



铜绿假单胞菌锌离子摄取系统的研究进展

牛艳婷¹, 王帅涛¹, 成娟丽¹, 林金水^{1,2*}

¹延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

²陕西省红枣重点实验室(延安大学), 陕西 延安 716000

摘要: 锌作为一种结构、催化和信号的成分, 在许多生理过程中起着关键的作用。它也是病原微生物生长所必需的, 不但参与病原微生物代谢和各种毒力因子的调控, 而且是病原微生物在宿主中感染和定殖所必需的。铜绿假单胞菌侵染宿主发挥毒力时, 宿主会采取营养免疫的策略来限制体内环境中游离的锌离子浓度而抑制该病原菌的感染和定殖。反过来, 铜绿假单胞菌则通过自身的锌离子摄取系统克服宿主的营养免疫防御。本综述重点介绍了铜绿假单胞菌中已知的 3 种锌离子摄取系统(ZnuABC 摄取系统、HmtA 摄取系统和 CntRLMN 摄取系统)和锌摄取调控蛋白 Zur, 同时分析了其他潜在的锌离子摄取途径, 并进一步阐述了铜绿假单胞菌锌离子摄取系统在其侵染宿主发挥毒力时和抵御宿主营养免疫时发挥的重要作用。系统总结铜绿假单胞菌对锌离子的摄取过程, 旨在为靶向锌离子摄取系统的新型抗铜绿假单胞菌药物的开发提供指导。

关键词: 铜绿假单胞菌, 锌离子摄取系统, Zur, 毒力因子, 营养免疫

锌是生物体中仅次于铁的第二丰富的过渡金属元素, 是几乎所有生物体生命活动中的一种关键微量元素, 尤其是微生物生长所必需的^[1]。胞内游离锌离子可以通过与亚铁离子竞争而抑制芬顿反应(即 H_2O_2 与亚铁离子反应产生活性氧自由基)以阻止活性氧自由基的产生, 从而降低活性氧自由基对细胞产生的毒性作用^[2]。然而, 细

胞中存在的大多数锌不是游离的, 而是与蛋白质结合在一起的。例如, 在大肠杆菌中, 锌的总量被认为大约在毫摩尔范围内, 而游离 Zn^{2+} 的浓度维持在一个非常低的微摩尔到皮摩尔的浓度^[3]。依赖锌离子的蛋白质在细胞内扮演着许多不可或缺的角色, 如 DNA 修复、凋亡、代谢过程、胞外基质调控和抗氧化防御, 还参与生长激素的

基金项目: 国家自然科学基金(31700031, 31860012, 32070103); 陕西省教育厅重点实验室科研计划(17JS138); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目; 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划; 延安大学博士科研启动项目(YDBK2016-01)

*通信作者。Tel: +86-911-2332030; E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

收稿日期: 2020-08-06; 修回日期: 2020-10-06; 网络出版日期: 2020-11-09

代谢调节, 在基因表达调控和免疫系统中起着关键作用^[4-5]。当锌在细胞中过量存在时, 往往占据非特异性的结合位点, 与其他基本微量金属元素竞争或破坏呼吸电子传递系统, 从而中断重要的代谢和细胞通路^[6]。因此, 维持锌的体内平衡是所有生物系统正常运作的一个重要前提。哺乳动物宿主和病原菌之间对必需金属元素(包括锌离子等金属离子)的竞争发生在感染期间。为了抵御致病入侵者, 宿主通过营养免疫机制有效地隔离金属离子, 试图造成病原菌金属离子饥饿, 从而限制它们的生长增殖^[7]。而细菌在该过程中除了周围环境中缺少可接触的金属离子之外, 其自身缺乏储存金属元素的细胞空间也是导致细菌金属离子饥饿的一个重要因素^[8]。因此, 细菌进化出多种金属缺乏防御机制, 使它们能够在金属限制条件下正常成长, 尤其对感染哺乳动物至关重要^[9]。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)于1882年由 Gessard 首次分离, 1890年被 Charrin 首次确认为病原体, 于2017年2月被世界卫生组织列为急需开发新抗菌治疗药物的病原菌之一, 是目前最受人类关注的条件性致病菌之一^[8]。铜绿假单胞菌引起的疾病种类繁多, 从表面的伤口感染、烧伤和尿路感染, 到内部播散性感染, 如菌血症、心内膜炎、脑膜炎和骨髓炎, 甚至恶性肿瘤中都可以分离出相应临床菌株^[8]。铜绿假单胞菌对多种抗生素具有耐药性, 可以直接将毒素、胞外酶、铁载体、脂多糖等大量的毒力因子分泌到宿主细胞, 并且能够感知和适应不断变化的环境, 这使得其能够同时造成急性感染和慢性感染^[10]。当人体受到铜绿假单胞菌侵染时, 体内

的锌被转运和储藏起来, 或与钙网蛋白和牛皮癣素等紧密结合, 通过这种营养免疫反应的激活可以有效抑制铜绿假单胞菌对锌的摄取, 从而降低其在人体内的定殖和持久感染^[8,11]。因此, 铜绿假单胞菌逃避人体免疫反应和在感染期间繁殖的能力, 很大程度上取决于它们摄取锌等金属离子的能力^[7,9]。

本文重点介绍了铜绿假单胞菌的已知的3种主要锌离子摄取系统(ZnuABC 摄取系统、HmtA 摄取系统和 CntRLMN 摄取系统)和锌离子调控蛋白 Zur, 并进一步阐述了其他潜在的锌离子摄取途径。这些锌离子摄取系统不仅是维持细胞锌离子稳态的重要部分, 而且通过复杂的基因表达调控对毒力和宿主营养免疫有直接影响, 这将成为开发抗铜绿假单胞菌药物的潜在靶点。

1 铜绿假单胞菌中已知的锌离子摄取系统

1.1 ZnuABC 锌离子摄取系统

特异性的高亲和锌离子摄取系统首先在大肠杆菌中被鉴定, 即由 ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白 ZnuABC 所介导的锌离子摄取系统^[12]。对铜绿假单胞菌 PAO1 基因组的生物信息学分析同样发现了3个与大肠杆菌 *znuABC* 同源的基因: PA5498 (*znuA*)、PA5500 (*znuC*)和 PA5501 (*znuB*)。ZnuA 是一个高亲和力的锌离子特异的可溶性结合蛋白, 存在于细胞周质空间^[12]。ZnuB 是内膜透性酶, ZnuC 是 ATP 酶, 这两者构成内膜上的转运蛋白复合体 ZnuBC^[12]。铜绿假单胞菌 ZnuA 有2个锌离子结

合位点, 一个是由 His60、His140 和 His204 等 3 个组氨酸残基组成的高亲和位点, 它对锌离子的结合常数 K_d 为 22.6 ± 6.4 nmol/L, 另一个是结合常数为微摩尔级的低亲和位点^[3]。在脑膜炎奈瑟氏菌中, ZnuABC 与一个 TonB 依赖的外膜转运蛋白 ZnuD 相偶联, ZnuD 负责转运胞外 Zn^{2+} 穿过外膜^[13]。铜绿假单胞菌基因组中也编码一个氨基酸序列与脑膜炎奈瑟氏菌 ZnuD 达 27%一致性的蛋白 PA0781, 在限锌培养条件下 *znuA* 缺失突变显著诱导 PA0781 的表达, 暗示 PA0781 可能是 ZnuD 的同源蛋白^[3]。综上, 在铜绿假单胞菌中可能由 ZnuD 同源蛋白(PA0781)负责将 Zn^{2+} 从胞外转运至周质空间, 周质空间蛋白 ZnuA 则将其传递给内膜上 ZnuBC 转运蛋白复合体并进一步转运至细胞质, 从而完成 Zn^{2+} 从胞外到细胞质的转运过程(图 1)。虽然 ZnuABC 在铜绿假单胞菌的锌离子摄取过程中起作用, 但是 *znuA*、*znuB* 和 *znuC* 基因缺失突变仅微弱影响铜绿假单胞菌在限锌培养基中的生长^[3,14], 这表明铜绿假单胞菌中还存在其他的锌离子摄取系统。

1.2 HmtA 锌离子摄取系统

除 ZnuABC 锌离子摄取系统外, HmtA (PA2435)也是铜绿假单胞菌已知的锌离子摄取系统之一(图 2)。铜绿假单胞菌中 HmtA 是一种定位于内膜上的 P 型 ATP 酶^[15]。P 型 ATP 酶是一种通过水解 ATP 提供能量的转运蛋白超家族, 这类转运蛋白的特点是通过将来自 ATP 的 γ -磷酸转移到高度保守的 DKTGT 基序上而形成一种磷酸酶中间体^[16]。其中, 催化过渡金属转运的 P 型 ATP 酶家族也称为重金属 ATP 酶或 P_{1B} 型 ATP 酶, 在其第六跨膜螺旋(TM6)中含有一个转运活性所必需的 Cys-Pro-Xaa (或 Xaa-Pro-Cys)基序, Xaa 可以是 Cys、Ser 或 His 残基^[17]。不同的 P 型 ATP 酶转运蛋白具有不同的底物专一性, 但它们中的大多数负责 Ag^+/Cu^+ 或 $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ 的外排。然而与大多数作为外排泵的 P 型 ATP 酶不同, HmtA 是一种金属离子输入蛋白, 它对底物有高度选择性, 仅介导铜绿假单胞菌对 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的摄取, 而不介导其对其他金属离子如 Ag^+ 和 Cd^{2+} 的摄取^[15]。

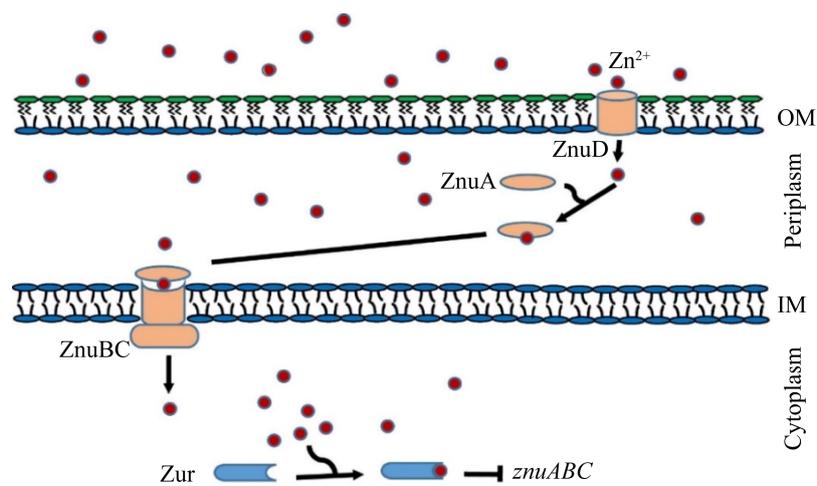


图 1. 铜绿假单胞菌 ZnuABC 摄取锌离子模型图

Figure 1. The model of zinc uptake by *P. aeruginosa* ZnuABC. OM: outer membrane; IM: inner membrane.

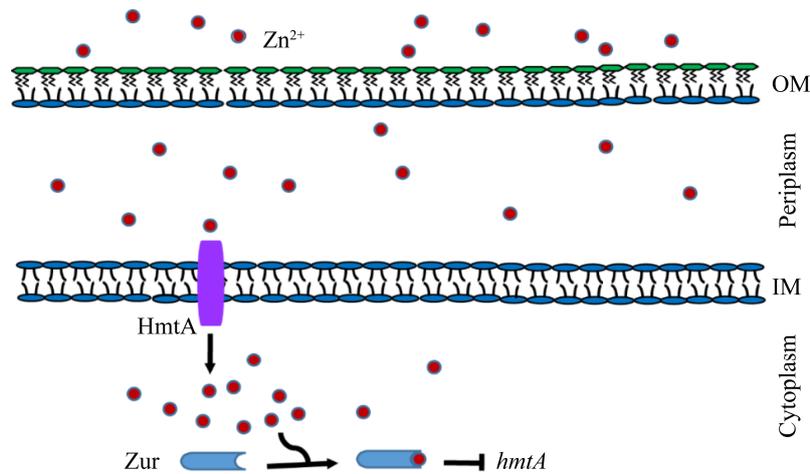


图 2. 铜绿假单胞菌 HmtA 摄取锌离子模型图

Figure 2. The model of zinc uptake by *P. aeruginosa* HmtA. OM: outer membrane; IM: inner membrane.

1.3 CntRLMN 锌离子摄取系统

结合细菌其他类型的锌离子摄取系统，有科学家提出，与铁载体介导的细胞铁离子摄取过程相似，铜绿假单胞菌也可能通过分泌能够整合锌离子的化合物或蛋白质(被称为 Zincophore, 锌载体)而介导细胞的锌离子摄取^[18]。最近，我们课题组^[19]证实铜绿假单胞菌中存在这种类型的锌离子摄取系统，即在铜绿假单胞 PAO1 中鉴定了一个新的锌离子摄取系统 CntRLMN (PA4834-PA4837)。通过在富锌和限锌环境下的生长曲线分析表明，ZnuBC 和 CntL、CntR、CntN 都具有参与铜绿假单胞菌锌离子摄取的功能，然而只有当 *znuBC* 和 *cntRLMN* 同时缺失时铜绿假单胞菌在限锌环境中的生长才会受到显著抑制。由于 ZnuBC 是已报道的锌离子摄取系统，因此 CntRLMN 是一种在功能上与 ZnuBC 互补的新型锌离子摄取系统。通过对外源添加细胞提取物的生长曲线分析以及 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚 [4-(2-pyridylazo)resorcinol, PAR] 实验表明，在 *cntRLMN* 操纵子中 CntL 通过控制合成某种锌载

体(zincophore)参与铜绿假单胞菌的锌离子摄取；CntN 作为细胞质膜转运蛋白，介导 Zincophore 的分泌，而 CntR 则作为外膜受体，介导胞外 Zincophore-Zn²⁺复合物向胞内的转运。这与 Mastropasqua 和 Lhospice 等课题组报道的研究结果相一致^[20-21]。Mastropasqua 课题组^[20]还发现缺失突变 *cntR* (也称 *zrmA*)显著降低铜绿假单胞菌在限锌培养条件下胞内锌离子的含量，从而降低了其胞外蛋白酶的产生和活性。Lhospice 课题组^[21]则解析了 Zincophore 的化学结构和生物合成途径，并将该 Zincophore 命名为 Pseudopaline。该物质的化学结构和生物合成途径均与金黄色葡萄球菌金属载体 Staphylopin^[22]类似(图 3-A)。Pseudopaline 的生物合成成分两步：首先，在 CntL 的催化下，S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)对 L-组氨酸(L-histidine, L-His)上的 α -氨基丁酸基团进行亲核攻击，从而生成反应中间体 yNA；其次，在 CntM 的催化下，NADH 提供还原动力，yNA 中间体与一分子的 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α KG)缩合形成 Pseudopaline^[21]。上述这些

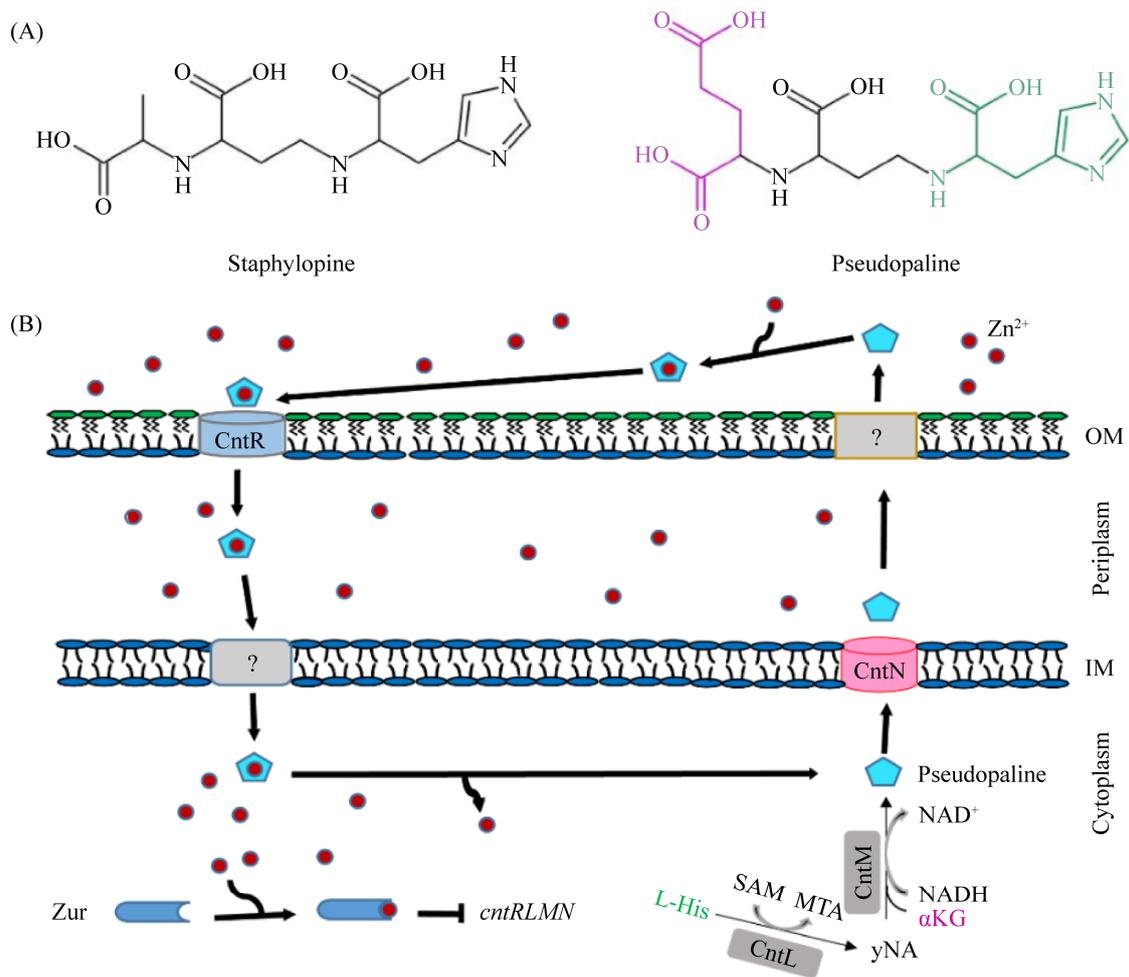


图 3. 铜绿假单胞菌 CntRLMN 摄取锌离子模型图

Figure 3. The model of zinc uptake by *P. aeruginosa* CntRLMN. A: Chemical structures of staphylopine^[22] and pseudopaline^[21]. The purple part is α -ketoglutarate, and the green part is L-histidine. B: Model of pseudopaline synthesis, secretion and metal uptake in *P. aeruginosa*. OM: outer membrane; IM: inner membrane; L-His: L-histidine; SAM: S-adenosine methionine; MTA: 5-methylthioadenosine; α KG: α -ketoglutarate.

研究结果促使我们提出了铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子的功能模型(图 3-B), 限锌环境中, CntLM 合成的 Pseudopaline 经内膜转运蛋白 CntN 分泌至周质空间, 再经外膜一个未知的通道蛋白分泌到胞外, 在胞外螯合游离锌离子形成 Pseudopaline-Zn²⁺ 复合物, 该复合物通过外膜受体 CntR 转运进入周质空间, 再经由一个未知的内膜转运蛋白将其或其卸载下来的 Zn²⁺ 转运进入胞内, 从而完成对胞外锌离子的摄取。

2 锌离子摄取调控蛋白 Zur 的调控

原核生物的锌离子摄取系统受锌离子摄取调控蛋白(zinc uptake regulator, Zur)的直接负调控, 该蛋白属于重要的铁摄取调控蛋白 Fur (ferric uptake regulator) 家族^[23]。Zur 是一种单组分调节蛋白, 即输入域和输出域位于同一蛋白上, 直接受锌离子可逆结合的调控。Zur 在细胞质中形成二聚体, 需要锌离子进行折叠和二聚化。N 端含

Zur 失稳, 无法抑制 *znuABC* 转录, 从而允许锌离子摄取^[26]。

对锌缺乏的调控主要依赖于转录抑制因子 Zur, 敲除 *zur* 的铜绿假单胞菌突变体显示细胞质锌离子浓度更高, 与 Zur 蛋白质的阻遏功能一致^[14]。与 Fur 的铁浓度依赖性调控机制相似, Zur 在富锌条件下起着抑制靶基因的作用。当锌离子含量丰富时, 结合锌离子的 Zur 蛋白与靶基因上游的启动子序列结合以阻止转录, 防止锌离子过剩; 在锌离子限制条件下, Zur 转移到无负载形式, 导致 Zur 与靶基因启动子分离, 目的基因正常进行转录, 促进锌离子摄取。已有研究表明 *znuABC*、*hmtA* 和 *cntRLMN* 的表达受锌离子调控蛋白 Zur 负调控并以 Zur 蛋白依赖的形式受到锌离子的抑制, 并且 Zur 抑制其自身操纵子转录以响应锌浓度增加^[14-15,19-21,26], 见图 1、图 2 和图 3-B。

3 铜绿假单胞菌中其他潜在的锌离子摄取途径

3.1 PA1922-PA1925、PA2911-PA2914 和 PA4063-PA4066 锌离子摄取系统

最近, 限锌培养条件下对铜绿假单胞菌 *znuA* 缺失突变株进行转录组分析的研究结果显示除了 *znuABC*、*hmtA* 和 *cntRLMN* 等 3 套已知的锌离子摄取系统的表达显著上调外, 还有 3 个未知功能的转运器, 分别为 PA1922-PA1925、PA2911-PA2914 和 PA4063-PA4066, 它们的表达也显著上调^[3,8], 同时它们的启动子均存在 Zur 调控蛋白的结合位点, 如图 5-A 所示。我们课题组已进行初步实验证明 PA1922-PA1925、PA2911-PA2914 和 PA4063-PA4066 的表达受

Zur 蛋白的负调控(数据未发表), 因此推测这 3 个未知的转运器可能也参与铜绿假单胞菌的锌离子摄取, 然而, 这一推测目前仍然没有得到实验数据的证实。首先, PA1922-PA1925 中, PA1922 是一种 TonB 依赖的外膜受体, PA1923 编码一种参与钴胺素合成的钴螯合酶同源蛋白, PA1924 则编码一种假定的 ExbD 同源蛋白, ExbD 蛋白的作用是为 TonB 依赖外膜受体的转运功能提供能量, 而 PA1925 是一个未知蛋白, 因此 PA1922 和 PA1924 可能组成 TonB 依赖的外膜转运器, 参与游离的锌离子从胞外向细胞质的转运。其次, 铜绿假单胞菌中螯合形式的锌离子可能通过 PA2912-PA2914 从周质转运到细胞质^[3]。Pederick 等^[3]预测 PA2911 也是一种 TonB 依赖的外膜受体, PA2912-2914 则编码一种 ABC 转运器, PA2912 是 ATP 酶, PA2913 编码周质空间结合蛋白, PA2914 是内膜透性酶。PA2911/PA2912-2914 转运器的组织结构与 ZnuD/ZnuABC 转运器的组织结构相似, PA2911 与 PA2912-PA2914 协同作用。首先, 螯合形式的 Zn^{2+} 通过外膜受体 PA2911 从胞外被转运到周质空间, 然后与周质空间结合蛋白 PA2913 结合, 并通过 PA2913 运载给内膜转运蛋白复合体 PA2912/PA2914, 进而穿过内膜进入细胞质^[3]。第三, PA4063-PA4066 操纵子是铜绿假单胞菌在囊性纤维化患者痰液中生长所必需的, 它也编码一种 ABC 转运器, 含有 2 个功能未知的周质底物结合蛋白 PA4063 和 PA4066, 而 PA4064 和 PA4065 则分别与唾液链球菌的抗菌肽抗性转运蛋白 SalX 和 SalY 同源^[32-33]。PA4063 和 PA4066 蛋白分别由 196 个和 172 个氨基酸残基组成, 我们经 SignalP 信号肽序列在线软件分析显示它们的信号肽切割位点分别位于

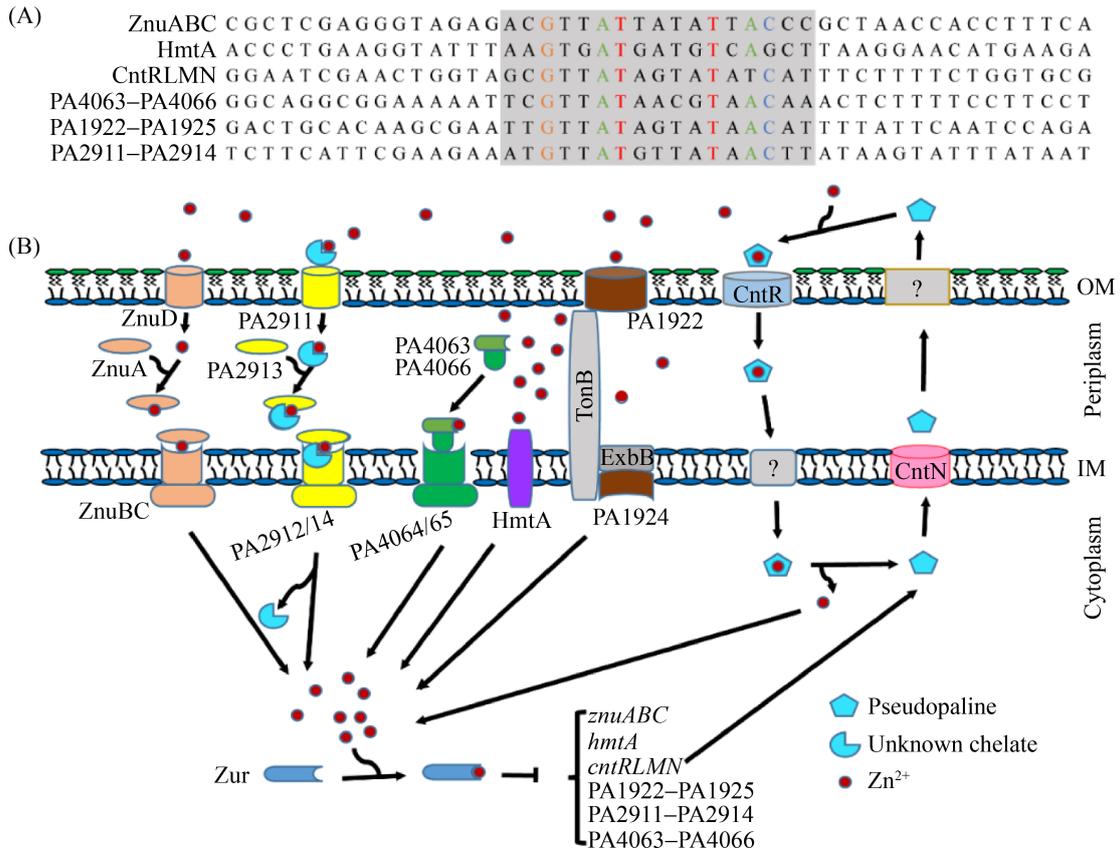


图 5. 铜绿假单胞菌锌离子摄取系统的表达受锌离子调控蛋白 Zur 的调控

Figure 5. The expression of zinc uptake system of *P. aeruginosa* is regulated by zinc regulator Zur. A: DNA sequence alignments of ZnuABC, HmtA, CntRLMN, PA4063-PA4066, PA2911-PA2914 and PA1922-PA1925 promoter. The yellow region represents the zur binding site containing 17 bp base, and the red labeled base represents the conserved nucleotide in this region. B: the model of zinc uptake systems in *P. aeruginosa*. OM: outer membrane; IM: inner membrane.

17-18 氨基酸残基之间和 23-24 氨基酸残基之间 (预测网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 即它们成熟形式的蛋白分别只有 179 个和 149 个氨基酸残基。这么小的蛋白可能达不到同时与配体和 ABC 转运器的跨膜结构域形成稳定相互作用所需要的蛋白尺寸^[3]。PA4063 蛋白存在大量整合锌离子所需的组氨酸残基因而可能具有锌离子整合活性, PA4066 的组氨酸残基数目则比较缺乏^[3], 因此, 二者可能构成蛋白尺寸更大的异源二聚体蛋白复合体共同执行周质锌离子结合

蛋白的功能。据此, 我们推测 PA4063-PA4066 可能利用形成异源二聚体的周质底物结合蛋白 PA4063 和 PA4066 结合周质空间的游离 Zn²⁺, 并将锌离子投递给位于内膜上的 PA4064/PA4065 转运蛋白复合体, 而进一步完成 Zn²⁺向细胞质的跨膜转运, 其中 PA4063 作为锌离子整合蛋白, 而 PA4066 则作为接头蛋白介导 PA4063 与内膜透性酶 PA4065 之间的互动, 而 PA4064 作为 ATP 酶为整个操纵子介导锌离子摄取供能。

综上所述, 铜绿假单胞菌为满足其自身 Zn²⁺

需要使用大量锌离子摄取系统,如图 5-B 所示。在限锌条件下,游离的锌离子可能通过 ZnuD/ZnuABC、HmtA、PA1922-PA1925 和 PA4063-PA4066 等锌离子转运系统完成从细胞外向细胞质的跨膜转运;螯合形式的锌离子则通过 CntRLMN 和 PA2911/PA2912-PA2914 这两种锌离子转运系统进行摄取。这些转运系统的表达都受 Zur 蛋白的负调控并以 Zur 蛋白依赖的形式受到锌离子的抑制。在富锌条件下,Zur 蛋白与 Zn^{2+} 结合,从而抑制锌离子摄取系统的转录;限锌条件下 Zur- Zn^{2+} 的抑制作用解除,从而激活锌离子摄取系统相关基因的表达。锌离子摄取是依赖能量的,需要通过内膜的 TonB-ExbB-ExbD 复合物将营养物质的摄取与内膜上的质子梯度结

合起来。与锌离子摄取相关的部分基因及其表达的蛋白所处位置和功能见表 1。

3.2 铜绿假单胞菌其他锌离子摄取途径

限锌培养条件下对铜绿假单胞菌 *znuA* 缺失突变株进行转录组分析的研究结果还显示,*rpmE2* (PA3600)、*rpmJ2* (PA3601) 和 *dkxA2* (PA5536) 等基因的表达也均显著上调。*RpmE2* 和 *RpmJ2* 分别是 50S 核糖体蛋白 *RpmE* (PA5049) 和 *RpmJ* (PA4242) 在铜绿假单胞菌中的旁系同源蛋白^[3]。原核生物核糖体蛋白通常有两种形式,一种是结合金属离子如 Zn^{2+} 的 C^+ 亚型,另一种是由于缺乏金属结合残基而不具备与金属离子相互作用的 C^- 亚型。正是由于 C^- 亚型核糖体蛋白替代依赖于 Zn^{2+} 的 C^+ 亚型核糖体蛋白,使细胞的

表 1. 铜绿假单胞菌中参与锌离子摄取的蛋白质列表

Table 1. List of proteins involved in zinc uptake in *P. aeruginosa*

ID	Gene name	Localization	Function
PA5498	<i>znuA</i>	Periplasm	Solute-binding protein (SBP)
PA5499	<i>zur</i>	Cytoplasm	Zinc uptake regulator
PA5500	<i>znuC</i>	Cytoplasmic membrane	ATPase
PA5501	<i>znuB</i>	Cytoplasmic membrane	Permease of ABC transporter
PA0781	<i>znuD</i>	Outer membrane	TonB-dependent receptor
PA2435	<i>hmtA</i>	Cytoplasmic membrane	P-type ATPase transporter
PA4834	<i>cntN</i>	Cytoplasmic membrane	membrane transporter
PA4837	<i>cntR</i>	Outer membrane	TonB-dependent receptor
PA1922	PA1922	Outer membrane	TonB-dependent receptor
PA1924	PA1924	Inner membrane	ExbD protein
PA2911	PA2911	Outer membrane	TonB-dependent receptor
PA2912	PA2912	Cytoplasmic membrane	ATPase
PA2913	PA2913	Periplasm	Solute-binding protein (SBP)
PA2914	PA2914	Cytoplasmic membrane	Permease of ABC transporter
PA4063	PA4063	Periplasm	Solute-binding protein (SBP)
PA4064	PA4064	Cytoplasmic membrane	ATPase
PA4065	PA4065	Cytoplasmic membrane	Permease of ABC transporter
PA4066	PA4066	Periplasm	Solute-binding protein (SBP)

The bold sections represent known zinc uptake associated proteins, while the others are hypothetical zinc uptake associated proteins.

核糖体功能在锌离子受限条件下得以维持,同时 C^+ 亚型核糖体蛋白中的 Zn^{2+} 也可重新释放出来作为他用,使核糖体蛋白可能作为细胞的锌离子存储库^[34]。RpmE 和 RpmJ 属于 C^+ 亚型核糖体蛋白,而 RpmE2 和 RpmJ2 属于 C^- 亚型核糖体蛋白,*rpmE2-rpmJ2* 操纵子的启动子中存在 Zur 结合位点,其表达在锌饥饿条件下显著上调^[3]。这些 C^- 亚型核糖体蛋白的诱导表达是铜绿假单胞菌对锌饥饿的一种适应策略,它们在功能上取代了依赖于 Zn^{2+} 的 C^+ 亚型核糖体蛋白 RpmE 和 RpmJ^[3]。这暗示铜绿假单胞菌可以通过将 C^+ 亚型核糖体蛋白转换为 C^- 亚型核糖体蛋白而重新改变胞内锌离子的分布以适应锌饥饿的环境。另一个表达受锌饥饿诱导的基因是 *dksA2*, 与 *dksA* (PA4723) 旁系同源。DksA 是铜绿假单胞菌中的一种依赖于 Zn^{2+} 的转录调控蛋白,在营养缺乏期间,DksA 与 ppGpp (鸟苷四磷酸)/pppGpp (鸟苷五磷酸)协同作用,增强 RNA 聚合酶与 rRNA 启动子的结合,从而抑制 rRNA 转录^[35-36]。DksA 蛋白含有由 2 个 CxxC 基序组成的典型 Cys4 锌指结构基序 CxxC-(x₁₇)-CxxC,类似于在 Zur 中发现的 C 位点,该结构对其自身的正确折叠和蛋白活性至关重要^[37]。铜绿假单胞菌基因组编码一个与 DksA 密切相关的旁系同源蛋白,被称为 DksA2,它包含 1 个 CxxT-(x₁₇)-CxxA 基序,相比 DksA 该基序缺少 2 个半胱氨酸残基^[29,37]。有趣的是,在低锌环境中 DksA2 是被诱导的,并且 *dksA2* 缺失会导致限锌环境下的生长缺陷,这表明该蛋白在缺锌时可以在功能上替代 DksA 的作用^[37]。此外,在 *dksA2* 的启动子区发现了一个假定的 Zur 结合位点,事实上,Zur 还可以抑制 *dksA2* 基因的表达,这与 *dksA2* 基因的表达在低锌条件下受到诱导的

表型相一致^[3,29]。尽管 DksA2 在表型和调控上都与锌离子相关,但是至于它是否具有参与调节铜绿假单胞菌胞内锌离子稳态的功能还有待于进一步研究。

除上述胞内储锌蛋白释放锌离子供铜绿假单胞菌在限锌条件下使用外,铜绿假单胞菌中可能还存在一些非特异性转运系统参与锌离子的摄取。(1) 除了 *cntRLMN* 分泌的 Pseudopaline 外,铜绿假单胞菌可能也分泌其他能够螯合锌离子的化合物或蛋白质即锌载体(zincophores)参与细胞摄取锌离子。在恶臭假单胞菌中,能够结合 Fe^{3+} 的铁载体吡啶-2,6-二硫代羧酸(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, PDTC)与 Zn^{2+} 结合,并允许其进入细胞^[38]。类似 Bobrov 等在鼠疫耶尔森氏菌中发现铁载体耶尔森杆菌素(yersiniabactin)结合锌离子,并通过内膜转运蛋白 YbtX 将其运输到胞内的过程^[39]。在铜绿假单胞菌中,主要有两种铁载体,即螯铁蛋白(pyochelin)和脓青素(pyoverdine),这些分子除了参与铁的吸收外,也可以结合其他各种阳离子,包括 Zn^{2+} ^[8]。铜绿假单胞菌中, Zn^{2+} 和 Fe^{3+} 的摄取密切相关,铁载体可能发挥锌载体的作用而参与锌离子的摄取^[18]。另外,在假结核耶尔森氏菌和泰国伯克霍尔德氏菌中发现,细菌还可以利用 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)通过向胞外分泌能够结合锌离子的效应蛋白而参与细胞的锌离子摄取^[40-41]。虽然目前在铜绿假单胞菌中还没有类似的介导细胞锌离子摄取的 T6SS 效应蛋白被鉴定出来,但是已有文献报道铜绿假单胞菌的 T6SS 效应蛋白具有介导细胞铁离子或铜离子摄取的功能。最近我们课题组发现铜绿假单胞菌 H3-T6SS 分泌的效应蛋白 TseF 可以结合细胞分

泌的铁螯合剂 2-庚基-3-羟基-4(1H)-喹诺酮(又称 *Pseudomonas* quinolone signal, PQS), 并通过与 PQS-Fe³⁺结合而随同 PQS-Fe³⁺一起定位在外膜囊泡上, 进而通过外膜囊泡将 TseF-PQS-Fe³⁺复合物运输到细胞表面与其外膜受体 FptA 或 OprF 结合而介导 PQS-Fe³⁺通过外膜受体 FptA 或 OprF 进入细胞, 从而完成细胞对胞外铁离子的摄取^[42]。同样, 铜绿假单胞菌 H2-T6SS 分泌一种 Cu²⁺结合蛋白 Azu, 它通过与外膜受体蛋白 OprC 的互作而介导 Cu²⁺通过外膜受体 OprC 进入细胞, 从而完成细胞对胞外铜离子的摄取^[43]。因此, 铜绿假单胞菌 T6SS 也可能通过分泌能够结合锌载体或锌离子的效应蛋白而参与细胞的锌离子摄取。

(2) 低亲和力的锌离子转运蛋白介导的锌离子摄取。大肠杆菌能在较低锌离子浓度的体外环境下和宿主的体内环境中利用非特异性的低亲和力 ZIP (ZRT/IRT-like protein) 家族转运蛋白 ZupT 有效介导锌离子的摄取^[44]。ZupT 含 8 个跨膜结构域, 跨膜结构域 3 和 4 之间有一个富 His 区, 有广泛的金属结合特性, 包括结合 Zn²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺或 Cd²⁺, 其中对 Zn²⁺有明显的偏好性, 是一种低亲和力的锌离子转运蛋白, 在金属离子丰富的条件下可依靠质子动力势提供能量完成对金属离子向胞内的转运^[45]。通过 NCBI-BLAST 同源搜索比对, 我们课题组发现铜绿假单胞菌中也存在一个 ZupT 同源蛋白 PA4467, 它的氨基酸序列与大肠杆菌 ZupT (b3040) 的氨基酸序列一致性达到 36.59%, 然而它的功能到目前为止依然还未被鉴定。我们课题组的初步研究显示异源表达铜绿假单胞菌的 *zupT* (PA4467) 显著增强大肠杆菌对高浓度 Zn²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺和 Co²⁺等二价金属离子的敏感性(数据未发表), 这说明

铜绿假单胞菌的 ZupT 可能参与这些二价金属离子的摄取。因此, 我们推测 ZupT 也能够介导铜绿假单胞菌对锌离子的摄取, 依靠质子动力势低亲和地转运 Zn²⁺到胞内。

(3) 非特异的膜转运蛋白介导锌离子转运。MFS 超家族(major facilitator superfamily)蛋白是一类转运膜蛋白, 能够应答离子浓度梯度对次级代谢产物等进行运输^[46]。MFS 超家族蛋白具有多样性的转运底物, 可以转运单糖、药物分子、辅酶因子、肽、寡糖、核苷酸、铁螯合物以及阴离子和阳离子等多种配体^[47-49], 因此推测 MFS 蛋白可能也参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取。有研究发现细胞膜上的非特异性孔蛋白可能也参与锌离子从外膜向周质空间的转运。例如, OprF 是铜绿假单胞菌中最丰富的非脂蛋白类的外膜孔蛋白, 允许离子和低分子量糖分子通过^[50]。因此预测 OprF 等孔蛋白也可能参与铜绿假单胞菌锌离子的摄取。

(4) 组氨酸介导的细胞锌离子摄取。越来越多的研究表明, 添加组氨酸可以增加锌离子的溶解度和锌转运蛋白的有效性, 或者锌离子和组氨酸可以跨膜共转运^[51]。在鲍曼不动杆菌的研究中发现组氨酸分解代谢系统 HutUHTIG 通过水解螯合锌的 L-组氨酸参与细菌锌离子的摄取。该过程中, 胞外的锌离子与组氨酸螯合形成 His-Zn²⁺复合物可被鲍曼不动杆菌外膜上的组氨酸输入蛋白 HutT 转运至胞内。ZigA 是一种含锌的金属伴侣蛋白, 其表达受锌饥饿的诱导和 Zur 蛋白的直接负调控, 而 HutH 是一种以锌为辅因子的组氨酸解氨酶, 其酶活受锌的激活。当菌体处于锌饥饿时 ZigA 能帮助 HutH 结合 Zn²⁺, 进而激活 HutH, 然后将 HutT 从胞外输入的 His-Zn²⁺复合

物分解, 释放 Zn^{2+} 并产生尿刊酸, 尿刊酸再经水合酶 HutU、水解酶 HutI 和 HutG 等作用最终转化成 L-谷氨酸, 从而完成鲍曼不动杆菌对胞外锌离子的摄取^[52]。有趣的是铜绿假单胞菌中也存在该组氨酸分解代谢系统 HutUHTIG^[53]。上述研究结果暗示铜绿假单胞菌中 HutUHTIG 可能也具有与锌离子摄取有关的功能。

4 锌离子摄取与毒力

通常为了确保感染成功, 铜绿假单胞菌产生大量的毒力因子, 包括胞外酶(LasB 弹性蛋白酶、LasA 蛋白酶、碱性蛋白酶)、次级代谢产物(绿脓菌素、氰化氢)、毒素(外毒素 A)和凝集素(LecA)等, 它们的表达受细胞密度(群体感应)调控^[54]。这些毒力因子在囊性纤维化患者感染中起主要作用, 其中铜绿假单胞菌可利用藻酸盐形成粘液型生物被膜以增强对抗生素的耐受性^[55]。该过程中, 铜绿假单胞菌利用锌离子摄取系统竞争 Zn^{2+} 不但可以满足自身营养所需, 而且在宿主定殖过程中对毒力因子的产生也发挥重要作用^[8]。研究表明, 铜绿假单胞菌 *znuABC* 的缺失显示细胞内锌离子积累减少 60%, 会影响藻酸盐的生成, 抑制胞外含锌蛋白酶 LasA、LasB 和蛋白酶 IV 的活性, 并降低铜绿假单胞菌在小鼠全身感染过程中的传播能力, 说明 *ZnuABC* 对铜绿假单胞菌的感染定殖至关重要^[56]。同时, *cntRLMN* 缺失突变也显著降低了铜绿假单胞菌侵染大蜡螟幼虫后的存活率^[19]和对小鼠的毒力和侵染能力^[20], 表明 *CntRLMN* 对铜绿假单胞菌毒力的发挥也起重要作用。此外, *zur* 缺失突变导致绿脓菌素和群体感应信号分子 PQS 的产生减少^[57], 同时导致了铜绿假单胞菌致病性显著下降, 即对小鼠的致死率

显著降低 100 倍, 对线虫则显示出无毒性作用^[14], 这些结果表明锌离子摄取调控蛋白 Zur 也对铜绿假单胞菌的毒力发挥至关重要^[58]。综上所述, 有效的锌离子摄取对铜绿假单胞菌毒力发挥具有非常重要的作用。

5 锌离子摄取与宿主营养免疫

由于金属元素是病原菌生长过程所必需的营养辅助因子, 对金属营养物质的竞争不可避免地发生在宿主和病原菌之间^[18,53]。事实上, 已经有研究表明, 宿主金属稳态的失调会增加病原菌的感染率^[11]。为了防止病原菌的定殖, 宿主生物进化出了一种名为营养免疫的防御策略^[7]。这一策略包括宿主介导的对重要营养物质可及性的限制, 特别是必需的金属元素, 从而导致病原菌的生长受到抑制^[7]。病原菌的代谢和毒力作用都需要铁, 宿主蛋白质对铁的隔离作用是宿主营养免疫的一个重要分支, 例如, 通过分泌螯铁蛋白或能够结合铁载体的脂蛋白^[42]。同样, 宿主的营养免疫也被认为作用于其他金属元素, 主要是对锌离子和锰离子的隔离限制^[7]。在人类宿主中, Zn^{2+} 被感染部位中性粒细胞分泌的钙网蛋白(calprotectin, CP)^[59]、肝脏中的金属硫蛋白^[60]或皮肤上的牛皮癣蛋白^[61]等各种蛋白螯合, 耗尽了宿主体内环境中任何剩余的游离锌离子, 从而抑制了病原菌的生长。为了保证在限锌的宿主环境中正常定殖, 铜绿假单胞菌会激活高亲和力的锌离子摄取系统, 如 *ZnuABC* 系统, 与宿主细胞竞争锌离子, 从而抵御宿主的营养免疫反应^[8]。CP 是一种由中性粒细胞释放的钙激活的抗菌肽, 其功能是在体内隔离 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} ^[62]。在体外 CP 处理的条件下, *znuABC* 缺失突变株生长明显受到抑

制^[56]。研究表明在囊性纤维化病人肺部和铜绿假单胞菌引起的烧伤创面感染中, CntRLMN 的合成产物 Pseudopaline 会过度分泌^[63], 说明铜绿假单胞菌利用高亲和力的锌离子摄取系统 CntRLMN 摄取锌离子以适应体内 CP 丰富的限锌环境。综上所述, ZnuABC 和 CntRLMN 等锌离子摄取系统是铜绿假单胞菌抵御宿主营养免疫的主要参与者。

6 展望

铜绿假单胞菌在感染过程会激活宿主体内的营养免疫反应, 导致锌等必需元素被多种宿主蛋白螯合。因此, 为了保证感染成功, 铜绿假单胞菌必须适应锌缺乏的环境, 而这个过程主要由铜绿假单胞菌锌离子摄取系统所介导。通过对铜绿假单胞菌锌离子摄取系统的研究, 可以为靶向锌离子摄取系统的新型抗铜绿假单胞菌药物的开发奠定基础^[64]。特别是通过新的策略干扰锌载体的合成和转运来限制锌离子的摄取, 将成为抗铜绿假单胞菌感染的潜在新疗法。

目前对铜绿假单胞菌锌离子摄取系统的研究已取得一定的进展, 但铜绿假单胞菌锌离子摄取过程中还有许多不确定的地方。比如, 未被证实的几套潜在锌离子摄取系统是否都有功能? 它们的作用机制如何? 已知的几套锌离子摄取系统都是独立工作的, 那么它们之间是如何协调的? 有无主次之分? 另外, 所有的这些锌离子摄取系统是否都在与宿主竞争锌离子的过程中起作用? 其机制如何? 这些问题都有待于进一步的研究解决。只有对铜绿假单胞菌锌离子摄取更加深入研究, 才能为靶向锌离子摄取系统的新型抗铜绿假单胞菌药物的开发和铜绿假单胞菌感染的治疗提供更多新的思路和方法。

参考文献

- [1] Coverdale JPC, Khazaipoul S, Arya S, Stewart AJ, Blindauer CA. Crosstalk between zinc and free fatty acids in plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(4): 532–542.
- [2] Faulkner MJ, Helmann JD. Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(1): 175–189.
- [3] Pederick VG, Eijkelkamp BA, Begg SL, Ween MP, McAllister LJ, Paton JC, Mcdevitt CA. ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 13139.
- [4] Escobedo Monge MF, Barrado E, Alonso Vicente C, Redondo del Río MP, Marugán de Miguelsanz JM. Zinc nutritional status in patients with cystic fibrosis. *Nutrients*, 2019, 11(1): 150.
- [5] Ohashi W, Fukada T. Contribution of zinc and zinc transporters in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 8396878.
- [6] Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal preferences and metallation. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(41): 28095–28103.
- [7] Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(2): 218–224.
- [8] Gonzalez MR, Ducret V, Leoni S, Perron K. *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: key issues for an opportunistic pathogen. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms*, 2019, 1862(7): 722–733.
- [9] Chandrangsu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(6): 338–350.
- [10] Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 2020, 9(1): 6.
- [11] Palmer LD, Skaar EP. Transition metals and virulence in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 2016, 50: 67–91.
- [12] Luo RX, Liu MF. The mechanism of zinc uptake in Gram-negative bacteria and strategies for resisting host

- nutrition immunity. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 35(8): 831–836. (in Chinese)
- 罗睿心, 刘马峰. 革兰氏阴性菌锌摄取机制及抵抗宿主营养免疫的策略. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(8): 831–836.
- [13] Calmettes C, Ing C, Buckwalter CM, El Bakkouri M, Chieh-Lin Lai C, Pogoutse A, Gray-Owen SD, Pomès R, Moraes TF. The molecular mechanism of Zinc acquisition by the neisserial outer-membrane transporter ZnuD. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 7996.
- [14] Ellison ML, Farrow III JM, Parrish W, Danell AS, Pesci EC. The transcriptional regulator Np20 is the zinc uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75389.
- [15] Lewinson O, Lee AT, Rees DC. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(12): 4677–4682.
- [16] Dao TT, Sehgal P, Tung TT, Møller JV, Nielsen J, Palmgren M, Christensen B, Fuglsang AT. Demethoxycurcumin is a potent inhibitor of P-type ATPases from diverse kingdoms of life. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): e0163260.
- [17] Argüello JM. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P_{1B}-type ATPases. *The Journal of Membrane Biology*, 2003, 195(2): 93–108.
- [18] Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 525–537.
- [19] Lin JS, Niu YT, Wang ST, Wang GF, Tian Y, Zhang H, Zhu XF, Si QP, Cheng JL, Ai YN, Zhao WJ, Zhang XQ. Characterization of zinc ion uptake mediated by *cntRLMN* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(4): 789–804. (in Chinese)
- 林金水, 牛艳婷, 王帅涛, 王贵锋, 田野, 张恒, 朱旭飞, 司青坡, 成娟丽, 艾亚楠, 赵文静, 张向前. 铜绿假单胞菌 *cntRLMN* 操纵子介导锌离子摄取的功能鉴定. *微生物学报*, 2020, 60(4): 789–804.
- [20] Mastropasqua MC, D’Orazio M, Cerasi M, Pacello F, Gismondi A, Canini A, Canuti L, Consalvo A, Ciavardelli D, Chirullo B, Pasquali P, Battistoni A. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. *Molecular Microbiology*, 2017, 106(4): 543–561.
- [21] Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C, Liratni A, Wang SL, Richaud P, Bleves S, Ball G, Borezée-Durant E, Lobinski R, Pignol D, Arnoux P, Voulhoux R. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17132.
- [22] Ghssein G, Brutesco C, Ouerdane L, Fojcik C, Izaute A, Wang SL, Hajjar C, Lobinski R, Lemaire D, Richaud P, Voulhoux R, Espaillat A, Cava F, Pignol D, Borezée-Durant E, Arnoux P. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 2016, 352(6289): 1105–1109.
- [23] Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 546: 41–52.
- [24] Shin JH, Jung HJ, An YJ, Cho YB, Cha SS, Roe JH. Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in *Zur*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(12): 5045–5050.
- [25] Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(2): 52–56.
- [26] Smith KF, Bibb LA, Schmitt MP, Oram DM. Regulation and activity of a zinc uptake regulator, *Zur*, in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(5): 1595–1603.
- [27] Kandari D, Gopalani M, Gupta M, Joshi H, Bhatnagar S, Bhatnagar R. Identification, functional characterization, and regulon prediction of the zinc uptake regulator (*zur*) of *Bacillus anthracis* - An insight into the zinc homeostasis of the pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3314.
- [28] Ducret V, Gonzalez MR, Leoni S, Valentini M, Perron K. The CzcCBA efflux system requires the CadA P-type ATPase for timely expression upon zinc excess in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 911.
- [29] Blaby-Haas CE, Furman R, Rodionov DA, Artsimovitch I,

- de Crécy-Lagard V. Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(3): 700–715.
- [30] Zackular JP, Knippel RJ, Lopez CA, Beavers WN, Maxwell CN, Chazin WJ, Skaar EP. ZupT facilitates *Clostridioides difficile* resistance to host-mediated nutritional immunity. *mSphere*, 2020, 5(2): e00061-20.
- [31] Kallifidas D, Pascoe B, Owen GA, Strain-Damerell CM, Hong H J, Paget MSB. The zinc-responsive regulator Zur controls expression of the coelibactin gene cluster in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2): 608–611.
- [32] Gi M, Lee KM, Kim SC, Yoon JH, Yoon SS, Choi JY. A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 14644.
- [33] Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(13): 4110–4115.
- [34] Gabriel SE, Helmann JD. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(19): 6116–6122.
- [35] Min KB, Yoon SS. Transcriptome analysis reveals that the RNA polymerase-binding protein DksA1 has pleiotropic functions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(12): 3851–3864.
- [36] Gourse RL, Chen AY, Gopalkrishnan S, Sanchez-Vazquez P, Myers A, Ross W. Transcriptional responses to ppGpp and DksA. *Annual Review of Microbiology*, 2018, 72: 163–184.
- [37] Furman R, Biswas T, Danhart EM, Foster MP, Tsodikov OV, Artsimovitch I. DksA2, a zinc-independent structural analog of the transcription factor DksA. *FEBS Letters*, 2013, 587(6): 614–619.
- [38] Leach LH, Morris JC, Lewis TA. The role of the siderophore pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by *Pseudomonas putida* DSM 3601. *BioMetals*, 2007, 20(5): 717–726.
- [39] Bobrov AG, Kirillina O, Fetherston JD, Miller MC, Burlison JA, Perry RD. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(4): 759–775.
- [40] Wang TT, Si MR, Song YH, Zhu WH, Gao F, Wang Y, Zhang L, Zhang WP, Wei GH, Luo ZQ, Shen XH. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020.
- [41] Si MR, Wang Y, Zhang B, Zhao C, Kang YW, Bai HN, Wei DW, Zhu LF, Zhang L, Dong TG, Shen XH. The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. *Cell Reports*, 2017, 20(4): 949–959.
- [42] Lin JS, Zhang WP, Cheng JL, Yang X, Zhu KX, Wang Y, Wei GH, Qian PY, Luo ZQ, Shen XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [43] Han YY, Wang TT, Chen GK, Pu QQ, Liu Q, Zhang YN, Xu LH, Wu M, Liang HH. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(12): e1008198.
- [44] Wątył J, Potocki S, Rowińska-Żyrek M. Zinc homeostasis at the bacteria/host interface—from coordination chemistry to nutritional immunity. *Chemistry - A European Journal*, 2016, 22(45): 15992–16010.
- [45] Li B, Li J, Shen LX. Zinc regulation system in bacteria and its relationship with infection—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8): 1211–1221. (in Chinese)
李博, 李晶, 沈立新. 细菌锌离子调控体系与感染. *微生物学报*, 2016, 56(8): 1211–1221.
- [46] Wu HH, Symersky J, Lu M. Structure and mechanism of a redesigned multidrug transporter from the major facilitator superfamily. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3949.
- [47] Saier Jr MH, Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2001, 12(3): 205–213.
- [48] Guan L, Kaback HR. Lessons from lactose permease. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2006, 35: 67–91.

- [49] Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VLG, Xia XB, Fowler PW, Ingram JC, Carpenter EP, Sansom MSP, McPherson MJ, Baldwin SA, Iwata S. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO Journal*, 2010, 30(2): 417–426.
- [50] Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, Orange N, Dufour A, Cornelis P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(5): 698–722.
- [51] Murphy JT, Bruinsma JJ, Schneider DL, Collier S, Guthrie J, Chinwalla A, Robertson JD, Mardis ER, Kornfeld K. Histidine protects against zinc and nickel toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 2011, 7(3): e1002013.
- [52] Nairn BL, Lonergan ZR, Wang J, Braymer JJ, Zhang YF, Calcutt MW, Lisher JP, Gilston BA, Chazin WJ, De Crécy-Lagard V, Giedroc DP, Skaar EP. The response of *Acinetobacter baumannii* to zinc starvation. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(6): 826–836.
- [53] Capdevila DA, Wang JF, Giedroc DP. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(40): 20858–20868.
- [54] Lin JS, Cheng JL, Wang Y, Shen XH. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 230.
- [55] Lin JS, Cheng JL. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to biofilm development//Rathinam NK, Sani RK. Introduction to Biofilm Engineering. *American Chemical Society*, 2019: 1–16.
- [56] D’Orazio M, Mastropasqua MC, Cerasi M, Pacello F, Consalvo A, Chirullo B, Mortensen B, Skaar EP, Ciavardelli D, Pasquali P, Battistoni A. The capability of *Pseudomonas aeruginosa* to recruit zinc under conditions of limited metal availability is affected by inactivation of the ZnuABC transporter. *Metallomics*, 2015, 7(6): 1023–1035.
- [57] Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(23): 6472–6480.
- [58] Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1308–1321.
- [59] Correnti C, Strong RK. Mammalian siderophores, siderophore-binding lipocalins, and the labile iron pool. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 13524–13531.
- [60] Haase H, Rink L. Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics*, 2014, 6(7): 1175–1180.
- [61] Águeda-Pinto A, Castro LFC, Esteves PJ. The evolution of S100A7: An unusual gene expansion in *Myotis bats*. *BMC Evolutionary Biology*, 2019, 19(1): 102.
- [62] DeShazer D. A novel contact-independent T6SS that maintains redox homeostasis via Zn²⁺ and Mn²⁺ acquisition is conserved in the *Burkholderia pseudomallei* complex. *Microbiological Research*, 2019, 226: 48–54.
- [63] Bielecki P, Puchałka J, Wos-Oxley ML, Loessner H, Glik J, Kawecki M, Nowak M, Tümmler B, Weiss S, dos Santos VAPM. *In-vivo* expression profiling of *Pseudomonas aeruginosa* infections reveals niche-specific and strain-independent transcriptional programs. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e24235.
- [64] Battistoni A, Ammendola S, Chiancone E, Ilari A. A novel antimicrobial approach based on the inhibition of zinc uptake in *Salmonella enterica*. *Future Medicinal Chemistry*, 2017, 9(9): 899–910.

Zinc uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa*

Yanting Niu¹, Shuaitao Wang¹, Juanli Cheng¹, Jinshui Lin^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

² Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube (Yan'an University), Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Abstract: As a structural, catalytic, and regulatory component, zinc plays a key role in many cellular processes. It is also necessary for the growth of pathogenic microorganisms. It is not only involved in microbial pathogen metabolism and various virulence play, but also necessary for microbial pathogen infection and colonization in the host. When *Pseudomonas aeruginosa* infects the host to exert its virulence, the host will adopt the strategy of nutritional immunity to limit the concentration of free zinc ions in the internal environment and inhibit the infection and colonization of the pathogen. On the contrary, *P. aeruginosa* overcomes the host's nutritional immune defenses through its own zinc uptake systems. This review focuses on the three known zinc uptake systems (ZnuABC, HmtA and CntRLMN) and zinc uptake regulator (Zur) in *P. aeruginosa*, and further analyzes other potential zinc uptake pathways. The important roles of *P. aeruginosa* zinc uptake systems in host virulence and nutritional immune defense are also discussed. A systematic summary of the *P. aeruginosa* zinc uptake pathways is aimed at providing guidance for the development of new anti-*P. aeruginosa* drugs targeted zinc uptake systems.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, zinc uptake system, Zur, virulence factor, nutritional immunity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31700031, 31860012, 32070103), by the Scientific Research Program Funded by the Shaanxi Provincial Education Department (17JS138), by the Regional Development Talent Project of "Special Support Plan" of Shaanxi Province, by the Outstanding Young Talent Support Plan of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province and by the Startup Foundation for Doctors of Yan'an University (YDBK2016-01)

*Corresponding author. Tel: +86-911-2332030; E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 6 August 2020; Revised: 6 October 2020; Published online: 9 November 2020