

Urszula Jankiewicz

Katedra Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka piowerdyn. 3. Transport ferripiowerdyny do komórki bakterii. 4. Biosynteza piowerdyny i jej regulacja. 4.1. Geny odpowiedzialne za syntezę piowerdyny. 4.2. Regulacja biosyntezy składników aktywnego transportu żelaza. 5. Inne funkcje i potencjalne zastosowanie piowerdyn. 5.1. Znaczenie i zastosowanie piowerdyn bakterii glebowych. 5.2. Znaczenie i zastosowanie piowerdyn w medycynie. 6. Podsumowanie

#### Characteristics and significance of pyoverdines of the genus *Pseudomonas*

**Abstract:** Pyoverdines of *Pseudomonas* bacteria have been intensely studied over the past few years. This is connected with the significant role siderophores have in physiological processes and in the achieving of an ecological niche by *Pseudomonas* bacteria as well as with the practical uses people have found for them. Several dozen pyoverdines with different peptide chain structures have been characterised. Besides pyoverdine, a whole range of proteins are involved in obtaining iron; they create an entire system with a high iron affinity. Studies into the characteristics and regulation of the gene coding of individual elements of this system are being carried out. An insufficiently studied phenomenon is the secretion of pyoverdines by bacteria living in environments poor in iron, whereas our understanding is increasing in the specific recognition and transport of iron-bound pyoverdine (ferripyoverdine) into bacteria cells.

1. Introduction. 2. Characteristics of pyoverdines. 3. Transport of ferripyoverdine into the bacterial cell. 4. Biosynthesis of pyoverdine and its regulation. 4.1. Genes responsible for pyoverdine synthesis. 4.2. Regulation of the biosynthesis of the components of the active transport of iron. 5. Functions and potential use. 5.1. The significance of pyoverdines of the soil-borne strains of *Pseudomonas*. 5.2. The significance of pyoverdines in medicine. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** niedobór żelaza, piowerdyna, siderofor  
**Key words:** iron limitation, pyoverdine, siderophore

## 1. Wstęp

Piowerdyny są charakterystyczną dla fluoryzujących gatunków bakterii *Pseudomonas*, rodziną związków chemicznych zaliczanych do sideroforów. Z definicji sideroforów wynika, że należą do niskocząsteczkowych związków o charakterze niebiałkowym i nieporfirynowym, wiążących z dużą specyficznością jony żelazowe (III). Są one wytwarzane przez grzyby i bakterie w warunkach niedoboru żelaza. Główną funkcją sideroforów jest pozyskiwanie żelaza z jego trudno dostępnych związków kompleksowych, przeprowadzanie go w formę rozpuszczalną i udział w jego transporcie do komórek drobnoustrojów [73, 74]. Żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do życia, choć wymaganym przez komórki drobnoustrojów w niewielkich ilościach. Do namnażania się drobnoustrojów wystarczająca jest obecność żelaza o stężeniu wewnątrzkomórkowym  $1,8 \times 10^{-6}$  M. Pomimo, tego drobnoustroje tlenowe zwykle borykają się z niedoborem tego pierwiastka. Stężenie dostępnego żelaza w glebie jest ponad tysiąc razy niższe i wynosi zwykle od  $1,0 \times 10^{-9}$  do  $10^{-18}$  [78]. Podobnie jest w przypadku mikroorganizmów patogennych, dla których

zbyt niskie stężenie dostępnej formy żelaza w płynach ustrojowych i w tkankach człowieka ogranicza możliwość zakażenia [87].

Jony żelaza mogą być pobierane przez komórki mikroorganizmów w dwojaki sposób, w zależności od dostępności tego pierwiastka w środowisku. Jeżeli w środowisku bytowania mikroorganizmów stężenie żelaza jest wystarczająco duże wówczas pobieranie tego pierwiastka zachodzi na drodze swobodnej dyfuzji poprzez błony komórkowe z wykorzystaniem niespecyficznego systemu niskiego powinowactwa. Natomiast system wysokiego powinowactwa złożony z ligandu żelaza – sideroforu oraz szeregu charakterystycznych białek jest uruchamiany dopiero w warunkach niedoboru żelaza [2, 19].

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* syntetyzują kilka typów sideroforów, które ze względu na rodzaj ugrupowań wiążących żelazo zaliczono do klasy mieszanej. W tego typu cząsteczkach za wiązanie Fe (III) odpowiadają ugrupowania hydroksamowe i katecholowe [3]. Za główny siderofor fluoryzujących szczepów *Pseudomonas* uważa się piowerdynę, ponieważ występuje u tych bakterii najpowszechniej i ma szczególnie wysokie powinowactwo do jonów Fe (III).

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; tel.: (22) 59 325 58; fax: (22) 39 325 62

W warunkach deficytu żelaza komórki *Pseudomonas* mogą wytwarzać także piochelinę i pseudomoninę, pochodne kwasu salicylowego. Piochelina jest dobrze scharakteryzowanym sideroforem, produkowanym przez liczne bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, w tym *P. aeruginosa*, a także przez *Burkholderia cepacia* [14]. Niedawno opisana pseudomonina jest produkowana tylko przez nieliczne szczepy w tym *P. fluorescens* WCS374 [56].

U bakterii tego rodzaju wykryto także kwas 2,6-pirydynoditiokarboksylowy zidentyfikowany początkowo jako aktywny czynnik odpowiedzialny za zewnątrzkomórkowy rozkład tetrachloru węgla do dwutlenku węgla u *P. stutzeri* [27]. Obecnie jednak wiadomo, że związek ten jest odpowiedzialny za wiązanie i transport żelaza [52]. Innym mniej znanym sideroforem jest chinolobaktyna, produkowana przez *P. fluorescens*. Interesujące jest, że związek ten jest wytwarzany przez pierwsze 16 godzin od wystąpienia niedoboru żelaza, po tym czasie jego synteza ulega represji pod wpływem rosnącego stężenia piowerdyny [72]. Ponadto znana jest korrugatyna, typowy dla *P. corrugata* siderofor [86] i nokardamina produkowana przez *P. stutzeri* [60].

## 2. Charakterystyka piowerdyn (pseudobaktyn)

Piowerdyna to typowa dla fluoryzujących gatunków bakterii *Pseudomonas* grupa sideroforów wykazujących fluorescencję w świetle ultrafioletowym. Szczepy bakterii produkujące ten siderofor wchodzi w skład wyodrębnionej w obrębie rodzaju *Pseudomonas* grupy „*Pseudomonas sensu stricto*” (RNA homology group I) skupiającej ok. 100 fluoryzujących i niefluoryzujących gatunków bakterii [15, 77]. Obecność piowerdyny nadaje hodowłom bakterii charakterystyczne, zielono-żółte zabarwienie. Jako pigment piowerdyna została opisana już w 1892 roku przez Gesarta [32], jednak jej funkcja w pobieraniu żelaza została udowodniona przez Meyera i Abdalla [59] kilkadziesiąt lat później. Poszczególne szczepy bakterii zwykle syntetyzują jedną formę piowerdyny, choć u niektórych występuje kilka izoform tego sideroforu [62].

Cząsteczki piowerdyny wiążą jony Fe(III) w stosunku stechiometrycznym 1:1, utworzone kompleksy mają stałą stabilności kompleksu najprawdopodobniej najwyższą spośród wszystkich scharakteryzowanych dotychczas sideroforów, wynoszącą  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  [30]. Jak wynika z najnowszych badań mogą także tworzyć rozpoznawalne przez receptory błony zewnętrznej (OM) kompleksy z Alu, Gal, V oraz Cu [23]. Masy cząsteczkowe tej grupy sideroforów są zróżnicowane i jak podają Meyer i wsp. [63] wahają się od 889 do 1764 Da.

W każdej cząsteczce piowerdyny można wyróżnić trzy charakterystyczne części:

- 1) chromofor, pochodna kwasu dihydroksychinolinowego,
- 2) łańcuch boczny, zwykle kwas dikarboksylowy lub jego amid,
- 3) łańcuch peptydowy o zmiennej sekwencji aminokwasów.

Chromofor, kwas (1S)-5amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroksy-1H-pyrimido-[1,2-a] chinolino-1-karboksylowy ma silnie zakonserwowaną strukturę u wszystkich opisanych dotychczas cząsteczek piowerdyn. Odpowiada on za fluorescencję nieskompleksowanej z żelazem cząsteczki piowerdyny oraz za jej charakterystyczne zabarwienie [30, 109]. Pochodząca od chromoforu grupa katecholowa jest jedną z grup wiążących żelazo. Grupa aminowa chromoforu wiąże się poprzez grupę  $\text{NH}_2$  z kolejnym elementem cząsteczki piowerdyny, z łańcuchem bocznym. Acylowy łańcuch boczny jest resztą kwasu karboksylowego lub jego amidu. Często funkcję łańcucha bocznego w cząsteczce piowerdyn spełniają kwas bursztynowy lub jabłkowy ewentualnie ich amidy. Spotykane w tej roli są także kwas glutaminowy lub 2-ketoglutaryny [54].

Sekwencja aminokwasów w łańcuchu peptydowym determinuje różnice w budowie poszczególnych cząsteczek piowerdyn. Peptyd ma zwykle od 6 do 12 reszt aminokwasowych w formie L- lub D-izomerów, niektóre z nich są zmodyfikowane poprzez m.in. hydroksylację, formylację lub cyklizację. Obecność zmodyfikowanych aminokwasów jest istotna dla wytworzenia ugrupowań wiążących żelazo, a obecność dużej liczby reszt D-aminokwasów zapobiega degradacji wiązań peptydowych przez enzymy proteolityczne [14]. Peptyd piowerdyny poprzez N-koniec łączy się z atomem węgla grupy karboksylowej chromoforu.

F u c h s i wsp. [30] przyjmując jako kryterium budowę peptydu zaproponowali podział dotychczas poznanych piowerdyn na 4 grupy:

1. Najbardziej liczna grupa piowerdyn z linearnym łańcuchem peptydowym, gdzie jako C-końcowym aminokwas występuje cyklo-N-hydroksy-Orn.
2. Druga pod względem wielkości grupa piowerdyn, charakteryzująca się występowaniem cyklicznego układu na C-końcu uformowanego przez wiązanie amidowe pomiędzy grupą karboksylową i grupą ε-aminową Lys, zawierającego od trzech do czterech aminokwasów.
3. Mało liczna grupa piowerdyn, u których zaobserwowano na C-końcu łańcucha strukturę cyklo-depsydu uformowaną przez wytworzenie wiązania estrowego pomiędzy karboksylową grupą aminokwasu C-końcowego a grupą OH-Ser lub Thr.
4. Skupia zaledwie kilka form piowerdyny z wolnym C-końcem łańcucha. Przypuszcza się, że mogły one powstać w wyniku hydrolizy lub innych przekształceń chemicznych piowerdyn z grupy trzeciej.

Łańcuch peptydowy zapewnia dwa miejsca wiążące oraz spełnia inną, bardzo istotną funkcję, tj. odpowiada za specyficzne rozpoznanie ferripiowerdyny lub „wolnej” piowerdyny na powierzchni komórki przez receptory błony zewnętrznej (OM). Dotąd uważano, że specyficzna sekwencja aminokwasowa łańcucha peptydowego warunkuje pobieranie skompleksowanego z piowerdyną żelaza tylko przez szczep będący producentem tej piowerdyny [14, 35]. Wyniki nowszych badań uszczególniły te dane pozwalając na stwierdzenie, że w specyficznym rozpoznaniu przez receptor piowerdyny odpowiada sekwencja utworzona przez trójkę lub czwórkę aminokwasów. Wiadomo także, że te kilka reszt aminokwasów musi zajmować odpowiednią pozycję w łańcuchu peptydowym piowerdyny [54, 62,]. W ten sposób można wytłumaczyć pobieranie piowerdyny kompleksującej żelazo przez szczepy bakterii niebędące jej producentami, np. *P. aeruginosa* ATCC 15692 rozpoznaje piowerdynę *P. fluorescens* ATCC 13525. Ciekawym przypadkiem jest krzyżowe pobieranie piowerdyn przez *P. fluorescens* ATCC 13525 i *P. chlororaphis* ATCC 9446 [40].

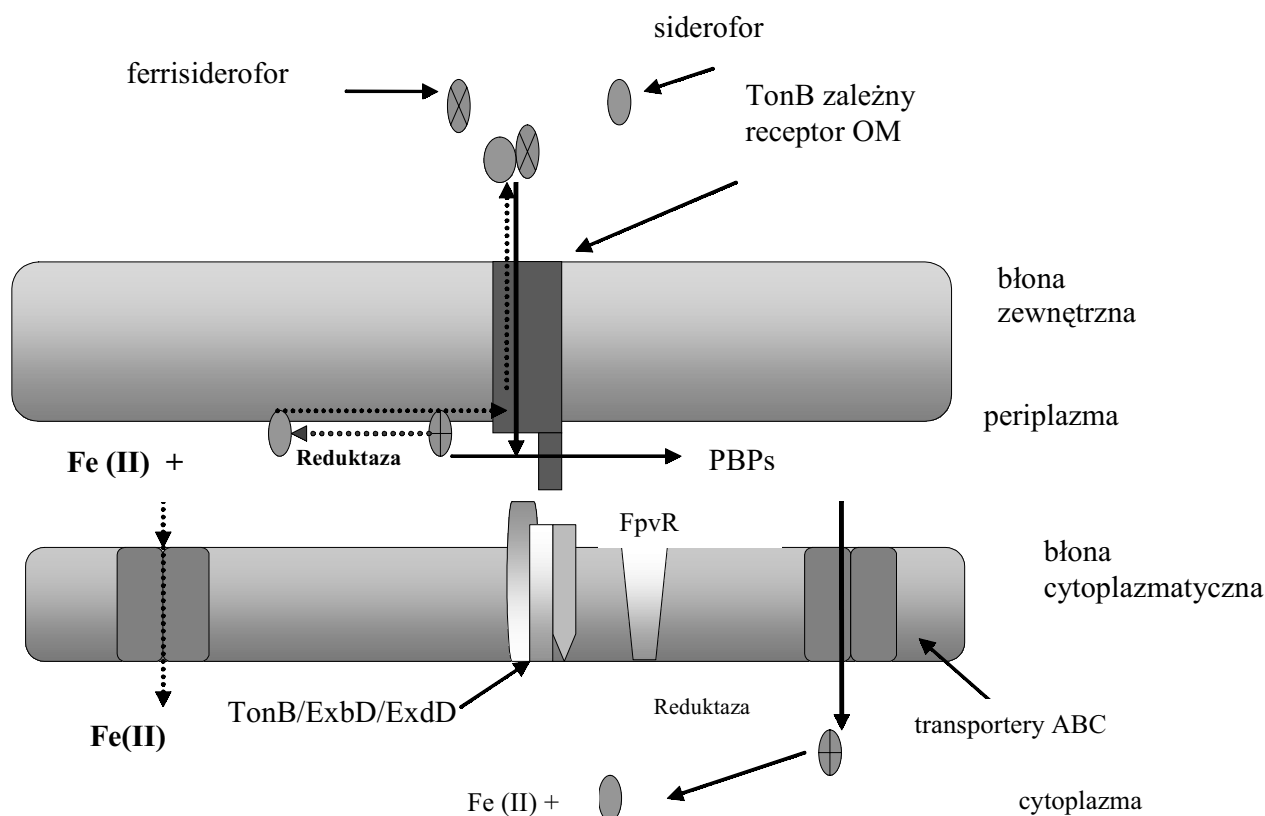
Obecnie znane jest, co najmniej 50 cząsteczek piowerdyn o różnych sekwencjach łańcucha peptydowego a przewiduje się występowanie w naturze, co najmniej dwukrotności tej liczby [15]. Zmienna budowa piowerdyny w obrębie peptydu jest unikatową

właściwością *Pseudomonas* wykorzystywaną, w tzw. siderotypowaniu – nowym systemie taksonomi bakterii tego rodzaju [30, 63].

### 3. Transport ferripiowerdyny do komórki bakterii

Kompleks piowerdyny z żelazem jest zbyt duży, żeby mógł być wprowadzony do komórki drogą dyfuzji poprzez błony komórkowe. Dlatego też w pozyskiwaniu żelaza przez bakterie są zaangażowane obok sideroforu wyspecjalizowane białka, w tym: receptory błony zewnętrznej, peryplazmatyczne białka wiążące, system białek transportujących znajdujący się w błonie cytoplazmatycznej, a także kompleks białek dostarczający energii niezbędnej dla funkcjonowania białek receptorowych błony zewnętrznej. Ważną funkcję w tym procesie pełnią także enzymy, które umożliwiają uwolnienie jonu żelaza z utworzonego z siderofem kompleksu [29, 46, 65]. Przy charakterystyce transportu kompleksu sid-Fe (III) do wnętrza komórek bakterii Gram-ujemnych jako modelowy przyjęto dobrze scharakteryzowany mechanizm występujący u *Escherichia coli* [38, 39]. Poniżej przedstawiono modelowy schemat z uwzględnieniem różnic występujących u bakterii *P. aeruginosa* (rys. 1).

Wydzielone przez komórki bakterii w warunkach niedoboru żelaza siderofory chelatują jony Fe(III).



Rys. 1. Modelowy mechanizm aktywnego transportu ferri-sideroforu do komórki bakterii Gram-ujemnych (opis w tekście). Proponowany schemat transportu ferripiowerdyny bakterii *Pseudomonas*, różnice oznaczone linią przerywaną ..... (opis w tekście).

Utworzone ferrisiderofory są przyłączane do odpowiedniego zależnego od TonB receptora OM. Biorąc udział w transporcie żelaza receptory OM rozpoznające różnego typu ferrisiderofory wykazują wspólne cechy strukturalne, choć podobieństwo ich sekwencji aminokwasowej jest niewielkie [21]. Dobrze scharakteryzowanym receptorem OM TonB specyficznym rozpoznającym piowerdynę, występującym u bakterii *P. aeruginosa* jest FpvA. Jest to białko o masie cząsteczkowej ok. 90 kDa, którego synteza jest indukowana podczas niedoboru żelaza w komórce [22, 24, 29, 33].

Utworzona na C-końcu łańcucha peptydowego struktura  $\beta$ -beczułki zbudowana jest z 22 antyrównoległych odcinków łańcucha białkowego z charakterystycznymi pętlami większymi (zewnątrzkomórkowymi) i mniejszymi (peryplazmatycznymi). Struktura  $\beta$  beczułki jest stabilizowana poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i jonowe pomiędzy pierwszym a ostatnim odcinkiem łańcucha białkowego. Z kolei na N-końcu łańcucha białkowego FpvA występuje mieszana struktura typu  $\alpha/\beta$ , tworząca domenę korka korka (cork, plug) [29, 92]. Funkcją tej domeny jest przejściowe blokowanie (bramkowanie) od strony peryplazmy kanału w błonie zewnętrznej utworzonego przez domenę  $\beta$ -beczułki. Za utrzymanie „korka” w odpowiedniej pozycji wobec  $\beta$ -beczułki odpowiadają wiązania wodorowe i jonowe utworzone z udziałem silnie zakonserwowanych dwóch reszt argininy zlokalizowanych w strukturze globularnej i dwóch reszt kwasu glutaminowego w strukturze  $\beta$ -beczułki. W obrębie domeny korka występuje sekwencja „TonB box”, odpowiedzialna za połączenie cząsteczki FpvA z białkiem TonB. Natomiast w interakcjach pomiędzy poszczególnymi składnikami aktywnego transportu ferripiowerdyny ważną rolę odgrywa zlokalizowana blisko N-końca łańcucha białkowego FpvA wydłużona struktura zwana domeną sygnalizacyjną. Jej zadaniem jest współdziałanie z białkiem TonB i transporterami ABC (ATP-binding cassette) oraz z białkiem regulatorowym FpvR [29, 46, 79, 89]. Warto tu zauważyć, że połączenie tej domeny białka z czynnikiem antysigma FpvR, uruchamia mechanizm regulacji biosyntezy piowerdyny [84].

Aby transport z udziałem zewnątrz błonowych receptorów mógł funkcjonować, niezbędne jest dostarczenie energii do receptora przez system TonB. Jest to kompleks trzech białek TonB/ExbB/ExbD mający zasadnicze znaczenie dla transferu energii do receptora błony zewnętrznej. Bakterie Gram-ujemne konieczną energię do tego procesu czerpią z gradientu protonomotorycznego utworzonego wzdłuż błony cytoplazmatycznej. Kompleks ExbB/ExbD przypuszczalnie stanowi aparat tworzenie gradientu protonowego, TonB natomiast jest łącznikiem pomiędzy błoną zewnętrzną i cytoplazmatyczną, przenoszącym energię wytworzoną przez gradient protonowy wokół błony cytoplazma-

tycznej [18, 46, 80]. Białko to jest zakotwiczone jest w wewnętrznej błonie pojedynczą, N-terminalną helisą stanowiącą domenę transbłonową tego białka. Na C-końcu łańcucha białkowego znajduje się domena globularna, która oddziałuje z sekwencją TonB-box występującą w obrębie domeny korka receptora [46, 65]. Natomiast ExbD jest białkiem peryplazmatycznym zakotwiczonym w błonie cytoplazmatycznej, a białko ExbB jest obecne w cytoplazmie i jest także zakotwiczone trzema wypustkami w błonie cytoplazmatycznej [90]. Przemieszczanie protonów z peryplazmy do cytoplazmy, powodowane gradientem elektrochemicznym, przy udziale kompleksu białek ExbB/ExbD, prowadzi do pobudzenia zmian konformacji białka TonB, co skutkuje jego połączeniem z regionem TonB-box [1]. Mechanizm przekazywania energii do receptora nie jest do końca wyjaśniony. Proponowane są tu dwa, równie prawdopodobne mechanizmy: model śmigła [17] oraz model czółna [50]. Według koncepcji śmigła (ang. the propeller model) białko TonB jest powiązanie na stałe z błoną cytoplazmatyczną, jedynie C-końcowy fragment tego białka tworzy śmigło będąc w ciągłym ruchu powodowanym przez kompleks ExbB/ExbD i siłę protonomotoryczną. Umożliwia to transdukcję energii do receptora OM. Natomiast w modelu czółna (ang. the shuttle model) zakłada się, że TonB jest właściwym przenośnikiem energii z błony cytoplazmatycznej do receptora. Po naładowaniu energetycznym kompleksu TonB-ExbB/ExbD białko TonB uwalnia się z kompleksu białkowego i przenosi energię do receptora OM. Dopływ energii do receptora OM wywołuje allosteryczne zmiany konformacji sprzyjające rozluźnieniu jego struktury w obrębie domeny korka, co umożliwia transport skompleksowanego z sideroforem żelaza do przestrzeni peryplazmatycznej [29].

Po przejściu ferrisideroforu przez kanał błonowy, kompleks ten dostaje się do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie zostaje wychwycony i związany przez peryplazmatyczne białka wiążące siderofory (PBPs). Jak dotąd nie udało się zidentyfikować tego białka u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Wiadomo, że ta grupa białek pod względem struktury jest podobna do transferyny i laktoferyny człowieka. Analiza struktury krystalicznej PBPs bakterii *Haemophilus influenzae* wykazała obecność w cząsteczce tego białka dwóch domen N- i C-końcowych, połączonych ze sobą interhelisą, stanowiącą miejsce wiązania ligandu, w tym przypadku kompleksu ferrisideroforu. Po przyłączeniu kompleksu siderofor – Fe(III) następuje zmiana konformacji cząsteczki białka, dzięki czemu domeny zbliżają się do siebie, tworząc pewnego rodzaju kleszcze, co uniemożliwia przedwczesne odłączenie się transportowanego kompleksu [11, 12, 29, 95]. Zadaniem białek wiążących jest nie tylko związanie ferrisideroforu i dostarczenie go do błonowych transporterów

ABC, ale także aktywacja ATP-azy. Transportery ABC tworzą dużą rodzinę białek o bardzo podobnej budowie: Składają się z czterech domen lub podjednostek: dwóch hydrofobowych domen transbłonowych tworzących kanał w błonie cytoplazmatycznej (TMD – transmembrane domain) oraz domen wiążących ATP (NBD – nucleotide-binding domain) znajdujących się przy powierzchni błony cytoplazmatycznej odpowiedzialnych za dostarczanie energii. Przyłączenie się ferrisideroforu do domeny transbłonowej powoduje zmianę konformacji tego białka i w konsekwencji otwarcie kanału transmembranowego, przez który ferrisiderofor jest wpompowany do cytoplazmy. Niezbędna do tego procesu energia jest dostarczana dzięki hydrolizie ATP do ADP [46, 107].

Związany z sideroforem Fe(III), żeby mógł być wykorzystany przez bakterię musi zostać odłączony z kompleksu i zredukowany do Fe(II). Jak dotąd poznano są dwa mechanizmy uwalniania jonów żelaza z kompleksu. Pierwszy, najczęściej spotykany polega na redukcji Fe(III) do Fe(II) przez reduktazę żelazową, co skutkuje rozpadem kompleksu bez szkody dla samego sideroforu, który może być ponownie użyty. Reduktazy żelazowo-sideroforowe u drobnoustrojów mogą występować w zasadzie w wszystkich przedziałach komórki. Najczęściej są one spotykane w cytoplazmie, ale występują także w peryplazmie, błonie cytoplazmatycznej lub mogą być wydzielane na zewnątrz komórki [92]. W drugim przypadku wykorzystywane są hydrolazy o aktywności esteraz. Wskutek tej reakcji następuje uszkodzenie sideroforu i niemożliwa jest jego dalsza aktywność. Po uwolnieniu jon żelaza jest kierowany do odpowiednich miejsc w komórce i wykorzystywany w poszczególnych procesach metabolicznych [46].

Jednak z najnowszych badań wynika, że w przypadku pobierania ferripiowerdyny przez *Pseudomonas* są obserwowane pewne, istotne odstępstwa od tego modelu (rys. 1a). Przypuszcza się, że podczas transportu kompleks piowerdyna – Fe(III) u bakterii *P. aeruginosa* gromadzi się w peryplazmie, a nie w cytoplazmie jak by to wynikało z analogii do mechanizmu przebiegającego w modelowym schemacie. Dodatkowo nie stwierdzono obecności genów odpowiedzialnych za biosyntezę peryplazmatycznych białek wiążących. Z obserwacji tych wynikałoby, że utworzony kompleks (III) jest rozkładany przez reduktazy peryplazmatyczne, a transportowi przez błonę cytoplazmatyczną podlegają już zredukowane jony żelaza [89]. Co więcej, z badań przeprowadzonych przez Greenwald i wsp. [34] wynika, że po rozpadzie kompleksu ferripiowerdyny w peryplazmie komórki *P. aeruginosa* siderofor ten jest wtórnie wiązany do receptora i wydalany poza błonę zewnętrzną. Część piowerdyny pozostaje w postaci niezmienionej i może wiązać kolejny jon żelaza (III).

## 4. Biosynteza piowerdyny i jej regulacja

### 4.1. Geny odpowiedzialne za syntezę piowerdyny

Synteza części peptydowej piowerdyny jest katalizowana przez wieloskładnikowe, cytoplazmatyczne kompleksy białkowe – nierybosomalne syntetazy peptydowe – (NRPSs). Te aktywności enzymatyczne biorą także udział w syntezie piocheliny [81], peptydowych antybiotyków [36] i biosurfaktantów [53].

W skład cząsteczek nierybosomalnych syntetaz peptydowych wchodzi moduły zawierające domeny o specyficznej funkcji katalizacyjnej. Każdy moduł jest odpowiedzialny za przeprowadzenie jednego cyklu wydłużania produktu, tzn. za wprowadzenie jednego aminokwasu do produktu. Różne domeny jednego modułu odpowiadają za przynajmniej trzy procesy: aktywację substratu przez adenylację, (domena A), kowalencyjne wiązanie (domena PCP), tworzenie wiązania peptydowego (domena C). Ilość i kolejność modułów decyduje o ilości i sekwencji aminokwasów w cząsteczce piowerdyny. Na C-końcu całego kompleksu zazwyczaj zlokalizowana domena tioesterazowa (Te) odpowiedzialna za uwalnianie peptydowego produktu. Ponadto w modułach, które wprowadzają cyliczne lub D-aminokwasy do produktu peptydowego zazwyczaj jest obecna domena E odpowiedzialna za cyklizację lub epimeryzację aminokwasu. Jednak jak wykazują badania, niektóre NRPSs występujące u *Pseudomonas* spp. mogą posiadać domenę C/E o podwójnej funkcji: kondensacji i epimeryzacji [4, 94]. Mogą także jednocześnie występować w komórce dwa różne pod tym względem systemy NRPSs [53].

Geny kodujące piowerdynę są zlokalizowane chromosomalne, u bakterii *P. aeruginosa* tworzą dwa oddzielne klastry. Jeden z nich (*pvd*) skupia geny odpowiedzialne za syntezę części peptydowej piowerdyny i białek receptorowych [57, 98] a drugi za syntezę chromoforu (*pvc*) [83, 96]. Natomiast w komórkach bakterii *P. siringae* zlokalizowano jeden klaster utworzonych przez geny piowerdyny [42].

Wiele badań przeprowadzonych z wykorzystaniem odpowiednio zmutowanych szczepów pozwoliło na jednoznaczne określenie funkcji produktów tych genów w syntezie piowerdyny [47, 83]. Geny kodujące syntetazy biorące udział w syntezie części peptydowej piowerdyny występują zapewne jako homologii u wszystkich szczepów syntetyzujących piowerdynę. Mossialos i wsp. [71] stwierdzili, że gen kodujący NRPS *PvsA* u *P. fluorescens* ATCC 17400 jest funkcjonalnym ortologiem genu kodującego NRPS *PvdL* u *P. aeruginosa*.

Typowe dla części peptydowej modyfikacje aminokwasów są formowane z udziałem specyficznych enzymów. Jak wykazał Viscia i wsp. [106] u *P. aeruginosa*

hydroksylaza ornitynowa, produkt genu *pvdA* odpowiada za powstanie N5-hydroksyornityny, wchodzącej w skład syntetyzowanej przez ten szczep piowerdyny. Brak tego genu u innego gatunku *Pseudomonas* był równoznaczny z brakiem tak zmodyfikowanego aminokwasu w strukturze odpowiadającej mu piowerdyny. Natomiast obecność homologicznych genów odpowiedzialnych za acetylację ornityny u *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* wiązała się z syntezą przez te bakterie piowerdyny zawierającej acylovaną ornitynę [71].

W ostatnich latach mechanizm biosyntezy chromoforu piowerdyny był intensywnie badany, szczególnie u *P. aeruginosa*. Przełomem w tych badaniach stało się odkrycie ferrybaktyny. Jest to związek niewykazujący fluorescencji różniącym się w budowie od piowerdyny tylko obecnością trójpeptydu o sekwencji:  $\gamma$ -L-Glu-D-Tyr-L-Dab, zamiast w pełni wykształconego chromoforu. Uważa się, że fragment cząsteczki: -D-Tyr-L-Dab może być przekształcony przez oksydazę polifenolową w chromofor piowerdyny. Natomiast obecny w cząsteczce ferrybaktyny kwas glutaminowy może ulegać transformacji do kwasu ketoglutazarowego lub innego stanowiącego łańcuch boczny piowerdyny. Nie rozpoznano jak dotąd białka enzymatycznego biorącego udział w tym procesie [100]. Biochemiczne mechanizmy dojrzewania chromoforu nie są jeszcze do końca poznane. Synteza prekursora przebiega w cytoplazmie a dojrzewanie chromoforu może zachodzić w peryplazmie komórki, o czym świadczy lokalizacja białek istotnych dla tego procesu [7, 113].

Pomimo znacznej wiedzy o funkcjach genów zaangażowanych w utrzymanie przez komórki właściwej homeostazy żelaza wciąż są jeszcze pewne niejasności. Okazuje się, że w klastrach genów odpowiedzialnych za syntezę piowerdyn znajdują się również takie, które kodują białka membranowe i wydzielnicze o nieznanym dotychczas funkcji w syntezie lub utylizacji składników systemu wysokiego powinowactwa do żelaza. Nie udało się ustalić m.in. znaczenia produktów genów *PA2389*, *PA2390*, *PA2391* u *P. aeruginosa*, choć wiadomo, że wyciszenie wymienionych genów prowadzi do istotnej redukcji poziomu biosyntezy piowerdyny u tego szczepu [75]. Pewnym utrudnieniem w badaniach homologii genów kodujących piowerdyny u poszczególnych szczepów *Pseudomonas* jest zmienność w lokalizacji w genomie klastrów skupiających te geny.

#### 4.2. Regulacja biosyntezy składników aktywnego transportu żelaza

Ekspresja genów związanych z aktywnym transportem ferripiowerdyny do komórki bakterii jest pośrednio zależna od białka Fur (ferric uptake regulator) oraz bezpośrednio od alternatywnych czynników sigma (ECF- $\delta$ s) [22, 102].

Fur to niskocząsteczkowe, cytoplazmatyczne białko występujące w komórce w licznych kopiach. Posiada silnie zakonserwowany fragment o sekwencji -His-His-Asp-His. Na N-końcu jego łańcucha peptydowego występuje specyficzną strukturę – helisa-skრეთ-helisa, typową dla białek wiążących DNA [97]. Sekwencja aminokwasowa dotychczas poznanych białek Fur wykazuje duże, bo blisko 70% podobieństwo. Bakterie *P. aeruginosa* kodują białko Fur o masie cząst. 15,2 kDa, które występuje jako dimer. Podjednostki białka Fur są utrzymywane poprzez wiązanie disulfidowe. Fur posiada miejsca wiązania korepresora – jonu Fe(II), w każdej z pojedynczych podjednostek dimeru [107]. Fur syntetyzowany przez *P. aeruginosa* nie posiada miejsc wiążących jony cynku, tak jak to opisano u *E. coli* [51].

Gdy poziom żelaza w komórce jest wysoki, wówczas białko Fur łączy się w kompleks Fur-Fe[II] i wiąże się do ściśle zakonserwowanych miejsc tzw. Fur-box w obszarze promotorowym regulowanych genów wstrzymując ich transkrypcję. W następstwie tego biosynteza związków biorących udział w aktywnym transporcie żelaza do wnętrza komórki zostaje wstrzymana, co zapobiega to nadmiernemu gromadzeniu się żelaza w komórce bakteryjnej. Gdy w komórce zaczyna brakować żelaza białko Fur traci korepresor, co powoduje zmianę jego konformacji i jego odłączenie od fragmentu promotorowego genu, co umożliwi dalsze działanie polimerazy [88, 108]. Białko to może być także regulatorem genów odpowiedzialnych za odpowiedź komórki na stres oksydacyjny i metabolizm węgla [28].

W komórkach bakterii odkryto także inne białko DxtR, potencjalnie pełniące homologiczną funkcję jak białko Fur. Zazwyczaj jednak u bakterii, u których białko Fur pełni główną rolę w kontroli aktywności genów kodujących składniki systemu wysokiego powinowactwa do żelaza, białko DxtR jest odpowiedzialne za regulację transportu Mn[II] [65, 109].

Ekspresja zależnych od Fur genów kodujących, scharakteryzowane u *P. aeruginosa* czynniki sigma FpvI i PvdS następuje w warunkach niedoboru żelaza w komórce [8, 48]. Związki te zaliczane są do rodziny alternatywnych czynników sigma. Ta grupa białek jest związana z pozytywną regulacją transkrypcji genów istotnych w szczególnych warunkach np. głodu żelaza lub związanych z cyklem życiowym komórki [13]. Po połączeniu tych czynników z rdzeniem polimerazy możliwa jest transkrypcję odpowiednich sekwencji kodujących poszczególne składniki systemu aktywnego pobierania żelaza. Promotory genów PvdS-zależnych zawierają tzw. IS box (iron starvation box) -30 -40 pz przed miejscem startu transkrypcji. Po przyłączeniu czynnika sigma do rdzenia polimerazy następuje aktywacja tego enzymu umożliwiająca transkrypcję odpowiedniego fragmentu DNA [112].

Sekwencja aminokwasowa PvdS wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji innych regulatorów genów związanych z pobieraniem żelaza, w tym do PbrA *P. fluorescens* M114 lub PfrI *Pseudomonas putida* WCS358 [93, 103].

Czynnik FpvI wydaje się być bardziej specyficzny, ponieważ wymagany jest jedynie do aktywacji transkrypcji genu *fpvA* kodującego białko FpvA, receptora OM [84, 85]. Kontrola aktywności białek PvdS i FpvI zachodzi z udziałem białkowego czynnika anty-sigma FpvR. Gdy aktywność czynnika sigma jest zbędna dochodzi do jego przejściowego połączenia z FpvR i utworzenie kompleksów PvdS/FpvR oraz FpvI/FpvR (84). Skompleksowanie czynnika sigma z czynnikiem antysigma powoduje jego funkcjonalne unieczynnienie. Tak jak już wcześniej wspomniano impulsem do uaktywnienia czynnika sigma jest zmiana konformacji błonowego receptora podczas transportu ferri-piowerdyny. Po rozpoznaniu ferripiowerdyny przez receptor FpvA domena sygnalizacyjna oddziałuje na zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej czynnik antysigma FpvR, co powoduje uwolnienie czynnika sigma i wznowienie transkrypcji genów odpowiedzialnych za syntezę piowerdyny [84].

## 5. Pośrednie funkcje piowerdyn oraz ich potencjalne zastosowania

### 5.1. Znaczenie i zastosowanie piowerdyn glebowych *Pseudomonas*

Bakterie glebowe rodzaju *Pseudomonas* są tematem licznych badań głównie ze względu ich liczne i aktywne występowanie w glebie. Synteza przez te bakterie sideroforów, o tak dużym powinowactwie do jonów żelaza jak piowerdyny ułatwia nie tylko ich przeżywanie i namnażanie w glebie, ale również kolonizację korzeni roślin (9). Dla wielu roślin korzystna jest możliwość pobierania i wykorzystywania kompleksów piowerdyna – Fe(III) [101]. Obecnie prowadzone badania mają na celu wyjaśnienie mechanizmów stymulacji wzrostu roślin przez *Pseudomonas*.

Rola piowerdyny w polepszaniu zdrowotności roślin powinna być rozpatrywana dwójako, jako bezpośredni czynnik bakteryjny powodujący inhibicję wzrostu grzybów patogennych oraz czynnik (elicitor) indukujący w roślinie systemiczną odporność (ISR – Induced Systemic Resistance).

Bezpośrednie ograniczanie wzrostu fitopatogenów możliwe jest wówczas, gdy, szczep bakterii antagonisty i szczep zwalczany zajmują tę samą niszę ekologiczną. Jak wynika z wielu badań komórki *Pseudomonas* występujące w ryzosferze wykazują antagonistyczne właściwości względem bytujących tam także w fitopatogen-

nych mikroorganizmów. Do tej pory wykazano biaktywność *Pseudomonas* względem całej gamy fitopatogenów grzybowych w tym: *Phytophthora capsici* [25], *Fusarium* spp. [44] i *Heterobasidion annosum* [31].

Wśród szeregu bioaktywnych metabolitów syntetyzowanych przez bakterie rodzaju *Pseudomonas* na uwagę zasługują siderofory a wśród nich piowerdyny [35, 37, 49]. Zahamowanie wzrostu fitopatogenów w obecności piowerdyn *Pseudomonas* jest efektem wychwytywania jonów żelaza ze środowiska przez ten siderofor. Skutkuje to znacznym ograniczeniem ilości tego niezbędnego do życia pierwiastka w dostępnej formie dla innych mikroorganizmów, których siderofory nie wiążą tak silnie jonów tego pierwiastka. Istnieją pewne kontrowersje wokół dominującej roli piowerdyn w bezpośrednim antagonizmie fluoryzujących pałeczek *Pseudomonas* przeciw grzybom patogenym. Większość autorów najnowszych prac wskazuje na synergistyczne działanie metabolitów syntetyzowanych przez te bakterie [82, 99].

Interesującym przypadkiem jest ochrona biologiczna roślin, gdy biokontrolujący szczep bakterii i zwalczany fitopatogen są przestrzennie rozdzielone i w ten sposób unikają bezpośrednich interakcji. W tym wypadku efekt ochrony roślin wynika z indukcji odporności systemicznej (ISR). Ten typ odporności badany intensywnie w ciągu ostatnich kilkunastu lat jest wywoływany przez tzw. elicitory, czyli „cząsteczki aktywujące reakcje obronne komórek roślinnych”. *Pseudomonas* syntetyzuje kilka typów elicitorów ISR m.in. piowerdyny i inne siderofory i antybiotyki. Indukcja ISR inicjowana jest połączeniem wyżej wspomnianych elicitorów bakterii PGPR z receptorami korzeniowymi, co skutkuje zapoczątkowaniem łańcucha reakcji, w którym ważną rolę odgrywają etylen i kwas jasmonowy [20]. Badania, w których wykazano indukujący wpływ piowerdyny na odporność typu ISR u roślin pomidora zostały przeprowadzone m.in. przez M e z i a n e i wsp. [64]. Jak wykazali autorzy, piowerdyna *P. putida* WCS358 jest elicitorem odporności tych roślin względem *Botrytis cinerea*. Z innych badań wynika, że ten siderofor może także indukować odporność roślin względem chorób wirusowych [55].

Biorąc pod uwagę zdolność sideroforów do chelatacji jonów żelaza zaproponowano ich wykorzystanie jako składników biopestycydów. Takie preparaty są tańsze i mniej szkodliwe w porównaniu do środków chemicznych. Nie zaobserwowano też efektów zatrucia bądź akumulacji tych środków w łańcuchu pokarmowym zwierząt. Jednakże problemem przy stosowaniu jest ich mniejsza skuteczność, ale jak wykazały badania preparat piowerdyny i kwasu salicylowego glebowego szczepu *P. aeruginosa* okazał się wysoce skutecznym przeciwko *Paenonospira tabacina* i *Alternaria solani* zakażających rośliny tytoniu i pomidora [105].

## 5.2. Znaczenie i zastosowanie piowerdyny w medycynie

Piowerdyna jako czynnik wirulencji *P. aeruginosa*

Szczepy bakterii *P. aeruginosa* są przyczyną oportunistycznych zakażeń szpitalnych stanowiących poważny problem szczególnie u osób przewlekle chorych na mukowiscydozę oraz u ofiar wypadków z rozległymi oparzeniami i innymi uszkodzeniami skóry [70].

W organizmie zasiedlanego przez bakterie makroorganizma stężenie wolnego żelaza jest niższe, niż minimalne wymagane do wzrostu i namnażania bakterii. Jest to dla niego korzystne, ponieważ ograniczenie ilości żelaza stanowi barierę chroniącą go przed zakażeniem patogenami. W organizmie człowieka praktycznie cała pula żelaza występuje w postaci związanej z żelazoproteinami hemowymi i niehemowymi. Bakteryjne patogeny człowieka wykorzystują jako źródło żelaza najczęściej białka transportujące żelazo, czyli transferynę i laktoferynę, a także hemoglobinę [66, 67, 110].

W takim przypadku wydzielanie sideroforów o szczególnie wysokim powinowactwie do żelaza umożliwia patogenom pozyskiwanie jonów żelaza skompleksowanych z białkami zasiedlanego organizmu. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że piowerdyna *P. aeruginosa* podczas zakażeń, nie pełni jedynie typowej funkcji chelatora żelaza, lecz jest także molekułą sygnałową. Niedobór żelaza indukuje syntezę i wydzielanie piowerdyny, po skompleksowaniu żelaza siderofor ten w interakcji z receptorem OM FpvA wywołuje kaskadę sygnałową, prowadzącą do syntezy czynników wirulencji takich jak egzotoksyna A i proteaza PrpL [8, 48, 107, 111]. Sama piowerdyna wytwarzana przez *P. aeruginosa* jest także uważana za czynnik wirulencji tych bakterii. Zaobserwowano, że mutanty piowerdyno-ujemne nie wykazywały wirulencji takiej jak szczepy dzikie podczas doświadczeń na modelach zwierzęcych [61, 76].

Jak udowodniono w patogenezie wielu przewlekłych stanów zapalnych istotną rolę odgrywają biofilmy bakteryjne [16]. Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat dowiodły, że wysoki poziom wewnątrzkomórkowego żelaza w komórkach *P. aeruginosa* jest sygnałem do tworzenia biofilmu o typowej dla tych bakterii strukturze. Zaobserwowano, że piowerdyno-ujemne mutanty nie były zdolne do tworzenia w pełni wykształconego biofilmu. Prawidłowy biofilm był jednak tworzony przez te zmutowane szczepy po dodaniu do hodowli  $\text{FeCl}_3$  lub egzogennej piowerdyny [5]. Wyniki tych badań pokazują, że w tym wypadku sygnałem do utworzenia prawidłowego biofilmu jest nie sama obecność piowerdyny, ale odpowiednio wysoki poziom żelaza wewnątrzkomórkowego. Ponadto, stwierdzono, że niski poziom żelaza stymuluje ruch powierzchniowy bakterii, co utrudnia tworzenie stabil-

nej struktury w postaci biofilmu. Wiadomo także, że obecność laktoferyny w stężeniu poniżej wywołującego efekt bakteriostatyczny ogranicza zdolność tych bakterii do tworzenia biofilmów o prawidłowej strukturze. Do tej pory nie poznano opisanych wyżej dokładnych mechanizmów regulacji tych procesów [5].

W ostatnich latach duże nadzieje budzi zastosowanie sideromycyn w terapii antybiotykowej zakażeń bakteryjnych. Sideromycyny to kowalencyjne połączenia sideroforu z antybiotykiem, specyficznie rozpoznawane przez receptory OM [10, 68, 69, 104]. Wprowadzanie antybiotyku do komórki z wykorzystaniem mechanizmu aktywnego transportu żelaza nazywano taktyką konia trojańskiego (trojan horse) [69].

Przeprowadzono już badania nad wprowadzaniem złożonych antybiotyków do komórek niektórych bakterii patogennych np. *P. aeruginosa*, gdzie skutecznie wprowadzono ampicylinę i norfloksacynę związane z ferripiowerdyną [45].

Obecnie trwają intensywne prace nad tworzeniem połączeń syntetycznych sideroforów z antybiotykami (siderophore drug conjugates; SDC). W skład takiego połączenia wchodzi: syntetyczny siderofor skompleksowany z żelazem, lek posiadający aktywność antimikrobiologiczną oraz łącznik pomiędzy lekiem a sideroforem. Łącznik pełni bardzo ważną rolę w tej strukturze, ponieważ jego właściwości pozwalają kontrolować tempo uwalniania leku. Po rozpoznaniu przez specyficzne receptory ten zwykle zabójczy dla bakterii konstrukt dostaje się do wnętrza komórki. Gdy patogen stara się pobrać żelazo z takiego sideroforu, pobiera także antybiotyk, który go zabija. Kompleks ferrisiderofor-antybiotyk może być szkodliwy dla komórki bakterii nie tylko po pobraniu leku. Może on także blokować pobieranie żelaza lub działać w całości czynnik antybakteryjny. Istotną zaletą stosowania strategii „konia trojańskiego” jest selektywne unieszkodliwienie określonego gatunku bakterii [26, 45]. Ponadto tworzone koniugaty może być użyteczna przy zwalczaniu powszechnych mechanizmów oporności drobnoustrojów, szczególnie tych związanych z czynnym usuwaniem leku z komórki (ang. efflux), czy też blokowaniem jego hydrolizy [26].

Taktyka konia trojańskiego jest wykorzystywana także przy wprowadzaniu do komórek bakterii innych niż żelazo metali. Może to być wanad lub gal wprowadzony w postaci schelatowanej z piowerdyną. Kompleksy te oddziałują toksycznie na metabolizm bakterii, gal niszczy także biofilmy bakteryjne [43]. Lekiem stosowanym powszechnie u pacjentów z zatruciem żelazem i wykorzystującym strategię „konia trojańskiego” jest Desferal. Związek ten wiąże żelazo odkładające się w nadmiernych ilościach w niektórych tkankach, nie naruszając typowych rezerw żelaza w organizmie człowieka.



## 6. Podsumowanie

Najnowsze piśmiennictwo wciąż precyzuje dane dotyczące wyspecjalizowanych mechanizmów sideroforowego systemu wysokiego powinowactwa pobierania żelaza przez bakterie. Wśród sideroforów fluorujących *Pseudomonas* intensywnie badaną pod wieloma względami jest rodzina piowerdyn. Jest to liczna grupa związków chelatujących o różnej budowie części peptydowej cząsteczki. Piowerdyny charakteryzują się wyjątkowo wysokim powinowactwem do jonów żelaza, co ułatwia drobnoustrojom je wykorzystującym namazanie w określonych środowiskach. Utrzymanie właściwej homeostazy żelaza w komórkach drobnoustrojów wymaga skomplikowanych mechanizmów regulacyjnych na poziomie transkrypcji. W regulację syntezy piowerdyny i pozostałych składników systemu pobierania żelaza obok białka Fur są zaangażowane bezpośrednio alternatywne czynniki sigma PvdS i PvdI. Badania nad piowerdynami są tematem nadal aktualnym, ponieważ te wtórne metabolity obok niewątpliwie dominującej funkcji, jaką jest pozyskiwanie żelaza dla bakterii posiadają inne, cenne właściwości. Przedmiotem badań wielu laboratoriów są piowerdyny pozyskiwane zarówno z szczepów klinicznych jak i glebowych. Bardzo obiecujące wydaje się być wykorzystanie tych sideroforów w farmacji i ochronie roślin.

## Piśmiennictwo

- Adams H., Zeder-Lutz G., Schalk I., Pattus F., Celia H.: Interaction of TonB with the Outer Membrane Receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 5752–5761 (2006)
- Andrews S.C., Robinson A.K., Rodríguez-Quíñones F.: Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215–237 (2003)
- Bagg A., Neilands J.B.: Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**, 509–518 (1987)
- Balibar C.J., Vaillancourt F.H., Walsh C.T.: Generation amino acid residues in assembly of arthofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem. Biol.* **12**, 1189–1200 (2005)
- Banin M.L., Vasil M.L., Greenberg E.P.: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11076–11081 (2005).
- Baysse C., De Vos D., Naudet Y., Vandermonde A., Ochsner U., Meyer J.M., Budzikiewicz H., Schafer M., Fuchs R., Cornelis P.: Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **146**, 2425–2434 (2000)
- Baysse C., Matthijs S., Pattery T., Cornelis P.: Impact of mutations in hemA and hemH genes on pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* ATCC17400. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**, 57–63 (2001)
- Beare P.A., For R.J., Martin L.W., Lamont I.L.: Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol. Microbiol.* **47**, 195–207 (2003)
- Boopathi E., Sankara Rao K.A.: Siderophores from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Bioch. Biophys. Acta*, **1435**, 30–40 (1999)
- Braun V., Pramanik A., Gwinner T., Köberle M., Bohn E.: Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals*, **22**, 3–13 (2009)
- Braun V., Braun M.: Active transport of iron and siderophore antibiotics *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 194–201 (2002)
- Braun V., Endriss F.: Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals*, **20**, 219–231 (2007)
- Braun V., Mahren S., Ogierman M.: Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 173–180 (2003)
- Budzikiewicz H.: Siderophores of Fluorescent *Pseudomonas*. *Z. Naturforsch.* **52c**, 713–720 (1997)
- Budzikiewicz H.: Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **87**, 81–237 (2004)
- Caraher E., Duff C., Mullen T., Mc Keon S., Murphy P., Callaghan M., McClean S.: Invasion and biofilm formation of *Burkholderia dolosa* is comparable with *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*. *J. Cyst. Fibros.* **6**, 49–56 (2007).
- Cascales E., Lloubès R., Sturgis J.N.: The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* **42**, 795–807 (2001)
- Chang C., Mooser A., Pluckthun A., Wlodawer A.: Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **276**, 27535–27540 (2001)
- Chimiak A.: Siderofory – nośniki jonów żelazowych. *Post. Biochem.* **30**, 435–460 (1984)
- Choudhary D.K., Prakash A., Johri B.N.: Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Ind. J. Microbiol.* **47**, 289–297 (2007)
- Cobessi D., Celia H., Folschweiller N., Schalk I.J., Abdallah M.A., Pattus F.: The Crystal Structure of the Pyoverdine Outer Membrane Receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **347**, 121–134 (2005)
- Cornelis P., Matthijs S., Van Oeffelen L.: Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, **22**, 15–22 (2009)
- Cornelis P.: Unexpected Interaction of a Siderophore with Aluminum and Its Receptor. *J. Bacteriol.* **190**, 6541–6543 (2008)
- De Chial M., Ghysels B., Beatson S.A., Geoffroy V., Meyer J.M., Pattery T., Baysse Ch., Chablain P., Parsons Y.N., Winstanley C.: Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **149**, 821–831 (2003)
- Diby P., Sarma Y.R.: Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* **39**, 1–6, (2005)
- Ding P., Schous C.E., Miller M.J.: Design and synthesis of a novel protected mixed ligand siderophore, *Tetrahedron Letters*, **49**, 2306–2310 (2008)
- Dybas M.J., Tatara G.M., Criddle C.S.: Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 758–762 (1995)

28. Escolar L., Perez-Martin J., de Lorenzo V.: Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6223–6229 (1999)
29. Faraldo-Gomez J.D., Sansom M.S.: Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 105–116 (2003)
30. Fuchs R., Schäfer M., Geoffroy V., Meyer J.M.: Siderotyping – A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Curr. Topics Med. Chem.* **1**, 31–57 (2001)
31. Gamalero E., Trotta A., Massa N., Copetta A., Martinotti A.G., Berta G.: Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and acquisition. *Mycorrhiza*, **14**, 185–192 (2004)
32. Gessard M.C.: Sur la fonction fluorescigene des microbes. *Ann.Inst. Pasteur (Paris)*, **6**, 801–823 (1892)
33. Ghysels B., Dieu B.T., Beatson A.S., Pirnay J-P., Ochsner U.A., Vasil M., Cornelis P.: FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **150**, 1671–1680 (2004)
34. Greenwald J., Hoegy F., Nader M., Journet L., Mislin G., Graumann P., Schalk I.: Real Time Fluorescent Resonance Energy Transfer Visualization of Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J. Biol. Chem.* **282**, 2987–2995 (2007)
35. Haas D., Defago G.: Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 307–319 (2005)
36. Hancock R.E., Chapple D.S.: Peptide antibiotics antimicrobial agents and chemotherapy. *J. Bacteriol.* **43**, 1317–1323 (1999)
37. Handelsman J., Stabb E.V.: Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, **8**, 1855–1869 (1996)
38. Handke K.: Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 172–177 (2001)
39. Hoegy F., Celia H., Mislin G.L., Vincent M., Gallay J., Schalk I.J.: Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**, 20222–20230 (2005)
40. Hohlneicher U., Hartmann R., Traz K., Budzikiewicz H.: Pyoverdin, Ferribactin, Azotobactin – a New Triade of Siderophores from *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 and Its Relation to *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Z. Naturforsch.* **50c**, 337–3441 (1995)
41. Jankiewicz U., Kuzawińska O.: Purification and partial characterization of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas putida*. *EJPau*, 12 [on line] <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue1> (2009)
42. Julich M., Taraz K., Budzikiewicz H., Geoffroy V., Meyer J.M., Gardan L.: The structure of the pyoverdin isolated from various *Pseudomonas syringae* pathovars. *Z. Naturforsch.* **56c**, 687–694 (2001)
43. Kaneko Y., Thoendel M., Olanmi O., Britigan B.E., Singh P.K.: The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clinical. Invest.* **117**, 877–888 (2007)
44. Kaur R., Singh R.S., Alabouvette C.: Antagonistic Activity of Selected Isolates of Fluorescent *Pseudomonas* Against *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. *Asian J. Plant. Sci.* **6**, 446–454 (2007)
45. Kinzel O., Tappe R., Gerus I., Budzikiewicz H.: The synthesis and antibacterial activity of two pyoverdin-ampicillin conjugates, entering *Pseudomonas aeruginosa* via the pyoverdin-mediated iron uptake pathway. *J. Antibiot.* **51**, 499–507 (1998)
46. Krewulak K.D., Vogel H.J.: Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1781–1784 (2008)
47. Lamont I.L., Martin L.W.: Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **149**, 833–842 (2003).
48. Lamont I.L., Beare P.A., Ochsner U., Vasil A.I., Vasil M.L.: Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7072–7077 (2002)
49. Lee E.-T., Lim S.-K., Nam D.-H., Khang Y.-H., Kim S.-D.: Pyoverdin<sub>2112</sub> of *Pseudomonas fluorescens* 2112 inhibits *Phytophthora capsici*, a red-pepper blight-causing fungus. *J. Microbiol. Biotech.* **13**, 415–421 (2003)
50. Letain T.E., Postle K.: TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **24**, 271–83 (1997)
51. Lewin A.C., Doughty P.A., Flegg L., Moore G.R., Spiro S.: The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology*, **148**, 2449–2456 (2002)
52. Lewis T., Morales L.L., Paula S.A., Hartwell R., Hadley J., Benjamin K., Cynthia F., Meyer J.M.: Physiological and molecular genetic evaluation of the dechlorination agent, pyridine-2,6-bis[monothiocarboxylic acid] (PDTC) as a secondary siderophore of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **6**, 159–169 (2004)
53. Lim S.P., Niran R., Kenji W., Masaaki M.: Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci. Biotech. Biochem.* **71**, 2002–2009 (2007)
54. Meyer J.M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N.: Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2745–2753 (2002)
55. Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Métraux J.P., Défago G.: Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, **84**, 139–146 (1994)
56. Mercado-Blanco J., van der Drift K.M., Olsson P.E., Thomas-Oates J.E., van Loon L.C., Bakker P.A.: Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**, 1909–1920 (2001)
57. Merriman T.R., Merriman M.E., Lamont I.L.: Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: *PvdD* has similarity to peptide synthetases. *J. Bacteriol.* **177**, 252–258 (1995)
58. Meyer J.M., Stintzi A., De Vos D., Cornelis P., Tappe R., Taraz K., Budzikiewicz H.: Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, **143**, 35–43 (1997)
59. Meyer J.M., Abdallah M.A.: The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319–328 (1978)
60. Meyer J.M., Abdallah M.A.: The siderochromes of nonfluorescent *Pseudomonas*: production of nocardamine by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Gen. Microbiol.* **118**, 125–129 (1980)
61. Meyer J.M., Neely A., Stintzi A., Georges C., Holder I.A.: Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **64**, 518–523 (1996)

62. Meyer J.M.: Pyoverdines: pigments, Siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* **174**, 135–142 (2000)
63. Meyer J.M.; Gruffaz Ch., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schäfer M., Budzikiewicz H.: Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Bio-metals*, **21**, 259–271 (2008)
64. Meziane H., van der Sluis I., van Lonn L.C., Höfte M., Bakker P.A.: Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 177–185 (2005)
65. Miethke M., Marahiel M.A.: Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 413–451 (2007)
66. Mietzner T.A., Morse S.A.: The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* **14**, 471–493 (1994)
67. Mikucki J., Lisiecki P.: Siderofory – agresyny bakterii. *Post. Mikrobiol.* **37**, 73–97 (1998)
68. Miller M.J., Zhu H., Xu Y., Wu C., Walz A.J., Vergne A., Roosenberg J.M., Moraski G., Minnick A.A., McKee-Dolence J., Hu J., Fennell K., Dolence K., Dong L., Franzblau S., Malouin F.: Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *Biometals*, **22**, 61–75 (2009)
69. Möllmann U., Heinisch L., Bauernfeind A., Köhler T., Ankel D.: Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. *Biometals*, **22**, 615–624 (2009)
70. Mossialos D., Grigoris D.A.: Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 87–98 (2009)
71. Mossialos D., Ochsner C.U., Baysse Ch., Chablain P., Pirnay J.-P., Koedam N., Budzikiewicz H., Fernández D.U., Schäfer M., Ravel J., Cornelis P.: Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **45**, 1673–1685 (2002)
72. Mossialos D., Meyer J.M., Budzikiewicz H., Wolff U., Koedam N., Baysse Ch., Anjaiah V., Cornelis P.: Quinolobactin, a New Siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the Production of Which Is Repressed by the Cognate Pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 487–492 (2000)
73. Neilands J.B.: Microbial Iron Compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 715–731 (1981)
74. Neilands J.B.: Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726 (1995)
75. Ochsner U.A., Wilderman P.J., Vasil A.I., Vasil M.L.: Gene-Chip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* **45**, 1277–1287 (2002)
76. Oglesby A.G., Farrow J.M., Lee J.-H., Andrew P.T., Greenberg E.P., Pesci C., Vasil M.L.: The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology regulatory link between iron and quorum sensing. *J. Biol. Chem.* **283**, 15558–15567 (2008)
77. Palleroni N.J.: Family I. Pseudomonadaceae. Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555. In *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, s. 141–218. Edited by: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. (1984)
78. Poole K., McKay G.A.: Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience*, **8**, 661–686 (2003)
79. Poole K., Neshat S., Krebs K. and Heinrichs D.E.: Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**, 4597–4604 (1993)
80. Postle K., Kadner R.J.: Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* **49**, 869–882 (2003)
81. Quadri L.E.N., Keating T.A., Patel H.M., Walsh C.T.: Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: in vitro reconstitution of aryl-4,2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchA. *Biochem.* **38**, 14941–14954 (1999)
82. Rane M.R., Sarode P.D., Chaudhari B.L., Chincholkar S.B.: Exploring antagonistic metabolites of established biocontrol agent of marine origin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**, 665–675 (2008)
83. Ravel J., Cornelis P.: Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol.* **11**, 195–200 (2003)
84. Rédly G.A., Poole K.: FpvIR Control of *fpvA* Ferric Pyoverdine Receptor Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*: Demonstration of an Interaction between FpvI and FpvR and Identification of Mutations in Each Compromising This Interaction. *J. Bacteriol.* **187**, 5648–5657 (2005)
85. Rédly G.A., Poole K.: Pyoverdine-Mediated Regulation of FpvA Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Probable Extracytoplasmic-Function Sigma Factor, FpvI. *J. Bacteriol.* **185**, 1261–1265 (2003)
86. Risse D., Beiderbeck H., Taraz K., Budzikiewicz H., Gustine D.: Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Zeitschrift Naturforsch. C. Biosci.* **53**, 295–304 (1998)
87. Różalska B.: Rola jonów żelaza w procesie zakażenia. *Post. Mikrobiol.* **36**, 87–100 (1997)
88. Saito T., Williams R.J.: The binding of the ferric uptake regulation protein to a DNA fragment. *Eur. J. Biochem.* **197**, 43–47 (1991)
89. Schalk I.J.: Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J. Inorganic Biochem.* **102**, 1159–1169 (2008)
90. Schauer K., Rodionov A.D., Reuse H.: New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? *Trends Biochem. Sci.* **33**, 330–338 (2008)
91. Schröder I., Johnson E., De Vries S.: Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 427–447 (2003)
92. Scott D.C., Zhenghua C., Bauler M., Igo J.D., Salete M., Newton C., Klebba Ph.E.: Exchangeability of N Termini in the Ligand-gated Porins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 13025–13033 (2001)
93. Sexton R., Gill P.R., Callanan Jr. M.J., O’Sullivan D.J., Dowling D.N., O’Gara F.: Iron-responsive gene expression in *Pseudomonas fluorescens* M114: cloning and characterization of a transcription-activating factor, PbrA. *Mol. Microbiol.* **15**, 297–306, (1995)
94. Sieber S.A., Marahiel M.A.: Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* **105**, 715–738 (2005)
95. Siudeja K., Olczak T.: Mechanizmy i regulacja przyswajania żelaza i hemu przez bakterie gramujemne. *Post. Biochem.* **51**, 198–208 (2005)
96. Stintzi A., Johnson Z., Stonehouse M., Ochsner U., Meyer J.M., Vasil M., LPoole K.: The *pvc* gene cluster of

- Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. *J. Bacteriol.* **181**, 4118–4124 (1999)
97. Stojiljkovic I., Hantke K.: Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein [Fur]. *Mol. Gen. Genet.* **247**, 199–205 (1995)
  98. Tsuda M., Miyazaki H., Nakazawa T.: Genetic and physical mapping of genes involved in pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **177**, 423–431 (1995)
  99. Upadhyay A., Srivastava S.: Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**, 98–105 (2008)
  100. Vandenberghe Ch.S., Vlasschaert M., Seah S.Y.: Functional Characterization of an Aminotransferase Required for Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **186**, 5596–5602 (2004)
  101. Vansuyt G., Robin A., Briat J.F., Curie C., Lemanceau Ph.: Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *MPMI.* **20**, 441–447 (2007)
  102. Vasil M. L., Ochsner U.A.: The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetic, biochemistry and virulence. *Mol. Biol.* **34**, 399–413 (1999)
  103. Venturi V., Weisbeek P., Koster M.: Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Mol. Microbiol.* **17**, 603–610 (1995)
  104. Verbeken G., De Vos D., Vanechoutte M., Merabishvili M., Zizi M., Pirnay J.P.: European regulatory conundrum of phage therapy. *Future Microbiol.* **2**, 485–849 (2007)
  105. Villa P., Bell A., Frías A., Díaz de Villegas M.E., Martínez J., Gutiérrez I., Torres P., Redondo D., Hernández Y., Stefanova M., Alfonso I., Budzikiewicz H.: Biosynthesis of metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* strain PSS for the control of phytopathogenic fungus. *Memorias Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola*, **3**, 21–25 (2004)
  106. Visca P., Ciervo A., Orsi N.: Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**, 1128–1140 (1994)
  107. Visca P., Imperi F., Lamont I. L.: Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**, 22–30 (2007)
  108. Visca P., Leoni L., Wilson M. J., Lamont I. L.: Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **45**, 1177–1190 (2002)
  109. Wandersman C., Delepelaire P.: Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 611–647 (2004)
  110. Weinberg E.D., Weinberg G.A.: The role of iron in infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **8**, 164–169 (1995)
  111. Wilderman P. J., Vasil A.I., Johnson Z., Wilson M.J., Cunliffe H.E., Lamont I.L., Vasil M.L.: Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a PvdS-Regulated Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **69**, 5385–5394 (2001)
  112. Wilson M.J., McMorran B.J., Lamont I.L.: Analysis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-function sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 2151–1155 (2001)
  113. Yeterian E., Martin L.W., Guillon L., Journet L., Lamont I.L., Schalk I.J.: Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, DOI 10.1007/s00726-009-0358-0 (2009)