

Е.И.Еременко

## СИДЕРОФОРЫ *BACILLUS ANTHRACIS*

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Железо необходимо для роста и размножения бактерий. Один из способов приобретения железа *Bacillus anthracis* состоит в использовании высокоаффинных хелатирующих агентов ионов железа – сидерофоров бациллибактина и петробактина, извлекающих железо из трансферрина и ферритина клеток хозяина. Функции бациллибактина и петробактина реализуются на разных стадиях роста *B. anthracis in vivo*, при этом синтез петробактина необходим также и для проявления вирулентности микроба. Знание путей биосинтеза сидерофоров способствует разработке блокирующих эти пути новых терапевтических средств против сибирской язвы. В обзоре приведены сведения о структуре, генетике, функциях сидерофоров сибирезвездного микроба.

**Ключевые слова:** сидерофоры, потребление железа, вирулентность *B. anthracis*.

Корреспондирующий автор: Еременко Евгений Иванович, e-mail: snipchi@mail.stv.ru

Е.И.Еременко

### *Bacillus anthracis* Siderophores

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Iron is an essential for growth and reproduction of bacteria element. One of the ways of its acquisition by *Bacillus anthracis* is utilization of high-affinity chelating agents of iron ions – bacillibactin and petrobactin siderophores, extracting the iron from transferring and ferritin of a host cell. Bacillibactin and petrobactin functions are realized on different stages of *B. anthracis* growth *in vivo*, whereas petrobactin synthesis is also necessary for manifestation of microbe virulence. Awareness of siderophore biosynthesis pathways facilitates the development of medicines against anthrax, which can block them up. The review contains the data on the structure, genetics, and functions of *B. anthracis* siderophores.

**Key words:** siderophores, iron acquisition, *B. anthracis* virulence.

**Conflict of interest:** The author declares no conflict of interest.

Corresponding author: Evgeny I. Eremenko, e-mail: snipchi@mail.stv.ru

Citation: Eremenko E.I. *Bacillus anthracis* Siderophores. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:68–74. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-68-74

*Bacillus anthracis* – возбудитель особо опасной зоонозной инфекции и признанный агент биологического оружия и терроризма. Лечение и экстренная профилактика тяжелых форм сибирской язвы, в частности, ингаляционной формы, требует длительного назначения антибиотиков в сочетании с серотерапией, что часто сопровождается побочными эффектами. В связи с этим разработка новых антибактериальных средств, нацеленных на блокирование факторов вирулентности сибирезвездного микроба, является актуальной задачей и перспективным направлением исследований. С проявлением вирулентности у патогенных микроорганизмов ассоциируется функция приобретения железа, поскольку это необходимый для роста и размножения бактерий микроэлемент, который бактерии должны получать из окружающей среды [20]. Получение железа патогенными бактериями представляет сложную задачу, так как растворимое  $Fe^{3+}$  в водной содержащей кислород среде обычно существует в аттомолярных ( $10^{-18}$ ) концентрациях [21]. Гомеостаз железа у млекопитающих хозяев также строго регулируется; практически в сыворотке не существует железа, которое не было бы связано с гемом, железосодержащими белками

(ферритин, трансферрин и т.п.) или в виде кофакторов разных ферментов.

Известно, что строгий контроль доступности железа у млекопитающих служит барьером против инфекций [3]. Эффективность, с которой получение железа достигается патогенными бактериями, соответствует, как правило, их вирулентности [20].

Один из способов получения железа бактериями состоит в использовании высокоаффинных хелатирующих агентов ионов железа, называемых сидерофорами [5, 32, 43].

**Сидерофоры *B. anthracis*.** Основной из сидерофоров, выделенных из штамма *B. anthracis* Sterne, выращенного в среде без железа, охарактеризован как петробактин (ПБ), катехолатное соединение, содержащее необычные субъединицы 3,4-дигидробензоата (ДГБ), прежде идентифицированного только в экстрактах *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Структурный анализ второго сидерофора показал, что он соответствует бациллибактину (ББ) – сидерофору, присущему многим видам бацилл [26]. Оба рассматриваются как катехоловые сидерофоры, в том смысле, что металл связывается в голо-сидерофоре

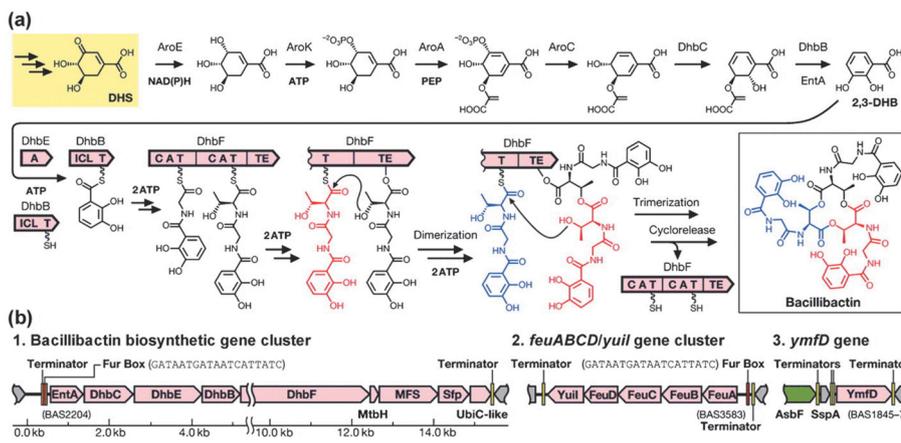


Рис. 1 Метаболический путь биосинтеза бациллибактина (в рамке) и организация кластеров генов, участвующих в биосинтезе, экспорте и поглощении бациллибактина:

(а) лиганд ДНВ образуется из DHS, который, в свою очередь, образуется из эндогенного пентозофосфатного пути (выделено желтым). (б) (1) ферменты, участвующие в сборке бациллибактина, кодируются генами кластера *entA-dhbBCF*; (2) гены, вовлеченные в поглощение бациллибактина, объединены в кластер *feuABCD/yuII*; (3) экспорт бациллибактина осуществляется транспортером MFS-типа, кодируемым геном *ymfD*. Гены и генетические кластеры аннотированы представленными номерами ORF, терминаторными сайтами (узкие желтые прямоугольники) и последовательностями предсказанных Fur-регуляторных сайтов (узкие красные прямоугольники). PEP – фосфонолпирует. Аббревиатуры ферментативных доменов (изображенные пятиугольниками): A – аденилирование; C – конденсация; ICL – изохоризматлаза; T – тиолирование; TE – тиоэстераза (из работы K.Hotta *et al.*, 2010) [24]

либо частично (ПБ), либо полностью (ББ) с единицами ДГБ (рис. 1, 2). Хотя обе молекулы химически способны связывать и переводить железо в растворимую форму, генетические, биохимические исследования и определение вирулентности показывают, что они выполняют явно разные биологические функции у бактерий [24].

Системная сибиреязвенная инфекция развивается в несколько стадий, начиная со стадии внутриклеточного развития *B. anthracis* в фагоцитах, за которой следует внеклеточная стадия, включающая массивную бактериемию, сепсис и гибель. Ранее идентифицированы два типа предполагаемых оперонов синтеза сидерофоров, получивших название *B. anthracis cat Echol*, *bac* (антрабактин или ББ) и оперон биосинтеза сибиреязвенного сидерофора *anthrax siderophor biosynthesis*, *asb* (антрахелин или ПБ). Изучение мутантов штамма 34F2 Sterne с мутациями *DasbA* и *ΔbacCEBF* показало, что у них снижалась продукция сидерофоров при росте в условиях дефицита железа, но ослабление роста отмечалось только у *DasbA*. Кроме того, у *DasbA* значительно ослаблен рост в макрофагах и существенно снижена вирулентность для мышей. В отличие от него штамм *ΔbacCEBF* фенотипически не

отличался от родительского штамма. Эти данные свидетельствуют в пользу необходимости антрахелина, но не антрабактина для ассимиляции железа во время внутриклеточной стадии сибирской язвы [10, 24].

**Бациллибактин: структура, биохимия, генетика и железосвязывающие свойства.** ББ – циклический тример, компонентами которого служат треонин, глицин и ДГБ. Для эффективного хелатирования железа ББ, как и большинство охарактеризованных катехолатных сидерофоров, имеет 2,3-ДГБ. Биосинтез бациллибактина идет с участием нерибосомальных пептид-синтетаз (NRPS), типичным для большинства макролактоновых сидерофоров путем [31].

Кластер генов биосинтеза ББ организован в отдельный оперон, охваченный Fur-регуляцией (рис. 1). Кластер содержит *mtbH*-подобный ген, функция которого остается неопределенной, но она часто ассоциируется с выполняемым с помощью NRPS биосинтезом арил-содержащих естественных продуктов [15]. Он также включает ген *sfp*, кодирующий

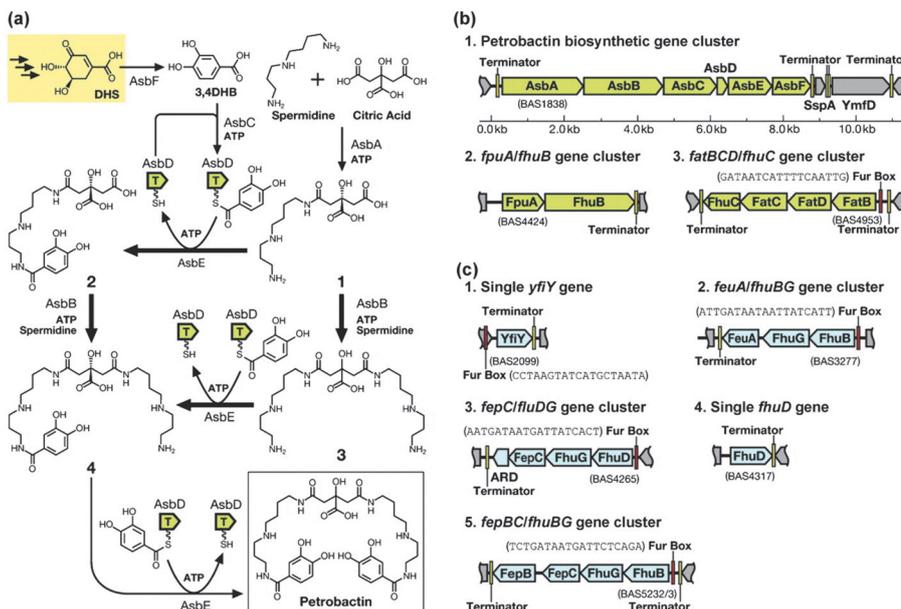


Рис. 2. Метаболический путь биосинтеза петробактина (в рамке) и организация генетических кластеров, вовлеченных в биосинтез и поглощение петробактина:

(а) лиганд ДНВ образуется из DHS, который, в свою очередь, образуется из эндогенного пентозофосфатного пути (выделено желтым). (б) (1) Ферменты, вовлеченные в сборку петробактина, кодируются кластером *asbABCDEF*; (2, 3) гены, вовлеченные в поглощение петробактина и 3,4-DHB, происходят из кластеров *fpuA/fhuB* и *fatBCD/fhuC*. (с) гены-гомологи транспортеров поглощения железосодержащих соединений с неизвестной субстратной специфичностью (из работы K.Hotta *et al.*, 2010) [24]

4'-фосфопантетеин-трансферазу, необходимую для правильного посттрансляционного переноса фосфопантетеина на ферментативные домены транспортера эффлюкса из суперсемейства транспортеров MFS-типа, и гомолога *ubiC*, который кодирует хоризматпируват-лиазу, хотя роль этого гена в биосинтезе ББ остается неясной [24].

ББ, как и родственные трис-катехолатные сидерофоры, связывает железо с аффинностью ( $K_f=10^{47,6}$ ) [12], что явно выше, чем у переносящих железо белков млекопитающих трансферрина и ферритина [13, 14].

ББ синтезируют все исследованные штаммы *B. anthracis* [27]. Хотя синтез этой молекулы весьма консервативен среди штаммов бацилл, она не является необходимой для жизнеспособности всех штаммов [10].

Поглощению сидерофоров у грамположительных бактерий способствуют как ассоциированные с мембраной субстрат-связывающие белки, так и трансмембранные белки ABC-транспортеры. В поглощение ББ членами группы *Bacillus cereus*, вероятно, вовлечены FeuA, B и C [37], как и трилактон-гидролаза YuiI (BesA) [33, 34]. Кодирующие их четыре гена и *feuD*, кодирующий АТФ-азный компонент составного транспортера железа ABC-типа, организованы в оперон с Fur-боксом у его 5'-конца. Система FeuABC вовлечена в поглощение ББ со связанным трехвалентным железом у *Bacillus subtilis*, а FeuA проявляет наномолярную связывающую аффинность для Fe<sup>3</sup>-сидерофора. С другой стороны, YuiI также гидролизует ББ и ББ со связанным трехвалентным железом, хотя катализирует гидролиз последнего в 25 раз эффективнее. Поэтому предположили, что YuiI отвечает за освобождение железа из его хелата с ББ в цитозоль. Все эти белки консервативны для штаммов в пределах группы *Bacillus cereus* и предположительно играют подобную роль у разных штаммов. Экспорт ББ этими штаммами происходит с использованием того же ферментного аппарата, что использует *B. subtilis*, а именно, транспортера MFS-типа YmfD и транскрипционного регулятора Mta [34].

**Петробактин: структура, биохимия и свойства связывания железа.** Хотя ПБ содержит катехолатные (в дополнение к  $\alpha$ -гидроксикарбоксилату) железokoординирующие единицы, он отличается от бациллина (как и от других катехолатных сидерофоров) характером гидроксилирования единиц ДГБ (рис. 2). ПБ относят также к сидерофорам смешанного типа – цитрат-катехолатным [32].

ПБ использует 3,4-ДГБ лиганды, тогда как подавляющее большинство катехолатных сидерофоров, идентифицированных к настоящему времени, использует 2,3-ДГБ-структурные изомеры. Сейчас ПБ и его сульфонируемые производные являются единственными известными сидерофорами, которые используют этот необычный лиганд (хотя свободный 3,4-ДГБ продуцируют некоторые штаммы *B. anthracis* и *Magnetospirillum magneticum*) [6, 18, 19, 22, 23]. Оказалось, что единицы 3,4-ДГБ не просто хими-

ческая аномалия в мире сидерофоров, они играют важную роль в развитии микроорганизма. ПБ – линейная молекула, состоящая из цитрата, спермидина и 3,4-ДГБ, ферменты его биосинтеза отличаются от ответственных за циклические сидерофоры и поэтому называются NRPS-независимыми сидерофорсинтазами (NIS-синтазами). Продукция сидерофоров NIS-синтазами у других бактерий достаточно распространена. Как в случае с ПБ, продуцируемые NIS-синтазой сидерофоры играют значительную роль в вирулентности их продуцентов.

В сборке трех молекулярных строительных блоков в молекулу ПБ участвуют шесть ферментов, кодируемых кластером генов *asbABCDEF* [10, 30]. Биосинтез ПБ необычен в том отношении, что в нем участвуют ферменты двух различных классов, NRPS и NIS-синтазы, функционирующие во взаимодействии для выработки конечного продукта.

NIS-синтаза типа A, AsbA, специфически катализирует стереоспецифическое присоединение спермидина к одному из прохиральных карбоксилатов цитрата с образованием (3S)-N<sup>8</sup>-цитрилспермидина [38]. С этой стадии путь биосинтеза ПБ разветвляется, и после нее действует либо белок NRPS-типа AsbE, переносящий 3,4-ДГБ с AsbD на (3S)-N<sup>8</sup>-цитрилспермидин с образованием N<sup>7</sup>-(3,4-дигидробензоил)-N<sup>8</sup>-цитрилспермидина, либо NIS-синтаза типа C AsbB, предоставляющая бис-амид. Интермедиаты N<sup>7</sup>-(3,4-дигидробензоил)-N<sup>8</sup>-цитрилспермидин и бис-амид собираются под действием соответственно AsbB и AsbE в следующий интермедиат, к которому под действием AsbE присоединяется вторая молекула 3,4-ДГБ, завершая синтез ПБ.

Кластер генов *asbABCDEF* *B. anthracis* ответственен за биосинтез ПБ, который выполняет функции, связанные как с приобретением железа, так и с вирулентностью для мышей. Получены мутации в каждом из генов *asbABCDEF*-локуса. Индивидуальные мутации привели к полному прекращению биосинтеза ПБ при выращивании штаммов в истощенной по железу среде. Однако анализ *in vitro* показал, что каждый *asb*-мутант давал весьма ограниченный вегетативный рост в железodefицитной среде. Напротив, ни один из *asb*-мутантов не был способен прорасти из спор в тех же условиях. Обеспечение экзогенным ПБ способно исправить дефект роста у каждого *asb*-мутанта. AsbA осуществляет предпоследнюю стадию в биосинтезе ПБ, включая конденсацию 3,4-дигидробензоил спермидина с цитратом с образованием 3,4-дигидробензоил спермидинил цитрата. На конечной стадии AsbA катализирует конденсацию второй молекулы 3,4-дигидробензоил спермидина с 3,4-дигидробензоил спермидинил цитратом, образуя зрелый сидерофор [30]. AsbC, 3,4-ДГБ-АМФ-лигаза, является ключевым компонентом биосинтеза дигидробензоат-спермидина (ДГБ-СП), первого выделяемого интермедиата в биосинтезе ПБ. AsbC катализирует аденилирование соответствующего АМФ-эфира необычного предшественника 3,4-ДГБ,

в дополнение к бензоатным субстратам, несущим доноры водородных связей в пара- и мета-позициях фенильного кольца. Второй реакцией AsbC катализирует перенос активированной начальной единицы на AsbD, белок арил-транспортер, подобный ацил- и пептидил-транспортерам, которые функционируют в биосинтезе жирных кислот, поликетидов и нерибосомальном биосинтезе пептидов. Третий белок, AsbE, ответственен за конденсацию 3,4-дигдробензоил-AsbD со спермидином, поставляя ДГБ-СП, который связывается с цитратом для сборки ПБ. На основе селективного субстратного профиля AsbC синтезирован негидролизруемый аналог 3,4-дигдробензоил-АМФ. Показано, что он эффективно ингибирует функцию AsbC *in vitro* [41].

В то время как функции ферментов AsbABCDE биосинтеза ПБ точно установлены в работах *in vivo* и *in vitro*, роль AsbF остается непонятной. Начальные представления о существовании основного метаболического пути 3,4-ДГБ получены в исследованиях с меченной углеродом  $^{13}\text{C}$  глюкозой в питательной среде. Основываясь на изучении обогащения изотопом катехоловой единицы выделенного ПБ, были идентифицированы ранние стадии пути биосинтеза шикимата как первичного источника для продукции 3,4-ДГБ [28]. Вскоре после этого охарактеризовали AsbF как дегидрошикимат-дегидратазу, осуществляющую прямое превращение 3-дигидрошикимовой кислоты в 3,4-ДГБ [17, 40]. Действие NRPS-подобных ферментов AsbCD, в конечном счете, ответственно за активацию 3,4-ДГБ для переноса на структуру цитрил-спермидина и завершение сборки ПБ.

Хотя ББ проявляет значительно большую аффинность к ионам  $\text{Fe}^{+3}$ , чем ПБ ( $K_f^{\text{bac}} = 10^{47,6}$  против  $K_f^{\text{pet}} = 10^{23}$ ), оба имеют большую аффинность к  $\text{Fe}^{+3}$ , чем трансферрин ( $K_f = 10^{21}$ ). Следовательно, трансферрин является первичным источником железа для патогенных видов *Bacillus* в процессе инфекции. Более того, ПБ извлекает железо из трансферрина с большей скоростью и большей эффективностью, чем энтеробактин или аэробактин [2]. Несомненно, способность ПБ быстро экстрагировать из этого белка и растворять железо, переводя его в доступную для микробов форму, играет значительную роль в инфекциозности микроба.

Комплекс Fe-ПБ декарбоксилируется при длительном воздействии света [4], и фотопродукт сам по себе имеет большую аффинность к  $\text{Fe}^{3+}$  ( $K_f = 10^{24,4}$ ), чем ПБ [2]. Хотя предполагалось, что это играет роль в жизненном цикле продуцирующих ПБ морских бактерий, вероятно, этот факт не имеет значения для обитающих в почве штаммов *Bacillus*. Тем не менее, ПБ и его фотопродукт могут использоваться как ксеносидерофоры другими членами этого вида [2].

Продукция ПБ группой *Bacillus cereus* не является исключительной особенностью патогенных штаммов [27]. Однако все штаммы, способные вызывать потенциально летальную инфекцию у людей, продуцируют ПБ в качестве их основного сидерофо-

ра. Поэтому продукция ПБ, не являясь биомаркером вирулентности в этой группе, представляет собой свойство, которое необходимо для развития инфекции у млекопитающих [9].

Полагают, что поглощению ПБ способствуют мембранно-ассоциированные субстрат-связывающие белки и транспортеры. Субстрат-связывающие белки FruA и FatB проявляют прочную связывающую аффинность к ПБ (или его фотопродукту) и Fe-ПБ (или его фотопродукту), причем последний также обнаруживает способность связывать 3,4-ДГБ и его аналог со связанным ионом железа [44].

Вышеупомянутые сидерофоры также прочно связываются YclQ, гомологом FatB у *B. subtilis*, ортологи этого белка найдены у представителей группы *B. cereus* [45]. Таким образом, обзор геномов представительной выборки штаммов группы *B. cereus* выявил присутствие ряда транспортеров соединений железа, субстратная специфичность и функция которых остается неясной. Несмотря на наличие множественных транспортеров, способных связывать ПБ, в опытах *in vivo* показано, что у *B. anthracis* Sterne FruA играет более важную роль в потреблении ПБ, чем FatB [8]. Штамм с генетической делецией FruA растет медленнее и накапливает ПБ в среде в большей степени, чем штамм дикого типа или дефицитный по FatB. Наиболее важно то, что споры FruA мутанта обладают сниженной вирулентностью на модели мышей, хотя синтез ПБ у этого штамма не аттенуирован. LD<sub>50</sub> спор FruA мутанта более чем на три порядка выше, чем штамма дикого типа, и в 10 раз выше, чем у штамма, дефектного по продукции ПБ. Исчерпывающий сравнительный анализ геномов группы *B. cereus* выявил, что, за немногими исключениями, большинство непатогенных штаммов не имеют *fpuA* или *fatB*. В то время как FruA играет важную роль в вирулентности штамма, роль FatB менее понятна. Однако рост штамма с делецией *fpuA/fatB* в желездефицитной среде замедлен по сравнению со штаммом с делетированным *fpuA* [8]; FatB, возможно, играет вспомогательную роль в приобретении железа. Вероятно, основная роль FatB заключается в транспорте самого связанного с 3,4-ДГБ железа, это согласуется с тем, что  $K_d$  для субстрата  $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-ДГБ}_2)^3]^-$  примерно в 100 раз ниже, чем для  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})^3]^-$  [44]. Кроме того, в отличие от кластера генов *fat*, кластеры генов *asb* и *fpuA* не содержат регуляторного элемента Fur, что предполагает более близкую функциональную связь между биосинтезом ПБ и опосредуемым FruA его потреблением. Эти исследования служат иллюстрацией важности потребления бактериальных сидерофоров в процессе инфекции. Они показывают, что аппарат транспорта сидерофоров представляет собой еще одну точку воздействия для потенциальных терапевтических средств [16].

Накопление ББ у *B. anthracis* Sterne 34F2 и у мутанта, не имеющего основной супероксиддисмутазы D (SodA1), почти полностью репрессировалось при добавлении 20 мМ железа. Напротив, синтез ПБ у обоих штаммов продолжался вплоть до 20 мМ же-

леза. Аккумуляция ПБ и ББ слегка увеличивалась при добавлении низких концентраций параквата, индуцирующего окислительный стресс у *B. anthracis* Sterne дикого типа. Выращивание культур при интенсивной аэрации приводило к относительно большому накоплению ПБ, чем при слабой аэрации, и задерживало репрессивное действие добавления железа. Напротив, рост культур в среде с низким содержанием железа и при слабой аэрации сопровождался увеличением уровня ББ. Не выявлено различий в общей супероксиддисмутазной активности или уровнях транскрипции генов *sodA1* и *sodA2* между культивированием в обедненной и обогащенной железом среде при интенсивной и слабой аэрации, что могло указывать на разделение регуляции супероксиддисмутазы и метаболизма железа у *B. anthracis*. Наиболее высокий уровень транскрипции гена *asbB*, части оперона биосинтеза ПБ, отмечался в условиях лимитирования железа и интенсивной аэрации, но транскрипция также заметна даже при избытке железа и слабой аэрации. Ген *dhbC*, член оперона биосинтеза ББ, транскрибировался только при истощении железа независимо от уровня аэрации. Эти данные позволяют прийти к заключению, что регуляция ББ высокочувствительна к концентрации железа. Хотя регуляция ПБ менее зависима от железа, он подвергается дополнительным уровням регуляции, что может способствовать вирулентности *B. anthracis* [29].

**Микробиологическая роль бациллибактина и петробактина.** Хотя ПБ и ББ секвестрируют железо и переводят его в растворимую форму, появляется все больше данных о том, что эти два сидерофора имеют различные биологические функции у производящих их бактерий. Продукция ПБ играет ключевую роль в развитии сибиреязвенной инфекции у млекопитающих, тогда как продукция ББ представляется значительно менее важной. Генетические делеции в кластере генов биосинтеза ББ штамма Sterne *B. anthracis* не влияют на рост в обедненной железом среде и вирулентность для мышей [10]. Частично это находит объяснение в наблюдениях об отличающемся по времени накоплении сидерофоров *B. anthracis* в среде культивирования [42]. ПБ накапливается в среде спустя 5 ч после прорастания спор, что составляет менее половины времени, требующегося для накопления ББ в аналогичных условиях. Эти исследования показывают, что ПБ используется бактерией на ранних стадиях роста – прорастании спор. Дефектный по синтезу ПБ штамм *B. anthracis* прорастает только в среде с добавкой экзогенного ПБ или других источников железа, что согласуется с вышеописанной гипотезой. Кроме того, продукция ББ бактерией, растущей при 37 °С в обогащенной CO<sub>2</sub> атмосфере, значительно снижена по сравнению с продукцией при росте в условиях окружающей среды. Вегетативный рост штамма Sterne *B. anthracis* при 37 °С без обогащения атмосферы CO<sub>2</sub> сопровождается двукратным снижением продукции ББ по сравнению с ростом при 23 °С (10 против 20 мМ

соответственно). ББ не накапливается в определяемых количествах в культурах, выращенных в среде с 0,4–0,8 % бикарбоната, что согласуется с другими анализами с добавлением CO<sub>2</sub> [42].

Повышенные температура и содержание CO<sub>2</sub> имитируют условия кровеносной системы млекопитающих, которые влияют на экспрессию ряда факторов вирулентности бактерий [7, 25, 36]. Супрессия продукции ББ может отражать попытки микроорганизма сохранить метаболические ресурсы, не растрачивая их на синтез молекулы, которая изолируется защитной системой хозяина и не обеспечивает биологических преимуществ в этих условиях. Как разобщение по времени продукции двух сидерофоров, так и супрессия продукции ББ факторами организма хозяина представляют собой интригующее свидетельство того, что эти сидерофоры играют разные роли в жизненном цикле *B. anthracis* и других близких бацилл. Тогда как ПБ, несомненно, сидерофор, который используется микробом в процессе прорастания спор и во время манифестации инфекции, предполагается, что ББ используется на поздних стадиях инфекции, когда изменяются концентрация CO<sub>2</sub> и температура, или при переходе вегетативных клеток в споры [42].

ПБ необходим для полной вирулентности *B. anthracis*. Оперон *asbABCDEF* кодирует аппарат биосинтеза этого вторичного метаболита. Функция пяти продуктов генов оперона *asb* необходима и достаточна для превращения эндогенных предшественников в ПБ. На этом биосинтетическом пути сидерофор-синтетаза *AsbB* катализирует образование амидных связей, критичных для сборки ПБ, используя интермедиаты биосинтеза, а не первичные метаболиты в качестве доноров карбоксилата. При исследовании кристаллической структуры белка *AsbB*, участвующего в биосинтезе сидерофора *B. anthracis*, открыта трехмерная модель NIS. Последующее исследование ферментативной активности NRPS-подобных полипептидов показало, что альтернативные продукты *AsbB* в дальнейшем превращаются в ПБ, подтверждая существование предполагаемых ранее конвергентных путей образования этого сидерофора [35].

**Роль сидерокалина.** Благодаря основополагающей работе S.Cendrowski *et al.* [10], стало известно, что штаммы *B. anthracis*, неспособные продуцировать ПБ, не патогенны. В то время как росту микроба способствует свойство ПБ экстрагировать железо из белков хозяина, дополнительное содействие росту оказывает уникальная возможность сидерофора «ускользнуть» от эндогенного сидерофор-секвестрирующего белка сидерокалина, компонента иммунной системы млекопитающих [11]. Сидерокалин имеет высокую аффинность к трис-катехолатным сидерофорам, включая ББ, но совершенно незначительную к ПБ [1]. Есть основания полагать, что 3,4-ДГБ группа ПБ сама имеет значение в преграждении доступа сидерофора к связывающей зоне сидерокалина [1, 2]. Неспособность сидерокалина связывать ПБ позволяет сидерофору сохраняться в кровяном русле и обеспечивать более благоприят-

ные условия для роста. Из-за его способности избегать действия сидерокалина, ПБ назвали «невидимым сидерофором». Он является необходимым фактором, способствующим проявлению вирулентности в организме хозяина, так как прекращение его продукции патогенными штаммами делает их авирулентными.

У патогенных бактерий сами сидерофоры часто являются ключевыми медиаторами вирулентности. ББ и ПБ в совокупности представляют интересный пример того, как приобретение ионов железа не только опосредует вирулентность у семейства патогенных бактерий, но и оказывает влияние на развитие микроорганизмов на протяжении их жизненного цикла.

С приобретением железа у *B. anthracis*, кроме ББ и ПБ, связаны два иммуногенных белка, Dlp-1 и Dlp-2, гены которых гомологичны генам ДНК-связывающих белков. Изучение Dlpс *Escherichia coli* показало, что их кристаллическая структура имеет сфероподобную форму с внутренней полостью. Они действуют как ферритины (депонирующие железо глобулярные белковые комплексы) и участвуют в усвоении железа и регуляции этого процесса [39].

Таким образом, ферменты, участвующие в биосинтезе сидерофоров, являются новой привлекательной мишенью для разрабатываемых антибиотиков. Прицельные ингибиторы биосинтеза ПБ, сидерофора, ассоциируемого с вирулентностью и кодируемого локусом *asb B. anthracis*, могут стать потенциальным средством лечения сибирской язвы.

**Конфликт интересов:** Автор подтверждает отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

References / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abergel R.J., Wilson M.K., Arceneaux J.E., Hoette T.M., Strong R.K., Byers B.R., Raymond K.N. Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103:18499–503.
2. Abergel R.J., Zawadzka A.M., Raymond K.N. Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore. *J. Am. Chem. Soc.* 2008; 130:2124–5.
3. Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27:215–37.
4. Barbeau K., Zhang G., Live D.H., Butler A. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124:378–9.
5. Boukhalfa H., Crumbliss A.L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals.* 2002; 15:325–39.
6. Calugay R.J., Takeyama H., Mukoyama D., Fukuda Y., Suzuki T., Kanoh K., Matsunaga T. Catechol siderophore excretion by bacterium *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; 101:445–7.
7. Caparon M.G., Geist R.T., Perez-Casal J., Scott J.R. Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide. *J. Bacteriol.* 1992; 174:5693–701.
8. Carlson P.E.Jr., Dixon S.D., Janes B.K., Carr K.A., Nusca T.D., Anderson E.C., Keene S.E., Sherman D.H., Hanna P.C. Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 2010; 75:900–9.
9. Casadevall A. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe.* 2006; 1:359–64.
10. Cendrowski S., MacArthur W., Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* 2004; 51:407–17.
11. Clifton M.C., Corrent C., Strong R.K. Siderocalins: siderophore-binding proteins of the innate immune system. *Biometals.* 2009; 22:557–64.

12. Dertz E.A., Xu J., Stintzi A., Raymond K.N. Bacillibactin mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128:22–3.
13. Dhungana S., Anderson D.S., Mietzner T.A., Crumbliss A.L. Kinetics of iron release from ferric binding protein (FbpA): mechanistic implications in bacterial periplasm-to-cytosol Fe<sup>3+</sup> transport. *Biochemistry.* 2005; 44:9606–18.
14. Dhungana S., Taboy C.H., Zak O., Larvie M., Crumbliss A.L., Aisen P. Redox properties of human transferrin bound to its receptor. *Biochemistry.* 2004; 43:205–9.
15. Drake E.J., Cao J., Qu J., Shah M.B., Straubinger R.M., Gulick M. The 1.8 Å<sup>3</sup> crystal structure of PA2412, an MbtH-like protein from the pyoverdine cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:20425–34.
16. Ferreras J.A., Ryu J.S., Di Lello F., Tan D.S., Quadri L.E.N. Small molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nat. Chem. Biol.* 2005; 1:29–32.
17. Fox D.T., Hotta K., Kim C.Y., Koppisch A.T. The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a (–)-3-dehydroshikimate dehydratase. *Biochemistry.* 2008; 47:12251–3.
18. Gardner R.A., Kinkade R., Wang C., Phanstiel O. 4th. Total synthesis of petrobactin and its homologues as potential growth stimuli for *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, an oil-degrading bacterium. *J. Org. Chem.* 2004; 69:3530–7.
19. Garner B.L., Arceneaux J.E., Byers B.R. Temperature control of a 3,4-dihydroxybenzoate (protocatechuate)-based siderophore in *Bacillus anthracis*. *Curr. Microbiol.* 2004; 49:89–94.
20. Griffiths E. Iron in biological systems. In: Iron and Infection Molecular, Physiological and Clinical Aspect. Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1999. P. 1–26.
21. Harris W.R. Iron chemistry. In: Molecular and Cellular Iron Transport. New York: Marcel Dekker; 2002. P. 1–40.
22. Hickford S.J., Kupper F.C., Zhang G., Carrano C.J., Blun J.W., Butler A. Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Nat. Prod.* 2004; 67:1897–9.
23. Homann V.V., Edwards K.J., Webb E.A., Butler A. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives. *Biometals.* 2009; 22:565–71.
24. Hotta K., Kim C.-Y., Fox D.T., Koppisch A.T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology.* 2010; 156:1918–25.
25. Koehler T.M., Dai Z., Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO<sub>2</sub> and a transacting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* 1994; 176:586–95.
26. Koppisch A.T., Browder C.C., Moe A.L., Shelley J.T., Kinkel B.A., Hersman L.E., Iyer S., Ruggiero C.E. Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *Biometals.* 2005; 18:577–85.
27. Koppisch A.T., Dhungana S., Hill K.K., Boukhalfa H., Heine H.S., Colip L.A., Romero R.B., Shou Y., Ticknor L.O., Marrone B.L., Hersman L.E., Iyer S., Ruggiero C.E. Petrobactin is produced by both pathogenic and nonpathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. *Biometals.* 2008; 21:581–9.
28. Koppisch A.T., Hotta K., Fox D.T., Ruggiero C.E., Kim C.Y., Sanchez T., Iyer S., Browder C.C., Unkefer P.J., Unkefer C.J. Biosynthesis of the 3,4-dihydroxybenzoate moieties of petrobactin by *Bacillus anthracis*. *J. Org. Chem.* 2008; 73:5759–65.
29. Lee J.Y., Passalacqua K.D., Hanna P.C., Sherman D.H. Regulation of Petrobactin and Bacillibactin Biosynthesis in *Bacillus anthracis* under Iron and Oxygen Variation. *PLoS ONE.* 2011; 6(6):e2077. doi:10.1371/journal.pone.0020777.
30. Lee J.Y., Janes B.K., Passalacqua K.D., Pflieger B.F., Bergman N.H., Liu H., Håkansson K., Somu R.V., Aldrich C.C., Cendrowski S., Hanna P.C., Sherman D.H. Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2007; 189:1698–710.
31. May J.J., Wendrich T.M., Marahiel M.A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:7209–17.
32. Miethke M., Marahiel M.A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 71:413–51.
33. Miethke M., Klotz O., Linne U., May J.J., Beckering C.L., Marahiel M.A. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 61:1413–27.
34. Miethke M., Schmidt S., Marahiel M.A. The major facilitator superfamily-type transporter YmfE and the multidrug efflux activator Mta mediate bacillibactin secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2008; 190:5143–52.
35. Nusca T.D., Kim Y., Maltseva N., Lee J.Y., Eschenfeldt W., Stols L., Schofield M.M., Scaglione J.B., Dixon S.D., Oves-Costales D., Challis G.L., Hanna P.C., Pflieger B.F., Joachimiak A., Sherman

- D.H. Functional and structural analysis of the siderophore synthetase AsbB through reconstitution of the petrobactin biosynthetic pathway from *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:16058–72.
36. Okada N., Geist R.T., Caparon M.G. Positive transcriptional control of *mry* regulates virulence in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.* 1993; 7:893–903.
37. Ollinger J., Song K.B., Antelmann H., Hecker M., Helmann J.D. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2006; 188:3664–73.
38. Oves-Costales D., Song L., Challis G.L. Enantioselective desymmetrisation of citric acid catalyzed by the substrate-tolerant petrobactin biosynthetic enzyme AsbA. *Chem. Commun. (Camb)*, 2009; 11:1389–91.
39. Papinutto E., Dundon W.G., Pitulis N., Battistutta R., Montecucco C., Zanotti G. Structure of Two Iron-binding Proteins from *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:15093–8.
40. Pflieger B.F., Kim Y., Nusca T.D., Maltseva N., Lee J., Rath C.M., Scaglione J.B., Janes B.K., Anderson E.C., Bergman N.H., Hanna P.C., Joachimiak A., Sherman D.H. Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105:17133–8.
41. Pflieger B.F., Lee J.Y., Somu R.V., Aldrich C.C., Hanna P.C., Sherman D.H. Characterization and analysis of early enzymes for petrobactin biosynthesis in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry.* 2007; 46:4147–57.
42. Wilson M.K., Abergel R.J., Arceneaux J.E., Raymond K.N., Byers B.R. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals.* 2010; 23:129–34.
43. Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30:691–6.
44. Zawadzka A.M., Abergel R.J., Nichiporuk R., Andersen U.N., Raymond K.N. Siderophore-mediated iron acquisitions systems in *Bacillus cereus*: identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry.* 2009; 48:3645–57.
45. Zawadzka A.M., Kim Y., Maltseva N., Nichiporuk R., Fan Y., Joachimiak A., Raymond K.N. Characterization of a *Bacillus subtilis* transporter for petrobactin, an anthrax stealth siderophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106:21854–9.

**Authors:**

Eremenko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

**Об авторах:**

Еременко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 24.07.15.