



Uniwersytet
Wrocławski

Dr inż. Magdalena Rowińska-Żyrek

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

Wyjaśnienie elementów homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów

1. Imię i Nazwisko, dane osobowe

Imię i nazwisko: Magdalena Rowińska-Żyrek
Data, miejsce urodzenia: 11.11.1984, Wrocław
Nazwisko rodowe: Żyrek
Email: magdalena.rowinska-zyrek@chem.uni.wroc.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2011, **doktor chemii**, Uniwersytet Wrocławski

tytuł pracy: 'Potencjalne miejsca wiążące bizmut, cynk i kadm we fragmentach białek chaperonowych niklu bogatych w cysteiny', specjalność: chemia nieorganiczna

2008 – **magister inżynier biotechnologii**, Politechnika Wrocławska

2008 – **magister fizyki**, Ecole Normale Supérieure de Cachan (Paryż, Francja)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

od 2012 – **adiunkt**, Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

06.2012 – 03.2015 **staż podoktorski** na Uniwersytecie w Zurychu (finansowanie: Marie Curie Intra-European Fellowship i Sciex-NMS)

2011 – 2012 **asystent**, Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):*

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Wyjaśnienie elementów homeostazy niklu i cynku(II) u bakterii i grzybów

_b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Sumaryczny IF trzynastu prac = 56,88; liczba ich niezależnych cytowań (z dn. 12.03.2018): 98 (łącznie 39 prac z sumarycznym IF = 161.87; Indeks Hirscha = 13, 428 cytowań, w tym 309 niezależnych). Autora korespondującego oznaczono gwiazdką. IF dotyczy roku wydania prac.

H1. Wątył Joanna, Potocki Sławomir, Rowińska-Żyrek Magdalena*

Zinc homeostasis at the bacteria/host interface—from coordination chemistry to nutritional immunity.

Chemistry-A European Journal, 2016, 22, 15992-16010.

IF: 5.317

Liczba niezależnych cytowań: 4 (razem 7)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, napisaniu wstępu i rozdziałów 'Zinc-dependent immune-system response. Chosen aspects of nutritional immunity', 'Local zinc limitation', 'Competition for zinc inside the macrophage', 'Conclusions and Future Perspectives', naniesieniu poprawek do pozostałych rozdziałów, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H2. Walencik Paulina K., Wątył Joanna, Rowińska-Żyrek Magdalena*

Fungal zinc homeostasis - a tug of war between the pathogen and host.

Current Medicinal Chemistry, 2016, 23, 3717-3729.

IF: 3.249

Liczba niezależnych cytowań: 0 (razem 2)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, napisaniu wstępu, podsumowania i rozdziałów 'Zincosomes – the zinc-storage vesicles', 'A tug of war over zinc', wyszukiwaniu literatury, nadzorowaniu pisania i wprowadzeniu poprawek do pozostałych części pracy, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H3. Łoboda Dorota, Rowińska-Żyrek Magdalena*Zinc binding site in Pra1, a zincophore from *Candida albicans*.**Dalton Transactions**, 2017, 46, 13695-13703.

IF: 4.029

Liczba niezależnych cytowań: 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, przeprowadzeniu (MS, NMR) lub nadzorowaniu przeprowadzonych eksperymentów i pomocy w ich interpretacji, napisaniu tekstu publikacji, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H4. Łoboda Dorota, Rowińska-Żyrek Magdalena**Candida albicans* zincophore and zinc transporter interactions with Zn(II) and Ni(II)**Dalton Transactions**, 2018, 47, 2646-2654.

IF: 4.029

Liczba niezależnych cytowań: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, przeprowadzeniu (MS, NMR) lub nadzorowaniu przeprowadzonych eksperymentów i pomocy w ich interpretacji, napisaniu tekstu publikacji, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H5. Rowińska-Żyrek Magdalena*Coordination of Zn²⁺ and Cu²⁺ to the membrane disrupting fragment of amylin.**Dalton Transactions**, 2016, 45, 8099-8106.

IF: 4.029

Liczba niezależnych cytowań: 3 (razem 5)

Mój udział procentowy to 100%.

H6. Łoboda Dorota, Rowińska-Żyrek Magdalena*

Zn(II) - pramlintide: stability, binding sites and unexpected aggregation.

Journal of Inorganic Biochemistry, 2017, 174, 150-155.

IF: 3.348

Liczba niezależnych cytowań: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, przeprowadzeniu (MS, NMR) lub nadzorowaniu przeprowadzonych eksperymentów i ich interpretacji, napisaniu tekstu publikacji, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H7. Rowińska-Żyrek Magdalena*, Witkowska Danuta, Potocki Sławomir, Remelli Maurizio, Kozłowski Henryk

His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea?

New Journal of Chemistry, 2013, 37, 58-70.

IF: 3.159

Liczba niezależnych cytowań: 22 (razem 31)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, napisaniu rozdziału 'Other His-rich sequences in proteins and peptides', wstępu i podsumowania, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H8. Kozłowski Henryk*, Potocki Sławomir, Remelli Maurizio, Rowińska-Żyrek Magdalena, Valensin Daniela

Specific metal ion binding sites in unstructured regions of proteins.

Coordination Chemistry Reviews, 2013, 257, 2625-2638.

IF: 12.098

Liczba niezależnych cytowań: 36 (razem 40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, napisaniu rozdziałów 'Cysteines as anchoring sites for metal ions', 'Polyhistidine sequences vs. the Cys-Cys binding site', wstępu i konkluzji, pomocy w redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

H9. Rowińska-Żyrek Magdalena*, Zakrzewska-Czerwińska J., Zawilak-Pawlik Anna, Kozłowski Henryk
Ni²⁺ chemistry in pathogens - a possible target for eradication.

Dalton Transactions, 2014, 43, 8976-8989.

IF: 4.197

Liczba niezależnych cytowań: 9 (razem 13)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, napisaniu 'chemicznej' części pracy (rozdziały 'Nickel's bioinorganic preferences', 'Tempting binding sites in *Helicobacter pylori*', 'Histidines – some useful statistics', 'Cysteine rich sequences in *Helicobacter pylori* – an anchoring site for nickel ions'), wstępu i podsumowania, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H10. Chiera Nadine M., Rowińska-Żyrek Magdalena*, Wieczorek Robert, Guerrini Remo, Witkowska Danuta, Remelli Maurizio, Kozłowski Henryk

Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability.

Metallomics, 2013, 5, 214-221.

IF: 3.978

Liczba niezależnych cytowań: 14 (razem 23)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, przeprowadzeniu (MS) lub nadzorowaniu (CD, UV-Vis, EPR, potencjometria) eksperymentów określających stechiometrię, miejsca wiążące i termodynamikę niklowych kompleksów, ich interpretacji i korelacji z wynikami obliczeń teoretycznych, napisaniu tekstu publikacji, prowadzeniu korespondencji z edytorem i redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H11. Rowińska-Żyrek Magdalena, Potocki Sławomir, Witkowska Danuta, Valensin Daniela, Kozłowski Henryk*

The zinc-binding fragment of HypA from *Helicobacter pylori*: a tempting site also for nickel ions.

Dalton Transactions, 2013, 42, 6012-6020.

IF: 4.097

Liczba niezależnych cytowań: 9 (razem 17)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na propozycji tematu, nadzorowaniu syntezy peptydów, opracowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów określających stechiometrię i termodynamikę powstających kompleksów (MS, CD, UV-Vis, potencjometria), ich interpretacji i korelacji z wynikami eksperymentów spektroskopowych (NMR), przygotowaniu tekstu publikacji i pomocy w redagowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H12. Rowińska-Żyrek Magdalena*

Peryplasmic HupE region-Ni²⁺ interactions: thermodynamics, binding mode and competition with Cu²⁺ and Zn²⁺.

Inorganica Chimica Acta, 2017, 460, 141-147 (praca na zaproszenie w specjalnym wydaniu 'Bioinorganic chemistry – the new generation').

IF: 2.002

Liczba niezależnych cytowań: 0

Mój udział procentowy to 100%.

H13. Rowińska-Żyrek Magdalena*

Metal interactions with the transmembrane region of HupE Ni²⁺ transporter explain its efficiency.

Journal of Inorganic Biochemistry, 2018, 180, 33-38.

IF: 3.348

Liczba niezależnych cytowań: 0

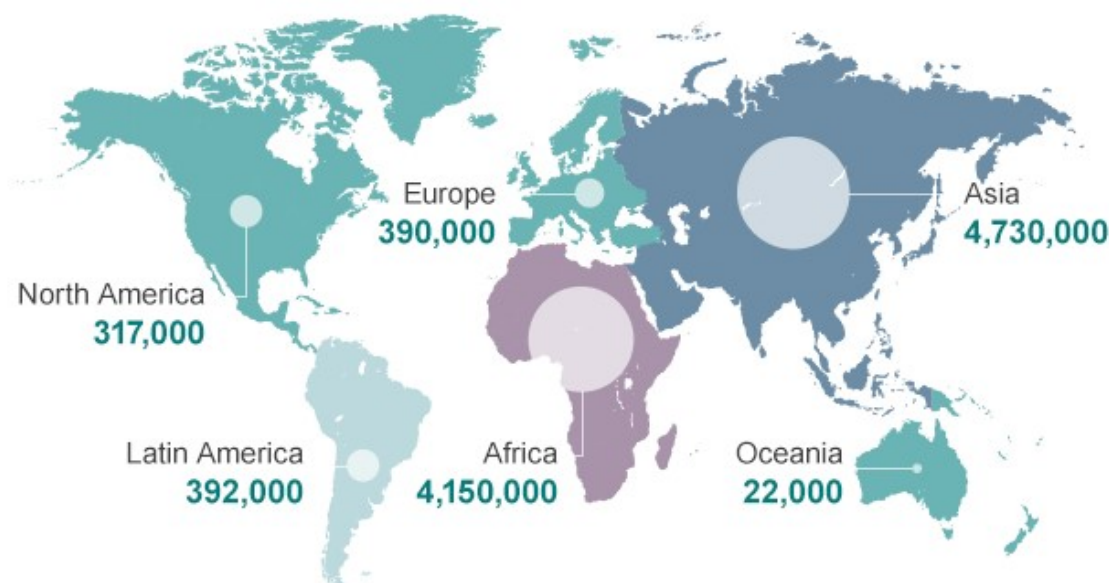
Mój udział procentowy to 100%.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4.1. Cel naukowy podjętych badań

Infekcje wywołane przez lekooporne bakterie zabijają co roku 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 terapie 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

Obecnie stosowane antybiotyki celują w szereg jasno określonych punktów metabolizmu bakterii: (i) uszkodzają 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 terapie (i) zaburzające funkcje błony komórkowej (polienowe lub pochodne pirydonu), (ii) inhibitory biosyntezy ergosterolu (azolowe, triazolowe, pochodne alliloaminy i fenyłomorfoliny, (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). W celu opracowania wysoce specyficzne leku przeciwgrzybicznego lub przeciwbakteryjnego, ważne jest, aby zrozumieć i celować w różnice w metabolizmie człowieka i drobnoustroju. Taką znaczącą różnicą może okazać się 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 tą 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 logarytmicznie (Rys. 2).



Rysunek 2. Wyszukiwanie fraz 'nutritional immunity' i 'metal ions' w 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 Metaloproteiny 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 trywialnym 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 wydaje się zdawać sobie sprawę z niezbędności cynku dla grzybowych patogenów

i ogranicza (i tak już skąpy) poziom wolnego Zn^{2+} poprzez 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 ssących.

Wyniki opisanego niżej cyklu prac, które stanowią mój dorobek habilitacyjny 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.

Ogólnym celem badań przedstawionych w poniższych pracach 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.

4.2. Najważniejsze wyniki

4.2.1 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

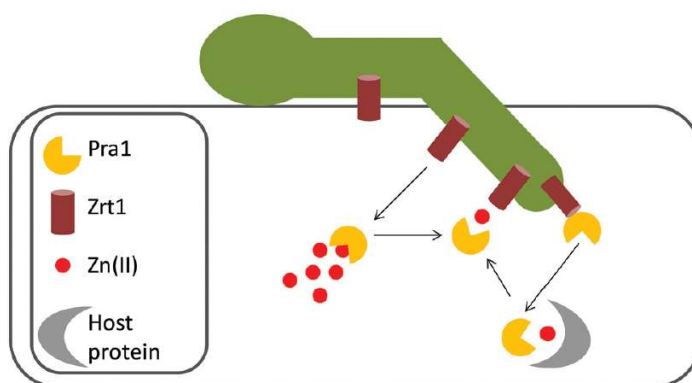
białka wiążące cynk; ich główną funkcję jest regulacja transkrypcji i innych procesów biologicznych.¹⁰ Jak wspomniano już we wstępie – białka wiążące cynk(II) są podstawą wirulencji mikroorganizmów i nie ulega wątpliwości, że wychwytywanie Zn^{2+} ma zasadnicze znaczenie dla zjadliwości i przeżycia patogenów w organizmie gospodarza. Wychwycenie tego metalu jest skomplikowanym procesem, m.in. ze względu na subnanomolowe stężenie wolnego Zn^{2+} .

Praca H1 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 przeciwgrzybicznego, ważne jest, aby zrozumieć i celować w różnice w metabolizmie człowieka i grzyba. Znaczącą różnicą pomiędzy komórkami mikroorganizmów i ssaków jest system transportu cynku, mikroelementu niezbędnego dla prawie wszystkich organizmów [H1, H2].

Chorobotwórcze grzyby przystosowały się do nałożonych przez gospodarza cynkowych limitów poprzez rozwój dodatkowych mechanizmów pozyskiwania tego metalu – wydzielają 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 wsp. wyjaśnili szczegóły tego mechanizmu u *C. albicans*¹¹: (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 uwalnianie z powierzchni strzępek grzyba; jest to niezbędne dla wzrostu grzyba i powoduje uszkodzenia śródbłonna gospodarza;¹² (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.¹³ 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.

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 powierzchownych, 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.¹⁴ 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.¹⁵ Naturalnie, chemia koordynacyjna cynku w biomolekułach nie jest tak trywialna jak to opisano powyżej; istotna dla stabilności tego typu kompleksów jest druga powłoka interakcji, która obejmuje oddziaływania reszt położonych blisko miejsca wiązania. Dobrym przykładem może być ten, który opisano podrozdziale 4.2.3 dla kompleksów poliHis i poliGln sekwencji z Ni^{2+} , w którym region polyGln tworzy sieć kooperatywnych wiązań wodorowych, które chronią rdzeń kompleksu przed i innymi kompetycyjnymi ligandami [H10].

Zastosowaliśmy wyżej opisane reguły do odnalezienia miejsc wiążących cynk w Pra1 (rejonu zaznaczone na czerwono na Rys. 4A; nasze przypuszczenia są zgodne z pokazanymi przez Citiulo i wsp.¹¹). Istotnym zagadnieniem jest też struktura białka. Pracowaliśmy z układami modelowymi – peptydami, które są fragmentami Pra1. Struktura Pra1 nie została, jak dotąd, rozwiązana, dlatego

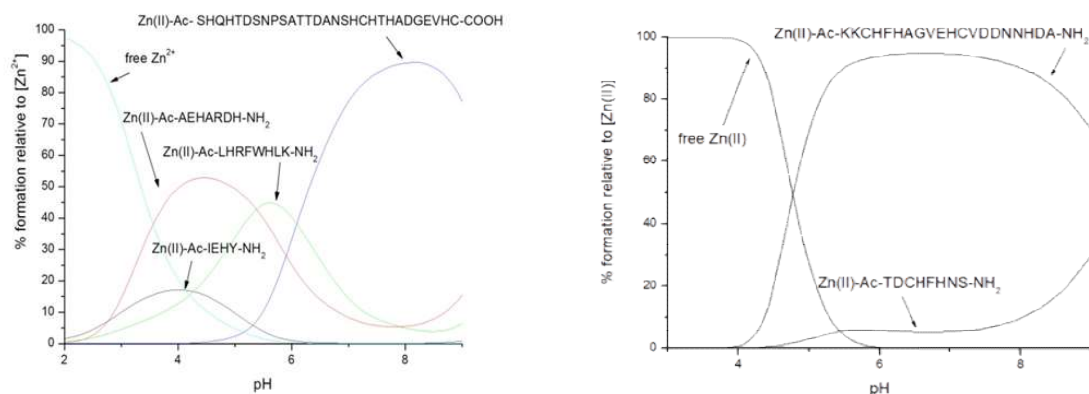
posłużyliśmy się programem Phyre2 (wykorzystującym technikę zdalnej homologii do modelowania struktury białek),¹⁶ który pokazał, że Pra1, a w szczególności jego C-końcowa część, jest całkowicie nieustrukturyzowana, a więc idealna do zastosowania naszego eksperymentalnego podejścia. Również struktura 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-końiec tego białka (reszty 1-183, Rys. 4B); ponadto, rejon ten jest wysoce nieustrukturyzowany.



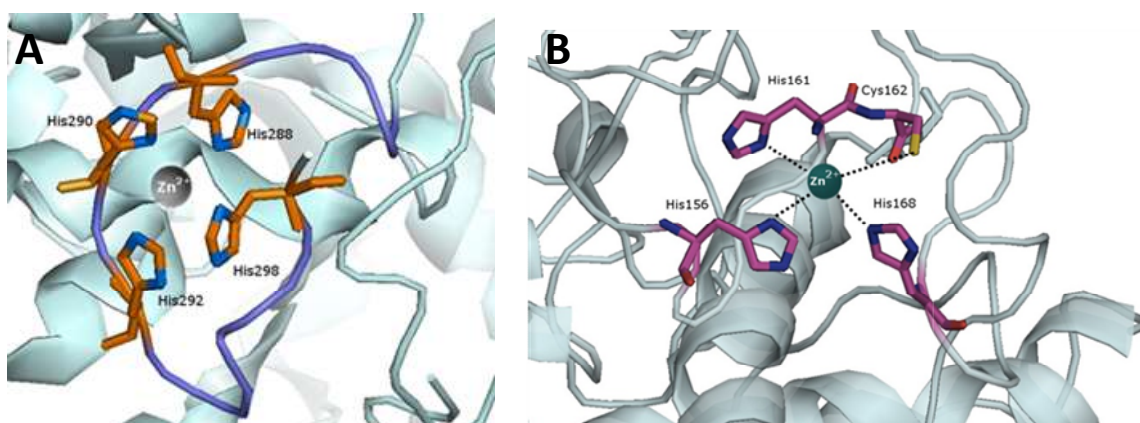
Rysunek 4. Sekwencja aminokwasowa cynkoforu Pra1; B) Sekwencja zewnątrzkomórkowej, N-końcowej części transportera Zrt1. Przewidywane miejsca wiązania Zn^{2+} wyróżniono na czerwono.

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 koekspresjonowane geny, *zrfC* i *aspf2*, są odpowiednikami *zrt1* i *pra1* u *C. albicans*.¹⁷ Wybraliśmy takie fragmenty białek, które najprawdopodobniej 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 stochiometrię 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-SHQHTDSNPSATTDANS**SHCH**THADGEVHC-COOH) ma największe powinowactwo do jonów Zn^{2+} (Rys. 5A). Najprawdopodobniej 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) [H3]. Najprawdopodobniej jest to to miejsce, które wchodzi w interakcje z transporterem cynku Zrt1.



Rysunek 5 A) Wykres kompetycyjny między fragmentami cynkoferu Pra1: Ac-IEHY-NH₂; Ac-AEHARDH-NH₂; Ac-SHQHT-NH₂; Ac-SHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-SHQHTSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH oraz jonami Zn²⁺ oraz B) między fragmentami transportera Zrt1 (Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH₂ i Ac-TDCHFHS-NH₂). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której mieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K, I = 0.1 M, [Zn²⁺] = [L] = 0.001M.

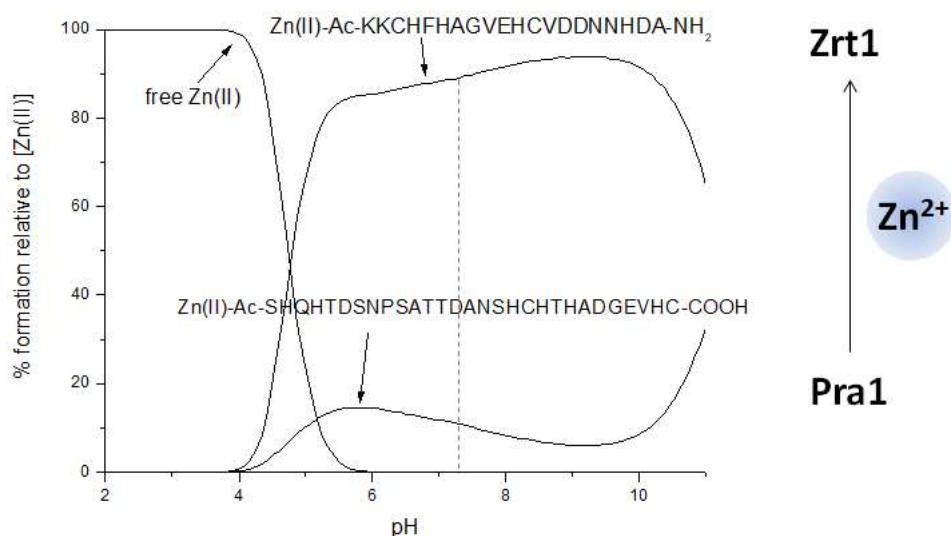


Rysunek 6. Proponowany sposób wiązania Zn²⁺ do A) cynkoferu Pra1 i B) transportera Zrt1. Struktura opiera się na koordynatach symulowanych przez program Phyre2.¹⁶ Rysunek został wygenerowany za pomocą Pymol.¹⁸

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 być rejon KKCHFAGVEHCVDDNNHDA (Rys. 5B). Spektroskopia NMR wskazała imidazolowe azoty reszt His156, His161 i His168 oraz tiolową siarkę Cys162 jako miejsca koordynacji Zn²⁺ (Rys. 6B) [H4].

Czy możemy zatem sugerować, że wyżej opisane rejony Pra1 i Zrt1 przekazują sobie jon Zn²⁺? Biorąc pod uwagę chemię bionieorganiczną obu białek, jest to wysoce prawdopodobne – na podstawie obliczonych stałych trwałości możemy wywnioskować, że w pH 7.4, około 85% dotępnego Zn²⁺ będzie związane do zewnątrzkomórkowego fragmentu transportera Zrt1, a tylko 15% - do oddziałującego z nim cynkoferu Pra1 (Rys. 7) [H4]. 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).



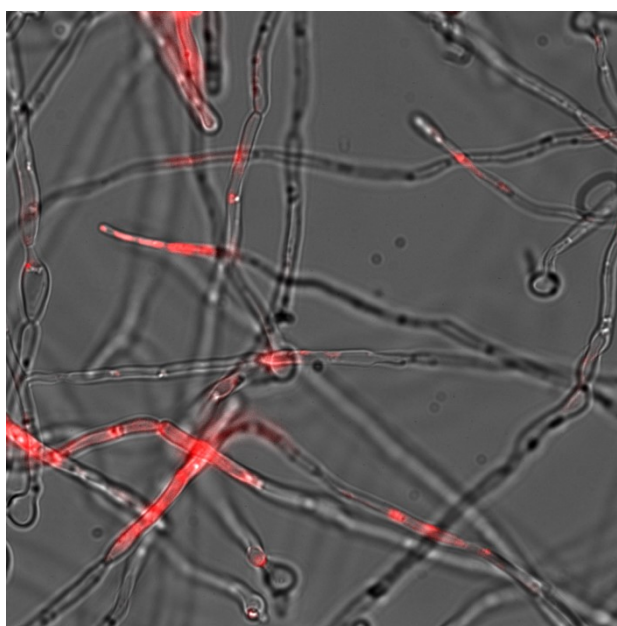
Rysunek 7. Wykres kompetycyjny między wiążącymi Zn^{2+} fragmentami cynkoforu Pra1 i transportera Zn^{2+} Zrt1 (odpowiednio Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH₂). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której zmieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K, I = 0.1 M, $[\text{Zn}^{2+}] = [\text{Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH}] = [\text{Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH}_2] = 0.001\text{M}$. Linią przerywaną zaznaczono pH fizjologiczne.

Innym istotnym aspektem funkcjonowania systemu transportu opartego na cynkoforach 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+} ? Określiśmy 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 najprawdopodobniej z faktu, że rejon KKCHFAGVEHCVDDNNHDA jest w stanie skoordynować dwa jony Ni^{2+} i tylko jeden jon Zn^{2+} [H4].

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.

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 diskutowany przez nas C-końcowy fragment Pra1 jest rozpoznawany przez *C. albicans* w podobny sposób, co jego pełnej długości, dziesięciokrotnie większy, natywny analog.



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

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 dostarczałby lek do grzyba. Jaki lek powiązać z Pra1? Poza najbardziej popularnymi lekami imidazolowymi lub triazolowymi warto przyjąć się bliżej tym opartych na przeciwdrobnoustrojowych peptydach. Przykład jednego z nich opisano w następnym podrozdziale.

4.2.2. Rola jonów Zn^{2+} w tworzeniu złogów amyloidowych przeciwdrobnoustrojowej amyliny

Ze względu na generalny brak oporności mikroorganizmów na peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang.: antimicrobial peptides, AMP), są one duża nadzieją na zostanie nową, skuteczną klasą terapeutyków. Istnieje wiele sposobów, na które 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 dwójaki 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 amylin (znana też jako IAPP, ang. Islet Amyloid Polypeptide);^{19, 20} 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.²¹ Ludzka amylin jest wyjątkowo trudno rozpuszczalna i błyskawicznie fibryluje, skutkując stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami błon komórkowych.^{22, 23} 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.^{24, 25} Przeciwdrobnoustrojowa skuteczność amyliny silnie zależy od stopnia jej agregacji, a agregacja z kolei – od obecności jonów Zn^{2+} .²⁶

Ludzka postać amyliny ma sekwencję KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY, z mostkiem dwusiarczkowym pomiędzy resztami cystein 2 i 7 oraz z amidowanym C-końcem. Obie modyfikacje są konieczne do pełnej aktywności biologicznej amyliny.²⁷

W reakcji fibrylizacji amyliny, wczesne, tzw. prefibrylarne struktury są ogromnie toksyczne dla komórek beta trzustki. Tworzące się w następnym etapie struktury włókien amyloidu również wydają się mieć 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 wiewiórki) 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.^{28, 29, 30} 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.³¹ C-terminalna część amyliny (30-37), będąc odcinkiem wysoce hydrofobowym, może również wspomagać proces fibrylacji.

Szczurza amylin wykazuje aż 84% homologii sekwencji aminokwasowej z formą ludzką, a pomimo tego nie tworzy fibryli. Polipeptydy te różni tylko sześć aminokwasów, z których najważniejszymi substytucjami wydają się być 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 najprawdopodobniej 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).

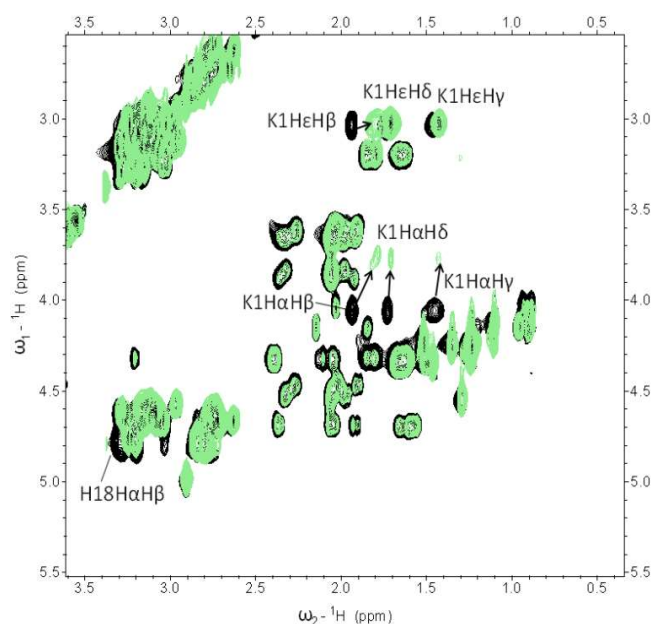
Pramlintyd:	KCNTATCATQ RLANFLV	HSS	NNFGPILPPT NVGSNTY-(NH ₂)
Ludzka amylin:	KCNTATCATQ RLANFLV	HSS	NNFGAILST NVGSNTY-(NH ₂)
Szczurza amylin:	KCNTATCATQ RLANFLV	HSS	NNLGPVLPPT NVGSNTY-(NH ₂)

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 najprawdopodobniej bierze udział w wiązaniu jonów cynku i miedzi, wyróżniono w ramce.

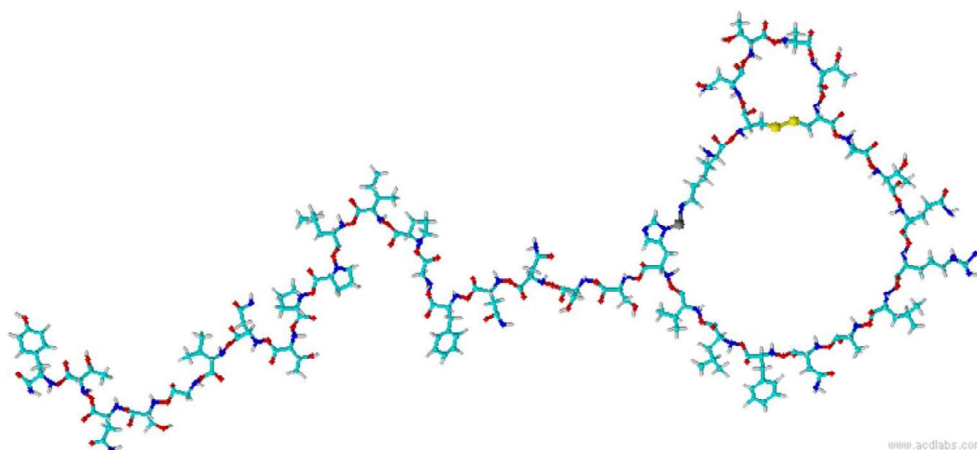
Ciekawym wariantem amyliny jest pramlintyd, jej syntetyczny analog – nowy, dopuszczony w USA w 2006 roku do stosowania w leczeniu cukrzycy hipoglikemiczny lek stosowany u pacjentów u których leczenie insuliną nie przynosi pożądanych efektów. W sekwencji pramlintydu trzy aminokwasy zostały zastąpione 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 Zn²⁺ w procesie agregacji amyliny poprzez precyzyjne wskazanie miejsc jego wiązania, określenie termodynamiki tworzącego się kompleksu i zrozumienie wpływu koordynacji Zn²⁺ 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 [H5], jak i pramlintydu [H6], selektywne przesunięcia sygnałów pochodzących od korelacji H α -H β His18 i wszystkich korelacji H α 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) [H6]. Analogiczny sposób koordynacji zaobserwowano w przypadku amyliny₁₋₁₉ [H5].



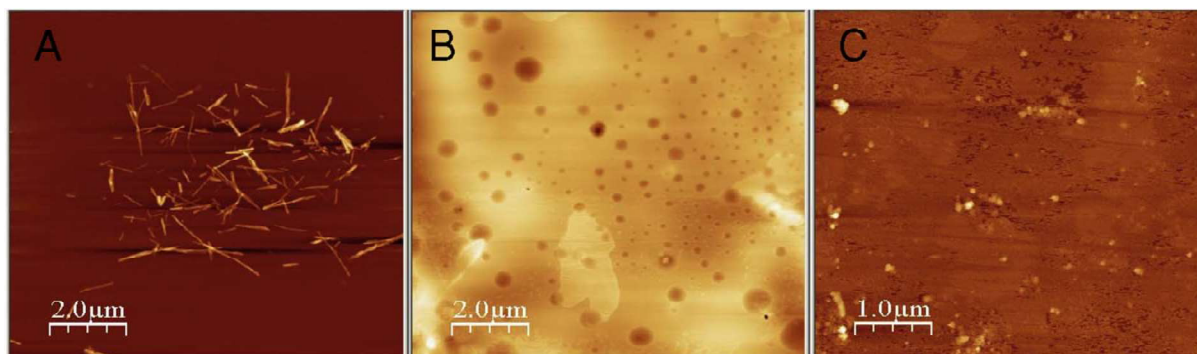
Rysunek 10. Widmo TOCSY 3 mM pramlintydu (czarne kontury) i 3 mM pramlintydu w obecności 1 ekwiwalentu Zn^{2+} (zielone kontury), pH 7.2, T = 298 K.



Rysunek 11. Sugerowany sposób koordynacji kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd [H6].

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 [H6]. Jeszcze bardziej ciekawy jest wpływ tego rejonu na fibrylizację kompleksu Zn^{2+} -pramlintyd – początkowo dobrze rozpuszczalna, nieagregująca amyliną po ok. 20h od skoordynowania Zn^{2+} zaczyna tworzyć oligomeryczne agregaty, podczas gdy sam peptyd pozostaje dobrze rozpuszczalny (Rys. 12) [H6].

Takie wywołane koordynacją cynku(II) zgięcie peptydu prowadzące do opóźnionej w czasie agregacji może być częściowym wyjaśnieniem procesu tworzenia prefibrylarnych, oligomerycznych form amyliny, 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+} -pramlinydy, inkubowane przez 24 godziny; B) pramlinydy, inkubowany przez 24 godziny; i C) przezroczystą płytkę z miki.

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, z kolei, na przebieg tych chorób.³² Niedawno rozpoczęto podobną dyskusję na temat amyliny, która wykazuje liczne podobieństwa do wiążących metal neuro-białek tworzących amyloidy.

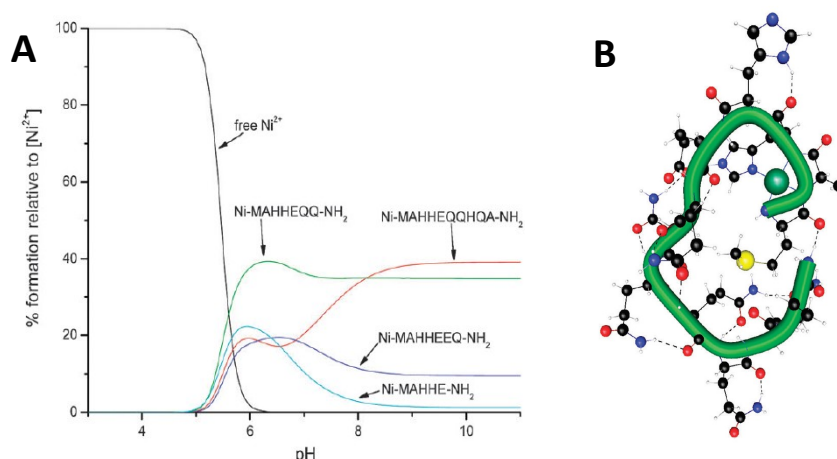
Powyższe, zupełnie nieoczekiwane zjawisko agregacji kompleksu Zn^{2+} -pramlinydy stawia wiązanie cynku(II) do amyliny w zupełnie nowym świetle – zarówno w przebiegu cukrzycy, jak i w terapii przeciwdrobnoustrojowej, wyjaśniając wpływ wiązania metalu na agregację kompleksu.

4.2.3 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 ssących. 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 [H7, H8, H9]. Nie jest zaskakujące to, 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 [H9] 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 [H7]. Kompleks, w którym nikiel(II) wiąże się do sąsiadujących z sobą cystein (do cysteinyliowych tioli i znajdującego się między nimi amidowego atomu azotu) okazał się być trwalszy zarówno do niklowego kompleksu sekwencji polihistydylowych, jak i kompleksu z motywem ATCUN [H8].

Pokazałam również, w jaki sposób powtórzenia aminokwasów niebiorących bezpośredniego udziału w koordynacji wpływają na stabilność kompleksu peptydu z takim rejonem [H10]. Przeanalizowaliśmy

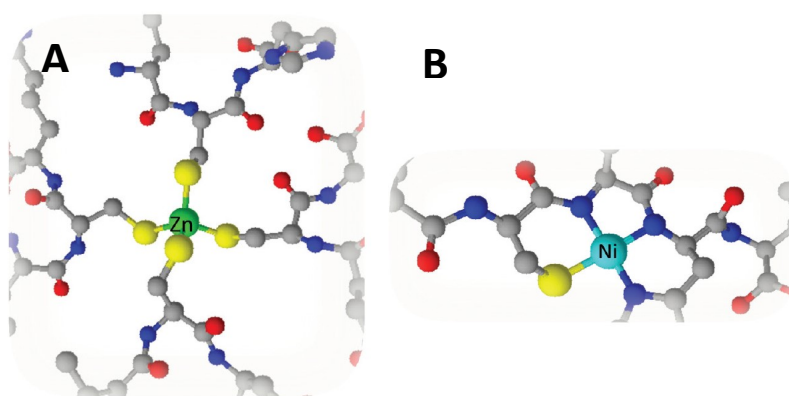
szereg niklowych kompleksów N-końcowych rejonów bakteryjnych białek Hpn i Hpn-like (MAHHE-NH₂, MAHHEEQ-NH₂, MAHHEQQ-NH₂, MAHHEQQHQA-NH₂, MAHHEEQHG-NH₂ i MAHHEQQQQQA-NH₂), których najbardziej prawdopodobną funkcją jest przechowywanie jonów Ni²⁺. Opierając się na wynikach spektrometrii mas, która pokazała stechiometrię powstających kompleksów, spektroskopii UV-Vis i CD, pokazujących bezpośrednie otoczenie koordynacyjne Ni²⁺ 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 być 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 najprawdopodobniej chronią kompleks przed hydrolizą (Rys. 13B) [H10]. 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 Ni²⁺, MAHHE-NH₂, MAHHEEQ-NH₂, MAHHEQQ-NH₂ i MAHHEQQHQA-NH₂; B) Sieć wiązań wodorowych w kompleksie Ni-MAHHEQQQQQA-NH₂ [H10].

Homeostaza Ni²⁺ jest w nierozdzielny sposób powiązana z homeostazą Zn²⁺ – oba metale konkurują o podobne miejsca wiązania. Dobrze obrazuje to przykład białka HypA, uwikłanego w fałdowanie hydrogenazy (jego rola polega m.in. na dostarczaniu Ni²⁺ do hydrogenazy). HypA wiąże jon Zn²⁺ w tzw. miejscu strukturalnym – nieustrukturyzowanej pętli, zawierającej w swojej sekwencji dwa motywy CXXC (ELECKDCSHVFKPNALDYGVCCKHS). Pokazaliśmy w jaki sposób Zn²⁺ wiąże się do tego rejonu HypA i dlaczego Ni²⁺, 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 Zn²⁺ [H11]. Potwierdza to monitorowane za pomocą CD miareczkowanie omawianego kompleksu Ni²⁺ jonami Zn²⁺ – w miarę

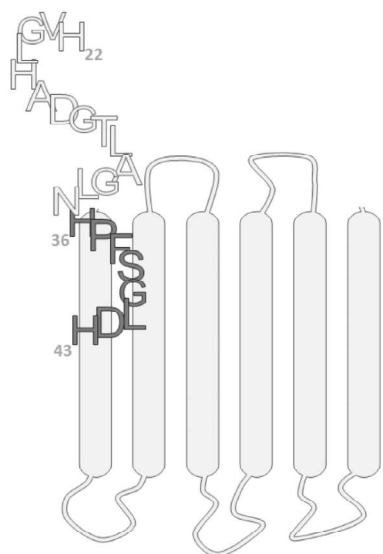
dodawania Zn^{2+} zanikają charakterystyczne dla niklowych kompleksów pasma [H11]. Diametralnie różna stabilność kompleksów wynika z różnych sposobów koordynacji w okotofizjologicznym pH – Ni^{2+} wiąże się do tiolowej siarki i poprzedzających ją amidowych atomów azotu, podczas gdy Zn^{2+} koordynuje 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+} .³³



Rysunek 14. Sposób koordynacji Zn^{2+} (A) i Ni^{2+} (B) do rejonu pętli białka HypA [H11].

4.2.4 Transport metali

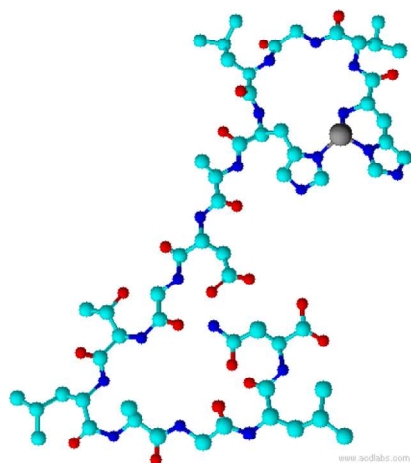
W większości naturalnych środowisk bakteryjnych, dostępność niklu(II) jest bardzo niska (nanomolarna). Bakterie rozwinęły wysoko wyspecjalizowane systemy transportu dla tego metalu, by zapewnić jego dostępność dla niklowo-zależnych enzymów.³⁴ Importery Ni^{2+} można podzielić na dwie główne kategorie: (i) pojedyncze polipeptydowe permeazy i (ii) złożone transportery z rodziny (ang.) 'ATP-binding cassette', wykorzystujące energię hydrolizy ATP do transportu Ni^{2+} ,³⁵ które można podzielić na kanoniczne importery ABC i niedawno odkryte czynniki transportujące czynnik energetyczny (ang. energy-coupling factor (ECF) transporters).³⁶ Pojedyncze polipeptydowe permeazy dzielą się na trzy grupy: transportery niklowo-kobaltowe (NiCoT), UreH i HupE/UreJ.³⁵ 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 (₂₂HVGLHADGTLA₃₅) i błonowy rejon, który przekazuje metal do wnętrza komórki bakteryjnej (₃₆HPFSGLDH₄₃) (Rys. 15).³⁷ Co ciekawe, pokazano, że transport Ni^{2+} zaburza obecność jonów Cu^{2+} .³⁸



Rysunek 15. Schematyczna budowa transportera HupE z *Rhizobium leguminosarum*. Wskazano sekwencje zaangażowane w transport Ni^{2+} .³⁷

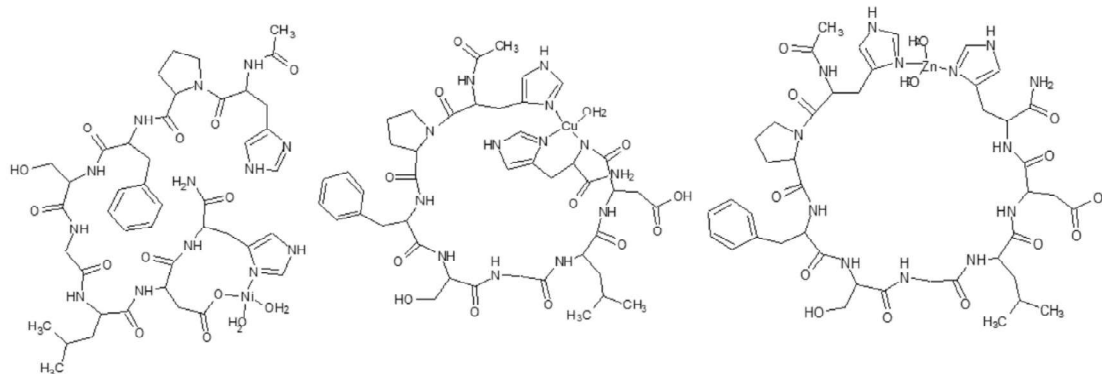
Określiliśmy specyficzność zarówno peryplazmatycznej, jak i błonowej domeny HupE względem natywnych jonów Ni^{2+} oraz jonów Cu^{2+} i Zn^{2+} , obecnych w ziemiach, które są naturalnym środowiskiem, w którym występuje *Rhizobium leguminosarum* i które najprawdopodobniej mogą być inhibitorami transportu 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 wypreć 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 ($[\text{ligand}] = [\text{Ni}^{2+}] + [\text{Cu}^{2+}] + [\text{Zn}^{2+}]$; $[\text{Ni}^{2+}] = 0.22 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 0.54 \text{ mM}$, $[\text{Zn}^{2+}] = 2.52 \text{ mM}$)³⁹ [H12].



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.

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 do azotu imidazolowego His43 i karboksylowej reszty Asp42. Cu^{2+} z kolei wiąże się do imidazolowych azotów His36, His43 i poprzedzającego His43 amidu; 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.

Termodynamiczne parametry kompleksów utworzonych przez peryplazmatyczny [H12] i błonowy [H13] fragment HupE okazały się być sporym zaskoczeniem. Spodziewano się, że peryplazmatyczny fragment będzie wiązał Ni^{2+} słabiej od fragmentu błonowego, który 'podaje' transportowane jony wgłąb komórki – taki sposób koordynacji czyniłby transport wydajnym. Zaobserwowano odwrotną sytuację – peryplazmatyczny fragment, HupE, ${}_{22}\text{HVGLHADGTLA}_{35}$, 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 [H12] i błonowy [H13] 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, mogących być podstawą do zaprojektowania 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 otoczeniu⁴⁰ lub (ii) strategia oparta na tzw. odporności odżywczej (ang. 'nutritional immunity'), w której zahamowany zostałby transport Ni^{2+} do wnętrza patogenu.

4.3. Główne osiągnięcia:

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 pramlintydzie – 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 (amylina₁₋₁₉ i pramlintyd);
- 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+} ;

4.4. Wykorzystanie wyników:

Opisane wyżej badania idealnie wpisują się w nurt badań podstawowych, których głównym celem jest (według definicji) 'zdobycie nowej wiedzy o podstawach zjawisk i obserwowalnych faktów bez nastawienia na bezpośrednie zastosowanie praktyczne'. Bez badań podstawowych, nie mogłyby istnieć badania aplikacyjne.

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 po pięknej, podstawowej chemii bionieorganicznej, pozwalającym na lepsze zrozumienie podstawowych mechanizmów chemicznych. Prace są oparte na dobrze kontrolowanych eksperymentach i uważnych obserwacjach i chociaż są to wyraźnie podstawowe badania, to wyraźnie widać, że jest to fundament (tzw. 'cegła w ścianie') w projektowaniu skutecznych, specyficznych i selektywnych leków do stosowania w ukierunkowanej terapii przeciwdrobnoustrojowej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Podsumowanie dorobku naukowego

1. Liczba publikacji opublikowanych w czasopismach z bazy Journal Citation Reports: 39
2. Liczba publikacji opublikowanych w czasopismach z bazy Journal Citation Reports po uzyskaniu stopnia doktora: 29
3. Sumaryczny IF: 161.87
4. Średni IF: 4.15
5. Liczba wszystkich cytowań: 428; cytowani niezależnych: 309 (wg Web of Science, dane z dn. 20.03.2018)
6. Indeks Hirscha: 13

5.2. Publikacje stanowiące dorobek naukowy (poza cyklem publikacji wymienionym w punkcie 4b), opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports:

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Belotti D., Łoboda D., Rowińska-Żyrek M.*, Remelli M.*, Investigation on the metal binding sites of a putative Zn(II) transporter in opportunistic yeast species *Candida albicans*, New Journal of Chemistry, 2018, DOI: 10.1039/C8NJ00533H.
2. Łoboda D., Kozłowski H., Rowińska-Żyrek M.*, Antimicrobial peptide – metal ion interactions – a potential way of activity enhancement, New Journal of Chemistry, 2018, DOI: 10.1039/C7NJ04709F.
3. Hecel A., Wąty J., Rowińska-Żyrek M., Świątek-Kozłowska J., Kozłowski H., Histidine tracts in human transcription factors: insight into metal ion coordination ability, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2018, 23, 81-90.
4. Wąty J., Hecel A., Rowińska-Żyrek M.*, Kozłowski H., Impact of histidine spacing on modified polyhistidine tag – metal ion interactions, Inorganica Chimica Acta (praca na zaproszenie, specjalne wydanie z okazji jubileuszu Prof. Sovago), Inorganica Chimica Acta, 2018, 472, 119-126.
5. Łodyga-Chruścińska E., Pilo M., Zucca A., Garribba E., Klewicka E., Rowińska-Żyrek M., Symonowicz M., Chruściński L., Cheshchewik V. T., Physicochemical, antioxidant, DNA cleaving properties and antimicrobial activity of fisetin-copper chelates, Journal of Inorganic Biochemistry, 2018, 180, 101-118.
6. Wąty J., Hecel A., Kołkowska P., Kozłowski H., Rowińska-Żyrek M.*, Poly-Xaa sequences in proteins - biological role and interactions with metal ions : chemical and medical aspects., Current Medicinal Chemistry, 2018, 25, 22-48.
7. Remelli M., Guerrini R., Pontecchiani F., Potocki S., Rowińska-Żyrek M., Wąty J., Kozłowski H., Zn(II) and Ni(II) complexes with poly-histidyl peptides derived from a snake venom (praca na zaproszenie, specjalne wydanie z okazji jubileuszu Prof. Sovago), Inorganica Chimica Acta, 2018, 472, 149-156.
8. Kołkowska P., Hecel A., Kędzierska D., Ostrowska M., Walencik P., Wąty J., Zdyb K., Spodzieja M., Rodziejewicz-Motowidło S., Potocki S., Łuczowski M., Gumienna-Kontecka E., Rowińska-Żyrek M.*, HENRYK - an endless source of metal coordination surprises, Journal of Inorganic Biochemistry, 2016, 163, 258-265.

9. Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel R. K. O., Secondary structure confirmation and localization of Mg(II) ions in the mammalian CPEB3 ribozyme, *RNA - A Publication of the RNA Society*, 2016, 22, 750-763.
10. Lodyga-Chruscinska E., Symonowicz M., Sykula A., Bujacz A., Garribba E., Rowińska-Żyrek M., Oldziej S., Klewicka E., Janicka M., Krolewska K., Cieslak M., Brodowska K., Chruściński L., Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 143, 34-47.
11. Rowińska-Żyrek M.*, Salerno M., Kozłowski H., Neurodegenerative diseases – understanding their molecular bases and progress in the development of potential treatments, *Coordination Chemistry Reviews*, 2015, 284, 298-312.
12. Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel RKO., Solution structure and metal ion binding sites of the human CPEB3 ribozyme's P4 domain, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014, (19)6, 903-912.
13. Pontecchiani F., Simonovsky E., Wieczorek R., Barbosa N., Rowińska-Żyrek M., Potocki S., Remelli M., Miller Y., Kozłowski H., Unusual binding mechanism of Cu(II) ions to the poly-histidyl domain of a peptide found in the venom of an African viper *Dalton Trans.*, 2014, 43(44), 16680 - 16689
14. Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel RKO., 'Hexaamminecobalt(III) – Probing Metal Ion Binding Sites in Nucleic Acids by NMR' *Z. Anorg. Allg. Chemie*, 2013, 639. 1313.
15. Witkowska D., Politano R., Rowińska-Żyrek M., Guerrini R., Remelli M., Kozłowski H., 'The coordination of NiII nad CuII ions to the polyhistidyl motif of Hpn proteins: is it as strong as we think?', *Chem. Eur. J.*, 2012, 18, 11088.
16. Witkowska D., Valensin D., Rowińska-Żyrek M., Karafova A., Kamysz W., Kozłowski H., 'Coordination of Ni²⁺ and Cu²⁺ to metal ion binding domains of E.coli SlyD protein.' *J. Inorg. Biochem.*, 2012, 107, 73.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

17. Witkowska D., Rowińska-Żyrek M., Valensin G., Kozłowski H., 'Specific poly-histidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in z*Helicobacter pylori*. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects.', *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 133.

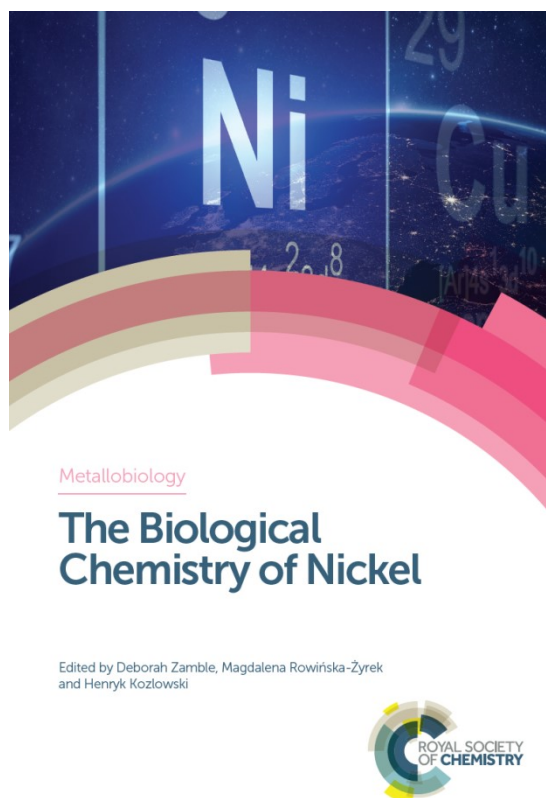
18. Potocki S., Rowińska-Żyrek M., Witkowska D., Pyrkosz M. J., Szebesczyk A., Krzywoszyńska K., Kozłowski H.. 'Metal transport and homeostasis within the human body : toxicity associated with transport abnormalities.', *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 2738.
19. Pap J. S., Szyrwił Ł., Rowińska-Żyrek M., Nikitin K., Fritsky I. O., Kozłowski H., 'An efficient copper(III) catalyst in the four electron reduction of molecular oxygen by L-ascorbic acid.', *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2011, 334, 77.
20. Rowińska-Żyrek M., Witkowska D., Bielińska S., Kamysz W., Kozłowski H., 'The -Cys-Cys- motif in *Helicobacter pylori*'s Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions.', *Dalton Trans.*, 2011, 40, 5604.
21. Potocki S., Rowińska-Żyrek M., Valensin D., Krzywoszyńska K., Witkowska D., Łuczowski M., Kozłowski H., 'Metal binding ability of cysteine-rich peptide domain of ZIP13 Zn²⁺ ions transporter.', *Inorg. Chem.*, 2011, 50, 6135.
22. Krzywoszyńska K., Rowińska-Żyrek M., Witkowska D., Potocki S., Łuczowski M., Kozłowski H., 'Polythiol binding to biologically relevant metal ions.', *Dalton Trans.*, 2011, 40, 10434.
23. Rowińska-Żyrek M., Witkowska D., Valensin D., Kamysz W., Kozłowski H., 'The C terminus of HspA—a potential target for native Ni(II) and Bi(III) anti-ulcer drugs.', *Dalton Trans.*, 2010, 39, 5814.
24. Żyrek M., Gumienna-Kontecka E., Szewczuk Z., Fritsky I. O., Kozłowski H., 'Copper(II)-aminohydroxamate ternary complexes evidenced by mass spectrometry.', *Arkivoc*, 2009, Pt. 3, 145.
25. Rowińska-Żyrek M., Valensin D., Szyrwił Ł., Grzonka Z., Kozłowski H., 'Specific interactions of Bi(III) with the Cys-Xaa-Cys unit of a peptide sequence.', *Dalton Trans.*, 2009, 9131.
26. Valensin D., Szyrwił Ł., Camponeschi F., Rowińska-Żyrek M., Molteni E., Jankowska E., Szymańska A., Gaggelli E., Valensin G., Kozłowski H., 'Heteronuclear and homonuclear Cu²⁺ and Zn²⁺ complexes with multihistidine peptides based on zebrafish prion-like protein.', *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 7330.

5.3. Książki i monografie:

1. Rowińska-Żyrek M.*, Kozłowski H., Nickel binding sites : coordination modes and thermodynamics / The biological chemistry of nickel., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017, 43-59 , ISBN 978-1-78262-498-1, 10.1039/9781788010580-00043
2. Musiari A., Rowińska-Żyrek M., Gallo S., Sigel RKO., Metal ions in ribozymes and riboswitches / DNA in supramolecular chemistry and nanotechnology., Chichester: John Wiley and Sons, 2015, 412-433, ISBN 978-1-118-69686-6, 10.1002/9781118696880.ch5
3. Rowińska-Żyrek M., Valensin D., Łuczowski M., Kozłowski H., Prion disease / RSC Metallobiology Series. No. 1, Mechanisms and metal involvement in neurodegenerative diseases., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, 118-162, ISBN 978-1-84973-588-9, 10.1039/9781849735896-00118
4. Kozłowski H., Witkowska D., Rowińska-Żyrek M., Chemia nieorganiczna i medycyna / Misja nauk chemicznych., Poznań: Wydawnictwo Nauka i Innowacje, 2011, 141-151, ISBN 978-83-934106-0-6

5.4. Prace redakcyjne:

1. Zamble D., Rowińska-Żyrek M., Kozłowski H., The biological chemistry of nickel., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017, 1-380, ISBN 978-1-78262-498-1, 10.1039/9781788010580



2. Kozłowski H., Gumienna-Kontecka E., Rowińska-Żyrek M., Journal of Inorganic Biochemistry : special issue : ISMEC 2015 Wrocław., Amsterdam: Elsevier, 2016, 1-374

5.5 Podsumowanie działalności naukowej

Problematyką, która bardzo intensywnie zajmowałam się podczas swojej pracy naukowej była chemia bionieorganiczna rybozymów.^{41, 42} W szczególności skupiałam się na korelacji między zdolnością wiązania jonów Mg^{2+} , strukturą i funkcją pierwszego ze znanych ludzkich rybozymów, CPEB3. Rozwiązaliśmy jego częściową strukturę⁴³ i pokazaliśmy rolę magnezu(II) w tworzeniu struktury trzeciorzędowej katalitycznie aktywnego rybozymu – wskazaliśmy precyzyjne miejsca wiązania Mg^{2+} i określiliśmy charakter koordynacji (zewnętrz- i wewnętrzzsferowy).⁴⁴ Pokazaliśmy, że ok. 85% trzeciorzędowej struktury CPEB3 tworzy się bez udziału Mg^{2+} , a jedynie w obecności jednododatnich jonów metali (Na^+ , K^+). Milimolowe stężenia Mg^{2+} sprzyjają bardziej zwartemu fałdowaniu się rybozymu i prowadzą do tworzenia dodatkowych struktur w jego rdzeniu, który zawiera wewnętrzny mały pseudowęzeł i miejsce aktywne.⁴⁴ Pokazaliśmy również podobieństwa struktury CBEP3 do struktury rybozymu HDV (Hepatitis Delta Virus), sugerując wspólnego w ewolucji przodka.⁴⁵

Tematyką zajmowałam się w ramach mojego stażu podoktorskiego, finansowanego przez stypendium Marie Curie IEF i Sciex-NMS (szczegóły w p. 3 autoreferatu). Ze strony metodologicznej, staż podoktorski pozwolił mi na opanowanie techniki NMR, którą obecnie wykorzystuję do rozwiązywania struktur biomolekuł.

W ciągu ostatnich lat zajmowałam się również szeroko pojętą chemią koordynacyjną białek z sekwencjami typu 'polyXaa'⁴⁶ (w szczególności polyHis), pokazując wpływ ilości imidazoli i ich rozmieszczenia w sekwencji na efektywność koordynacyjną.^{47, 48} Szczególnie ciekawym przypadkiem okazały się być sekwencje polihistydylowe w peptydach z jadu węża; udowodniliśmy, że liczba histydyn nie koreluje ze stabilnością kompleksów tworzonych przez zawierające je peptydy z jonami Cu^{2+} , Zn^{2+} czy Ni^{2+} ; pokazaliśmy też, że koordynacja Cu^{2+} indukuje tworzenie się struktury α -helikalnej.^{49, 50}

W obszarze moich zainteresowań znajdowała się również rola metali w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. W pracy przeglądowej⁵¹ zostały podsumowane dotychczasowe informacje o roli metali w agregacji białek uwikłanych w choroby neurodegeneracyjne; opisane zostały znane nam dotąd terapie (albo podsumowane zostały próby znalezienia takowych).

W ostatnich miesiącach zajęliśmy się problemem wpływu jonów Zn^{2+} i Cu^{2+} na strukturę i aktywność biologiczną peptydów przeciwdrobnoustrojowych.⁵² Kilka tygodni temu, nasz pomysł został doceniony przez NCN i otrzymał finansowanie w ramach projektu SONATA-BIS.

6. Staże zagraniczne, kierowanie projektami, nagrody, udział w konferencjach

6.1. Staże zagraniczne

Po doktoracie:

- | | |
|--------------------|--|
| 06. 2012 – 03.2015 | staż podoktorski na Uniwersytecie w Zurychu, Instytut Chemii Nieorganicznej, finansowany przez Marie Curie Intra-European Fellowship i stypendium Sciex-NMS; w ramach projektu wskazałam rolę jonów metali i rozwiązałam pierwszą strukturę ludzkiego rybozymu – CPEB3 |
|--------------------|--|

07.2014 Intensywny kurs 'EMBO Paramagnetic NMR summer school', Florencja, Włochy

Przed uzyskaniem tytułu doktora:

04.2009 – 05.2009, 12.2009 oraz 12.2010 – pomiary NMR na Uniwersytecie w Sienie – pozwoliły wskazać miejsca wiążące bizmut w peptydach

07.2007 - 11.2007- staż w firmie Thermometric AB i (dodatkowe badania w BioVitrum AB) (Sztokholm, Szwecja); celem projektu było opracowanie formuły emulsji – wypełniacza do szczepionek; badania kalorymetryczne (ITC)

6.2. Realizowane projekty badawcze

Po doktoracie:

- NCN SONATA BIS 7 ('Oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowych peptydów z jonami metali - zrozumienie relacji między chemią koordynacyjną, strukturą, termodynamiką a sposobem działania'), 2018-2023, kierownik projektu
- NCN MAESTRO 9 ('Metalofory - zrozumienie (i wizualizacja) transportu metali w patogenach, by pomóc gospodarzowi oszukać najeźdźców'), 2018-2023, wykonawca projektu
- NCN SONATA 7 ('Zrozumienie oddziaływań cynku z cynkoforami i transporterami Zn(II) w grzybowych patogenach', nr umowy UMO-2014/13/D/STS/02868), 2015-2018, kierownik projektu
- Grant dla młodych doktorów z dotacji celowej MNiSW, ('Selektywność domen triad polihistydylowych zewnątrzkomórkowych białek dwoinki zapalenia płuc względem jonów cynku(II) i niklu(II)'), 1.07.2017-30.09.2018, nr 0420/2655/17, kierownik projektu
- KNOW 12 ('Zrozumienie selektywności stafylopiny, metaloforu z gronkowca złocistego'), 1.01-31.12.2017, kierownik projektu
- Grant dla młodych doktorów z dotacji celowej MNiSW ('Rola jonów Zn(II) i Cu(II) w tworzeniu złogów amyloidowych amyliny i pramlintydu', 1.06.2015-30.09.2016, nr 1493/M/WCH/15, kierownik projektu
- Marie Curie Intra-European Fellowship, półtoraroczny staż podoktorski HumanRib, 329700 ('Metal ion binding - structure - function relations of the human CPEB3 ribozyme'), PEOPLE, Marie Curie Intra European Fellowship, FP7-MC-IEF, Project number: 329700 (Instytut Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet w Zurychu, 1.10.2013-30.03.2015)
- Sciex-NMS, roczny staż podoktorski (Instytut Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet w Zurychu, 1.09.2012-30.09.2013)

Przed uzyskaniem tytułu doktora:

- Grant promotorski nr KBN N N204 183340, 2011

6.3. Nagrody uzyskane za działalność naukową

- Stypendium Ministra dla Wybitnych Młodych Naukowców (2015-2018)
- Nagroda rektora Uniwersytetu Wrocławskiego, 2016
- Nagroda za najlepsze wystąpienie ustne na 12th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC12), Kanton, Chiny, 3-6.12.2013
- Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (edycja 2013)
- Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (edycja 2012)
- Stypendium wyjazdowe Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (miesięczny pobyt na Uniwersytecie w Zurychu, czerwiec 2012)
- Stypendium Europejskiego Funduszu Społecznego dla młodych doktorów w ramach projektu 'Rozwój potencjału i oferty edukacyjnej Uniwersytetu Wrocławskiego szansą zwiększenia konkurencyjności Uczelni' (04-10.2012).
- Nagroda rektora Uniwersytetu Wrocławskiego, 2012
- Stypendium Europejskiego Funduszu Społecznego dla doktorantów w ramach projektu 'Rozwój potencjału i oferty edukacyjnej Uniwersytetu Wrocławskiego szansą zwiększenia konkurencyjności Uczelni' (03-08.2011).
- Imienne Stypendium Samorządu Wrocławia, 2011.
- Stypendia konferencyjne, m. in. Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na udział w konferencji ICBIC15 w Vancouver, Kanada, 7-12.08.2011, Stypendium ESF na udział w konferencji 4ECCLS, Budapeszt, Węgry, 31.08-3.09.2011, stypendium wyjazdowe 'FEBS Youth Travel Grant' na udział w kursie chemii bionieorganicznej 'FEBS Advanced Course' w Louvain-la-Neuve, Belgia, 15-22.05.2011
- Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej, 2008

6.4. Udział w międzynarodowych konferencjach naukowych:

Po uzyskaniu tytułu doktora:

Ponad 20 ustnych prezentacji na międzynarodowych konferencjach, m. in.:

- **wykład keynote** na 18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC18, największa konferencja w chemii bionieorganicznej), 31.07-4.08.2017, Florianopolis, Brazylia ('Metal homeostasis in bacteria and fungi – interesting chemistry and possible targets for novel therapies')

- **wykłady na zaproszenie**, m.in.:

- (i) 24th Polish Peptide Symposium, 3-7.09.2017, Jastrzębia Góra, Polska ('Peptide-based zincphores as possible targets for novel antifungal strategies')
- (ii) 60TH PTChem meeting, 17-21.09.2017, Wrocław, Polska ('Metal ion homeostasis – a tug of war between pathogen and host')
- (iii) 16th IUPAC International Symposium on MacroMolecular Complexes (MMC-16), 10-14.08.2015, Wrocław, Polska ('The complicated relationship between metal ions and RNA')
- (iv) Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC 7), 30.11 – 5.12.2014, Gold Coast, Australia ('Analogy of metal binding sites in CPEB3 and HDV ribozymes')

- inne **wystąpienia ustne**, m.in.:

- (v) 12th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC12), Kanton, Chiny, 3-6.12.2013 ('CPEB3 structure and metal binding sites') – nagroda za najlepsze wystąpienie ustne
- (vi) Bioinorganic Chemistry Conference, Lanzarote, Spain. 19-22.02.2013 ('CPEB3 ribozyme – an evolutionary relict?')
- (vii) Sympozjum Biochemii Nieorganicznej (ISIB13), Karpacz 4.9.09.2015 ('Zincophores – a clever way to trick the host')
- (viii) ISMEC 2015, 24-28.06.2015, Wrocław ('Metal ions – the key to the RNA world')

W trakcie studiów doktoranckich:

- M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, H. Kozłowski 'Bismuth displaces nickel from its binding sites', 4ECCLS, 31.08-3.09.2011, wystąpienie ustne, Budapeszt, Węgry
- M. Rowińska-Żyrek, H. Kozłowski 'Cysteine rich sequences in H. pylori's nickel chaperones-promising target sites for inhibitory bismuth ions', poster, ICBIC15, Vancouver, Kanada, 7-12.08.2011
- M. Rowińska-Żyrek, H. Kozłowski 'Zinc and cadmium- can they displace nickel from it's chaperones?', wystąpienie ustne, WROBIC Workshop, Karpacz, 27.06 – 29.06.2011
- M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, H. Kozłowski 'Therapeutic Bi(III) binds to cysteine rich sequences in H. pylori's nickel chaperones', wystąpienie ustne, 3rd International Symposium on Metallomics, Münster, Germany, 15 – 18.06.2011
- M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, H. Kozłowski 'The complicated relationship between bismuth and Helicobacter pylori's nickel chaperones', wystąpienie ustne, PhoBia Annual Nanophotonics International Conference, Wrocław, 25-27.05.2011
- M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, H. Kozłowski 'Anti- ulcer Bi(III) Competes with Native Ni(II) in Binding to Helicobacter pylori's Chaperones'; wystąpienie ustne na XI International Symposium on Inorganic Biochemistry, Challenge for all Generations, Kudowa Zdrój, Polska, 4 – 8.09.2010

- M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, D. Valensin, H. Kozłowski 'Bismuth anti- ulcer drugs- possible inhibitors of Helicobacter pylori's nickel chaperones', wystąpienie ustne, PhoBia Annual Nanophotonics International Conference, Wrocław, 28-30.04.2010;
- M. Rowińska-Żyrek, H. Kozłowski 'Związki bizmutowe w terapii wrzodów żołądka', wystąpienie ustne, Prezentacje młodych naukowców, Wrocławskie Forum Biologii Eksperymentalnej, Wrocław, 27.01.2010.
- M. Rowińska-Żyrek, D. Valensin, L. Szyrwił, H. Kozłowski 'Interactions of Bi(III) with proteins from Helicobacter pylori – possible binding sites', wystąpienie ustne, WROBIC Workshop, Szklarska Poręba, 22.06 – 24.06.2009.
- M. Rowińska-Żyrek, E. Gumienna-Kontecka, Z. Szewczuk, I.O. Fritsky, H. Kozłowski, 'Copper (II)-aminohydroxamate Ternary Complexes Evidenced by Mass Spectrometry', poster, EUROBIC9, Wrocław, 2-6.09.2008
- M. Żyrek, E. Gumienna-Kontecka, H. Kozłowski, 'Copper (II) and Gadolinium (III) aminohydroxamate complexes as new diagnostic tools' 8.05.2008 – wystąpienie ustne na III International Student Chapters Meeting, Wrocław
- M. Żyrek, H. Kozłowski, 'Chelating copper ions by aminohydroxamic acids as a potential way to remove them from the body', - VI Konferencja Naukowa Studentów, Wrocław, 3-6.05.2008, wystąpienie ustne uzyskało Nagrodę Rektora Politechniki Wrocławskiej.

M. Rowińska-Żyrek

8. Literatura

- ¹ European Commission, AMR Factsheet, 2017, (https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_factsheet_en.pdf, dostęp 1.03.2018)
- ² Coates A., Halls G., Hu Y., Brit. J. Pharm., 2011, 163, 184.
- ³ Denningd., Bromley M., Science, 2015, 347, 1414.
- ⁴ Vasak M., Hasler D.W., Curr. Opin. Chem. Biol., 2000, 4, 177.
- ⁵ Hwang C.S., Rhie G., Oh J.H., Huh W.K., Yim H.S., Kang S.O., Microbiology, 2002, 148, 3705.
- ⁶ Yike I., Mycopathologia, 2011, 171, 299.
- ⁷ Edwards D.R., Handsley M., Pennington C.J., Mol. Aspects Med., 2008, 29, 258.
- ⁸ Kim Y., Cunningham M., Mire J., Tesar C., Sacchettini J., Joachimiak A., Faseb J., 2013, 27, 1917.
- ⁹ Boer J.L., Mulrooney S., Hausinger R., Arch. Biochem. Biophys., 2014, 544, 142.
- ¹⁰ MacPherson S., Larochelle M., Turcotte B., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2006, 70, 583.
- ¹¹ Citiulo F., Jacobsen I.D., Miramón P., Schild L., Brunke S., Zipfel P., Brock M., Hube B., Wilson D., PLoS pathogens, 2012, 8: e1002777
- ¹² Outten C.E., O'Halloran T.V., Science, 2001, 292, 2488.
- ¹³ Zakikhany K., Naglik J.R., Schmidt-Westhausen A., Holland G., Schaller M., Cell Microbiol, 2010, 9, 2938.
- ¹⁴ Karlin S., Zhu Z.Y., Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94, 14231.
- ¹⁵ Braymer J.J., Giedroc D.P., Curr Opin Chem Biol., 2014, 19, 59.
- ¹⁶ Kelley LA., Mezulis S., Yates C., Wass M., Sternberg M., Nature Protocols, 2015, 10, 845.
- ¹⁷ Amich J., Vicentefranqueira R., Leal F., Calera J.A., Eukaryot Cell, 2010, 9, 424–437.
- ¹⁸ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- ¹⁹ Wang L, Liu Q, Chen JC, Cui YX, Zhou B, Chen YX, Biol Chem. 2012, 393, 641.
- ²⁰ Wang G., Pharmaceuticals, 2014, 7, 545.
- ²¹ Hoppener JW., Lips C., Cell Biol., 2006, 38, 726.
- ²² Ono K., Condrón MM., Teplow DB., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2009, 106, 14745
- ²³ Brender J., Salamekh S. Ramamoorthy A., Acc. Chem. Res., 2012, 45, 454
- ²⁴ Lee E., Singh S., Legesse L., Ahmad S., Karnaukhova E., Donaldson RP., Jeremic AM., Phys.Chem. Chem. Phys., 2013, 15, 12558

-
- ²⁵ Sinopoli A., Magrì A., Milardi D., Pappalardo M., Pucci P., Flagiello A., Titman JJ., Nicoletti VG., Caruso G., Pappalardo G., Grasso G., *Metallomics* 2014, 6, 1841
- ²⁶ Wang L., Liu Q., Chen JC., Cui YX., Zhou B., Chen YX., *Biol Chem.* 2012, 393, 641.
- ²⁷ Roberts A., Leighton B., Todd J., Cockburn D., Schofield P., Sutton R., Holt S. Boyd Y., Day A., Foot E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 9662.
- ²⁸ Tomasello M., Sinopoli A., Pappalardo G., *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 81, 442.
- ²⁹ Brender J., Lee E., Cavitt M., Gafni A., Steel DJ. Ramamoorthy A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6424.
- ³⁰ Nanga R., Brender J., Jiadi Xu J., Veglia G., Ramamoorthy A., *Biochemistry*, 2008, 47, 12680.
- ³¹ Brender J., Diirr U., Heyl D., Budarapu, M., Ramamoorthy A., *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1768, 2026.
- ³² Rowińska-Żyrek M., Salerno M., Kozłowski H., *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 284, 298.
- ³³ Xia W., Li H., Sze K., Sun H., *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 10031.
- ³⁴ Sydor A., Zamble D., *Met. Ions Life Sci.*, 2013, 12, 375.
- ³⁵ Rodionov D., Hebbeln P., Gelfand M., Eitinger T., *J. Bacteriol.*, 2006, 188, 2520.
- ³⁶ Eitinger T., Rodionov DA., Grote M., Schneider EW., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, 35, 3.
- ³⁷ Brito B., Prieto RI., Cabrera E., Mandrand-Berthelot M., Imperial J., Ruiz-Argüeso T., Palacios JM., *J. Bacteriol.*, 2010, 192, 925.
- ³⁸ Albareda M., Rodrigue A., Brito B., Ruiz-Argüeso T., Imperial J., Mandrand-Berthelot M., Palacios J., *Metallomics*, 2015, 7, 691.
- ³⁹ McGrath S., Chaudri AM., Giller K., *J. Industr. Microbiol.*, 1995, 14, 94.
- ⁴⁰ Gorska A., Sloderbach A., Marszall M., *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014, 35, 442.
- ⁴¹ Musiari A., Rowińska-Żyrek M., Gallo S., Sigel RKO., *Metal ions in ribozymes and riboswitches/DNA in supramolecular chemistry and nanotechnology*, Chichester: John Wiley and Sons, 2015, 412.
- ⁴² Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel RKO., *Z. Anorg. Allg. Chemie*, 2013, 639, 1313.
- ⁴³ Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel RKO., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014, 19, 903.
- ⁴⁴ Rowińska-Żyrek M., Skilandat M., Sigel RKO., *RNA - A Publication of the RNA Society*, 2016, 22, 750.
- ⁴⁵ Jeng KS., Daniel A., Lai MM., *J Virol.*, 1996, 70, 2403.
- ⁴⁶ Wątył J., Hecel A., Kołkowska P., Kozłowski H., Rowińska-Żyrek M., *Curr. Med. Chem.*, 2018, 25, 22.
- ⁴⁷ Wątył J., Hecel A., Rowińska-Żyrek M., Kozłowski H., *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 472, 119.
- ⁴⁸ Hecel A., Wątył J., Rowińska-Żyrek M., Świątek-Kozłowska J., Kozłowski H., 2018, 23, 81.
- ⁴⁹ Pontecchiani F., Simonovsky E., Wieczorek R., Barbosa N., Rowińska-Żyrek M., Potocki S., Remelli M., Miller Y., Kozłowski H., *Dalton Trans.*, 2014, 43, 16680.
- ⁵⁰ Remelli M., Guerrini R., Pontecchiani F., Potocki S., Rowińska-Żyrek M., Watly J., Kozłowski H., *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 472, 149.
- ⁵¹ Rowińska-Żyrek M., Salerno M., Kozłowski H., *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 284, 298.
- ⁵² Łoboda D., Kozłowski H., Rowińska-Żyrek M., *New J. Chem.*, 2018, DOI: 10.1039/C7NJ04709F.