

**DOBRY AMYLOID  $\beta$ ? WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE  
PEPTYDÓW  $A\beta_{4-x}$  WSKAZUJĄ NA ICH ZNACZENIE  
BIOLOGICZNE**

GOOD  $\beta$ -AMYLOID? CHEMICAL PROPERTIES OF  $A\beta_{4-x}$   
PEPTIDES INDICATE THEIR BIOLOGICAL RELEVANCE

**Wojciech Bal**

*Institut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa  
e-mail: wbal@ibb.waw.pl; wojciech.bal.ibb@gmail.com*

---

*Pracę dedykuję pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Peptydy  $A\beta$

2. Kompleksy miedziowe peptydów  $A\beta_{1-x}$

3. Kompleksy miedziowe peptydów  $A\beta_{4-x}$  i ich  
reaktywność Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**Prof. dr hab. Wojciech Bal** w r. 1987 ukończył studia magisterskie na Wydziale Matematyki Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, na kierunku chemia. Pracę doktorską z zakresu chemii bionieorganicznej wykonał w r. 1991 pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Kozłowskiego. W latach 1992–1996 odbył staże podoktorskie w Birkbeck College, University of London i National Cancer Institute (NIH, USA). Stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych uzyskał na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w r. 1999. W latach 2001 i 2002 prowadził badania w ramach stypendium

Fundacji Humboldta na Uniwersytecie Karlsruhe. Od 2002 r. pracuje w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, gdzie w 2006 r. uzyskał tytuł profesora nauk biologicznych. Obecnie pełni funkcję kierownika Zakładu Biofizyki IBB PAN. Jego zainteresowania naukowe obejmują chemię bionieorganiczną i toksykologię chemiczną jonów metali przejściowych oraz biotechnologię białek.



<https://orcid.org/0000-0003-3780-083X>

---

**ABSTRACT**

Alzheimer's Disease is a neurodegenerative condition, an irreversible progressive dementia caused by death of neurons in brain structures responsible for memory related processes. Despite many years of research and numerous trials, no therapy succeeded that could stop the development of this disease, which affects tens of millions of patients worldwide.

The amyloid cascade prevails among a variety of possible mechanisms of its development proposed in the scientific literature. It proposes that death of neurons, preceded by dysfunction of their synaptic activity is caused by the incremental formation of structures (fibrils, oligomers) composed of  $A\beta$  peptides. In its copper variant the processes of aggregation and oxidative stress, causing the inflammation and neuronal damage are related to the formation of reactive Cu(II) complexes with  $A\beta$  peptides.

$A\beta$  peptides are a family of molecules with similar amino acid sequences, differing mainly by the presence of longer or shorter terminal sequences. Their physiological role of is unclear.  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{1-40}$  have been mostly studied, but most studies have ignored a very abundant *N*-terminally truncated species  $A\beta_{4-42}$ . We recognized it, and more gene-rally the  $A\beta_{4-x}$  peptide family as potentially strong Cu(II) ligands, due to the presence at their *N*-termini of the Phe-Arg-His amino acid sequence, comprising the ATCUN/NTS structural motif. This observation was followed by vigorous research performed in our laboratory.

We studied the ability of  $A\beta_{4-x}$  peptides to bind Cu(II) ions, their electrochemical properties and redox reactivity, interactions with proteins which bind copper under physiological conditions, their aggregation properties in the Cu(II) presence and susceptibility to proteolysis. Additionally, we investigated their interaction with a molecule of a therapeutic potential. We demonstrated that  $A\beta_{4-x}$  peptides can be primary copper binding agents in extracellular spaces in the brain, able to instantaneously intercept copper from  $A\beta_{1-x}$  peptides studied so far. Cu(II) complexes of  $A\beta_{4-x}$  peptides are highly resistant to oxidation and reduction, release copper ions to other molecules slowly and reluctantly, and do not produce reactive oxygen species. In accordance with these properties we proposed a physiological role for the  $A\beta_{4-42}$  peptide as a molecule cleansing the synaptic cleft from  $\text{Cu}^{2+}$  ions and thereby assuring the correct neurotransmission. This function can however be disturbed by an inappropriate pharmacological intervention. The results of studies of the effect of cupric ions on the aggregation and membrane interactions of the  $A\beta_{4-40}$  peptides suggest that copper can inhibit the  $A\beta_{4-x}$  peptides toxicity, thereby providing an additional support for our concept. Studies of hydrolysis of  $A\beta$  peptides and properties of its products revealed a possibility for a significant role of short fragments in the brain copper physiology. Our hypothesis awaits verification by biological studies. The issue of metabolism of the studied complexes is a key issue remaining to be solved.

**Keywords:** Amyloid  $\beta$  peptides, Alzheimer's disease, ATCUN/NTS, Cu(II) binding, redox reactivity

**Słowa kluczowe:** peptydy  $\beta$ -amyloidowe, choroba Alzheimera, ATCUN/NTS, wiązanie Cu(II), aktywność redoks

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

$A\beta$	– peptydy $\beta$ -amyloidowe (ang. <i>Amyloid <math>\beta</math> peptides</i> )
AD	– choroba Alzheimera (ang. <i>Alzheimer's disease</i> )
ATCUN/NTS	– amino-końcowy motyw wiążący Cu, Ni / miejsce N-końcowe) (ang. <i>Amino-terminal Cu, Ni binding motif/N-terminal Site</i> )
$K_{7,4}^C$	– warunkowa stała trwałości w pH 7,4
FAD	– postać rodzinna choroby Alzheimera (ang. <i>familial Alzheimer's disease</i> )
HSA	– albumina osocza krwi człowieka (ang. <i>human serum albumin</i> )
PBT2	– 5,7-dichloro-2-[(dimetyloamino)metylo]chinolin-8-ol
PMR	– płyn mózgowo-rdzeniowy
SAD	– postać sporadyczna choroby Alzheimera (ang. <i>sporadic Alzheimer's disease</i> )

## WPROWADZENIE

Choroba Alzheimerera (ang. *Alzheimer's Disease*, AD) jest chorobą neurodegeneracyjną, z nieodwracalną postępującą demencją, u podłoża której leży śmierć neuronów w strukturach mózgu odpowiedzialnych za procesy związane z pamięcią [1–3]. Pomimo wieloletnich badań i licznych prób, jak dotąd, nie udało się opracować skutecznej terapii, która mogłaby powstrzymać rozwój tej choroby, dotyczącej od kilkunastu do kilkudziesięciu milionów osób w skali światowej. Głównym czynnikiem ryzyka AD jest wiek pacjenta. Choroba ta zatem dotyczy głównie osób w krajach rozwiniętych, o dużej długości życia, ale wraz z postępem cywilizacyjnym ogarnia cały świat, niosąc cierpienie i ogromne koszty społeczne i materialne, liczone w dziesiątkach miliardów dolarów.

Wyróżnia się dwie odmiany AD, postać sporadyczną (ang. *sporadic Alzheimer's disease*, SAD), której objawy pojawiają się w wieku późniejszym, po 65 roku życia, i o wiele rzadszą postać rodzinną (ang. *familial Alzheimer's disease*, FAD), której objawy występują dużo wcześniej, zazwyczaj około 40 roku życia. W obu przypadkach choroba rozwija się powoli, choć ma szybszy przebieg w FAD [4]. W przypadku SAD, charakteryzujące ją markery biochemiczne poprzedzają o co najmniej dziesięć lat pojawienie się pierwszych objawów klinicznych [5, 6]. Pacjenci stopniowo tracą zdolności poznawcze, pamięć krótko- i długoterminową, a w dalszym przebiegu choroby, która nieodwołalnie kończy się śmiercią pacjenta, pojawiają się zaburzenia psychiczne ze spektrum schizofrenii. W obu postaciach choroby wyróżnia się czynniki genetyczne, które w przypadku FAD [7] wyraźnie dominują.

W literaturze naukowej opisywane są różne możliwe mechanizmy molekularne rozwoju AD. Niepodważanym w zasadzie faktem jest obecność w jej początkowych stadiach, jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych, tzw. złożeń amyloidowych tworzonych przez peptydy  $\beta$ -amyloidowe (w skrócie  $A\beta$ ). Wiadomo również, że w praktycznie wszystkich rozpoznanych odmianach FAD następuje albo nadprodukcja tych peptydów, albo peptydy te – na skutek mutacji – przejawiają nadmierną skłonność do agregacji. Efekty te są związane z mutacjami genu dla białka APP, prekursora peptydów  $A\beta$  lub enzymów proteolitycznych, które wycinają peptydy  $A\beta$  z białka APP [8]. Na podstawie tych obserwacji oraz licznych badań eksperymentalnych na zwierzętach uznano, że prawdopodobnym mechanizmem AD jest tzw. kaskada amyloidowa, w której śmierć neuronów, poprzedzona zaburzeniem ich funkcji synaptycznych, jest spowodowana narastającym tworzeniem się neurotoksycznych struktur (nierozpuszczalnych fibryl i/lub rozpuszczalnych oligomerów) złożonych z peptydów  $A\beta$  [9]. Hipoteza kaskady amyloidowej wydaje się dość dobrze tłumaczyć gwałtowny przebieg rodzinnej postaci choroby, jest natomiast dość szeroko krytykowana jako wyłączna lub zasadnicza koncepcja etiologii SAD [10]. Krytyka ta wynika po części z faktu, że terapie eksperymentalne, nakierowane na zahamowanie tworzenia peptydów  $A\beta$  lub ich agregacji, jak się wydaje, nie powstrzymują rozwoju choroby. Ponadto okazało się, że peptydy  $A\beta$  są niezbędnym

składnikiem fizjologii mózgu, a ich usunięcie również wywołuje demencję. Nie ma jednak jasności co do ich konkretnej roli fizjologicznej [11].

W środowisku badaczy właściwości chemicznych peptydów  $A\beta$  powstała modyfikacja hipotezy kaskady amyloidowej, jej wersja miedziowa [12]. Według niej, procesy agregacji i stres oksydacyjny, powodujący stan zapalny i uszkodzenie neuronów w FAD i SAD, są związane z tworzeniem reaktywnych kompleksów jonów  $Cu(II)$  z tymi peptydami i stabilizacją pary redoks  $Cu(I)/Cu(II)$ . Punktem wyjścia dla tej koncepcji jest obserwacja, że płytki amyloidowe, czyli złogi złożone ze zagregowanych w formie fibryl peptydów  $A\beta$ , izolowane *post mortem* z mózgow chorych, zawierają duże ilości miedzi [13, 14]. Natomiast jej szczegółowe propozycje i pre-dykcje są oparte przede wszystkim na wynikach badań *in vitro*, przedstawionych pokrótce poniżej [15, 16].

Należy tu dodać, że w płytkach amyloidowych wykryto również duże ilości cynku, wapnia i żelaza. Cynk i wapń nie są aktywne redokso i nie są rozważane jako źródło stresu oksydacyjnego. Najnowsze badania wskazują natomiast, że żelazo jest obecne w płytkach w postaci mikrokryształów magnetytu i cząstek żelaza meta-licznego, nie jest więc związane z peptydami  $A\beta$  i raczej nie stanowi bezpośredniego źródła stresu oksydacyjnego [17].

Jedną z konsekwencji hipotezy miedziowej kaskady amyloidowej jest propozycja, że wprowadzenie do mózgu osoby cierpiącej na AD odpowiednio dobranych chelatorów/jonoforów miedziowych powinno doprowadzić do zatrzymania procesu chorobowego, poprzez rozłożenie kompleksów peptydów  $A\beta$  z jonami  $Cu(II)$  w przestrzeni pozakomórkowej i przeniesienie odzyskanych jonów miedziowych do komórek [18]. Koncepcji tej jednak nie potwierdzają badania kliniczne przeprowadzone dla 5,7-dichloro-2-[(dimetyloamino) metylo]chinolin-8-olu (PBT2), prominentnego przedstawiciela tej grupy związków [19]. W badaniach tych stosowanie PBT2 nie przyniosło poprawy zdolności poznawczych pacjentów, pomimo uprzednich pozytywnych wyników badań na zwierzętach laboratoryjnych. Ta i inne próby zastosowania chelatorów/jonoforów w leczeniu AD zostały ostatnio dogłębnie przedyskutowane i poddane zasadniczej krytyce [20].

## 1. PEPTYDY $A\beta$

Dla ułatwienia zrozumienia tego stanu rzeczy, należy przyrzeć się peptydom  $A\beta$ . Stanowią one rodzinę cząsteczek o zbliżonych sekwencjach aminokwasowych, różniących się głównie obecnością dłuższych lub krótszych sekwencji na obu końcach łańcucha aminokwasowego. Powstają w wyniku działania proteaz na białko prekursorowe APP, naturalny składnik błony komórkowej neuronów, pełniący nie do końca ustaloną funkcję [21]. Peptydy  $A\beta$  powstają w mniejszościowym procesie proteolitycznym z udziałem enzymów  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy, obejmującym 10–20% cząsteczek APP. Proces ten był początkowo uważany za wyłącznie patologiczny, w przeciwieństwie do procesu większościowego, w którym APP jest trawione przez

$\alpha$ -sekrează w środku odcinka wycinanego przez  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy [22]. Uważa się, że pierwotnie powstają przede wszystkim dwa peptydy,  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{1-40}$ , które podlegają dalszej proteolizie i modyfikacjom potranslacyjnym, podsumowanym na Rysunku 1 [23–25]. Peptydy  $A\beta$  występują w róznych strukturach mózgu, w formie monomerycznej, rozpuszczalnych agregatów (oligomerów) i nierozpuszczalnych agregatów bezpostaciowych lub fibrylarnych, w zależności od stężenia i indywidualnych waciuoci poszczególnych form. Dostępne metody badawcze oparte są gównie na immunoprecypitacji peptydów z materiau tkankowego, poaczonej z detekcj peptydów za pomocą spektrometrii mas [23–25]. Skutecznoc i selektywnoc detekcji bardzo zależy więc od charakteru zastosowanych przeciwciał, a zatem dane ilościowe są obarczone istotnymi bedami systematycznymi, a wyniki otrzymywane w róznych laboratoriach mogą istotnie r znic się od siebie. Drugą słabością tej metodologii jest ograniczona zdolnoc wykrywania najkrótszych peptydów  $A\beta$ . Pomimo tych ograniczeń, dane z wielu laboratoriów wskazują, że trzy najobficiej występujące peptydy  $A\beta$  to:  $A\beta_{4-42} \sim A\beta_{1-42} > A\beta_{1-40}$  [23, 24].

1 10 20 30 40 43	$A\beta_{1-43}$	
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT	$A\beta_{1-42}$	m
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	$A\beta_{1-40}$	d
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	$A\beta_{1-34}$	s
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL		s
$A\beta_{p3-42}$ pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		s
$A\beta_{4-42}$ FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		d
$A\beta_{4-40}$ FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	$A\beta_{4-34}$	m
FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL		m
$A\beta_{p11-42}$ pEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		m
$A\beta_{x-42}$ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		m
$A\beta_{x-40}$ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV		m

Rysunek 1. Sekwencje najważniejszych peptydów z rodziny  $A\beta$ , powstających w wyniku proteolizy białka APP i modyfikacji potranslacyjnych [23–25]. Nie wszystkie peptydy oznaczone **m** wykryto we wszystkich pracach. Numeracja reszt aminokwasowych i oznaczenia skrótowe peptydów oparte są na sekwencji peptydu  $A\beta_{1-42}$ . **pE** oznacza reszt piroglutamylow; **x** oznacza peptydy rozpoczynace się od kadej reszty od 2 do 9, z wyjtkiem 4; **m**, **s** i **d** oznaczaj małe,  rednie i due iloci wzgl dne peptydów w strukturach m zgu

Figure 1. Sequences of the most important  $A\beta$  family peptides, formed upon the APP protein proteolysis and posttranslational modifications [23–25]. Not all peptides marked **m** were detected in all studies. The numbering of amino acid residues and abbreviated peptide labels are based on the sequence of the  $A\beta_{1-42}$  peptide. **pE** denotes a pyroglutaryl residue; **x** means peptides starting at any residue from 2 to 9 except for 4; **m**, **s** i **d** denote low, medium and high relative amounts of peptides in brain structures

Niemniej jednak w ogromnej większości badań biochemicznych i całej praktycznie diagnostyce molekularnej AD uwzględnia się jedynie „pierwotne” peptydy  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{1-40}$ . Podstawowym kryterium diagnostycznym jest w chwili obecnej wartość stosunku stężeń  $A\beta_{1-42} / A\beta_{1-40}$  w płynie mózgowo-rdzeniowym [26]. Praktyka ta wywodzi się z jednej strony z założeń hipotezy kaskady amyloidowej, gdyż peptyd  $A\beta_{1-42}$  agreguje szybciej i przy niższym stężeniu niż peptyd  $A\beta_{1-40}$ , a zatem względny ubytek poziomu  $A\beta_{1-42}$  jest miarą postępu procesu agregacji.

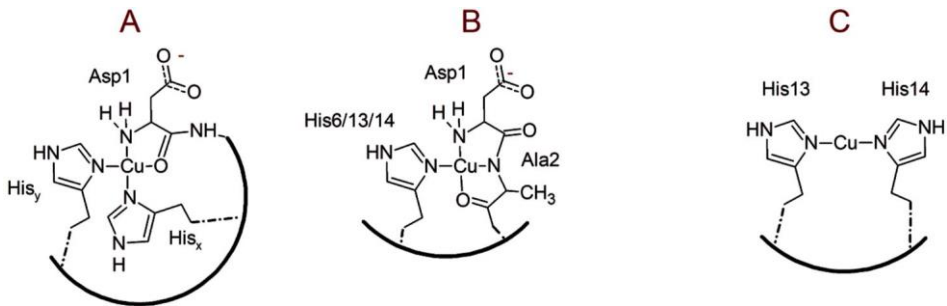
Peptyd  $A\beta_{4-42}$  został wykryty jako dominujący składnik płytek amyloidowych już w pierwszych badaniach poświęconych sekwencjonowaniu składników tego materiału biologicznego [27, 28]. Prawdopodobną przyczyną historyczną powszechnego zignorowania tej wiedzy i wieloletniego nieuwzględniania peptydu  $A\beta_{4-42}$  w diagnostyce i badaniach mechanizmów AD było mylne przekonanie, że obecność tego peptydu w badanych preparatach była artefaktem (produktem działania pepsyną) [20]. Postęp metod analitycznych, uzyskany pod koniec pierwszej dekady XXI wieku, ponownie obudził zainteresowanie rolą tej wersji peptydu  $A\beta$ , a także innymi peptydami skróconymi w badaniach mechanizmów patologii AD. Okazało się między innymi, że peptyd  $A\beta_{4-42}$  agreguje jeszcze łatwiej i szybciej niż peptyd  $A\beta_{1-42}$  [25, 29]. Potwierdza to jego nieobecność w płynie mózgowo-rdzeniowym. Jest ponadto bardziej neurotoksyczny w testach *in vitro* i w modelu myszy transgenicznej [30]. Natomiast aż do r. 2015 peptyd ten nie wzbudził zainteresowania badaczy koncepcji miedziowej AD, w pełni skupionych na peptydach  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-40}$ , sekwencjach pochodnych oraz ich mysich analogach [31–33]. Uwzględnienie w badaniach peptydów z myszy podyktowane było z jednej strony przekonaniem, że niemodyfikowane genetycznie gryzonie nie zapadają na AD, a z drugiej – szerokim stosowaniem myszy transgenicznych w modelowaniu AD i poszukiwaniu leków [34].

## 2. KOMPLEKSY MIEDZIOWE PEPTYDÓW $A\beta_{1-x}$

Zdolności do tworzenia kompleksów peptydów  $A\beta$  z jonami metali, jak zresztą dla wszystkich peptydów, określane są przez charakter łańcuchów bocznych aminokwasów, z uwzględnieniem roli reszt przy końcach N i C łańcucha głównego. W wiązaniu jonów metali o charakterze biologicznym uczestniczą przede wszystkim reszty His (atomy azotu pierścienia imidazolowego) oraz Asp i Glu (grupy karboksylowe). Jak pokazano na Rysunku 1, wszystkie takie reszty skoncentrowane są w zakresie pierwszych 14 reszt łańcucha peptydów  $A\beta_{1-x}$  (z wyjątkiem Met-35 i grupy karboksylowej końca-C, dla których nikt nie wykazał udziału w wiązaniu jonu miedziowego). W związku z tym, podstawowym modelem badawczym dla oddziaływania miedzi (a także cynku, żelaza i innych jonów metali o znaczeniu biologicznym) stał się pep-tyd  $A\beta_{1-16}$  [35]. Jego kolosalną zaletą jest dobra rozpuszczalność (mM) w szerokim zakresie pH i zachowanie stanu monomerycznego, co umożliwia wykonywanie dokładnych badań fizykochemicznych. Dla dłuższych form jest to utrudnione. Peptyd  $A\beta_{1-40}$  agreguje



w stężeniach powyżej 10–15  $\mu\text{M}$  [36]. Krytyczne stężenie agregacyjne dla peptydu  $A\beta_{1-42}$ , według najnowszych badań, jest bardzo niskie i wynosi około 90 nM [37]. W wyniku licznych badań wielu grup badawczych, ukształtował się konsensus, według którego w pH 7,4, powszechnie uznanym za zbliżone do warunków fizjologicznych, peptyd  $A\beta_{1-16}$  tworzy dwa typy kompleksów pozostających w dynamicznej równowadze [38, 39]. Są one przedstawione na Rysunku 2A i 2B. Wypadkowa stała wiązania dla tych kompleksów peptydu  $A\beta_{1-16}$  w pH 7,4 została wyznaczona za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej, jako  $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  [40, 41], a dla peptydu  $A\beta_{1-40}$  – jako  $2,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  [40]. Natomiast za właściwości redoks, w tym za generowanie przez parę Cu(I)/Cu(II) rodników hydroksylowych stanowiące podstawę koncepcji wiążącej miedź z AD, odpowiedzialna jest – jak się uważa – struktura przedstawiona na Rysunku 2C, której wkład do stanu równowagi w pH 7,4 nie przekracza 0,1% [42].



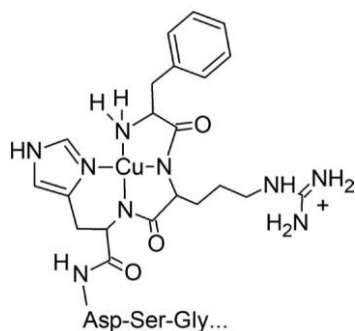
Rysunek 2. Struktury komponentu I (A), komponentu II (B) i formy aktywnej redokso (C) kompleksów Cu(II) z peptydami  $A\beta_{1-16}$  i  $A\beta_{1-40}$  (na podstawie [38, 39, 42]). His<sub>x</sub> i His<sub>y</sub> oznaczają każdą kombinację His6, His13 i His14

Figure 2. Structures of Component I (A), Component II (B) and the redox active form (C) of Cu(II) complexes with  $A\beta_{1-16}$  and  $A\beta_{1-40}$  peptides (based upon [38, 39, 42]). His<sub>x</sub> and His<sub>y</sub> denote any combination of His6, His13 and His14

Stała wiązania na poziomie  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  wydaje się dość niska, jak dla układu biologicznego, w którym obficie występują białka wiążące jony Cu(II) o wiele silniej, np. albumina osocza krwi człowieka (ang. *human serum albumin*, HSA), która wiąże jon miedziowy w pH osocza krwi (7,4) ze stałą  $^{\text{C}}K_{7,4} = 10^{12} \text{ M}^{-1}$  [43]. Dla metalotiotioneiny MT3 stałą wiązania jonów Cu(I) szacuje się na  $10^{16} \text{ M}^{-1}$  [44]. Ponadto wykazano, że zarówno albumina, jak i metalotioneina MT3, białka wiążące jony miedzi w przestrzeniach pozakomórkowych, są w stanie przejąć jony Cu(II) z kompleksów peptydów  $A\beta_{1-x}$  całkowicie i błyskawicznie [45, 46]. Te dane podają w wątpliwość możliwości oddziaływań peptydów  $A\beta_{1-x}$  z jonami miedziowymi *in vivo*, zwłaszcza we wczesnych stadiach choroby, gdy biochemia mózgu nie jest jeszcze zaburzona.

### 3. KOMPLEKSY MIEDZIOWE PEPTYDÓW $A\beta_{4-x}$ I ICH REAKTYWNOŚĆ

Zapoznawszy się z danymi analitycznymi dotyczącymi rodziny peptydów  $A\beta$ , przedstawionymi powyżej, uznaliśmy, że wariant  $A\beta_{4-42}$  i szerzej – rodzina peptydów  $A\beta_{4-x}$  – powinny wykazywać duże zdolności do wiązania jonów miedziowych. Jest tak ze względu na występowanie przy ich końcu-N sekwencji aminokwasowej Phe-Arg-His, reprezentującej znany w chemii bionieorganicznej motyw strukturalny ATCUN/NTS (z ang. *Amino-terminal Cu, Ni binding motif/N-terminal Site*, amino-końcowy motyw wiążący Cu, Ni / miejsce N-końcowe). Motyw ten, przedstawiony na Rysunku 3, jest tworzony przez tripeptydową sekwencję aminokwasową Xaa-Zaa-His, gdzie reszta aminokwasowa Xaa zawiera niezmodyfikowaną grupę aminową, a wiązanie peptydowe Xaa-Zaa zawiera odszczepialny atom wodoru przy azo-cie peptydowym (czyli Zaa  $\neq$  Pro). Cztery atomy azotu: azot aminowy aminokwasu Xaa, azot N-1 pierścienia imidazolowego His i azoty amidowe reszt Zaa i His tworzą kwadratową strukturę koordynacyjną wokół jonu Cu(II) z odszczepieniem jonów wodorowych (kompleks 4N). Struktura ta została udokumentowana za pomocą rentgenografii [47, 48], EXAFS [48, 49] oraz w licznych badaniach spektroskopowych, omówionych w pracach przeglądowych [49–52]. Struktura ATCUN/NTS wiąże w sposób analogiczny inne jony metali. Struktury rentgenowskie są dostępne dla jonów Ni(II) [53] oraz Pd(II) i Au(III) [54]. Stałe wiązania jonu Cu(II) w motywie ATCUN/NTS mieszczą się w zakresie od  $1,0 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  dla HSA [43] do  $3,2 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$  [56], a nawet  $4,6 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$  [57]. Fakt, że nawet najsłabszy z tych ligandów, HSA, jest w stanie usunąć Cu(II) z kompleksów z peptydami  $A\beta_{1-x}$  bez najmniejszego problemu [45], jednocześnie będąc biologicznym partnerem jonu Cu(II) [58], sugerował, że jeśli jakieś peptydy  $A\beta$  będą oddziaływać z jonami Cu(II) w warunkach biologicznych, to będą to raczej peptydy  $A\beta_{4-x}$ , a nie  $A\beta_{1-x}$ , czy inne peptydy skrócone, ale nietworzące miejsc wiązania typu ATCUN/NTS.



Rysunek 3. Struktura kompleksu ATCUN/NTS tworzony przez peptydy  $A\beta_{4-x}$  (na podstawie [59, 71, 72])

Figure 3. The structure of the ATCUN/NTS complex formed by  $A\beta_{4-x}$  peptides (based upon [59, 71, 72])

Badania oddziaływań Cu(II) z peptydami  $A\beta_{4-x}$  rozpoczęliśmy od wyznaczenia stechiometrii, stałych wiązania i struktury kompleksów dla peptydu modelo-

wego  $A\beta_{4-16}$ . Z zastosowaniem miareczkowań potencjometrycznych, których wyniki zostały pozytywnie zweryfikowane za pomocą spektroskopii UV-vis, CD i EPR, ustaliliśmy, że pierwszy równoważnik Cu(II) tworzy w bardzo szerokim zakresie pH kompleks 4N z motywem ATCUN/NTS (Phe-Arg-His). Stała trwałości dla tego kompleksu w pH 7,4 wynosi  $3,0 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , czyli 3000 razy więcej niż dla kompleksów  $A\beta_{1-x}$  [59]. W bezpośredniej reakcji wykazaliśmy, że peptyd  $A\beta_{4-16}$  pobiera jon Cu(II) z kompleksu  $A\beta_{1-16}$ , podobnie jak HSA, czyli błyskawicznie i całkowicie (reakcja zachodziła w czasie mieszania próbki), zgodnie z gradientem stałych wiązania.

Właściwości redoks kompleksu Cu[ $A\beta_{4-16}$ ] zbadaliśmy za pomocą metod woltametrycznych, CV i DPV. Jon Cu(II) związany do sekwencji Phe-Arg-His nie został zredukowany do Cu(I) w zakresie potencjałów dostępnym w roztworze wodnym, ale zaobserwowano nieodwracalne elektrochemicznie utlenienie Cu(II) do Cu(III) przy potencjale ok. 1,0 V. Proces ten nakładał się na nieodwracalne utlenienie pierścienia fenolowego do pochodnych chinonowych [59]. Następnie badania elektrochemiczne skróconych i zmodyfikowanych peptydów, zawierających sekwencję Phe--Arg-His, ale nie zawierających reszty Tyr-10, wykazały, że w tej sytuacji para redoks Cu(II)/Cu(III) jest elektrochemicznie odwracalna [60]. Oznacza to istnienie ścieżki transferu elektronów między kompleksem ATCUN/NTS i pierścieniem fenolowym reszty Tyr-10. Zbadaliśmy również tworzenie rodników hydroksylowych przez kompleksy miedziowe peptydów  $A\beta_{1-16}$ ,  $A\beta_{4-16}$ ,  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{4-42}$ , w obecności kwasu askorbinowego, za pomocą testu APF [58]. Stwierdziliśmy, że przy stechiometrii 1:1 kompleksy peptydów  $A\beta_{1-16}$  i  $A\beta_{1-42}$  tworzą znaczne ilości takich rodników, a kompleksy  $A\beta_{4-16}$ , i  $A\beta_{4-42}$  są pod tym względem całkowicie nieaktywne. Peptyd  $A\beta_{4-16}$  wiąże również drugi jon Cu(II) sekwencyjnie, ze stałą wiązania około  $10^6$  razy mniejszą. Miejscem wiązania tego jonu jest para His13-His14. Zgodnie z oczekiwaniami, tak związany jon Cu(II) jest aktywny redokso i obficie generuje rodniki [59]. Natomiast dwa jony miedziowe związane do peptydu  $A\beta_{4-16}$  nie oddziałują ze sobą bezpośrednio.

W następnym etapie badań sprawdziliśmy, czy jon miedziowy związany do peptydów  $A\beta_{4-x}$  jest mobilny, tzn. czy może zostać łatwo przekazany do innych cząsteček. Peptydy  $A\beta$  występują i przejawiają swoje właściwości neurotoksyczne przede wszystkim w przestrzeni pozakomórkowej. W warunkach fizjologicznych głównym białkiem wiążącym miedź w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) jest HSA. Jednak jej stężenie w PMR jest około 200 razy niższe niż w osoczu krwi [61, 62]. Ponadto lokalizacja synaptyczna HSA jest bardzo hipotetyczna i powszechnie podawana w wątpliwość. Jednym z głównych białek wiążących miedź w przestrzeni synaptycznej jest metalotioneina-3 (MT3). Wykazano, że MT-3 chroni hodowle komórkowe neuronów przed toksycznością miedziowych kompleksów peptydu  $A\beta_{1-40}$  [63]. Jak wspomniano powyżej, HSA wiąże jeden jon Cu(II) ze stałą wiązania  $^cK_{7,4} = 10^{12} \text{ M}^{-1}$  [43], a MT-3 do 11 jonów Cu(I) [44]. Zatem transfer miedzi od peptydu  $A\beta_{4-x}$  do HSA byłby reakcją dysocjacji/asocjacji, a przeniesienie miedzi do MT-3 wymagałoby

redukcji Cu(II) do Cu(I), z tym jednak, że MT-3 może pełnić w niej również rolę reduktora, z utworzeniem wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarcz-kowych. Stała wiązania jonów Cu(I) do MT-3 jest szacowana na ok.  $10^{16} \text{ M}^{-1}$  [44]. Jak widać, przeniesienie Cu(II) do HSA jest nieuprzywilejowane termodynamicznie, i rzeczywiście taka reakcja nie zachodzi. Natomiast przejście miedzi od  $A\beta_{4-x}$  do MT-3 powinno być możliwe. Eksperymenty wykonane przez nas wykazały, że reakcja ta nie zachodzi jednak w warunkach nawet kilkugodzinnej inkubacji  $\text{CuA-}\beta_{4-16}$  z  $\text{Zn}_7\text{MT-3}$  (fizjologiczną postacią MT-3), natomiast może zostać wymuszona przez współinkubację z niefizjologicznie wysokimi stężeniami askorbinianu [64]. W innego rodzaju eksperymencie kompozycyjnym, polegającym na dodaniu soli Cu(II) do roztworu zawierającego  $A\beta_{4-16}$  i  $\text{Zn}_7\text{MT-3}$  wykazaliśmy, że obie cząsteczki wiążą znaczące ilości miedzi, a szybko ustalający się stan pozornej równowagi pozostaje stabilny, zgodnie z wynikami poprzednich eksperymentów. Natomiast drugi jon Cu(II), związany do pary His13-His14 w  $A\beta_{4-16}$  z łatwością ulega redukcji i przejściu do MT-3, podobnie jak jon Cu(II) z kompleksów  $\text{CuA-}\beta_{1-16}$  i  $\text{CuA}\beta_{1-40}$  [64, 65]. Eksperymenty dotyczące możliwych mechanizmów redukcyjnego przejścia jonu Cu(II) do kompleksu Cu(I) z MT-3 były kontynuowane, ze względu na ich znaczenie dla fizjologii i toksykologii peptydów  $A\beta$ . Wykazaliśmy, że przy długich, kilkugodzinnych inkubacjach  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$  z  $\text{Zn(II)}_7\text{MT-3}$  w obecności reduktorów tiolowych, reakcja zachodzi częściowo dla GSH (zredukowanej formy glutationu), a całkowicie i dużo szybciej (w skali minut) dla cysteiny, z utworzeniem kompleksu  $\text{Cu(I)}_4\text{Zn(II)}_4\text{MT-3}$  [66]. Wyniki tej części badań można podsumować stwierdzeniem, że kompleks  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$  jest w dużej mierze odporny na działanie czynników wspomagających transfer miedzi i, w związku z tym, może być elementem alternatywnego szlaku metabolizmu miedzi.

PBT2, pochodna hydroksychinoliny, dotarła do drugiej fazy badań klinicznych w leczeniu choroby Alzheimera, ale te badania zakończyły się niepowodzeniem. Postulowanym mechanizmem działania tej cząsteczki było wiązanie pozakomórkowych jonów miedziowych (w tym odbieranie ich z kompleksów z peptydami  $A\beta$  i przenoszenie ich do wnętrza neuronów). W jednej z poprzednich prac wykazaliśmy słabości tego mechanizmu w odniesieniu do peptydów  $A\beta_{1-x}$  [67]. Zamiast tworzyć hydrofobowe kompleksy o stechiometrii  $\text{CuL}_2$ , zdolne do przenoszenia jonu Cu(II) przez błonę komórkową, cząsteczka 2-[(dimetyloamino)-metylo-8-hydroksychinoliny, bliskiego analogu zastrzeżonej podówczas cząsteczki PBT2, preferencyjnie tworzyła kompleksy ternarne typu  $\text{CuLA}$ , gdzie A reprezentuje pierścień imidazolowy dowolnej reszty His peptydu  $A\beta_{1-x}$ . W omawianych tu badaniach zastosowaliśmy analogiczne podejście do peptydu  $A\beta_{4-16}$ . Wykazaliśmy, że 2-[(dimetyloamino)-metylo-8-hydroksychinolina może oddziaływać z kompleksem ATCUN/NTS peptydu  $A\beta_{4-16}$ . Co prawda stanem końcowym reakcji jest kompleks ATCUN/NTS z resztami Phe-Arg-His, ale przejściowo tworzą się również kompleksy mieszane typu  $\text{CuLA}$ , analogiczne do  $A\beta_{1-16}$ , które generują rodniki hydroksylowe w teście APF [68].

Zbadaliśmy także trawienie peptydów  $A\beta_{1-16}$  i  $A\beta_{1-40}$  przez neprylizynę, proteazę cynkową wskazywaną jako jeden z głównych enzymów katabolizmu peptydów  $A\beta$  w mózgu, a także potencjalne źródło peptydów  $A\beta_{4-x}$  [69, 70]. Zbadaliśmy również wpływ jonów  $Zn(II)$  i  $Cu(II)$  na aktywność enzymu i dystrybucję produktów hydrolizy. Stwierdziliśmy, że nadmiar jonów  $Cu(II)$  i  $Zn(II)$  hamuje enzym, z wartościami  $K_i = 1,0$  i  $20 \mu M$  [71]. Ustaliliśmy, że w warunkach eksperymentów tworzą się peptydy ATCUN/NTS  $A\beta_{4-x}$ , a także  $A\beta_{12-x}$ , natomiast głównym produktem tego typu jest peptyd  $A\beta_{4-9}$ , ze względu na bardzo szybką eliminację dipeptydu Tyr-Glu ( $A\beta_{10-11}$ ). W obecności jonów  $Cu(II)$  istotnym produktem reakcji jest kompleks  $CuA\beta_{4-9}$ , który przejmuje jon  $Cu(II)$  od substratu reakcji, peptydu  $A\beta_{1-x}$ . Tworzenie tego kompleksu również częściowo hamuje enzym. W kolejnej pracy opisaliśmy właściwości koordynacyjne peptydów  $A\beta_{4-9}$ ,  $A\beta_{11-16}$  i  $A\beta_{12-16}$ . Wykazaliśmy, że peptydy te, zwłaszcza peptyd  $A\beta_{4-9}$ , tworzą kompleksy miedziowe jeszcze silniejsze i jeszcze bardziej inertne pod względem wymiany jonu  $Cu(II)$ , niż długie peptydy  $A\beta_{4-x}$ . Dla peptydu  $A\beta_{4-9}$   ${}^C K_{7,4} = 1,5 \times 10^{14} M^{-1}$ , czyli jest 5 razy wyższa niż dla peptydu  $A\beta_{4-16}$  [72].

Wykazano uprzednio, że peptydy  $A\beta_{4-x}$  ( $x = 40, 42$ ) agregują szybciej niż odpowiednie peptydy  $A\beta_{1-x}$  [73]. Wpływ wiązania  $Cu(II)$  do tych peptydów na ich agregację nie był dotąd badany. Wstępne wyniki naszych badań, prowadzonych według analogicznej metodologii, potwierdzają bardzo dużą zdolność do fibrylizacji peptydu  $A\beta_{4-40}$  w stosunku do peptydu  $A\beta_{1-40}$ , ale wskazują na częściowe znoszenie tego efektu przez jon  $Cu(II)$ . Ponadto fibryle tworzone w obecności jonu  $Cu(II)$  mają zmienioną morfologię. Podobne różnicowe efekty otrzymujemy w badaniach oddziaływań tych peptydów z modelową błoną biologiczną, z zastosowaniem układu do pomiaru przenoszenia ładunku przez błonę [74].

## UWAGI KOŃCOWE

Nasze wyniki otworzyły nowy rozdział w dziedzinie badań chemii i mechanizmów toksyczności peptydów  $A\beta$ . Wykazaliśmy, że peptydy  $A\beta_{4-x}$  mogą być pierwszoplanowymi czynnikami wiążącymi miedź w pozakomórkowych przestrzeniach mózgu, zdolnymi do błyskawicznego przejmowania miedzi od dotychczas badanych peptydów  $A\beta_{1-x}$ . Kompleksy  $Cu(II)$  peptydów  $A\beta_{4-x}$  są bardzo odporne na utlenianie i redukcję, powoli i niechętnie oddają jon miedziowy innym cząsteczkom i nie produkują reaktywnych form tlenu. W związku z tymi właściwościami, zaproponowaliśmy rolę fizjologiczną dla peptydu  $A\beta_{4-42}$  jako cząsteczki oczyszczającej szczelinę synaptyczną z jonów  $Cu^{2+}$  i tym samym zapewniającej prawidłową neurotransmisję [59, 64, 66]. Funkcję tę jednak można łatwo zaburzyć przez niewłaściwą interwencję farmakologiczną [68]. Wyniki badań wpływu jonów miedziowych na agregację i oddziaływanie z błoną peptydu  $A\beta_{4-40}$  sugerują, że miedź może hamować toksyczność peptydów  $A\beta_{4-x}$ , co dodatkowo potwierdza naszą koncepcję. Badania hydrolizy peptydów  $A\beta$  i właściwości jej produktów ujawniły możliwość istotnej roli krótkich

fragmentów w fizjologii miedzi w mózgu [71, 72]. Nasze hipotezy oczekują na weryfikację w rozpoczętych już obecnie badaniach biologicznych.

## PODZIĘKOWANIA

Badania opisane w tym artykule wykonano w ramach grantu Opus, Narodowego Centrum Nauki nr 2014/15/B/ST5/05229. Autor pragnie podziękować za pomocne uwagi Dr Tomaszowi Frączykowi i Dr Kamili Stokowej-Sołtys.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Alzheimer's Disease International, World Alzheimer report 2018, <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf?2>
- [2] Alzheimer's Association, 2018 Alzheimer's Disease Facts and Figures, <https://www.alz.org/media/Documents/facts-and-figures-2018-r.pdf>
- [3] M.L. Haaksma, L.R. Vilela, A. Marengoni, A. Calderón-Larrañaga, J.S. Leoutsakos, M.G.M. Olde Rikkert, R.J.F. Melis, PLoS One, 2017, **12**, e0177044.
- [4] P.K. Panegyres, H.-Y. Chen, Am. J. Neurodegener. Dis., 2013, **2**, 300.
- [5] K. Ritchie, I. Carrière, C. Berr, H. Amieva, J.F. Dartigues, M.L. Ancelin, C.W. Ritchie, J. Clin. Psychiatry, 2016, **77**, e305.
- [6] J. Dorszewska, M. Prendecki, A. Oczkowska, M. Dezor, W. Kozubski, Curr. Alz. Res., 2016, **13**, 952.
- [7] K.V. Nguyen, Biomol. Concepts, 2015, **6**, 11.
- [8] S. Thordardottir, A. Kinhult Ståhlbom, O. Almkvist, H. Thonberg, M. Eriksdotter, H. Zetterberg, K. Blennow, C. Graff, Alzheimers Res. Ther., 2017, **9**, 9.
- [9] C.L. Masters, D.J. Selkoe, Cold Spring Harbor Perspect. Med., 2012, **2**, a006262.
- [10] G.P. Morris, I.A. Clark, B. Vissel, Acta Neuropath. Comm., 2014, **2**, 135.
- [11] A. Copani, Eur. J. Pharmacol., 2017, **817**, 71.
- [12] A.D. Watt, V.L. Villemagne, K.J. Barnham, J. Alzheimers Dis., 2013, **33**, S283.
- [13] L. Miller, Q. Wang, T. Telivala, R. Smith, A. Lanzirrotti, J. Miklossy, J. Struct. Biol., 2006, **155**, 30.
- [14] J.A. Duce, A.I. Bush, P.A. Adlard, Future Neurol., 2011, **6**, 641.
- [15] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, F. Collin, Redox Biol., 2018, **14**, 450.
- [16] K. Reybier, S. Ayala, B. Alies, J. V. Rodrigues, S. Bustos Rodriguez, G. La Penna, F. Collin, C.M. Gomes, C. Hureau, P. Faller, Angew. Chem. Int. Ed., 2016, **55**, 1085.
- [17] J. Everett, J.F. Collingwood, V. Tjendana-Tjhin, J. Brooks, F. Lermyte, G. Plascencia-Villa, I. Hands-Portman, J. Dobson, G. Perry, N.D. Tellinga, Nanoscale, 2018, **10**, 11782.
- [18] P.A. Adlard, A.I. Bush, Front Psychiatry, 2012, **3**, 15.
- [19] P.A. Adlard, A.I. Bush, J. Alzheimers Dis., 2018, **62**, 1369.
- [20] S.C. Drew, Front. Neurosci., 2017, **11**, 317.
- [21] U.C. Müller, T. Deller, M. Korte, Nat. Rev. Neurosci., 2017, **18**, 281.
- [22] Y.-Q. Wang, D.-H. Qu, K. Wang, Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2016, **20**, 2389.
- [23] E. Portelius, N. Bogdanovic, M. K. Gustavsson, I. Volkman, G. Brinkmalm, H. Zetterberg, B. Winblad, K. Blennow, Acta Neuropathol., 2010, **120**, 185.
- [24] H. Lewis, D. Behr, N. Cookson, A. Oakley, M. Piggott, C.M. Morris, E. Jaros, R. Perry, P. Ince, R.A. Kenny, C.G. Ballard, M.S. Shearman, R.N. Kalaria, Neuropathol. Appl. Neurobiol., 2006, **32**, 103.

- [25] E. Cabrera, P. Mathews, E. Mezhericher, T.G. Beach, J. Deng, T.A. Neubert, A. Rostagno, J. Ghiso, *Biochim. Biophys. Acta*, 2018, **1864**, 208.
- [26] S. Janelidze, H. Zetterberg, N. Mattsson, S. Palmqvist, H. Vanderstichele, O. Lindberg, D. van Westen, E. Stomrud, L. Minthon, K. Blennow, O. Hansson, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 2016, **3**, 154.
- [27] C.L. Masters, G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, K. Beyreuther, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, **82**, 4245.
- [28] C.L. Masters, G. Multhaup, G. Simms, J. Pottgiesser, R.N. Martins, K. Beyreuther, *EMBO J.*, 1985, **4**, 2757.
- [29] J. Dunys, A. Valverde, F. Checler, *J. Biol. Chem.*, 2018, **293**, 15419.
- [30] K. Dietrich, Y. Bouter, M. Müller, T.A. Bayer, *Molecules*, 2018, **23**, 718.
- [31] H. Eury, C. Bijani, P. Faller, C. Hureau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, **50**, 901.
- [32] C. Hureau, P. Faller, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2175.
- [33] S.C. Drew, K.J. Barnham, *Acc. Chem. Res.*, 2011 **44**, 1146.
- [34] J.L. Jankowsky, H. Zheng, *Mol. Neurodegener.*, 2017, **12**, 89.
- [35] I. Zawisza, M. Rózga, W. Bał, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2297.
- [36] M. Rózga, M. Kłoniecki, M. Dadlez, W. Bał, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 336.
- [37] M. Novo, S. Freire, W. Al-Soufi, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 1783.
- [38] S.C. Drew, K.J. Barnham, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 1146.
- [39] B. Alies, H. Eury, C. Bijani, L. Rechinat, P. Faller, C. Hureau, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 11192.
- [40] B. Alies, E. Renaglia, W. Bał, P. Faller, C. Hureau, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1501.
- [41] T.R. Young, A. Kirchner, A.G. Wedd, *Z. Metallomics*, 2014, **6**, 505.
- [42] C. Cheignon, M. Jones, F. Atrián-Blasco, I. Kieffer, P. Faller, F. Collin, C. Hureau, *Chem Sci.*, 2017, **8**, 5107.
- [43] M. Rózga, M. Sokołowska, A.M. Protas, W. Bał, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 913.
- [44] E. Artells, O. Palacios, M. Capdevila, S. Atrian, *FEBS J.*, 2014, **281**, 1659.
- [45] L. Perrone, E. Mothes, M. Vignes, A. Mockel, C. Figueroa, M.C. Miquel, M.L. Maddelein, P. Faller, *ChemBiochem.*, 2010, **11**, 110.
- [46] G. Meloni, V. Sonois, T. Delaine, L. Guilloueu, A. Gillet, J. Teissie, P. Faller, M. Vasak, *Nat. Chem. Biol.*, 2008, **4**, 366.
- [47] N. Camerman, B. Sarkar, *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, 1309.
- [48] C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari, E. Guillon, P. Faller, P. Dorlet, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 10151.
- [49] V.A. Streltsov, R.S.K. Ekanayake, S.C. Drew, C.T. Chantler, S.P. Best, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 11422.
- [50] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, 1982, **82**, 385.
- [51] H. Kozłowski, W. Bał, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 319.
- [52] C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 123.
- [53] P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, I. Raibaut, W. Bał, P. Faller, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 8029.
- [54] W. Bał, M.I. Djuran, D.W. Margerum, E.T. Gray, Jr., M.A. Mazid, R.T. Tom, E. Nieboer, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1994, 1889.
- [55] S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sóvágó, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2587.
- [56] A. Kolozsi, A. Jancsó, N.V. Nagy, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 940.
- [57] D. Płonka, W. Bał, *Inorg. Chim. Acta*, 2018, **472**, 76.
- [58] W. Bał, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2013, **1830**, 5444.

- [59] M. Mital, N.E. Wezynfeld, T. Frączyk, M.Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, A. Bonna, C. Tumpach, C.L. Haigh, K.J. Barnham, W. Bal, S.C. Drew, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 10460.
- [60] M.Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, S.C. Drew, W. Wróblewski, *J. Elec-trochem. Soc.*, 2016, **163**, G196.
- [61] F. Licastro, M.C. Morini, L.J. Davis, R. Biagi, L. Prete, G. Savorani, *Adv. Biosci. (Oxford)*, 1993, **87**, 283.
- [62] R.H. Christenson, P. Behlmer, J.F. Howard, Jr., J.B. Winfield, L.M. Silverman, *Clin. Chem.*, 1983, **29**, 1028.
- [63] Y. Irie, W. M. Keung, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **282**, 416.
- [64] N. E. Wezynfeld, E. Stefaniak, K. Stachucy, A. Drozd, D. Płonka, S. C. Drew, A. Krężel, W. Bal, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 8235.
- [65] G. Meloni, V. Sonois, T. Delaine, L. Guilloureau, A. Gillet, J. Teissie, P. Faller, M. Vasak, *Nat. Chem. Biol.*, 2008, **4**, 366.
- [66] A. Santoro, N. Wezynfeld, M. Vasak, W. Bal, P. Faller, *Chem. Comm.*, 2017, **53**, 11634.
- [67] V.B. Kenche, I. Zawisza, C.L. Masters, W. Bal, K.J. Barnham, S.C. Drew, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 4303.
- [68] M. Mital, I.A. Zawisza, M.Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, V. Kenche, W. Wróblewski, W. Bal, S.C. Drew, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 7317.
- [69] H. Kanemitsu, T. Tomiyama, H. Mori, *Neurosci. Lett.*, 2003, **350**, 113.
- [70] C. Oefner, B.P. Roques, M.C. Fournie-Zaluski, G.E. Dale, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystal-logr.*, 2004, **60**, 392.
- [71] M. Mital, W. Bal, T. Frączyk, S. C. Drew, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 6193.
- [72] K. Bossak-Ahmad, M. Mital, D. Płonka, S. C. Drew, W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 932.
- [73] E. Cabrera, P. Mathews, E. Mezhericher, T.G. Beach, J. Deng, T.A. Neubert, A. Rostagno, J. Ghiso, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2018, 1864, 208.
- [74] B. Reilly-O'Donnell, G.B. Robertson, A. Karumbi, C. McIntyre, W. Bal, M. Nishi, H. Takeshima, A.J. Stewart, S.J. Pitt, *J. Biol. Chem.*, 2017, 292, 13361.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 grudnia 2018 r.