

**WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE
WYBRANYCH CYKLICZNYCH HORMONÓW
PEPTYDOWYCH ORAZ ICH POCHODNYCH**

**COORDINATION PROPERTIES OF SELECTED CYCLIC
PEPTIDE HORMONES AND THEIR ANALOGUES**

Weronika Witak, Aleksandra Marciniak*

*Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław,
e-mail: aleksandra.marciniak@umed.wroc.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Hormony peptydowe

2. Cykliczne hormony peptydowe

3. Metale a hormony

4. Oksytocyna i wazopresyna

4.1. Właściwości koordynacyjne oksytocyny, wazopresyny i ich analogów

5. Hepcydyna

5.1. Właściwości koordynacyjne hepcydyny i jej fragmentów

6. Somatostatyna

6.1. Właściwości koordynacyjne analogów somatostatyny

7. Amylina

7.1. Właściwości koordynacyjne amyliny

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Weronika Witak – w 2018 roku ukończyła studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Od 2019 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Jej zainteresowania naukowe skupiają się na badaniu oddziaływań jonów metali z analogami strukturalnymi peptydów o znaczeniu biologicznym.



<https://orcid.org/0000-0002-2585-4243>

Dr inż. Aleksandra Marciniak – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W 2009 roku ukończyła studia na kierunku chemia na Politechnice Wrocławskiej. Od 2010 roku związana z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu, gdzie w 2016 roku otrzymała stopień doktora nauk farmaceutycznych. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badania oddziaływań peptydów o znaczeniu biologicznym oraz ich analogów z jonami metali oraz badania oddziaływań białek ze związkami o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, ze szczególnym uwzględnieniem metod spektroskopowych.



<https://orcid.org/0000-0003-2225-7897>

ABSTRACT

Hormones are a heterogeneous, significant compounds, responsible for proper functioning of living organisms, produced by specialized cells, tissues and glands. Theirs main role is signals transmission to target tissues, responsible for the right working of the whole organism. Dysfunctions of the hormones homeostasis balance lead to disease states [1–3]. Recently, scientists have paid attention to role of the metal ions in the proper synthesis of these compounds and functioning of human body [4]. More and more scientific works explain the complicated roles of metals as beneficial factors that stimulate the conformation of peptides. Metal ions are responsible for biological properties and influence of hormones binding to appropriate receptors, but also adverse factors [4,5]. The search for an answer to the question about the metal – hormone relationship has led to the development of a new, interdisciplinary studies: metalloendocrinology, linking inorganic chemistry with endocrinology [4].

In this work, we present the literature data that relate to metal – peptide hormone interactions. We focused on cyclic hormones with a disulfide bridge and their analogues. In our review we have focused on selected natural cyclic peptide hormones: oxytocin, vasopressin, somatostatin, hepcidin and amylin. The studies on the coordination abilities showed that transition metal ions, such as copper(II), zinc(II) or nickel(II), form stable complexes with described peptides. Metal ions actively participate in many phenomena. They have played role in the formation of amylin aggregates in patients with type 2 diabetes [6]. The high ability to copper(II) by hepcidin may have an effect on its homeostasis [7]. Stable complexes of oxytocin and vasopressin facilitate binding with appropriate receptors for these peptides [8].

Keywords: peptide hormones, cyclic peptide, disulfide bridge, metal ions

Słowa kluczowe: hormony peptydowe, peptydy, wiązanie disulfidowe, jony metali

WPROWADZENIE

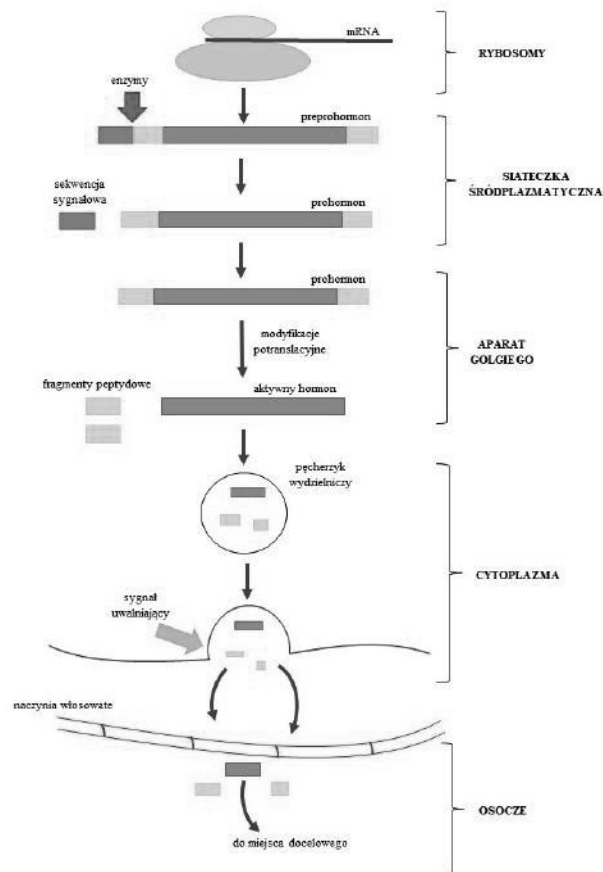
Układ hormonalny, jako jeden z najważniejszych w organizmie człowieka, składa się z szeregu gruczołów, takich jak: szyszynka, przysadka mózgowa, podwzgórze, tarczyca, przytarczyce, grasicca, wątroba, nadnercza, trzustka, jajniki czy jądra, tkanek oraz wyspecjalizowanych komórek nabłonkowych, które wydzielają przekaźniki chemiczne do krwi lub płynów pozakomórkowych [1,2]. Częsteczki te, zwane hormonami, odgrywają istotną rolę w organizmie – odpowiadają za regulację wielu procesów fizjologicznych takich jak: wzrost, metabolizm, rozmnażanie czy utrzymywanie homeostazy. Hormony produkowane są w niskich stężeniach i transportowane do komórek, gdzie wiążą się z odpowiednimi receptorami. Powszechnie wiadomo, że nie wszystkie hormony działają tylko w sposób endokryny, czyli poprzez wysyłanie sygnałów do odległych komórek za pomocą układu krwionośnego. Znane są również substancje, które działają w pobliżu komórek wydzielających – parakrynie lub inicjując sygnał bezpośrednio na komórkę je produkującą, czyli autokrynie [3].

Klasyfikacja hormonów następuje między innymi w zależności od miejsca pochodzenia, czy wiązania z receptorem. Najbardziej powszechnym jest podział na trzy grupy: hormony steroidowe jako pochodne cholesterolu, hormony będące pochodnymi aminokwasów lub amin, które powstają na skutek modyfikacji tyrozyny lub tryptofanu oraz najliczniejsze, hormony peptydowe/białkowe [3]. W niniejszej pracy zostaną przybliżone zagadnienia dotyczące grupy hormonów peptydowych.

1. HORMONY PEPTYDOWE

Budowa hormonów peptydowych waha się w zakresie od trzech do kilkudziesięciu reszt aminokwasowych, połączonych wiązaniami amidowymi. Są one syntezowane z udziałem rybosomów w postaci długich nieaktywnych polipeptydów, zwanych preprohormonami, które w swojej budowie zawierają między innymi jedną lub kilka kopii właściwego hormonu, sekwencję sygnałową, która odpowiada za wysyłanie cząsteczki peptydu do siateczki śródplazmatycznej oraz dodatkowe łańcuchy aminokwasowe (Rysunek 1). Takie cząsteczki następnie kierowane są do siateczki śródplazmatycznej, gdzie po odcięciu sekwencji sygnałowej powstają nieaktywne prohormony, które kolejno w aparacie Golgiego są poddawane modyfikacjom potranslacyjnym. W wyniku tych działań produkowane zostają pęcherzyki wydzielnicze, zawierające aktywne hormony peptydowe, które magazynowane są w cytoplazmie komórek i uwalniane na skutek bodźców zewnętrznych na drodze egzocytozy [9,10]. Hormony peptydowe, ze względu na swój lipofobowy charakter, nie są zdolne do przenikania bezpośrednio przez błonę komórkową. Dlatego wytworzyły mechanizmy, dzięki którym aktywnie

wiążą się z powierzchniowymi receptorami błonowymi i swobodnie przechodzą do wnętrza komórki [3].



Rysunek 1. Schemat syntezy hormonów peptydowych w organizmie człowieka [3]
 Figure 1. Scheme of synthesis of peptide hormones in human body [3]

Ich transport w organizmie odbywa się z udziałem płynu zewnątrzkomórkowego, dlatego hormony peptydowe charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, a okres półtrwania jest krótki i waha się w granicach kilku do kilkudziesięciu minut. W związku z tym, aby zapewnić organizmowi dostateczną ilość hormonów, ich wydzielanie musi przebiegać w sposób ciągły [3,11].

Hormony peptydowe są najliczniejszą spośród wszystkich grup hormonów. Różnią się między sobą budową, strukturą oraz miejscem występowania. Najpowszechniejszym miejscem ich wytwarzania jest przedni płąt przysadki mózgowej, gdzie produkowane są związki kontrolujące metabolizm kilku innych gruczołów i narządów, w tym gonad – hormon folikulotropowy i hormon luteinizujący, gruczołów sutkowych – prolaktyna, nadnerczy – hormon adrenokortykotropowy, tarczycy – tyreotropina, wątroby – hormon wzrostu [3,10]. Hormony peptydowe syntezowane są również w tylnym płacie przysadki mózgowej – oksytocyna i wazopresyna, przez podwzgórze – związki kontrolujące wydzielanie hormonów przez przysadkę, np. tyreoliberyna, przez tarczycę – kalcytonina i przytarczyce – parathormon, serce – przedsionkowy peptyd natriuretyczny, wątrobę – angiotensyna, żołądek i jelito cienkie – gastryna, cholecystokinina i sekretyna, trzustkę – insulina, amylina, glukagon i somatostatyna oraz inne wyspecjalizowane komórki, czego przykładem może być synteza greliny czy leptyny [3,12,13].

2. CYKLICZNE HORMONY PEPTYDOWE

Wśród dotychczas poznanych hormonów peptydowych możemy wyróżnić zarówno krótkie oligopeptydy zbudowane od 3 do kilku reszt aminokwasowych, przykładem jest tyreoliberyna, oksytocyna czy wazopresyna, jak i bardzo złożone, zawierające powyżej 100 reszt aminokwasowych, takie jak hormon wzrostu, leptyna czy prolaktyna. Związki te różnią się między sobą nie tylko długością łańcuchów peptydowych, ale również strukturą. Większość ludzkich hormonów jest peptydami liniowymi, które są elastyczne i podlegają degradacji przez proteazy [14]. Jednak część z nich posiada sztywną budowę cykliczną, która zostaje uzyskana poprzez utworzenie mostka disulfidowego pomiędzy dwiema resztami cysteiny, co chroni związki przed degradacją enzymatyczną i niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Do cyklicznych hormonów peptydowych zaliczamy: oksytocynę, wazopresynę, somatostatynę, kalcytoninę, amylinę, hepcydynę, czy najbardziej znaną spośród hormonów insulinę [15,16].

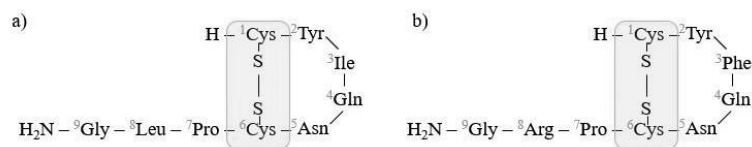
3. METALE A HORMONY

W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na rolę jonów metali w prawidłowej syntezie hormonów peptydowych oraz funkcjonowaniu całego układu dokrewnego. Liczne badania, poszukujące odpowiedzi na pytanie jaką rolę w organizmie odgrywa związek metal – hormon, spowodowały rozwój nowej, interdyscyplinarnej dziedziny nazwanej metaloendokrynologią [4].

Pierwsze zainteresowania wpływem metali na hormony narodziły się podczas badania czynników chemicznych, które zakłócają prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego i jego elementów, w tym produkowanych przez liczne gruczoły i komórki, cząsteczek sygnałowych zwanych hormonami. Badania te koncentrowały się przede wszystkim na metalach ciężkich, takich jak: kadm, ołów, arsen, rtęć [5]. Początkowo jony: cynku, selenu i miedzi, uznawane były za związki zaburzające działanie hormonów. Jednak przeprowadzenie wnikliwych doświadczeń biochemicznych dowiodło, że odgrywają one krytyczną rolę w regulowaniu szeregu procesów biologicznych, w tym działanie układu endokrynnego. Przypuszcza się, że jony metali wpływają na czynności hormonów peptydowych. Podczas syntezy tych związków jony metali wiążą się z DNA lub czynnikami transkrypcyjnymi i odpowiednio ułatwiają bądź hamują transkrypcję [4,17]. Metale mogą wiązać się bezpośrednio z hormonami po procesie translacji lub po wejściu do retikulum endoplazmatycznego, co wpływa na ich stabilność. Natomiast w aparacie Golgiego hormony peptydowe poddawane są modyfikacjom potranslacyjnym z udziałem licznej grupy peptydaz zależnych od jonów metali. Ponadto metale mogą również wpływać na konformację hormonów po wydzieleniu, stymulując bądź hamując ich aktywność biologiczną, a także odgrywają istotną rolę podczas wiązania ze swoistymi receptorami, co znacznie ułatwia interakcję typu hormon – receptor [4]. Te liczne oddziaływania typu metal – hormon stały się interesującym obiektem badawczym dla wielu grup, zajmujących się chemią bionieorganiczną. Badanie tworzenia stabilnych kompleksów jonów metali z hormonami peptydowymi, bądź ich fragmentami, pozwala na zgłębienie wiedzy odnośnie funkcjonowania układu hormonalnego na poziomie komórkowym, co w dalszym etapie umożliwi projektowanie nowych leków, bądź staje się efektywnym celem diagnostycznym.

4. OKSYTOCyna I WAZOPRESYNA

Oksytocyna i wazopresyna są cyklicznymi nonapeptydami, które różnią się w swojej budowie tylko jedną resztą aminokwasową – w pozycji 8 oksytocyna posiada leucynę, a wazopresyna argininę (Rysunek 2).



Rysunek 2. Schematyczna struktura pierwszorzędowa: a) oksytocyny i b) wazopresyny [18, 19]
 Figure 2. Schematic primary structure: a) oxytocin and b) vasopressin [18, 19]

Oba hormony produkowane są przez jądra przykomorowe i nadwzrokowe podwzgórza, a następnie przekazywane i magazynowane w tylnym płacie przysadki mózgowej [19]. Do najważniejszych funkcji oksytocyny należy przede wszystkim udział w skurczach macicy podczas porodu, jej obkurczanie po porodzie oraz pobudzanie laktacji [20]. W związku z tym znalazła ona powszechne zastosowanie jako środek przyspieszający akcję porodową. Ponadto, nazywana potocznie hormonem miłości, zaangażowana jest w złożone zachowania socjalne oraz odpowiada za tworzenie więzi emocjonalnych pomiędzy dzieckiem a matką i wyzwała potrzebę bliskości między partnerami [21]. Oksytocyna nie jest klasycznym hormonem krążącym jedynie we krwi. Działa również jako neuroprzekaznik i neuromodulator, poprzez swoiste receptory, których obecność wykazano między innymi w mózgu, rdzeniu kręgowym, jelitach czy nadnerczach [22].

Wazopresyna, strukturalnie podobna do oksytocyny, odpowiada w organizmie za resorpcję wody w kanalikach nerkowych. Drugą ważną jej funkcją jest zwężanie naczyń krwionośnych. Działanie antydiuretyczne wazopresyny skutkuje zagęszczeniem moczu, wzrostem ciśnienia tętniczego oraz zwiększeniem objętości krwi obwodowej [20]. Przypuszcza się, że hormon ten, podobnie jak oksytocyna, jest mediatorem w regulacji złożonego poznania i zachowań społecznych [19].

4.1. WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE OKSYTOCYNY, WAZOPRESYNY I ICH ANALOGÓW

Pierwsze doniesienia literaturowe, dotyczące właściwości koordynacyjnych oksytocyny i wazopresyny sięgają końca lat 80. i początku lat 90. ubiegłego stulecia. Udowodniono, że oksytocyna, wazopresyna i ich analogi tworzą stabilne kompleksy z jonami miedzi (II) [23, 24]. Finalnie w opisywanych układach powstawały formy kompleksowe, w których donorami jonu metalu były: aminowy atom azotu na N-końcu peptydu oraz trzy kolejne amidowe atomy azotu z wiązań peptydowych. Pomimo tego, że sposób koordynowania jonów miedzi (II) był tu podobny do tetraglicyny, to drugi i trzeci amidowy atom azotu rozpoczynały wiązanie w znacznie niższym pH, co skutkowało dużo większą stabilnością tych kompleksów. Powodem większej skuteczności było tu powstanie 20-członowego pierścienia, utworzonego na skutek związania jonu metalu oraz obecności mostka disulfidowego pomiędzy dwiema resztami cysteinyłowymi. Udowodniono również, że dodanie reszty aminokwasowej na N-końcu cząsteczki wazopresyny (a dokładniej, wydłużenie łańcucha peptydowego o resztę alaniny) spowodowało, że właściwości koordynacyjne tego peptydu były bardziej zbliżone do tetraglicyny,

przez co utracona została tu zdolność do zwiększonej stabilności kompleksów typu 4N [24, 25].

W 1995 roku Danyi i współpracownicy analizowali właściwości koordynacyjne kolejnych analogów oksytocyny i wazopresyny względem jonów Cu(II) [25]. Autorzy postanowili dodać na N-końcu hormonów peptydowych dodatkowe reszty aminokwasowe, wydłużając tym samym łańcuch peptydowy. Innymi wprowadzanymi modyfikacjami było zastąpienie glutaminy i asparaginy odpowiednio kwasem glutaminowym lub asparaginowym. Tak skonstruowane cząsteczki zawierały dodatkowe donory dla jonów miedzi (II), w porównaniu z natywnymi związkami. Otrzymane wyniki badań potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że jakakolwiek modyfikacja sekwencji peptydowej, zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz 20-członowego pierścienia, znacząco wpływa na konformację powstających form kompleksowych i skuteczność koordynowania jonu metalu. Zastąpienie glutaminy kwasem glutaminowym w 4-Glu-oksytocynie powodowało, że grupa karboksylowa tego aminokwasu brała udział w wiązaniu jonu metalu, co zwiększało stabilność kompleksu typu 2N o modelu koordynacyjnym $\{NH_2, N_{amid}^-\}$. Natomiast kompleks czteroazotowy tworzył się wtedy w nieco wyższym pH niż w przypadku niemodyfikowanej oksytocyny. Z kolei w przypadku 5-Asp-oksytocyny (w której asparagina została zastąpiona kwasem asparaginowym) nie obserwowano udziału grupy karboksylowej w koordynacji, jednakże zmiana ta znacząco wpływała na właściwości koordynacyjne, które w tym układzie były zbliżone do tetraglicyny. Ostatni z analizowanych peptydów z wydłużonym łańcuchem na N-końcu, GlyGlyGly-8-Lys-wazopresyna, wykazywał właściwości koordynacyjne zbliżone do 4-Glu-oksytocyny.

W 2003 roku Kleszczewski i współpracownicy opublikowali badania sugerujące, że związanie jonów miedzi (II) przez wazopresynę wzmacnia i modyfikuje aktywność skurczową hormonu [26]. Rola jonu metalu polega tu na ustabilizowaniu odpowiednich konformacji aromatycznych łańcuchów bocznych fenyloalaniny i tyrozyny, niezbędnych do oddziaływania z receptorem. Podobne obserwacje, dotyczące jonów metali i oksytocyny, opublikowano już w 1979 roku [27]. Z kolei w 2004 roku Liu i współpracownicy zbadali wpływ skoordynowania jonów Zn(II) przez oksytocynę na jej oddziaływanie z receptorami [28]. Wyniki pokazały, że konformacja oksytocyny znacząco zmienia się po związaniu z jonem metalu, co ułatwia oddziaływanie z receptorem. Potwierdziły to również dalsze eksperymenty z różnymi dwuwartościowymi jonami metali [8, 29].

Właściwości koordynacyjne analogów oksytocyny i wazopresyny zostały również opisane w pracach Justyny Brasuń i współpracowników [30–33]. Autorzy postanowili sprawdzić, jak na sposób koordynacji i efektywność wiązania jonów

metali wpłynie zastąpienie reszt cysteinyłowych resztami histydyłowymi. Tak zaprojektowane peptydy traciły strukturę cykliczną, ale dzięki wprowadzonej modyfikacji w cząsteczce pojawiały się dodatkowe donory dla jonów metali. Celem badań było określenie, czy możliwe jest powstawanie kompleksów, gdzie struktura cykliczna zostanie uzyskana dzięki związaniu jonu metalu. Pierwsza praca, opublikowana w 2008, prezentuje wyniki badań przeprowadzonych dla 1,6-His-wazopresyny [31]. Otrzymane wyniki pokazały, że w analizowanym układzie w zakresie pH fizjologicznego dominował kompleks, w którym jon miedzi (II) był koordynowany przez aminowy atom azotu z N-końca peptydu oraz dwa imidazolowe atomy azotu z reszt His. Zatem utworzona została tutaj oczekiwana makrochelatowa struktura cykliczna. Co więcej, okazało się, że wprowadzona modyfikacja znacząco wpłynęła na zwiększenie skuteczności koordynowania jonu metalu przez badany ligand, w porównaniu z niemodyfikowaną cząsteczką hormonu. W następnym kroku zbadano wpływ wprowadzenia dwóch reszt His zamiast Cys w cząsteczce oksytocyny [32]. Wyniki badań potencjometrycznych i spektroskopowych pokazały, że ligand ten również tworzy makrochelatowe kompleksy z dwoma imidazolowymi atomami azotu. Ponadto, przy pomocy technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), wyznaczono struktury 3D dla kompleksów histydyłowych analogów obu hormonów peptydowych. Wyniki tych badań pokazały, że kompleksy te mają podobną strukturę przestrzenną do kompleksów miedzi z natywnymi hormonami.

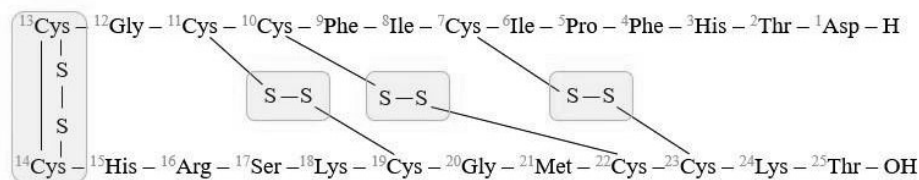
Przeprowadzono również analizę właściwości koordynacyjnych obu peptydów z jonami Zn(II) [33]. Podobnie jak w przypadku kompleksów z Cu(II), w analizowanych układach w fizjologicznym pH powstawały formy kompleksowe o modelu koordynacyjnym $\{NH_2, 2N_{Im}\}$. Zarówno jony miedzi, jak i jony cynku w wyżej opisywanych układach były, w całym analizowanym zakresie pH, skuteczniej wiązane przez histydyłowy analog wazopresyny, niż przez pochodną oksytocyny. Prawdopodobną przyczyną tej sytuacji jest hydrofobowe oddziaływanie pierścieni aromatycznych tyrozyny i fenyloalaniny w cząsteczce 1,6-His-wazopresyny. W związku z tym, w ostatniej z prac z tej serii autorzy postanowili sprawdzić jak na właściwości koordynacyjne histydyłowej pochodnej oksytocyny wpłynie zastąpienie Tyr przez Phe [30]. Otrzymane wyniki pokazały, że do pH około 7,5 zarówno peptydy z Tyr jak i Phe, cechują się podobną skutecznością koordynowania jonu miedzi. Powyżej tej wartości bardziej skuteczne stają się peptydy z fenyloalaniną w sekwencji.

Interesujące wyniki badań, dotyczące oksytocyny, przedstawili w swojej pracy z 2020 roku Mervinetsky i współpracownicy [34]. Autorzy zaprojektowali biosensor na bazie cząsteczki tego hormonu. Wykazuje on bardzo

wysoką czułość i selektywność względem jonów Zn(II). Może być stosowany do wykrywania jonów cynku w obecności jonów miedzi.

5. HEPCYDYNA

Hepcydyna jest hormonem peptydowym, produkowanym głównie w wątrobie, pełniącym rolę inhibitora ferroportyny. Została ona odkryta w 2000 roku, jako peptyd o silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym: przeciwgrzybiczym przeciwko *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, oraz *Aspergillus niger* i przeciwbakteryjnym przeciwko *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz paciorkowcom grupy B [35]. Przeprowadzone badania dowiodły, że ekspresja tego związku wzrasta w momencie obciążenia organizmu żelazem, co sugerowało kluczową rolę hormonu w regulacji homeostazy tego metalu [36]. Dotychczas w ludzkim moczu scharakteryzowano 3 różne formy hepcydyny, różniące się długością N-końca peptydu. Dwie dominujące formy zbudowane są odpowiednio z 20 i 25 reszt aminokwasowych. Każda z nich ma w swojej strukturze 8 reszt cysteinylowych, połączonych wewnątrzcząsteczkowo mostkami disulfidowymi [37]. Sekwencję bioaktywnej 25-aminokwasowej formy hepcydyny przedstawiono na Rysunku 3.



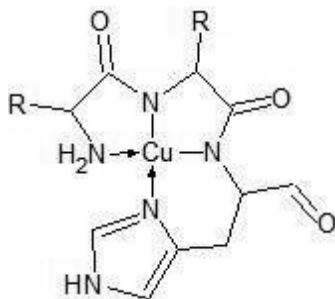
Rysunek 3. Struktura pierwszorzędowa bioaktywnej formy hepcydyny [35]

Figure 3. Primary structure of the bioactive form of hepcidin [35]

5.1. WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE HEPCYDINY I JEJ FRAGMENTÓW

Bardzo atrakcyjna z koordynacyjnego punktu widzenia jest sekwencja N-końca hepcydyny-25: Asp–Thr–His, z resztą histydylową w pozycji trzeciej w łańcuchu peptydowym (Rysunek 3). Jest to tak zwany motyw ATCUN (z ang. amino-terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding), będący efektywnym miejscem wiązania dla jonów Cu(II) i Ni(II), obecny na N-końcu wielu naturalnie występujących białek, np. albumin [38]. W bardzo stabilnym czteroazotowym kompleksie donorami dla jonu metalu są: aminowy atom azotu z grupy N-końca, imidazolowy

atom azotu z reszty histydylowej oraz dwa amidowe atomy azotu z wiązań peptydowych [39] (Rysunek 4).



Rysunek 4. Czterozotowy kompleks z jonami miedzi (II) w motywie ATCUN
Figure 4. Complex with four nitrogen atoms with copper (II) ions in ATCUN motif

W 2005 roku Melino i współpracownicy wykazali, że N-koniec hepcydyny jest miejscem wiązania jonów metali, takich jak miedź (II) i nikiel (II) [40].

Kolejne badania dotyczące hepcydyny i jej właściwości koordynacyjnych względem jonów metali zostały przeprowadzone przez Farnaunda i współpracowników [41,42]. Za pomocą MALDI-MS i metod spektroskopowych: UV-Vis, CD i EPR, badano oddziaływanie tego związku z jonami żelaza (III). Udowodniono, że donorami dla jonu metalu są tu cztery atomy siarki, a powstający kompleks ma strukturę tetraedryczną.

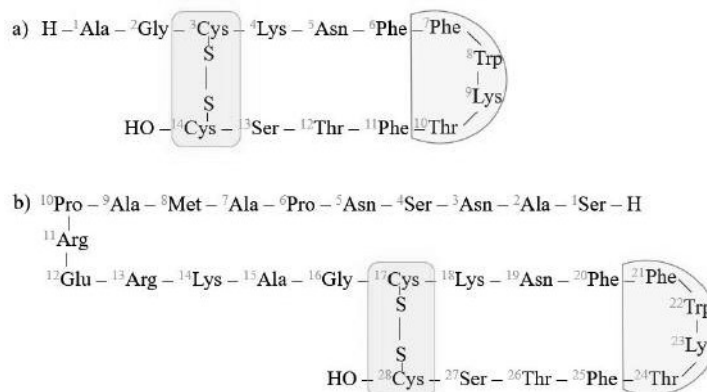
W 2010 roku Tselepis i współpracownicy postanowili uważniej przyjrzeć się właściwościom koordynacyjnym hepcydyny-25 [7]. Udowodnili oni, że hormon ten może tworzyć kompleksy z dwuwartościowymi jonami miedzi, niklu i cynku. Nie zaobserwowano jednak wiązania z jonami żelaza (III). Największe powinowactwo hepcydyna wykazywała względem Cu(II). W pracy tej udowodniono również, że zastąpienie reszty histydylowej w pozycji 3 oraz kwasu asparaginowego w pozycji 1 przez resztę alaniny zmniejszyło aktywność biologiczną badanego hormonu. Na podstawie otrzymanych wyników wysnuto wniosek, że wysoka zdolność do wiązania jonów miedzi przez hepcydynę, a co za tym idzie, prawdopodobne wiązanie tego pierwiastka również w warunkach *in vivo*, może mieć znaczący wpływ na homeostazę jonów żelaza i miedzi w organizmie.

W 2018 roku Płonka i współpracownicy przeanalizowali właściwości koordynacyjne heksapeptydu o sekwencji H-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-NH₂, będącego modelem fragmentu wiążącego jony miedzi (II) w cząsteczce hepcydyny [43]. Za pomocą metod spektroskopowych: UV-Vis i CD oraz miareczkowania potencjometrycznego, badacze udowodnili, że jest to najsilniej wiążący peptyd z dotychczas badanych. Analizowany N-końcowy fragment hepcydyny wyparł

całkowicie jony miedzi związane przez ludzką albuminę. W tym samym roku Abbas i współpracownicy analizowali oddziaływanie cząsteczki hepcydyny-25 z jonami miedzi (II) za pomocą metod LC-MS/MS i NMR [44]. Za pomocą techniki NMR wyznaczono struktury 3D powstających form kompleksowych. Potwierdzono powstawanie kompleksu, w którym jon metalu jest wiązany przez 4 atomy azotu: z N-końca peptydu, imidazolowy z reszty histydylowej oraz dwa amidowe z wiązań peptydowych. Co ciekawe, analiza próbek metodą MS w różnych stosunkach hepcydyny do jonów miedzi pokazała, że możliwe jest również tworzenie się kompleksów z dwoma jonami metalu.

6. SOMATOSTATYNA

Somatostatyna, jako kolejny spośród cyklicznych hormonów peptydowych, występuje w dwóch bioaktywnych formach, odpowiednio zbudowanych z 14 i 28 reszt aminokwasowych (Rysunek 5). Jest neuropeptydem produkowanym przez komórki parakryenne, zlokalizowane między innymi w układzie nerwowym. Ich obecność zidentyfikowano także w przewodzie pokarmowym, płucach oraz trzustce [45]. Somatostatyna działa za pośrednictwem interakcji z jej specyficznymi receptorami (sstr), których dotychczas scharakteryzowano 5 podtypów i oznaczono sstr 1-5 [46]. Za aktywność biologiczną i oddziaływanie z właściwymi receptorami odpowiedzialne są 4 reszty aminokwasowe –Phe–Trp–Lys–Thr–, oznaczone na Rysunku 5 kolorem zielonym. Tworzą one strukturę β -zgięcia, dodatkowo stabilizowaną przez strukturę cykliczną peptydu, uzyskaną dzięki utworzeniu wiązania disulfidowego pomiędzy obiema resztami cysteiny [47]. W organizmie człowieka somatostatyna pełni funkcję neuroprzekaźnika, wpływa na proliferację komórek, bierze udział w regulacji układu immunologicznego, hamuje wydzielanie hormonu wzrostu i tyreotropiny, a w przewodzie pokarmowym jest inhibitorem insuliny i glukagonu [48]. Szerokie spektrum działania somatostatyny skłoniło naukowców do syntezy jej skutecznych analogów, które posiadają dłuższy czas połowicznego zaniku przy jednoczesnym zachowaniu fragmentów odpowiedzialnych za aktywność biologiczną natywnego hormonu. Syntetyczne pochodne somatostatyny: oktreotyd, lanreotyd i wapreotyd znalazły liczne zastosowanie w diagnostyce i terapii [49–51].

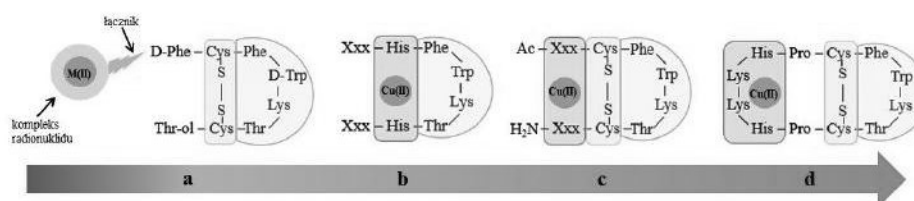


Rysunek 5. Schematyczna struktura pierwszorzędowa somatostatyny: a) 14 i b) 28 [48, 52]

Figure 5. Schematic primary structure of somatostatin: a) 14 and b) 28 [48, 52]

6.1. WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE ANALOGÓW SOMATOSTATYNY

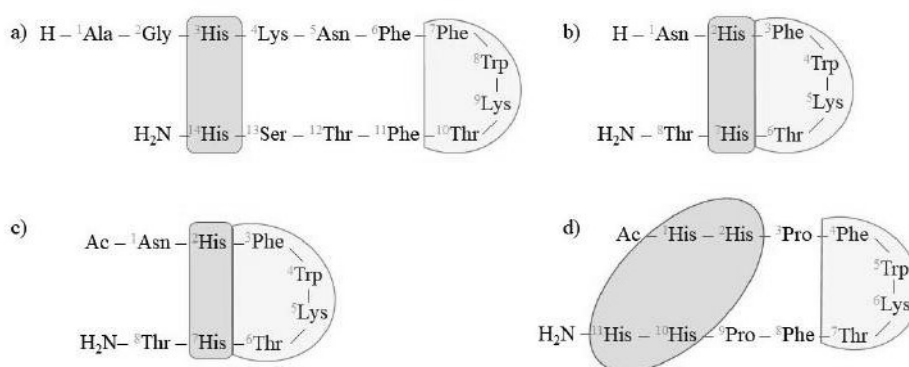
Jak opisano w rozdziale dotyczącym właściwości koordynacyjnych oksytocyny i wazopresyny, atrakcyjne wydaje się być zastąpienie w sekwencji aminokwasowej reszt cysteiny resztami histydylowymi. W ten sposób podejmuje się próbę otrzymania cząsteczki o strukturze cyklicznej, uzyskanej na skutek jej kompleksowania przez jon metalu (a nie przez obecność mostka disulfidowego, jak w przypadku natywnych hormonów). Podejście to zostało również wykorzystane przy projektowaniu liniowych analogów somatostatyny (Rysunek 6b).



Rysunek 6. Koncepcja badań przeprowadzonych dla analogów somatostatyny z jonami miedzi (II). Kolorem zielonym zaznaczono fragment odpowiedzialny za interakcję z sstr, pomarańczowym – mostek disulfidowy pomiędzy resztami cysteiny, niebieskim – miejsce koordynowania jonu metalu (a: analogi SST używane w medycynie, b: badane liniowe analogi SST, c: badane cykliczne analogi SST, d: badany bicykliczny analog SST)

Figure 6. The concept of research carried out for somatostatin analogues with copper (II) ions. The green is the fragment responsible for interaction with the sstr, orange – the disulfide bridge between cysteine residues, the blue – the metal ion coordinating site (a: SST analogues used in medicine, b: studied SST linear analogues, c: studied SST cyclic analogues, d: studied bicyclic SST analogue)

Prowadzone badania opierały się na poszukiwaniu nowych analogów somatostatyny, w których jon metalu byłby połączony bezpośrednio z częścią peptydu. Analogi somatostatyny obecnie stosowane w diagnostyce i terapii posiadają w swojej strukturze część peptydu, łącznik oraz skompleksowany radioaktywny jon metalu. Czynniki chelatujące są tu cząsteczki organiczne typu DOTA (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy), czy TETA (trietylenotetraamina) (Rysunek 6a).



Rysunek 7. Liniowe analogi somatostatyny: a) somatostatyny-14 z 2 resztami His zamiast Cys; b) z wolną grupą aminową; c) z acetylowaną grupą aminową; d) z 4 resztami His
 Figure 7. Linear somatostatin analogues: a) somatostatin-14 with 2 His residues instead of Cys; b) with free amino group; c) with acetylated amino group; d) with 4 His residues

Zaprojektowano i przebadano cztery liniowe analogi somatostatyny (Rysunek 6b, 7). Pierwszym analizowanym peptydem była pochodna somatostatyny-14 o sekwencji pokazanej na Rysunku 7a [53]. Modyfikacja wprowadzona do struktury analizowanego peptydu, w porównaniu do natywnego hormonu, polegała jedynie na zastąpieniu reszt cysteinyłowych resztami His. Ligand zaprojektowany w ten sposób posiadał jedną z reszt histydyłowych w 3 pozycji, podobnie jak wcześniej opisywany motyw ATCUN, obecny w ludzkiej albuminie, czy hepcydynie. Otrzymane wyniki pokazały, że to właśnie położenie tej reszty aminokwasowej determinowało właściwości koordynacyjne analizowanego peptydu. W układzie z nadmiarem liganda powstające formy kompleksowe były charakterystyczne dla peptydów z resztą His w trzeciej pozycji, a dominującym kompleksem była forma o modelu koordynacyjnym $\{NH_2, N_{im}, 2N_{amid}^-\}$. W całym analizowanym zakresie pH nie obserwowano form kompleksowych o strukturze cyklicznej. Pomimo tego,

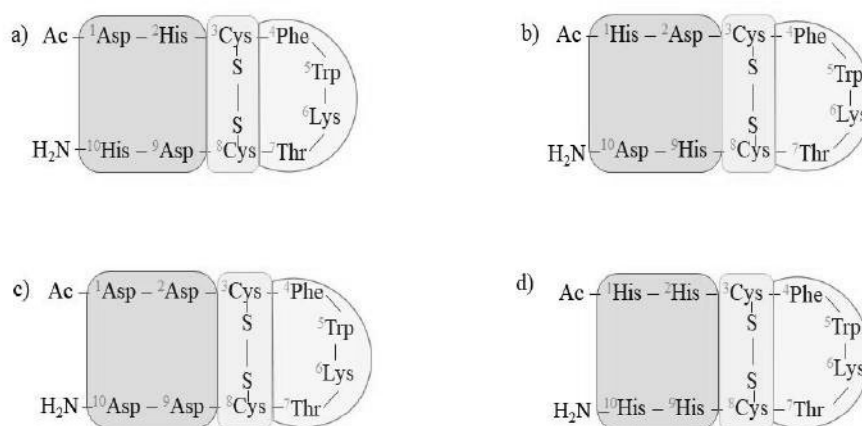
okazało się, że skuteczność wiązania jonów miedzi (II) przez opisywany liniowy analog somatostatyny jest większa niż przez histydylowy analog wazopresyny, czy prosty tripeptyd o sekwencji Gly–Gly–His. Ciekawy wynik dała również analiza zdolności koordynacyjnych liganda w obecności podwójnego nadmiaru jonów metalu. W analizowanym zakresie pH, pomiędzy 2,5 a 11, powstawały formy kompleksowe o różnej stechiometrii L:Cu(II), począwszy od 1:1, poprzez 2:3, a skończywszy na 1:2.

Kolejne dwie badane pochodne somatostatyny, to peptydy liniowe krótsze od poprzedniego liganda, różniące się między sobą grupą N-końca: w jednym z nich grupa aminowa była wolna, w drugim zablokowana (acetylowana) [54] (Rysunek 7b,c). W obydwu analizowanych związkach zachowano fragment istotny biologicznie, odpowiedzialny za oddziaływanie natywnego hormonu z receptorami, zbudowany z czterech aminokwasów: Phe–Trp–Lys–Thr. Celem badań było poszukiwanie form kompleksowych, które na skutek skoordynowania jonu miedzi (II) przez obie reszty histydylowe, miałyby strukturę cykliczną. Analiza otrzymanych wyników pokazała, że obydwa peptydy tworzą tego typu kompleksy. W przypadku peptydu z wolną grupą N-końcową forma kompleksowa CuL o modelu koordynacyjnym $\{NH_2, 2N_{lm}, N_{amid}^-\}$ dominowała w badanym układzie w zakresie pH od 6 do 9. Jednakże modelowanie molekularne pokazało, że struktura przestrzenna fragmentu istotnego biologicznie jest tu odmienna niż dla peptydu z resztami cysteinyłowymi i mostkiem disulfidowym pomiędzy nimi. W przypadku liganda z acetylowaną grupą na N-końcu peptydu pierwszą formą kompleksową, która powstawała w układzie był kompleks CuHL. Donorami dla jonu metalu były tu dwa imidazolowe atomy azotu. Zatem był to kompleks o strukturze cyklicznej, ale dominujący tylko w niskim zakresie pH, pomiędzy 5 a 6. Co ciekawe, struktura przestrzenna fragmentu odpowiedzialnego w natywnej cząsteczce za oddziaływanie z receptorami, wyznaczona za pomocą modelowania molekularnego, w przypadku tej formy jest bardzo zbliżona do jej cysteinyłowego odpowiednika. Wraz ze wzrostem pH w koordynację jonu miedzi (II) zaangażowane były kolejno amidowe atomy azotu z wiązań peptydowych, co powodowało utratę struktury cyklicznej.

Ostatni z grupy ligandów liniowych posiadał w sekwencji cztery reszty histydyny [55] (Rysunek 7d). Ponadto aminokwasy te zostały oddzielone od pozostałych w łańcuchu peptydowym za pomocą dwóch prolin, działających jako tzw. "break point" [56]. Działanie to polega na blokowaniu koordynowania jonu miedzi (II) przez kolejne amidowe atomy azotu z łańcucha peptydowego. Formy kompleksowe, które powstawały w tym układzie wraz ze wzrostem pH, miały odpowiednio następujące modele koordynacyjne: $\{1N_{lm}\}$, $\{2N_{lm}\}$, $\{3N_{lm}\}$, $\{4N_{lm}\}$. Dla kompleksu, w którym w wiązanie jonu miedzi (II) są zaangażowane cztery

reszty histydylowe wykonano porównanie jego struktury przestrzennej z cysteinylowym analogiem. Jednakże ułożenie fragmentów cząsteczek, istotnych z biologicznego punktu widzenia, było odmienne dla porównywanych peptydów.

Drugą grupę badanych analogów somatostatyny stanowiły cztery peptydy cykliczne [57,58] (Rysunek 6c, 8). Każdy z nich miał w swojej strukturze po cztery reszty aminokwasowe zdolne do koordynowania jonu miedzi (II), His i Asp w różnych konfiguracjach. Wszystkie badane ligandy efektywnie koordynowały jony metalu. Jednakże najbardziej skuteczny był ten, który posiadał w strukturze cztery reszty histydylowe. Pozbawienie peptydu tych reszt i zastąpienie ich resztami kwasu asparaginowego znacząco wpłynęło na obniżenie efektywności wiązania jonu Cu(II) [58].



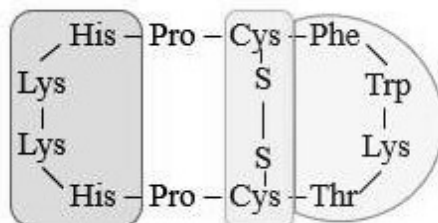
Rysunek 8. Cykliczne analogi somatostatyny: a) 1,9-Asp,2,10-His-SST i b) 1,9-His,2,10-Asp-SST, c) 1,2,9,10-Asp-SST, d) 1,2,9,10-His-SST

Figure 8. Cyclic somatostatin analogues: a) 1,9-Asp,2,10-His-SST i b) 1,9-His,2,10-Asp-SST, c) 1,2,9,10-Asp-SST, d) 1,2,9,10-His-SST

Ciekawe wyniki uzyskano w badaniu właściwości koordynacyjnych dwóch cyklicznych peptydów, różniących się jedynie położeniem reszt histydyny i kwasu asparaginowego (Rysunek 8a,b) [57]. Przeprowadzone badania pokazały, że niewielka modyfikacja w obrębie łańcucha peptydowego ma znaczący wpływ na skuteczność wiązania jonów miedzi (II). W całym analizowanym zakresie pH peptyd 1,9-His,2,10-Asp-SST okazał się być dużo bardziej efektywnym ligandem niż drugi z badanych analogów somatostatyny. Spowodowane jest to

prawdopodobnie tym, że 1,9-His,2,10-Asp-SST koordynuje jon metalu przez amidowe atomy azotu w niższym pH niż 1,9-Asp,2,10-His-SST, co znacząco podnosi jego skuteczność.

W roku 2020 ukazała się praca, opisująca właściwości koordynacyjne bicyklicznego analogu somatostatyny (Rysunek 6d, 9) [59]. Ligand został zaprojektowany w taki sposób, aby w cząsteczce znajdowały się dwa istotne fragmenty: cykliczny motyw z mostkiem disulfidowym, odpowiedzialny za interakcję z receptorami w natywnym peptydzie (zaznaczony na Rysunku 9 kolorem zielonym) oraz cykliczny fragment z resztami histydyłowymi, będący miejscem wiązania jonu metalu (zaznaczony na Rysunku 9 kolorem niebieskim). Otrzymane wyniki pokazały, że tak skonstruowana cząsteczka efektywnie koordynuje jon miedzi (II). Co ciekawe, zaobserwowano tu niezwykle dużą stabilność form kompleksowych, w których jon metalu był koordynowany tylko przez imidazolowe atomy azotu, dużo większą w porównaniu z innymi ligandami opisanymi w literaturze, wiążącymi Cu(II) w taki sam sposób. Prawdopodobnym powodem zwiększonej stabilności imidazolowych kompleksów jest wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie części cyklicznej, gdzie skoordynowany jest jon metalu, z aromatycznymi aminokwasami z drugiego cyklu, istotnego z biologicznego punktu widzenia.



Rysunek 9. Bicykliczna pochodna somatostatyny
Figure 9. Bicyclic somatostatin analogues

Otrzymane wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że odpowiednio modyfikując sekwencje analogów somatostatyny, można wpływać na skuteczność koordynowania jonu metalu, czy sposób jego związania. Taki sposób projektowania pochodnych tego hormonu peptydowego jest nietypowy, ale wyniki pokazują, że jon miedzi może tu być efektywnie wiązany bezpośrednio do łańcucha peptydowego. Ze względu na wiele doniesień literaturowych, pokazujących potencjalne zastosowanie radionuklidów miedzi w połączeniu z tą grupą związków i ich możliwości stosowania w diagnostyce i terapii [60], podejście to wydaje się być słuszne.

7. AMYLINA

Amylina jest hormonem neuroendokrynnym. Podobnie jak insulina, wydzielana jest przez komórki trzustki. Sekwencja składa się z 37 reszt aminokwasowych, z mostkiem disulfidowym pomiędzy resztami cysteinyłowymi w pozycjach 2 i 7, a C-koniec peptydu zawiera grupę amidową (Rysunek 10). Za aktywność biologiczną hormonu odpowiada obecność grupy amidowej i wiązań disulfidowych. Amylina działa jak synergistyczny partner insuliny, ponieważ reguluje poziom glukozy poprzez tłumienie wydzielania glukagonu i insuliny, spowalniając tym samym opróżnianie żołądka i promując tłumienie apetytu poprzez interakcje z receptorami kalcytoniny [61]. Ponadto hormon ten wpływa na rozszerzanie naczyń krwionośnych, a poprzez hamowanie aktywności osteoklastów przeciwdziała rozwojowi osteoporozy [62].



Rysunek 10 Schematyczna struktura pierwszorzędowa ludzkiej amyliny [61]

Figure 10. Schematic primary structure of human amylin [61]

7.1. WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE AMYLINY

W ostatnich latach intensywnie badany jest wpływ jonów metali na agregację amyliny. Udowodniono bowiem, że hormon ten jest kluczowym składnikiem agregatów białkowych, pojawiających się u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 [6]. Obecność takich dwuwartościowych jonów metali jak cynk, miedź i żelazo wydaje się tu być kluczowa. Oddziaływanie amyliny z różnymi jonami metali oraz rolę tych oddziaływań doskonale podsumowali i opisali w pracy przeglądowej z 2019 roku Mariusz i Łukasz Jareńko wraz ze współpracownikami [63].

Oddziaływanie z jonami Zn(II) zarówno ludzkiej jak i szczurzej amyliny oraz jej agonisty – pramlintydu, stosowanego w leczeniu cukrzycy, opisano w pracach Rowińskiej Żyrek i współautorów [64,65]. Podjęto próbę wyjaśnienia wpływu jonów cynku na proces agregacji amyliny. W pracach tych autorzy postulują, iż miejscem wiązania jonu cynku (II) jest reszta histydylowa w pozycji 18 oraz grupa

lizyny z N-końca. Taki sposób koordynacji wymusza zgięcie cząsteczki między resztami 1 a 18. Pokazano również, że po związaniu jonów cynku dobrze rozpuszczalny peptyd agreguje po upływie czasu.

Li i współpracownicy badali oddziaływanie amyliny z jonami Cu(II) za pomocą spektrometrii masowej [66]. Ich badania pokazały, że obecność jonów tego metalu hamuje powstawanie dimerów peptydu i ogranicza tworzenie fibryli. Obecność jonów miedzi (II) powoduje, że cząsteczki peptydu uzyskują drugorzędową strukturę przestrzenną typu "spinki do włosów". Natomiast dimeryzacja wpływa na pojawienie się struktur o charakterze β -kartki. W pracy tej udowodniono również, że bez względu na stosunek molowy dodanych jonów miedzi (II) do liganda, tworzą się wyłącznie kompleksy o stechiometrii 1:1. W 2016 roku Carolina Sanchez-Lopez i współpracownicy za pomocą metod spektroskopowych UV-Vis, CD i EPR oraz metody NMR określili donory koordynujące jon miedzi (II) przez cząsteczkę ludzkiej amyliny [67]. Udowodnili, że jon Cu(II) jest tu wiązany przez imidazolowy atom azotu reszty His-18 oraz dwa amidowe atomy azotu, pochodzące z reszt Ser-19 i Ser-20. Czwartym donorem dla jonu metalu jest atom tlenu z Ser-20. Możliwe jest tu wiązanie zarówno przez O z grupy hydroksylowej łańcucha bocznego, jak i karbonylowy donor tlenowy. Wyniki pokazały, że pierwsza z możliwości jest bardziej prawdopodobna. Dodatkowo, atom tlenu grupy CONH₂ z reszty aminokwasowej Asn-22 może pełnić rolę donoru aksjalnego. W pracy tej ponownie udowodniono, że reszty aminokwasowe zaangażowane w koordynację jonu miedzi (II) są kluczowe w tworzeniu struktur typu β -kartki i włókien amyloidowych. Okazuje się również, że współwystępowanie różnych form kompleksowych powoduje wyższą barierę energetyczną dla tworzenia fibryli amyloidowych. Zatem z powyższego opisu wyraźnie widać, że obecność jonów miedzi (II) ma znaczący wpływ na powstawanie agregatów białkowych, jednakże zgoła odmienny od jonów cynku.

UWAGI KOŃCOWE

Mimo rosnącej wiedzy na temat hormonów peptydowych i ich roli w organizmie człowieka, pytanie o rolę metali w ich prawidłowym funkcjonowaniu pozostaje w dalszym ciągu otwarte. W związku z tym zgłębianie wiedzy na temat oddziaływań typu metal – hormon w ostatnich latach stało się niezwykle interesującym i popularnym przedmiotem badań wśród naukowców. Tworzenie stabilnych form kompleksowych przez natywne hormony, czy ich strukturalne analogi z jonami metali przejściowych, może w przyszłości zostać wykorzystane w aspekcie projektowania nowych leków, bądź efektywnych czynników diagnostycznych. Warto podkreślić tu ogromny wkład polskich naukowców na rozwój

tej dziedziny nauki. W niniejszej pracy wiele z zacytowanych artykułów naukowych jest autorstwa badaczy, pochodzących z Polski.

PODZIĘKOWANIE

Autorki serdecznie dziękują Profesor Justynie Brasuń za cenne wskazówki i uwagi.

Praca powstała w ramach zadania statutowego nr SUB.D080.19.029 (Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W.W. de Herder, *Endocr. Connect.*, 2014, **3**, R94.
- [2] Tata Jamshed R., *EMBO Rep.*, 2005, **6**, 490.
- [3] D.U. Silverthorn, B.R. Johnson, W.C. Ober, C.W. Garrison, A.C. Silverthorn, *Human Physiology An Integrated Approach Edition 6E*, 2013.
- [4] M.J. Stevenson, K.S. Uyeda, N.H.O. Harder, M.C. Heffern, *Metallomics.*, 2019, **11**, 85.
- [5] I. Iavicoli, L. Fontana, A. Bergamaschi, *J. Toxicol. Environ. Heal.-Part B Crit. Rev.* 2009, **12**, 206.
- [6] A. Sinopoli, A. Magri, D. Milardi, M. Pappalardo, P. Pucci, A. Flagiello, J.J. Titman, V.G. Nicoletti, G. Caruso, G. Pappalardo, G. Grasso, *Metallomics.*, 2014, **6**, 1841
- [7] C. Tselepis, S.J. Ford, A.T. McKie, W. Vogel, H. Zoller, R.J. Simpson, J. Diaz Castro, T.H. Iqbal, D.G. Ward, *Biochem. J.*, 2010, **427**, 289.
- [8] X. Xu, W. Yu, Z. Huang, Z. Lin, *J. Phys. Chem. B.*, 2010, **114**, 1417.
- [9] O. Mirabeau, E. Perlas, C. Severini, E. Audero, O. Gascuel, R. Possenti, E. Birney, N. Rosenthal, C. Gross, *Genome Res.*, 2007, **17**, 320.
- [10] G. Palade, *Science*, 1975, **189**, 347.
- [11] A.E. Pontiroli, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **29**, 81.
- [12] Y. Date, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M.S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato, *Endocrinology*, 2000, **141**, 4255.
- [13] Y. Zhang, K.Y. Guo, P.A. Diaz, M. Heo, R.L. Leibel, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 2002, **282**, R226.
- [14] V.J. Hruby, *Biopolymers.*, 2016, **106**, 884.
- [15] S.H. Joo, *Biomol. Ther.*, 2012, **20**, 19.
- [16] S. Hess, O. Ovadia, D.E. Shalev, H. Senderovich, B. Qadri, T. Yehezkel, Y. Salitra, T. Sheynis, R. Jelinek, C. Gilon, A. Hoffman, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6201.
- [17] S.A. Lambert, A. Jolma, L.F. Campitelli, P.K. Das, Y. Yin, M. Albu, X. Chen, J. Taipale, T.R. Hughes, M.T. Weirauch, *Cell.*, 2018, **175**, 598.
- [18] R. Acher, J. Chauvet, *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **12**, 487.
- [19] M.J. Brownstein, J.T. Russel, H. Gainer, *Science*, 1980, 207, 373.
- [20] C.W. Gruber, *Exp. Physiol.*, 2014, **99.1**, 55.
- [21] R. Feldman, I. Gordon, O. Zagoory-Sharon, *Developmental Science*, 2011, **14**, 752.
- [22] R. Ivell, T. Kimura, D. Müller, K. Augustin, N. Abend, R. Bathgate, R. Telgmann, M. Balvers, G. Tillmann, A.R. Fuchs, *Exp. Physiol.*, 2001, **86.2**, 289.
- [23] W. Bal, H. Kozłowski, B. Lammek, K. Rolka, L.D. Pettit, *J. Inorg. Biochem.*, 1992, **45**, 193.
- [24] H. Kozłowski, B. Radomska, G. Kupryszewski, B. Lammek, C. Livera, L.D. Pettit, S. Pyburn, *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.*, 1989, 173.

- [25] P. Danyi, K. Várnagy, I. Sóvágó, I. Schön, D. Sanna, G. Micera, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **60**, 69.
- [26] T. Kleszczewski, B. Modzelewska, W. Bal, M. Sipowicz, A. Kostrzevska, *Contraception.*, 2003, **67**, 477.
- [27] A.F. Pearlmutter, M.S. Soloff, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 3899.
- [28] D. Liu, A.B. Seuthe, O.T. Ehrler, X. Zhang, T. Wyttenbach, J.F. Hsu, M.T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2024
- [29] T. Wyttenbach, D. Liu, M.T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 5993.
- [30] A. Kotynia, Z. Czyznikowska, M. Cebrat, Ł. Jaremko, O. Gładysz, M. Jaremko, A. Marciniak, J. Brasuń, *Inorganica Chim. Acta.*, 2013, **396**, 40.
- [31] J. Brasuń, M. Cebrat, A. Sochacka, O. Gładysz, J. Świątek-Kozłowska, *Dalt. Trans.* 2008, 4978.
- [32] J. Brasuń, M. Cebrat, Ł. Jaremko, M. Jaremko, G. Ilc, O. Gładysz, I. Zhukov, *Dalt. Trans.*, 2009, 4853.
- [33] J. Brasuń, M. Cebrat, M. Jaremko, Ł. Jaremko, O. Gładysz, I. Zhukov, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 1033.
- [34] E. Mervinetsky, I. Alshanski, K.K. Tadi, M. Hurevich, S. Yitzchaik, A. Dianat, J. Buchwald, R. Gutierrez, G. Cuniberti, G. Cuniberti, G. Cuniberti, *J. Mater. Chem. B.*, 2019, **8**, 155.
- [35] C.H. Park, E. V. Valore, A.J. Waring, T. Ganz, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 7806.
- [36] G. Nicolas, M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn, S. Vaulont, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 8780.
- [37] H.N. Hunter, D. Bruce Fulton, T. Ganz, H.J. Vogel, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 37597.
- [38] C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 123.
- [39] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 319.
- [40] S. Melino, L. Garlando, M. Patamia, M. Paci, R. Petruzzelli, *J. Pept. Res.*, 2005, **66**, 65.
- [41] S. Farnaud, C. Rapisarda, T. Bui, A. Drake, R. Cammack, R.W. Evans, *Biochem. J.*, 2008, **413**, 553.
- [42] S. Farnaud, A. Patel, R.W. Evans, *Biometals.*, 2006, **19**, 527.
- [43] D. Płonka, W. Bal, *Inorganica Chim. Acta.*, 2018, **472**, 76.
- [44] I.M. Abbas, M. Vranic, H. Hoffmann, A.H. El-Khatib, M. Montes-Bayón, H.M. Möller, M.G. Weller, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, **19**, 2271.
- [45] O. Keskin, S. Yalcin, *Onco. Targets. Ther.*, 2013, **6**, 471.
- [46] R. Panetta, M.T. Greenwood, A. Warszynska, L.L. Demchyshyn, R. Day, H.B. Niznik, C.B. Srikant, Y.C. Patel, *Mol. Pharmacol.* 1994, **45**, 417.
- [47] A.G. Harris, *Gut* 1994, **35**, S1.
- [48] M.A. Sheridan, J.D. Kittilson, B.J. Slagter, *Am. Zool.*, 2000, **40**, 269.
- [49] S. Massironi, D. Conte, R.E. Rossi, *Scand. J. Gastroenterol.*, 2016, **51**, 513.
- [50] M. E. Caplin, M. Pavel, J. B. Ćwikła, A. T. Phan, M. Raderer, E. Sedláčková, G. Cadiot, E. M. Wolin, J. Capdevila, L. Wall, G. Rindi, A. Langley, S. Martinez, J. Blumberg, P. Ruszniewski, *N. Engl. J. Med.*, 2014, **371**, 224.
- [51] C. Bartheuf, H. Pourrat, A. Pourrat, H. Ibrahim, P. E. Cottier, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1994, **71**, 161.
- [52] L. Pradayrol, H. Jörnval, V. Mutt, A. Ribet, *FEBS Lett.*, 1980, **109**, 55.
- [53] A. Marchewka, Z. Czyznikowska, M. Cebrat, J. Brasuń, *Polyhedron.*, 2012, **42**, 236.
- [54] A. Marciniak, M. Cebrat, Z. Czyznikowska, J. Brasuń, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **117**, 10.
- [55] A. Marciniak, Z. Czyznikowska, M. Cebrat, A. Kotynia, J. Brasuń, *Inorganica Chim. Acta.* 2014, **416**, 57.
- [56] L.D. Pettit, I. Steel, G. Formicka-Kozłowska, T. Tatarowski, M. Bataille, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 1985, 535.
- [57] A. Marciniak, M. Cebrat, J. Brasuń, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2017, **23**, 135.

- [58] A. Marciniak, A. Kotynia, M. Cebrat, J. Brasuń, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2019, **26**, 969.
- [59] A. Marciniak, W. Witak, A. Pieniężna, J. Brasun, *Chem. Biodivers.*, 2020, **17**, e2000307.
- [60] A. Marciniak, J. Brasuń, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2017, **313**, 279.
- [61] Y. Kiriya, H. Nochi, *Cells*, 2018, **7**, 95.
- [62] J. Cornish, K.E. Callon, G.J.S. Cooper, I.R. Reid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **207**, 133.
- [63] M. Alghrably, I. Czaban, Ł. Jaremko, M. Jaremko, *J. Inorg. Biochem.*, 2019, **191**, 69.
- [64] M. Rowinska-Żyrek, *Wiad. Chem.*, 2018, **72**, 469.
- [65] M. Rowińska-Zyrek, *Dalt. Trans.*, 2016, **45**, 8099.
- [66] H. Li, E. Ha, R.P. Donaldson, A.M. Jeremic, A. Vertes, *Anal. Chem.* 2015, **87**, 9829.
- [67] C. Sánchez-López, R. Cortés-Mejía, M.C. Miotto, A. Binolfi, C.O. Fernández, J.M. del Campo, L. Quintanar, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 10727.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 lipca 2020 r.