

BAKTERYJNE STRATEGIE WYKORZYSTANIA JONÓW METALI – KULISY CHEMII KOORDYNACYJNEJ

BACTERIAL STRATEGIES FOR THE USE OF METAL IONS – BACKSTAGE OF COORDINATION CHEMISTRY

**Karolina Piasta¹, Andrzej Mular¹, Anna Rola¹,
Valentyn Dzyhovskiy¹, Paulina Potok¹, Bartosz
Orzeł¹, Sławomir Potocki¹, Kamila Stokowa-Sołtys¹,
Henryk Kozłowski^{1,2}, Elżbieta Gumienna-
Kontecka^{1,*}**

¹ *Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

² *Zespół Chemii Medycznej, Instytut Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Opolski, ul. Katowicka 68, 45-060 Opole*

**e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Biomimetyczne analogi sideroforów jako strukturalne sondy procesów asymilacji żelaza przez mikroorganizmy

2. Toksyczność metali

3. Generowanie reaktywnych form tlenu przez kompleksy białek błonowych bakterii zaangażowanej w proces nowotworzenia

Uwagi końcowe


Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Andrzej Mular – doktorant IV roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie bada oddziaływania jonów metali z ligandami pochodzenia mikrobiologicznego i ich syntetycznymi analogami. Od 2022 roku Członek Królewskiego Towarzystwa Chemicznego.




 <https://orcid.org/0000-0003-1172-762X>



Mgr Anna Rola jest doktorantką w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej. Celem jej pracy jest zrozumienie oddziaływania między jonami takimi jak Zn(II), Ni(II), Cu(II), a fragmentami wybranych białek patogennych bakterii i grzybów.




 <https://orcid.org/0000-0001-7881-7174>



Mgr Valentyn Dzyhovskiy jest doktorantem III roku w Kolegium Doktorskim Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W swojej pracy bada oddziaływania jonów Fe(II), Cu(II) i Zn(II) z fragmentami białek transportujących jony metali u bakterii *Staphylococcus aureus*.




 <https://orcid.org/0000-0003-2089-1624>



Mgr Paulina Potok – doktorantka I roku Kolegium Doktorskiego Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zajmuje się analizą chemii koordynacyjnej kompleksów jonów metali przejściowych z bakteryjnymi metalopeptydazami w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej.




 <https://orcid.org/0000-0002-5263-6794>



Mgr Bartosz Orzel jest doktorantem I roku w Kolegium Doktorskim Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zajmuje się badaniem oddziaływania jonów Fe(II), Mn(II) i Zn(II) z fragmentami białek bakteryjnych transportujących jony metali przejściowych.




 <https://orcid.org/0000-0001-9299-1697>



Dr Karolina Piasta uzyskała stopień doktora w 2020 r. Adiunkt naukowy w ramach stażu podoktorskiego w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, zajmująca się badaniem naturalnych metaloforów i ich analogów oraz ich kompleksów, głównie z dwuwartościowymi jonami metali.



 <https://orcid.org/0000-0003-0160-6920>



Dr inż. Sławomir Potocki – absolwent Politechniki Wrocławskiej, Uniwersytetu Wrocławskiego i École Normale Supérieure de Cachan. Stopień doktora uzyskał na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w 2014 r. pod kierunkiem prof. Henryka Kozłowskiego. Laureat programu Marie Skłodowska-Curie, Horyzont 2020. Aktualnie kierownik grantu NCN SONATA: „Zrozumienie oddziaływań cynku z regulatorami transkrypcji z rodziny *ArsR* z *Mycobacterium tuberculosis*”.



<https://orcid.org/0000-0002-5528-7200>



Zjednoczonych).

Dr Kamila Stokowa-Sołtys – Wrocławianka Roku 2021, na liście „22 Polek, które warto obserwować” Forbes Women, stypendystka Fundacji Kościuszkowskiej. Kierowała projektem OPUS NCN. Zainteresowania badawcze obejmują właściwości koordynacyjne i prooksydatywne fragmentów białek powierzchniowych *F. nucleatum* oraz syntezę związków hamujących rozwój tej bakterii czy też namnażanie wirusa SARS-CoV-2 (projekt realizowany w Stanach



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



Prof. dr hab. Henryk Kozłowski – twórca polskiej chemii bionieorganicznej. Członek Rzeczywisty PAN. Pełni funkcję dyrektora Instytutu Nauk o Zdrowiu na Uniwersytecie Opolskim i jest profesorem emerytowanym na Wydziale Chemii UW. Tematyka badań prof. Kozłowskiego obejmuje zagadnienia z pogranicza chemii, biologii i medycyny, koncentrując się wokół homeostazy jonów metali.



<https://orcid.org/0000-0001-5769-8583>



Horyzont 2020 UE. Nagradzana m.in. przez MNiSW, Rektora UW. Od 2021 r. członkini Society of Biological Inorganic Chemistry Council.

Prof. dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka kieruje Zespołem Biologicznej Chemii Nieorganicznej na WChUWr, gdzie bada strukturę i termodynamikę układów bionieorganicznych, a szczególnie transport i homeostazę jonów metali u patogenów, zależności struktura-funkcja metaloforów, ich kompleksów oraz układów biomimetycznych. Laureatka stypendium naukowego Marie Skłodowskiej-Curie (Uniwersytet w Strasburgu), odbyła liczne staże badawcze w Europie i USA. Kierowała projektami finansowanymi przez MNiSW, NCN, czy



<https://orcid.org/0000-0002-9556-6378>

ABSTRACT

In the Biological Inorganic Chemistry Group we are inspired to better understand metal ions acquisition and homeostasis in pathogenic bacteria, and in this review we present three different approaches to the role of these processes.

The growing importance of a full understanding of the iron transport system in pathogens prompted us to study synthetic analogs of siderophores, used as structural probes in the process of iron uptake by microorganisms. The ferrichrome biomimetic analogs allowed efficient Fe(III) chelation under biological conditions and were recognized better by *P. putida*. than *E. coli*, suggesting differences in uptake mechanisms. Addition of a fluorescent probe to the compound allowed to track biological fate of studied complexes [1, 2]. Biomimetics of ferrioxamine E revealed their potential as radioactive $^{68}\text{Ga(III)}$ -based probes [3], and studies of Zr(IV) complexes permitted to explain the *in vivo* behavior of desferrioxamine B as $^{89}\text{Zr(IV)}$ radionuclide carrier [4], as well as design better chelators for this metal ion [5].

One of the possible mammalian immune system responses to mycobacterial infection is the increase of Zn(II) concentration in phagosomes to a toxic level [6-8]. The mycobacterial SmtB protein is a transcription regulator that in the presence of high concentrations of metals, dissociates from DNA and activates the expression of metal efflux proteins. We focused on $\alpha 5$ Zn(II) binding domains of SmtB/BigR4 proteins [9], looking at the coordination modes and thermodynamics of their Zn(II) and Ni(II) complexes. The study points out the specificity of metal-ligand interactions and the effect of mutations on the coordination properties of studied systems. The project can be considered as an introduction to the new strategies in tuberculosis treatment based on Zn(II)/Ni(II)-sensitive mechanisms.

F. nucleatum is an anaerobic bacteria present in the plaque. It leads not only to periodontal diseases but also, angina, purulent inflammation of the lung tissue or reproductive organs [10]. Moreover, *F. nucleatum* promotes colon cancer growth [11]. This bacteria strain promotes inflammation and tumorigenesis by modulating the tumor immune microenvironment [12, 13]. Microbial pathogens drive tumorigenesis in 15–20% of cancer cases [14]. However, not only microorganisms are considered a major risk factor, but also metal ions play an important role in tumor promotion [15, 16]. Therefore, our primary research goal is to investigate the effect of metal ions coordination on the activity of outer-membrane proteins from *F. nucleatum* and to answer whether these proteins increase the prooxidative activity of Cu(II) and Fe(II) ions [16-18].

Keywords: metal homeostasis, metalophores, metalloproteins, metal toxicity,

Słowa kluczowe: homeostaza metali, metalofory, metaloproteiny, toksyczność metali,

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CDF	– <i>Cation Diffusion Facilitators</i> , białka ułatwiające dyfuzję kationów
DFO	– Desferrioksamina B
FC	– Ferrichrom
FOXE	– Ferrioksamina E
PET	– Pozytonowa Tomografia Emisyjna
QD	– <i>Quantum Dot</i> , kropka kwantowa
RFT	– Reaktywne formy tlenu

WPROWADZENIE

Według WHO i najnowszych analiz [19, 20], w ostatnich dekadach obserwujemy gwałtowny wzrost oporności patogenów na środki przeciwdrobnoustrojowe, czyniąc powszechne choroby zakaźne nieuleczalnymi i stanowiącymi coraz poważniejsze zagrożenie dla zdrowia publicznego na świecie, co z kolei wymaga opracowania nowatorskich, skutecznych metod leczenia i sposobów ich specyficznego dostarczania bakteriom i grzybom opornym na antybiotyki. Jednym ze sposobów walki z patogenami jest celowanie w homeostazę jonów metali, które często stanowią element, o który mikroorganizmy konkurują z gospodarzem [21]. Zainteresowania naukowe Zespołu Biologicznej Chemii Nieorganicznej doskonale wpisują się w ten obszar badawczy, obejmując szerokie spektrum zagadnień chemii bionieorganicznej i biomedycznej, a zwłaszcza takie jej działy jak asymilacja, transport i homeostaza jonów metali (m.in. żelaza, miedzi, cynku czy niklu) u patogenów. Badania zależności struktura-funkcja metaloformów i ich biomimetyków służą jako narzędzia do opracowania nieinwazyjnych, działających *in vivo* czynników obrazujących pozwalających na bardziej specyficzną i czułą diagnostykę i rozróżnienie źródła infekcji bakteryjnych/grzybiczych oraz leków opartych o zasadę konia trojańskiego.

Badania termodynamiki, struktury i funkcji kompleksów metal-białko/peptyd są wstępem do projektowania nowej strategii terapeutycznej wobec patogennych szczepów bakteryjnych. Ze względu na możliwe działanie toksyczne jonów metali w komórkach bakteryjnych, nasze badania obejmują również analizę oddziaływań cynku oraz niklu z metalo-zależnymi regulatorami transkrypcji ArsR/SmtB bakterii *Mycobacterium tuberculosis*. Rodzina białek ArsR/SmtB jest jednym z czynników zapewniających przeżycie prątków gruźlicy podczas ekspozycji na zbyt wysokie stężenie metali.

Jednym z naszych celów jest również uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy białka adhezyjne *Fusobacterium nucleatum* zwiększają prooksydatywną aktywność jonów żelaza i miedzi? To zagadnienie jest bardzo interesujące między innymi ze względu na jego istotny aspekt społeczny i ekonomiczny. Nasze badania mają bowiem za zadanie wyjaśnić molekularny mechanizm oddziaływań pomiędzy ważnymi biologicznie jonami metali, a białkami powierzchniowymi bakterii związanej z patogenezą chorób nowotworowych. Wiadomo, że wiele tych chorób ma charakter dietopochodny. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na dodatnią korelację pomiędzy spożywaniem bogatego w przejściowe jony metali czerwonego mięsa a częstotliwością występowania nowotworów przewodu pokarmowego, zwłaszcza jelita grubego.

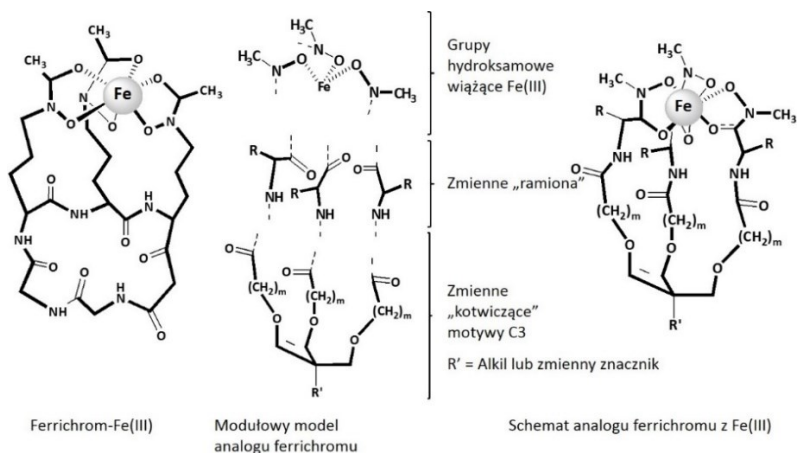
1. BIOMIMETYCZNE ANALOGI SIDEROFORÓW JAKO STRUKTURALNE SONDY PROCESÓW ASYMLACJI ŻELAZA PRZEZ MIKROORGANIZMY

Żelazo jest mikroelementem niezbędnym dla wszystkich organizmów żywych, jednak trudno dostępnym. Aby ułatwić odpowiedni wychwyt jonów Fe(III) ze środowiska mikroorganizmy wykształciły system poboru tego metalu oparty na niskocząsteczkowych związkach, zwanych sideroforami, które wydzielane do otoczenia wiążą jony żelazowe i wracają do komórki poprzez specyficzne dla danego sideroforu receptory błonowe i białka transportowe. Właściwości i biologiczna aktywność sideroforów dyktowana jest przez ich strukturę, chiralność oraz to, w jakim stopniu kształt kompleksu pasuje do miejsc wiążących receptora. Ze względu na ogromną różnorodność strukturalną, skomplikowaną budowę sideroforów (dotąd wyizolowano ich ponad 500) [22] oraz dużą specyfikę oddziaływania z dedykowanymi receptorami, pomimo rozwiązania struktur krystalicznych kilku receptorów, i wglądu w reszty uczestniczące w wiązaniu ligandów i kompleksów, wymagania strukturalne i charakter interakcji siderofor - białko receptorowe nie są jeszcze absolutnie dostatecznie poznane. W takiej sytuacji badania syntetycznych analogów jako biomimetyków naturalnych sideroforów, mają na celu przybliżenie kluczowych czynników istotnych dla rozpoznania i transportu ich kompleksów z jonami Fe(III). Główną podstawą takiego zastosowania jest uzyskanie funkcjonalności naturalnego związku bez konieczności wprowadzania jego pełnej, szczegółowej struktury. Metodologia projektowania struktur biomimetycznych opiera się na identyfikacji głównych, niezbędnych elementów oraz ich grup obecnych w złożonych systemach biologicznych, i wprowadzeniu dokładnie tych detali do możliwie najprostszyc struktur molekularnych [23].

Wzrost znaczenia pełnego zrozumienia systemu transportu żelaza u patogenów, jak również wspomniane wcześniej trudności w syntezie naturalnych, strukturalnie skomplikowanych sideroforów, skłoniły nas do badań nad ich syntetycznymi analogami, wykorzystywanymi jako strukturalne sondy w procesie poboru żelaza przez mikroorganizmy. Racjonalnie zaprojektowane biomimetyki sideroforów, rozpoznawane i wykorzystywane przez te same systemy wychwyty, co naturalne siderofory, mogą stanowić wyjątkową platformę badań nad kluczowymi elementami struktury, efektami ich modyfikacji oraz strategicznymi czynnikami wpływającymi na dopasowanie kompleks-receptor. Ponadto, w połączeniu z odpowiednimi markerami, np. sondami fluorescencyjnymi, mogą stanowić nowe, nieinwazyjne środki do obrazowania *in vivo*, które zapewnią bardziej czułe i specyficzne metody diagnozowania i rozróżniania inwazyjnych zakażeń grzybiczych / bakteryjnych, lub platformy do transportu leków, działające na zasadzie konia trojańskiego.

W pracach z tej tematyki, prowadzonej we współpracy z prof. A. Shanzerem (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael) [1, 2] przedstawiliśmy badania kilkunastu biomimetycznych analogów naturalnego i najszerzej poznanego sideroforu – ferrichromu, FC (Schemat 1), który jest prototypem sideroforów hydroksamowych [24], oraz ferrioksaminy E, FOXE, cyklicznego sideroforu hydroksamowego wykorzystywanego przez wiele gatunków bakterii. Co istotne, mimo, że są to siderofory produkowane przez konkretne gatunki grzybów czy bakterii, mogą być rozpoznawane także przez receptory obecne na powierzchni komórek innych mikroorganizmów. Pomimo poznania wielu szczegółów dotyczących procesu asymilacji jonów żelaza w formie kompleksów z FC czy FOXE, również dzięki syntetycznym analogom, wciąż nie do końca jest jasne, jakie dokładnie elementy struktury cząsteczki tych sideroforów decydują o rozpoznaniu tworzonego kompleksu przez ich receptory, odpowiednio FhuA [25] oraz FoxA [26, 27]. Pomimo opracowania wielu biomimetyków sideroforów, dla FC oraz FOXE nie pokonano dotąd pewnych nieodłącznych ograniczeń, w tym: (i) niskiej ogólnej liczby analogów zdolnych do promowania wzrostu drobnoustrojów, szczególnie patogennych jak *E. coli* oraz (ii) faktu, że aktywność u wielu gatunków, podobną do natywnych FC oraz FOXE, uzyskiwano tylko sporadycznie.

Projektując serię mimetyków dla FC oparliśmy ich strukturę na czterech podstawowych elementach: (i) C_3 -symetrycznym (tripodalnym) motywie, zastępującym natywny heksapeptyd FC; (ii) jego rozbudowie poprzez ramiona będące pochodnymi naturalnych aminokwasów i (iii) zakończone ugrupowaniem retrohydroksamowym, oraz (iv) zachowaniu apikalnego atomu C, pozwalającego na wydajną koniugację fluorescencyjnego chromoforu, która nie zakłóca wiązania żelaza, ani rozpoznania przez receptor (Schemat 1).



Schemat 1. Struktura kompleksu ferrichromu z Fe(III) oraz elementy strukturalne zaprojektowanych analogów

Scheme 1. Structure of the Fe(III)-ferrichrome complex and structural elements of the designed analogs

Co istotne, w proponowanych analogach zastosowaliśmy następujące dodatkowe strategie ich modyfikacji: (v) optymalizację ogólnego rozmiaru i względnej orientacji wiązań, (vi) zwiększenia wiązań wodorowych poprzez wprowadzenie zewnętrznych donorów H w szkielecie ramion lub grup polarnych oraz (vii) modyfikację pozycji α -grupą metylową [1, 2].

Na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem szeregu komplementarnych metod fizykochemicznych stwierdziliśmy, że kompleksy tripodalnych analogów FC z jonami Fe(III) charakteryzują wysokie wartości stałych trwałości (rzędu 10^{27} - 10^{28}) oraz pFe mniej niż dwa rzędy wielkości niższe niż dla FC (pFe = $-\log[\text{Fe(III)}]_{\text{aq}}$, wyznaczone w pH=7.4, dla $c_{\text{ligand}} = 1 \cdot 10^{-5}$ M i $c_{\text{Fe}} = 1 \cdot 10^{-6}$ M - stężenie jonów metalu fizjologiczne dla mikroorganizmów), pozwalając na efektywne chelatowanie jonów Fe(III) w warunkach biologicznych. Badania biologiczne, przeprowadzone na dwóch szczepach bakterii, *Pseudomonas putida* JM218 oraz *E. coli* UT5600 pozbawionych zdolności syntezy FC, pozwoliły sprawdzić rozpoznawalność kompleksów przez receptory bakteryjne, a zatem ocenić czy dzięki wprowadzonym modyfikacjom mogą stanowić biomimetyczne analogi ferrichromu. Z przeprowadzonych badań wynika, że bakterie *E. coli* są znacznie bardziej selektywne niż *P. putida*, a fakt, że niektóre analogi nie transportowały żelaza do *E. coli*, będąc w pełni aktywne u *P. putida*, sugeruje, że systemy wychwytu FC z tych dwóch szczepów bakteryjnych nie są identyczne.

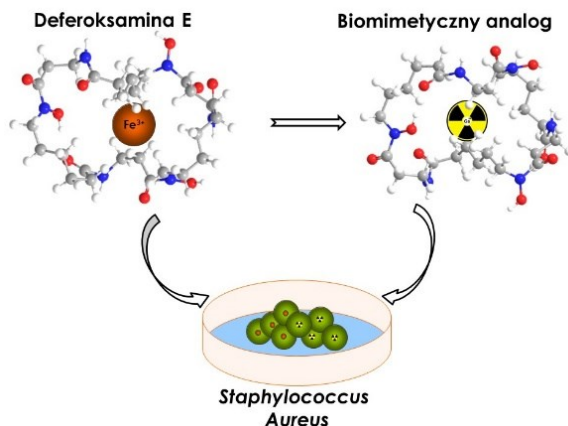
Dwa główne parametry strukturalne wydają się kontrolować rozpoznanie analogów FC przez bakteryjny receptor FhuA i są to: (i) obecność podstawników na ramionach chelatujących jony Fe(III) oraz (ii) długość łącznika pomiędzy kotwiczącym motywem C3 oraz grupami hydroksamowymi. Zasadniczo, w badanej serii biomimetyków, obecność podstawników zakłóca rozpoznanie kompleksu przez FhuA, z wyjątkiem reszt karboksylanowych, które mogą odgrywać pewną rolę w tworzeniu wiązań wodorowych z transporterem, a optymalna długość łącznika to dwie reszty metylenowe. Przestrzeganie tych wytycznych prowadzi do uzyskania aktywności u szerokiego spektrum mikroorganizmów, także bardzo restrykcyjnej *E. coli* (długo oczekiwany cel!), a ich zignorowanie powoduje, że analogi rozpoznawane są tylko przez receptor bardziej tolerancyjnej *P. putida*.

Wprowadzenie barwnika naftalimidowego do struktury najbardziej aktywnego i szeroko rozpoznawanego chelatora pozwoliło na śledzenie jego dystrybucji w komórce bakteryjnej (peryplazma) i grzybiczej (cytozol), wskazując tym samym cele terapeutyczne. Odkrycia te są zgodne z raportem dotyczącym aktywności przeciwdrobnoustrojowej hydroksamowego sideroforu sprzężonego z antybiotykiem β -laktamowym u bakterii Gram-ujemnych [28]. Ten sam chelator przyłączono również do powierzchni kropki kwantowej (QD) i inkubowano jego kompleks z jonami Fe(III) z bakteriami w środowisku ubogim w żelazo. W przeciwieństwie do sondy naftalimidowej, fluorescencja zastosowanej QD nie jest wygaszana w obecno-

ści związanych jonów Fe(III), dzięki czemu można było obserwować tworzenie klastrów bakteryjnych na powierzchni QD. Takie zachowanie przybliżyło nas do opracowania metod koncentracji komórek bakteryjnych przy użyciu różnych analogów sideroforów, a co za tym idzie metodologii selektywnego zateżnienia bakterii w rozcieńczonych próbkach, zwłaszcza gdy pojawiają się problemy z hodowlą [2].

Kolejną grupą badanych biomimetyków była seria 6 analogów cyklicznego sideroforu – ferioksaminy E (FOX E). Badane związki różniły się położeniem atomu azotu z grupy hydroksamowej w pozycji retro (retrohydroksamy). Taka modyfikacja nie wpływa znacząco na stałą trwałości kompleksu [29], a jednocześnie upraszcza syntezę [27]. Drugą znaczącą modyfikacją była zmiana wielkości 33-członowego pierścienia naturalnego sideroforu wpływająca na wielkość wnęki koordynacyjnej wewnątrz heterocyklicznego układu.

Podczas szeroko zakrojonych badań obejmujących właściwości koordynacyjne tak przygotowanych sideroforów dostarczyliśmy wyczerpujących informacji o sile ich wiązania, trwałości i sposobie koordynacji jonów Fe(III), Fe(II) i Ga(III), które pomimo wprowadzonych modyfikacji wiążą z siłą porównywalną do naturalnych związków. Kolejnym krokiem były badania biologiczne mające na celu określenie zdolności do rozpoznawania, pobierania i włączenia w szlaki metaboliczne proponowanych analogów przez mikroorganizmy. W tym celu użyto radioaktywny izotop ^{68}Ga , który został podany kolonii bakteryjnej. Po czasie inkubacji zmierzono poziom radioaktywności kolonii za pomocą licznika promieniowania gamma i w ten sposób określono wychwyty badanych analogów względem naturalnego sideroforu, FOX E. Dodatkowo przeprowadzono próby wzrostu kolonii bakteryjnych, gdzie jedynym źródłem żelaza, mikroelementu niezbędnego do rozwoju, były badane analogi. Badania takie zostały przeprowadzone we współpracy z prof. C. Decristoforo (Uniwersytet Medyczny w Innsbrucku, Austria). Pierwsza część badań biologicznych, w których wykorzystano bakterie z gatunku *S. aureus* dały bardzo obiecujące rezultaty. Analogi najbardziej podobne do naturalnego sideroforu, a więc FOX 2-5, FOX 2-6 i FOX 3-5 były rozpoznawane i pobierane przez bakterie na poziomie nie wiele mniejszym od próby kontrolnej FOX E, obserwowano także znaczny wzrost kolonii bakteryjnych suplementowanych kompleksami Fe(III)-FOX dla analogów 2-4, 2-5, 2-6 i 3-5 [29].



Schemat 2. Schematyczne przedstawienie wykorzystania biomimetyków sideroforów jako sondy znakowane jonami radioaktywnych izotopów metali

Scheme 2. Schematic representation of the use of siderophore biomimetics as probes labeled with radioactive metal isotopes

Powyższe badania pokazały, że siderofory i ich analogi mogą być podstawą nieinwazyjnych czynników kontrastowych działających *in vivo*, a najlepszym przykładem jest stosowanie w tym aspekcie kompleksu jonów $^{89}\text{Zr(IV)}$ z desferrioksaminą B (DFO), pomimo faktu, iż badania biologiczne wskazują na uwalnianie się jonu metalu *in vivo* i jego akumulację w kościach. Zatem, jednym z kluczowych elementów radiofarmaceutyku wykorzystywanego w obrazowaniu, np. Pozytonową Tomografią Emisyjną (PET), jest czynnik chelatujący – ligand, który wiąże jon metalu radioaktywnego tworząc termodynamicznie trwałe, kinetycznie inertny kompleks koordynacyjny, który *in vivo* skierowany zostanie w odpowiednie miejsce za pomocą kowalencyjnie związanego wektora, umożliwiając obrazowanie (lub terapię) danej tkanki. Obecne kierunki rozwoju radiochemii i medycyny nuklearnej podkreślają ważne znaczenie PET, a wśród najbardziej obiecujących w jej rozwoju jonów metali wymienia się izotopy $^{68}\text{Ga(III)}$ i $^{89}\text{Zr(IV)}$.

Ponieważ w literaturze nie opisano charakterystyki termodynamicznej układu DFO – Zr(IV), w 2019 roku podjęliśmy takie badania, z sukcesem przezwyciężając wszystkie trudności jakie napotyka charakterystyka chemii roztworów wodnych kompleksów jonów Zr(IV), wynikające z silnej tendencji do hydrolizy i braku informacji spektroskopowych [4]. Zaproponowany model wskazywał na obecność tylko kompleksów monojądrowych, w całym mierzonym zakresie pH (1-11), a wyznaczone stałe trwałości pozwoliły uplasować desferrioksaminę wśród dobrych chelatorów jonów Zr(IV). Jednak tworzenie 6-koordynacyjnych, nienasyconych kompleksów (ze sferą koordynacyjną 8-koordynacyjnego jonu Zr(IV) uzupełnioną

cząsteczkami wody), razem z podatnością skoordynowanych cząsteczek wody na deprotonację sugerowane są jako przyczyna niestabilności kompleksów $^{89}\text{Zr(IV)}$ -DFO *in vivo*.

Dalej, badania kolejnych kilku tri- i tetra-hydroksamowych analogów sideroforów pozwoliły zbadać wpływ strukturalnych elementów liganda, takich jak liczba grup wiążących, możliwość zaistnienia efektu makrocyklicznego, rozmiar wnętrza liganda czy jego symetria, na właściwości fizykochemiczne kompleksów jonów Zr(IV) i Ga(III) [5]. Należy przy tym zaznaczyć, że, jak dotąd, wartości stałych trwałości tetrahydroksamowych kompleksów jonów Zr(IV) były wyznaczane jedynie na podstawie obliczeń teoretycznych dla liniowego DFOB oraz cyklicznego CTH36 [30-32]. Badany ligand trihydroksamowy stanowi efektywny chelator dla jonów Ga(III), jednakże trwałość jego kompleksu z jonami Zr(IV) jest o jeden rząd trwałości słabszy niż Zr(IV)-DFOB. W przypadku liganda tetrahydroksamowego zaobserwowano wzrost trwałości o 8.5 rzędów trwałości w stosunku do analogu trihydroksamowego, co jest konsekwencją wprowadzenia do struktury liganda czwartej grupy hydroksamowej. Podsumowując, określenie trwałości termodynamicznej kompleksów powyższych metali w połączeniu z odpowiednią strukturą liganda pomoże w dalszym rozwoju optymalnych chelatorów do zastosowań w obrazowaniu PET. Zdajemy sobie jednak sprawę, że w celu wykorzystania tych ligandów jako chelatorów PET potrzebne są kolejne badania, takie jak wydajność i kinetyka radioznakowania, testy biodystrybucji itp. Obecnie koncentrujemy się na projektowaniu i badaniach tetrapodalnych ligandów hydroksamowych, aby określić, jak ich kształt i wielkość wpływają na trwałość termodynamiczną kompleksów jonów Zr(IV) [5].

Zatem, przedstawione badania pozwalają na lepsze rozumienie procesów asymilacji jonów żelaza u mikroorganizmów oraz opracowanie schematu postępowania w analizie oddziaływań kompleks Fe(III)-biomimetyk z receptorem, szczególnie istotne, w przypadku braku danych krystalograficznych dla receptorów sideroforów. Wiodące wytyczne pozwalające na projektowanie analogów o szerokim spektrum rozpoznania obejmują (i) modelowanie transportera o najbardziej rygorystycznych wymaganiach, jak transporter u *E. coli*; (ii) opracowanie biblioteki analogów, w których każdy element budulcowy może być systematycznie i stopniowo modyfikowany, aż do uzyskania optymalizacji, jak zademonstrowano w naszych pracach na przykładzie stopniowej modyfikacji struktur modułowych analogów FC czy FOXE. Ciekawe, że nawet mniej znaczące modyfikacje mogą niwelować możliwość rozpoznania przez szerokie spektrum mikroorganizmów, prowadząc tym samym do analogów rozpoznawanych przez wąskie spektrum stosując praktycznie tę samą platformę.

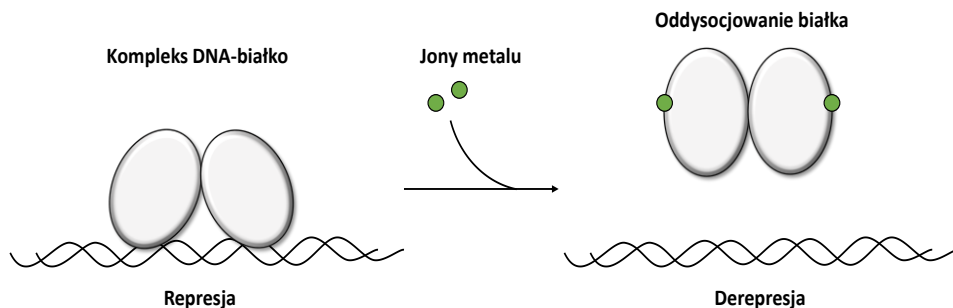
Ze względu na różnorodną stymulację wzrostu komórek bakteryjnych biomimetyki mogą potencjalnie znaleźć bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce i leczeniu różnego rodzaju zakażeń [24, 33]. Związki, które są rozpoznawane przez wiele szczepów bakteryjnych mogą np. stanowić nośniki leków o szerokim spektrum działania lub element układu koncentrowania bakterii, natomiast związki rozpoznawane tylko przez jeden rodzaj bakterii mogą stanowić podstawę testów wykrywających obecność konkretnych mikroorganizmów np. w płynach fizjologicznych.

2. TOKSYCZNOŚĆ METALI

Metale przejściowe są niezbędnymi pierwiastkami dla wszystkich form życia [34, 35]. Około jedna trzecia wszystkich białek do swojej biologicznej aktywności wymaga jonów metali, które pełnią rolę strukturalnych składników białek, bądź służą jako kofaktory w reakcjach enzymatycznych [36]. Zbyt wysokie lub za niskie stężenie metali niezbędnych do funkcjonowania komórek, może powodować ich obumieranie. Niektóre jony metali (np. Hg(II), Pd(II), Cr(III), As(III), itp.) są toksyczne dla komórek nawet w śladowych ilościach, natomiast inne (takie jak Cu(II), Zn(II)) mogą być tolerowane w większych ilościach. Taką zależność wykorzystują organizmy gospodarzy, które potrafią zwiększać stężenie niektórych metali do aktywnego zwalczania bakterii [37]. W celu zneutralizowania szkodliwego wpływu jonów metali ciężkich, drobnoustroje wykazują ekspresję genów kodujących białka, które biorą udział w ich transporcie, sekwestracji, buforowaniu i usuwaniu [38]. Do tej pory zidentyfikowano 7 głównych rodzin metaloregulatorów, których nazwy pochodzą od pierwszych zidentyfikowanych przedstawicieli: MerR, ArsR/SmtB, DtxR, Fur, NikR CsoR/RncF, CopY [39-41]. Poprzez wiązanie jonów metali, wspomniane metaloproteiny, bezpośrednio tłumią lub aktywują transkrypcję operonów kodujących m.in. pompy wypływu metali, transportery membranowe, reduktazy metali, białka transportujące lub sekwestrujące, a także same regulatory transkrypcji [42].

Rodzina homodimerowych białek ArsR/SmtB umożliwia bakteriom przetrwanie w trudnych warunkach środowiskowych wywołanych przez układ odpornościowy gospodarza. Do rodziny ArsR należą białka wrażliwe na takie jony metali, jak np. Zn(II) (SmtB), Cd(II) i Pb(II) (CmtR), Ni(II) i Co(II) (Nmtr, KmtR). Białka z rodziny ArsR/SmtB posiadają wysoce konserwatywny motyw helisa-skreć-helisa (HTH - ang. *helix-turn-helix*) rozpoznający DNA. Gdy stężenie jonów metali jest niskie w komórce, białka pozostają związane z DNA i bezpośrednio hamują ekspresję operonów uczestniczących w szlakach metabolicznych specyficznych dla określonego metalu. Gdy w komórce poziom jonów metali jest toksyczny, zostają one związane przez białka ArsR/SmtB. Następnie, taki kompleks oddysocjowuje od DNA, co prowadzi do ekspresji białek odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy metali

(Rysunek 1) [43]. Konsekwencją tak działającego mechanizmu jest utrzymywanie stężenia metali przejściowych (i innych) na odpowiednim poziomie i dzięki temu hamowanie ich szkodliwego wpływu [42].

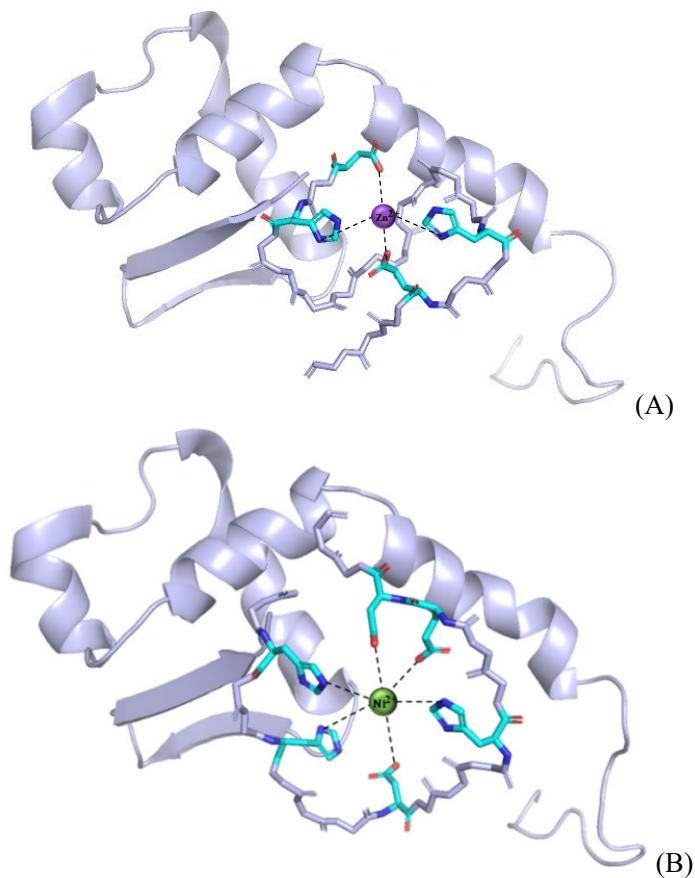


Rysunek 1. Mechanizm działania białkowych regulatorów transkrypcji z rodziny ArsR/SmtB (opracowanie własne na podstawie [41])

Figure 1. Mechanism of action of protein transcriptional regulators from the ArsR / SmtB family (own elaboration based on [41])

Jednym z przedstawicieli rodziny metalo-zależnych regulatorów transkrypcji jest białko SmtB wyizolowane z bakterii *Mycobacterium tuberculosis*. Odpowiedzią immunologiczną organizmu ludzkiego na infekcję *M. tuberculosis* jest m.in. zwiększenie stężenia miedzi i cynku w fagosomie (wakuoli, która podczas fagocytozy otacza patogenną komórkę – bakterię), dlatego też kontrola homeostazy tych jonów jest kluczowa w patogenezie bakterii. SmtB działa jako represor transkrypcji białek z rodziny CDF (ang. Cation diffusion facilitators) odpowiedzialnych za usuwanie jonów cynku z cytozolu na zewnątrz komórki. Przy niskim, nietoksycznym stężeniu cynku, białko SmtB związane jest z DNA, bezpośrednio hamując ekspresję białek CDF. Gdy stężenie cynku w komórce jest wysokie, SmtB wiąże jony Zn(II), co zmniejsza jego powinowactwo do DNA. Białko oddysocjowuje od regionu operator-promotor, w konsekwencji czego jony cynku wydalone są na zewnątrz komórki przez białka CDF. Za wiązanie koordynacyjne jonów cynku, który wywołuje kaskadę reakcji i przemian prowadzących do utrzymania homeostazy jonów metali w komórce bakteryjnej, odpowiada domena wiążąca $\alpha 5$ o następującej strukturze pierwszorzędowej: ${}_{116}\text{DHHLAHIVLDAVAHAGE}_{132}$. Nasze badania skupiają się na opisie właściwości domen wybranych wirulencyjnych białek bakteryjnych jako ligandów dla jonów metali z punktu widzenia chemii koordynacyjnej oraz bionieorganicznej. Wykorzystanie metod bioanalitycznych takich jak: spektrometria mas, potencjometria, spektroskopia UV-Vis, dichroizm kołowy czy spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliło nam na określenie dokładnych miejsc wiążących cynk, a także geometrii kompleksu modelowego peptydu domeny $\alpha 5$ białka SmtB (*M. tuberculosis*) oraz BigR4 (*M. smegmatis*) i jej mutantów. Analiza struktury i właściwości termodynamicznych tej domeny z innym metalem przejściowym

wym – niklem, pozwoliła na określenie znaczenia poszczególnych reszt aminokwasowych w wiązaniu jonów cynku oraz niklu. Wykazano, że domena $\alpha 5$ mykobakteryjnego białka SmtB charakteryzuje się innym motywem wiążącym dla jonów Zn(II) – DXHX₁₀HXXE i jonów Ni(II) – HX₄HX₃DX₃HXXED (Rysunek 2) [9, 44]. Podobieństwem dla cynkowych i niklowych kompleksów jest zróżnicowany typ donorów wiążących jon metalu: są to zarówno reszty histydyny, jak i kwasowe reszty aminokwasowe. W przypadku kompleksów jonów Zn(II), tylko dwie z czterech obecnych w sekwencji reszt histydyny są zaangażowane w wiązanie metalu. Sferę koordynacyjną jonu cynku dopełnia reszta kwasu asparaginowego i glutaminowego. W kompleksie Ni(II) natomiast, jon metalu jest związany z trzema resztami histydyny oraz najprawdopodobniej z trzema resztami aminokwasów kwasowych: glutaminowego i asparaginowego. Różna liczba donorów w kompleksie z jonami Zn(II) i Ni(II) wynika najprawdopodobniej z tego, że jony cynku preferują geometrię tetraedru (l. koordynacyjna = 4), natomiast jony Ni(II) – oktaedru (l. koordynacyjna = 6), lub płaskiego kwadratu (l. koordynacyjna = 4).



Rysunek 2. Proponowany model kompleksu białka SmtB z jonami (A) cynku, (B) niklu
Figure 2. The proposed model of the SmtB protein complex with (A) zinc and (B) nickel ions

Badania dotyczące właściwości kompleksów jonów metali oraz modelowych peptydów, będących fragmentami wirulencyjnych białek bakteryjnych, dostarczają informacji niezbędnych do pełnego zrozumienia mechanizmu homeostazy metali w patogennych organizmach. To potencjalnie ważny krok w kierunku planowania i projektowania nowych strategii terapeutycznych chorób wywołanych przez bakterie.

3. GENEROWANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU PRZEZ KOMPLEKSY BIAŁEK BŁONOWYCH BAKTERII ZAANGAŻOWANEJ W PROCES NOWOTWORZENIA

Wiele ostatnich badań wskazuje na związek pomiędzy dysbiozą (patologiczną florą bakteryjną przewodu pokarmowego) a występowaniem gruczolaków (stosunkowo jeszcze niegroźnych, wczesnych stadiów raka) i nowotworów jelita grubego [45]. Dokładny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze znany. W sierpniu 2013 r w „Cell Host & Microbe” ukazały się dwa artykuły Kostic’a [12] i Rubinstein’a [13], dotyczące relacji pomiędzy obecnością w jelitach *Fusobacterium nucleatum* (symbiotycznej bakterii naturalnie występującej w jamie ustnej) a rakiem tego narządu.

Fusobacterium to jedna z najbardziej rozpowszechnionych beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Jej obecność w płytce nazębnej może być powodem nie tylko chorób przyzębia, ale także, gdy dostanie się do krwioobiegu [46], anginy, ropnego zapalenia tkanki płucnej lub narządów rodnych [47]. Uzyskane dotychczas wyniki sugerują, że *F. nucleatum* promuje nie tylko stan zapalny, ale także proces nowotworzenia. Ponadto, białka występujące na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej tej bakterii, tzw. białka adhezyjne, odpowiadają za jej związanie się z komórkami gospodarza i ich kolonizację [12, 48]. Dlatego też badania właściwości białek błony zewnętrznej są niezbędne do zrozumienia procesów patogenezы nowotworów jelita grubego [13].

Choroby nowotworowe układu pokarmowego, w szczególności jelita grubego, częściej związane są ze stylem życia niż z zaburzeniami genetycznymi. Stany zapalne, spożywanie produktów o dużej zawartości tłuszczu, wysoka konsumpcja czerwonego mięsa od lat znane są jako jedne z najważniejszych czynników etiologicznych tych chorób. W raporcie opublikowanym niedawno przez World Cancer Fund i American Institute for Cancer Research, by zmniejszyć częstotliwość występowania nowotworów zaleca się znaczne ograniczenie spożycia czerwonego i przetworzonego mięsa [49]. Korelacja pomiędzy umieralnością na raka a dietą jest niezwykle silna. Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić tę zależność. Wyniki opublikowane przez Sawę [15], Sesinka [50] i Corpeta [51] sugerują, że jony metali przejściowych obecne w czerwonym mięsie, w tym w podrobach oraz przetworzonym mięsie [51], są głównym czynnikiem promocji nowotworu. Warto podkreślić, że jony te mogą

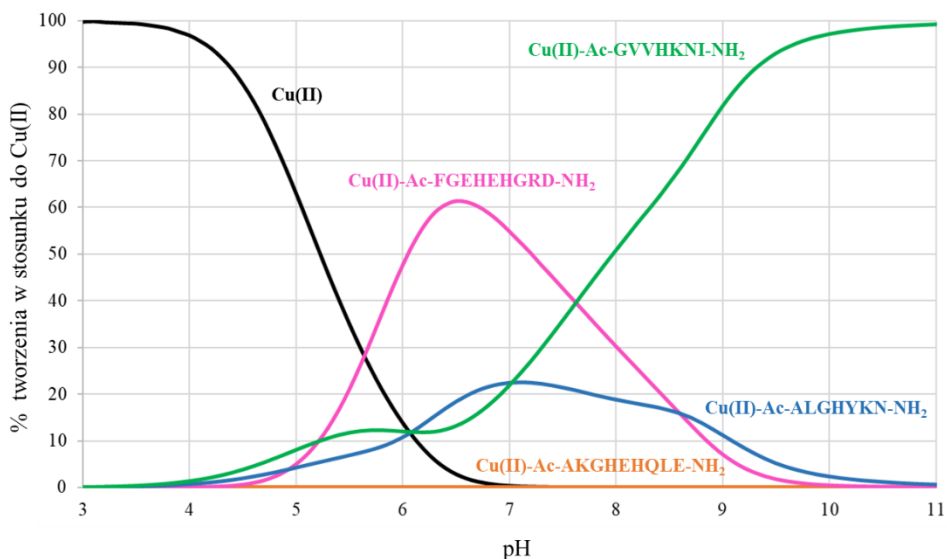
uczestniczyć w reakcji Fentona prowadząc do generowania reaktywnych form tlenu (RFT). Ze względu na długi czas przejścia treści kałowej przez jelito grube (12-30 godzin) i obecność endogennego nadtlenu wodoru, który jest wytwarzany przez np. oksygenazy hemowe [52], reakcja Fentona może być bardzo efektywna. Powstające RFT uszkadzają ważne biologicznie makromolekuły, w tym kwasy nukleinowe, białka i lipidy. Uszkodzenia DNA przyczyniają się do niestabilności genomu, powstawania mutacji i odgrywają istotną rolę w procesie nowotworzenia [53, 54]. Z kolei utlenianie białek może zakłócić funkcjonowanie receptorów, przeciwciał czy enzymów. Co więcej, takie utlenione białka mogą być uważane przez nasz układ odpornościowy jako obce, prowadząc tym samym do powstawania przeciwciał i reakcji autoimmunologicznych [55]. Lipidy także ulegają procesom utleniania. Produkty ich peroksydacji modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych. Jest to konsekwencją wprowadzenia grup polarnych do cząsteczek fosfolipidów, co skutkuje obniżeniem hydrofobowości wnętrza błony komórkowej. Efekt ten podwyższa przepuszczalność błon dla jonów wodorowych i innych substancji polarnych. Oprócz tego, peroksydacja lipidów powoduje zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportujących [56]. Wszystkie te zjawiska podwyższają ryzyko zachorowania na choroby dietopochodne, takie jak m.in. miażdżyca, cukrzyca czy nowotwory.

Uzyskane przez nas wyniki badań sugerują, że związanie jonów żelaza i miedzi do białek błonowych *Fusobacterium nucleatum* zwiększa efektywność generowania RFT. Co za tym idzie, przyczyniają się do uszkadzania potencjalnych celów komórkowych. Istotnym czynnikiem wpływającym na siłę i charakter oddziaływania związków na kwasy nukleinowe jest ich wypadkowy ładunek. Zarówno cząsteczki DNA, jak i RNA, jako polianiony silniej wiążą związki o wysokim ładunku dodatnim. Jednym ze sposobów zwiększania wypadkowego ładunku związku jest utworzenie kompleksów z jonami metali. Chelaty takie charakteryzują się nie tylko wyższym ładunkiem, ale bardzo często posiadają też odmienne właściwości fizykochemiczne niż nieskompleksowane ligandy w tych samych warunkach. Poza strukturą i ładunkiem często drastycznej zmianie ulega także reaktywność, w tym zdolność do generowania RFT. W efekcie badania kompleksów obfitują niejednokrotnie w znacząco większą liczbę oddziaływań niż badania samych ligandów [17].

Jednym z naszych celów badawczych jest zatem scharakteryzowanie molekularnych mechanizmów reaktywności kompleksów jonów Cu(II) z peptydami poprzez określenie ich zdolności do degradacji kwasów nukleinowych. Ponieważ degradacja materiału genetycznego, może zachodzić w różnoraki sposób, podjęto próbę określenia mechanizmu, jaki towarzyszy uszkodzeniom DNA oraz RNA.

Analiza porównawcza stałych trwałości badanych kompleksów wykazała, że w roztworze wodnym o wartości pH niższej od 7,5, jony miedziowe są najsilniej

wiązane przez peptyd o sekwencji Ac-FGEHEHGRD-NH₂, co obrazuje Rysunek 3. Sytuacja ulega zmianie dopiero w pH powyżej 8, w którym spośród badanych peptydów najefektywniejszym chelatorem staje się peptyd Ac-GVVHKNI-NH₂, co jest związane z tworzeniem licznych wiązań wodorowych stabilizujących strukturę kompleksu [16].



Rysunek 3. Wykres kompetycyjny obrazujący konkurencję w wiązaniu jonów Cu²⁺ pomiędzy wybranymi peptydami M:L 1:1.1, [Cu²⁺] = 1 mM

Figure 3. Competition plot illustrating the competition in Cu²⁺ ion binding between selected M: L 1: 1.1 peptides, [Cu²⁺] = 1 mM

W ramach pracy badawczej określono również wpływ peptydów i ich kompleksów na plazmidowy DNA. Zaobserwowano szereg intrygujących i wręcz nieprzewidywalnych efektów. Zgodnie z uzyskanymi wynikami zarówno kompleksy, jak i co radsze - ligandy, oddziałują w różnorodny sposób z DNA. Rozmiar i charakter uszkodzeń plazmidu może być jedynie efektem działania samych jonów Cu(II) lub też być wzmocniony efektem chelatacji. Właśnie taki destrukcyjny wpływ zaobserwowano w przypadku kompleksów z fragmentami białka porynowego P1 [17, 18]. Reakcji degradacji DNA często towarzyszy generowanie reaktywnych form tlenu, a w szczególności najbardziej z nich „agresywnego” rodnika hydroksylowego, co potwierdzono badaniami spektroskopowymi z użyciem NDMA (N,N-dimetylo-4-nitrozoanilina) [16, 17].

Zaobserwowano także zdolność niektórych peptydów do niespecyficznego degradacji DNA, polegającej na jego rozpadzie do krótszych form oligonukleoty-

dowych. Szczególnie silny efekt zaobserwowano w przypadku peptydów stanowiących fragmenty białka YadA, które w swej strukturze zawierały zasadowe aminokwasy [16].

Rezultaty uzyskanych badań przyczyniły się do głębszego poznania molekularnego podłoża chorób nowotworowych jelita grubego oraz stanowią „pomost” pomiędzy różnymi czynnikami etiologicznymi. Najważniejszym osiągnięciem tych badań jest określenie zależności pomiędzy dysbiozą przewodu pokarmowego a jonami metali występującymi w jelitach [10].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione przykłady metaloforów wskazują na ich centralną rolę w homeostazie jonów metali i ewolucji ważnych ludzkich patogenów.

Jak podkreślono, właściwości i aktywność biologiczna sideroforów podyktowane są ich strukturą, chiralnością oraz stopniem dopasowania kształtu kompleksu Fe(III)-siderofor do miejsc wiązania specyficznych białek receptorowych wewnątrz błony [57]. Z uwagi na znaczną różnorodność sideroforów i odpowiadających im receptorów, a także odkrycia nowych ról ligandów wcześniej uważanych za drugorzędowe chelatory, proces rozpoznawania sideroforów przez drobnoustroje nie jest jeszcze w pełni poznany. Dotychczasowe odkrycia potwierdzają również ideę dodatkowej roli sideroforów w pozyskiwaniu jonów metali innych niż Fe(III) oraz obronie przed toksycznością metali. Nadal jednak brakuje badań chemii koordynacyjnej w tym kontekście, określających ich powinowactwo wiązania do jonów Zn(II), Cu(II) i Cu(I) (obie formy prawdopodobnie obecne w fagosomie), jak również innych kationów. Lepsze zrozumienie tych właściwości oraz mechanizmu transportu kompleksów sideroforów z jonami metali pozwoli określić, w jaki sposób osiągnana jest swoistość jonów metali i sideroforów.

Toksyczność metali wobec patogennych bakterii stanowi solidną podstawę do projektowania nowych strategii terapeutycznych. Dokładne zbadanie mechanizmów homeostazy metali jest zatem kluczowym krokiem w tym kierunku. Nasze badania, dotyczące właściwości koordynacyjnych wybranych białek wirulencyjnych, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia oddziaływania metale-patogen.

Wykazano także, iż układy jon metalu-peptyd posiadają odmienne właściwości fizyko-chemiczne niż nieskompleksowane ligandy. Ponadto, cząsteczki kwasów nukleinowych jako polianiony, silniej wiążą związki o wysokim ładunku dodatnim, a taki właśnie posiadają kompleksy białek adhezyjnych po związaniu jonu metalu. Uzyskane wyniki świadczą o istotnym udziale reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju nowotworu i o zwiększaniu aktywności prooksydacyjnej jonów metali na skutek wiązania przez niektóre ligandy.

PODZIĘKOWANIE

Przedstawiona tematyka realizowana była w ramach kilku projektów badawczych, tj. NCN Opus 2012-2015, *Biomimetyczne analogi sideroforów jako strukturalne sondy procesów asymilacji żelaza przez mikroorganizmy*, NCN Opus 2016-2020, *Wychodząc poza "wystarczająco dobre": w poszukiwaniu efektywnych czynników chelatujących dla radioaktywnych jonów Cu-64, Ga-68 oraz Zr-89*, NCN Maestro 2018-2023, *Metalofory - zrozumienie (i wizualizacja) transportu metali w patogenach, by pomóc gospodarzowi oszukać najeźdźców*, NCN Sonata 2017-2022, *Zrozumienie oddziaływań cynku z regulatorami transkrypcji z rodziny ArsR z Mycobacterium tuberculosis*, NCN Opus 2015-2019, *Czy białka adhezyjne Fusobacterium nucleatum zwiększają prooksydatywną aktywność jonów żelaza i miedzi?* oraz programu COST, *Action Network for Equilibria and Chemical Thermodynamics Advanced Research (NECTAR) CA18202*.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Olshvang, A. Szebesczyk, H. Kozłowski, Y. Hadar, E. Gumienna-Kontecka, A. Shanzer, Dalton Trans., 2015, **44**, 2850.
- [2] J. Besserglick, E. Olshvang, A. Szebesczyk, J. Englander, D. Levinson, Y. Hadar, E. Gumienna-Kontecka and A. Shanzer, Eur. J. Chem., 2017, **23**, 13181.
- [3] A. Mular, A. Shanzer, H. Kozłowski, I. Hubmann, M. Misslinger, J. Krzywik, C. Decristoforo, E. Gumienna-Kontecka, Inorg. Chem., 2021, **60**, 17846.
- [4] Y. Toporivska, E. Gumienna-Kontecka, J. Inorg. Biochem., 2019, **198**, 110753/1.
- [5] Y. Toporivska, A. Mular, K. Piasta, M. Ostrowska, D. Illuminati, A. Baldi, V. Albanese, S. Pacifico, I.O. Fritsky, M. Remelli, R. Guerrini, E. Gumienna-Kontecka, Inorg. Chem., 2021, **60**, 13332.
- [6] O. Neyrolles, F. Wolschendorf, A. Mitra, M. Niederweis, Immunol. Rev., 2015, **264**, 249.
- [7] H. Botella, P. Peyron, F. Levillain, R. Poincloux, Y. Poquet, I. Brandli, C. Wang, et al., Cell Host & Microbe, 2011, **10**, 248.
- [8] S.L. Stafford, N.J. Bokil, M.E.S. Achard, R. Kapetanovic, M.A. Schembri, A.G. McEwan, M.J. Sweet, Biosci. Rep., 2013, **33**, 541.
- [9] A. Rola, R. Wieczorek, H. Korłowski, K. Krzywoszynska, S. Potocki, Dalton Trans., 2021, **50**, 12118.
- [10] K. Stokowa-Sołtys, K. Wojtkowiak, K. Jagiełło, J. Inorg. Biochem., 2021, **224**, 111586.
- [11] S. Bullman, C.S. Pedamallu, E. Sicinska, T. Clancy, S. Ogino, J. Tabernero, C. Fuchs, W.C. Hahn, P. Nuciforo, M. Meyerson, Cancer Res., 2018, **78**, 5129.
- [12] A.D. Kostic, E. Chun, L. Robertson, J.N. Glickman, C.A. Gallini, M. Michaud, T.E. Clancy, D.C. Chung, P. Lochhead, G.L. Hold, E.M. El-Omar, D. Brenner, C.S. Fuchs, M.W.S. Garrett, Cell Host Microbe, 2013, **14**, 207.
- [13] M.R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, Y.W. Han, Cell Host Microbe, 2013, **14**, 195.
- [14] A.P. Bhatt, M.R. Redinbo, S.J. Bultman, Ca-a Cancer J. Clin., 2017, **67**, 327.
- [15] T. Sawa, T. Akaike, K. Kida, Y. Fukushima, K. Takagi, H. Maeda, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 1998, **7**, 1007.

- [16] K. Stokowa-Sołtys, K. Kierpiec, R. Wieczorek, *Dalton Trans.*, 2022, **51**, 1.
- [17] K. Stokowa-Sołtys, K. Wojtkowiak, V. Dzyhovskiy, R. Wieczorek, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 12541/1.
- [18] K. Stokowa-Sołtys, V. Dzyhovskiy, R. Wieczorek, M. Jezowska-Bojczuk, J. Inorg. Biochem., 2021, **215**, 111332/1.
- [19] R. Laxminarayan, *Lancet*, 2022, **399**, 606.
- [20] C.J.L. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G.R. Aguilar, A. Gray, et al. *Lancet*, 2022, **399**, 629.
- [21] M.I. Hood, E.P. Skaar, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012, **10**, 525.
- [22] R.C. Hider, X. Kong, *Nat. Prod. Rep.*, 2010, **27**, 637.
- [23] A. Shanzer, J. Libman, w: *Handbook of Microbial Chelates*, ed. G. Winkelmann, CRC Press, Boca Raton, 1 edn., 1991, str. 309-338.
- [24] A. Szebesczyk, E. Olshvang, A. Shanzer, P.L. Carver, E. Gumienna-Kontecka, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **327**, 84.
- [25] A.D. Ferguson, V. Braun, H.P. Fiedler, J.W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte, *Protein Sci.*, 2000, **9**, 956.
- [26] R.A. Kingsley, R. Reissbrodt, W. Rabsch, J.M. Ketley, R.M. Tsois, P. Everest, G. Dougan, A.J. Baumler, M. Roberts, P. H. Williams, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 1610.
- [27] H. Kornreich-Leshem, C. Ziv, E. Gumienna-Kontecka, R. Arad-Yellin, Y. Chen, M. Elhabiri, A. M. Albrecht-Gary, Y. Hadar, A. Shanzer, *JACS*, 2005, **127**, 1137.
- [28] E.K. Dolence, A.A. Minnick, M.J. Miller, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 461.
- [29] A. Mular, A. Shanzer, H. Kozłowski, I. Hubmann, M. Misslinger, J. Krzywik, C. Decristoforo, E. Gumienna-Kontecka, *Inorg. Chem.*, 2021, **60**, 17846.
- [30] J.P. Holland, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 2070.
- [31] U. Seibold, B. Wangler, C. Wangler, *ChemMedChem*, 2017, **12**, 1555.
- [32] M. Patra, A. Bauman, C. Mari, C. A. Fischer, O. Blacque, D. Haeussinger, G. Gasser, T.L. Mindt, *Chem. Comm.*, 2014, **50**, 11523.
- [33] E. Gumienna-Kontecka, P. L. Carver, *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*. De Gruyter, 2019.
- [34] A. Bielański, *Podstawy chemii nieorganicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2017.
- [35] C.L. Coyle, E.I. Stiefel, *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*. VCH Publishers, New York, 1988.
- [36] L.S. Busenlehner, M.A. Pennella, D.P. Giedroc, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 131.
- [37] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 371.
- [38] B. Böttger, T. Rogall, T. Flohr, H. Blöcker, E. Böttger, *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 1751.
- [39] M.A. Pennella, D.P. Giedroc, *Biometals*, 2005, **18**, 413.
- [40] D. Osman, J.S. Cavet, *Nat. Prod. Rep.*, 2010, **27**, 668.
- [41] R.P. Saha, S. Samanta, S. Patra, D. Sarkar, A. Saha, M.K. Singh, *Biometals*, 2017, **30**, 459.
- [42] S. Silver, L.T. Phung, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, **50**, 753.
- [43] H. Chen, J.H. Wang, J.Q. Cui, C. Wang, S.X. Liang, H.H. Liu, J.P. Wen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, **103**, 6629.
- [44] A. Rola, P. Potok, R. Wieczorek, M. Mos, E. Gumienna-Kontecka, *Inorg. Chem.*, 2022, w trakcie recenzji.
- [45] I. Sobhani, J. Tap, F. Roudot-Thoraval, J.P. Roperch, S. Letulle, P. Langella, G. Corthier, J. Tran Van Nhieu, J. P. Furet, *PLoS One*, 2011, **6**, e16393.
- [46] S. Témoin, K.L. Wu, V. Wu, M. Shoham, Y.W. Han, *FEBS Lett*, 2012, **586**, 1.
- [47] Y.W. Han, A. Ikegami, C. Rajanna, H.I. Kawsar, Y. Zhou, M. Li, H.T. Sojar, R.J. Genco, H.K. Kuramitsu, C.X. Deng, *J. Bacteriol.*, 2005, **187**, 5330.
- [48] P. Klemm, M.A. Schembri, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000, **290**, 27.

- [49] Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective, World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, Washington DC: AICR, 2007.
- [50] A.L. Sesink, D.S. Termont, J.H. Kleibeuker, R. Van der Meer, *Carcinogenesis*, 2001, **22**, 1653.
- [51] D.E. Corpet, *Meat Sci.*, 2011, **89**, 310.
- [52] S. Ishikawa, S. Tamaki, M. Ohata, K. Arihara, M. Itoh, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, **54**, 1182.
- [53] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, *Mutat. Res.*, 2004, **567**, 1.
- [54] P. Jaruga, T.H. Zastawny, J. Skokowski, M. Dizdaroglu, R. Olinski, *FEBS Lett*, 1994, **341**, 59.
- [55] T.C. Squier, *Exp. Gerontol.*, 2001, **36**, 1539.
- [56] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition, Oxford University Press, Oxford, 2007.
- [57] D. van der Helm, R. Chakraborty, w: *Microbial Transport Systems*, ed. G. Winkelmann, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2002, r. 11, str. 261.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 marca 2022 r.