

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Tat'ána Doležalová

Metabolismus mědi u patogenních eukaryotických mikroorganismů
Copper metabolism in pathogenic eukaryotic microorganisms

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych poděkovala především školiteli RNDr. Róbertu Šuťákovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, a za cenné rady k psaní a úpravě tohoto textu. Dále bych chtěla poděkovat týmu parazitologické laboratoře Příjmu a vnitrobuněčného metabolismu kovů za všestrannou pomoc a vstřícnost. Nakonec bych ještě ráda poděkovala rodině, Honzovi a přátelům, kteří mi vždy byli podporou.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2021

Podpis

Abstrakt

Měď je esenciální prvek pro takřka všechny živé organismy. Její zásadní role v metabolismu je dána především redoxními vlastnostmi tohoto kovu. Díky tomu je to cenný kofaktor mnoha enzymů, které se podílejí na energetickém metabolismu buňky, ale také na detoxifikaci reaktivních forem kyslíku. Přesto měď může při příliš vysoké koncentraci buňkám spíše uškodit. Její toxické působení se projevuje především tvorbou hydroxylových radikálů, které narušují buněčné struktury. Dochází i k poškození Fe-S center, která jsou nepostradatelná pro mnoho enzymů. Aby nedošlo k projevům toxicity, musí každá buňka balancovat na hraně mezi přiměřeným příjmem a regulovaným výdejem mědi. Řada specializovaných přenašečů a ATPáz slouží výhradně pro transport mědi. Stejně tak najdeme metallochaperony, které vážou potenciálně toxické kovy a transportují je k cílovému proteinu. Případně je zajímavý úděl metallothioneinů, které vyvazují cytosolickou měď. Pochopení udržování homeostázy mědi u patogenních organismů přináší mnoho zajímavých možností pro lepší cílenou léčbu onemocnění. Například nemoci způsobené oportunistickými houbami jako je *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* nebo *Cryptococcus neoformans* mají významný podíl na úmrtích imunodeficientních pacientů. Jelikož jsou některé dráhy metabolismu mědi u eukaryot homologické, popsání homeostázy tohoto kovu u parazitických hub je přínosné i pro rozklíčování její homeostázy u dalších parazitických organismů. Potenciální využití ionoforů mědi, které zvyšují její intracelulární koncentraci, by tak mohlo být zajímavým novým způsobem antifungální a antiparazitické léčby.

Klíčová slova: homeostáze mědi, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, měď

Abstract

Copper is an essential trace element for almost every living organism. Its fundamental role in metabolism is caused by the redox properties of this metal. Owing to that it is a vital cofactor of many enzymes participating in cell energy metabolism as well as in the detoxification of reactive oxygen species. Nevertheless, too high copper concentration can damage the cells. The toxic effect of copper is manifested usually as the production of hydroxyl radicals distorting the cell structures. It can also damage Fe-S clusters that are essential for many enzymes. To avoid toxic manifestations the cell must balance on the edge of proper copper import and regulated export. Many specialized transporters and ATPases serve exclusively for copper transport. There are also known metallochaperones binding the potentially toxic metals and transporting them to the target protein. An interesting role in metabolism is played by the metallothioneins that bind cytosolic copper. Understanding copper homeostasis in pathogenic organisms reveals many interesting possibilities for better targeted treatment. For example, diseases caused by opportunistic fungi like *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* or *Cryptococcus neoformans* contribute significantly to the deaths of immunodeficient patients. Some copper metabolism pathways are homologous in eukaryotes and that is why the description of copper homeostasis in parasitic fungi is useful to resolve the copper homeostasis in other parasitic organisms. The potential use of copper ionophores increasing the intracellular copper concentration can thus represent a new type of antifungal and antiparasitic treatment.

Key words: copper homeostasis, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, copper

Seznam zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity
Als1, Als3	aglutininu podobný protein 1, 3
ATOX1, Atx1, Hah1	transportér mědi do Golgiho aparátu
ATP7	lidská ATPáza P-typu transportující měď
BGC	biosyntetický genetický klastr
Ccc2	„Ca ²⁺ -sensitive cross complementer 2“ (transportér mědi)
CCO	cytochrom c oxidáza
CCS	chaperon mědi pro superoxid dismutázu
CopA, CtpV, Crp	exportní ATPáza P-typu pro měď
COX17	chaperon mědi pro cytochrom c oxidázu
Crd2, Cup1, Cmt1,2	metallothioneiny mědi
Ctr1-4	přenašeče mědi
Cu/Zn-SOD	superoxid dismutáza
CueO	„multicopper“ oxidáza
CueR	transkripční regulátor
Cuf1, Mac1	transkripční faktor závislý na mědi
CuRE	měď-responzivní elementy
CusC	protein kationtového efluxního systému
CusS	senzorická histidin-kináza
CusR	transkripční regulační protein
Fet3	„multicopper“ oxidáza pro transport železa
Fre1, Fre2	reduktáza železa a mědi
GXM	glukuronoxylomannan
LAC1,2	lakáza 1,2
ROS	reaktivní formy kyslíku
TM	transmembránová doména
UV	ultrafialové záření
ZPT	zinkový pyrithion

Obsah

Úvod	8
1. Homeostáza mědi	8
1.1. Metallochaperony	9
1.1.1. Atx1 (Antioxidační protein1).....	9
1.1.2. CCS (chaperon mědi pro superoxid dismutázu)	10
1.1.3. COX17 (chaperon mědi pro cytochrom c oxidázu)	10
1.2. Metallothioneiny.....	11
1.3. Poruchy homeostázy mědi.....	12
1.3.1. Toxicita mědi	12
1.3.2. Wilsonova choroba	13
1.3.3. Menkeho choroba.....	13
2. Metabolismus mědi u bakterií	14
2.1. Systémy tolerance mědi u <i>Escherichia coli</i>	14
2.2. Mechanismy tolerance mědi u patogenních prokaryot.....	15
2.2.1. Export mědi přes cytoplazmatickou membránu.....	15
2.2.2. Sekvestrace mědi	15
2.2.3. Oxidace mědi pomocí „multi-copper“ oxidáz	16
3. Parazitické houby	16
3.1. <i>Candida albicans</i>	16
3.2. <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
3.3. <i>Cryptococcus neoformans</i>	18
3.4. Společné mechanismy homeostázy mědi	19
3.5. Mechanismy virulence patogenních hub	23
3.5.1. <i>Candida albicans</i>	23
3.5.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
3.5.3. <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
4. Metabolismus mědi u dalších parazitů	24
5. Metody využití mědi v léčbě parazitárních onemocnění.....	25
6. Závěr.....	26
Literatura	27

Úvod

Měď je jedním z esenciálních prvků každého organismu. Nehledě na její roli uvnitř organismu, má měď mnohé vhodné fyzikální vlastnosti, díky kterým je už od pravěku lidmi využívána. V dnešní době je díky svým antimikrobiálním účinkům používána jako materiál pro různé povrchy v lékařských zařízeních, kdy prokazatelně snižuje přenos patogenů (Colin et al., 2020). Uvnitř organismu se vyskytuje jako měďný (Cu^+) nebo měďnatý (Cu^{2+}) iont a samovolně mezi těmito oxidovanými a redukovanými formami přechází. Homeostáza mědi ale podléhá přísné regulaci, aby se neprojevil její toxické vlastnosti. Ionty mědi se mohou vázat na lipidy a proteiny a způsobit tak nežádoucí auto-oxidaci. Nezastupitelnou roli má měď v metabolismu jako kofaktor enzymů účastnících se energetického metabolismu, homeostázy železa, odstraňování volných radikálů a v mnohých dalších biochemických reakcích (Linder & Hazegh-Azam, 1996 ; Scheiber et al., 2013).

Význam mědi pozorujeme i v reakcích imunitního systému, kdy celková deficiencie mědi snižuje funkčnost všech leukocytů. Ale imunitní systém měď využívá i ve svůj prospěch, kdy se během infekce cíleně zvyšuje koncentrace mědi v krevním séru. Jelikož je měď pro patogeny toxická i esenciální, vyvinuly si mechanismy, díky kterým dokážou zvýšenou koncentraci přežít a využít (Percival, 1998). Makrofágy, tkáňové fagocytické buňky, uzavírají patogeny ve fagolyzozomu, kde je patogen vystaven reaktivním formám kyslíku (ROS), proteázám a jiným látkám, které mají patogen zneškodnit. Při infekci *Mycobacterium tuberculosis* je ve fagolyzozomu zvýšená i koncentrace mědi, kdy se využívá jejího toxického účinku (Wagner et al., 2005). Podobně tomu nastává u infekcí patogenními houbami a dalšími patogeny (Besold et al., 2016).

Popis a porozumění metabolismu mědi u parazitických organismů může otevřít nové možnosti léčby. Dosud známé jsou především metabolické pochody u parazitických hub, které jsou zmíněny v práci níže. Tyto poznatky snad bude možné aplikovat na více druhů parazitických organismů a přispět tak k boji proti mnohým parazitárním onemocněním.

1. Homeostáza mědi

V buněčném prostředí se měď téměř nikdy nevyskytuje volně. Import i export v eukaryotických buňkách zajišťuje vysokoafinitní přenašeč pro měď Ctr1, případně Ctr3. Tyto přenašeče se skládají ze tří identických podjednotek. Každá podjednotka má extracelulární i intracelulární část, které oddělují tři transmembránové helixy TM1-3. Přenašeč Ctr1 propouští

Cu⁺ ionty bez nutnosti dodávat energii. Mechanismus transportu není jasně rozluštěn, během přenosu není pozorována žádná konformační změna. Jeho selektivita je dána atomy síry v triádách methioninů v TM2 v centrální kavitě přenašeče, která propouští Cu⁺ ionty na základě jejich elektrického náboje (Ren et al., 2019).

Jakmile se měď dostane do cytosolu, je ihned zachycena metallochaperony. Jedná se o rozpustné proteiny, které vážou měď a dopraví ji na konkrétní místo v buňce (Rosenzweig, 2001). Měď nejčastěji putuje do mitochondrií, kam jsou často směřovány i další kovy (Baker et al., 2017). Matrix mitochondrie obsahuje „pool“ mědi, který je tvořen nízkomolekulárními anionty. Jeho složení není přesně známé a měď v něm není vázaná na žádný protein. Tento „pool“ je schopný reagovat na koncentraci mědi v cytosolu (Cobine et al., 2004).

1.1. Metallochaperony

Jedná se o solubilní proteiny, které díky svým vlastnostem dokážou navázat volný iont Cu⁺ a přenést ho na cílené místo. V cytosolu buňky je velmi nízká koncentrace mědi, přibližně 10⁻¹⁸ M, tedy méně než jeden volný iont na buňku (Rae et al., 1999). Přenos je přísně regulován a kontrolován, aby nedocházelo k projevům toxicity.

1.1.1. Atx1 (antioxidační protein1)

Atx1 je metallochaperon, který nalezneme v *Saccharomyces cerevisiae*, u lidí se jeho homolog nazývá Hah1, případně ATOX1 (Klomp et al., 1997). Stejně tak byl objeven u *Arabidopsis thaliana* jeho homolog nazvaný rovněž Atx1 (Shin et al., 2012).

Samotný Atx1 byl objeven původně jako supresor oxidativního stresu a až později byla jeho funkce přesněji objasněna. Jedná se o malý solubilní protein složený ze 72 aminokyselin. Má β_αβ_αβ strukturu, kdy jsou na jedné straně molekuly dva helixy a na straně druhé čtyři skládané listy. V prvním helixu najdeme motiv z aminokyselin MXCXXC (Rosenzweig et al., 1999). Důležitou roli hraje lysin (Lys⁶⁵), který spolu s cysteiny tvoří vazebné místo pro měď. Tato struktura je evolučně konzervována i u rostlin a savců (Portnoy et al., 1999).

V případě *Saccharomyces cerevisiae* metallochaperon Atx1 váže měď v cytosolu ve formě Cu⁺ a předává ji na ATPázu P-typu Ccc2 v Golgiho aparátu. Ccc2 neboli „Ca²⁺ sensitive cross-complementer“ sdílí s Atx1 podobný strukturní motiv, který umožňuje přímé předání iontů mědi (Huffman & O'Halloran, 2000 ; Arnesano et al., 2002). Měď je ATPázou vkládána do váčků a sekretorickou dráhou se pak dostává na plazmatickou membránu, nebo je vylučována do extracelulárního prostředí. Na plazmatické membráně je lokalizovaná Cu-dependentní „multicopper“ oxidáza Fet3, která se podílí na transportu železa

(Yuan et al., 1997). Homologicky najdeme v lidském organismu Wilsonův protein, který přenáší měď na ceruloplasmin. (Fu et al., 1995 ; Dancis, 1998).

1.1.2. CCS (chaperon mědi pro superoxid dismutázu)

Metallochaperon CCS (copper chaperone for superoxid dismutase) dodává měď do cytosolického enzymu Cu/Zn-SOD1. Superoxid dismutáza 1 díky redoxnímu potenciálu mědi mění superoxid kyslíku na peroxid vodíku a volný kyslík (Rosenzweig, 2001). Pro správnou funkci enzymu SOD1 je nutné posttranslačně vložit atom mědi a zinku. Přenos měďného iontu zajišťuje právě CCS, který dodává měď pouze pro tento enzym (Culotta et al., 1997). Tento metallochaperon interaguje s C-koncovou intracelulární doménou přenašeče Ctr1, od kterého přebírá atom mědi za vzniku pevného spojení. Tuto interakci naruší až pevné připojení SOD1. Nejdříve vzniká stabilní heterotrimer, který se rozpadne až po úplné aktivaci SOD1 a úspěšném předání Cu^+ iontu (Skopp et al., 2019).

Jedná se o největší známý metallochaperon, složený ze tří proteinových domén. CCS obsahuje homologický strukturní Cu-vazebný motiv MXCXXC, který sdílí s ostatními metallochaperony (Fukuoka et al., 2017). Atx1-like doména vykazuje vysokou homologii (34 %) s metallochaperonem Atx1. Další domény slouží především pro rozpoznání a navázání SOD1 (Lamb et al., 1999). V *Saccharomyces cerevisiae* je pojmenován yCCS a v lidském organismu najdeme homologický hCCS.

SOD1 najdeme i v intermembránovém prostoru mitochondrií. Přes vnější mitochondriální membránu se dostává pomocí pórů spolu s CCS, kdy je transport regulován koncentrací kyslíku. Pravděpodobně zde redukuje ROS vzniklé respirací (Kawamata and Manfredi, 2010).

1.1.3. COX17 (chaperon mědi pro cytochrom c oxidázu)

Cytochrom c oxidáza je multi-podjednotkový komplex zásadní pro buněčný energetický metabolismus. Je umístěna ve vnitřní membráně mitochondrií. V cytochrom c oxidáze jsou zabudovány dva atomy mědi do binukleární podjednotky Cu_A a jeden atom mědi do mononukleární Cu_B . Dochází zde k přenosu elektronů a protonů, tím vzniká protonový gradient. Redoxní potenciál mědi a železa umožňuje posun elektronů na terminální akceptor kyslík (Horn and Barrientos, 2008).

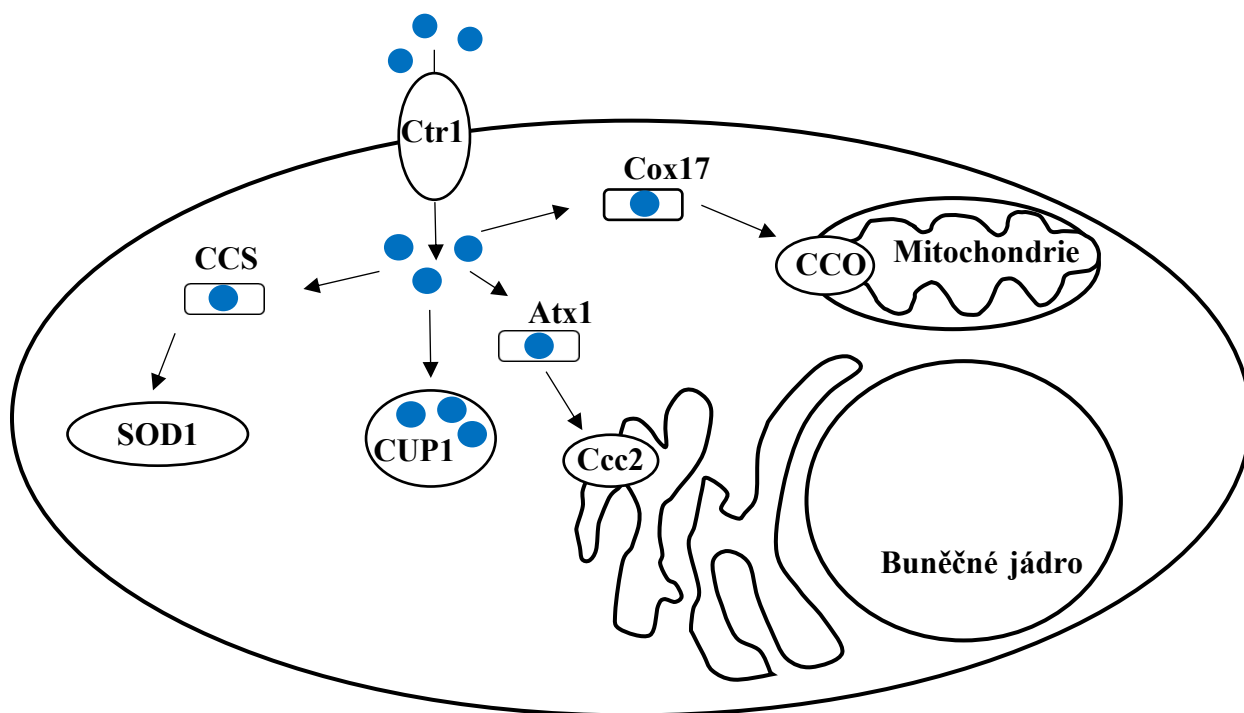
Cox17 (copper chaperone for cytochrome c oxidase) dopravuje měď do enzymu cytochrom c oxidázy (CCO). Jedná se o polypeptid se šesti cysteiny a motivem CCXC, který umožňuje vazbu mědi (Srinivasan et al., 1998). V oxidované formě Cox17 obsahuje dva vysoce

stabilní disulfidické můstky a jeden nestabilní, na které váže většinou dva atomy mědi (Voronova et al., 2007). Cox17 naváže měď v cytosolu a předá ji metallochaperonům Sco1 a Cox11, které jsou pevně vázané ve vnitřní mitochondriální membráně. Sco1 je malý protein, který přenáší měď přímo do Cu_A části cytochrom c oxidázy. Do Cu_B části zajišťuje přenos mědi Cox11 (Horn and Barrientos, 2008).

1.2. Metallothioneiny

Metallothioneiny jsou skupina intracelulárních proteinů, které dokážou vázat kovy jako je měď, zinek nebo kadmium (Bertini et al., 2007). Poprvé byly zaznamenány při frakcionaci koňské ledviny jako nízkomolekulární proteiny schopné vázat kadmium (Margoshes and Vallee, 1957). Později byly popsány téměř u každého organismu, ale strukturou i funkcí se často liší. Společné této rodině proteinů ale zůstává vysoký podíl cysteinů, které umožňují navázání kovů. Metallothioneiny se podílejí na udržování homeostázy kovů a ochraně před reaktivními formami kyslíku i před toxicitou kovů. Mimo to mají v lidském organismu úlohu při stresové nebo imunitní reakci, například během zánětu. (Calvo et al., 2017).

Konkrétní příklad metallothioneinu je CUP1 u *Saccharomyces cerevisiae*. Váže osm iontů mědi (Cu⁺) pomocí dvanácti cysteinylových zbytků (George et al., 1988). Jedná se o krátký peptid z 53 aminokyselin. Jeho role spočívá v udržování homeostázy mědi v cytosolu a díky němu je buňka schopná přežít stres vyvolaný nadměrnou intracelulární koncentrací mědi.



Obrázek 1: Schematický náčrt mechanismů homeostázy mědi u modelového eukaryotického organismu *Saccharomyces cerevisiae*. *Ctr1* je specifický přenašeč mědi na plazmatické membráně. Ionty mědi jsou v cytosolu zachytávány metallochaperony *CCS*, *Atx1* a *Cox17*, případně metallothioneinem *Cup1*. Každý metallochaperon směřuje ionty mědi k odlišnému cílovému proteinu. *CCS* dodává měď pro superoxid dismutázu *SOD1*. *Atx1* směřuje do Golgiho aparátu, kde je pumpa *Ccc2*, která ionty mědi nakládá do váčků sekretorické dráhy. *Cox17* je zásadní pro doručování enzymů pro cytochrom *c* oxidázu (*CCO*) v mitochondrii.

1.3. Poruchy homeostázy mědi

1.3.1. Toxicita mědi

Toxicita mědi se projevuje na několika úrovních. Když je buňka vystavena vyšší koncentraci mědi, dojde k narušení permeability plazmatické membrány a dalších buněčných membrán (Borkow and Gabbay, 2005). Vysoký redoxní potenciál tohoto kovu umožňuje tvorbu volných reaktivních hydroxylů, které mohou poškodit důležité součásti buňky, jako jsou lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Působení těchto hydroxylů může vést k oxidativnímu stresu a k interakci s atomy síry. Síra je běžně zabudována do železosírných center (Fe-S), která jsou důležitou součástí mnoha enzymů. V okamžiku, kdy je v buňce nadbytek mědi, je syntéza Fe-S center blokována, což vede k dalším komplikacím (Tan et al., 2017). Působení toxicity mědi je široké, ale ještě stále není přesně popsáno.

1.3.2. Wilsonova choroba

V lidském organismu funguje podobný mechanismus transportu mědi, jako byl již výše popsán u metallochaperonu Atx1 ze *S. cerevisiae*. Zde tuto funkci plní ATOX1, který přenáší měď k ATPáze ATP7B. Ta transportuje měď přes membránu Golgiho aparátu do sekretorických váčků. Touto cestou se dostane měď k ceruloplasminu, kde je klíčová pro správné fungování tohoto enzymu.

Wilsonova choroba je vyvolána mutací, která vede ke ztrátě funkce ATP7B, a proto měď nemůže být dále využívána. Hromadí se v různých částech těla, především v játrech, ale ve zvýšené koncentraci je i v mozkové tkáni. Následně se projevují toxické důsledky nadbytku mědi (Lorincz, 2018). Samuel Kinnier Alexander Wilson v roce 1912 popsal tuto nemoc a publikoval své poznatky (Broussolle et al., 2013). Jedná se o autozomálně recesivní genetické onemocnění, které má prevalenci 1:30 000 – 1:40 000, ale v malých izolovaných populacích, jako jsou některé vesnice na Krétě, je prevalence mnohem vyšší, až 1:15 (Sandahl et al., 2020).

Mezi příznaky pozorovatelné na první pohled patří v pokročilejším stádiu nemoci často otevřená ústa vlivem stahu zygomatického svalu. Pacienti se často usmívají a odhalují horní ret (Wilson, 1912). Kolem rohovky vzniká Kayser-Fleischerův prstenec hnědošedé barvy, který je tvořený mědí. Další příznaky jsou spíše neurologické, například třes, špatná koordinace pohybů, těžko ovladatelný jazyk a slintání (Scheinberg and Sternlieb, 1960). Indikovat onemocnění lze i bez příznaků na základě koncentrace ceruloplasminu v krevním séru; za velmi nízkou koncentraci je považováno 0-15 mg/100 ml (Aisen et al., 1960). Léčba je naštěstí snadno aplikovatelná a funkční. Lze snížit příjem mědi z potravy, ale také redukovat množství volné mědi v tkáních. Využívá se léků jako penicillamin, trientin, zinkový acetát nebo tetrathiomolybdát, které jsou schopné vyvézt volnou měď z tkání (Lorincz, 2018).

1.3.3. Menkeho choroba

Na transportu mědi do váčků Golgiho aparátu a následně do sekretorické dráhy se podílí kromě ATPázy ATP7B i ATP7A. Recesivní, pohlavně vázaná choroba, která způsobuje poruchy ATP7A, byla popsána v roce 1962 a pojmenována dle svého objevitele Johna Hanse Menkese (Menkes et al., 1962). Gen pro Menkeho chorobu (MNK) leží na X chromozomu a kóduje právě ATPázu ATP7A. Typ mutace se liší u jednotlivých případů (Fujisawa et al., 2019). Nebyla nalezena korelace mezi typem mutace a konkrétním fenotypem. Celkem je popsáno přibližně 160 typů mutací a jejich fenotypový projev je často odlišný (Møller et al., 2009).

Během tohoto onemocnění měď zůstává v cytosolu, jelikož ATPáza nefunguje a měď nemůže být z buňky sekretována. Měď přijímaná z potravy zůstává v tenkém střevě a není distribuována krví do celého těla. Tento lokální nadbytek ale vyústí v systematickou deficienci mědi, která je problematická zvláště pro enzymy, pro které je měď zásadní kofaktor. Pokud dojde k selhání enzymů, jako je COX, SOD1, ale také lyzyl oxidáza nebo dopamin betahydroxyláza, často dochází k úmrtí ve velmi raném věku.

Četnost onemocnění není stejná ve všech zemích. Predikce odhadují prevalenci 1:8 664 u mužského pohlaví, ačkoliv incidence v Evropě je mnohonásobně nižší – 1:250 000 (Kaler et al., 2020 ; Tønnesen et al., 1991). Jasně viditelným příznakem jsou drsné, řídnoucí vlasy, ale hlavně dochází k poškození mozkové a pojivové tkáně (Tümer and Horn, 1997). Nedostatek mědi v mozkové tkáni vede k nevratným neurodegeneračním poškozením. Proto je nutné nemoc co nejdříve rozpoznat. Čím dříve se tak podaří, tím lépe lze nemoc léčit. Novorozencům lze denně podávat subkutánní injekce měď-histidinu, díky kterým se zmírní neurodegenerace (Kaler et al., 2008). Ale ani časná léčba mnohdy neodvrátí působení nedostatku mědi a tyto důsledky mohou vést ke smrti (Kim et al., 2015).

2. Metabolismus mědi u bakterií

Prokaryota mají vyvinuté mechanismy pro udržování homeostázy mědi, které jsou podobné výše popsaným. Důsledná regulace příjmu i výdeje mědi je zásadní pro předcházení toxickému působení tohoto kovu. Přesné procesy nelze pro všechna prokaryota generalizovat (Andrei et al., 2020). Většina enzymů vyžadujících měď je umístěna v cytoplazmatické membráně, aby se minimalizoval obsah volné mědi v cytoplazmě. U gram-negativních bakterií jsou tyto enzymy vyžadující měď v periplazmě, aby byl příjem mědi jednodušší bez nutnosti specifického přenosu (Argüello et al., 2013).

2.1. Systémy tolerance mědi u *Escherichia coli*

Příkladem gram-negativní bakterie je *E. coli*, která je často využívána jako modelový organismus pro studium prokaryot a homeostáza mědi je v tomto případě dobře prozkoumána. Při vysoké koncentraci mědi je spuštěn chromozomální systém *cue* a *cus* (Outten et al., 2001 ; Bondarczuk & Piotrowska-Seget, 2013).

Systém *cue* (copper efflux) je pro homeostázu mědi primární a probíhá za aerobních i anaerobních podmínek (Outten et al., 2001). Vlivem působení transkripčního regulátoru CueR dochází k expresi genů *cueA* a *copA*. CopA patří do rodiny ATPáz P-typu, která vylučuje

nadbytečnou měď z cytoplazmy (Rensing and McDevitt, 2013). CueO je „multi-copper“ oxidáza, která váže čtyři atomy mědi a oxiduje Cu^+ na Cu^{2+} iont (Roberts et al., 2002). Chrání periplazmatické enzymy před poškozením působeným mědí a oxidativním stresem (Grass and Rensing, 2001).

Systém *cus* (copper sensing) je dvoukomponentní a skládá se z genů *cusR* a *cusS*. Tyto geny jsou zásadní pro expresi *cusC* v přítomnosti mědi (Munson et al., 2000). Tento systém dává vznik více-podjednotkovému transportéru *cusCFBA*, který překlenuje obě membrány a periplazmatický prostor. Skládá se ze čtyř proteinů *cusC*, *cusB*, *cusA* a periplazmatického chaperonu *cusF* (Loftin et al., 2005). Proton-motivní síla pohání přenos jak iontů mědi, tak stříbra (Long et al., 2012).

2.2. Mechanismy tolerance mědi u patogenních prokaryot

Patogenní prokaryotické organismy musí být schopné přežít v prostředí hostitele, kde je mimo jiné často zvýšená koncentrace mědi (White et al., 2009). Patogen tedy musí být schopný na takové zvýšení reagovat. Porozumění těmto mechanismům může vést k cílenému narušení funkcí jednotlivých komponent homeostázy, snížení virulence bakterií a přinést potenciální novou léčbu (Ladomersky and Petris, 2015).

2.2.1. Export mědi přes cytoplazmatickou membránu

Přenos mědi zajišťuje podskupina ATPáz typu- $\text{P}_{1\text{B}}$. Mají 6-8 transmembránových domén a od ostatních ATPáz P-typu je odlišuje přítomnost domény pro vazbu cytosolických kovů (Argüello et al., 2007). U *E. coli* je to výše zmíněná CopA. Pro *Mycobacterium tuberculosis* je zásadní CtpV. Transkripce této ATPázy je indukovaná ve větším množství při vyšší koncentraci mědi (Ward et al., 2010). *Pseudomonas aeruginosa* má dvě strukturně podobné ATPázy CopA1 a CopA2 (González-Guerrero et al., 2010 ; Teitzel et al., 2006). Bakteriální ATPázy P-typu jsou homologické těm eukaryotickým (Fagan and Saier, 1994). Slouží nejen k ochraně před nežádoucími účinky mědi, ale k jejímu cílenému transportu v buňce, kdy dodávají měď do enzymů jako je Cu/Zn-superoxid dismutáza (Osman et al., 2013).

2.2.2. Sekvestrace mědi

Jedno z možných řešení je využití metallothioneinů. Prvním objeveným byl MymT (mycobacterial metallothionein) u gram-pozitivní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Jeho role je vázat přebytečnou měď v cytosolu. Exprimován je při vyšší koncentraci mědi a také za podmínek, které panují ve fagolyzozomu (Gold et al., 2008).

V případě *Salmonella enterica* serovar Typhimurium existuje gen cueP, který kóduje malý periplazmatický protein. Tento systém doplňuje funkci systému *cus*, který najdeme u *E. coli*, a jeho exprese je regulována Cu-senzitivním faktorem CueR (Pontel & Soncini, 2009 ; Espariz et al., 2007). CueP váže ionty mědi v periplazmatickém prostoru a chrání tak toto prostředí před toxicitou mědi (Osman et al., 2010).

2.2.3. Oxidace mědi pomocí „multi-copper“ oxidáz

Funkce „multi-copper“ oxidáz byla již popsána výše. Pomocí vázané mědi redukuje kyslíkaté deriváty, které by jinak poškodily periplazmatický prostor prokaryot. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium má oxidázu CuiD, jejíž funkce i struktura je obdobná CueO u *E. coli* (Acharad et al., 2010 ; Espariz et al., 2007). Homologická CueO byla objevena i u *Campylobacter jejuni* a u jiných patogenních prokaryot (Silva et al., 2012).

3. Parazitické houby

Většina patogenních hub nepředstavuje pro teplokrevné živočichy žádný problém. S jejich spory se setkává každý organismus denně a imunitní systém dokáže potlačit jakýkoliv nechtěný nárůst. Proto většinu oportunistických parazitických hub, stejně jako zde uvedené *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* a *Cryptococcus neoformans*, najdeme většinou jako komenzály mukózních povrchů lidského těla, kde mají velké zastoupení v mikrobiomu (Kapitan et al., 2019). Jakmile je však imunitní systém oslaben, mohou způsobit vážné nemoci. Díky svým unikátním vlastnostem dokážou přežít ve fagolyzozomu makrofágů a odolat zvýšené koncentraci mědi v krevním séru (Culbertson et al., 2020). Poznání metabolismu mědi u těchto hub je důležitým krokem pro efektivní boj s fungálními infekcemi a možná cesta pro pochopení metabolismu mědi i u ostatních parazitů.

3.1. *Candida albicans*

C. albicans patří do kmene Ascomycota (houby vřeckovýtrusné) a čeledi *Saccharomycetaceae*. Za běžných podmínek jde o komenzální houbu teplokrevných organismů včetně člověka (McCullough et al., 1996). Kolonizuje především gastrointestinální systém, ženský reprodukční trakt, ústní dutinu a kůži. Nicméně za určitých vnějších i vnitřních podmínek se z ní stává oportunistický parazit, který v těle hostitele může způsobit vážná onemocnění. Převážně u imunosuprimovaných pacientů nebo u lidí s onemocněním *diabetes mellitus* může působit velké komplikace (Belazi et al., 2005). Mezi běžná onemocnění můžeme zahrnout vulvovaginální kandidózu, kterou jednou za život zažije přibližně 75 % všech žen (Foxman, 1990 ; Sustr et al., 2020). Ve vážných případech, například u lidí s nedostatkem

neutrofilů, organismus nedokáže udržet rovnováhu a dochází k silnému nárůstu populace *C. albicans* na sliznicích a vzniku lokální infekce. Většinou dojde ke tvorbě souvislých biofilmů na sliznicích, kdy buňky díky adhezi na epitely lépe odolávají působení imunitního systému, a následně se může rozvinout infekce (Gulati and Nobile, 2016). Kandidémie neboli diseminace infekce do krve vede k rychlému šíření do dalších vnitřních orgánů (Kim and Sudbery, 2011). Následná mortalita těchto případů je až 40 % (Koehler et al., 2019).

Candida se vyskytuje v několika morfologických variantách. Buď přetrvává v kulovitém jednobuněčném kvasinkovém stádiu, nebo vznikají dlouhé hyfy, případně pseudohyfy, které jsou pro lidský organismus nebezpečnější (Noble et al., 2017). Právě přeměna mezi jednotlivými morfotypy hraje zásadní roli pro virulenci (Witchley et al., 2019). Ačkoliv se jedná o diploidní organismus bez jakéhokoliv pohlavního rozmnožování, jeho genom přesto umožňuje velkou genetickou variabilitu i bez meiotického dělení (Molero et al., 1998). V buňce je sice přítomný dělicí aparát, ale není využíván, a místo toho probíhá parasexuální cyklus, kdy dojde k redukci počtu chromozomů a vzniku nových variant genomu (Forche et al., 2008).

3.2. *Aspergillus fumigatus*

Saprofytická půdní houba *Aspergillus fumigatus* se řadí mezi Ascomycota a čeleď *Trichocomaceae*. Jedná se o běžnou plíseň, jejíž konidie se snadno šíří vzduchem (Mullins et al., 1976). Lidský organismus je tak potenciální infekci vystavován velmi často. Vdechnuté konidie jsou v plicích zdravého jedince snadno zlikvidovány a nežádoucí rozšíření je potlačeno. Pokud ale imunitní systém není plně funkční, může se tato běžná houba stát vážným parazitem a tvořit tak nárůsty přímo uvnitř lidského těla (Kwon-Chung & Sugui, 2013 ; Paulussen et al., 2017). U některých astmatických pacientů se slabšími plicemi se může rozvinout alergická bronchopulmonální aspergilóza (Moss, 2005). Pokud předchozí nemoci značně narušily plicní sklípky, mohou vláknité hyfy vzniklé otvory a dutiny plic silně prorůst a tvořit husté útvary zvané aspergilomy. Nejnebezpečnější nárůst infekce se nazývá invazivní aspergilóza. Projevuje se i mimo tkáň plic, kdy dojde k diseminaci do krve a následnému šíření k dalším orgánům (Denning, 1998). Jedná se o vážné onemocnění, které u pacientů s rakovinou nebo AIDS mnohonásobně zvyšuje mortalitu (Latgé and Chamilos, 2020). Hrubá míra smrtelnosti (case-fatality rate) 58 % ukazuje, o jak závažné onemocnění se jedná, hlavně s ohledem na neustálý nárůst imunodeficientních pacientů (Lin et al., 2001).

Aspergillus fumigatus se rozmnožuje jak pohlavně, tak nepohlavně (O’Gorman et al., 2009 ; Korfanty et al., 2021). Nejčastěji probíhá nepohlavní rozmnožování, jelikož se vzniklé

konidie a spory velmi rychle a snadno šíří. Právě v tom spočívá problematika této patogenní houby. Konidie dosahují velikosti 2-3 μm a mají kapénkový tvar, který je ideální pro šíření větrem. Při vdechnutí se konidie zadrží v alveolech plic, následně se mohou rozrůstat a působit značné plicní potíže. Konidie navíc obsahují melanin, díky kterému jsou chráněné před ultrafialovým zářením, reaktivními formami kyslíku i před fagocytózou (Schmaler-Ripcke et al., 2009 ; Pihet et al., 2009 ; Ferling et al., 2020).

Samotný *Aspergillus* produkuje mnoho mykotoxinů, jako jsou aflatoxiny a gliotoxiny (Gardiner and Howlett, 2005). Také produkuje extracelulární enzymy peptidázy a lipázy, které narušují soudržnost okolních buněk (Beauvais et al., 1997 ; Markaryan et al., 1994). Během chronických a invazivních infekcí tvoří biofilmy, které představují velmi komplexní a odolnou vrstvu. Taková pevná struktura je mnohem odolnější jak proti působení imunitního systému, tak i proti antifungálním lékům (Seidler et al., 2008).

3.3. *Cryptococcus neoformans*

Na rozdíl od předchozích zástupců patří *Cryptococcus neoformans* do kmene Basidiomycota. Jedná se o půdní saprofytický organismus, který dokáže přežít i v extrémně odlišných podmínkách, jako je vnitřní prostředí teplokrevných živočichů. V prostředí většinou formuje oválné buňky velikosti 5–10 μm . Pozoruhodné jsou gigantické buňky (titan cells), které se tvoří v některých případech uvnitř hostitele. Buňka zesílí vrstvu chitinu v buněčné stěně a zvětší svůj objem až 5x. Během toho dochází i k odštěpování menších dceřiných buněk (Zaragoza et al., 2010). Tato zvětšená struktura snadněji odolá nepříznivým podmínkám prostředí. Během pohlavního rozmnožování ale vytváří i pseudohyfy. Bipolární rozmnožovací systém se skládá ze dvou alel lokalizovaných na MAT lokusu a liší se od všech ostatních systémů pohlavního rozmnožování hub (Lengeler et al., 2002).

Patogenní působení se projevuje především kožními problémy, ale může se při nedostatečné odezvě imunitního systému rozšířit dál. Nárůst nejdříve probíhá v plicích, ale diseminace může postihnout i centrální nervovou soustavu. Právě tam dochází k rozvinutí fatálního onemocnění, jakým je kryptokoková meningitida (Bicanic and Harrison, 2004). Převážně v Africe a Asii je to velmi časté onemocnění u imunodeficientních pacientů a působí půl milionové ztráty životů HIV pozitivních jedinců ročně (Park et al., 2009).

Cryptococcus má velmi výhodné virulentní faktory, díky kterým dokáže odolat působení imunitního systému (Alspaugh, 2015). Základ tvoří velmi pevná buněčná chitinová stěna a polysacharidová kapsule (Banks et al., 2005). Základní složkou kapsule je

glukuronoxylomannan (GXM) a glukuronoxylomannogalaktan (Heiss et al., 2009). GXM přidává na odolnosti *C. neoformans* proti buňkám imunitního systému a převážně proti fagocytóze. Pro sekreci GXM na povrch buňky je vytvořený speciální systém extracelulárních váčků, tzv. virulence bags (Rodrigues et al., 2008). Váčky obsahují i enzymy, jako je fosfolipáza B, superoxid dismutáza nebo ureáza, které mají roli při boji s imunitním systémem (Cox et al., 2003 ; Wright et al., 2007 ; Cox et al., 2000). Některé váčky obsahují i lakázu, která je zásadní pro syntézu melaninu (Lee et al., 2019).

3.4. Společné mechanismy homeostázy mědi

Přestože jsou výše zmínění zástupci hub biologicky i taxonomicky značně odlišní, mechanismy homeostázy mědi jim zůstávají poměrně společné. Homologické struktury, které byly popsány výše u *Saccharomyces cerevisiae*, najdeme s malými rozdíly i mezi ostatními zástupci hub.

Například rodina Ctr (copper transporter) přenašečů je velmi konzervovaná v celé živočišné říši a většinou v genomu hub alespoň jeden přenašeč nalezneme (Li et al., 2019). Vysokoafinitní přenašeče mědi pro *S. cerevisiae* se nazývají Ctr1 a Ctr3 a zajišťují import mědi přes cytoplazmatickou membránu buňky. Oproti tomu nízkoafinitní přenašeč pro měď Ctr2 je na membráně vakuoly (Rees et al., 2004). *C. neoformans* kóduje dva homologické přenašeče lokalizované na plazmatické membráně Ctr1 a Ctr4 (Waterman et al., 2007 ; Ding et al., 2011). *A. fumigatus* má přenašeče CtrA2 a CtrC, které jsou homologní přenašeči Ctr1 (Park et al., 2014). Pro tyto přenašeče jsou charakteristické tři transmembránové domény (Dumay et al., 2006). Na N-konci druhé transmembránové domény je vysoce konzervovaný MXXXM motiv, který je právě za vazbu mědi zodpovědný (Puig et al., 2002). Aktivita těchto přenašečů závisí na Cu^+ metalloreduktázách Fre1 a Fre2. Ty katalyzují redukci iontu Cu^{2+} na Cu^+ , ale také redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} na cytoplazmatické membráně buňky (Georgatsou et al., 1997). Měďný iont je méně reaktivní, a tím pádem ho lze snadněji transportovat přes membránu. Uvnitř buňky jsou ionty mědi vázány na metallochaperony Atx1 a CCS, případně na jejich homology, stejně jako v případě *S. cerevisiae*, a pomocí nich doručovány k enzymům, kterým měď slouží jako kofaktor (Walton et al., 2005).

Expresí těchto přenašečů je ovlivněná koncentrací mědi v buňce. Při jejím poklesu je vlivem měď-responzivních elementů (CuRE) aktivován transkripční faktor Mac1 v případě *S. cerevisiae* nebo jeho homolog Cuf1 u *C. neoformans* (Labbé et al., 1997 ; Waterman et al., 2007). Tento transkripční faktor se naváže na promotory, které ovlivňují expresi přenašečů Ctr1 a Ctr3, případně i metalloreduktázy Fre1 (Georgatsou et al., 1997 ; Yamaguchi-Iwai et al.,

1997). Exprese přenašeče Ctr2 a metallochaperonů CCS a Atx1 je překvapivě podmíněná i množstvím železa v buňce (Fei and Deng, 2007). Transkripční faktor Mac1 je s malými odchylkami konzervován pro všechna ascomycota, společně jim jsou konzervované struktury na N-konci a motivy bohaté na cystein na C-konci. Tento transkripční faktor najdeme jak u *S. cerevisiae*, tak i v *C. albicans* a *A. fumigatus* (Cai et al., 2017).

V hostitelském prostředí jsou patogeny podrobeny mnohým toxickým působením, mezi které lze zahrnout i reaktivní ionty mědi. Pokud dojde k narušení její homeostázy, je pro patogeny zásadní eliminovat nadbytečnou měď z cytosolu. Jelikož je pro patogenní houby zásadní úspěšná kolonizace prostředí, proliferace a nakonec invaze do dalších částí organismu, musely přijít s mechanismy, díky kterým budou mít nad hostitelským prostředím výhodu.

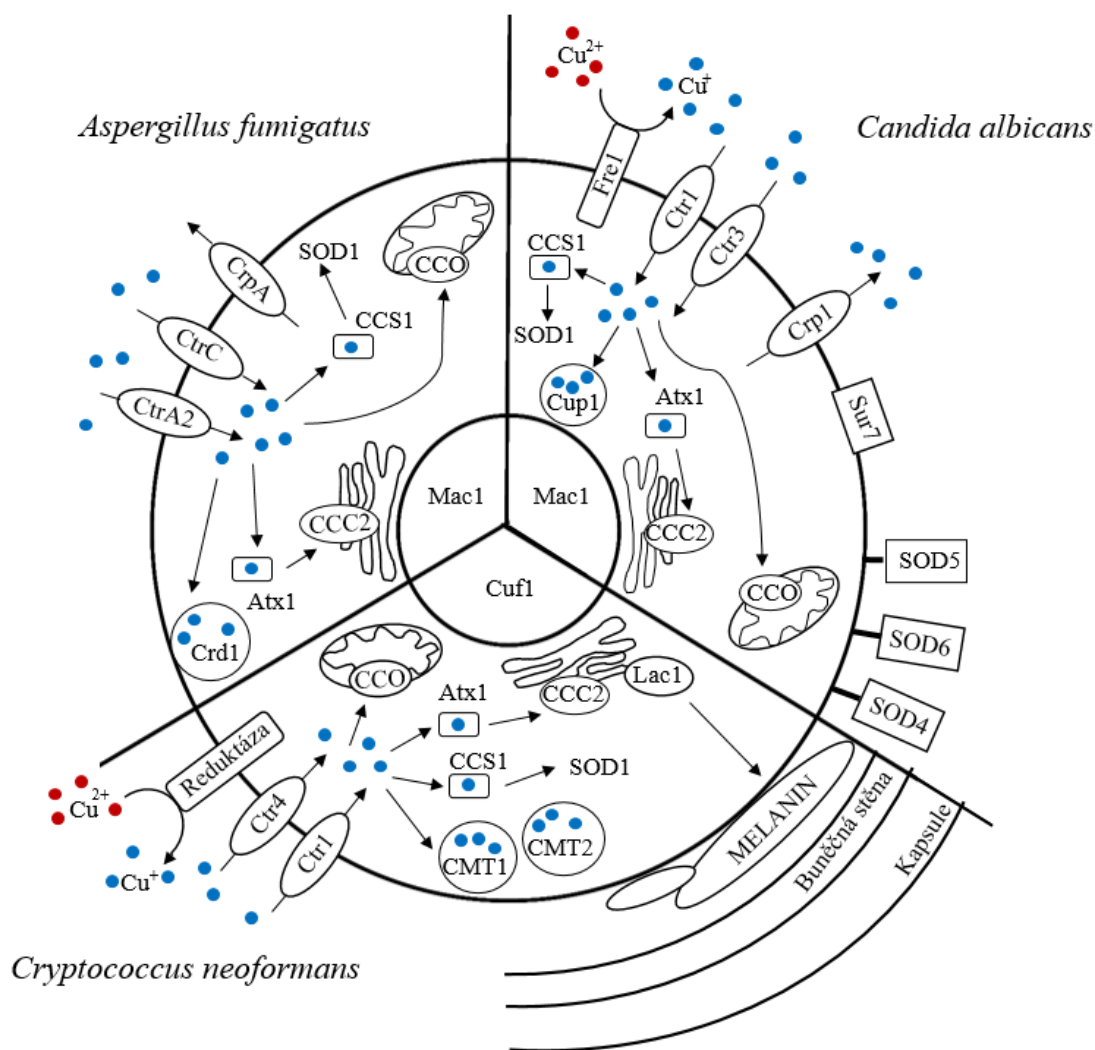
Konzervovanou strategií je využití metallothioneinů, které na sebe vážou cytosolické ionty mědi a zabraňují tak jejich reakcím. V *C. albicans* transkripční faktor Ace1 v závislosti na koncentraci mědi reguluje expresi metallothioneinů Cup1 a Crd2 (Winge et al., 1985). V *C. neoformans* byly identifikovány dva metallothioneiny CMT1 a CMT2, které jsou exprimovány za zvýšené koncentrace mědi (Ding et al., 2011). *A. fumigatus* využívá transkripční faktor AceA, který reguluje expresi metallothioneinu AfCrdA (Cai et al., 2018).

Kromě metallothioneinů v *C. albicans* funguje ještě export mědi z buňky pomocí ATPázy P-typu Crp1 (Riggle and Kumamoto, 2000). Crp1 je exprimována při zvýšené koncentraci mědi a efektivně vylučuje přebytečné Cu^+ ionty (Weissman et al., 2000). Homologická ATPáza P-typu CrpA je využívána v *A. fumigatus* (Cai et al., 2018).

Velkou roli v rezistenci vůči iontům mědi hraje i buněčná stěna a plazmatická membrána. Je možné, že se ionty mědi váží přímo na fosfolipidy v membráně, a tím naruší její permeabilitu. Proto je vhodná organizace a složení membrány pro rezistenci vůči mědi také zásadní. V *C. albicans* byl popsán integrální membránový protein Sur7. Tento protein se podílí na správném prostorovém uspořádání buněčné stěny a její rigiditě (Wang et al., 2011). Kromě toho má důležitou roli v rezistenci vůči mědi. Bez Sur7 dochází v buňkách po vystavení vyšším koncentracím mědi ke značným defektům a k narušení permeability membrány. Mohl by to tak být zajímavý cíl pro budoucí boj s patogeny (Douglas and Konopka, 2019).

Mimo to využívá proteiny na plazmatické membráně Als1 a Als3. Podílí se především na heterogenitě buněčné stěny a adhezi k povrchům, přesto jejich přítomnost v buňce zvyšuje rezistenci vůči mědi a také reguluje její příjem z okolí (Zheng et al., 2016). Na povrchu buňky najdeme superoxid dismutázy Sod4, Sod5 a Sod6, které mají jako kofaktor pouze vázanou měď.

Podílí se na likvidaci ROS produkovaných imunitními buňkami (Frohner et al., 2009 ; Schatzman et al., 2020). *C. neoformans* využívá mitochondriální ABC transportér Atm1, který je zapojen do regulace homeostázy železa a především tvorby Fe-S center (Do et al., 2018). Jelikož právě Fe-S center není při toxickém působení mědi dostatek, je tento transportér klíčový pro virulenci. Právě při stresu působeným mědí je zvýšena exprese Atm1, aby byl nedostatek Fe-S center dorovnán a funkce buňky tak nebyla narušena (Garcia-Santamarina et al., 2017).



Obrázek 2: Schematický náčrt shrnující výše popsané mechanismy homeostázy mědi u zástupců patogenních hub. U všech zástupců jsou přenašeče z rodiny Ctr, které importují měďné ionty. Redukci iontů mědi zajišťují metalloreduktázy (Fre1) na povrchu buňky. Metallochaperon Atx1 transportuje měď do Golgiho aparátu a sekretorické dráhy. CCS1 dodává měď pro superoxid dismutázu. Metallothioneiny Crd1, CMT1, CMT2 a Cup1 slouží pro vyvazování cytosolických iontů mědi. Export iontů mědi zajišťují ATPázy P-typu Crp1 a CrpA. C. albicans má specifický membránový protein Sur7 a extracelulární SOD 4,5,6, které jsou v rezistenci vůči mědi zásadní. C. neoformans naopak produkuje lakázu 1 (Lac1), která se podílí na syntéze melaninu na povrchu buňky. Transkripční faktory Mac1 a Cuf1 jsou senzitivní ke koncentraci mědi a ovlivňují expresi komponentů pro udržování homeostázy mědi.

3.5. Mechanismy virulence patogenních hub

Jednu stránku úspěchu patogenních hub tvoří přežití zvýšené koncentrace mědi nejen ve fagolyzozomu imunitních buněk, ale někdy i v samotných tkáních lidského těla. Druhou částí je protiútok a využití toxicity mědi ve vlastní prospěch. Mnohé patogenní houby mají své způsoby, kterými využívají proti imunitnímu systému jeho vlastní zbraň.

3.5.1. *Candida albicans*

Během systematické kandidózy, kdy se infekce šíří do dalších orgánů, naráží *C. albicans* na rozličné překážky. Celková hladina mědi v buňce se odráží i v homeostáze železa, flexibilitě buňky reagovat na změny v prostředí a také na schopnosti odolávat reaktivním formám kyslíku. Všechny tyto děje jsou provázané a ukazují, jak vyřazení některého přenašeče mědi má pro *C. albicans* fatální důsledky. Během počáteční infekce je v ledvinách zvýšená hladina mědi, na kterou *C. albicans* reaguje vyšší expresí exportních pump Crp1. Imunitní systém vytvoří zóny s nedostatkem železa, které se pak stane limitujícím prvkem pro patogen (Potrykus et al., 2013). Později je v ledvinách i nedostatek mědi, a tak je zvýšena exprese importních přenašečů Ctr1. Stejně tak působení *C. albicans* ovlivňuje hostitelské tkáně a narušuje v nich homeostázu mědi (Mackie et al., 2016). Na změny koncentrace mědi dokáže *C. albicans* reagovat i výměnou kofaktoru v superoxid dismutáze. Při nedostatku mědi je vlivem transkripčního faktoru Mac1 zvýšená exprese Sod3, která jako kofaktor využívá mangan, a nahrazuje tak funkci Cu/Zn-Sod1 při hašení reaktivních forem kyslíku (Li et al., 2015).

3.5.2. *Cryptococcus neoformans*

Unikátní složkou virulence v *C. neoformans* je kapsule a buněčná stěna, které byly zmíněny výše. Ohledně homeostázy mědi je zajímavé, že využívá rozličnou strategii v odlišných tkáních. Infekce má často počátek v plicích, kde je vysoká koncentrace mědi, a následně se přesune do mozkové tkáně, kde je naopak mědi nedostatek. Schopnost regulovat expresi přenašečů Ctr1 a Ctr4 vzhledem k podmínkám prostředí je pro virulenci zásadní. Během infekce v plicích je import mědi přes Ctr1 rychle omezen tím, že je Ctr1 degradován. Naopak v mozkové tkáni je jeho exprese zvýšená (Sun et al., 2014). Expresi Ctr1 i Ctr4 je regulována transkripčním faktorem Cuf1, který je citlivý na koncentraci mědi. Ctr4 není pro příjem mědi zásadní, ale bez jeho přítomnosti je značně snížena virulence (Waterman et al., 2012).

Dalším faktorem virulence je tvorba melaninu. Povrchová vrstva melaninu chrání buňky nejen před UV zářením, rozdíly teplot, ale i před fagocytózou a antifungálními léky (Rosas & Casadevall, 1997 ; Liu et al., 1999). Lakáza, která katalyzuje první krok syntézy melaninu,

obsahuje atomy mědi jako kofaktor, díky kterým může oxidovat široké spektrum substrátů (Williamson et al., 1998 ; Williamson, 1994). Lakázu kódují dva paralogy, ale více je exprimovaný LAC1 než LAC2. Při vyšší koncentraci extracelulární mědi je vlivem transkripčního faktoru Cuf1 indukována exprese lakázy, a tak je regulována i syntéza melaninu (Mauch et al., 2013 ; Jiang et al., 2009).

3.5.3. *Aspergillus fumigatus*

Překvapivě i přes detailně prozkoumané působení aspergilózy není přesně popsáno, k jakým změnám v homeostáze mědi a vzájemným reakcím mezi hostitelem a *A. fumigatus* dochází (Raffa et al., 2019). Rozhodně je regulována exprese transportérů mědi vlivem její koncentrace, ale přesné důsledky nejsou zřejmé. Velkou roli v tom zastávají transkripční faktory Ace1 a Mac1 (Cai et al., 2017). Zajímavou odlišností od ostatních patogenních hub je, že v *A. fumigatus* byly popsány biosyntetické genetické klastry (BGC), které produkují sekundární metabolity. Konkrétně byly popsány dvě isokyanidové syntázy, které exprimují isokyanid xantocilin (*xan* BGC) a měď-responzivní metabolit CrmA (*crm* BGC). Isokyanidy mají v metabolismu rozličné role, ale mohou také sloužit jako chelátory kovů. Exprese těchto klastrů je regulována extracelulární koncentrací mědi a transkripčními faktory Ace1 a Mac1. Je pravděpodobné, že mají velkou roli ve virulenci (Lim et al., 2018).

4. Metabolismus mědi u dalších parazitů

Parazitické organismy představují velice heterogenní skupinu a navzdory jejich důležitosti není spektrum znalostí o homeostáze mědi zatím nijak široké. Ani u vybraných zástupců není celý mechanismus jasně prozkoumaný, ale i tak můžeme pozorovat určité homologie se zástupci hub či prokaryot.

Velmi známý původce malárie *Plasmodium falciparum* je zkoumán ze všech úhlů, ale metabolismus mědi je teprve pomalu odkrýváán. *P. falciparum* infikuje v lidském hostiteli erytrocyty, ve kterých je měď většinou vázána v Cu/Zn-SOD. V infikovaném erytrocytu je koncentrace mědi snížena oproti normálnímu stavu. Pravděpodobným zdrojem mědi pro *P. falciparum* je právě protein Cu/Zn-SOD, nebo může být přijímána speciálním přenašečem. Ačkoliv byl u *P. falciparum* nalezen membránový protein schopný vázat měď, který je částečně podobný Ctr1 v *S. cerevisiae*, není ještě jeho funkce přesně popsána (Choveaux et al., 2012). Na membráně parazita, ale i na membráně erytrocytu je ATPáza P-typu, která přenáší redukované ionty mědi přes membránu buňky. Pravděpodobně hraje roli v ochraně před toxicitou mědi. Obsahuje jednu charakteristickou doménu MXCXXC, která

umožňuje navázání mědi (Rasoloson et al., 2004). Kromě toho byl popsán cytosolický metallochaperon, který se podílí na transportu iontů mědi k cytochrom c oxidáze, který je označován obdobně jako u *S. cerevisiae* názvem Cox17 (Choveaux et al., 2015). Dostatek mědi je zásadní pro správný vývoj parazita především v rané fázi infekce. Při narušení homeostázy mědi může dojít k zastavení vývoje, což by mohl být potenciálně cílený postup pro léčbu malárie (Asahi et al., 2014).

U dalších parazitických protist není popsáno z homeostázy mědi mnoho mechanismů. Často je společným prvkem ATPáza P-typu umístěná na plazmatické membráně nebo alespoň protein, který by potenciálně mohl plnit její funkci. *Trypanosoma brucei brucei* je významný původce spavé nemoci, ve kterém byla identifikována ATPáza P-typu (TbbCuATPáza) pro přenos mědi a také metallochaperony Cox 17, Cox 11 a Sco1 (Isah et al., 2020). V zástupcích skupiny *Leishmania* byla popsána ATPáza LmATP7 s charakteristickým motivem pro vazbu mědi CXXC (Paul et al., 2021). Odlišný organismus, *Naegleria fowleri*, která může v lidském těle způsobit primární amébovou meningoencefalitidu, dokáže přežívat v rozmanitých podmínkách, které se liší nejen koncentrací mědi. Pro udržení homeostázy mědi a export iontů mědi z buňky využívá ATPázu P-typu (Nf-CuATPáza). Pravděpodobně její genom kóduje i přenašeče pro měď homologické s Ctr1 a Ctr2 v *S. cerevisiae* (Grechnikova et al., 2020).

5. Metody využití mědi v léčbě parazitárních onemocnění

Využití mědi jako léčiva může samo o sobě vyvolat buněčnou smrt při vystavení buňky toxickým hladinám, které převyšují přirozenou toleranci vůči tomuto kovu. Vlastnosti mědi mohou být výhodné i pro zesílení účinku jiných léčiv, kdy lze využít komplexy s navázanými ionty mědi. Například bis(thiosemikarbazon) měďnatý [Cu(btsc)] tvoří malé, stabilní a lipofilní komplexy, které mají antimikrobiální účinek (Djoko et al., 2015). Případné využití dalších měďnatých komplexů se ukazuje jako možná cesta v léčbě infekce působené *Toxoplasma gondii* (Portes et al., 2017). Stále rostoucí rezistence vůči antibiotikům je vážný problém. Pyrazolopyrimidiny a jejich deriváty zvyšují intracelulární koncentraci mědi v buňce, a tak by mohly být novým zajímavým řešením tohoto problému (Crawford et al., 2019).

Cílené narušení homeostázy mědi lze vyvolat využitím měďnatých ionoforů. Jedná se o látky schopné přecházet přes membránovou dvojvrstvu. Jejich působením jsou měďnaté ionty transportovány do buňky, čímž se zvyšuje intracelulární koncentrace mědi. Potenciálně by tak jejich využití mohlo přinést výsledky nejen v léčbě infekčních onemocnění, ale i rakoviny (Alfonso & Quesada, 2013 ; Oliveri, 2020). Příkladem měďnatého ionoforu je zinkový

pyrithion (ZPT), který je běžně využíván pro léčbu lupů. Mimo to ZPT reaguje s extracelulární mědí a následně vzniká pyrithion s vázaným iontem mědi (CuPT), který může být transportován do buňky. Při inkubaci s buňkami *S. cerevisiae* značně zvyšuje intracelulární koncentraci mědi a zastavuje buněčný růst. Dochází i k narušení funkce enzymů s vázanými Fe-S centry (Reeder et al., 2011). Dalšími příklady ionoforů jsou disulfiram a 8-hydroxychinolin (Dalecki et al. 2015 ; Festa et al. 2014). Účinky ionoforů s mědí byly úspěšně ověřeny u *Naegleria fowleri* a mohly by tak potenciálně účinkovat i na další zástupce parazitických améb (Grechnikova et al., 2020).

6. Závěr

Parazitické organismy stále představují závažný problém v lidské i veterinární medicíně. Proto je vyvíjena silná motivace, aby došlo k důkladnému porozumění jejich metabolismu a mechanismů virulence, které by umožnilo využití účinnějších možností k zastavení parazitárního nárůstu. Cílem bakalářské práce bylo shrnout dosavadní znalosti o homeostáze mědi nejen v eukaryotické říši, ale také vycházet z již získaných znalostí z říše prokaryotické. Měď je zajímavý prvek v metabolismu každého organismu vzhledem ke svým obojetným vlastnostem. Díky jejím redoxním vlastnostem se stává jak výhodným kofaktorem mnoha enzymů, tak nebezpečným protivníkem, pokud se v buňce vyskytuje volně. Tuto vlastnost sdílí například i s železem, jehož metabolismus je již ale mnohem lépe objasněn.

Nejlépe pochopené principy udržování homeostázy mědi najdeme u *S. cerevisiae*, kde je patrné zapojení rozličných molekul, které sdílí podobné vazebné motivy pro měď, díky kterým ji mohou přenášet a využívat. Stejně tak jsou velmi dobře charakterizované dráhy mědi u patogenních hub zmíněných v práci. Lze pozorovat určité homologie v říši hub, které se s mědí vyrovnávají obdobně. Základními mechanismy jsou selektivní přenašeče pro měď, metallochaperony, metallothioneiny a ATPázy P-typu. Přesto interakce mezi imunitním systémem a patogenem nejsou plně prozkoumány, a tak zbývá mnoho otázek. Je také nutné připomenout nedostatek poznatků o metabolismu mědi, a tím i nové možnosti výzkumu u ostatních eukaryotických parazitů. Zde je mnoho prázdného prostoru, jehož zaplnění by mohlo být přínosné v hledání nových molekulárních cílů antiparazitik pro léčbu závažných parazitárních onemocnění, která se stále nepodařila vymýtit.

Literatura

Achard, M.E.S., Tree, J.J., Holden, J.A., Simpfendorfer, K.R., Wijburg, O.L.C., Strugnell, R.A., Schembri, M.A., Sweet, M.J., Jennings, M.P., and McEwan, A.G. (2010). The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar typhimurium is required for systemic virulence. *Infect. Immun.* 78, 2312–2319.

Aisen, P., Schorr, J.B., Morell, A.G., Gold, R.Z., and Scheinberg, I.H. (1960). A rapid screening test for deficiency of plasma ceruloplasmin and its value in the diagnosis of Wilson's disease. *Am. J. Med.* 28, 550–554.

Alfonso, I., and Quesada, R. (2013). Biological activity of synthetic ionophores: Ion transporters as prospective drugs? *Chem. Sci.* 4, 3009–3019.

Alspaugh, J.A. (2015). Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 78, 55–58.

Andrei, A., Öztürk, Y., Khalfaoui-Hassani, B., Rauch, J., Marckmann, D., Trasnea, P.I., Daldal, F., and Koch, H.G. (2020). Cu homeostasis in bacteria: The ins and outs. *Membranes (Basel)*. 10, 1–45.

Argüello, J.M., Eren, E., and González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals* 20, 233–248.

Argüello, J.M., Raimunda, D., and Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–14.

Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D.L., and O'Halloran, T. V. (2002). Metallochaperones and metal-transporting ATPases: A comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res.* 12, 255–271.

Asahi, H., Tolba, M.E.M., Tanabe, M., Sugano, S., Abe, K., and Kawamoto, F. (2014). Perturbation of copper homeostasis is instrumental in early developmental arrest of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *BMC Microbiol.* 14, 1–11.

Baker, Z.N., Cobine, P.A., and Leary, S.C. (2017). The mitochondrion: A central architect of copper homeostasis. *Metallomics* 9, 1501–1512.

Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., and Lodge, J.K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1902–1912.

Beauvais, A., Monod, M., Debeauvais, J.P., Diaquin, M., Kobayashi, H., and Latgé, J.P. (1997). Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 272, 6238–6244.

Belazi, M., Velegraki, A., Fleva, A., Gidarakou, I., Papanau, L., Baka, D., Daniilidou, N., and Karamitsos, D. (2005). Candidal overgrowth in diabetic patients: Potential predisposing factors. *Mycoses* 48, 192–196.

Bertini, I., Gray, H.B., Valentine, J.S., and Stiefel, E.I. (2007). *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity* (Sausalito: University Science Books).

- Besold, A.N., Culbertson, E.M., and Culotta, V.C. (2016). The yin and yang of copper during infection. *J. Biol. Inorg. Chem.* *21*, 137–144.
- Bicanic, T., and Harrison, T.S. (2004). Cryptococcal meningitis. *Br. Med. Bull.* *72*, 99–118.
- Bondarczuk, K., and Piotrowska-Seget, Z. (2013). Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol. Toxicol.* *29*, 397–405.
- Borkow, G., and Gabbay, J. (2005). Copper as a biocidal tool. *Curr. Med. Chem.* *12*, 2163–2175.
- Broussolle, E., Trocello, J.-M., Woimant, F., Lachaux, A., and Quinn, N. (2013). Samuel Alexander Kinnier Wilson. Wilson's disease, Queen Square and neurology. *Rev. Neurol. (Paris)*. *169*, 927–935.
- Cai, Z., Du, W., Zeng, Q., Long, N., Dai, C., and Lu, L. (2017). Cu-sensing transcription factor Mac1 coordinates with the Ctr transporter family to regulate Cu acquisition and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* *107*, 31–43.
- Cai, Z., Du, W., Zhang, Z., Guan, L., Zeng, Q., Chai, Y., Dai, C., and Lu, L. (2018). The *Aspergillus fumigatus* transcription factor AceA is involved not only in Cu but also in Zn detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA. *Cell. Microbiol.* *20*, 12864.
- Calvo, J., Jung, H., and Meloni, G. (2017). Copper metallothioneins. *IUBMB Life* *69*, 236–245.
- Choveaux, D.L., Przyborski, J.M., and Goldring, J.P.D. (2012). A *Plasmodium falciparum* copper-binding membrane protein with copper transport motifs. *Malar. J.* *11*, 1–15.
- Choveaux, D.L., Krause, R.G.E., Przyborski, J.M., and Goldring, J.P.D. (2015). Identification and initial characterisation of a *Plasmodium falciparum* Cox17 copper metallochaperone. *Exp. Parasitol.* *148*, 30–39.
- Cobine, P.A., Ojeda, L.D., Rigby, K.M., and Winge, D.R. (2004). Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* *279*, 14447–14455.
- Colin, M., Charpentier, E., Klingelschmitt, F., Bontemps, C., De Champs, C., Reffuveille, F., and Gangloff, S.C. (2020). Specific antibacterial activity of copper alloy touch surfaces in five long-term care facilities for older adults. *J. Hosp. Infect.* *104*, 283–292.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* *68*, 443–448.
- Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Tabora, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect. Immun.* *71*, 173–180.
- Crawford, C.L., Dalecki, A.G., Narmore, W.T., Hoff, J., Hargett, A.A., Renfrow, M.B., Zhang, M., Kalubowilage, M., Bossmann, S.H., Queern, S.L., et al. (2019). Pyrazolopyrimidinones, a novel class of copper-dependent bactericidal antibiotics against multi-drug resistant: *S. aureus*. *Metallomics* *11*, 784–798.

- Culbertson, E.M., Khan, A.A., Muchenditsi, A., Lutsenko, S., Sullivan, D.J., Petris, M.J., Cormack, B.P., and Culotta, V.C. (2020). Changes in mammalian copper homeostasis during microbial infection. *Metallomics* *12*, 416–426.
- Culotta, V.C., Klomp, L.W.J., Strain, J., Casareno, R.L.B., Krems, B., and Gitlin, J.D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* *272*, 23469–23472.
- Dalecki, A.G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., and Wolschendorf, F. (2015). Disulfiram and copper ions kill *Mycobacterium tuberculosis* in a synergistic manner. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 4835–4844.
- Dancis, A. (1998). Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Pediatr.* *132*, S24-9.
- Denning, D.W. (1998). Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* *26*, 781–805.
- Ding, C., Yin, J., Tovar, E.M.M., Fitzpatrick, D.A., Higgins, D.G., and Thiele, D.J. (2011). The copper regulon of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* H99. *Mol. Microbiol.* *81*, 1560–1576.
- Djoko, K.Y., Goytia, M.M., Donnelly, P.S., Schembri, M.A., Shafer, W.M., and McEwan, A.G. (2015). Copper(II)-bis(thiosemicarbazonato) complexes as antibacterial agents: Insights into their mode of action and potential as therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 6444–6453.
- Do, E., Park, S., Li, M.H., Wang, J.M., Ding, C., Kronstad, J.W., and Jung, W.H. (2018). The mitochondrial ABC transporter *Atm1* plays a role in iron metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* *56*, 458–468.
- Douglas, L.M., and Konopka, J.B. (2019). Plasma membrane architecture protects *Candida albicans* from killing by copper. *PLoS Genet.* *15*, 1007911.
- Dumay, Q.C., Debut, A.J., Mansour, N.M., and Saier, M.H. (2006). The copper transporter (Ctr) family of Cu⁺ uptake systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *11*, 10–19.
- Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E.P., Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2007). Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* *153*, 2989–2997.
- Fagan, M.J., and Saier, M.H. (1994). P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* *38*, 57–99.
- Fei, X., and Deng, X. (2007). A novel Fe deficiency-responsive element (FeRE) regulates the expression of *atx1* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* *48*, 1496–1503.
- Ferling, I., Dunn, J.D., Ferling, A., Soldati, T., Hillmann, F., and Goldman, G.H. (2020). Conidial melanin of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* disrupts cell autonomous defenses in amoebae. *MBio* *11*, 00862–20.
- Festa, R.A., Helsel, M.E., Franz, K.J., and Thiele, D.J. (2014). Exploiting innate immune cell activation of a copper-dependent antimicrobial agent during infection. *Chem. Biol.* *21*, 977–987.

- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., and Bennett, R.J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol.* *6*, 1084–1097.
- Foxman, B. (1990). The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: Risk factors. *Am. J. Public Health* *80*, 329–331.
- Frohner, I.E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., and Kuchler, K. (2009). *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol. Microbiol.* *71*, 240–252.
- Fu, D., Beeler, T.J., and Dunn, T.M. (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca²⁺-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu²⁺-ATPase subfamily. *Yeast* *11*, 283–292.
- Fujisawa, C., Kodama, H., Hiroki, T., Akasaka, Y., and Hamanoue, M. (2019). ATP7A mutations in 66 Japanese patients with Menkes disease and carrier detection: A gene analysis. *Pediatr. Int.* *61*, 345–350.
- Fukuoka, M., Tokuda, E., Nakagome, K., Wu, Z., Nagano, I., and Furukawa, Y. (2017). An essential role of N-terminal domain of copper chaperone in the enzymatic activation of Cu/Zn-superoxide dismutase. *J. Inorg. Biochem.* *175*, 208–216.
- Garcia-Santamarina, S., Uzarska, M.A., Festa, R.A., Lill, R., and Thiele, D.J. (2017). *Cryptococcus neoformans* iron-sulfur protein biogenesis machinery is a novel layer of protection against Cu stress. *MBio* *8*, 01742–17.
- Gardiner, D.M., and Howlett, B.J. (2005). Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* *248*, 241–248.
- Georgatsou, E., Mavrogiannis, L.A., Fragiadakis, G.S., and Alexandraki, D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* *272*, 13786–13792.
- George, G.N., Byrd, J., and Winge, D.R. (1988). X-ray absorption studies of yeast copper metallothionein. *J. Biol. Chem.* *263*, 8199–8203.
- Gold, B., Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., Jiang, X., and Nathan, C. (2008). Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 609–616.
- González-Guerrero, M., Raimunda, D., Cheng, X., and Argüello, J.M. (2010). Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *78*, 1246–1258.
- Grass, G., and Rensing, C. (2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 902–908.
- Grechnikova, M., Ženíšková, K., Malych, R., Mach, J., and Sutak, R. (2020). Copper detoxification machinery of the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* involves copper-translocating ATPase and the antioxidant system. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* *14*, 126–135.

- Gulati, M., and Nobile, C.J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* *18*, 310–321.
- Heiss, C., Klutts, J.S., Wang, Z., Doering, T.L., and Azadi, P. (2009). The structure of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan contains β -d-glucuronic acid. *Carbohydr. Res.* *344*, 915–920.
- Horn, D., and Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome C oxidase. *IUBMB Life* *60*, 421–429.
- Huffman, D.L., and O'Halloran, T. V. (2000). Energetics of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.* *275*, 18611–18614.
- Isah, M.B., Goldring, J.P.D., and Coetzer, T.H.T. (2020). Expression and copper binding properties of the N-terminal domain of copper P-type ATPases of African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* *235*, 111245.
- Jiang, N., Sun, N., Xiao, D., Pan, J., Wang, Y., and Zhu, X. (2009). A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol. Lett.* *296*, 84–90.
- Kaler, S.G., Holmes, C.S., Goldstein, D.S., Tang, J., Godwin, S.C., Donsante, A., Liew, C.J., Sato, S., and Patronas, N. (2008). Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N. Engl. J. Med.* *358*, 605–614.
- Kaler, S.G., Ferreira, C.R., and Yam, L.S. (2020). Estimated birth prevalence of Menkes disease and ATP7A-related disorders based on the Genome Aggregation Database (gnomAD). *Mol. Genet. Metab. Reports* *24*, 100602.
- Kapitan, M., Niemiec, M.J., Steimle, A., Frick, J.S., and Jacobsen, I.D. (2019). Fungi as part of the microbiota and interactions with intestinal Bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *422*, 265–301.
- Kawamata, H., and Manfredi, G. (2010). Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1375–1384.
- Kim, J., and Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.* *49*, 171–177.
- Kim, J.H., Lee, B.H., Kim, Y.M., Choi, J.H., Kim, G.H., Cheon, C.K., and Yoo, H.W. (2015). Novel mutations and clinical outcomes of copper-histidine therapy in Menkes disease patients. *Metab. Brain Dis.* *30*, 75–81.
- Klomp, L.W.J., Lin, S.J., Yuan, D.S., Klausner, R.D., Culotta, V.C., and Gitlin, J.D. (1997). Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* *272*, 9221–9226.
- Koehler, P., Stecher, M., Cornely, O.A., Koehler, D., Vehreschild, M.J.G.T., Bohlius, J., Wisplinghoff, H., and Vehreschild, J.J. (2019). Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* *25*, 1200–1212.

- Korfanty, G., Stanley, K., Lammers, K., Fan, Y.Y., and Xu, J. (2021). Variations in sexual fitness among natural strains of the opportunistic human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Genet. Evol.* *87*, 104640.
- Kwon-Chung, K.J., and Sugui, J.A. (2013). *Aspergillus fumigatus*-What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog.* *9*, 1–4.
- Labbé, S., Zhu, Z., and Thiele, D.J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 15951–15958.
- Ladomersky, E., and Petris, M.J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* *7*, 957–964.
- Lamb, A.L., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O’Halloran, T. V, and Rosenzweig, A.C. (1999). Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 724–729.
- Latgé, J.P., and Chamilos, G. (2020). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* *33*, 00140–18.
- Lee, D., Jang, E.H., Lee, M., Kim, S.W., Lee, Y., Lee, K.T., and Bahna, Y.S. (2019). Unraveling melanin biosynthesis and signaling networks in *Cryptococcus neoformans*. *MBio* *10*, 02267–19.
- Lengeler, K.B., Fox, D.S., Fraser, J.A., Allen, A., Forrester, K., Dietrich, F.S., and Heitman, J. (2002). Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: A step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot. Cell* *1*, 704–718.
- Li, C., Li, Y., and Ding, C. (2019). The role of copper homeostasis at the host-pathogen axis: From bacteria to fungi. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 175.
- Li, C.X., Gleason, J.E., Zhang, S.X., Bruno, V.M., Cormack, B.P., and Culotta, V.C. (2015). *Candida albicans* adapts to host copper during infection by swapping metal cofactors for superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5336–5342.
- Lim, F.Y., Won, T.H., Raffa, N., Baccile, J.A., Wisecaver, J., Keller, N.P., Rokas, A., and Schroeder, F.C. (2018). Fungal isocyanide synthases and xanthocillin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *MBio* *9*, 00785–18.
- Lin, S.J., Schranz, J., and Teutsch, S.M. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: Systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* *32*, 358–366.
- Linder, M.C., and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* *63*, 797S-811S.
- Liu, L., Tewari, R.P., and Williamson, P.R. (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* *67*, 6034–6039.
- Loftin, I.R., Franke, S., Roberts, S.A., Weichsel, A., Héroux, A., Montfort, W.R., Rensing, C., and McEvoy, M.M. (2005). A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* *44*, 10533–10540.

- Long, F., Su, C.C., Lei, H.T., Bolla, J.R., Do, S. V, and Yu, E.W. (2012). Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *367*, 1047–1058.
- Lorincz, M.T. (2018). Wilson disease and related copper disorders. *Handb. Clin. Neurol.* *147*, 279–292.
- Mackie, J., Szabo, E.K., Urgast, D.S., Ballou, E.R., Childers, D.S., MacCallum, D.M., Feldmann, J., and Brown, A.J.P. (2016). Host-imposed copper poisoning impacts fungal micronutrient acquisition during systemic *Candida albicans* infections. *PLoS One* *11*, 0158683.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 4813–4814.
- Markaryan, A., Morozova, I., Yu, H., and Kolattukudy, P.E. (1994). Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect. Immun.* *62*, 2149–2157.
- Mauch, R.M., Cunha, V. de O., and Dias, A.L.T. (2013). The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* *55*, 117–120.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., and Reade, P.C. (1996). *Candida albicans*: A review of its history, taxonomy, epidemiology virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* *25*, 136–144.
- Menkes, J.H., Alter, M., Steigleder, G.K., Weakley, D.R., and Sung, J.H. (1962). A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar. *Pediatrics* *29*, 764–779.
- Molero, G., Dfcz-Orejas, R., Navarro-García, F., Monleoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sánchez-Pérez, M., and Nombela, C. (1998). *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int. Microbiol.* *1*, 95–106.
- Møller, L.B., Mogensen, M., and Horn, N. (2009). Molecular diagnosis of Menkes disease: Genotype-phenotype correlation. *Biochimie* *91*, 1273–1277.
- Moss, R.B. (2005). Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* *43*, 203–206.
- Mullins, J., Harvey, R., and Seaton, A. (1976). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin. Allergy* *6*, 209–217.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., and O’Halloran, T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *182*, 5864–5871.
- Noble, S.M., Gianetti, B.A., and Witchley, J.N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 96–108.
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., and Dyer, P.S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* *457*, 471–474.
- Oliveri, V. (2020). Biomedical applications of copper ionophores. *Coord. Chem. Rev.* *422*, 213474.

- Osman, D., Waldron, K.J., Denton, H., Taylor, C.M., Grant, A.J., Mastroeni, P., Robinson, N.J., and Cavet, J.S. (2010). Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J. Biol. Chem.* *285*, 25259–25268.
- Osman, D., Patterson, C.J., Bailey, K., Fisher, K., Robinson, N.J., Rigby, S.E.J., and Cavet, J.S. (2013). The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P1B-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Mol. Microbiol.* *87*, 466–477.
- Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., and O’Halloran, T. V. (2001). The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *276*, 30670–30677.
- Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., Govender, N., Pappas, P.G., and Chiller, T.M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* *23*, 525–530.
- Park, Y.S., Lian, H., Chang, M., Kang, C.M., and Yun, C.W. (2014). Identification of high-affinity copper transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* *73*, 29–38.
- Paul, R., Banerjee, S., Sen, S., Dubey, P., Bachhawat, A.K., Datta, R., and Gupta, A. (2021). The novel leishmanial Copper P-type ATPase plays a vital role in intracellular parasite survival. *BioRxiv* 2021.01.01.425060.
- Paulussen, C., Hallsworth, J.E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W.C., Hamill, P.G., Blain, D., Rediers, H., and Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb. Biotechnol.* *10*, 296–322.
- Percival, S.S. (1998). Copper and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* *67*, 1064–1068.
- Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F., and Bouchara, J.P. (2009). Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol.* *9*, 1–11.
- Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2009). Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* *73*, 212–225.
- Portes, J.A., Motta, C.S., Azeredo, N.F., Fernandes, C., Horn, A., De Souza, W., DaMatta, R.A., and Seabra, S.H. (2017). In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. *Vet. Parasitol.* *245*, 141–152.
- Portnoy, M.E., Rosenzweig, A.C., Rae, T., Huffman, D.L., O’Halloran, T. V., and Culotta, V.C. (1999). Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J. Biol. Chem.* *274*, 15041–15045.
- Potrykus, J., Stead, D., MacCallum, D.M., Urgast, D.S., Raab, A., van Rooijen, N., Feldmann, J., and Brown, A.J.P. (2013). Fungal iron availability during deep seated candidiasis is defined by a complex interplay involving systemic and local events. *PLoS Pathog.* *9*, 1003676.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J. (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* *277*, 26021–26030.

- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., and O'Halloran, T. V (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805–808.
- Raffa, N., Osheroov, N., and Keller, N.P. (2019). Copper utilization, regulation, and acquisition by *aspergillus fumigatus*. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1980.
- Rasoloson, D., Shi, L., Chong, C.R., Kafsack, B.F., and Sullivan, D.J. (2004). Copper pathways in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes indicate an efflux role for the copper P-ATPase. *Biochem. J.* 381, 803–811.
- Reeder, N.L., Kaplan, J., Xu, J., Youngquist, R.S., Wallace, J., Hu, P., Juhlin, K.D., Schwartz, J.R., Grant, R.A., Fieno, A., et al. (2011). Zinc pyrithione inhibits yeast growth through copper influx and inactivation of iron-sulfur proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5753–5760.
- Rees, E.M., Lee, J., and Thiele, D.J. (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* 279, 54221–54229.
- Ren, F., Logeman, B.L., Zhang, X., Liu, Y., Thiele, D.J., and Yuan, P. (2019). X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nat. Commun.* 10, 1–9.
- Rensing, C., and McDevitt, S.F. (2013). The copper metallome in prokaryotic cells. *Met. Ions Life Sci.* 12, 417–450.
- Riggle, P.J., and Kumamoto, C.A. (2000). Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J. Bacteriol.* 182, 4899–4905.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C., and Montfort, W.R. (2002). Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2766–2771.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell* 7, 58–67.
- Rosas, Á.L., and Casadevall, A. (2006). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 265–272.
- Rosenzweig, A.C. (2001). Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc. Chem. Res.* 34, 119–128.
- Rosenzweig, A.C., Huffman, D.L., Hou, M.Y., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., and O'Halloran, T. V. (1999). Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure* 7, 605–617.
- Sandahl, T.D., Laursen, T.L., Munk, D.E., Vilstrup, H., Weiss, K.H., and Ott, P. (2020). The prevalence of Wilson's disease: An update. *Hepatology* 71, 722–732.
- Schatzman, S.S., Peterson, R.L., Teka, M., He, B., Cabelli, D.E., Cormack, B.P., and Culotta, V.C. (2020). Copper-only superoxide dismutase enzymes and iron starvation stress in *Candida* fungal pathogens. *J. Biol. Chem.* 295, 570–583.

- Scheiber, I., Dringen, R., and Mercer, J.F.B. (2013). Copper: Effects of deficiency and overload. *Interrelat. between Essent. Met. Ions Hum. Dis.* 13, 359–387.
- Scheinberg, I.H., and Sternlieb, I. (1960). The long term management of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Am. J. Med.* 29, 316–333.
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., and Brakhage, A.A. (2009). Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 493–503.
- Seidler, M.J., Salvenmoser, S., and Müller, F.M.C. (2008). *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4130–4136.
- Shin, L.J., Lo, J.C., and Yeh, K.C. (2012). Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol.* 159, 1099–1110.
- Silva, C.S., Durão, P., Fillat, A., Lindley, P.F., Martins, L.O., and Bento, I. (2012). Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: Characterization of a metallo-oxidase. *Metallomics* 4, 37–47.
- Skopp, A., Boyd, S.D., Ullrich, M.S., Liu, L., and Winkler, D.D. (2019). Copper–zinc superoxide dismutase (Sod1) activation terminates interaction between its copper chaperone (Ccs) and the cytosolic metal-binding domain of the copper importer Ctr1. *BioMetals* 32, 695–705.
- Srinivasan, C., Posewitz, M.C., George, G.N., and Winge, D.R. (1998). Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 37, 7572–7577.
- Sun, T.-S., Ju, X., Gao, H.-L., Wang, T., Thiele, D.J., Li, J.-Y., Wang, Z.-Y., and Ding, C. (2014). Reciprocal functions of *Cryptococcus neoformans* copper homeostasis machinery during pulmonary infection and meningoencephalitis. *Nat. Commun.* 5, 5550.
- Sustr, V., Foessleitner, P., Kiss, H., and Farr, A. (2020). Vulvovaginal candidosis: Current concepts, challenges and perspectives. *J. Fungi* 6, 1–14.
- Tan, G., Yang, J., Li, T., Zhao, J., Sun, S., Li, X., Lin, C., Li, J., Zhou, H., Lyu, J., et al. (2017). Anaerobic copper toxicity and iron-sulfur cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 00867–17.
- Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M., and Parsek, M.R. (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7242–7256.
- Tønnesen, T., Kleijer, W.J., and Horn, N. (1991). Incidence of Menkes disease. *Hum. Genet.* 86, 408–410.
- Tümer, Z., and Horn, N. (1997). Menkes disease: recent advances and new aspects. *J. Med. Genet.* 34, 265–274.
- Voronova, A., Kazantseva, J., Tuuling, M., Sokolova, N., Sillard, R., and Palumaa, P. (2007). Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase: Expression, purification, and formation of mixed disulphide adducts with thiol reagents. *Protein Expr. Purif.* 53, 138–144.

- Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., Höner zu Bentrup, K., Russell, D.G., and Bermudez, L.E. (2005). Elemental analysis of *Mycobacterium avium* -, *Mycobacterium tuberculosis* -, and *Mycobacterium smegmatis* -containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J. Immunol.* *174*, 1491–1500.
- Walton, F.J., Idnurm, A., and Heitman, J. (2005). Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* *57*, 1381–1396.
- Wang, H.X., Douglas, L.M., Amanianda, V., Latgé, J.P., and Konopka, J.B. (2011). The *Candida albicans* Sur7 protein is needed for proper synthesis of the fibrillar component of the cell wall that confers strength. *Eukaryot. Cell* *10*, 72–80.
- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., and Talaat, A.M. (2010). CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *77*, 1096–1110.
- Waterman, S.R., Hacham, M., Hu, G., Zhu, X., Park, Y.D., Shin, S., Panepinto, J., Valyi-Nagy, T., Beam, C., Husain, S., et al. (2007). Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* *117*, 794–802.
- Waterman, S.R., Park, Y. D., Raja, M., Qiu, J., Hammoud, D.A., O'Halloran, T. V., and Williamson, P.R. (2012). Role of CTR4 in the virulence of *cryptococcus neoformans*. *MBio* *3*, 285–297.
- Weissman, Z., Berdicevsky, I., Cavari, B.Z., and Kornitzer, D. (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3520–3525.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009). A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J. Biol. Chem.* *284*, 33949–33956.
- Williamson, P.R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *J. Bacteriol.* *176*, 656–664.
- Williamson, P.R., Wakamatsu, K., and Ito, S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* *180*, 1570–1572.
- Wilson, S.A.K. (1912). Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* *34*, 295–507.
- Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R., and Hamer, D.H. (1985). Yeast metallothionein. *J. Biol. Chem.* *260*, 14464–14470.
- Witchley, J.N., Penumetcha, P., Abon, N. V., Woolford, C.A., Mitchell, A.P., and Noble, S.M. (2019). *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. *Cell Host Microbe* *25*, 432–443.
- Wright, L.C., Santangelo, R.M., Ganendren, R., Payne, J., Djordjevic, J.T., and Sorrell, T.C. (2007). Cryptococcal lipid metabolism: Phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. *Eukaryot. Cell* *6*, 37–47.

Yamaguchi-Iwai, Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D.J., Klausner, R.D., and Dancis, A. (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* *272*, 17711–17718.

Yuan, D.S., Dancis, A., and Klausner, R.D. (1997). Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *272*, 25787–25793.

Zaragoza, O., Rocío, G.R., Nosanchuk, J.D., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., and Casadevall, A. (2010). Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* *6*, 1000945.

Zheng, S., Chang, W., Li, C., and Lou, H. (2016). Als1 and Als3 regulate the intracellular uptake of copper ions when *Candida albicans* biofilms are exposed to metallic copper surfaces. *FEMS Yeast Res.* *16*, 029.