bezpośrednio zaangażowany w przeniesienie Fe^{2+} lub kontrolę aktywności FeoB zależną od wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza [3].

1.5. BIAŁKO FEOC

FeoC jest małym, hydrofilowym białkiem zbudowanym z około 78 reszt aminokwasowych, którego pI wynosi 7.7. Występuje jedynie w cytoplazmie γ -proteobakterii. Prawdopodobnie posiada strukturę przestrzenną podobną do tej, którą obserwuje się wśród członków rodziny regulatorów transkrypcji LysR (LTTR, ang. *LysR-type transcriptional regulators*), zawierającą motyw helisa-zwrot-helisa (HTH) [3, 20]. Rodzina białek LTTR składa się z dwóch domen: pierwszej, która zawiera motyw trihelikalny helisa-zwrot-helisa, odpowiedzialny za wiązanie DNA; domeny drugiej stanowiącej strukturę nazywaną skrzydłem. Jest ona odpowiedzialna za wiązanie induktora, który zazwyczaj reguluje powinowactwo domeny HTH do DNA [20]. Ze względu na to, że motyw HTH zlokalizowany jest na N-końcu FeoC, można go klasyfikować jako represor transkrypcji [7, 20]. Wyjątkową cechą FeoC jest region tzw. skrzydła zawierający reszty cysteiny, które prawdopodobnie odpowiadają za wiązanie żelaza w klastrach żelazowo-siarkowych. Na poparcie tej tezy wykonano szereg badań, których wyniki wykazały, że cysteiny występujące w *K. pneumoniae* mogą tworzyć klaster Fe-S [21].

Badania przeprowadzone przez Hung *et al.* w 2012 roku na białkach systemu Feo pochodzących z *Klebsiella pneumoniae* pokazały, że KpFeoC tworzy zwarty kompleks 1:1 z KpNFeoB. Ponadto ukazano interakcje KpFeoC z resztami

w pobliżu przełącznika II (miejsca wiązania nukleotydu) i domeną S w KpNFeoB. Wyniki te wskazują, że KpFeoC odrywa rolę regulującą w modulowaniu transportu Fe^{2+} [22].



Rysunek 5. Model ilustrujący sposób kontroli poboru Fe^{2+} poprzez proteolizę FeoC w *Salmonelli*. Opracowanie własne na podstawie [23]

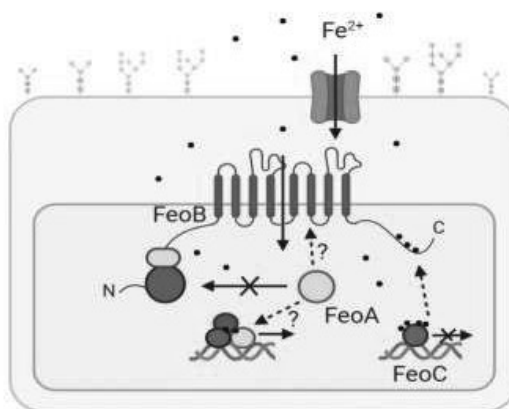
Figure 5. Model illustrating controls of Fe^{2+} uptake via FeoC proteolysis in *Salmonella*. Own figure based on [23]

W zależności od zawartości w środowisku tlenu i żelaza bakterie kontrolują pobieranie tego drugiego pierwiastka przez system Feo, w czym również bezpośrednio bierze udział FeoC (Rys. 5). I tak na przykład w *Salmonelli* hodowanej w warunkach niskiego poziomu tlenu i żelaza, regulator FNR zawierający klastery 4Fe-4S „ucieka” pośredniczącemu w proteolizie enzymowi ClpXP (ang. *ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like*) i wiąże się z promotorem operonu *feoABC*, powodując wzmożoną produkcję *feo* mRNA [8, 24]. Warto zwrócić uwagę, że FeoC może zawierać klastery żelazowo-siarkowe, dzięki czemu staje się ono mniej podatne na działanie proteazy Lon (ang. *ATP-dependent protease La*). Wiadomo także, że takie klastery w niektórych białkach regulatorowych służą jako czujniki redoks lub czujniki żelaza. Ekspozycja na tlen lub żelazo może zatem zmniejszyć poziom FeoC lub obniżyć jego aktywność (np. zdolność wiązania FeoB), co skutkuje hydrolizą FeoB przez proteazy. Z kolei, w przypadku niskiego stężenia żelaza, nowo powstałe FeoC_{red} (zawierające zredukowany klastery 4Fe-4S) wiąże się z FeoB chroniąc go przed proteolizą katalizowaną przez proteazę FtsH (ang. *ATP-dependent metalloproteinases, Filamentous temperature sensitive H*). Powoduje to akumulację FeoB, a tym samym zwiększony zostaje pobór Fe^{2+} [24]. Dzięki temu bakterie adaptują się do warunków środowiskowych i ograniczonego dostępu do jonów żelaza [23].

W przypadku wysokiego poziomu tlenu i żelaza, regulator FNR zostaje przekształcony w formę apo- według nieznanego mechanizmu. Wówczas nie może się on wiązać z promotorem operonu *feoABC* i zostaje zdegradowany przez proteazę ClpXP [25, 26]. W niniejszych warunkach klaster 4Fe-4S może zostać utleniony i powstaje wówczas forma FeoC_{ox}. Utlenione białko FeoC jest bardziej podatne na działanie proteazy Lon. Powoduje to „odsłonięcie” białka FeoB, które zostaje wyeliminowane przez proteazę FtsH. W konsekwencji zahamowany zostaje pobór jonów Fe²⁺ [26]. Procesy te schematycznie przedstawiono na Rysunku 5.

1.6. MECHANIZM WYCHWYTU JONÓW FE²⁺

Mechanizm wychwytu jonów żelaza Fe²⁺ nie został jeszcze dokładnie poznany. Uważa się, że jony te swobodnie dyfundują przez poryny do peryplazmy, gdzie zostają wychwycone przez FeoB i przeniesione poprzez motywy bramkowe. Białko G i domena GDI sygnalizują regionom błonowym o stanie komórki lub dostarczają tym regionom energię niezbędną do transportu aktywnego. Przypuszcza się, że FeoA bierze udział w transporcie poprzez interakcje z pętlami regionu transbłonowego FeoB, znajdującymi się po wewnętrznej stronie błony. Istnieje możliwość, że FeoA oddziałuje wzajemnie z innymi białkami by tworzyć transkrypcyjny kompleks regulatorowy. Natomiast FeoC, prawdopodobnie wiąże jon żelaza Fe²⁺ zachowując się jak regulator transkrypcji lub, w niektórych bakteriach, oddziałuje z C-końcem FeoB [7], co zostało schematycznie przedstawione na Rysunku 6.



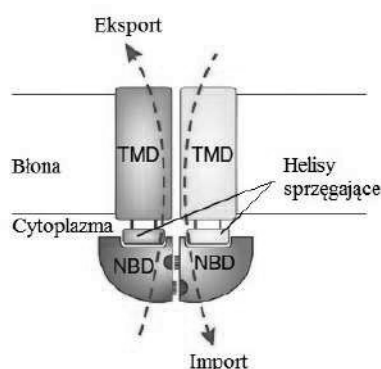
Rysunek 6. Prawdopodobny mechanizm wychwytu jonów Fe²⁺ w bakteriach gram-ujemnych. Opracowanie własne na podstawie [7]

Figure 6. Predicted ferrous ions uptake mechanism in Gram-negative bacteria. Own figure based on [7]

2. TRANSPORTERY ABC

2.1. OGÓLNY PODZIAŁ I MECHANIZM DZIAŁANIA TRANSPORTERÓW ABC

Transportery ABC należą do rodziny białek błonowych biorących udział w procesach transportu, wykorzystując energię z hydrolizy wysokoenergetycznych wiązań zawartych w ATP. Importery ABC uczestniczą w pobieraniu substancji odżywczych do komórki w wyniku specyficznych reakcji wymagających obecności peryplazmatycznych (lub zakotwiczonych w błonie) białek wiążących substrat [27]. Natomiast eksporterzy ABC obecne w bakteriach mają różnorodne funkcje. Przyczyniają się m.in. do oporności niektórych szczepów bakteryjnych na leki poprzez czynne usuwanie substancji toksycznych [28] lub transport budulców wymaganych do syntezy ściany komórkowej.



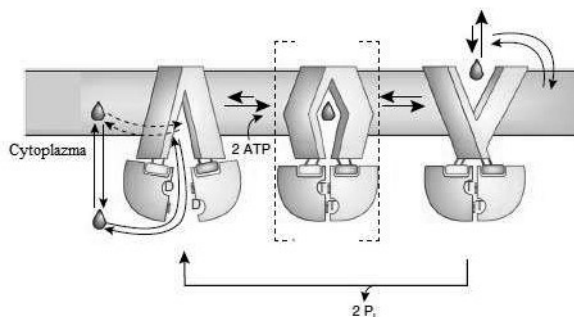
Rysunek 7. Układ domen transportera ABC [29]

Figure 7. Domain arrangement of ABC transporter [29]

Systemy te zbudowane są z pary domen cytoplazmatycznych nazywanych kasetami wiążącymi ATP (ang. *ATP-binding cassettes* – ABC) lub domenami wiążącymi nukleotydy (ang. *nucleotide-binding domains* – NBD) oraz z dwóch domen transbłonowych (ang. *transmembrane domain* – TMD). Podczas gdy importery ABC tworzone są przez oddzielne łańcuchy polipeptydowe TMD i NBD, eksporterzy u bakterii generują „półtransporter” poprzez fuzję TMD do NBD. Formuje on homo- lub heterodimer w celu wytworzenia funkcjonalnej jednostki [30]. Ogólną budowę transportera ABC przedstawiono na Rysunku 7.

Domeny wiążące nukleotydy napędzają transport substancji w poprzek błony. W ich strukturze można wyróżnić kilka motywów o konserwatywnej sekwencji zaangażowanych np. w wiązanie i hydrolizę ATP. Wyróżniamy w nich takie motywy jak: pętla P (albo motyw Walker-A), który wiąże α - i β -fosforan ATP; motyw LSGGQ (zwany także pętlą C), który styka się ze związanym nukleotydem, gdy domena związana jest z ATP, a także motyw Walker-B, zawierający

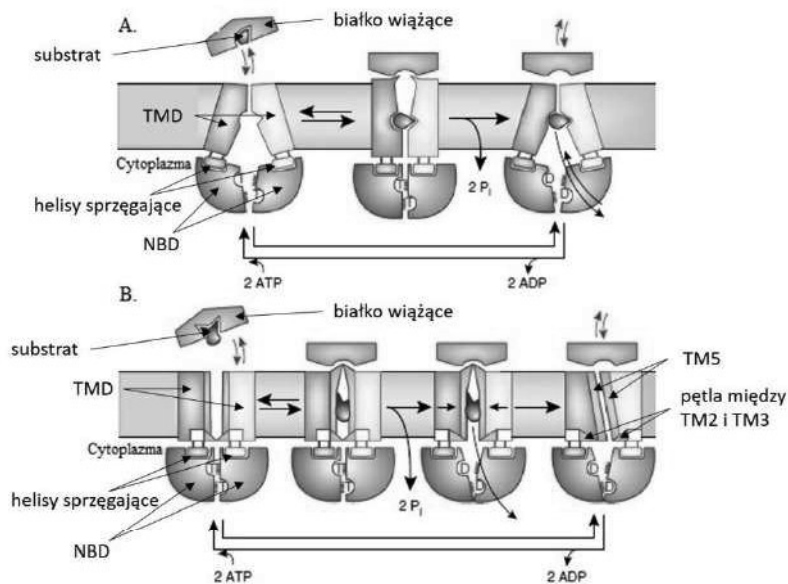
konserwatywną resztę glutaminianu zaangażowaną w atak nukleofilowy na cząsteczkę ATP [29, 31]. Motyw Walker-A jest motywem bogatym w reszty glicyny (GXXGXG-KS/T), podczas gdy motyw Walker-B posiada sekwencje hhhh-D (gdzie „h” oznacza dowolny hydrofobowy aminokwas) [31]. Obecne są także inne motywy odpowiedzialne za kontakt między domenami. Pomędzy pętlą P jednej z domen wiążących nukleotydy a motywem LSGGQ drugiej (i odwrotnie) tworzą się dwa miejsca wiążące ATP. W przeciwieństwie do NBD, domeny transbłonowe znacznie różnią się długością, sekwencją czy nawet liczbą helis transbłonowych. Zmiany konformacyjne w domenach wiążących nukleotydy, spowodowane związaniem i hydrolizą ATP, są przekazywane do domen transbłonowych poprzez wzajemne oddziaływania niekwalencyjne na powierzchni ich styku [30].



Rysunek 8. Schemat mechanizmu eksportera ABC [29]

Figure 8. Scheme of the ABC-exporter mechanism [29]

Główny mechanizm działania eksporterów ABC z rodziny B nie jest do końca poznany. Prawdopodobnie substrat wiąże się z wewnętrzną kieszenią domeny transbłonowej. Może być ona usytuowana nie tylko w taki sposób, by przyjmować substrat z cytoplazmy, ale także, jeśli jest on bardzo hydrofobowy, bezpośrednio z wnętrza dwuwarstwy lipidowej. Po związaniu substratu transporter najprawdopodobniej przechodzi sekwencyjne zmiany strukturalne, uzyskując w efekcie konformację zamkniętą. Nie wiadomo jednak, czy jest to niezbędny stan pośredni. Następnie transporter ponownie zmienia swoją strukturę trzeciorzędową. Jego fragment ulega translokacji w błonie, tym samym przechodząc do tzw. konformacji zewnątrzkomórkowej. Uzyskanie takiej struktury umożliwia uwolnienie substratu [29, 32]. Proces ten schematycznie przedstawia Rysunek 8.



Rysunek 9. Mechanizmy importerów ABC. (A) Schemat mechanizmu importera ABC typu I. (B) Schemat mechanizmu importera ABC typu II [29]

Figure 9. Mechanisms of ABC importers. (A) Scheme of a type I importer mechanism. (B) Scheme of a type II importer mechanism [29]

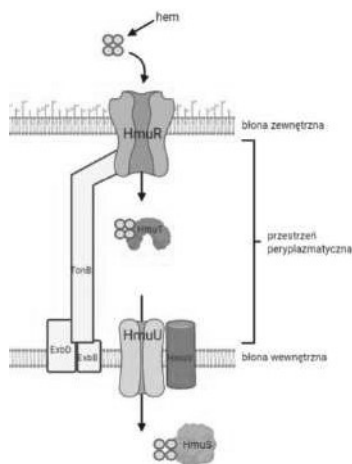
Wyróżniamy dwa typy importerów ABC (Rys. 9). W Typie I importera ABC zmiana konformacyjna podczas cyklu transportowego polega na zamknięciu domeny wiążącej nukleotydy. To z kolei powoduje zepchnięcie helisy sprzęgających do siebie, a tym samym następuje przekształcenie domeny transbłonowej w konformację zewnątrzkomórkową (Rys. 9A). Zmiany strukturalne powodują utworzenie tunelu pomiędzy przyłączonym białkiem wiążącym, a kieszenią wiążącą substrat o niskim do niego powinowactwie [29]. W odróżnieniu od importerów ABC typu I, importery ABC typu II są zaangażowane w wychwyt nie tylko większych, ale i bardziej hydrofobowych substratów takich jak np. hem (i innych kompleksów zawierających żelazo) oraz kobalaminy [33, 34]. Kluczową różnicą jest także fakt, że związanie i hydroliza ATP sama w sobie nie powoduje przekształcenia w domenę wewnątrzkomórkową. Gdy transportowany substrat jest nieobecny, dwie bramki cytoplazmatyczne pozostają zamknięte, oddzielając cytoplazmę od tunelu transportującego. Podczas dokowania kieszeń obecna w białku wiążącym substrat jest zniekształcona. Pętle TMD powodują wystąpienie zawady sterycznej, co prowadzi do odebrania substratu z kieszeni wiążącej i zamknięcie go między domenami transbłonowymi. Następnym, nieodwracalnym krokiem, jest hydroliza ATP i uwolnienie fosforanu. Jest to niezbędnym elementem powodującym otwarcie dimeru NBD. Tym samym dochodzi do rozłączenia helisy

sprzęgających i otwarcia bramy dla substratu [29]. Mechanizm ten został schematycznie przedstawiony na Rysunku 9B.

2.2. BIAŁKA TRANSPORTUJĄCE HMU

Bakterie gram-ujemne aktywnie transportują żelazo hemowe przez błonę cytoplazmatyczną. W tym celu wykorzystują energię pochodzącą z ATP. Systemy takie nazywane są transporterami ABC, do których należą między innymi białka z rodziny Hmu (ang. *Hemin uptake protein*). System HmuRSTUV zbudowany jest z kilku białek odpowiedzialnych za absorpcję i wykorzystanie hemoprotein jako źródła żelaza [35]. Jako pierwsza zbadana została struktura krystaliczna importera HmuUV pochodzącego z patogenu *Yersinia pestis*. Struktura kompleksu HmuUV niezwiązanego z nukleotydem składała się z dimeru TMD (HmuU) i dimeru NBD (HmuV). Na jej podstawie możemy wnioskować, że droga translokacji hemu przez HmuU jest otwarta w stronę peryplazmatyczną, natomiast zamknięta od strony cytoplazmatycznej. Sugeruje to, że HmuUV w tym stanie pozostaje w konformacji zewnątrzkomórkowej. W roku 2012 Woo *et al.* zaobserwował, że struktura ta jest niezwykle podobna do importerów ABC typu II [36]. Położenie białek HmuRSTUV w błonie komórkowej przedstawia Rysunek 10.

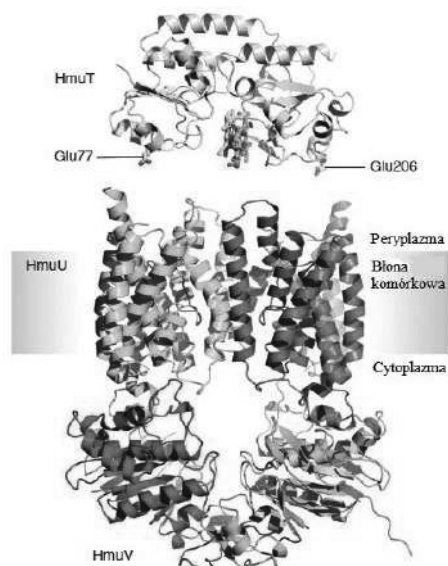
HmuR jest zależnym od TonB zewnętrznym receptorem błonowym. Kompleks trzech białek błony wewnętrznej TonB-ExbB-ExbD jest niezbędny, ponieważ odpowiada za przeniesienie energii na błonę zewnętrzną [1, 37], co z kolei umożliwia transport hemu przez HmuR.



Rysunek 10. Schematyczne umiejscowienie białek z rodziny Hmu w błonie komórkowej oraz droga transportu hemu. Opracowanie własne na podstawie [38]

Figure 10. Schematic view of the location of Hmu family proteins in the cytoplasmic membrane and haem translocation pathway. Own figure based on [38]

Si et al. w 2017 roku dowiódł, że na skutek stresu oksydacyjnego dochodzi do utworzenia wewnątrzkomórkowego wiązania disulfidowego pomiędzy dwoma resztami cysteinowymi, co umożliwia transport jonów cynku. Badania wykazały, że utworzenie tego wiązania kowalencyjnego jest czynnikiem niezbędnym do tego procesu, a mutacja tychże reszt Cys prowadzi do zaniechania pobierania cynku. Mutacja ta nie miała jednak wpływu na transport hemu [38]. Kompleks HmuTUV zawiera białka transportujące ABC znajdujące się w wewnętrznej błonie. Odpowiadają one za transport hemoprotein z przestrzeni peryplazmatycznej do cytoplazmy bakterii, gdzie są one degradowane przy udziale HmuS. Badania wykazały, że HmuS uwalnia żelazo poprzez degradację hemu do biliwerdyny w obecności tlenu cząsteczkowego, donoru elektronowego takiego jak NADPH czy reduktazy ferrodoksyna-NADP⁺ [39].



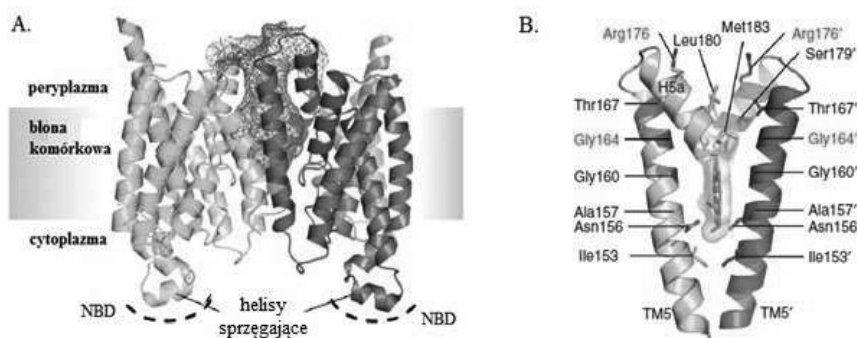
Rysunek 11. Struktura HmuUVT z *Y. pestis* w reprezentacji wstążkowej. HmuU zaznaczono kolorem jasno- i ciemnozielonym, HmuV kolorem czerwonym i pomarańczowym, a HmuT (PDB id: 3MD9) kolorem szarym. Widoczne są także dwie cząsteczki hemu (zaznaczone kolorem żółtym i niebieskim) związane przez HmuT oraz konserwatywne reszty glutaminowe obecne w tym białku [36].

Figure 11. Structure of *Y. pestis* HmuUVT in ribbon representation. HmuU subunits are shown in light and dark green, HmuV in red and orange, and HmuT (PDB id: 2MD9) is depicted in gray. HmuT contains two heme molecules (highlighting in yellow and blue) and two conserved glutamate residues [36].

HmuV jest hydrofilowym białkiem wiążącym ATP. Zawiera ono motywy Walkera, które są charakterystyczne i obecne we wszystkich białkach wiążących nukleotydy [40]. W HmuT obecne są kieszenie, które są zdolne do wiązania dwóch

cząsteczek hemu i mają do niego duże powinowactwo. Ponadto, w strukturze białka z *Y. pestis* wyróżniamy dwie konserwatywne reszty kwasu glutaminowego (Glu77 i Glu206), które są kluczowe dla prawidłowego wprowadzenia i ustawienia jednostki białka względem kompleksu HmuUV (Rys. 11) [36].

HmuU uznawane jest, podobnie jak opisywane wcześniej FeoB, za permeazę ze względu na jego silną homologię z innymi białkami o tej funkcji m.in. BtuC (ang. *Vitamin B₁₂ import system permease protein*) [36, 40]. Umieszczenie w błonie komórkowej świadczy o tym, że jest to białko bardzo hydrofobowe. W domenach transbłonowych możemy wyróżnić motywy charakterystyczne dla permeaz. Jednym z nich jest obecność konserwatywnego motywu sekwencji aminokwasowej z niezmienną resztą glicyny, niezbędną dla funkcji permeazy [40]. Znajduje się ona zazwyczaj około 100 reszt aminokwasowych od C-końca łańcucha białkowego i prawdopodobnie bierze udział w oddziaływaniu permeazy z ATPazą [1].



Rysunek 12. Modele strukturalne HmuU w konformacji zewnątrzkomórkowej. (A) Zewnętrzna wnęka między podjednostkami HmuU (szara siatka) ukazująca prawdopodobną ścieżkę translokacji hemu (struktura zaznaczona kolorem niebieskim). (B) Położenie helis TM5, TM5', H5a i H5a'. Zaznaczone zostały także łańcuchy boczne aminokwasów budujących białko HmuU, które skierowane są w stronę tunelu transportującego [36]

Figure 12. Structural models of HmuU in outward-facing conformation. (A) The outward-facing cavity between HmuU subunits (gray mesh) indicates the heme translocation pathways (structure shown in blue). (B) View of HmuU helices TM5, TM5', H5a o H5a'. HmuU side chains facing the heme translocation pathway are shown [36]

Jedna transbłonowa podjednostka HmuU zbudowana jest z 10 helis, co stanowi połowę segmentów obecnych w funkcjonalnym transporterze. W zespole HmuU₂V₂ możemy poprowadzić oś symetrii dzielącą kompleks na identyczne podjednostki. Podobnie jak we wszystkich transporterach ABC, także w przypadku kompleksu HmuUV, możemy zaobserwować motyw niekowalencyjnego związania podjednostek HmuV z domenami transbłonowymi poprzez helisy sprzegające [36].

Dokładna ścieżka transportu hemu niestety nie została dotychczas poznana. Ze względu na podobieństwo HmuU do BtuC założono, że w strukturze musi istnieć tunel, którym będzie biegł szlak transportu (Rys. 12A). Formuje się on między piątą helisą transbłonową (TM5) a helisą 5a (Rys. 12B), jednak domniemana ścieżka nie wykazuje podobieństwa do zbadanych kieszeni wiążących obecnych w enzymach hemozależnych. Obserwacje te są podobne do tych poczynionych na transporterze witaminy B₁₂ i sugerują, że brak zlokalizowanej w błonie kieszeni wiążącej substrat może być charakterystyczny dla importerów ABC typu II [36, 41]. Różnica między ścieżkami transportu w obu kompleksach może wynikać z obecności różnych reszt aminokwasowych w helisach transbłonowych wyścielających tunel, przez który mogą migrować związki. Kobalamina transportowana przez BtuCD jest większa aniżeli hem transportowany przez kompleks HmuUV, dlatego w porównaniu z transporterem witaminy B₁₂, średnica tunelu transportującego w przypadku białek z rodziny Hmu jest mniejsza [36].

UWAGI KOŃCOWE

W środowisku beztlenowym oraz niskim pH żelazo występuje na drugim stopniu utlenienia. Z tego względu dla gram-ujemnych bakterii, które zazwyczaj należą do anaerobów, kluczowe było wytworzenie systemów odpowiedzialnych za pobieranie tych jonów ze środowiska. Poznanie budowy białek odpowiedzialnych za transport jonów metali oraz odkrycie mechanizmów ich wychwytu będzie ważnym krokiem w kierunku odnalezienia skutecznych zamienników antybiotyków. Należy w tym miejscu podkreślić, że skuteczność tych leków przeciwdrobnoustrojowych znacznie spadła na przestrzeni ostatnich lat ze względu na nabycie przez bakterie oporności na te związki.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja finansowana ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu numer 2014/13/B/ST5/04359.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Siudeja, T. Olczak, *Post. Bioch.*, 2005, **2**, 198.
- [2] A.E. Sestok, R.O. Linkous, A.T. Smith, *Metalomics*, 2018, **7**, 887.
- [3] M.L. Cartron, S. Maddocks, P. Gillingham, C.J. Craven, S.C. Andrews, *Biomaterials*, 2006, **19**, 143.
- [4] B. Stevenson, E.E. Wyckoff, S.M. Payne, *J. Bacteriol.*, 2016, **198**, 1160.
- [5] T.C. Marlovits, W. Haase, C. Herrmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2002, **99**, 16243.
- [6] M. Shin, A.R. Mey, S.M. Payne, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2019, **116**, 4599.
- [7] C.K. Laum, K.D. Krewulak, H.J. Vogel, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2016, **40**, 273.

- [8] M. Kammler, C. Schon, K. Hantke, *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 6212.
- [9] J.W. Lee, J.D. Helmann, *Biometals*, 2007, **20**, 485.
- [10] M.F. Fillat, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, **546**, 41.
- [11] N.L. Barbieri, J.A. Vande Verde, A.R. Baker, F.Horn, G.Li, C.M. Logue I L.K.Nolan, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017, **7**, 1.
- [12] K.E. Stoll, W.E. Draper, J.I. Kliegman, *Biochemistry*, 2009, **48**, 10308.
- [13] H. Kim, H. Lee, D. Shin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, **423**, 4826.
- [14] D.D. Leipe, Y.I. Wolf, E.V. Koonin, *J. Mol. Biol.*, 2002, **317**, 41.
- [15] J. Velayudhan, N.J. Hughes, A.A. McColm, J. Bagshaw, C.L. Clayton, S.C. Andrews, D.J. Kelly, *Mol. Microbiol.*, 2000, **37**, 274.
- [16] M. Hattori, Y. Jin, H. Nishimasu, Y. Tanaka, M. Mochizuki, T. Uchiumi, R. Ishitani, K. Ito, O. Nureki, *Structure*, 2009, **17**, 1345.
- [17] S.R. Sprang, *Sci. Signal.*, 2000, **2000**, pe1.
- [18] E.T. Eng, A.R. Jalilian, K.A. Spasov, V.M. Unger, *J. Mol. Biol.*, 2008, **375**, 1086.
- [19] S. Severance, S. Chakraborty, D.J. Kosman, *Biochem. J.*, 2004, **380**, 487.
- [20] S.E. Maddocks, P.C. Oyston, *Microbiology*, 2008, **154**, 3609.
- [21] K.L. Hsueh, L.K. Yu, Y.H. Chang, *J. Bacteriol.*, 2010, **195**, 501.
- [22] K. W. Hung, J. Y. Tsai, T. H. Juan, Y. L. Hsu, C. D. Hsiao, T. H. Huang, *J. Bacteriol.*, 2012, **194**, 6518.
- [23] H. Kim, H. Lee, D. Shin, *J. Bacteriol.*, 2015, **197**, 92.
- [24] H. Kim, H. Lee, D. Shin, *J. Bacteriol.*, 2013, **195**, 3364.
- [25] P.J. Kiley, H. Beinert, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, **6**, 181 .
- [26] E.L. Mettert, P.J. Kiley, *J. Mol. Biol.*, 2005, **354**, 220.
- [27] A. Maqbool, R.S. Horler, A. Muller, A.J. Wilkinson, K.S. Wilson, G.H. Thomas, *Biochem. Soc. Trans.*, 2015, **43**, 1011.
- [28] K. Wong, J. Ma, A Rothnie, P.C. Biggin, I.D. Kerr, *Trends Biochem. Sci.*, 2014, **39**, 8.
- [29] K.L. Locher, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016, **23**, 487.
- [30] K. Hollenstein, R. J.P. Dawson, K.P. Locher, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, **17**, 412.
- [31] X. Liu, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, **1141**, 13.
- [32] K. Beis, S. Rebuffat, *Res. Microbiol.*, 2019, **170**, 399.
- [33] V. Braun, K. Hantke, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2011, **15**, 328.
- [34] W. Köster, *Res. Microbiol.*, 2001, **152**, 291.
- [35] L. Schwiesow, E. Mettert, Y. Wei, H.K. Miller, N.G. Herrera, D. Balderas, P.J. Kiley, V. Auerbuch, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, **8**, 1.
- [36] J-S. Woo, A. Zeltina, B.A. Goetz, K.P. Locher, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012, **19**, 1310.
- [37] N. Noinaj, M. Guillier, T.J. Barnard I S.K. Buchanan, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010, **64**, 43.
- [38] M. Si, Y. Wang, B. Zhang, C. Zhao, Y. Kang, H. Bai, D. Wei, L. Zhu, L. Zhang, T.G. Dong, X. Shen, *Cell Reports*, 2017, **20**, 949.
- [39] M. Onzuka, Y. Sekine, T. Uchida, K. Ishimori, S.I. Ozaki, *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 2017, **1861**, 1870.
- [40] I. Stojiljkovic, K. Hantke, *Mol. Microbiol.*, 1994, **13**, 719.
- [41] O. Lewinson, A.T. Lee, K.P. Locher, D.C. Rees, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, **17**, 332.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 listopada 2020 r.