

**POLIHISTYDYLOWE SEKWENCJE Z MOTYWEM  
HIS-TAG – ICH ROLA I BIOLOGICZNE ZNACZENIE  
ODDZIAŁYWANIA Z JONAMI METALI**

POLYHISTIDINE SEQUENCES WITH HIS-TAG MOTIF  
– THEIR ROLE AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF  
INTERACTION WITH METAL IONS

**Joanna Wątył\*, Henryk Kozłowski**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
\* e-mail: joanna.watly@chem.uni.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Powtórzenia aminokwasowe w sekwencjach białkowych
2. Histydyna
3. Chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (IMAC)
4. Naturalne białka bogate w reszty histydylowe
  - 4.1 Hpn i Hpn-like
  - 4.2 AdcR
  - 4.3 AtHMA i AtMTP
  - 4.4. Czynniki transkrypcyjne
  - 4.5. pHpG
5. Termodynamiczne i strukturalne aspekty wiązania jonów metali przez sekwencje białkowe z motywem His-tag

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Joanna Wątyły** uzyskała stopień magistra chemii na Uniwersytecie Wrocławskim w 2012 roku. Jej praca magisterska skupiała się na oddziaływaniu jonów metali z fragmentem białka opiekuńczego HypA z *H. pylori*. Obecnie kończy swoją pracę doktorską pod nadzorem prof. H. Kozłowskiego na tym samym uniwersytecie, badając zachowanie domen z motywami polihistydylowych tagów wiążących jony metali. Jej naukowe zainteresowania obejmują głównie równowagi tworzenia kompleksów pomiędzy jonami metali i ważnymi biologicznie ligandami, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zrozumieniu roli 'nietypowych' sekwencji białkowych w wiązaniu metali, zrozumieniu homeostazy jonów metali u bakterii i grzybów, a także roli metali w biologicznym i farmakologicznym działaniu hemopresyny.

**Prof. dr hab. Henryk Kozłowski** jest związany z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wywodzi się ze szkoły chemii koordynacyjnej prof. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej i jest twórcą polskiej chemii bionieorganicznej. Na Uniwersytecie Wrocławskim uzyskał tytuł zawodowy magistra (1968) oraz stopnie naukowe doktora (1973), doktora habilitowanego (1979) oraz profesora (1989). Lata 1974–75 to czas stażu podoktorskiego w Tokio. W 1979 roku stworzył na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego zespół odnoszący międzynarodowe sukcesy (do 1992 zespół nosił nazwę Bionieorganicznej Chemii Strukturalnej, obecnie jest to Zespół Chemii Bionieorganicznej i Biomedycznej). Tematyka badań prof. Henryka Kozłowskiego obejmuje zagadnienia z pogranicza chemii, biologii i medycyny, koncentrując się m.in. wokół takich zagadnień jak: termodynamika, struktura i właściwości biologiczne układów zawierających jony metali; struktura i funkcje biomolekuł (aminokwasów, peptydów i ich analogów fosfonowych, oksymowych i hydroksamowych; kwasów nukleinowych i ich podjednostek, kwasów peptydonukleinowych oraz nukleozydów modyfikowanych; cukrów i polisacharydów) i ich oddziaływanie z jonami metali; wpływ jonów metali na chemię i biochemię leków (m.in. tetracyklin, antracyklin, famotydyne) i pestycydów; elektrochemia układów bionieorganicznych; chemia bionieorganiczna metali toksycznych (m.in. Ni, Cd, Pb, Cr, Al) oraz molekularne mechanizmy toksyczności metali (m.in. karcynogenezy wywołanej związkami metali); homeostaza jonów metali w białkach bakteryjnych, a także oddziaływanie jonów metali z białkami zawierającymi sekwencje polihistydylowe o motywie His-tag. Profesor Henryk Kozłowski jest również światowym autorytetem w dziedzinie chemii bionieorganicznej procesów neurodegeneracyjnych. Zajmuje się badaniem oddziaływania jonów metali (m.in. Cu, Zn) z fragmentami białek istotnych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.

## ABSTRACT

His-tags are specific sequences containing six to nine subsequent histidyl residues and they are used commercially in immobilized metal affinity chromatography (IMAC) as molecular 'anchors' that bind to a metal ion (usually nickel), immobilized by chelation with nitrilotriacetic acid (NTA) bound to a solid support [37, 38]. Consecutive histidines are the common denominator for both His-tags used in molecular biology and for quite remote biological phenomena – more than 2000 histidine-rich proteins (HRPs) are found in microorganisms including 60% and 82% of archaeal and bacterial species, respectively and their roles are not well characterized [73]. The physicochemical properties of histidine make it a versatile amino acid that influences protein conformation and enzymatic activity [15]. Many natural proteins with a His-tag domain are assigned to different functions, for example: most bacterial proteins, containing this motif are probably involved in the homeostasis of nickel ions [68, 76], while others, *e.g.* newly isolated peptides from the venom of the snake genus *Atheris* contain poly-histidyl-poly-glycyl sequences (pHpG) can act on the cardiovascular system by inhibiting snake venom metalloproteinases and affect its function by acting on specific receptors [58, 62]. His-rich motifs have been found also *e.g.* in Zn<sup>2+</sup> transporters, prion proteins, His-rich glycoproteins, transcription factors or numerous copper-binding proteins [56, 67, 84].

Binding mode and the thermodynamic properties of the system depends on the specific metal ion and the histidine sequence. Despite the wide application of the His-tag for purification of proteins, little is known about the properties of metal-binding to such tag domain. Recent experimental and theoretical studies have shown that metal ions, *e.g.* Cu<sup>2+</sup> can bind to various sets of imidazoles depending on the number of histidine residues that are located in His-rich sequences. The occurrence of polymorphic binding states and the formation of an  $\alpha$ -helical structure induced by metal ion coordination suggest that proteins with a His-tag domain may serve as the dynamic site able to 'move' metal ions along the tag sequence [99, 100]. This might explain the frequent occurrence of such sequences in bacterial Ni<sup>2+</sup> chaperones, which transfer the metal ion between different proteins.

Keywords: histidine, His-tag motif, metal ions, proteins

Słowa kluczowe: histydyna, motyw His-tag, jony metali, białka

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADAM	– adamalizyny – białka spokrewnione z SVMPPs (ang. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i> )
ATCUN	– amino-terminalny motyw wiążący jony $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Ni}^{2+}$ (ang. <i>amino terminal <math>\text{Cu}^{2+}</math> and <math>\text{Ni}^{2+}</math> binding site</i> )
CD	– spektroskopia dichroizmu kołowego (ang. <i>circular dichroism spectroscopy</i> )
DFT	– teoria funkcjonału gęstości – podstawa wielu metod kwantowo-mechanicznych, używanych do modelowania struktury (ang. <i>density functional theory</i> )
EPR	– spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. <i>electron paramagnetic resonance spectroscopy</i> )
His-tag	– sekwencja zawierająca ciąg sąsiadujących reszt histydylowych
Hpn	– polihistydylowe białko wiążące nikiel w <i>H. pylori</i> (ang. <i>H. pylori nickel-binding protein</i> )
HRPs	– białka bogate w reszty histydylowe (ang. <i>histidine rich proteins</i> )
IDA	– kwas iminodiactowy (ang. <i>iminodiacetic acid</i> )
IMAC	– chromatografia powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (ang. <i>immobilized metal affinity chromatography</i> )
MD	– metoda symulacji komputerowej do badania oddziaływań atomów i cząsteczek (ang. <i>molecular dynamics</i> )
MJD	– ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3, choroba Machado-Josepha (ang. <i>Machado-Josepha disease</i> )
NTA	– kwas nitylotriactowy (ang. <i>nitrilotriacetic acid</i> )
pHpG	– sekwencja zawierająca polihistydylowy i poliglicylowy motyw
SBMA	– opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni, choroba Kennedy'ego (ang. <i>spinal and bulbar muscular atrophy</i> )
SPR	– technika powierzchniowego rezonansu plazmowego (ang. <i>surface plasmon resonance</i> )
SRRs	– sekwencje bogate w jeden rodzaj aminokwasu (ang. <i>single residue rich sequences</i> )
SVMPPs	– metaloproteiny jadu węża (ang. <i>snake venom metalloproteinases</i> )
UV-Vis	– spektroskopia absorpcji elektronowej w zakresie widzialnym i nadfioletowym (ang. <i>ultraviolet-visible spectroscopy</i> )

Zastosowane skróty jedno- i trójliterowe dla nazw aminokwasów w sekwencjach wszystkich opisywanych peptydów oraz badanych ligandów przedstawiono zgodnie z zaleceniami IUB-IUPAC.

## WPROWADZENIE

Polihistydylowe tagi (poli-His-tag) to peptydy zawierające wielokrotne powtórzenia reszt histydylowych, powszechnie stosowane w biologii molekularnej do oczyszczania rekombinowanych białek od ponad czterech dekad. Ich rozpowszechnienie oraz niezwykła skuteczność są przypisane właściwościom reszt histydylowych, które mają zdolność do efektywnego wiązania jonów metali. Takie motywy zostały również zidentyfikowane w kilkuset naturalnych białkach. Można je znaleźć m.in. w białkach transportujących jony metali, bakteryjnych białkach chaperonowych, białkach prionowych oraz jadach niektórych afrykańskich węży. Pomimo, iż oddziaływania między histydyną i jonami metali przejściowych w układach biologicznych są badane od dziesięcioleci, wiedza na temat właściwości termodynamicznych i strukturalnych kompleksów metali przejściowych z peptydami zawierającymi motywy His-tag oraz rola polihistydylowych domen w naturalnych białkach jest wciąż znikoma.

### 1. POWTÓRZENIA AMINOKWASOWE W SEKWENCJACH BIAŁKOWYCH

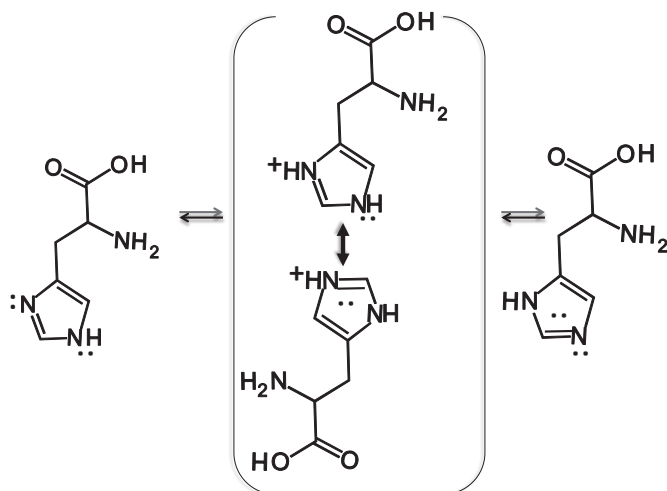
Aminokwasy są podstawową jednostką strukturalną budującą białka. Częstość występowania różnych aminokwasów wśród proteomów różnych organizmów żywych uważa się za podobną i waha się w granicy od 1 do 10% [1]. Jednakże, w niektórych przypadkach dany aminokwas może być wielokrotnie powielony w pewnym odcinku białka, w celu osiągnięcia unikalnych funkcji. Takie specyficzne fragmenty o małej różnorodności reszt aminokwasowych lub zawierające powtórzenia tylko jednego rodzaju aminokwasu zostały nazwane SRRs (ang. *single residue rich sequences*). Ich największa procentowa zawartość została zidentyfikowana w proteomach komórek eukariotycznych (około 5%) [2], zaś około 1,4% wszystkich naturalnych białek zawiera regiony z co najmniej sześciokrotnym powtórzeniem jednego aminokwasu [3, 4].

Do najczęściej występujących SRRs należą odcinki zawierające reszty, takie jak: Leu, Ala, Asp, Ser, Gly, Glu i Gln [5, 6]. Często są one istotne z funkcjonalnego i medycznego punktu widzenia. Na przykład białka zawierające długie powtórzenia glutamylowe (poly-Q) są związane z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak np. *choroba Huntingtona*, *choroba Kennedy'ego* (SBMA), czy ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (choroba Machado-Josepha, MJD) [7–9]. Choroby te są wywoływane agregacją poliglutamylowych białek, co przyczynia się do neurotoksyczności i stopniowej śmierci neuronów [10–12]. Natomiast sekwencje zawierające powtórzenia reszt arginylowych, obecne w wirusowych białkach Tat i Rev, są związane z chorobami układu odpornościowego człowieka [13]. Inne reszty, takie jak cysteinyłowa czy histydyłowa występują w sekwencjach białek ze względnie niską częstotliwością (< 2,5%) [5], mimo iż najczęściej pełnią kluczową rolę w miejscach aktywnych enzymów i/lub miejscach wiążących jony metali w białkach [14].

## 2. HISTYDYNA

Spośród dwudziestu naturalnych aminokwasów histydyna (His, H) jest najbardziej wielofunkcyjnym aminokwasem, dzięki swojej unikalnej strukturze cząsteczkowej [15]. Histydyna w łańcuchu bocznym posiada imidazolową grupę funkcyjną, która zawiera dwa atomy azotu, z których oba mogą być protonowane przy wartościach  $pK_a \sim 6$  oraz 14 dla wolnego aminokwasu. Wartości te mogą być zmieniane przez środowisko białka oraz koordynację jonów metali. Utrata pierwszego protonu skutkuje obojętnym donorem azotu imidazolowego, podczas gdy utrata drugiego protonu prowadzi do utworzenia anionu imidazolowego [16].

Histydyna, dzięki obecności dwóch atomów azotu w pierścieniu jest zaliczana do aminokwasów zasadowych. Jeden z wodorów w imidazolu jest labilny, dzięki czemu może być położony na jednym z atomów azotu, tworząc równoważne formy tautomeryczne. Dzięki możliwościom protonowania i deprotonowania atomów azotów w pierścieniu imidazolowym w sposób zależny od wartości pH, histydyna jest idealnym kandydatem do wiązania się z jonami metali w sposób odwracalny, w odpowiedzi na niewielkie zmiany pH środowiska (Rys. 1) [17].



Rysunek 1. Protonowanie i deprotonowanie bocznego łańcucha histydyny. Imidazolowy łańcuch boczny histydyny może być protonowany, gdy wartość pH ulega obniżeniu, podczas gdy wartość pH zwiększa się (do pH około 8) dochodzi do deprotonowania. Po związaniu z jonem metalu,  $pK_a$  reszty histydylowej może być obniżone ze względu na charakter jonów metali (kwasy Lewisa)

Figure 1. Protonation and deprotonation of the side chain of histidine. The imidazole side chain of histidine may be protonated when the pH is lowered, while the value of pH is increased (to about pH 8) comes to the deprotonation. After binding of a metal ion,  $pK_a$  of histidyl residue may be lowered due to the nature of the metal ions (Lewis acids)

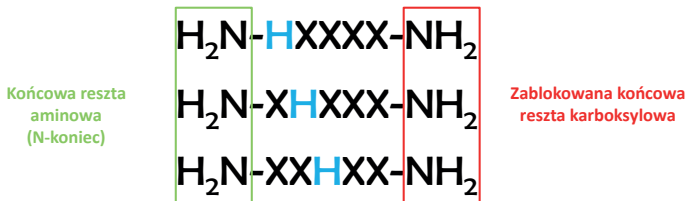
Oddziaływania histydyny z innymi aminokwasami oraz kationami metali w białkach zostały podzielone na kilka typów. Do najważniejszych z nich należą: (i) oddziaływania kation- $\pi$  (między resztami aromatycznymi a histydyną – jej

formą uprotonowaną w kwaśnym pH) [18]; (ii) oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  (nazywane również ‘stackingiem’ – możliwe podczas oddziaływania z aromatycznymi łańcuchami bocznymi aminokwasów, takich jak: His, Phe, Tyr i Trp) [19]; (iii) oddziaływania wodór- $\pi$  (polarny atom wodoru w histydynie może tworzyć wiązanie wodorowe z innymi aromatycznymi aminokwasami w orientacji ‘T’) [20]; (iv) oddziaływania prowadzące do powstania wiązania o charakterze koordynacyjnym (zasadowy atom azotu w pierścieniu imidazolowym, posiadający wolną parę elektronową jest idealnym ligandem dla jonów takich jak:  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) [21].

Znaczenie oddziaływania histydyny z jonami metali przejściowych jest intensywnie badane od lat [22–29]. Obecność reszty histydylowej w dowolnej pozycji łańcucha peptydowego stanowi doskonały punkt kotwiczenia dla jonów  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oraz  $Ni^{2+}$ . Sposób koordynacji jest silnie uzależniony od położenia i ilości reszt histydylowych w sekwencji białkowej oraz od obecności sąsiadujących reszt aminokwasowych, a także od struktury łańcucha peptydowego, co znacznie wpływa na stabilizację lub przeciwnie – destabilizację miejsca wiązania jonu metalu, dzięki bezpośrednim lub pośrednim oddziaływaniom [17]. Szczegółowa wiedza na temat chemii tych oddziaływań jest kluczem do zrozumienia ich biologicznych skutków.

Biologicznie istotne jony metali, takie jak miedź, nikiel, cynk, czy żelazo, zazwyczaj koordynują do jednego z imidazolowych atomów azotu  $N^1$ -Im (tzw. atom ‘pyrrole-like’) lub  $N^3$ -Im (tzw. atom ‘pyridine-like’) (jak np. w ureazie, karboksypeptydazie, niebieskich białkach miedziowych, czy w białkach zawierających hem). Inną możliwością koordynacji jest funkcjonowanie imidazolu jako liganda mostkującego, w którym zarówno atomy  $N^1$  (z grupy  $N^1H$ ) oraz  $N^3$  uczestniczą w wiązaniu jonów metali, jak np. w cynkowo-miedziowej dysmutazie ponadtlenkowej (Cu-Zn SOD) [30, 31].

Istotny wpływ na tworzenie kompleksów oraz ich właściwości termodynamiczne oraz strukturalne ma lokalizacja histydyny w łańcucha peptydowym. Szczegółowe badania zostały przeprowadzone dla układów, w których histydyna zajmuje pozycję 1, 2 lub 3 (Rys. 2).



Rysunek 2. Rozmieszczenie reszt His w sekwencji białkowej istotnie wpływa na właściwości wiążące jony metali. Najważniejsze właściwości His w pozycji 1, 2 lub 3 zostały opisane poniżej

Figure 2. Location of His residues in the protein sequence significantly affect the binding properties of the metal ions. The most important characteristics of His in position 1, 2 or 3 are described below

Usytuowanie histydyny jako *N*-terminalnego aminokwasu skutkuje tworzeniem kompleksów, w których jony niklu i miedzi są związane przez imidazolowy



azot His1 oraz azot z grupy aminowej His1. Taki sposób koordynacji nosi nazwę tzw. 'histamine-like'. Jest dobrze udokumentowane, że w przypadku gdy jon  $\text{Cu}^{2+}$  lub  $\text{Ni}^{2+}$  jest związany do reszty histydylowej, wraz ze wzrostem pH dochodzi do dysocjacji protonu i koordynacji kolejnych amidowych atomów azotu, zmieniając sposób koordynacji z  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{imid}}\}$  na  $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{amid}}\}$ , tworząc kompleks z sześciocząłnowym pierścieniem. W przypadku jonów cynku, sposób koordynacji 'histamine-like' występuje w całym zakresie pH, dodatkowo w wiązanie jonu metalu mogą być zaangażowane donory tlenowe (z grupy karbonylowej lub otaczających cząsteczek wody) [32, 33]. Peptydy, w których grupa aminowa histydyny w pozycji 1 jest zablokowana, wiążą jony  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Cu}^{2+}$  do imidazolowego azotu oraz do dwóch lub trzech azotów amidowych leżących po prawie stronie, prowadząc do utworzenia mniej stabilnego, siedmioczłonowego pierścienia chelatowego i jednego lub dwóch stabilnych pierścieni pięcioczłonowych [25].

W przypadku, gdy reszta His jest na drugiej pozycji w łańcuchu bocznym peptydu, jony niklu i miedzi tworzą wyjątkowo stabilne termodynamicznie kompleksy z pięcioczłonowymi  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{amid}}\}$  i sześcioczłonowymi  $\{\text{N}_{\text{imid}}, \text{N}_{\text{amid}}\}$  pierścieniami chelatowymi, stabilizującymi strukturę kompleksu. W wiązanie jonu metalu zaangażowane są wówczas atomy azotu zarówno z pierścienia imidazolowego, wiązania peptydowego przy His2, jak i grupy aminowej z N-końca peptydu. Sfera koordynacyjna jonu metalu jest uzupełniona w pozycji ekwatorialnej atomem tlenu z cząsteczki wody lub np. grupy karbonylowej [33]. Natomiast gdy peptyd jest blokowany na N-końcu i posiada His w pozycji 2, zwykle dochodzi do utworzenia kompleksów z koordynacją  $\{\text{N}_{\text{imid}}, 2\text{N}_{\text{amid}}\}$  w zakresie pH 6–10, a czwarta pozycja w tym kompleksie o geometrii płaskiego kwadratu może być zajęta przez cząsteczkę wody lub inną grupę peptydową [22].

Białka z His w pozycji trzeciej są określane jako białka z motywem ATCUN (ang. *amino terminal  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  binding site*). Ze względu na to, iż takie motywy występują naturalnie w niektórych rodzajach albumin (np. albumina surowicy krwi ludzkiej, HSA – ang. *human serum albumin*, surowicza albumina wołowa, BSA – ang. *bovine serum albumin* oraz albumina królicza, RSA – ang. *rabbit serum albumin*), neuromedynach C i K, protaminie P2A ludzkiej spermy oraz histatynach, są nazywane również 'albumin-like' [35]. Sekwencje z motywem ATCUN posiadają wyjątkowe powinowactwo do jonów  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Ni}^{2+}$ , tworząc kompleksy z trzech połączonych ze sobą pierścieni chelatowych o sposobie koordynacji:  $\{1\text{N}_{\text{imid}}, 2\text{N}_{\text{amid}}, \text{NH}_2\}$ . Imidazolowy atom azotu jest głównym miejscem kotwiczenia jonu metalu, a wraz ze wzrostem pH, dochodzi do wiązania jonu metalu przez dwa amidowe atomy azotu oraz azot z grupy aminowej. Taki sposób koordynacji jest scharakteryzowany przez utworzenie trzech termodynamicznie stabilnych pierścieni chelatowych – jednego sześcioczłonowego pomiędzy jonem metalu, imidazolowym atomem azotu i azotem z grupy amidowej His3 oraz dwóch pięcioczłonowych pierścieni pomiędzy metalem, kolejnym amidowym atomem azotu oraz azotem z grupy aminowej [24]. Do deprotonowania dwóch grup amidowych i wiązania jonu metalu



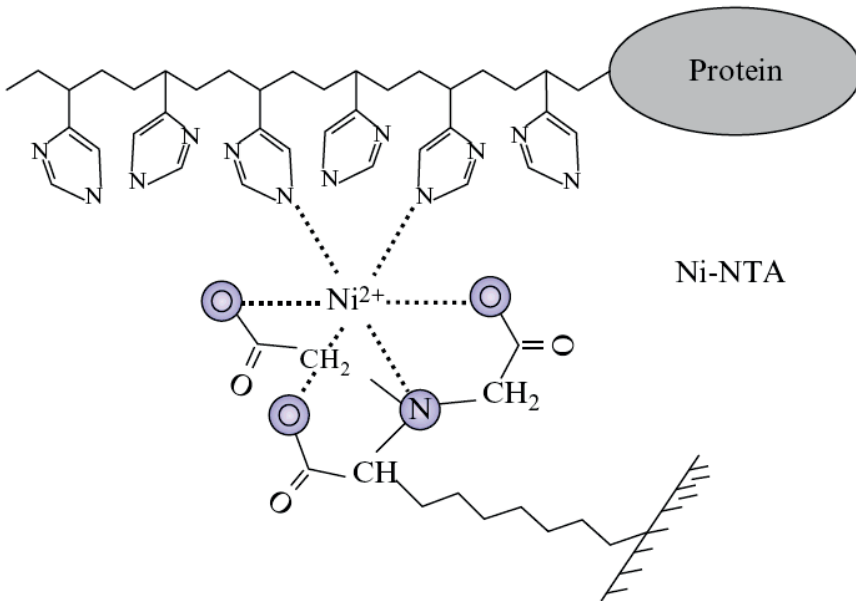
dochodzi w bardzo wąskim zakresie pH; w przypadku jonu  $\text{Cu}^{2+}$  proces ten zachodzi zazwyczaj przy wartości pH pomiędzy 4 i 5. Kompleks z czterema atomami azotu skoordynowanymi do jonu metalu w sposób:  $\{1\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}_{\text{amid}}, \text{NH}_2\}$ , charakteryzuje się najwyższą stabilnością spośród wcześniej opisanych kompleksów z His w różnych położeniach. W przypadku peptydów *N*-terminalnie blokowanych z His w pozycji 3, jon metalu przy wyższych wartościach pH jest skoordynowany przez imidazolowy azot oraz trzy azoty amidowe [33].

Niezwykle wysoka skuteczność wiązania jonów metali przez histydynę wywołała lawinę pytań, na przykład: czy dostępność większej ilości reszt histydylowych w sekwencji aminokwasowej może prowadzić do utworzenia jeszcze bardziej stabilnych kompleksów?; czy kompleksy z jonami cynku(II), które nie są w stanie deprotonować azotów amidowych, ale mogą wiązać nawet kilka reszt histydylowych, będą najbardziej stabilne? Jaki jest wpływ ilości reszt histydylowych oraz ich rozmieszczenie w sekwencji na skuteczność wiązania jonów metali? Znalezienie odpowiedzi na te, i wiele innych pytań stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnego badacza.

### 3. CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA NA UNIERUCHOMIONYCH JONACH METALI (IMAC)

Reszta histydylowa, a właściwie peptyd z wielokrotnym powtórzeniem tego aminokwasu, jest nieodzownym elementem w inżynierii biomedycznej. Syntetyczne peptydy, bogate w reszty histydylowe, nazywane His-tagami, są powszechnie stosowane od ponad 40 lat do oczyszczania rekombinowanych białek w chromatografii powinowactwa na unieruchomionych jonach metali (IMAC) [36]. Takie peptydy posiadają specyficzną sekwencję od dwóch do dziesięciu sąsiadujących reszt histydylowych i są przyczepiane do C- lub *N*-końca rekombinowanego białka w procesie oczyszczania tą metodą. Polihistydylowa sekwencja His-tag jest łatwa do usunięcia po oczyszczeniu, a otrzymane białko uzyskuje bardzo wysoką czystość [37].

Ideologia techniki IMAC jest oparta na tworzeniu wiązań koordynacyjnych pomiędzy imidazolowymi azotami w resztach histydylowych His-tagu (przyczepionego do oczyszczanego białka) i jonami metali (zazwyczaj  $\text{Ni}^{2+}$ , ale mogą to być również:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Wybrany jon metal jest częściowo skoordynowany za pomocą kwasu iminodioctowego (IDA) [38] lub kwasu nitrylotriooctowego (NTA) [39] (Rys. 3), przyczepionego do podłoża w kolumnie chromatograficznej. His-tagi nie są ustrukturyzowane, dzięki czemu posiadają dużą zdolność do łatwego tworzenia kompleksów chelatowych [39].



Rysunek 3. Sposób oddziaływania imidazolowych azotów w resztach histydylowych His-tagu z jonem metalu, unieruchomionym w podłożu za pomocą chelatującego liganda NTA w technice IMAC. W zaproponowanym modelu koordynacji jonów Ni<sup>2+</sup> do NTA, dochodzi do utworzenia kompleksu o geometrii oktaedrycznej. Chelatowany jon nikiel(II) posiada cztery miejsca koordynacyjne zajmowane przez ligand NTA oraz dwa wolne miejsca, zdolne do oddziaływania z imidazolowymi azotami w His-tagu [36]

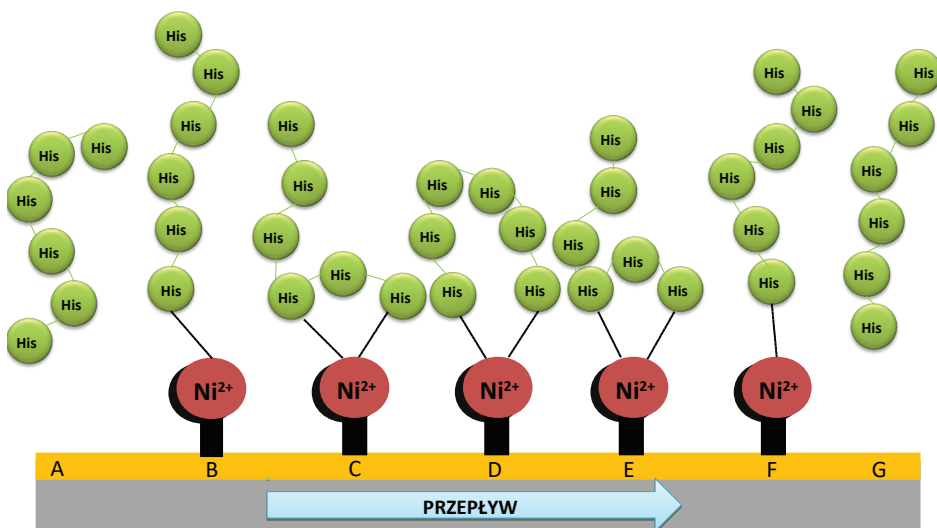
Figure 3. Interaction mode between imidazole nitrogens in histidine residues of His-tag and the metal ion immobilized by the chelating ligand NTA in IMAC technique. In the proposed model, the coordination of Ni<sup>2+</sup> ion to the NTA leads to the formation of the octahedral complex. Chelated Ni(II) ion have four coordination sites occupied by the ligand NTA and two sites, capable of interacting with the imidazole nitrogens in the His-tag [36]

W 1988 roku Hochuli i współpracownicy w swojej pionierskiej pracy nad rozwojem technologii His-tag zastosowali tagi zawierające pięć i sześć sąsiadujących reszt histydylowych, uważając iż takie sekwencje rzadko występują w naturalnych białkach i będą stanowić gwarancję wysokiej selektywności [40]. Po dzień dzisiejszy, His-tag z sześcioma resztami histydylowymi jest najpowszechniej stosowanym tagiem w chromatografii IMAC, a niezwykle skuteczne wiązanie jonów Ni<sup>2+</sup> przez histydynę zostało wykorzystane w oczyszczaniu białek i zyskało wielki sukces na rynku komercyjnym.

Technika IMAC jest stosowana również do oczyszczania niezmodyfikowanych białek, zawierających histydylowe reszty [38], a także w celu określenia powinowactwa metal-białko (również białek etykietowanych fluorescencyjnie lub innych cząsteczek w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*), we frakcjonowaniu oraz wykrywaniu białek, a także w oczyszczaniu immunoglobulin oraz izolacji kwasów nukleinowych [36].

W zależności od zastosowania, tagi w chromatografii powinowactwa muszą spełniać określone wymagania. Gdy są one przewidziane do zastosowania w testach wiążących ligand niezbędna jest silna interakcja. Z drugiej strony, gdy tagi stosowane są do oczyszczania, jedynie umiarkowane stałe dysocjacji są wymagane w celu umożliwienia łagodnego wymywania z kolumny [41].

Dokładny mechanizm wiązania jonów metali do tagów, stosowanych w IMAC nie jest znany. Istnieje jedynie kilka doniesień, opierających się głównie na symulacjach dynamiki molekularnej. Badania przeprowadzone przez Liu i współpracowników wykazały, że jony metali takie jak:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Co}^{2+}$  wiążą się z dwiema resztami histydylowymi:  $n$  i  $n+2$  w przypadku, gdy tag zawiera trzy lub więcej reszt His [42, 43].

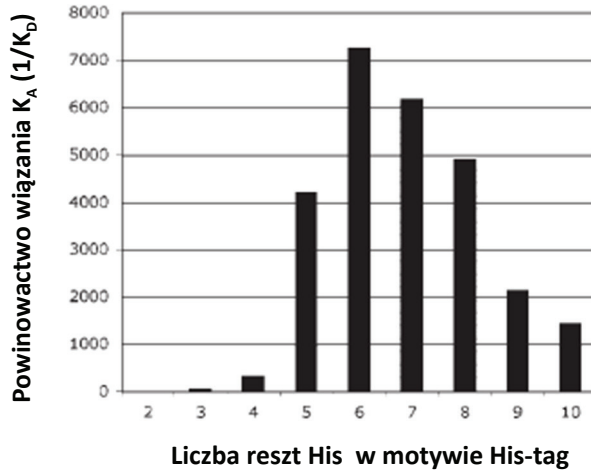


Rysunek 4. Schematyczny mechanizm wiązania His-tagu, zawierającego sześć reszt histydylowych, do fazy stacjonarnej – układu  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA w chromatografii powinowactwa z unieruchomionym jonem metalu (IMAC).  $\text{Ni}^{2+}$  jest unieruchomiony w podłożu przez ligand chelatujący NTA.  $\text{His}_6$ -tag oddziałuje z jonem metalu w kilku etapach: A: wolny His-tag; B: pierwszy kontakt z  $\text{Ni}^{2+}$  i utworzenie kompleksu z jedną resztą histydylową; C-E: tworzenie kompleksów z dwiema resztami histydylowymi, w których  $n$  i  $n+2$  lub  $n$  i  $n+5$  reszty są skoordynowane do  $\text{Ni}^{2+}$ ; F, G: oddysocjowanie  $\text{Ni}^{2+}$  z  $\text{His}_6$ -tagu [37]

Figure 4. Schematic mechanism of  $\text{His}_6$ -tag binding to  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA in IMAC chromatography.  $\text{Ni}^{2+}$  is immobilized to the surface by an NTA chelator.  $\text{His}_6$ -tag interacts with the metal ion in few steps: A: unbound His-tag; B: first contact with  $\text{Ni}^{2+}$  – monovalent complex, C-E: divalent complexes in which  $n$  and  $n+2$  or  $n$  and  $n+5$  imidazole nitrogens are coordinated to  $\text{Ni}^{2+}$ ; F,G: dissociation of  $\text{Ni}^{2+}$  from a  $\text{His}_6$ -tag [37]

Pierwsze próby eksperymentalnego scharakteryzowania mechanizmu oddziaływania jonów metali z His-tagami, o różnej kombinacji reszt histydylowych i alanylowych, zostały podjęte przez Knecht i współpracowników w 2009 roku [37]. Sposób wiązania jonów  $\text{Ni}^{2+}$  został określony przez wartość pozornej stałej dysocjacji

(Kd) =  $14 \pm 1$  nM, za pomocą techniki powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR). W tych badaniach, His-tag zawierający sześć reszt histydylowych okazał się najskuteczniejszym tagiem, wiążąc jon metalu z najwyższym powinowactwem, gdy dwie reszty His (oddzielone od siebie jedną lub czterema histydynami) były zaangażowane w wiązanie metalu (Rys. 4). Wykazano również zależność między liczbą reszt His w His-tagu i ich właściwościami wiążącymi - wydłużenie polihistydyłowej sekwencji z sześciu do siedmiu lub dziesięciu reszt His, powoduje zmniejszenie powinowactwa, prawdopodobnie ze względów na efekt entropowy (Rys. 5).



Rysunek 5. Powinowactwo wiązania  $K_A$  ( $1/K_D$ ) różnej długości polihistydyłowych tagów do fazy stacjonarnej  $Ni^{2+}$ -NTA w eksperymencie SPR. Peptyd sześciohistydyłowy wykazuje najwyższe powinowactwo ( $3 \times 10^8 M^{-1}$ ), spośród wszystkich porównywanych peptydów. Peptydy zawierające dwie lub trzy reszty His wykazują dość niskie powinowactwo w stosunku do peptydów o długości od pięciu do ośmiu reszt His. Dla dwóch najdłuższych peptydów (zawierających dziewięć i dziesięć reszt histydyłowych), powinowactwo spada znacznie poniżej  $10^8 M^{-1}$  [37]

Figure 5. Binding affinity  $K_A$  ( $1/K_D$ ) of different oligohistidine tags in surface plasmon resonance experiment (SPR). The hexahistidine peptide shows the highest affinity ( $3 \times 10^8 M^{-1}$ ), among the compared peptides. Peptides containing two or three His residues exhibit a rather weak affinity compared to the peptides with a length of five to eight His residues. For the two longest peptides (containing nine and ten His), the affinity drops substantially below  $10^8 M^{-1}$  [37]

Chociaż technika IMAC z wykorzystaniem polihistydyłowych tagów jest standardową procedurą oczyszczania, mechanizm wiązania jonów metali przez peptydy z motywami His-tag nie jest wciąż w pełni poznany. W przypadku projektowania nowych tagów na podstawie technologii zaproponowanej przez Hochuli (polihistydyłowy tag/ $Ni^{2+}$ -NTA), wymagane jest lepsze zrozumienie molekularnych podstaw tych oddziaływań.

Niezwykle interesujące jest również powszechne zjawisko występowania polihistydyłowych motywów w wielu naturalnych białkach. Dlaczego natura wykształciła takie domeny? Jakie pełnią funkcje? Czy oddziaływanie z jonami metali jest podobne do tego obserwowanego w przypadku His-tagów stosowanych w IMAC?

#### 4. NATURALNE BIAŁKA BOGATE W RESZTY HISTYDYLOWE

Białka bogate w reszty histydylowe (ang. *histidine rich proteins*, HRP) można podzielić na takie, które posiadają dużą ilość reszt His, oddzielonych od siebie innymi aminokwasami lub takie, które zawierają długie fragmenty sąsiadujących reszt His. HRP są obecne w organizmach, należących zarówno do archeonów, bakterii jak i eukariontów. W proteomach organizmów prokariotycznych występuje ponad 2000 takich białek. Wiele z nich bierze udział w różnych procesach biologicznych, związanych między innymi z homeostazą jonów metali, ich transportem oraz przechowywaniem [14, 32]. Białka obecne w organizmach eukariotycznych mogą pełnić również inne funkcje, np. histatyny (rodzina małych białek HRP obecna w ślinie) posiadają działanie przeciwdrobnoustrojowe w jamie ustnej [44–46], natomiast białko HRP-2 (ang. *histidine-rich protein 2*) z *Plasmodium falciparum* jest zaangażowane w polimeryzację hemu [47–49].

Szczególną grupę HRP stanowią białka zawierające sekwencje z bardzo długimi powtórzeniami histydyłowymi lub z kilkoma domenami krótszych polihistydylowych odcinków. Występują one między innymi w bakteryjnych białkach opiekuńczych (ch peronach), transporterach jonów metali, białkach prionowych, jadach niektórych węży oraz ludzkich czynnikach transkrypcyjnych (Tab. 1) [50]. W większości przypadków niewiele wiadomo na temat dokładnej roli oraz mechanizmu działania takich białek, ale pewnym jest, że są one niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania.

Tabela 1. Przykłady białek z motywami His-tagów zawierającymi co najmniej cztery sąsiadujące reszty histydylowe

Table 1. Examples of proteins with His-tag motifs having at least four consecutive histidine residues

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag	Źródło						
<b>NikR</b> (Ni-specyficzny czynnik transkrypcyjny) [51] motyw:His <sub>4</sub> -tag	<i>Escherichia coli</i>	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">70</td> <td style="text-align: center;">80</td> <td style="text-align: center;">90</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">EHEKRDLASR</td> <td style="text-align: center;">IVSTQH<del>HH</del>HD</td> <td style="text-align: center;">LSVATLHVHI</td> </tr> </table> <p>Długość białka: 133 reszty aminokwasowe</p>	70	80	90	EHEKRDLASR	IVSTQH <del>HH</del> HD	LSVATLHVHI	PDB ID: 1Q5Y UniProtKB: P0A6Z6
70	80	90							
EHEKRDLASR	IVSTQH <del>HH</del> HD	LSVATLHVHI							
<b>Glioksalaza II</b> (nadrodzina metalo-beta-laktamaz) [52] motyw:His <sub>4</sub> -tag	<i>Salmonella typhimurium</i>	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">50</td> <td style="text-align: center;">60</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">EAAPVLKAIA</td> <td style="text-align: center;">EHKWMPEAIF</td> <td style="text-align: center;">LTH<del>HH</del>HDHVG</td> </tr> </table>	40	50	60	EAAPVLKAIA	EHKWMPEAIF	LTH <del>HH</del> HDHVG	PDB ID: 2QED UniProtKB: Q8ZRM2
40	50	60							
EAAPVLKAIA	EHKWMPEAIF	LTH <del>HH</del> HDHVG							
<b>AdcR</b> (regulator transkrypcji z rodziny MarR) [53] motyw:His <sub>3</sub> -tag	<i>Streptococcus pneumoniae D39</i>	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">110</td> <td style="text-align: center;">120</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">RVIFYQLTDL</td> <td style="text-align: center;">ARPIAEE<del>HH</del>H</td> <td style="text-align: center;">HHEHTLLTYE</td> </tr> </table> <p>Długość białka: 146 reszt aminokwasowych</p>	100	110	120	RVIFYQLTDL	ARPIAEE <del>HH</del> H	HHEHTLLTYE	PDB ID: 3TGN UniProtKB: Q04I02
100	110	120							
RVIFYQLTDL	ARPIAEE <del>HH</del> H	HHEHTLLTYE							

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag			Źródło
<b>UreE</b> (białko pomocnicze ureazy) [54] motyw: His <sub>5</sub> -tag	<i>Proteus mirabilis</i>	150	160	161	UniProtKB: P17090
		PEPGAYGGSS	GGHHHHHDHH	H	
Długość białka: 161 reszt aminokwasowych					
<b>MTP1</b> (białkowy przenośnik jonów metali)[55] motyw: His <sub>3</sub> -tag	<i>Arabidopsis thaliana</i>	190	200	210	UniProtKB: Q9ZT63
		GHDHGHSHGH	GHGHDHDDHH	HSHGVTVTTH	
		220	230		
		HHHHDHEHGH	SHGHGEDKHH		
Długość białka: 398 reszt aminokwasowych					
<b>ZIP</b> (przypuszczalny transporter cynku)[56] motywy: His <sub>4</sub> -tag His <sub>5</sub> -tag His <sub>6</sub> -tag	<i>Cryptosporidium parvum</i>	110	120	130	UniProtKB: Q5CXM3
		SPQDVAQFHM	HDHSFPHNRD	HHHHHHKDPG	
		140	150	160	
		CVGVNSDVY	SIVNGEKKSH	YHHHHRNDNN	
420	430	437			
IINIIQHKLK	GCTLHHHHHG	HSIHHTH			
Długość białka: 437 reszt aminokwasowych					
<b>LIV1</b> (transporter cynku)[57] motywy: 2xHis <sub>4</sub> -tag His <sub>5</sub> -tag His <sub>6</sub> -tag	<i>Danio rerio (Zebrafish)</i>	310	320	330	UniProtKB: Q6L8F3
		SKSCIVHEDE	DEHSDHSHHH	KHHHHHHHDHQ	
		400	410	420	
		ALAVGTLSGD	ALLHLIPHSQ	GHHHHGHSEE	
		540	550	560	
VGQSDEQHHH	HHDYHHILHH	HHSQNHPHT			
Długość białka: 742 reszty aminokwasowe					
<b>Npun_AR245</b> (transporter o wysokim powinowactwie do jonów Ni <sup>2+</sup> ) motyw: His <sub>6</sub> -tag	<i>Nostoc punctiforme ATCC 29133</i>	360	370	380	UniProtKB: B2JAZ6
		SHDHEHENHV	HTHQSHSHHH	HHEHLPPHS	
Długość białka: 488 reszt aminokwasowych					

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag	Źródło						
<b>SVMI 02D01</b> (inhibitor metaloproteinaz jadu węża) [58] motyw: His <sub>6</sub> -tag	<i>Echis ocellatus</i>	<table border="1"> <tr> <td>260</td> <td>270</td> <td>280</td> </tr> <tr> <td>DHDHDHHHHHH</td> <td>HPGSSVGGGG</td> <td>GGGGGGARRL</td> </tr> </table>	260	270	280	DHDHDHHHHHH	HPGSSVGGGG	GGGGGGARRL	UniProtKB: A8YPR6
		260	270	280					
DHDHDHHHHHH	HPGSSVGGGG	GGGGGGARRL							
Długość białka: 308 reszt aminokwasowych									
HypB (białko chaperonowe hydrogenazy) [59] motywy: His <sub>3</sub> -tag His <sub>6</sub> -tag	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	<table border="1"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>MCTVCGCSDG</td> <td>KASIEHAHDH</td> <td>HHDHGHGDHDH</td> </tr> </table>	10	20	30	MCTVCGCSDG	KASIEHAHDH	HHDHGHGDHDH	UniProtKB: Q45257
		10	20	30					
		MCTVCGCSDG	KASIEHAHDH	HHDHGHGDHDH					
<table border="1"> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>GHDGHHHHHH</td> <td>GHDQDHHHHH</td> <td>DHAHG DAGLL</td> </tr> </table>	40	50	60	GHDGHHHHHH	GHDQDHHHHH	DHAHG DAGLL			
40	50	60							
GHDGHHHHHH	GHDQDHHHHH	DHAHG DAGLL							
Długość białka: 302 reszty aminokwasowe									
Hpn (polihistydylowe białko wiążące jony metali)[60] motywy: His <sub>3</sub> -tag His <sub>6</sub> -tag His <sub>7</sub> -tag	<i>Helicobacter pylori</i>	<table border="1"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>MAHHEEQHGG</td> <td>HHHHHHHTHH</td> <td>HHYHGGEHHH</td> </tr> </table>	10	20	30	MAHHEEQHGG	HHHHHHHTHH	HHYHGGEHHH	UniProtKB: P0A0V6
		10	20	30					
		MAHHEEQHGG	HHHHHHHTHH	HHYHGGEHHH					
<table border="1"> <tr> <td>40</td> <td>50</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>HHSSHHEEG</td> <td>CCSTSDSHHQ</td> <td>EEGCCHGHE</td> </tr> </table>	40	50	60	HHSSHHEEG	CCSTSDSHHQ	EEGCCHGHE			
40	50	60							
HHSSHHEEG	CCSTSDSHHQ	EEGCCHGHE							
Długość białka: 60 reszt aminokwasowych									
<b>NLK</b> (serynowo-treoninowa kinaza białkowa)[61] motywy: His5-tag, His8-tag	<i>Homo sapiens</i>	<table border="1"> <tr> <td>30</td> <td>40</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>SAAAAGHHHH</td> <td>HHHHLPHLPP</td> <td>PHLHHHHHPQ</td> </tr> </table>	30	40	50	SAAAAGHHHH	HHHHLPHLPP	PHLHHHHHPQ	UniProtKB: Q9UBE8
		30	40	50					
SAAAAGHHHH	HHHHLPHLPP	PHLHHHHHPQ							
Długość białka: 527 reszt aminokwasowych									
<b>pHpG-1</b> (poli-His-poli-Gly peptyd-1) [62] motyw: His <sub>9</sub> -tag	<i>Atheris squamigera</i> ; <i>Atheris chlorechis</i>	<table border="1"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>EDDHHHHHHH</td> <td>HHGVGGGGGG</td> <td>GGGG</td> </tr> </table>	10	20	24	EDDHHHHHHH	HHGVGGGGGG	GGGG	UniProtKB: P0C7K4
		10	20	24					
EDDHHHHHHH	HHGVGGGGGG	GGGG							
Długość białka: 24 reszty aminokwasowe									
<b>CACNA1A</b> (podjednostka α-1A kanału wapniowego typu P/Q)[63, 64] motyw: His <sub>10</sub> -tag	<i>Homo sapiens</i>	<table border="1"> <tr> <td>2210</td> <td>2220</td> <td>2230</td> </tr> <tr> <td>GRPKDRKHRQ</td> <td>HHHHHHHHHH</td> <td>PPPPDKDRYA</td> </tr> </table>	2210	2220	2230	GRPKDRKHRQ	HHHHHHHHHH	PPPPDKDRYA	PDB ID: 3BXX UniProt KB: O00555
		2210	2220	2230					
GRPKDRKHRQ	HHHHHHHHHH	PPPPDKDRYA							
Długość białka: 24 reszty aminokwasowe									



Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag	Źródło
<b>Hox-A1</b> białko homeoboksowe[65] motywy: His <sub>5</sub> -tag His <sub>10</sub> -tag	<i>Homo sapiens</i>	60 70 80	UniProtKB: P49639
		DREFLVGRGVQ IGSPHHHHHH HHHHPQPATY	
		140 150 160	
		YSGNLSSPMV QHHHHHHQGYA GGAVGSPQYI	
Długość białka: 335 reszt aminokwasowych			
<b>YY1</b> (białko represorowe transkrypcji)[66] motyw: His <sub>11</sub> -tag	<i>Homo sapiens</i>	70 80 90	PDB ID: 1UBD UniProtKB: P25490
		GGGGHGHAGH HHHHHHHHHH PPMIALQLPV	
		Długość białka: 414 reszt aminokwasowych	
<b>HMA4</b> (przypuszczalne białko transportujące Cd/Zn) [67] motyw: His <sub>11</sub> -tag	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1160 1170 1172	PDB ID: 2KKH UniProtKB: O64474
		AKELCSHRHH HHHHHHHHHV SA	
		Długość białka: 1172 reszty aminokwasowe	
<b>Hpn-like</b> (HpnI, białko bogate w reszty His i Gln wiążące jony metali)[68] motywy: His <sub>4</sub> -tag His <sub>11</sub> -tag	<i>Helicobacter pylori</i>	10 20 30	UniProtKB: A3RDS2
		MAHHEQQQQA QQQQQQANS QHHHHHHAHH	
		40 50 60	
		HHYYGGEHHH HNAEQHAEQQ AEQQAQQQQA	
		70 75	
		HQQQQQKAQQ QNQY	
Długość białka: 1172 reszty aminokwasowe			
<b>pHpG-2</b> (poli-His-poli-Gly peptyd 2) [62] motyw: His <sub>12</sub> -tag	<i>Atheris nitschei</i>	10 20 30	UniProtKB: P0C7K6
		EDDHDHHHHH HHHHHHHHGVG GGGGGGGGA	
		Długość białka: 30 reszt aminokwasowych	
<b>DYRK1A</b> (kinaza o podwójnej specyficzności) [69] motywy: His <sub>4</sub> -tag His13-tag	<i>Homo sapiens</i>	600 610 620	PDB ID: 2WO6 UniProtKB: Q13627
		VAPQQNALHH HHGNSSHHHH HHHHHHHHHG	
		Długość białka: 763 reszt aminokwasowych	

Białko	Organizm	Sekwencja aminokwasowa peptydu z motywem His-tag	Źródło						
<b>CDF</b> (transporter dwuwartościowych kationów metali) [70] motywy: His <sub>4</sub> -tag His <sub>19</sub> -tag	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">160</td> <td style="text-align: center;">170</td> <td style="text-align: center;">620</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">VAPQQNALHH</td> <td style="text-align: center;">HHGNSSHHHH</td> <td style="text-align: center;">HHHHHHHHHHG</td> </tr> </table> <p>Długość białka: 328 reszt aminokwasowych</p>	160	170	620	VAPQQNALHH	HHGNSSHHHH	HHHHHHHHHHG	UniProtKB: A3M8Y6
160	170	620							
VAPQQNALHH	HHGNSSHHHH	HHHHHHHHHHG							

#### 4.1. Hpn I Hpnl

Doskonałymi przykładami polihistydylowych białek są Hpn oraz Hpn-like (z ang. podobne do Hpn, Hpnl) z *Helicobacter pylori*, bakterii, która kolonizuje śluzówkę żołądka u ponad połowy populacji świata, powodując m.in. wrzody żołądka [68]. Białko Hpn jest 60-aminokwasowym białkiem, w którym 47% wszystkich aminokwasów stanowią reszty histydylowe, tworzące trzy długie polihistydylowe odcinki: z czterema, sześcioma i siedmioma resztami His (Tab. 1). Badania *in vitro* wykazały, że całe białko Hpn tworzy bardzo stabilne kompleksy z jonami Cu<sup>2+</sup> [71], jednakże badania *in vivo* sugerują, iż to białko odgrywa kluczową rolę w homeostazie jonów niklu (preferencje białka względem jonów metali zmniejszają się w kolejności: Ni<sup>2+</sup> > Bi<sup>3+</sup> > Cu<sup>2+</sup> ≈ Zn<sup>2+</sup>) [72].

Badania eksperymentalne na kilku krótszych fragmentach Hpn: THHH-HYHGG [73], MAHHEEQHG [72] oraz EEGCCHGHHE [74] z różnymi jonami metali wykazały, że każdy z nich jest zdolny wiązać jony Ni<sup>2+</sup> z wysokim powinowactwem, jednakże sekwencja zawierająca motyw Cys-Cys jest prawdopodobnie najbardziej korzystnym miejscem wiązania jonów niklu w całym białku i może być kluczowa dla przeżycia *H. pylori* [73].

Białko Hpnl zawiera 72 reszty aminokwasowe, przy czym 18 z nich to histydyny (25%). W sekwencji białka Hpnl występują również liczne reszty glutaminowe, które stanowią aż 43% wszystkich aminokwasów (Tab. 1) [75]. Białko Hpnl posiada bardzo wysokie powinowactwo względem jonów Cu<sup>2+</sup> (K<sub>d</sub> = 2,5 μM) oraz Ni<sup>2+</sup> (K<sub>d</sub> = 3,8 μM), wiążąc 1,4 atomu miedzi i 2 atomy niklu na monomer. Białko to jest również skuteczne w wiązaniu jonów cynku (K<sub>d</sub> = 10,6 μM) oraz kobaltu (K<sub>d</sub> = 12,4 μM) [76].

Oba cytoplazmatyczne białka, Hpn i Hpnl, są zaangażowane w homeostazę jonów niklu – magazynowanie oraz ochronę przed jego bardzo wysokim, toksycznym stężeniem. Wspólną cechą charakterystyczną jest również zdolność do wiązania jonów niklu w sposób odwracalny, umożliwiając tym samym dostarczenie jonów Ni<sup>2+</sup> do innych białek. W przypadku, gdy środowisko jest ubogie w nikiel, Hpn i Hpnl konkurują o ten metal z białkami zaangażowanymi w dojrzewanie ureazy [68]. Motywy polihistydylowe w sekwencjach białek Hpn oraz Hpnl prawdopodobnie odgrywają rolę regulacyjną w zdolnościach wiążących jony metali [73].

#### 4.2. AdcR

Innym przykładem bakteryjnych białek bogatych w reszty histydylowe jest białko AdcR (ang. *adhesin competence repressor*), wyizolowane ze *Streptococcus pneumoniae* D39, patogenu kolonizującego górne drogi oddechowe [53, 77]. AdcR jest białkiem regulatorowym należącym do rodziny MarR, której wspólną cechą jest m.in. ekspresja czynników wirulencji oraz odpowiedź na antybiotyki oraz inne środki przeciwbakteryjne [53]. AdcR jest represorem operonu *acdRCBA*, obecnego u wszystkich paciorkowców, kodującego transporter ABC (system wychwytu z wysokim powinowactwem do jonów  $Zn^{2+}$ ), a także kodującego geny białek z rodziny Pht (ang. *pneumococcal histidine triad*, zawierających w swojej sekwencji kilka motywów HxxHxH) oraz *adcAII* [78]. Geny te, w swoich regionach promotorowych kodują możliwe miejsca wiążące AdcR z DNA. Białko AdcR z *S. pneumoniae* jest homodimerem, a jego C-końcowy fragment zawiera polihistydylowy fragment z pięcioma sąsiadującymi resztami His (Tab. 1). Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że dwie reszty z polihistydylowego odcinka: His108 oraz His112 oraz reszta His42 (obecna w domenie wiążącej DNA) są zaangażowane w wiązanie jonów cynku i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tego białka [79]. Te reszty aminokwasowe są konserwatywne we wszystkich znanych regulatorach z rodziny MarR. Białka z rodziny Pht zostały znalezione jedynie u patogennych gatunków paciorkowców. Ze względu na właściwości regulacyjne geny *pht* oraz *adcAII*, białko AdcR ma potencjalny wpływ na zdolność *S. pneumoniae* do wywoływania stanu chorobowego [78].

#### 4.3. AtHMA I AtMTP

Niezwykłe interesującymi białkami, zawierającymi sekwencje z długimi polihistydyłowymi regionami są: AtHMA2, AtHMA4, AtMTP1 występujące w roślinie *Arabidopsis thaliana*.

Białka AtHMA2, AtHMA4 należą do rodziny transporterów metali ciężkich,  $P_{1B}$ -ATP-az, wykorzystujących ATP jako źródło energii do transportu jonów cynku i kadmu [80]. Sekwencje tych białek zawierają regiony bogate w reszty histydylowe – jedenaście sąsiadujących reszt His w ich C-końcowym odcinku (Tab. 1). Ten polihistydylowy region, razem z motywem -Cys-Cys-X-X-Glu-, zlokalizowanym na N-końcu białka jest zaangażowany w wiązanie jonu metalu [81]. Badania wykazały, że polihistydylowy region jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania tych białek – mutacje lub usunięcie tego fragmentu białka skutkują utratą zdolności wiązania jonów metali [67].

Odcinki zawierające jedenaście sąsiadujących reszt histydylowych występują również w innych  $P_{1B}$ -APTazach, np. w HMA1 z *Arabidopsis thaliana* i BXA1 z *Oscillatoria brevis*, które są odpowiedzialne za transport kationów zarówno jedno- jak i dwu-wartościowych. Jednakże w tych przypadkach, polihistydylowa domena jest zlokalizowana w N-końcowej części tych białek [82].

Białko MTP1 z *A. thaliana* (AtMTP1) należy natomiast do transporterów CDF (ang. *cation diffusion facilitator*), odpowiedzialnych za eksport jonów metali ciężkich i odgrywają istotną rolę w homeostazie i tolerancji jonów metali. Białko AtMTP1 jest zlokalizowane w błonie wakuolarnej i bierze udział w transporcie jonów cynku (grupa Zn-CDF) [83]. AtMTP1 posiada sześć transbłonowych domen, długi N- i C-końcowy ogon oraz hydrofilowy region bogaty w reszty histydylowe pomiędzy czwartą i piątą domeną [55]. Badania przeprowadzone przez Kawachi, mające na celu wyjaśnienie mechanizmu transportu jonów cynku przez AtMTP1 wykazały, że polihistydylowa pętla z pięcioma resztami His nie pełni kluczowej roli w transporcie, może pełnić natomiast funkcję 'kieszeni buforującej', pochłaniając nadmiar jonów  $Zn^{2+}$ , odgrywając tym samym rolę 'czujnika' poziomu cynku w cytoplazmie [55].

Podobny region występuje również w białku MTP4 z *Cucumis sativus*, które jest funkcjonalnie ważne w komórkach ogórka, wpływając na homeostazę jonów cynku oraz kadmu [82].

#### 4.4. CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Unikalna grupa białek z odcinkami powtórzeń histydylowych została zidentyfikowana również w ludzkim genomie. Ponad osiemdziesiąt takich białek posiada regiony zawierające co najmniej pięć sąsiadujących reszt histydylowych [84]. Większość z nich jest zlokalizowana w jądrowych strukturach, określanymi jako ang. *speckles* (cętki, łatki) i odgrywa rolę w funkcjonowaniu DNA i RNA. Mogą one posiadać jeden lub kilka polihistydylowych fragmentów w swojej sekwencji, np. białko HOXA1 posiada jeden region z dziesięcioma resztami His: 65-HHHHHHHHHH-74, a białko MAFA kilka regionów o różnej ilości reszt His: 184-HHHGAHHAHHHHAAHHHHHHHHHSH-GGAGHGGGAGHH-219. Badania wykazały, że prawdopodobnie większy wpływ na funkcjonalną rolę tych białek może mieć odstęp pomiędzy resztami, a nie ilość reszt histydylowych w sekwencji [84].

Niezwykle interesujące jest białko DYRK1A, które zawiera w swojej sekwencji regiony z czterema i trzynastoma sąsiadującymi resztami histydyny (Tab. 1). DYRK1A należy do rodziny kinaz odpowiedzialnych za kluczową rolę w rozwoju mózgu, regulację splicingu oraz apoptozy, a także stanowią potencjalne miejsca działania leków w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz raka. Białko DYRK1A bierze udział w komórkowym szlaku sygnalizacyjnym, regulowaniu ważnych procesów komórkowych, np. proliferacji komórek oraz jest związane z patologią zespołu Downa i chorób neurodegeneracyjnych [85, 86].

Innym przykładem jest białko NLK, należąca do grupy kinaz białkowych serynowo-treoninowych. W swojej sekwencji posiada dwa polihistydylowe odcinki zawierające 5 oraz 8 sąsiadujących reszt His. Białko to jest związane z regulacją liczby czynników transkrypcyjnych, pełniących kluczową rolę w określaniu losów komórki.

Dokładny mechanizm działania oraz przekazywania sygnału przez powtórzenia histydylowe nie jest jeszcze jasny, ale na pewno jest związany z unikalnymi właściwościami chemicznymi histydyny. Bardzo interesujący jest również fakt, że lokalizacja w cętkach jądrowych jest utracona, podczas gdy histydylowe powtórzenia zostają usunięte, udowadniając, że His-powtórzenia są niezbędne do lokalizacji tych białek w cętkach jądrowych. Z drugiej zaś strony, usunięcie polihistydylowych regionów z białek DYRK1A oraz NLK nie wpływa na podstawowe właściwości biochemiczne tych białek [87].

#### 4.5. pHpG

Jady węży są mieszaniną bioaktywnych związków, takich jak, np. metaloproteinazy, wielodomenowe białka oraz ponad 100 enzymatycznie aktywnych toksyn białkowych [88]. Metaloproteinazy jadu węża (ang. *snake venom metalloproteinases*, SVMPs) stanowią około 30% wszystkich białek w jadach węży i są jednym z kluczowych enzymów wpływających na toksyczność jadów. Ich aktywność jest związana z występowaniem u ofiary m.in. krwotoku (miejscowego lub ogólnoustrojowego), obrzęków, zapalenia czy martwicy [89]. SVMPs są spokrewnione z białkami z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*). Adamalizyny (ADAM) należą do nadrodziny białek zależnych od obecności jonów cynku oraz wapnia. SVMPs zostały podzielone na trzy klasy (PI, PII i PIII) w oparciu o skład domen. Z kolei w ramach każdej z klas wyróżnia się podklasy, które są pogrupowane w zależności od tego czy są monomerami, homo- lub hetero dimerami. Zmiany w składzie domen pomiędzy różnymi klasami SVMPs mają znaczenie w mechanizmie działania toksyn wywołujących krwotok. Szczegółowa analiza biochemicznej charakterystyki SVMPs została opisana w doskonałych publikacjach, dotyczących tego zagadnienia [90–92].

Wszystkie SVMPs posiadają domenę z motywem HEXXHXGXHXH, która jest odpowiedzialna za wiązanie jonu cynku [93]. Kilka dostępnych struktur krystalicznych SVMPs pokazuje, że jon cynku jest skoordynowany w tej cząsteczce tetradrycznie przez trzy reszty His oraz tlen z cząsteczki wody (polaryzowany przez resztę Glu). Jony wapniowe natomiast znajdują się po przeciwnej stronie miejsca aktywnego i najprawdopodobniej odgrywają rolę strukturalną [94].

Metaloproteinazy są syntezowane i przechowywane w gruczole jadowym węży w formie nieaktywnej [95]. Gruczoł jadowy jest chroniony przed uszkodzeniem przez synergistyczne działanie kilku różnych czynników obecnych w jadzie, które są w stanie zahamować aktywność metaloproteinaz *in situ*: (i) niskie pH, (ii) chelatację jonów wapnia cytrynianem, (iii) konkurencyjne hamowanie enzymatyczne przez tripeptydy [96, 97]. Aktywność ta może zostać całkowicie przywrócona poprzez rozcieńczenie lub fizykochemiczne zmiany, do których dochodzi podczas, gdy jad jest wstrzykiwany do ciała ofiary [98].

Ostatnie doniesienia wykazały, że jady węży z rodziny *Atheris* oraz *Echis* zawierają nową grupę peptydów z motywami powtarzających się reszt histydyliny i glicyny (Tab. 1) [62]. Poli-His i poli-Gly (pHpG) sekwencje peptydowe z *Atheris squamigera* oraz *Atheris chlorechis* posiadają dziewięć sąsiadujących reszt His oraz dziesięciokrotne powtórzenie reszty Gly. Natomiast jad z *Atheris nitschei* zawiera peptyd aż z dwunastoma sąsiadującymi resztami His. W jadzie węża *Echis ocellatus* zidentyfikowano domenę z krótszym motywem, zawierającym sześć sąsiadujących reszt His, obok równie interesującego motywu z naprzemiennie ułożonymi resztami kwasowymi (Asp) i histydyłowymi (His) [58] (Tab. 1). Obecność sekwencji poli-His i poli-Gly w jadach węży jest prawdopodobnie związana z ich aktywnością biologiczną. Istnieje hipoteza, że takie peptydy mogą odgrywać kluczową rolę w oddziaływaniu z jonami metali, hamując działanie metaloproteinaz, podczas przechowywania jadu w gruczole jadowym [62, 89].

## 5. TERMODYNAMICZNE I STRUKTURALNE ASPEKTY WIĄZANIA JONÓW METALI PRZEZ SEKWENCJE BIAŁKOWE Z MOTYWEM HIS-TAG

W ostatnim czasie podjęto próbę określenia roli domen zawierających motyw His-tag w wiązaniu dwuwartościowych jonów metali ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ), a także porównania termodynamicznej trwałości tworzących się kompleksów oraz ich struktury. Zostały przeprowadzone szczegółowe badania dotyczące sześciohistydylowego peptydu His-tag, powszechnie stosowanego w biotechnologii do oczyszczania rekombinowanych białek oraz naturalnie występujących sekwencji z motywem His-tag w peptydach z jądów węży z rodzaju *Atheris* oraz *Echis* przy użyciu technik eksperymentalnych (spektrometria mas, potencjometria oraz metody spektroskopowe: UV-Vis, CD, EPR) oraz obliczeniowych (DFT oraz symulacji MD). Badania wykazały, że sekwencje z motywem His-tag bardzo skutecznie wiążą jony metali ( $\text{Cu}^{2+} \gg \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ). Polihistydyłowy fragment z jadu węża *Atheris squamigera* zawierający ciąg dziewięciu reszt histydylowych (pHG) wykazywał najwyższą skuteczność w wiązaniu jonów metali w porównaniu z peptydem zawierającym sześciohistydyłowy motyw His-tag oraz peptydem, który obok tej domeny zawiera dodatkowe dwie reszty His w sekwencji. Autorzy wykazali, że wiązanie jonu metalu indukuje tworzenie struktury  $\alpha$ -helisy (regularna  $\alpha$ -helisa w przypadku pHG), a dzięki zdolności tworzenia stanów 'polimorficznych' metal może 'poruszać się' wzdłuż długiej polihistydyłowej domeny z motywem His-tag. Sekwencje zawierające ciąg sąsiadujących reszt His wiążą jony metali znacznie silniej niż inne sekwencje białkowe bogate w histydyliny, rozdzielone innymi aminokwasami. Dzięki zrozumieniu chemii bionieorganicznej kompleksów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  z sekwencjami zawierającymi motywy tagów polihistydyłowych, zaproponowano hipotezę odnośnie ich roli w syntetycznych i naturalnych białkach: ze względu na wysoką trwałość tworzonych kompleksów takie białka stanowią idealne miejsce przechowywania jonów metali, pełniąc funkcję 'gąbki', natomiast obecność stanów 'polimorficznych' może



świadczą o ich roli w dystrybucji metali w i między białkami. Takie białka mogą również determinować strukturę białek ze względu na indukcję struktury  $\alpha$ -helisy pod wpływem wiązania metali [99–101].

## UWAGI KOŃCOWE

Sekwencje aminokwasowe, w których jeden rodzaj aminokwasu jest wielokrotnie powtórzony, często są nie tylko kuszącym miejscem wiązania jonów metali, lecz także niejednokrotnie, razem ze związanym metalem, determinują strukturę całego białka i wpływają na jego funkcje. Zrozumienie podstawowych korelacji pomiędzy daną sekwencją i właściwościami jego kompleksu z jonem metalu jest pierwszym krokiem w kierunku wyjaśnienia wielu istotnych procesów biologicznych. Kluczowy jest rodzaj i ilość poszczególnych reszt aminokwasowych wiążących jon metalu w sekwencji oraz obecność sąsiadujących łańcuchów bocznych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.F. Doolittle, *Redundancies in protein sequences* [w:] *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, G.D. Fasman ed, Plenum Press, New York 1989.
- [2] J.M. Hancock, M. Simon, *Gene*, 2005, **345**, 113.
- [3] N.G. Faux, S.P. Bottomley, A.M. Lesk, J.A. Irving; J.R. Morrison, M.C. de la Banda, J.C. Whisstock, *Genome Res.*, 2005, **15**, 537.
- [4] N.G. Faux, G.A. Huttley, K. Mahmood, G.I. Webb, M.G. de la Banda, J.C. Whisstock, *Genome Res.*, 2007, **17**, 1118.
- [5] M.V. Katti, R. Sami-Subbu, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta, *Protein Sci.*, 2000, **9**, 1203.
- [6] H. Lavoie, F. Debeane, Q.D. Trinh, J.F. Turcotte, L.P. Corbeil-Girard, M.J. Dicaire, A. Saint-Denis, M. Page, G.A. Rouleau, B. Brais, *Hum. Mol. Genet.*, 2003, **12**, 2967.
- [7] M.F. Perutz, A.H. Windle, *Nature*, 2001, **412**, 143.
- [8] C.A. Ross, R.L. Margolis, M.W. Becher, J.D. Wood, S. Engelender, J.K. Cooper, A.H. Sharp, *Neurological Degeneration and Regeneration: from Basic Mechanisms to Prospects for Therapy*, 1998, **117**, 397.
- [9] S.L. Hands, A. Wytenbach, *Acta Neuropathol.*, 2010, **120**, 419.
- [10] R.L. Margolis, C.A. Ross, *Trends Mol. Med.*, 2001, **7**, 479.
- [11] H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, *Annual Review of Neuroscience*, 2007, **30**, 575.
- [12] I.A. Klement, P.J. Skinner, M.D. Kaytor, H. Yi, S.M. Hersch, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr, *Cell*, 1998, **95**, 41.
- [13] R. Truant, B.R. Cullen, *Mol. Cell. Biol.*, 1999, **19**, 1210.
- [14] T. Cheng, W. Xia, P. Wang, F. Huang, J. Wang, H. Sun, *Metallomics*, 2013, **5**, 1423.
- [15] S.M. Liao, Q.S. Du, J.Z. Meng, Z.W. Pang, R.B. Huang, *Chem. Centr. J.*, 2013, **7**, 12.
- [16] J.T. Rubino, K.J. Franz, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **107**, 129.
- [17] R.J. Sundberg, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, 1974, **74**, 471.
- [18] K. Fink, J. Boratynski, *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 2014, **68**, 1276.
- [19] S. Grimme, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2008, **47**, 3430.
- [20] G.B. McGaughey, M. Gagne, A.K. Rappe, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 15458.



- [21] G.L. Miessler, D.A. Tarr, *Inorganic Chemistry*, Wyd. 3, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2003.
- [22] M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozłowski, J. Brasun, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **97**, 299.
- [23] C. Conato, R. Gavioli, R. Guerrini, H. Kozłowski, P. Młynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli, *BBA-Gen. Subjects*, 2001, **1526**, 199.
- [24] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 1.
- [25] B. Boka, A. Myari, I. Sovago, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 113.
- [26] C.E. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, B. Perly, H. Kozłowski, B. Radoska, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1987, **3**, 661.
- [27] I. Sovago, E. Farkas, C. Bertalan, A. Lebkiri, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **51**, 715.
- [28] C. Conato, W. Kamysz, H. Kozłowski, M. Luczkowski, Z. Mackiewicz, F. Mancini, P. Młynarz, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, **9**, 1694.
- [29] F. Carrera, E.S. Marcos, P.J. Merklings, J. Chaboy, A. Munoz-Paez, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 6674.
- [30] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Journal of Molecular Biology*, 1982, **160**, 181.
- [31] P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, A.M. Nersissian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg, *Biochemistry*, 1999, **38**, 2167.
- [32] M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, H. Kozłowski, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 58.
- [33] P. Kolkowska, A. Hecel, D. Kędzierska, M. Ostrowska, P.K. Walencik, J. Wątył, K. Zdyb, M. Spodzieja, S. Rodziejewicz-Motowidło, S. Potocki, M. Łuczowski, E. Gumienna-Kontecka, M. Rowinska-Zyrek, *J. Inorg. Biochem.* 2016, **163**, 258.
- [34] H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.* 2005, **249**, 2323.
- [35] C. Harford, B. Sarkar, *Accounts Chem. Res.*, 1997, **30**, 123.
- [36] H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schaefer, *Guide to Protein Purification*, Second Edition, 2009, **463**, 439.
- [37] S. Knecht, D. Ricklin, A.N. Eberle, B. Ernst, *J. Mol. Recogn.*, 2009, **22**, 270.
- [38] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, 1975, **258**, 598.
- [39] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatography*, 1987, **411**, 177.
- [40] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Bio-Technology*, 1988, **6**, 1321.
- [41] F.H. Arnold, *Bio-Technology*, 1991, **9**, 151.
- [42] H.L. Liu, Y. Ho, C.M. Hsu, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2003, **21**, 31.
- [43] C.W. Chen, H.L. Liu, J.C. Lin, Y. Ho, *J. Chinese Chem. Soc.*, 2005, **52**, 1281.
- [44] F.G. Oppenheim, T. Xu, F.M. McMillian, S.M. Levitz, R.D. Diamond, G.D. Offner, R.F. Troxler, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 7472.
- [45] M.J. Oudhoff, J.G.M. Bolscher, K. Nazmi, H. Kalay, W. van't Hof, A.V.N. Amerongen, E.C.I. Veerman, *Faseb J.*, 2008, **22**, 3805.
- [46] K. Kavanagh, S. Dowd, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, **56**, 285.
- [47] S.R. Hawley, P.G. Bray, M. Mungthin, J.D. Atkinson, P.M. O'Neill, S.A. Ward, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, **42**, 682.
- [48] A. Lynn, S. Chandra, P. Malhotra, V.S. Chauhan, *Febs Lett.*, 1999, **459**, 267.
- [49] D.J. Sullivan, I.Y. Gluzman, D.E. Goldberg, *Science*, 1996, **271**, 219.
- [50] H. Kozłowski, S. Potocki, M. Remelli, M. Rowinska-Zyrek, D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2625.

- [51] K. De Pina, V. Desjardin, M.A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, L.F. Wu, *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**, 670.
- [52] V.A. Campos-Bermudez, N.R. Leite, R. Krog, A.J. Costa-Filho, F.C. Soncini, G. Oliva, A.J. Vila, *Biochemistry*, 2007, **46**, 11069.
- [53] H. Reyes-Caballero, A.J. Guerra, F.E. Jacobsen, K.M. Kazmierczak, D. Cowart, U.M.K. Koppolu, R.A. Scott, M.E. Winkler, D.P. Giedroc, *J. Mol. Biology*, 2010, **403**, 197.
- [54] M.M. Pearson, M. Sebahia, C. Churcher, M.A. Quail, A.S. Seshasayee, N.M. Luscombe, Z. Abdellah, C. Arrosmith, B. Atkin, T. Chillingworth, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabinowitsch, D. Walker, S. Whithead, N.R. Thomson, P.N. Rather, J. Parkhill, H.L.T. Mobley, *J. Bacteriol.*, 2008, **190**, 4027.
- [55] M. Kawachi, Y. Kobae, T. Mimura, M. Maeshima, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 8374.
- [56] M.S. Abrahamsen, T.J. Templeton, S. Enomoto, J.E. Abrahante, G. Zhu, C.A. Lancto, M.Q. Deng, C. Liu, G. Widmer, S. Tzipori, G.A. Buck, P. Xu, A.T. Bankier, P.H. Dear, B.A. Konfortov, H.F. Spriggs, L. Iyer, V. Anantharaman, L. Aravind, V. Kapur, *Science*, 2004, **304**, 441.
- [57] S. Yamashita, C. Miyagi, T. Fukada, N. Kagara, Y.S. Che, T. Hirano, *Nature*, 2004, **429**, 298.
- [58] S.C. Wagstaff, P. Favreau, O. Cheneval, G.D. Laing, M.C. Wilkinson, R.L. Miller, R. Stoecklin, R.A. Harrison, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **365**, 650.
- [59] C.L. Fu, R.J. Maier, *BBA-Bioenergetics*, 1994, **1184**, 135.
- [60] J.V. Gilbert, J. Ramakrishna, F.W. Sunderman, A. Wright, A.G. Plaut, *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2682.
- [61] Z.Y. Zhang, S.Z. Li, H.H. Zhang, Q.R. Wu, J. Gong, T. Liang, L. Gao, N.N. Xing, W.B. Liu, R.L. Du, X.D. Zhang, *Mol. Cell. Biology*, 2015, **35**, 778.
- [62] P. Favreau, O. Cheneval, L. Menin, S. Michalet, H. Gaertner, F. Principaud, R. Thai, A. Menez, P. Bulet, R. Stocklin, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2007, **21**, 406.
- [63] S. Guida, F. Trettel, S. Pagnutti, E. Mantuano, A. Tottene, L. Veneziano, T. Fellin, M. Spadaro, K.A. Stauderman, M.E. Williams, S. Volsen, R.A. Ophoff, R.R. Frants, C. Jodice, M. Frontali, D. Pietrobon, *Am. J. Human Gen.*, 2001, **68**, 759.
- [64] Q. Yue, J.C. Jen, S.F. Nelson, R.W. Baloh, *Am. J. Human Gen.*, 1997, **61**, 1078.
- [65] Y.S. Hong, S.Y. Kim, A. Bhattacharya, D.R. Pratt, W.K. Hong, M.A. Tainsky, *Gene*, 1995, **159**, 209.
- [66] S. Gordon, G. Akopyan, H. Garban, B. Bonavida, *Oncogene*, 2006, **25**, 1125.
- [67] M. Zimmermann, O. Clarke, J.M. Gulbis, D.W. Keizer, R.S. Jarvis, C.S. Cobbett, M.G. Hinds, Z. Xiao, A.G. Wedd, *Biochemistry*, 2009, **48**, 11640.
- [68] S. Seshadri, S.L. Benoit, R.J. Maier, *J. Bacteriol.*, 2007, **189**, 4120.
- [69] M. Soundararajan, A.K. Roos, P. Savitsky, P. Filippakopoulos, A.N. Kettenbach, J.V. Olsen, S.A. Gerber, J. Eswaran, S. Knapp, J.M. Elkins, *Structure*, 2013, **21**, 986.
- [70] M.J. McConnell, L. Actis, J. Pachon, *Fems Microbiol. Rev.*, 2013, **37**, 130.
- [71] R.G. Ge, Y. Zhang, X.S. Sun, R.M. Watt, Q.Y. He, J.D. Huang, D.E. Wilcox, H.Z. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 11330.
- [72] D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 208.
- [73] D. Witkowska, R. Politano, M. Rowinska-Zyrek, R. Guerrini, M. Remelli, H. Kozłowski, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 11088.
- [74] M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5604.
- [75] J.F. Tomb, O. White, A.R. Kerlavage, R.A. Clayton, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, H.P. Klenk, S. Gill, B.A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L.X. Zhou, E.F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L.M. Fitzgerald, N. Lee, M.D. Adams, E.K. Hickey, D.E. Berg, J.D. Gocayne, T.R. Utterback, J.D. Peterson, J.M.

- Kelley, M.D. Cotton, J.M. Weldman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W.S. Hayes, J.M. Weidman, M. Borodovsky, P.D. Karp, H.O. Smith, C.M. Fraser, J.C. Venter, *Nature*, 1997, **388**, 539.
- [76] Y.B. Zeng, D.M. Zhang, H.Y. Li, H.Z. Sun, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 1121.
- [77] A. Kadioglu, J.N. Weiser, J.C. Paton, P.W. Andrew, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 288.
- [78] S. Shafeeq, T.G. Kloosterman, O.P. Kuipers, *Metallomics*, 2011, **3**, 609.
- [79] A.J. Guerra, C.E. Dann, D.P. Giedroc, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19614.
- [80] D. Hussain, M.J. Haydon, Y. Wang, E. Wong, S.M. Sherson, J. Young, J. Camakaris, J.F. Harper, C.S. Cobbett, *Plant Cell*, 2004, **16**, 1327.
- [81] F. Verret, A. Gravot, P. Auroy, S. Preveral, C. Forestier, A. Vavasour, P. Richaud, *Febs Lett.*, 2005, **579**, 1515.
- [82] M. Migocka, A. Kosieradzka, A. Papierniak, E. Maciaszczyk-Dziubinska, E. Posyniak, A. Garbicz, S. Filleur, *J. Exp. Bot.*, 2015, **66**, 1001.
- [83] Y. Kobae, T. Uemura, M.H. Sato, M. Ohnishi, T. Mimura, T. Nakagawa, M. Maeshima, *Plant Cell Physiol.*, 2004, **45**, 1749.
- [84] E. Salichs, A. Ledda, L. Mularoni, M.M. Alba, S. de la Luna, *Plos Genet.*, 2009, **5**, 18.
- [85] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozłowski, N. Katsaros, *Metal-based drugs*, 2000, **7**, 293.
- [86] A. Dobosz, I.O. Fritsky, A. Karaczyn, H. Kozłowski, T.Y. Silva, J. Swiatek-Kozłowska, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1998, 1089.
- [87] A.M. Moreeuw, P. Decock, H. Timmerman, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70**, 107.
- [88] B.G. Fry, K. Roelants, D.E. Champagne, H. Scheib, J.D.A. Tyndall, G.F. King, T.J. Nevalainen, J.A. Norman, R.J. Lewis, R.S. Norton, C. Renjifo, R.C.R. de la Vega, *R.C.R. Ann. Rev. Genom. Hum. G.*, 2009, **10**, 483.
- [89] S. Takeda, H. Takeya, S. Iwanaga, *BBA-Proteins Proteom.*, 2012, **1824**, 164.
- [90] J.W. Fox, S.M.T. Serrano, *Toxicon*, 2005, **45**, 969.
- [91] J.W. Fox, S.M.T. Serrano, *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA 2010.
- [92] N.R. Casewell, K. Sunagar, Z. Takacs, J.J. Calvete, T.N.W. Jackson, B.G. Fry, *Venomous Reptiles and Their Toxins. Evolution, Pathophysiology and Discovery*, Oxford University Press: Oxford, UK 2015.
- [93] W. Bode, F.X. Gomisruth, W. Stockler, *Febs Lett.*, 1993, **331**, 134.
- [94] T.S. Kang, D. Georgieva, N. Genov, M.T. Murakami, M. Sinha, R.P. Kumar, P. Kaur, S. Kumar, S. Dey, S. Sharma, A. Vrielink, C. Betzel, S. Takeda, R.K. Arni, T.P. Singh, R.M. Kini, *Febs J.*, 2011, **278**, 4544.
- [95] A.S. Kamiguti, M. Zuzel, R.D.G. Theakston, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1998, **31**, 853.
- [96] R. Marques-Porto, I. Lebrun, D.C. Pimenta, *Comp. Biochem. Phys. C.*, 2008, **147**, 424.
- [97] G.V. Odell, E.C. Ferry, L.M. Vick, A.W. Fenton, L.S. Decker, R.L. Cowell, C.L. Ownby, J.M. Gutierrez, *Toxicon*, 1998, **36**, 1801.
- [98] J.M. Gutierrez, T. Escalante, A. Rucavado, C. Herrera, *Toxins*, 2016, **8**, 4.
- [99] J. Watly, E. Simonovsky, R. Wieczorek, N. Barbosa, Y. Miller, H. Kozłowski, *Inorg. Chem*, 2014, **53**, 13, 6675.
- [100] J. Watly, E. Simonovsky, N. Barbosa, M. Spodzieja, R. Wieczorek, S. Rodziewicz-Motowidło, Y. Miller, H. Kozłowski, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 7692.
- [101] D. Brasili, J. Watly, E. Simonovsky, R. Guerrini, N.A. Barbosa, R. Wieczorek, M. Remelli, H. Kozłowski, Y. Miller, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 5629.

