

WYJAŚNIENIE ELEMENTÓW HOMEOSTAZY NIKLU(II) I CYNKU(II) U BAKTERII I GRZYBÓW

EXPLAINING ELEMENTS OF NICKEL(II) AND ZINC(II) HOMEOSTASIS IN BACTERIA AND FUNGI

Magdalena Rowinska-Żyrek

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@chem.uni.wroc.pl*

Pracę dedykuję pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk

Abstract

Wprowadzenie

1. Wychwyt jonów Zn^{2+} przez bakterie i grzyby
2. Rola jonów Zn^{2+} w tworzeniu złogów amyloidowych przeciwdrobnoustrojowej amyliny
3. Bakteryjne białka magazynujące jony Ni^{2+}
4. Transport metali

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Magdalena Rowińska-Żyrek, po ukończeniu biotechnologii na Politechnice Wrocławskiej (2008) i fizyki w paryskiej École Normale Supérieure de Cachan (2008), podjęła słuszną decyzję o kontynuowaniu pracy naukowej. W 2011 roku obroniła doktorat na Wydziale Chemii UWr (z którym jest związana do dziś), a w latach 2012–2015 pracowała na Uniwersytecie w Zurychu. Po powrocie na UWr zajęła się tematyką chemii bionieorganicznej patogenów i peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Poniższa praca jest podsumowaniem jej dorobku habilitacyjnego.

ABSTRACT

In the last 30 years, no new class of antibiotic was developed, and resistance to these already existing has increased dramatically. It seems reasonable to search for new classes therapeutics, targeting metabolic pathways, which standard therapies do not aim at.

One of the biggest obstacles in finding effective and specific antibacterial and antifungal agents, which do not cause serious side effects in patients, is due to the fact that micro-organisms share many basic metabolic pathways with their human hosts. One of the significant differences may be the transport system and homeostasis of Zn^{2+} and Ni^{2+} .

The review sheds new light on the homeostasis of the two metals in bacteria and fungi. The main points are: (i) determination of Zn^{2+} binding sites on the *C. albicans* Pra1 zincophore and in the N-terminal domain of the *C. albicans* Zrt1 zinc transporter; description of the geometry and thermodynamics of such binding (Fig. 5 and 6); (ii) understanding of the bioinorganic chemistry of zincophore based Zn^{2+} transport (understanding Pra1-Zrt1 interactions); suggesting how Zn^{2+} is delivered from the zincophore to the zinc transporter (Fig. 7); (iii) defining the specificity of zincophore-based transport; showing that they can also transport Ni^{2+} ions; (iv) pointing out Zn^{2+} binding sites on amylin₁₋₁₉ and pramlintide – amylin's non-aggregating analogue; describing the thermodynamics of the process (Fig. 10) and suggesting the potential effect of Zn^{2+} coordination on the antimicrobial effectiveness of amylin (Fig. 11 and 12); (v) defining how the non-coordinating poly-Gln region affect the structure and how it increases the thermodynamic stability of nickel complexes of the N-terminal region Hpn-like, a microbial Ni^{2+} storage protein (Fig. 13); (vi) indicating the specific regions of proteins with polyHis and polyGln regions, which are most likely to bind Ni^{2+} and Zn^{2+} ; (vii) explaining the effect of pH and Ni^{2+} binding to the N-terminal domain of HypA, a bacterial protein involved in the maturation of hydrogenase (Fig. 14 and 15); (viii) explaining the average efficiency and selectivity of HupE, a bacterial Ni^{2+} transporter (Fig. 16 and 17).

This new piece of knowledge is an interesting contribution to the beautiful, basic bioinorganic chemistry, which allows for a better understanding of basic mechanisms in biology and can be the basis in the design of effective, specific and selective drugs to be used in anti-microbial therapy, e.g. of traditional drugs combined with a part of a zincophore, which is specifically recognized by the fungus. First biological studies, which show that *Candida albicans* recognizes the C-terminal region Pra1, have already been carried out (see Figure 8 and its description).

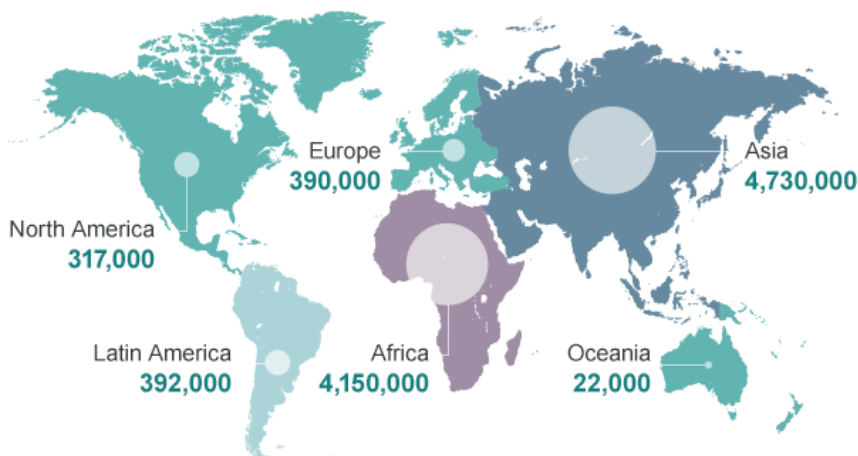
Keywords: Zn^{2+} and Ni^{2+} transport, microbial metal homeostasis, metal-peptide structure and thermodynamics

Słowa kluczowe: transport Zn^{2+} i Ni^{2+} , homeostaza metali drobnoustrojach, struktura i termodynamika układów metal-peptyd

WPROWADZENIE

Infekcje wywołane przez lekooporne bakterie zabijają rocznie co najmniej 700 000 osób. W ciągu ostatnich 30 lat nie wynaleziono żadnej nowej klasy antybiotyku, a oporność na te już istniejące dramatycznie wzrosła. Według szacunków Komisji Europejskiej, jeśli obecny stan wiedzy nie ulegnie zmianie, w 2050 roku lekooporne bakterie i grzyby będą przyczyną ponad 10 milionów zgonów (Rys. 1). Nowe terapeutyki i sposoby specyficznego dostarczania ich bezpośrednio do mikroorganizmów są intensywnie poszukiwane.

Deaths attributable to antimicrobial resistance every year by 2050



Source: Review on Antimicrobial Resistance 2014

Rysunek 1. Szacunki Komisji Europejskiej co do liczby śmiertelnych infekcji spowodowanych lekoopornymi mikroorganizmami [1]

Figure 1. European Commission's Estimates as to the number of fatal infections caused by resistant micro-organisms [1]

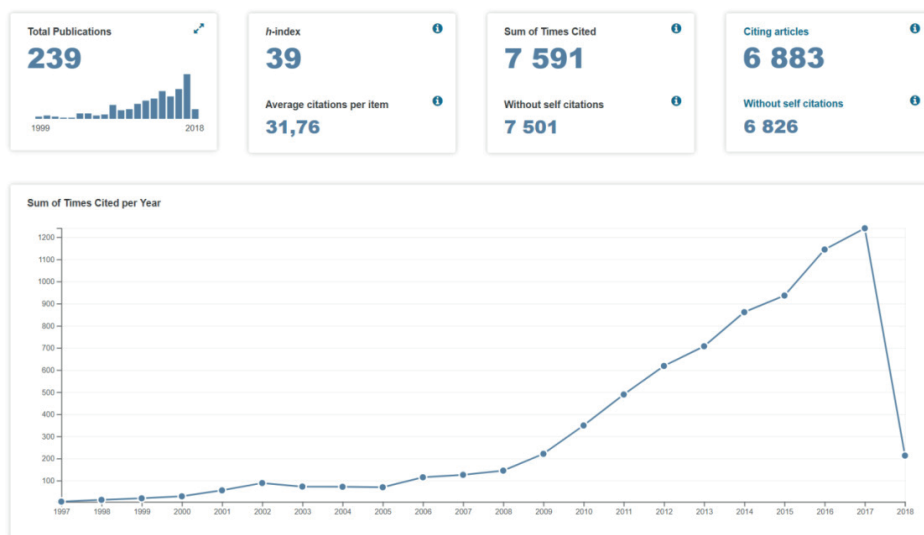
Obecnie stosowane antybiotyki celują w szereg jasno określonych punktów metabolizmu bakterii: (I) uszkadzają błonę protoplazmatyczną (polimyksyny, lipopeptydy), (II) blokują syntezę ściany komórkowej (beta-laktamy, cykliczne glikopeptydy), (III) blokują syntezę białek (tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy), (IV) blokują syntezę kwasów nukleinowych (fluorochinolony, rifamycyny) czy (V) innych szlaków metabolicznych (sulfony, sulfonamidy) [2].

Podobnie wygląda sprawa leków przeciwgrzybiczych – wyróżniamy terapeutyki (I) zaburzające funkcje błony komórkowej (polienowe lub pochodne pirydonu), (II) inhibitory biosyntezy ergosterolu (azolowe, triazolowe, pochodne alliloaminy i fenyломorfoliny, (III) inhibitory syntezy kwasów nukleinowych (analogi cytozyny) oraz (IV) inhibitory syntezy ściany komórkowej (echinokandyny) [3].

Rozsądne wydaje się poszukiwanie nowych klas terapeutyków – celowanie w szlaki metaboliczne, w które nie celują jeszcze standardowe terapie, wobec których mikroorganizmy zdążyły nabrać odporności.

Jedną z największych przeszkód w znalezieniu skutecznych i specyficznych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, które nie powodują poważnych skutków ubocznych u pacjentów, wynika z faktu, że mikroorganizmy dzielą wiele podstawowych szlaków metabolicznych ze swoim ludzkim gospodarzem, szczególnie grzyby (oba są eukariotami), o wiele więcej niż z prokariotycznymi bakteriami. Do opracowania specyficznego leku przeciwgrzybicznego lub przeciwbakteryjnego ważne jest, aby zrozumieć różnice w metabolizmie człowieka i drobnoustroju, i w nie celować. Taką znaczącą różnicą może być np. system transportu i homeostaza cynku(II) i niklu(II). Utrzymanie prawidłowej homeostazy tych jonów metali jest jednym z niezbędnych elementów dla przeżycia i wirulencji bakterii i grzybów.

Świat nauki zaczął rozważać tę zależność jako potencjalny cel terapeutyczny około dziesięciu lat temu, zauważając związek między tzw. odpornością odżywczą (ang. *'nutritional immunity'*), a homeostazą jonów metali. Od tego czasu liczba prac, których tematem jest zarówno odporność odżywcza, jak i homeostaza jonów metali, rośnie niemal logarytmicznie (Rys. 2).



Rysunek 2. Wyszukiwanie fraz 'nutritional immunity' i 'metal ions' w ISI Web of Knowledge (1.03.2018)
 Figure 2. Searched phrases: 'nutritional immunity' and 'metal ions' in ISI Web of Knowledge (1.03.2018)

Cynk to drugi (po żelazie) najbardziej rozpowszechniony metal bloku d w żywych organizmach [4]. Jest także kluczowym czynnikiem wirulencji patogenów. Jest obecny w dysmutazie ponadtlenkowej (SOD) i innych centralnych enzymach bakterii i grzybów związanych z detoksykacją reaktywnych form tlenu, wytwarzanych przez komórki gospodarza podczas interakcji gospodarz-patogen [5]. Metalo-

proteiny wiążące cynk uczestniczą w inwazji patogenu; są to np. metaloproteiny ADAM lub deuterolizyna (z dwoma histydynami wiążącymi cynk i katalitycznym glutaminianem w jego centrum katalitycznym) [6, 7]. Warto wspomnieć, że jedną z grup enzymów, które wymagają jonów Zn^{2+} jako kofaktora, są metalo-beta-laktamazy (np. New Delhi metalo-beta-laktamazy 1 (NDM-1)), zdolne do dezaktywacji antybiotyków beta-laktamowych, stosowane w leczeniu infekcji wielolekowych [8].

Wychwycenie tego metalu nie jest prostym zadaniem; całkowite stężenie cynku w tkankach gospodarza waha się w zakresie od 11–23 μM , a stężenie wolnego Zn^{2+} to 0,1–1 nM [3]. Organizm gospodarza jakby instynktownie reaguje na niezbędność cynku dla grzybowych patogenów i ogranicza (i tak już skąpy) poziom wolnego Zn^{2+} ograniczając aktywność własnych transporterów lub poprzez ekspresję białek wiążących cynk, takich jak np. produkowane przez neutrofile kalprotektyny [3].

Jony niklu są kolejnym przykładem jonów metali bloku d, które są niezbędne dla patogenów; są kofaktorami dziewięciu enzymów: ureazy, hydrogenazy, dehydrogenazy tlenku węgla, syntazy acetylo-CoA, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy metylo-koenzymu-M, dioksygenazy, glioksalazy i racemazy mleczanowej [9]. Z wyjątkiem ureazy, enzymy te występują tylko w mikroorganizmach i dlatego są doskonałym celem terapeutycznym. Warto wspomnieć, że człowiek nie posiada żadnego niklowo-zależnego enzymu i ten pierwiastek byłby całkowicie zbędny, gdyby nie obecność potrzebujących niklu symbiotycznych bakterii w organizmach ssaków.

Opisane niżej prace mają istotny aspekt poznawczy, który ma przełożenie na rozwój co najmniej kilku dziedzin: (I) po pierwsze, są wkładem do pięknej, podstawowej chemii bionieorganicznej cynku i niklu – został wyjaśniony sposób koordynacji, wskazane miejsca wiązania i wyjaśniona termodynamiczna stabilność; po drugie (II), uzyskane wyniki pozwalają zrozumieć nieorganiczną biochemię białek uwikłanych w homeostazę i transport Zn^{2+} i Ni^{2+} ; po trzecie (III), doniesienia te mogą być pierwszym krokiem w kierunku znalezienia nowych, specyficznych przeciwgrzybowych i przeciwbakteryjnych terapeutyków opartych na fragmentach biologicznie istotnych białek (chaperonów, cynkoforów) połączonych z lekiem przeciwdrobnoustrojowym.

Badania przedstawione w tej publikacji składają się na cykl prac, których ogólnym celem było wyjaśnienie elementów homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów. Cele szczegółowe to:

- zrozumienie chemii bionieorganicznej transportu Zn^{2+} , opartego na cynkoforach – wskazanie miejsca koordynacji Zn^{2+} na cynkoforze Pra1 i cynkowym transporterze Zrt1 z *Candida albicans*; określenie specyficzności tego typu transportu względem jonów Zn^{2+} i Ni^{2+} ;
- wytłumaczenie roli koordynacji jonów Zn^{2+} na przeciwdrobnoustrojową efektywność działania amyliny; określenie geometrii wiązania i parametrów termodynamicznych powstającego kompleksu

- zrozumienie wpływu niekoordynujących reszt aminokwasowych na termodynamiczną stabilność niklowych kompleksów wybranych bakteryjnych białek magazynujących Ni^{2+}
- określenie roli pH i obecności Ni^{2+} na wiązanie się Zn^{2+} do tzw. strukturalnego rejonu HypA, bakteryjnego białka uwikłanego w poprawne fałdowanie się hydrogenazy
- wskazanie rejonów i precyzyjnych donorów wiążących jony Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} w błonowym niklowym transporterze HupE; określenie termodynamiki wiązania i wyjaśnienie specyficzności transportera.

1. WYCHWYT JONÓW Zn^{2+} PRZEZ BAKTERIE I GRZYBY

Cynk jest jednym z kluczowych składników odżywczych dla gatunków ze wszystkich królestw, będąc strukturalnym lub katalitycznym składnikiem setek enzymów, niezbędnych dla przeżycia zarówno patogennych mikroorganizmów, jak i ich gospodarzy. 9% proteomu bakteryjnego i grzybowego to białka wiążące cynk; ich główną funkcję jest regulacja transkrypcji i innych procesów biologicznych [10]. Jak wspomniano już we wstępie, – białka wiążące cynk(II) są podstawą wirulencji mikroorganizmów i nie ulega wątpliwości, że wychwytywanie Zn^{2+} ma zasadnicze znaczenie dla zjadliwości i przeżycia patogenów w organizmie gospodarza. Wychwycenie tego metalu jest skomplikowanym procesem, m.in. ze względu na subnanomolowe stężenie wolnego Zn^{2+} .

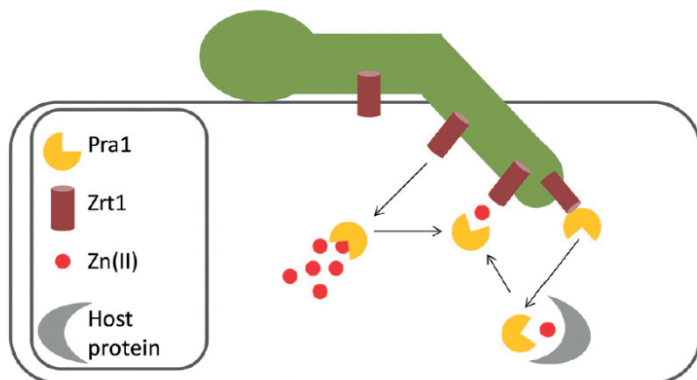
Praca [11] jest przeglądem homeostazy cynku u bakterii i ludzi. Wyjaśnia znaczenie tego składnika odżywczego dla patogenów, opisuje role czujników cynku, regulatorów i transporterów oraz podsumowuje różne systemy pobierania i różne białka zaangażowane w homeostazę cynku – zarówno te używane do przechowywania, buforowania i sygnalizacji wewnątrz komórki, jak i te wydalone w celu uzyskania Zn^{2+} od gospodarza. Wyjaśniono ludzką, zależną od cynku odpowiedź układu odpornościowego, ze szczególnym uwzględnieniem ‘cynkowej odporności odżywczej’ (ang.: *zinc nutritional immunity*), procesu opisującego współzawodnictwo między bakteriami lub grzybami, a żywicielem tego mikroorganizmu, podczas którego zarówno patogen, jak i gospodarz próbują kontrolować dostępność cynku(II). Ta wyrafinowana walka o Zn^{2+} może być uznana za potencjalny cel dla nowych terapii przeciwbakteryjnych.

W ciągu ostatnich 30 lat, nie tylko antybiotykooporne bakterie, ale i lekooporne grzyby stały się coraz częstszym problemem – nowe terapie i sposoby specyficznego dostarczania ich bezpośrednio do grzyba są intensywnie poszukiwane. Jedną z największych przeszkód w znalezieniu skutecznych i specyficznych leków przeciwgrzybiczych, które nie powodują poważnych skutków ubocznych u pacjentów, wynika z faktu, że grzyby dzielą wiele podstawowych szlaków metabolicznych ze swoim ludzkim gospodarzem (oba są eukariotami), o wiele więcej niż z prokariotycznymi bakteriami. W celu opracowania wysoce specyficznego leku przeciwgrzy-

bicznego ważne jest, aby zrozumieć i celować w różnice w metabolizmie człowieka i grzyba. Znaczącą różnicą między komórkami mikroorganizmów i ssaków jest system transportu cynku, mikroelementu niezbędnego dla prawie wszystkich organizmów [11, 12].

Chorobotwórcze grzyby przystosowały się do nałożonych przez gospodarza cynkowych limitów poprzez rozwój dodatkowych mechanizmów pozyskiwania tego metalu – wydzielając specyficzne białka chelatujące, które wiążą Zn^{2+} i dostarczają go do grzybowego transportera błonowego (sposób ich działania jest podobny do dobrze znanych sideroforów – sekretowanych przez bakterie lub grzyby niskocząsteczkowych nośników żelaza).

Pojęcie ‘cynkofor’ i odkrycie sposobu jego działania jest relatywną nowością w świecie nauki. Citiulo i współpracownicy wyjaśnili szczegóły tego mechanizmu u *C. albicans* [13]: (I) po inwazji komórek gospodarza, w zasadowym pH i małej ilości wewnątrzkomórkowego cynku wytwarzany jest Pra1 (ang. *pH-regulated antigen 1*, antygen regulowany pH; 299 aminokwasowe białko); (II) Pra1 jest uwalniane z powierzchni strzępeków grzyba; jest to niezbędne dla wzrostu grzyba i powoduje uszkodzenia śródbłonna gospodarza [14]; (III) Pra1 wiąże cynk z otaczających tkanek (wolny Zn^{2+} lub związany do białek gospodarza) i (IV) wraca do grzyba i za pomocą membranowego transportera Zrt1 przekazuje Zn^{2+} komórce grzybowej (Rys. 3) [11]. Geny *pra1* i *zrt1* są ko-ekspresjonowane [15]. Delecja genu *pra1* uniemożliwia *C. albicans* wykorzystanie cynku gospodarza i tym samym nie pozwala na wzrost grzyba i uszkodzanie otaczających komórek [11].



Rysunek 3. Schemat pobierania Zn^{2+} przez *C. albicans* z komórek gospodarza; sekretowany cynkofor Pra1 wiąże wolny lub związany do innych białek gospodarza cynk i wraca na powierzchnię grzyba, gdzie oddziałuje z transporterem Zrt1, w celu przekazania Zn^{2+} komórce

Figure 3. Schematic model of *C. albicans* zinc scavenging from host cells. After invasion of the host cell, Pra1 is expressed and secreted. It binds zinc, either in the form of free Zn(II) (extremely sparse in the cellular pool) or from zinc-binding proteins of the host. Reassociation with *C. albicans* cell surface and Zn(II) transport into the cell occurs via a Pra1-Zrt1 interaction

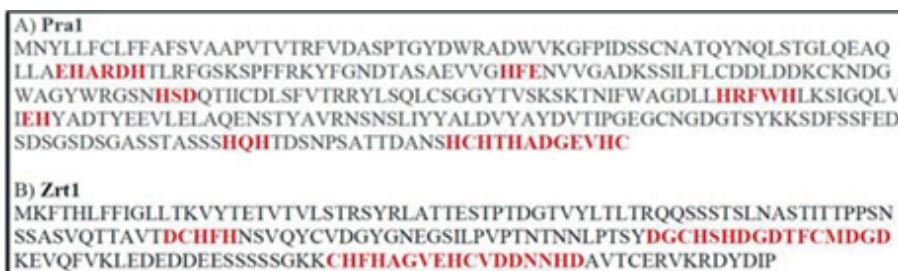
Jednym z celów podjętych przeze mnie badań jest zrozumienie interakcji Zn^{2+} z cynkoforami i transporterami cynku z *Candida albicans*, najczęstszej przyczyny

zakażeń grzybiczych u ludzi. Ten zazwyczaj będący komensalem grzyb bywa najczęstszą przyczyną kandydozy – stanu obejmującego infekcje od powierzchniowych, poprzez chroniczne, aż do przewlekłych, systemowych i potencjalnie zagrażających życiu *candidemii*.

Chcieliśmy zrozumieć chemię bionieorganiczną transportu cynku do *C. albicans* opartą o cynkofor Pra1, który dostarcza metal do transbłonowego transportera cynku Zrt1 poprzez (I) wskazanie miejsca wiązania Zn^{2+} zarówno na Pra1, jak i Zrt1, (II) wyjaśnienie termodynamiki interakcji Pra1- Zn^{2+} -Zrt1 i (III) określenie selektywności tego typu transportu względem jonów Zn^{2+} i Ni^{2+} .

Najbardziej popularne miejsca wiązania cynku(II) w białkach są dość dobrze opisane w literaturze [16]. Główne ligandy biorące udział w koordynacji, to reszty His, Cys, łańcuchy boczne reszt kwasowych, cząsteczki wody i, – dużo rzadziej, Tyr, Asn, Ser i Thr. Ze względu na geometrię wiązania i udział koordynujących reszt, można wyróżnić sześć klas miejsc wiążących cynk: (I) wiązanie cynku do przynajmniej 3 reszt His w motywie HEXXHXXGXXH; (II) wiązanie do trzech His, z których dwie są w motywie HXH, a trzecia jest w oddalonej pozycji; (III) wiązanie do donorów His i Cys; (IV) udział dwóch His, reszty kwasowej łańcucha bocznego Asp lub Glu i cząsteczki wody w wiązaniu; (V) wiązanie Zn^{2+} tylko do kwasowych ligandów oraz (VI) inny skład ligandów [17]. Naturalnie, chemia koordynacyjna cynku w biomolekułach nie jest tak prosta, jak to opisano powyżej; istotna dla stabilności tego typu kompleksów jest druga powłoka interakcji, obejmująca oddziaływanie reszt położonych blisko miejsca wiązania. Dobrym przykładem może być wcześniej opisany sposób oddziaływania kompleksów poliHis i poliGln sekwencji z Ni^{2+} , w którym region polyGln tworzy sieć kooperatywnych wiązań wodorowych chroniących rdzeń kompleksu przed i innymi kompetycyjnymi ligandami [18].

Zastosowaliśmy wyżej opisane reguły do odnalezienia miejsc wiążących cynk w Pra1 (rejonny zaznaczone – wyróżnione, na Rysunku 4A; nasze przypuszczenia są zgodne z pokazanymi przez Citiulo i in. [11]). Istotnym zagadnieniem jest też struktura białka. Pracowaliśmy z układami modelowymi – peptydami, które są fragmentami Pra1. Struktura Pra1 nie została, jak dotąd, rozwiązana, dlatego posłużyliśmy się programem Phyre2 (wykorzystującym technikę zdalnej homologii do modelowania struktury białek) [19], który pokazał, że Pra1, a w szczególności jego C-końcowa część, jest całkowicie nieustrukturyzowana, a więc idealna do zastosowania naszego eksperymentalnego podejścia. Również struktura Zrt1, transportera cynku, pozostaje nierozwiązana. Użyliśmy Phyre2 do modelowania struktury i przewidywania zewnątrz – i wewnątrzkomórkowych rejonów tego transportera. Okazuje się, że zewnątrzkomórkowa część Zrt1 to N-koniec tego białka (reszty 1-183, Rys. 4B); ponadto, rejon ten jest wysoce nieustrukturyzowany.

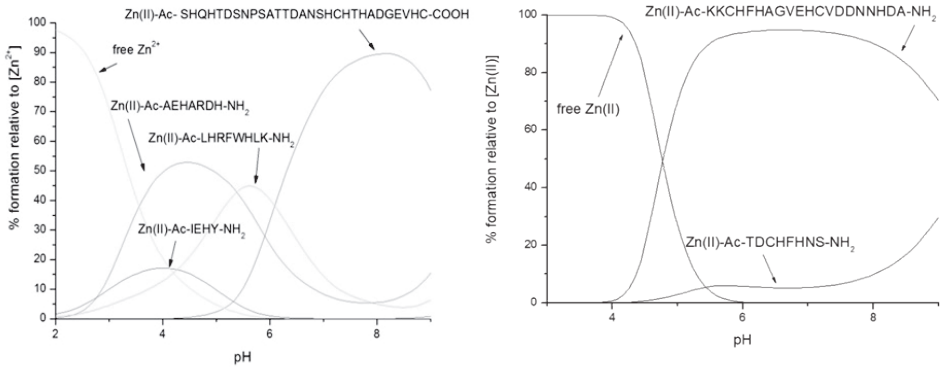


Rysunek 4. A) Sekwencja aminokwasowa cynkoforu Pra1; B) Sekwencja zewnątrzkomórkowej, N-końcowej części transportera Zrt1. Przewidywane miejsca wiązania Zn^{2+} wyróżniono

Figure 4. A) Sequence of the Pra1 zincophore; B) extracellular sequence of the N-terminal part of the Zrt1 transporter. Predicted Zn^{2+} binding sites are highlighted

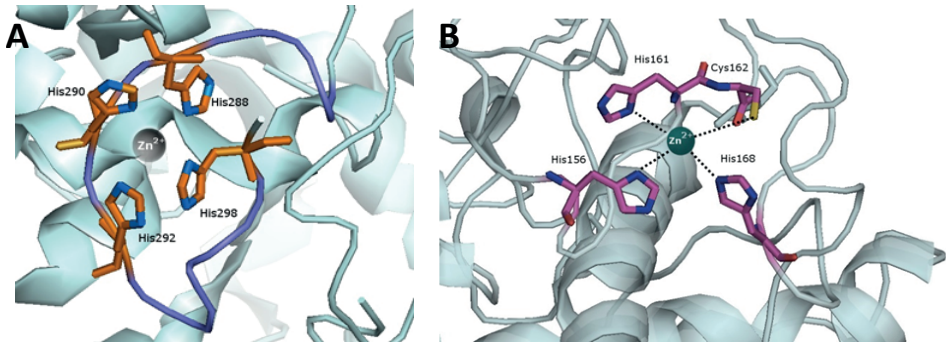
Wyboru odpowiednich fragmentów białek, będących modelowymi miejscami wiązania cynku, dokonano na podstawie dwóch kryteriów: (I) są one w nieustrukturyzowanym rejonie oraz (II) zawierają przewidywane miejsca (bądź kilka miejsc) wiążących cynk. Oparty na cynkoforach system transportu Zn^{2+} jest bardzo dobrze zachowany również u innych grzybów; u *A. fumigatus*, dwa ko-ekspresjonowane geny, *zrfC* i *aspf2*, są odpowiednikami *zrt1* i *pra1* u *C. albicans* [20]. Wybraliśmy takie fragmenty białek, które prawdopodobnie wiążą Zn^{2+} i których sekwencja jest ewolucyjnie dobrze zachowana w cynkoforach Pra1 z *C. albicans* i *Aspf2* z *A. fumigatus* (43% homologii).

Na podstawie spektrometrii mas, pokazaliśmy stechiometrię powstających kompleksów; badania potencjometryczne pozwoliły na wyznaczenie częściowych i całkowitych stałych trwałości utworzonych kompleksów; NMR pozwolił wskazać precyzyjnie miejsca wiązania metalu. Porównanie całkowitych stałych tworzenia pokazało, że C-końcowy region Pra1 (Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHAD-GEVHC-COOH) ma największe powinowactwo do jonów Zn^{2+} (Rys. 5A). Prawdopodobnie to właśnie ten rejon cynkoforu jest odpowiedzialny za wiązanie metalu. Spektroskopia NMR pokazała, że C-końcowy region Pra1 wiąże Zn^{2+} przez cztery histydylowe imidazole (His288, His290, His292 i His298) (Rys. 6A) [21]. Przypuszczalnie to właśnie miejsce wchodzi w interakcje z transporterem cynku Zrt1.



Rysunek 5 A) Wykres kompetycyjny między fragmentami cynkoforu Pra1: Ac-IEHY-NH₂; Ac-AEHARDH-NH₂; Ac-SHQHT-NH₂; Ac-SHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH oraz jonami Zn²⁺ oraz B) między fragmentami transportera Zrt1 (Ac-KKCHFhAGVEHCVDDNNHDA-NH₂ i Ac-TDCHFhNS-NH₂). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której zmieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K, $i = 0,1$ M, $[Zn^{2+}] = [L] = 0,001$ M

Figure 5 A) Competition plot between the Pra1 zincophore fragments: Ac-IEHY-NH₂; Ac-AEHARDH-NH₂; Ac-SHQHT-NH₂; Ac-SHCHTHADGEVHC-COOH and Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH and Zn²⁺ ions and B) between fragments of the Zrt1 transporter (Ac-KKCHFhAGVEHCVDDNNHDA-NH₂ and Ac-TDCHFhNS-NH₂). On the basis of the calculated stability constants, the graphs describe a hypothetical situation in which equimolar amounts of the ligands and metal are mixed. The graph shows the formation of the complex in different pH values, at 298 K, $i = 0.1$ M, $[Zn^{2+}] = [L] = 0.001$ M



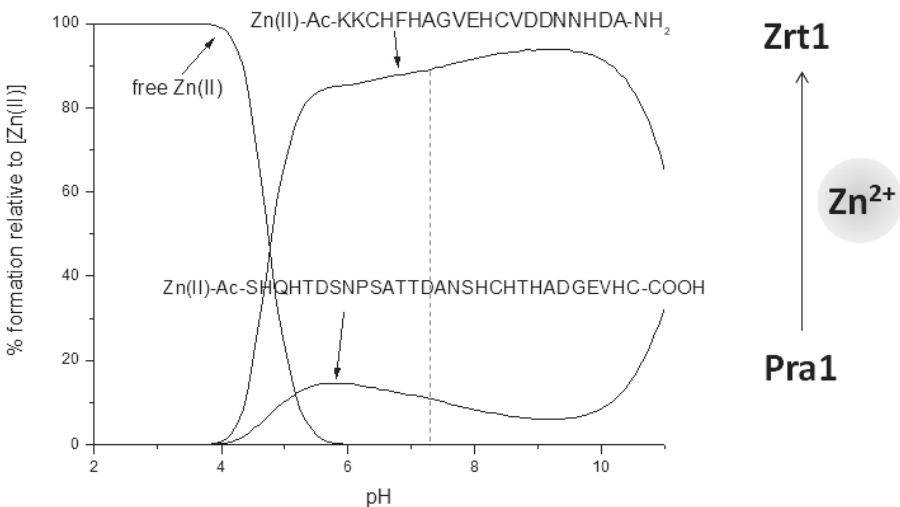
Rysunek 6. Proponowany sposób wiązania Zn²⁺ do A) cynkoforu Pra1 i B) transportera Zrt1. Struktura opiera się na koordynatach symulowanych przez program Phyre2.¹⁶. Rysunek został wygenerowany za pomocą Pymol [22]

Figure 6. The proposed binding Zn²⁺ sites on A) the Pra1 zincophore and B) the Zrt1 zinc transporter. Structures are based on coordinates simulated by Phyre2.¹⁶. The figure was generated with Pymol [22]

Do wskazania precyzyjnych miejsc wiązania Zn²⁺ na N-końcowym, zewnątrzkomórkowym rejonie transportera Zrt1 użyliśmy analogicznego podejścia eksperymentalnego. W fizjologicznym pH, rejonem zdolnym do związania Zn²⁺ okazał się

rejon KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA (Rys. 5B). Spektroskopia NMR wskazała imidazolowe azoty reszt His156, His161 i His168 oraz tiolową siarkę Cys162, jako miejsca koordynacji Zn^{2+} (Rys. 6B) [23].

Czy możemy zatem sugerować, że wyżej opisane rejony Pra1 i Zrt1 przekazują sobie jon Zn^{2+} ? Biorąc pod uwagę chemię bionieorganiczną obu białek, jest to bardzo prawdopodobne – na podstawie obliczonych stałych trwałości możemy wywnioskować, że w pH 7,4, około 85% dotępnego Zn^{2+} będzie związane do zewnątrzkomórkowego fragmentu transportera Zrt1, a tylko 15% – do oddziałującego z nim cynkoferu Pra1 (Rys. 7) [23]. Z punktu widzenia termodynamiki umożliwia to efektywny transport Zn^{2+} do wnętrza komórki grzybowej (naturalnie, musimy pamiętać o tym, że praca na fragmentach białek *in vitro* nie odzwierciedla w pełni ich funkcji *in vivo* – muszą ją potwierdzić badania biologiczne).



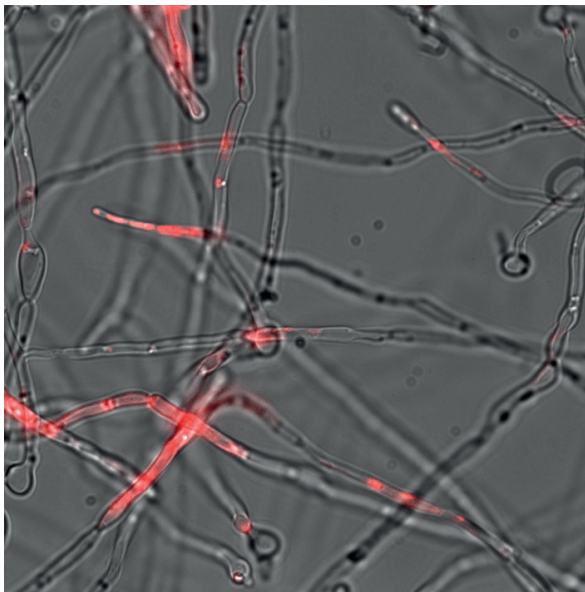
Rysunek 7. Wykres kompetycyjny między wiążącymi Zn^{2+} fragmentami cynkoferu Pra1 i transportera Zn^{2+} Zrt1 (odpowiednio Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA-NH₂). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której zmieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K, $i = 0,1$ M, $[Zn^{2+}] = [Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH] = [Ac-KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA-NH_2] = 0.001$ M. Linijką przerywaną zaznaczono pH fizjologiczne

Figure 7. Competition plot between Zn^{2+} and the Zn^{2+} binding region from Pra1 and Zrt1 (Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH and Ac-KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA-NH₂). On the basis of the calculated stability constants, the graphs describe a hypothetical situation in which equimolar amounts of the ligands and metal are mixed. The graph shows the formation of the complex in different pH values, at 298 K, $i = 0.1$ M, $[Zn^{2+}] = 0.001$ M = $[Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH] = [Ac-KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA-NH_2] = 0.001$ M. The dotted line shows physiological pH

Innym istotnym aspektem funkcjonowania systemu transportu opartego na cynkoferach jest jego specyficzność dla danego jonu metalu. Ogólnie przyjęto, że

Pra1 jest specyficzny dla cynku(II). Czy oznacza to, że nie będzie on przekazywał grzybowi innych niezbędnych dla niego jonów metali, które mają powinowactwo do tych samych reszt aminokwasowych, co Zn^{2+} ? Określiliśmy sposób wiązania niklu(II), kolejnego niezbędnego dla przeżycia i wirulencji jonu metalu, do badanych fragmentów Pra1 i Zrt1. Okazuje się, że Ni^{2+} , choć w teorii posiada równie wysokie powinowactwo do grup, do których koordynuje Zn^{2+} , nie zaburza wiązania się Zn^{2+} do badanych przez nas fragmentów – w pH fizjologicznym, do Pra1 wiąże się dużo słabiej niż Zn^{2+} (w pH 7,4 mniej niż 20% Pra1 zwiąże Zn^{2+} , reszta – Ni^{2+}), natomiast jego powinowactwo do Zrt1 jest porównywalne do cynkowego; wynika to prawdopodobnie z faktu, że rejon KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA jest w stanie skoordynować dwa jony Ni^{2+} i tylko jeden jon Zn^{2+} [23].

Wyniki wyżej opisanych badań mogą mieć znaczenie dla rozwoju co najmniej kilku dziedzin: (I) po pierwsze, jest to wkład do podstawowej chemii bionieorganicznej cynku – wyjaśniony został sposób koordynacji, wskazane miejsca wiązania i wyjaśniona termodynamiczna stabilność; po drugie (II), uzyskane wyniki pozwalają zrozumieć nieorganiczną biochemię cynkoforów, białek, które są naprawdę biologicznie istotne; po trzecie (III), może być krokiem w kierunku znalezienia nowych, specyficznych przeciwgrzybowych terapeutyków, opartych na fragmentach cynkoforów połączonych z lekiem przeciwgrzybicznym.



Rysunek 8. Wychwytywanie fluorescencyjnie znakowanego C-końcowego fragmentu Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATT-DANSHCHTHADGEVHC) przez *C. albicans* (Malavia, Łoboda, Wilson, Rowińska-Żyrek, praca w przygotowaniu)

Figure 8. Uptake of the fluorescently labeled C-terminal region of Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATT-DANSHCHTHADGEVHC) by *C. albicans* (Malavia, Atriplex, Wilson, Rowińska-Żyrek, work in progress)

Przyjrzyjmy się bliżej ostatniemu punktowi – czy nasze rozważania są naprawdę istotne biologicznie i czy C-końcowy rejon Pra1 faktycznie jest rozpoznawany i wychwytywany przez *C. albicans*, i czy są w stanie przenieść cynk do wnętrza grzyba *in vivo*? Odpowiedzi na to pytanie mogliśmy udzielić dzięki współpracy z prof. Duncanem Wilsonem z Uniwersytetu w Aberdeen (jeden z odkrywców Pra1), który zobrazował wychwytywanie znakowanego fluorescencyjnie C-końcowego fragmentu Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC) przez *C. albicans* (Rys. 8, dane nieopublikowane) – okazuje się, że dyskutowany przez nas C-końcowy fragment Pra1 jest rozpoznawany przez *C. albicans* w podobny sposób, co jego pełnej długości, dziesięciokrotnie większy, natywny analog.

Zrozumienie sposobu pozyskiwania Zn^{2+} przez *C. albicans* otwiera nowe możliwości terapeutyczne, oparte na lekach przeciwgrzybiczych związanych z C-końcowym fragmentem cynkoforu Pra1, który w selektywny sposób dostrzczałby lek do grzyba. Jaki lek powiązać z Pra1? Poza najbardziej popularnymi lekami imidazolowymi lub triazolowymi warto przyrzeć się bliżej lekom opartym na przeciwdrobnoustrojowych peptydach. Przykład jednego z nich opisano w następnym podrozdziale.

2. ROLA JONÓW Zn^{2+} W TWORZENIU ZŁOGÓW AMYLOIDOWYCH PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ AMYLINY

Ze względu na generalny brak oporności mikroorganizmów na peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMP), mają one szansę zostać nową, skuteczną klasą terapeutyków. Istnieje wiele sposobów którymi AMP mogą oddziaływać na patogeny: poprzez niszczenie błon komórkowych, wytwarzanie reaktywnych form tlenu, hamowanie syntezy ściany komórkowej, kwasów nukleinowych i białek lub wychwytywanie istotnych dla patogenów jonów metali. Jony Zn^{2+} mają dwojaki wpływ na aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych: (I) AMP wiążą je, dzięki czemu mikroorganizmy nie dostają wystarczająco dużo jonów metali istotnych dla ich życia i zjadliwości (wychwytywanie jonów metali, w tzw. ang. *'nutritional immunity'*) lub (II) AMP potrzebują danego jonu metalu do wzmocnienia ich działania przeciwdrobnoustrojowego (jony metali wpływają na ładunek i/lub strukturę AMP).

Przykładem peptydu przeciwdrobnoustrojowego jest amyлина (znana też jako IAPP, ang. *Islet Amyloid Polypeptide*) [24, 25]; jest ona zarówno peptydem przeciwdrobnoustrojowym, jak i neurohormonem kontrolującym regulację glikemiczną – synergicznym partnerem insuliny. Ten 37 aminokwasowy polipeptyd, wytwarzany przez komórki beta trzustki, w przebiegu cukrzycy typu 2 (popularnej chorobie metabolicznej, na którą choruje ponad 300 mln osób na świecie) tworzy patologiczne amyloidowe depozyty w obrębie wysp Langerhansa trzustki. Patologiczne fibryle amyloidowe występują u ponad 90% cukrzyków i prowadzą do uszkodzeń

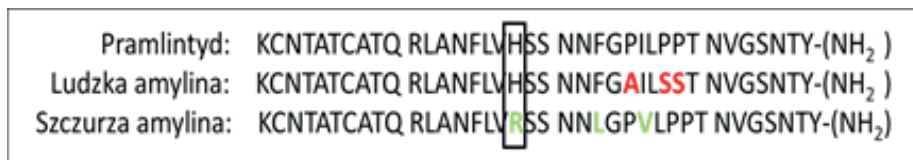
i dysfunkcji komórek trzustki, powodując postęp choroby. Ludzka amylna jest wyjątkowo trudno rozpuszczalna i błyskawicznie fibryluje, skutkując stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami błon komórkowych [27, 28]. Mechanizm prowadzący do konwersji natywnej postaci peptydu do nierozpuszczalnych fibryli pozostaje niewyjaśniony. Rosnąca ilość doniesień sugeruje udział jonów cynku(II) w procesie tworzenia struktury beta kartki, mikrodepozytów, a następnie fibrylarnych złogów [29,30]. Przeciwdrobnoustrojowa skuteczność amyliny silnie zależy od stopnia jej agregacji, a agregacja z kolei – od obecności jonów Zn^{2+} [31].

Ludzka postać amyliny ma sekwencję KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA-ILSSTNVGSNTY, z mostkiem dwusiarczkowym pomiędzy resztami cystein 2 i 7 oraz z amidowanym C-końcem. Obie modyfikacje są konieczne do pełnej aktywności biologicznej amyliny [32].

W reakcji fibrylizacji amyliny, wczesne, tzw. prefibrylarne struktury są ogromnie toksyczne dla komórek beta trzustki. Tworzące się w następnym etapie struktury włókien amyloidu – również prawdopodobnie mają pewien wpływ cytotoksyczny, jednak ta końcowa postać amyloidu jest dużo mniej toksyczna od utworzonych wcześniej struktur prefibrylarnych.

N-terminalna domena amyliny obejmuje umownie aminokwasy od 1 do 19. Pierwsze 16 aminokwasów jest identyczne u wszystkich wymienionych gatunków; na 18 miejscu w amylinie ludzkiej (a także tej występującej u konia, chomika i wieśniorki) znajduje się histydyna, podczas gdy we wszystkich innych polipeptydach (np. w niefibrylującej szczurzej amylinie) jest ona zastąpiona przez argininę. Substytucja ta wzbudziła szczególne zainteresowanie w kontekście jej roli w procesie fałdowania, fibrylacji i agregacji polipeptydu, sugerując zależność między zdolnością wiązania jonów metali a skłonnością do tworzenia fibryli i toksycznością neurohormonu – fragment 1–19 ludzkiej amyliny, który nie tworzy fibryli, jest tak samo toksyczny jak peptyd o pełnej długości, podczas gdy ten sam fragment szczurzej amyliny nie wykazuje żadnej toksyczności [33–35]. Podobnie ludzki fragment 20–29 amyliny jest w stanie fragmentować błony komórkowe, podczas gdy ten sam fragment szczurzy (w którym trzy aminokwasy podstawione są proliną, która uniemożliwia powstawaniu włókienek amyloidu) nie wykazuje toksyczności komórkowej. C-terminalna część amyliny (30–37), będąc odcinkiem bardzo hydrofobowym, może również wspomagać proces fibrylacji.

Szczurza amylna wykazuje aż 84% homologii sekwencji aminokwasowej z formą ludzką, a mimo to nie tworzy fibryli. Polipeptydy te różni tylko sześć aminokwasów, z których najważniejszymi substytucjami są – jak się wydaje – wspomniane wcześniej trzy proliny (Pro25, 28 i 29) obecne u szczura, a nieobecne u ludzi, oraz reszta histydyny (His18) zastąpiona w amylinie szczurzej resztą argininy. Proliny są resztami, które prawdopodobnie zapobiegają tworzeniu się drugorzędowych struktur, a histydylowy imidazol z dużym prawdopodobieństwem bierze udział w wiązaniu jonów metali. Równie istotny może okazać się związek protonacji histydyny z tworzeniem fibryli – deprotonacja His może prowadzić do szybszego formowania fibryli w porównaniu z warunkami niższego pH (Rys. 9).



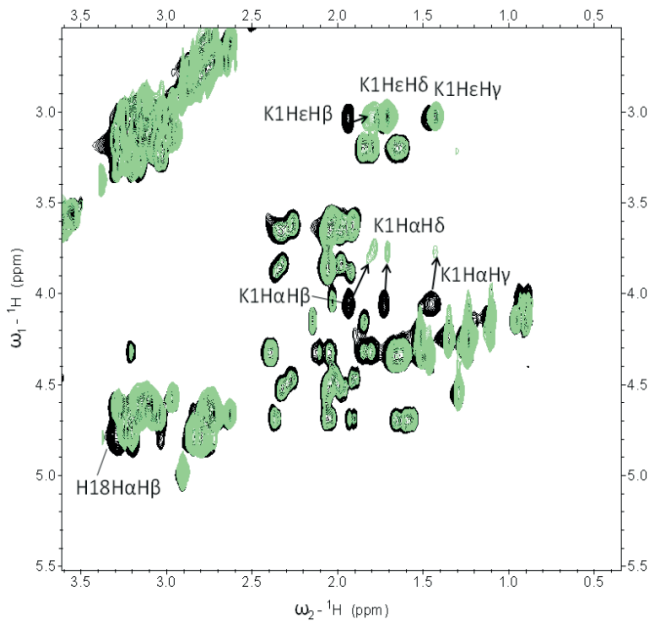
Rysunek 9. Sekwencje aminokwasowe pramlintydu oraz ludzkiej i szczurzej amyliny (numery uniprot odpowiednio P10997 i P12969). Kolorami wyróżniono substytucje jakim poddano amylinę ludzką i szczurzą w stosunku do pramlintydu. Histydyna18, która prawdopodobnie bierze udział w wiązaniu jonów cynku i miedzi, wyróżniono w ramce

Figure 9. Sequences of pramlintide, human and rat amylin (uniprot respectively numbers P10997 and P12969). Substitutions with respect to pramlintide are marked with color. His18, which most likely interacts with metal ions, is marked with a box

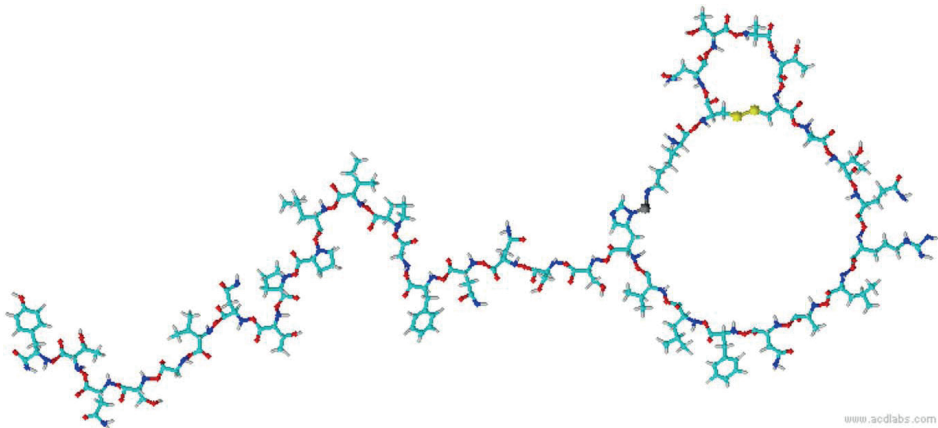
Ciekawym wariantem amyliny jest pramlintyd, jej syntetyczny analog – nowy, dopuszczony w USA w 2006 roku do stosowania w leczeniu cukrzycy hipoglikemiczny lek stosowany u pacjentów, u których leczenie insuliną nie przynosi pożądanych efektów. W sekwencji pramlintydu trzy aminokwasy zastąpiono prolinami (Pro 25, 28 i 29, jak w niefibrylującej sekwencji szczurzej), by zmniejszyć tendencję leku do tworzenia struktur wyższego rzędu i agregowania. Zachowana została natomiast kluczowa dla oddziaływań z metalami histydyna (His18) (Rys. 9) [30].

Celem naszych badań było rozwianie kontrowersji narosłych wokół roli Zn^{2+} w procesie agregacji amyliny, poprzez precyzyjne wskazanie miejsc jego wiązania, określenie termodynamiki tworzącego się kompleksu i zrozumienie wpływu koordynacji Zn^{2+} na proces agregacji i tworzenia się struktur amyloidowych. Pracowaliśmy na dwóch analogach natywnej, silnie agregującej amyliny: na pramlintydzie i fragmencie 1–19 amyliny.

Pokazaliśmy, że zarówno w przypadku amyliny₁₋₁₉ [37], jak i pramlintydu, selektywne przesunięcia sygnałów pochodzących od korelacji $H\alpha$ - $H\beta$ His18 i wszystkich korelacji $H\alpha$ Lys1 w obecności jonów cynku(II) (Rys. 10) wskazują na to, że wiąże się on do imidazolu His18 i do grupy *N*-końcowej aminowej Lys1, wymuszając w ten sposób zgięcie głównego łańcucha peptydowego między resztami 1 i 18 (Rys. 11) [38]. Analogiczny sposób koordynacji zaobserwowano w przypadku amyliny₁₋₁₉ [37].



Rysunek 10. Widmo TOCSY 3 mM pramlintydu (czarne kontury) i 3 mM pramlintydu w obecności 1 ekwiwalentu Zn^{2+} (zielone kontury), pH 7,2, T = 298 K
 Figure 10. TOCSY spectrum of 3 mM pramlintide (black contours) and 3 mM pramlintide in the presence of 1 equivalent of Zn^{2+} (green contours), pH 7.2, T = 298 K

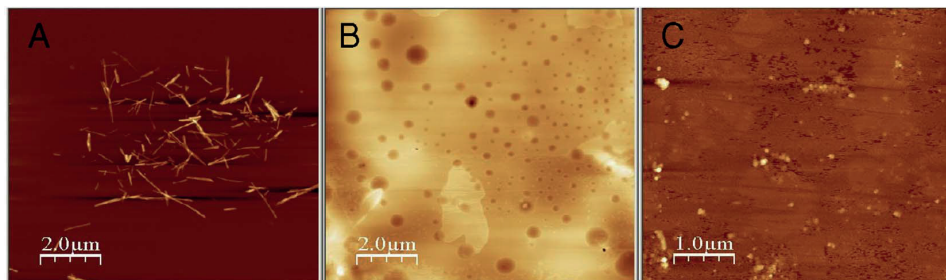


Rysunek 11. Sugerowany sposób koordynacji kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd [38]
 Figure 11. Suggested coordination mode of the Zn^{2+} -pramlintide complex [38]

Termodynamiczna stabilność kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd jest dużo wyższa od stabilności Zn^{2+} -amylina₁₋₁₉ – w pH 7,4, kompleks pramlintydu jest ponad dziesięciokrotnie bardziej stabilny, niż jego krótszy analog, co wskazuje na stabilizującą

rolę rejonu 20–37. Jeszcze bardziej ciekawy jest wpływ tego rejonu na fibrylizację kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd – początkowo dobrze rozpuszczalna, nieagregująca amylna po ok. 20 h od skoordynowania Zn^{2+} , zaczyna tworzyć oligomeryczne agregaty, podczas gdy sam peptyd pozostaje dobrze rozpuszczalny (Rys. 12) [38].

Takie wywołane koordynacją cynku(II) zgięcie peptydu, prowadzące do opóźnionej w czasie agregacji, może być częściowym wyjaśnieniem procesu tworzenia prefibrylarnych, oligomerycznych form amylny, które są znacznie bardziej toksyczne (zarówno dla mikroorganizmów, jak i dla ludzkich komórek β trzustki) niż, duże złogi amyloidowe.



Rysunek 12. Obrazy z mikroskopu sił atomowych A) kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd, inkubowane przez 24 godziny; B) pramlintyd, inkubowany przez 24 godziny; i C) przezroczystą płytkę z miki

Figure 12. Atomic force microscopy images of A) Zn^{2+} -pramlintide complex, incubated for 24 hours; B) pramlintide, incubated for 24 hours; and (C) a transparent MICA plate

Błędne fałdowanie się białek jest powszechną cechą wielu chorób. Najbardziej popularnymi przykładami są białka uwikłane w neurodegenerację – α -synukleina, β -amyloid, huntingtyna lub białko prionowe. Przez prawie dwie dekady byliśmy świadkami toczącej się debaty na temat wpływu jonów metali na molekularne podstawy i, w konsekwencji – na przebieg tych chorób [39]. Niedawno rozpoczęto podobną dyskusję na temat amylny wykazującej liczne podobieństwa do wiążących metal neuro-białek tworzących amyloidy.

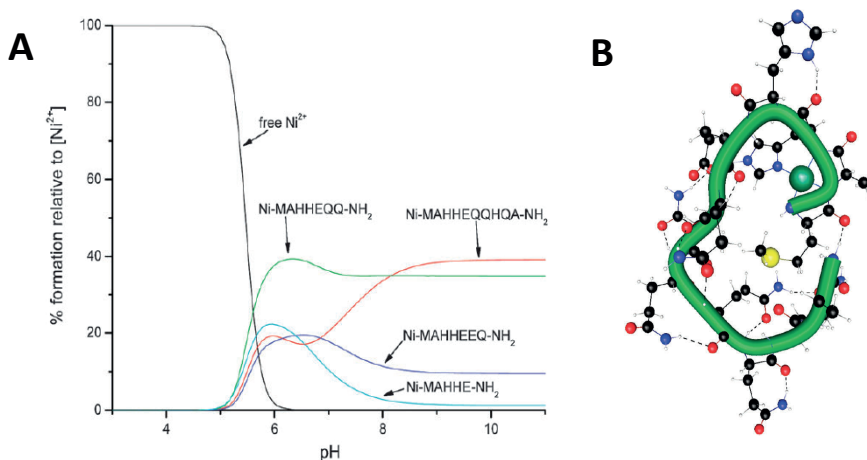
Powyższe, zupełnie nieoczekiwane zjawisko agregacji kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd stawia wiązanie cynku(II) do amylny w zupełnie nowym świetle – zarówno w przebiegu cukrzycy, jak i w terapii przeciwdrobnoustrojowej, wyjaśniając wpływ wiązania metalu na agregację kompleksu.

3. BAKTERYJNE BIAŁKA MAGAZYNUJĄCE JONY Ni^{2+}

Zrozumienie termodynamiki koordynacji niklu(II) do jego potencjalnych miejsc wiążących jest ważnym krokiem w kierunku znalezienia 'słabych punktów' homeostazy tego metalu. Poszukując specyficznych, racjonalnych celów terapeutycznych dla nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, skupiłam się na białkach transportujących i magazynujących nikiel(II) – metal kluczowy dla przeżycia

mikroorganizmów, a zbędny dla funkcjonowania komórek ssaków. Po szczegółowej analizie sekwencji i struktur takich białek (dostępnych odpowiednio w bazach danych uniprot i pdb) okazało się, że wiele z nich jest niezwykle bogatych w reszty histydylowe. Nie dziwi zatem, że histydyny znajdują się w białkach wiążących Ni^{2+} – reszta imidazolowa bardzo efektywnie wiąże ten jon metalu; dziwi natomiast duża liczba powtórzeń tej reszty aminokwasowej i/lub długość rejonów typu ‘HHHHHH’. Wskazałam również, że większość sekwencji polihistydylowych znajduje się w silnie nieustrukturyzowanych rejonach [40] i, że tego typu powtórzenia wiążą nikiel(II) silniej niż motyw ATCUN, jedna z najsilniej wiążących Cu^{2+} i Ni^{2+} sekwencji białkowych, ale tylko w pH niższym niż fizjologiczne [41]. Kompleks, w którym nikiel(II) wiąże się do sąsiadujących z sobą cystein (do cysteinylowych tioli i znajdującego się między nimi amidowego atomu azotu) okazał się trwalszy zarówno od niklowego kompleksu sekwencji polihistydylowych, jak i kompleksu z motywem ATCUN [42].

Pokazaliśmy również, w jaki sposób powtórzenia aminokwasów niebiorących bezpośredniego udziału w koordynacji wpływają na stabilność kompleksu peptydu z takim rejonem [18]. Przeanalizowaliśmy szereg niklowych kompleksów N-końcowych rejonów bakteryjnych białek Hpn i Hpn-like (MAHHE-NH₂, MAHHEEQ-NH₂, MAHHEQQ-NH₂, MAHHEQQHQ-NH₂, MAHHEEQHG-NH₂ i MAHHEQQQQQA-NH₂), których najbardziej prawdopodobną funkcją jest przechowywanie jonów Ni^{2+} . Opierając się na wynikach spektrometrii mas, która pokazała stechiometrię powstających kompleksów, spektroskopii UV-Vis i CD, pokazujących bezpośrednio otoczenie koordynacyjne Ni^{2+} oraz miareczkowań potencjometrycznych, które pozwoliły ustalić stałe tworzenia kompleksów tego metalu z analizowanymi fragmentami białek. Pokazaliśmy korelację między liczbą glutamin występujących w badanych sekwencjach, a stabilnością ich niklowych kompleksów. Okazało się, że im więcej glutamin w sekwencji, tym bardziej stabilne okazywały się badane kompleksy (Rys. 13A) – to bardzo ciekawa zależność, ze względu na to, że glutaminy nie biorą bezpośredniego udziału w koordynacji. Jaka jest więc ich funkcja? Obliczenia dynamiki molekularnej pokazały, że niekoordynujące łańcuchy boczne glutamin tworzą sieć wiązań wodorowych, które prawdopodobnie chronią kompleks przed hydrolizą (Rys. 13B) [18]. To odkrycie pozwala spojrzeć na sekwencje poliglutaminowe, nie tylko te występujące w bakteryjnych białkach uwikłanych w homeostazę metali, ale także w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych, z zupełnie nowej perspektywy.

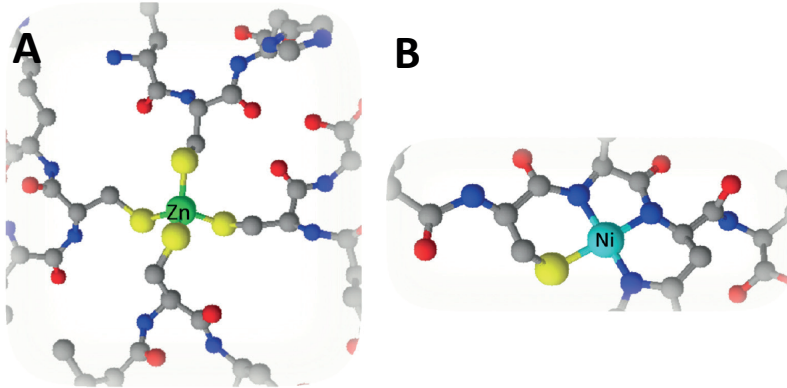


Rysunek 13. A) Wykres kompetycyjny, oparty na całkowitych stałych tworzenia, przedstawiający hipotetyczną sytuację, w której zmieszano równomolowe (0,001 M) ilości Ni^{2+} , MAHHE-NH₂, MAHHEEQ-NH₂, MAHHEQ-NH₂ i MAHHEQQA-NH₂; B) Sieć wiązań wodorowych w kompleksie Ni-MAHHEQQQQQA-NH₂ [18]

Figure 13. A) a competition plot, based on the calculated stability constants, describes a hypothetical situation in which equimolar (0.001 M) amounts of Ni^{2+} , MAHHE-NH₂, MAHHEEQ-NH₂, MAHHEQ-NH₂ and MAHHEQQA-NH₂ are mixed; (B) a network of hydrogen bonds in the Ni-MAHHEQQQQQA-NH₂ complex [18]

Homeostaza Ni^{2+} jest w nierozdzielny sposób powiązana z homeostazą Zn^{2+} – oba metale konkurują o podobne miejsca wiązania. Dobrze obrazuje to przykład białka HypA uwikłanego w fałdowanie hydrogenazy (jego rola polega m.in. na dostarczaniu Ni^{2+} do hydrogenazy). HypA wiąże jon Zn^{2+} w tzw. miejscu strukturalnym – nieustrukturyzowanej pętli, zawierającej w swojej sekwencji dwa motywy CXXC (ELECKDCSHVFKPNALDYGVCEKCHS). Pokazaliśmy, w jaki sposób Zn^{2+} wiąże się do tego rejonu HypA i dlaczego Ni^{2+} , metal o dużym powinowactwie do reszt tiolowych, nie wypiera cynku z badanego fragmentu. Istnieją bardzo duże różnice w termodynamicznej stabilności obu metali z rejonem pętli HypA – jeśli w fizjologicznym pH (pH = 7,4) zmieszalibyśmy równomolowe ilości metali i liganda, to ponad 98% badanego liganda będzie wiązało jony Zn^{2+} [43]. Potwierdza to monitorowane za pomocą CD miareczkowanie omawianego kompleksu Ni^{2+} jonami Zn^{2+} – w miarę dodawania Zn^{2+} zanikają charakterystyczne dla niklowych kompleksów pasma.⁴³ Diametralnie różna stabilność kompleksów wynika z różnych sposobów koordynacji w okołowizjologicznym pH – Ni^{2+} wiąże się do tiolowej siarki i poprzedzających ją amidowych atomów azotu, podczas gdy Zn^{2+} koordynuje do czterech cysteinyłowych tioli (Rys. 14). Ponadto, sposób koordynacji Zn^{2+} do analizowanego rejonu pętli HypA silnie zależy od pH – w pH niższym od 7,4 w wiązaniu biorą udział dwa imidazolowe azoty i dwa cysteinyłowe tiole. Otrzymane wyniki pozwalają zrozumieć (I) dlaczego w biologii miejscem wiązania Zn^{2+} w HypA jest nieustrukturyzowana pętla HypA, a naturalnym otoczeniem koordynacyjnym Ni^{2+}

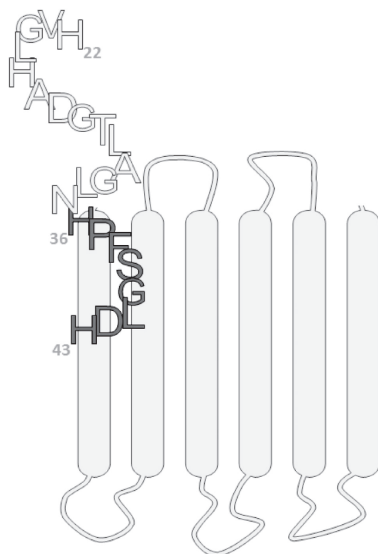
jest jego *N*-końcowa domena oraz (II) w jaki sposób pH-zależna koordynacja Zn^{2+} jest w stanie zmienić konformację białka i sposób wiązania Ni^{2+} [44].



Rysunek 14. Sposób koordynacji Zn^{2+} (A) i Ni^{2+} (B) do rejonu pętli białka HypA [43]
 Figure 14. The coordination of Zn^{2+} (A) and Ni^{2+} (B) to the loop region of HypA [43]

4. TRANSPORT METALI

W większości naturalnych środowisk bakteryjnych dostępność niklu(II) jest bardzo niska (nanomolarna). Bakterie rozwinęły wysoko wyspecjalizowane systemy transportu dla tego metalu, by zapewnić jego dostępność dla niklowo-zależnych enzymów [45]. Importery Ni^{2+} można podzielić na dwie główne kategorie: (I) pojedyncze polipeptydowe permeazy i (II) złożone transportery z rodziny (ang.) ‘*ATP-binding cassette*’, wykorzystujące energię hydrolizy ATP do transportu Ni^{2+} [46], które można podzielić na kanoniczne importery ABC i niedawno odkryte czynniki transportujące czynnik energetyczny (ang. *energy-coupling factor (ECF) transporters*) [47]. Pojedyncze polipeptydowe permeazy dzielą się na trzy grupy: transportery niklowo-kobaltowe (NiCoT), UreH i HupE/UreJ. Ostatni z nich, HupE, jest ewolucyjnie dobrze zachowanym niklowym transporterem, obecnym zarówno u patogennych bakterii, jak i u *Rhizobium leguminosarum*, Gram-ujemnej bakterii współżyjącej z roślinami motylkowymi. Według danych biologicznych, rejonami HupE zaangażowanymi w transport Ni^{2+} są: (I) peryplazmatyczna, *N*-końcowa domena odpowiedzialna za wiązanie metalu ($_{22}HVGLHADGTLA_{35}GLN_{35}$) i błonowy rejon, który przekazuje metal do wnętrza komórki bakteryjnej ($_{36}HPFSGLDH_{43}$) (Rys. 15) [48]. Co ciekawe, pokazano, że transport Ni^{2+} zaburza obecność jonów Cu^{2+} [49].

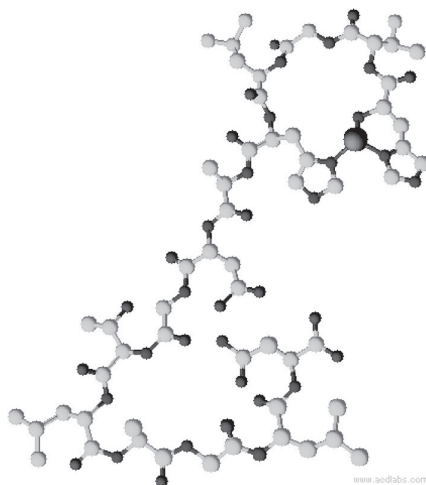


Rysunek 15. Schematyczna budowa transportera HupE z *Rhizobium leguminosarum*. Wskazano sekwencje zaangażowane w transport Ni^{2+} [48]

Figure 15. A schematic representation of the HupE transporter from *Rhizobium leguminosarum*. Indicated are the sequences involved in the transportation of Ni^{2+} [48].

Określiliśmy specyficzność zarówno peryplazmatycznej, jak i błonowej domeny HupE, względem natywnych jonów Ni^{2+} oraz jonów Cu^{2+} i Zn^{2+} , obecnych w ziemiach, które są naturalnym środowiskiem, w którym występuje *Rhizobium leguminosarum*, i które prawdopodobnie mogą być inhibitorami transportu Ni^{2+} , konkurując z nim o miejsca wiążące na HupE.

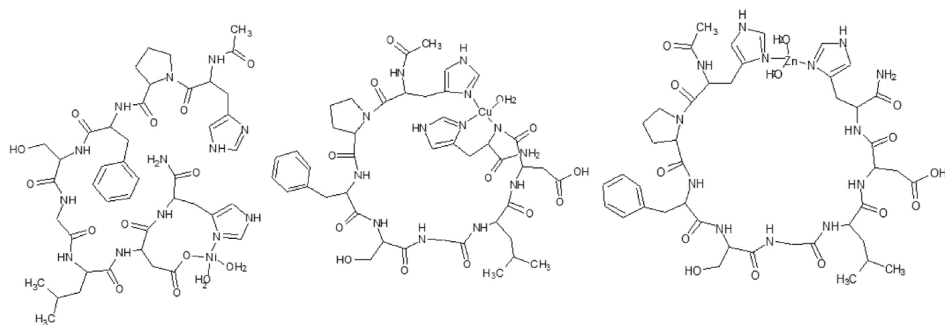
Za pomocą spektroskopii NMR precyzyjnie wskazaliśmy miejsca wiążące Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} w peryplazmatycznym i błonowym fragmencie białka. W pH fizjologicznym (pH = 7,4) peryplazmatyczny rejon ${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$ wiąże badane metale w analogiczny sposób, angażując w koordynację imidazolowy i aminowy atom azotu His1 (tzw. wiązanie histaminopodobne) i azot z imidazolu His5 (Rys. 16). Z termodynamicznego punktu widzenia, Cu^{2+} jest w stanie wyprzeć Ni^{2+} z jego miejsca wiązania w peryplazmatycznym fragmencie HupE, podczas gdy Zn^{2+} nie jest znaczącym konkurentem dla Ni^{2+} ani w stężeniu równomolowym ($[\text{ligand}] = [\text{Ni}^{2+}] = [\text{Cu}^{2+}] = [\text{Zn}^{2+}] = 0.001 \text{ M}$), ani w toksycznym stężeniu metali, przy których liczba *Rhizobium leguminosarum* spada w glebie o kilka rzędów wielkości [$[\text{ligand}] = [\text{Ni}^{2+}] + [\text{Cu}^{2+}] + [\text{Zn}^{2+}]$; $[\text{Ni}^{2+}] = 0,22 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 0,54 \text{ mM}$, $[\text{Zn}^{2+}] = 2,52 \text{ mM}$] [51].



Rysunek 16. Wiązanie jonów Ni^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} do peryplazmatycznej, N-końcowej domeny transportera HupE, odpowiedzialnego za wiązanie metali (${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$). W pH 7,4, peryplazmatyczny fragment wiąże badane metale w analogiczny sposób, angażując w koordynację imidazolowy i aminowy atom azotu His1 (tzw. wiązanie histaminopodobne) i azot z imidazolu His5

Figure 16. The binding of Ni^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} to the periplasmic N-terminal domain of the HupE transporter, responsible for the binding of metals (${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$). At pH 7.4, the periplasmic region coordinates the studied metals in the same binding mode, engaging the imidazole and the amine nitrogens of His1 (the so-called histamine-like binding) and the nitrogen of imidazole His5

Powinowactwo błonowego fragmentu ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$ do jonów Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} jest analogiczne do powinowactwa fragmentu peryplazmatycznego względem wymienionych jonów metali (jony Cu^{2+} są w stanie wyprzeć z niego jony Ni^{2+} , chociaż sposób koordynacji badanych metali do tego rejonu różni się od siebie. W pH fizjologicznym, natywny Ni^{2+} koordynuje do azotu imidazolowego His43 i karboksylowej reszty Asp42, Cu^{2+} z kolei wiąże się do imidazolowych azotów His36, His43 i poprzedzającego His43 amиду. Zn^{2+} wiąże się jedynie do łańcuchów bocznych His36 i His43, a jego sferę koordynacyjną uzupełniają cząsteczki wody (Rys. 17).



Rysunek 17. Schematyczny sposób koordynacji jonów Ni^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} do błonowego fragmentu HupE, ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$, w pH 7,4 [52]

Figure 17. Coordination of Ni^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions to the membrane region of HupE, ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$, pH 7.4 [52]

Termodynamiczne parametry kompleksów utworzonych przez peryplazmatyczny [51] i błonowy [52] fragment HupE okazały się być sporym zaskoczeniem. Spodziewano się, że peryplazmatyczny fragment będzie wiązał Ni^{2+} słabiej od fragmentu błonowego, który 'podaje' transportowane jony włąb komórki – taki sposób koordynacji czyniłby transport wydajnym. Zaobserwowano odwrotną sytuację – peryplazmatyczny fragment, HupE, ${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$, wiąże Ni^{2+} z dużo większym powinowactwem niż transmembranowy rejon ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$. W pH fizjologicznym, tylko około 5% dostępnego Ni^{2+} będzie związane do rejonu błonowego, w pH 5–6 – około 10%, a w pH 4,5 – 13%. Pozostała część metalu pozostaje związana do rejonu peryplazmatycznego. Porównanie termodynamicznych parametrów kompleksów utworzonych przez peryplazmatyczny [51] i błonowy [52] fragment HupE pozwala wytłumaczyć, dlaczego jest on transporterem o średnim powinowactwie i małej wydajności – jego peryplazmatyczny rejon wiąże Ni^{2+} z dużo większym powinowactwem niż odpowiedzialny za transport błonowy fragment ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$, który przekazuje Ni^{2+} do środka komórki. Ponadto, specyficzność obu rejonów względem badanych jonów metali jest podobna – jony Cu^{2+} wiążą się do nich silniej niż jony Ni^{2+} , co tłumaczy, dlaczego Cu^{2+} jest inhibitorem badanego transportera.

Oczywiście należy pamiętać o tym, że wyniki uzyskane *in vivo*, w środowisku błonowym, mogą różnić się od tych uzyskanych *in vitro* dla wyizolowanych fragmentów transportera; niemniej jednak wskazanie sposobu koordynacji i zrozumienie zależności między termodynamiką kompleksów metali z odpowiednimi fragmentami HupE i ich wpływem na wydajność działania transportera jest istotnym wkładem w chemię bionieorganiczną niklowych transporterów (wciąż znacznie mniej poznana niż chemia bionieorganiczna metali dużo bardziej powszechnych w biologii, takich jak żelazo, miedź czy cynk). Wykorzystanie podstawowej wiedzy o strukturalnych i termodynamicznych aspektach transporterów niklowych jest jednym z bardziej obiecujących obszarów badawczych, ukierunkowanych na

zaprojektowanie nowych, specyficznych terapii przeciwdrobnoustrojowych, takich jak (I) strategia 'konia trojańskiego', w której odpowiednie antybiotyki są połączone z nikloforami i są przekazywane przez dany transporter lub pozostają w jego bezpośrednim otoczeniu [53] lub (II) strategia oparta na tzw. odporności odżywczej (ang. 'nutritional immunity'), w której zahamowany zostałby transport Ni^{2+} do wnętrza patogenu.

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiony wyżej cykl prac wyjaśnia elementy homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów. Do ich głównych osiągnięć zaliczam:

- określenie miejsc wiążących Zn^{2+} w cynkoforze Pra1 z *C. albicans*; opisanie geometrii i termodynamiki powstających kompleksów i wskazanie C-końcowego rejonu białka jako miejsca, które wiąże Zn^{2+} z największym powinowactwem;
- określenie miejsc wiążących Zn^{2+} na nieustrukturyzowanej, N-końcowej domenie transportera cynku Zrt1 z *C. albicans* i opisanie geometrii i termodynamiki powstających kompleksów;
- zrozumienie chemii bionieorganicznej transportu Zn^{2+} opartego na cynkoforach (zrozumienie interakcji Pra1-Zrt1); zasugerowanie sposobu przekazywania Zn^{2+} z cynkoforu na transporter Zn^{2+} ;
- określenie specyficzności transportu metali opartego na cynkoforach; pokazanie, że mogą one również (z mniejszą wydajnością) transportować jony Ni^{2+} ;
- wskazanie miejsc koordynujących Zn^{2+} na fragmencie amyliny 1–19 i pramlinydyz – nieagregującym analogu amyliny i opisanie termodynamiki powstających kompleksów;
- zasugerowanie potencjalnego wpływu koordynacji jonów Zn^{2+} na przeciwdrobnoustrojową efektywność działania amyliny; określenie geometrii wiązania i jego wpływu na strukturę badanych ligandów (amylina_{1–19} i pramlinydyz);
- określenie sposobu koordynacji i zrozumienie wpływu niekoordynujących powtórzeń polyGln na strukturę i zwiększoną termodynamiczną stabilność niklowych kompleksów N-końcowego rejonu Hpn-like, bakteryjnego białka magazynującego jony Ni^{2+} ;
- wskazanie roli specyficznych specyficznych rejonów białek chaperonowych z powtórzeniami polyHis i polyGln, do których najsilniej koordynują jony Ni^{2+} i Zn^{2+} ;
- wytłumaczenie wpływu pH i wiązania się Ni^{2+} do N-końcowej domeny HypA, bakteryjnego białka uwikłanego w poprawne fałdowanie się hydrogenazy na wiązanie się Zn^{2+} do tzw. strukturalnego rejonu tego białka;

- wytłumaczenie przeciętnej efektywności działania HupE, bakteryjnego transportera Ni^{2+} ;
- wyjaśnienie selektywności transportera HupE względem jonów Ni^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} .

Cel badań powstał z ciekawości naukowej, a nie z potrzeby znalezienia praktycznego rozwiązania danego problemu, jednak trudno byłoby upierać się przy tym, że opisane wyżej badania nie mają potencjału aplikacyjnego. Termodynamiczna i strukturalna charakterystyka cynkoforów czy transporterów Zn^{2+} i Ni^{2+} może stanowić podstawę, pierwszy krok w kierunku racjonalnego projektowania potencjalnych leków specyficznych wobec mikroorganizmów, które mogą być oparte np. na tradycyjnym leku połączonym z częścią cynkoforu, która jest szczególnie rozpoznawana przez grzybowy przekaźnik leków. Pierwsze badania biologiczne, które pokazują, że *Candida albicans* rozpoznaje C-końcowy rejon Pra1, zostały już wykonane (patrz Rysunek 8 i jego opis).

Pomimo tych wstępnych, bardzo obiecujących danych na temat potencjalnego wykorzystania wyżej opisanej wiedzy, w moim odczuciu jest ona nadal przede wszystkim interesującym wkładem do pięknej, podstawowej chemii bionieorganicznej, pozwalającej na lepsze zrozumienie podstawowych mechanizmów chemicznych. Prace są oparte na dobrze kontrolowanych eksperymentach i uważnych obserwacjach i, chociaż są to wyraźnie podstawowe badania, to widać, że jest to fundament w projektowaniu skutecznych, specyficznych i selektywnych leków do stosowania w ukierunkowanej terapii przeciwdrobnoustrojowej.

PODZIĘKOWANIE

Autorkę wspomaga Narodowe Centrum Nauki (grant SONATA nr UMO-2014/13/D/ST5/02868).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] European Commission, AMR Factsheet, 2017, (https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_factsheet_en.pdf, dostęp 1.03.2018).
- [2] A. Coates, G. Halls, Y. Hu, Brit. J. Pharm., 2011, **163**, 184.
- [3] D. Denningd, M. Bromley, Science, 2015, **347**, 1414.
- [4] M. Vasak, D. Hasler, Curr. Opin. Chem. Biol., 2000, **4**, 177.
- [5] C.S. Hwang, G. Rhie, J.H. Oh, W.K. Huh, H.S. Yim, S.O. Kang, Microbiology, 2002, **148**, 3705.
- [6] I. Yike, Mycopathologia, 2011, **171**, 299.
- [7] D. Edwards, M. Handsley, C. Pennington, Mol. Aspects Med., 2008, **29**, 258.
- [8] Y. Kim, M. Cunningham, J. Mire, C. Tesar, J. Sacchettini, A. Joachimiak, J. Faseb, 2013, **27**, 1917.
- [9] J.L. Boer, S. Mulrooney, R. Hausinger, Arch. Biochem. Biophys., 2014, **544**, 142.
- [10] S. MacPherson, M. Larochele, B. Turcotte, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2006, **70**, 583.
- [11] J. Wątlý, S. Potocki, M. Rowińska-Żyrek, Chem. Eur. J., 2016, **22**, 15992.

- [12] P. Walencik, J. Wątyły, M. Rowińska-Żyrek, *Cur. Med. Chem.*, 2016, **23**, 3717.
- [13] F. Citiulo, I. Jacobsen, P. Miramón, L. Schild, S. Brunke, P. Zipfel, M. Brock, B. Hube, D. Wilson, *PLoS pathogens*, 2012, **8**: e1002777.
- [14] C. Outten, T. O'Halloran, *Science*, 2001, **292**, 2488.
- [15] K. Zakikhany, J. Naglik, A. Schmidt-Westhausen, G. Holland, M. Schaller, *Cell Microbiol*, 2010, **9**, 2938.
- [16] S. Karlin, Z. Zhu, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 14231.
- [17] J.J. Braymer, D. Giedroc, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, **19**, 59.
- [18] N.M. Chiera, M. Rowińska-Żyrek, R. Wiczorek, R. Guerrini, D. Witkowska, M. Remelli, H. Kozłowski, *Metallomics*, 2013, **5**, 214.
- [19] L.A. Kelley, S. Mezulis, C. Yates, M. Wass, M. Sternberg, *Nature Protocols*, 2015, **10**, 845.
- [20] J. Amich, R. Vicentefranqueira, F. Leal, J. Calera, *Eukaryot. Cell.*, 2010, **9**, 424.
- [21] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2017, **46**, 13695.
- [22] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- [23] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2018, **47**, 2646.
- [24] L. Wang, Q. Liu, J.C. Chen, Y. Cui, B. Zhou, Y.X. Chem. Biol. Chem., 2012, **393**, 641.
- [25] G. Wang, *Pharm.*, 2014, **7**, 545.
- [26] J.W. Hoppener, *Cell Biol.*, 2006, **38**, 726.
- [27] K. Ono, M. Condrón, D.B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 14745.
- [28] J. Brender, S. Salamekh, A. Ramamoorthy, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 454.
- [29] E. Lee, S. Singh, L. Legesse, S. Ahmad, E. Karnaukhova, R.P. Donaldson A.M. Jeremic, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 12558.
- [30] A. Sinopoli, A. Magri, D. Milardi, M. Pappalardo, P. Pucci, A. Flagiello, J.J. Titman, V.G. Nicoletti, G. Caruso, G. Pappalardo, O. Grasso, *Metallomics* 2014, **6**, 1841.
- [31] L. Wang, Q. Liu, J.C. Chen, Y.X. Cui, B. Zhou, Y.X. Chem. Biol. Chem. 2012, **393**, 641.
- [32] A. Roberts, B. Leighton, J. Todd, D. Cockburn, P. Schofield, R. Sutton, S. Holt, Y. Boyd, A. Day, E. Foot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, **86**, 9662.
- [33] M. Tomasello, A. Sinopoli, G. Pappalardo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **81**, 442.
- [34] J. Brender, E. Lee, M. Cavitt, A. Gafni, D.J. Steel, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6424.
- [35] R. Nanga, J. Brender, J. Jiadi Xu, G. Veglia, A. Ramamoorthy, *Biochem.*, 2008, **47**, 12680.
- [36] J. Brender, U. Diirr, D. Heyl, M. Budarapu, A. Ramamoorthy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**, 2026.
- [37] M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2016, **45**, 8099-8106
- [38] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **174**, 150.
- [39] M. Rowińska-Żyrek, M. Salerno, H. Kozłowski, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **284**, 298.
- [40] M. Rowińska-Żyrek, J. Zakrzewska-Czerwińska, A. Zawilak-Pawlik, H. Kozłowski, *Dalton T.*, 2014, **43**, 8976.
- [41] M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, H. Kozłowski, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 58.
- [42] H. Kozłowski, S. Potocki, M. Remelli, M. Rowińska-Żyrek, D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2625.
- [43] M. Rowińska-Żyrek, S. Potocki, D. Witkowska, D. Valensin, H. Kozłowski, *Dalton T.*, 2013, **42**, 6012.
- [44] W. Xia, H. Li, K. Sze, H. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 10031.
- [45] A. Sydor, D. Zamble, *Met. Ions Life Sci.*, 2013, **12**, 375.
- [46] D. Rodionov, P. Hebbeln, M. Gelfand, T. Eitinger, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 2520.
- [47] T. Eitinger, D.A. Rodionov, M. Grote, E.W. Schneider, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, **35**, 3.

- [48] B. Brito B., R.I. Prieto, E. Cabrera, M. Mandrand-Berthelot, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, J. Palacios, *J. Bacteriol.*, 2010, **192**, 925.
- [49] M. Albareda, A. Rodrigue, B. Brito, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial, M. Mandrand-Berthelot, J. Palacios J., *Metallomics*, 2015, **7**, 691.
- [50] M. McGrath S., Chaudri., G. Giller, *Industr. Microbiol.*, 1995, **14**, 94.
- [51] M. Rowińska-Żyrek, *Inorg. Chim. Acta*, 2017, **460**, 141.
- [52] M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **180**, 33.
- [53] A. Gorska, A. Sloderbach, M. Marszall, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014, **35**, 442.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 maja 2018