

## 革兰氏阴性菌血红素载体蛋白 Hemophore 的结构及作用机制

李岭<sup>1,2,3</sup> 刘马峰<sup>1,2,3\*</sup> 程安春<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 四川农业大学 动物医学院 预防兽医研究所 四川 成都 611130)

(2. 四川农业大学 动物医学院 禽病防治中心 四川 成都 611130)

(3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130)

**摘要:** 血红素作为宿主体内最丰富的铁离子来源,是致病菌营养竞争的主要目标,尤其对于血红素自身合成途径部分丧失的细菌。革兰氏阴性菌血红素转运系统由血红素载体蛋白(Hemophore)、外膜血红素受体、TonB-ExbB-ExbD 复合物、ABC 转运体等组成。Hemophore 是存在于细菌细胞膜上或分泌到胞外环境中的一种蛋白。它能从宿主血红素结合蛋白中捕获血红素并将其传递给外膜受体。目前,在不同革兰氏阴性菌中已发现 3 种类型的 Hemophore,分别是 HasA、HxuA 和 HmuY 型。本文将详细描述这 3 种 Hemophore 捕获血红素及与外膜受体相互作用的机制,以期为进一步研究其他细菌血红素载体蛋白的功能及作用机制奠定基础。

**关键词:** 革兰氏阴性菌, 血红素, 血红素转运系统, 血红素载体蛋白, 作用机制

## Structural and functional reveal of the hemophore in Gram-negative bacteria

LI Ling<sup>1,2,3</sup> LIU Ma-Feng<sup>1,2,3\*</sup> CHENG An-Chun<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** Heme is the most abundant iron source in the host. It has been proven that heme was the main nutrient competition aim for the pathogenic bacteria, especially for the bacteria that is not able to synthesize heme. The heme acquisition system of Gram-negative bacteria is consist of hemophore, outer membrane heme receptor, TonB-ExbB-ExbD complex, periplasmic heme-binding proteins, ABC transporter and so on. Hemophore is a type of outer membrane or secreted protein that can extract heme

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31302131); 教育部博士点基金项目(新教师类) (No. 20135103120006); 中国博士后科学基金项目(No. 2014M552378)

\*通讯作者: 刘马峰: liumafengra@163.com; 程安春: chenganchun@vip.163.com

收稿日期: 2015-03-17; 接受日期: 2015-04-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-04

from host hemoprotein and pass it to the outer membrane heme receptors. Up to date, three kinds of hemophores, HasA, HxuA and HmuY, have been identified in some Gram-negative bacteria. In this paper, we described the mechanism of these three types hemophore to capture heme and the interaction with outer membrane heme receptors in detail. It will be helpful for further understanding the function of hemophore and its working mechanism.

**Keywords:** Gram-negative bacteria, Heme, Heme acquisition system, Hemophore, Working mechanism

铁离子是绝大多数生物所必需的营养元素, 因其可以作为生物体内多种氧化还原酶的辅基, 在涉及氧化还原反应或能量代谢有关的过程中起着关键作用<sup>[1]</sup>。在高等动物体内, 游离的铁离子浓度非常低且不能够满足细菌的生长需求。一部分三价铁离子被结合在乳铁蛋白、转铁蛋白等宿主铁蛋白上<sup>[2]</sup>。为此, 细菌进化出了三价铁离子转运系统, 即 Siderophore 依赖型的铁离子转运系统。致病菌代谢的中间产物 Siderophore 螯合载铁蛋白上的铁离子, 随后被外膜受体识别, 再转移到胞内供自身使用。

而在宿主体内, 大多数的铁离子(90%以上)主要以血红素的形式存在于血红素结合蛋白(Hemoprotein)中, 如血液结合素、血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素等<sup>[3]</sup>。为适应宿主的环境, 许多致病菌进化出了血红素转运系统, 通过此系统细菌可以从宿主体内摄取血红素并作为其主要的铁离子来源。目前发现的革兰氏阴性菌血红素转运系统主要包括直接的血红素转运系统和 Hemophore 介导的间接血红素转运系统。

在直接的血红素转运系统中, 外膜受体可以直接从宿主摄取游离的血红素或 Hemoprotein 中的血红素。而在 Hemophore 载体介导的血红素转运系统中, 则是由 Hemophore 从 Hemoprotein 中摄取血红素, 然后将其传递给相应的外膜血红素受体。Hemophore 的这种作用方式不但增大了利用宿主 Hemoprotein 的范围, 而且提高了血红素的利用效率。Hemophore 蛋白已经在许多革兰氏阴性菌被发现和鉴定, 由于作用机制的不同可分为不同的类型。本文将详细讨论 Hemophore 在革兰氏阴性菌血红素摄取、转运过程中的结构基础和作用机制。

## 1 革兰氏阴性菌血红素转运机制

### 1.1 直接的血红素转运系统

在直接的血红素转运系统中(图 1A), 细菌可以通过细胞表面的血红素受体直接获取游离的血红素或 Hemoprotein 中的血红素, 再由 TonB-ExbB-ExbD 复合物提供能量将血红素转运至周质。周质中的血红素被周质结合蛋白结合并传递到质膜 ABC 转运体。ABC 转运体水解 ATP 释放能量将血红素摄入胞浆。胞浆中的血红素被血红素降解酶降解并释放铁离子供细菌利用。目前在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[4]</sup>、痢疾志贺氏杆菌(*Dysentery shigella*)<sup>[5]</sup>、致病性大肠杆菌(*Escherichia coli* O157:H7)<sup>[6]</sup>、巴尔通体(*Bartonella henselae*)<sup>[7]</sup>、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)<sup>[8-9]</sup>等革兰氏阴性菌中已发现有直接的血红素摄取系统。

### 1.2 Hemophore 介导的间接血红素转运系统

Hemophore 介导的间接血红素转运系统(图 1B-D)分泌的 Hemophore 高效率地从宿主的 Hemoprotein, 如血红蛋白、血清白蛋白等, 螯合血红素或与蛋白作用使血红素游离出来, 再将血红素呈递给特异的外膜血红素受体。外膜受体在 ExbB-ExbD-TonB 复合物的协助下将血红素转运至周质, 再经周质结合蛋白和 ABC 转运体进入胞浆。最后, 在血红素降解酶的作用下, 释放铁离子供细菌利用。在流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)等菌中发现有血红素载体 Hemophore 介导的血红素转运系统<sup>[10]</sup>。综上所述, 有些细菌, 如粘质沙雷氏菌同时可编码两套血红素转运系统。

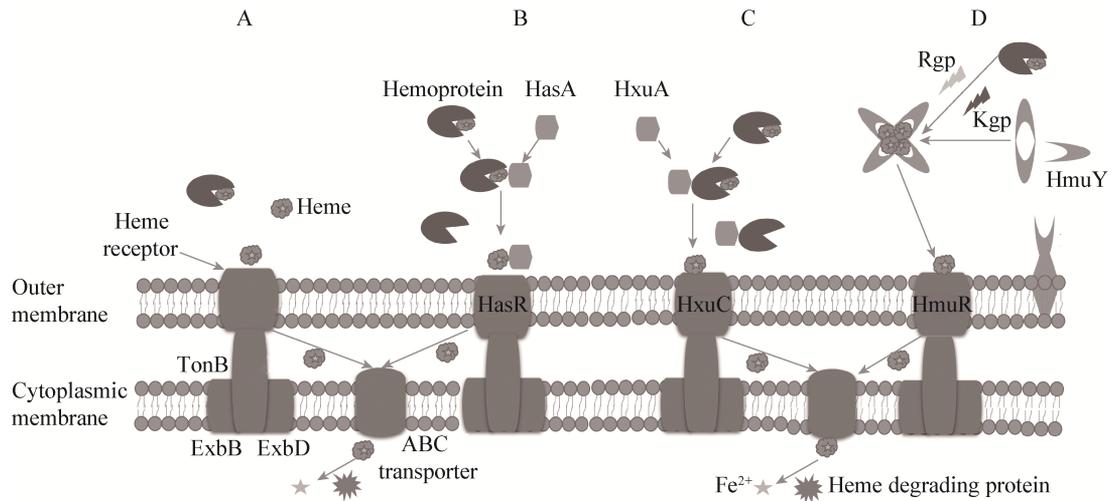


图 1 革兰氏阴性菌血红素转运系统模式图

Figure 1 Schematic diagram of heme acquisition system in Gram-negative bacteria

注: A: 直接的血红素转运模式; B: HasA 型 Hemophore 介导的血红素转运模式; C: HxuA 型 Hemophore 介导的血红素转运模式; D: HmuY 型 Hemophore 介导的血红素转运模式。

Note: A: Direct heme acquisition; B: HasA hemophore-mediated heme acquisition; C: HuxA hemophore-mediated heme acquisition; D: HmuY hemophore-mediated heme acquisition.

## 2 血红素载体 Hemophore

血红素载体 Hemophore 是革兰氏阴性菌分泌到胞外或锚定于外膜,能够与血红素或 Hemoprotein 中的血红素结合,或使血红素从 Hemoprotein 中游离出来,高效率地将血红素呈递给细胞外膜受体的蛋白。外膜血红素受体经血红素载体 Hemophore 介导而结合血红素的效率远远超过直接与血红素或 Hemoprotein 结合的效率。因此血红素载体 Hemophore 介导的血红素转运系统是细菌更重要、更主要的血红素转运系统。目前已发现的 Hemophore 有 3 种,分别为 HasA 型、HxuA 型、HmuY 型。HasA 型 Hemophore 能直接结合 Hemoprotein 中的血红素,并将其呈递给特异的外膜血红素受体; HxuA 型则直接与 Hemoprotein (如血色素结合蛋白 Hemopexin)结合并促使血红素从 Hemoprotein 中游离出来,更高效地被外膜血红素受体识别; HmuY 型是一类既可以锚定在细胞膜,又可以分泌到细胞外的脂蛋白。它需要在某些蛋白酶的参与下摄取 Hemoprotein 中的血红素,将其呈

递给相应的外膜受体。下面将对这 3 种不同类型的 Hemophore 做详细介绍。

### 2.1 HasA 型 Hemophore

粘质沙雷氏菌的 HasA 是第一种被发现的 Hemophore 蛋白。该分泌蛋白能与游离血红素或血红蛋白中的血红素结合(图 1B)。HasA 与外膜蛋白 HasR 在血红素利用过程中相互协同, HasA 起着血红素载体作用并使 HasR 利用血红素的效率提高 100 倍<sup>[11]</sup>。基于它与三价铁离子转运系统中位于细胞外的 Sideophore 功能相似性,于是将其命名为 Hemophore。随后在荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)<sup>[12]</sup>、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)<sup>[13-14]</sup>、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[15-16]</sup>也相继鉴定出有 HasA 型 Hemophore。通过序列对比和分析,我们还可以发现 HasA 的同源蛋白也存在于果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)、粪黄假单胞菌(*Pseudomonas synxantha*)、食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)等革兰氏阴性菌。是否这些同源蛋白与粘质沙雷氏菌 HasA 具有相同的功能和作用方式需进一步验证。

**2.1.1 HasA 型 Hemophore 的结构特点:** 沙雷氏菌的 HasA<sub>sm</sub> 含有 187 个氨基酸, 其分子量为 19 kD。结合了血红素的 HasA<sub>sm</sub> (Holo-HasA) 是一个球状分子(图 2A), 它具有两个相对的立体面, 一面由 4 个  $\alpha$  螺旋组成, 另一面则由 7 个  $\beta$  折叠形成; 血红素被绑定在  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠两者接合处的两个环之间。两个环中的组氨酸(His-32)和酪氨酸(Tyr-75)残基相互配合参与血红素的绑定<sup>[17]</sup>, 其中酪氨酸残基(Tyr-75)本身与血红素结合不牢固, 它需要与组氨酸残基(His-83)形成氢键后才能绑定好血红素。可见组氨酸(His-83)同样影响着血红素的转运过程<sup>[18]</sup>。没有结合血红素的 HasA (Apo-HasA), 它拥有与 Holo-HasA 相同的折叠(图 2B), 只是组氨酸残基(His-32)所在的环与酪氨酸残基(Tyr-75)所在的环相隔比较远<sup>[19]</sup>。综上所述, His-32、Tyr-75、His-83 这 3 个氨基酸残基在血红素的结合与释放过程的作用非常关键。

**2.1.2 HasA 型 Hemophore 作用机制:** HasA 单体与血红素分子以 1:1 的化学计量结合<sup>[21-22]</sup>, HasA 能从血红蛋白、豆血红蛋白和肌红蛋白处获取血红素。研究表明 HasA 摄取血红素的过程中 HasA 不与 Hemoprotein 形成复合物。HasA 对血红素的亲和力  $K_d$  值约为  $10^{-10}$  mol/L, 远高于宿主 Hemoprotein。因此该过程不需要蛋白与蛋白的相互作用, 而直接是 HasA 高亲和力地摄取宿主结合蛋白中的血红素, 同时不需要消耗能量<sup>[23]</sup>。当外界环境存在血红

素时, 血红素迅速与 HasA 的 Tyr-75 残基结合, 随后 Tyr-75 残基所在的环在 His-83 残基协调下缓慢关闭<sup>[24]</sup>。His-83 残基所在的环枢纽区为血红素结合到 His-32 残基传递信号。在鼠疫耶尔森菌中, 血红素的结合只涉及 Tyr-75 残基所在的环, 这与沙雷氏菌有所不同<sup>[13]</sup>。

HasA 与血红素的亲和力  $K_d$  值约为  $10^{-10}$  mol/L, 而外膜血红素受体 HasR 与血红素的亲和力  $K_d$  值约为  $10^{-6}$  mol/L。HasA 与血红素的亲和力远高于与它对应的外膜血红素受体 HasR。血红素不能通过亲和力从 HasA 转移到外膜受体。Izadi-Pruneyre 等<sup>[25]</sup>发现血红素从高亲和力的 HasA 上转移到低亲和力的 HasR 上这个过程不需要能量, 其驱动力仅仅是蛋白与蛋白之间的相互作用。Krieg 等<sup>[26]</sup>通过晶体结构的研究发现结合了血红素的 Holo-HasA 与 HasR 结合后, 两者相互作用形成一个有利于血红素转移的空间。血红素从 HasA 转移到 HasR 上, 被 HasR 上的 His-189、His-603 残基固定。此后在 TonB 提供能量的情况下血红素内化进入胞周质腔, 最后进入细胞内<sup>[27]</sup>。从整个呈递过程来看, HasA 型 Hemophore 要完成血红素的转运, 需要定向结合到细菌外膜受体, 换言之, HasA 型 Hemophore 具有靶向作用。基于这种特征, 已有学者提出以细菌的 Hemophore 为载体, 将药物靶向导入细菌体内从而杀灭细菌的观点, 而相关的研究文章尚未见报道。

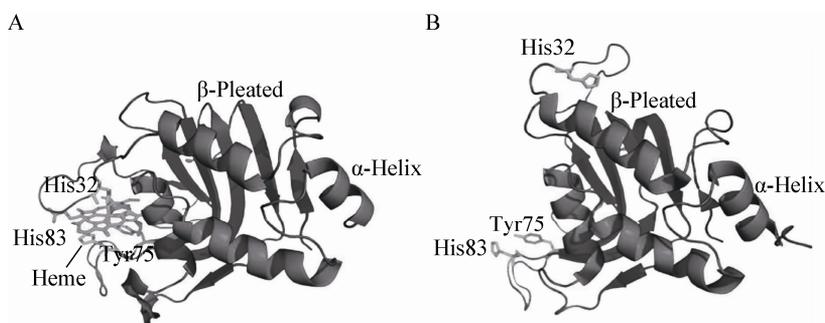


图 2 粘质沙雷氏菌 HasA 晶体结构示意图<sup>[20]</sup>

Figure 2 Crystal structure of HasA in *S. marcescens*<sup>[20]</sup>

注: A: 结合了血红素的 HasA; B: 单体 HasA, His-32、Tyr-75、His-83 残基参与 HasA 对血红素的绑定。

Note: A: Holo-HasA; B: Apo-HasA, His-32, Tyr-75, His-83 are involved in heme binding.

## 2.2 HxuA 型 Hemophore

除 HasA 型 Hemophore 外, 第 2 种被发现的 Hemophore 为流感嗜血杆菌的 HxuA。与 HasA 蛋白不同的是, 该蛋白分子量为 100 kD, 远大于 HasA。HxuA 不能直接与血红素结合, 只能结合 Hemopexin 蛋白, 间接促进 Heme 释放(图 1C)。序列分析发现流感嗜血杆菌 b 型 *hxuA* 基因上游存在 *hxuB* 和 *hxuC* 基因。其中 HxuC 蛋白与其他细菌血红素转运系统中的外膜血红素受体类似, 而 HxuB 蛋白与粘质沙雷氏菌中辅助蛋白分泌的蛋白类似。综上 HxuA 是一种少部分存在于细胞表面, 大部分分泌到胞外的能与血红素结合蛋白结合促使细菌利用血红素的蛋白。其蛋白的三维结构尚未解决。HxuA 型 Hemophore 目前仅发现于流感嗜血杆菌属。

为了研究 HxuA 是如何获取 Hemopexin 中的血红素的, Fournier 等<sup>[28]</sup>将纯化的 HxuA 分别与含有血红素的 Hemopexin 和不含血红素的 Hemopexin 在体外孵育。他们发现 HxuA 与以上两种蛋白都能以 1:1 的分子比结合形成复合物。而当 HxuA 与血红素孵育后没有特异性的光吸收峰形成, 表明 HxuA 不能与游离的血红素结合。将 HxuA、含有血红素的 Hemopexin、以及 HxuA-hemopexin 复合物进行非变性凝胶电泳, 利用血红素的过氧化物酶的特性检测血红素, 发现 HxuA、HxuA-hemopexin 泳道中没有检测到血红素的存在。这表明 HxuA 与 Hemopexin 紧密结合后, 蛋白与蛋白之间发生相互作用, 从而使血红素得以释放, 以增加外膜受体 HxuC 捕获血红素的几率。

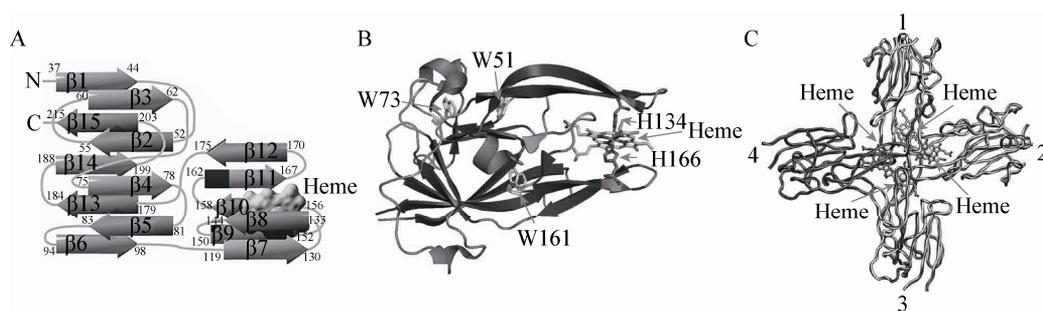
HxuA 的整个作用过程与 HasA 既有共同点, 又有一定的区别。HasA 与 HxuA 均可以被分泌到细菌胞外。不同的是, HxuA 是一种大分子的分泌蛋白(100 kD), 而 HasA 是一种小分子分泌蛋白(19 kD); 且 HxuA 不与血红素结合, 而是与血红素结合蛋白 Hemopexin 表现出非常高的亲和力。HxuA 的发现扩大了 Hemophore 的种类与范围。HxuA 蛋

白具体是如何与血红素结合蛋白 Hemopexin 相互作用目前还不得而知, 有待更进一步研究。

## 2.3 HmuY 型 Hemophore

类似的, Olczak 等<sup>[29]</sup>在牙龈卟啉单胞菌中发现编码外膜血红素受体 HmuR 蛋白的 *hmuR* 基因的操纵子上有一个 *hmuY* 基因。此基因表达的蛋白 HmuY 可以与血红素结合且以锚定在细胞膜和分泌的 2 种形式存在(图 1D)<sup>[30]</sup>。最终被鉴定为不同于 HasA 和 HuxA 的一种新型的 Hemophore 蛋白。HmuY 同源蛋白主要还存在于脆弱拟杆菌属<sup>[31]</sup>, 黄杆菌属的鸭疫里默氏杆菌。在鸭疫里默氏杆菌中, 我们发现 HmuY 蛋白既锚定在细胞膜上, 又分泌到胞外; 并且 HmuY 的表达受铁离子调控, 在低铁环境下表达量更高, 这一结果在蛋白水平与转录水平上相互印证(结果未发表)。

**2.3.1 HmuY 型 Hemophore 的结构及功能特点:** Wojtowicz 等探索了 HmuY 的结构特点, 并验证了其稳定的结构是它作为血红素载体的基础<sup>[32]</sup>。单体 HmuY 是一个分子量为 23 kD 的稳定脂蛋白。它由 15 个  $\beta$  折叠组成, 就好比人的右手, 当遇到血红素, 其拇指与其他手指形成绑定血红素的空间(图 3A), 这个空间由 37 个氨基酸残基构成, 包括 27 个疏水性残基或者中性残基和 8 个带电荷的残基, 血红素像楔子般插入到这个空间, 其中组氨酸残基 His-134、His-166 是血红素结合位点<sup>[31]</sup>, 如图 3B 所示。已报道它的稳定结构与序列保守的 51、73、161 位色氨酸残基(Trp-51、Trp-73、Trp-161)有关<sup>[33]</sup>。在血红素限制环境下以二聚体形式存在, 当环境中存在血红素时, HmuY 摄取血红素, 随后形成四聚物 Holo-HmuY<sup>[34]</sup>, 如图 3C 所示。每个 HmuY 单体都含有血红素结合位点, 可见四聚体能与 4 个血红素结合, HmuY 的这种特征使得它能够储存血红素。鸭疫里默氏杆菌 HmuY 蛋白在体外表达有单体也有二聚体, 它们都能与血红素结合(结果未发表)。在体内它是否也有二聚体、四聚体还需进一步研究。

图3 牙龈卟啉单胞菌 HmuY 晶体结构示意图<sup>[32-33]</sup>Figure 3 Crystal structure of HmuY in *Porphyromonas gingivalis*<sup>[32-33]</sup>

注: A、B: 结合了血红素的单体 Holo-HmuY 晶体结构; C: 四聚体 Holo-HmuY 晶体结构。

Note: A and B: Holo-HmuY in monomer; C: Holo-HmuY in tetramer.

**2.3.2 HmuY 型 Hemophore 作用机制:** 与 HasA 不同的是, HmuY 与血红素的亲和力  $K_d$  值约为  $10^{-6}$  mol/L, 血红素结合蛋白如血红蛋白与血红素的亲和力  $K_d$  值约为  $10^{-12}$  mol/L, HmuY 结合血红素的能力低于宿主的血红素结合蛋白, 血红素不能被动地从宿主的血红素结合蛋白转移到 HmuY<sup>[32]</sup>。细菌为了得到血红素分泌牙龈蛋白酶 R (Rgp)、牙龈蛋白酶 K (Kgp) 与血红蛋白发生作用(图 1D), 从而有利于血红素的利用<sup>[35-36]</sup>。Smallley 等在体外实验中发现 HmuY 与蛋白酶 Rgp、Kgp 相互协作完成血红素的摄取<sup>[37]</sup>。血红蛋白在蛋白酶 Rgp、Kgp 的作用下被氧化成高铁血红蛋白, 此时血红蛋白结构发生改变, 与血红素的亲和力降低, 随后 HmuY 蛋白可以从高铁血红蛋白捕获血红素, HmuY 结合血红素后形成四聚体。4 个血红素被埋藏在 4 个单体聚集的中央, 血红素结合位点很难使宿主的血红素结合蛋白(如: 血凝乳酶、血清白蛋白)接触到, 因此四聚体 HmuY 能为细菌囤积血红素。随后 HmuY 将血红素呈递给外膜受体 HmuR。鸭疫里默氏杆菌的 HmuY 摄取血红素过程是否也需要蛋白酶的辅助需要进一步研究。

HmuY 将血红素转运至外膜受体会遇到两个障碍, 首先外膜受体与血红素的亲和力远低于 HmuY<sup>[38-39]</sup>, 再者血红素与 HmuY 结合得很牢固, 外膜受体很难接触到 HmuY 四聚体中的血红素结

合位点。为了克服这些障碍, 这个过程可能是四聚体 HmuY 与外膜受体接触, 在蛋白与蛋白的相互作用下, HmuY 四聚物破裂从而血红素暴露出来<sup>[32]</sup>。该过程与 HasA 型 Hemophore 转运血红素至外膜受体 HasR 的过程相似, 转运起始, 可能涉及到两个组氨酸残基所在环中的一个环的破裂<sup>[26]</sup>, 伴随着  $Fe^{3+}$  转变成  $Fe^{2+}$ 。一旦血红素被外膜受体 HmuR 捕获, 血红素就可以通过外膜进入胞周质。但相关机制还处于推测阶段, 有待于进一步验证。

### 3 展望

从以上讨论可以看出, 不同来源的 Hemophore 从血红素结合蛋白捕获血红素的方式各不相同。Hemophore 分泌到胞外, 结合了血红素后很难返回到细菌外膜血红素受体附近, 对于 Hemophore 返回细胞膜的机制, 目前我们推测可能与细菌的群集效应有关。群集的细菌分泌大量的 Hemophore 于胞外, 在外膜血红素受体附近自然有很多结合了血红素的 Hemophore。Hemophore 从宿主血红素结合蛋白摄取血红素更加详细的机制仍然还需要进一步研究。比如当环境血红素浓度为多少时, 细菌能启动 Hemophore 摄取模式, 又是通过何种方式启动的? 另外, 鸭疫里默氏杆菌除了有 HmuY 型, 我们还发现了一种胞外血红素载体蛋白, 它们之间是如何协调作用的? 是否其他细菌也会同时存在 2 种不

同的 Hemophore? 或者有第 4 种 Hemophore 蛋白的存在? 这些都需要在以后的研究中逐步去探索。

## 参 考 文 献

- [1] Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008, 474(2): 238-251
- [2] Contreras H, Chim N, Credali A, et al. Heme uptake in bacterial pathogens[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 19: 34-41
- [3] Tong Y, Guo M. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 481(1): 1-15
- [4] Lansky IB, Lukat-Rodgers GS, Block D, et al. The cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) from the heme uptake system of *Pseudomonas aeruginosa* is an intracellular heme-trafficking protein to the delta-regioselective heme oxygenase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(19): 13652-13662
- [5] Cobessi D, Meksem A, Brillet K. Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism[J]. Proteins, 2010, 78(2): 286-294
- [6] Suits MD, Lang J, Pal GP, et al. Structure and heme binding properties of *Escherichia coli* O157:H7 ChuX[J]. Protein Science: The Protein Society, 2009, 18(4): 825-838
- [7] Liu M, Ferrandez Y, Bouhsira E, et al. Heme binding proteins of *Bartonella henselae* are required when undergoing oxidative stress during cell and flea invasion[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e48408
- [8] Wyckoff EE, Mey AR, Payne SM. Iron acquisition in *Vibrio cholerae*[J]. Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 2007, 20(3/4): 405-416
- [9] Mey AR, Payne SM. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(3): 835-849
- [10] Cheng XJ, Liu MF, Cheng AC. Structural and functional properties of the heme acquisition system in Gram-negative bacteria[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 9(30): 846-854 (in Chinese)  
程兴军, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌血红素转运系统结构及功能特点[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 9(30): 846-854
- [11] Ghigo JM, Letoffe S, Wandersman C. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(11): 3572-3579
- [12] Letoffe S, Omori K, Wandersman C. Functional characterization of the HasA(PF) hemophore and its truncated and chimeric variants: determination of a region involved in binding to the hemophore receptor[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(16): 4401-4405
- [13] Kumar R, Lovell S, Matsumura H, et al. The hemophore HasA from *Yersinia pestis* (HasA<sub>yp</sub>) coordinates heme with a single residue, Tyr75, and with minimal conformational change[J]. Biochemistry, 2013, 52(16): 2705-2707
- [14] Rossi MS, Fetherston JD, Letoffe S, et al. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(11): 6707-6717
- [15] Kumar R, Matsumura H, Lovell S, et al. Replacing the axial ligand tyrosine 75 or its hydrogen bond partner histidine 83 minimally affects heme acquisition by the hemophore HasA<sub>yp</sub> from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochemistry, 2014, 53(13): 2112-2125
- [16] Letoffe S, Redeker V, Wandersman C. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA hemophore[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(6): 1223-1234
- [17] Caillet-Saguy C, Piccioli M, Turano P, et al. Role of the iron axial ligands of heme carrier HasA in heme uptake and release[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(32): 26932-26943
- [18] Caillet-Saguy C, Turano P, Piccioli M, et al. Deciphering the structural role of histidine 83 for heme binding in hemophore HasA[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(9): 5960-5970
- [19] Wolff N, Izadi-Pruneyre N, Couprie J, et al. Comparative analysis of structural and dynamic properties of the loaded and unloaded hemophore HasA: functional implications[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 376(2): 517-525
- [20] Wandersman C, Delepleaire P. Hemophore functions revisited[J]. Molecular Microbiology, 2012, 85(4): 618-631
- [21] Deniau C, Gilli R, Izadi-Pruneyre N, et al. Thermodynamics of heme binding to the HasA(SM) hemophore: effect of mutations at three key residues for heme uptake[J]. Biochemistry, 2003, 42(36): 10627-10633
- [22] Izadi N, Henry Y, Haladjian J, et al. Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition[J]. Biochemistry, 1997, 36(23): 7050-7057
- [23] Cescau S, Cwerman H, Letoffe S, et al. Heme acquisition by hemophores[J]. Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 2007, 20(3/4): 603-613
- [24] Yukl ET, Jekporir G, Alontaga AY, et al. Kinetic and spectroscopic studies of heme acquisition in the hemophore HasA<sub>yp</sub> from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochemistry, 2010, 49(31): 6646-6654
- [25] Izadi-Pruneyre N, Huche F, Lukat-Rodgers GS, et al. The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(35): 25541-25550

- [26] Krieg S, Huche F, Diederichs K, et al. Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(4): 1045-1050
- [27] Letoffe S, Delepelaire P, Wandersman C. Free and hemophore-bound heme acquisitions through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(13): 4067-4074
- [28] Fournier C, Smith A, Delepelaire P. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(1): 133-148
- [29] Olczak T, Siudeja K, Olczak M. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 49(2): 299-306
- [30] Olczak T, Wojtowicz H, Ciuraszkiewicz J, et al. Species specificity, surface exposure, protein expression, immunogenicity, and participation in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* HmuY[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 134
- [31] Wojtowicz H, Wojaczynski J, Olczak M, et al. Heme environment in HmuY, the heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 383(2): 178-182
- [32] Wojtowicz H, Guevara T, Tallant C, et al. Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(5): e1000419
- [33] Bielecki M, Wójtowicz H, Olczak T. Differential roles of tryptophan residues in conformational stability of *Porphyromonas gingivalis* HmuY hemophore[J]. BMC Biochemistry, 2014, 15: 2
- [34] Olczak T, Sroka A, Potempa J, et al. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and HmuR: further characterization of a novel mechanism of heme utilization[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189(3): 197-210
- [35] Smalley JW, Birss AJ, Szmigielski B, et al. Sequential action of R- and K-specific gingipains of *Porphyromonas gingivalis* in the generation of the haem-containing pigment from oxyhaemoglobin[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 465(1): 44-49
- [36] Liu X, Sroka A, Potempa J, et al. Coordinate expression of the *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain proteinase, Kgp, arginine-specific gingipain proteinase, RgpA, and the heme/hemoglobin receptor, HmuR[J]. Biological Chemistry, 2004, 385(11): 1049-1057
- [37] Smalley JW, Byrne DP, Birss AJ, et al. HmuY hemophore and gingipain proteases constitute a unique syntrophic system of haem acquisition by *Porphyromonas gingivalis*[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17182
- [38] Olczak T, Dixon DW, Genco CA. Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5599-5608
- [39] Liu X, Olczak T, Guo HC, et al. Identification of amino acid residues involved in heme binding and hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1222-1232