

# **Kompleksy ternarne sensorów fluorescencyjnych dla jonów cynkowych**

**Ilona Marszałek, Mgr inż.**

Moja praca doktorska opisuje popularne czujniki - FluoZin-3, Zinpyr-1 i Zinbo-5 pod względem ich siły wiązania jonu Zn(II) oraz zdolności do tworzenia kompleksów trójskładnikowych z ligandami o niskiej masie cząsteczkowej, naturalnie występującymi w komórce i płynach pozakomórkowych.

Jony Zn(II) uczestniczą w prawie wszystkich procesach wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych. Badania bioinformatyczne wykazały, że prawie jedna dziesiąta ludzkich białek jest potencjalnie zaangażowana w wiązanie Zn(II). Dostępność cynku w komórce jest ściśle kontrolowana ze względu na udział tych jonów w metabolizmie, ekspresji genów, naprawie DNA i przekazywaniu sygnałów. Zaburzenia w fizjologii cynku są związane z podatnością na infekcje, nowotwory, cukrzycę, udary i choroby neurodegeneracyjne. Dlatego odpowiednia równowaga Zn(II) jest kluczem do zdrowego organizmu.

Pula wewnątrzkomórkowych jonów Zn(II) jest na poziomie milimolarnym. Większość tej puli jest związana z białkami. Reszta jest definiowana jako wymienialna (lub wolna), ponieważ jest łatwo dostępna dla białek, ale nie jest związana z białkami. Wymienialne jony Zn(II) są niezbędne do aktywacji lub hamowania wielu procesów biologicznych. W praktyce stężenie wewnątrzkomórkowych jonów Zn(II) określa się za pomocą czujników fluorescencyjnych specyficznych dla jonów Zn(II). W zależności od zastosowanego czujnika wiele grup badawczych wyznaczało stężenie wymienialnego cynku w zakresie od kilku do kilkuset pikomoli na litr, co jest dramatycznie niskie w porównaniu z całkowitym stężeniem Zn(II) w większości komórek eukariotycznych. Dlatego pomiar wymienialnego cynku

wewnątrz komórki jest bardzo trudny i pożądane jest sprawdzenie działania komercyjnie dostępnych czujników.

Hipotezą mojego projektu było to, że sygnały wytwarzane przez niektóre czujniki cynku są zniekształcone z powodu obecności związków / ligandów o niskiej masie cząsteczkowej (LMWL). Możliwe, że związki te konkurują z czujnikami o jony cynku i jednocześnie są zdolne do tworzenia z nimi kompleksów trójskładnikowych. Celem moich badań było zbadanie, które metabolity tworzą kompleksy i jak modulują sygnały fluorescencyjne czujników.

Jako potencjalnie istotne ligandy o niskiej masie cząsteczkowej (LMWL) wybrano cytrynian, octan, ATP, histydynę, glicynę, kwas glutaminowy oraz zredukowany i utleniony glutation. Dodatkowo zbadano również fosforan nieorganiczny, który jest składnikiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych układów buforujących. Metabolity te występują w znaczących stężeniach w warunkach fizjologicznych. Ponadto, ich stężenia są bardzo zmienne ze względu na ich udział w procesach metabolicznych, np. ATP, cytrynian i glutaminian oscylują wraz z cyklem Krebsa, podczas gdy na poziom glutationu wpływa stres komórkowy.

Eksperymenty wykazały, że współzawodnictwo i tworzenie trójskładnikowych kompleksów z LMWL silnie wpływają na fluorescencję Zn(Sensor). Sygnał fluorescencyjny Zn(FluoZin-3) może być wygaszony nawet o osiemdziesiąt procent przy stężeniu fizjologicznym mieszaniny LMWL. Dodatkowo czujnik FluoZin-3 wolny i skompleksowany z Zn(II) został dokładnie zbadany w szerokim zakresie pH. Łącznie określono eksperymentalnie osiem wartości  $pK_a$  oraz wyznaczono wartość  $^cK_d$  kompleksu Zn(FluoZin-3) w pH 7,4 równą  $9,1 \pm 0,4$  nM ( $-\log ^cK_d = 8,04$ ).

Moje badania eksperymentalne zaowocowały zestawem stałych wiązania kompleksów trójskładnikowych Zn(Sensor)(LMWL). Wyniki pokazały, że FluoZin-3 tworzy najsilniejszy kompleks trójskładnikowy ze zredukowanym glutationem z  $K_{tern}$  równą  $2,8 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>. Inne

testowane czujniki: ligand podwójny - Zinpyr-1 i ratiometryczny – Zinbo-5 tworzą najsilniejsze trójskładnikowe kompleksy z kwasem glutaminowym o  $K_{\text{tern}}$  odpowiednio  $4,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  i  $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Ponadto uzyskane stałe trójskładnikowe zastosowano w symulacjach numerycznych rozkładów Zn(II) przy stężeniach fizjologicznych wybranych LMWL. Symulacje wykazały, że Zn(FluoZin-3)(GSH) był dominującą frakcją dla układu Zn(II)/FluoZin-3 (ponad 47% wymienialnego Zn(II)); Zn(Zinpyr-1)(Glu) dominującą frakcją dla Zn(II)/Zinpyr-1 (ponad 96% wymienialnego Zn(II)); oraz Zn(Zinbo-5)(Glu) – najliczniejszy (ponad 40%) w tych symulacjach.

Metody zastosowane w mojej pracy obejmowały spektrofotometrię, spektrometrię mas, dynamiczne rozpraszanie światła i potencjometrię. Wymagany sprzęt był dostępny w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Dodatkowy eksperyment przeprowadzono na spektrometrze NMR w Centrum NanoBioMedical Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Podsumowując, moje eksperymenty wykazały, że obecność wewnątrzkomórkowych ligandów o niskiej masie cząsteczkowej może znacząco wpływać na sygnał fluorescencyjny komercyjnych czujników cynku. Potwierdziłam obecność trójskładnikowych kompleksów danych czujników z cynkiem oraz z niektórymi LMWL. Ponadto symulacje wskazują, że w warunkach fizjologicznych możliwe jest, że czujniki są w stanie raportować wolne jony  $\text{Zn}^{2+}$  oraz Zn(II) skompleksowany jednocześnie z LMWL. Wyniki moich badań zostały uzupełnione zestawem stałych trwałości. Dzięki temu możliwe jest uzyskiwanie rzeczywistych stężeń jonów  $\text{Zn}^{2+}$  za pomocą komercyjnie dostępnych czujników. Wyniki w postaci plakatów zostały zaprezentowane na trzech konferencjach międzynarodowych. Najważniejsze ustalenia zostały szczegółowo opisane w trzech opublikowanych artykułach naukowych.