

MODELE EKSPERYMENTALNE W BADANIACH ZEWNAŹTRZKOMÓRKOWEGO TRANSPORTU MIEDZI

EXPERIMENTAL MODELS IN STUDIES OF EXTRACELLULAR COPPER TRANSPORT

Wojciech Bal

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
e-mail: wbal@ibb.waw.pl*

Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Badania równowag kompleksowania
2. Badania kinetyczne
Uwagi końcowe
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Wojciech Bal uzyskał stopnie magistra (1987) i doktora (1991) nauk chemicznych na Uniwersytecie Wrocławskim pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Kozłowskiego, na podstawie badań właściwości koordynacyjnych hormonów peptydowych. Następnie odbył staże podoktorskie w laboratorium prof. Petera J. Sadlera na Uniwersytecie Londyńskim (1992/3), gdzie odkrył nowe miejsce wiązania metali w albuminie i w NIH Frederick (1994-6), podczas którego badał mechanizmy molekularne w kancerogenezie niklowej pod kierunkiem dr. Kazimierza S. Kasprzaka. W 1999 habilitował się na Uniwersytecie Wrocławskim, a następnie uzyskał stypendium Fundacji Humboldta na Uniwersytecie Karlsruhe (2001/2) w laboratorium prof. Andrei Hartwig, na badania mechanizmów uszkodzenia palców cynkowych przez metale kancerogenne. Obecnie (od 2002) prowadzi badania w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (tytuł i stanowisko profesora nauk biologicznych w 2006). Do głównych tematów badawczych jego laboratorium należą mechanizmy molekularne w transporcie biologicznym miedzi, cynku i srebra oraz (metalo)chemia peptydów A β . Badania prowadzone są za pomocą szerokiej gamy metod termodynamicznych, strukturalnych i kinetycznych. Szczególną uwagę zwraca się na rolę małych cząsteczek, jak aminokwasy i oligopeptydy, jako partnerów wymiany jonów metali między białkami.



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

ABSTRACT

The biological relevance of proteins and peptides for Cu(II) biology, including the extracellular transport of this element, is commonly estimated by studying stabilities and structures of their complexes. However, our experimental studies on the kinetics of formation of Cu(II) complexes of ATCUN/NTS and Xaa-His-R peptides, considered to be key actors in extracellular copper biology, revealed novel long-lived reaction intermediates. These intermediates, rather than the final reaction products fulfil the chemical criteria for actual biocomplexes derived from biological studies. Our research clearly demonstrated that understanding of the kinetic aspect of interactions is indispensable for realistic modeling of biological interactions of metal ions.

Keywords: copper(II), peptide, complexation, reaction kinetics, biological mechanisms

Słowa kluczowe: miedź(II), peptyd, kompleksowanie, kinetyka reakcji, mechanizmy biologiczne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ATCUN/NTS	– sekwencja peptydowa, zawierająca wolną grupę aminową w pozycji 1, dowolny aminokwas naturalny z wyjątkiem proliny w pozycji 2 i histydyne w pozycji 3 (amino-terminal Cu(II)-, and Ni(II) binding motif/N-terminal site)
Cco	– oksydaza cytochrome c (cytochrome c oxidase)
Ctrl	– transporter miedzi 1 (copper transporter 1)
hCtrl	– ludzki transporter miedzi 1 (human copper transporter 1)
HSA	– ludzka albumina osocza krwi (human serum albumin)
NTA	– kwas nitrylotrioctowy (nitrilotriacetic acid)
RFT	– reaktywne formy tlenowe
SOD	– dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase)

WPROWADZENIE

Miedź stosowana była w medycynie od czasów antycznych, jednak prawdziwe jej znaczenie jako pierwiastka niezbędnego dla życia opartego na tlenie rozpoznano dopiero w XX wieku [1]. Do tej pory odkryto ponad 300 enzymów miedziowych, które realizują rozmaite reakcje utleniania bezpośrednio lub pośrednio, jako przenośniki elektronów, wykorzystując parę redoks Cu(I)/Cu(II). Bezwzględnie niezbędne dla metabolizmu tlenu są dwa enzymy miedziowe: mitochondrialna oksydaza cytochromu c (Cco), zapewniająca przyswajanie tlenu cząsteczkowego i cytozolowa miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), odpowiedzialna za neutralizację toksycznych rodników ponadtlenkowych, powstających jako skutek uboczny aktywności Cco [2]. Miedź jest pierwiastkiem silnie toksycznym, gdyż zarówno akwajony miedziowe, jak i liczne kompleksy Cu(II) oddziałują z tlenem i jego metabolitami komórkowymi, katalizując powstawanie reaktywnych form tlenowych (RFT), w tym najbardziej reaktywnych rodników hydroksylowych, w myśl reakcji Fentona i Habera-Weissa [3]. W związku z tym wprowadzanie i wyprowadzanie jonów miedzi z komórki i ich transport wewnątrzkomórkowy są ściśle kontrolowane przez dedykowane białka. System transportu miedzi wewnątrz komórki eukariotycznej jest dość dobrze poznany. Jony miedzi są wprowadzane do komórki głównie za pośrednictwem kanału błonowego Ctr1, następnie odbierane i transportowane do enzymów docelowych przez system szperonów komórkowych, a ich nadmiar jest wyprowadzany do innych przedziałów komórkowych i poza komórkę przez pompy jonowe zależne od ATP [4].

We wszystkich procesach transportu wewnątrz komórki i przez błony komórkowe uczestniczą jony Cu(I), które są mniej reaktywne, niż jony Cu(II), zwłaszcza w postaci bardzo silnie związanych kompleksów tiolowych, tworzonych przez wspomniane szperony [5]. Inaczej sprawy mają się w przestrzeniach pozakomórkowych organizmu, zwłaszcza w osoczu krwi, gdzie ze względu na dostępność tlenu stężenie wolnych grup tiolowych jest niskie, a zidentyfikowane jak dotąd kompleksy, uczestniczące w transporcie miedzi, lub proponowane dla tej funkcji, zawierają jony Cu(II). Należy do nich przede wszystkim albumina osocza krwi (ang. Human Serum Albumin, HSA, obecna w stężeniu 0.6 mM), a także α 2-makroglobulina i być może hemopeksyna, występujące w stężeniach mikromolowych. Pewien udział w wiązaniu miedzi we krwi ma też nie w pełni scharakteryzowana frakcja niskocząsteczkowa, składająca się głównie z oligopeptydów i aminokwasów. W tej puli wyróżniają się odpowiednio peptyd GHK i aminokwas histydyna [6]. Enzym zawierający większą część puli miedzi w osoczu krwi, ceruloplazmina, nie jest powszechnie uznawany za transporter miedzi, gdyż ze względów kinetycznych oddaje on miedź jedynie wskutek degradacji enzymatycznej w hepatocytach [7]. Uzasadnieniem dla prowadzenia badań dystrybucji jonów miedziowych pomiędzy składnikami krwi są coraz liczniejsze doniesienia na temat dyshomeostazy miedzi w takich istotnych chorobach, jak cukrzyca typu II, choroba Alzheimera i niektóre nowotwory złośliwe [8-10].

Ze względu na labilność kompleksów Cu(II) z peptydami niełatwo jest określić dystrybucję tego pierwiastka pomiędzy poszczególnymi transporterami za pomocą metod analitycznych. Badania prowadzone w poszczególnych laboratoriach często dają niespójne wyniki, czego przykładem są sprzeczne doniesienia co do roli $\alpha 2M$ – według jednych białko to zawiera prawie tyle samo miedzi(II), co HSA, a według innych nie przenosi tego jonu wcale [11].

1. BADANIA RÓWNOWAG KOMPLEKSOWANIA

Alternatywnym podejściem badawczym jest wykonanie dokładnych badań kompleksowania i reaktywności jonów Cu(II) dla poszczególnych potwierdzonych analitycznie lub postulowanych biocząsteczek transportujących te jony, by następnie stopniowo, wraz z uzyskiwaną wiedzą, rekonstruować możliwe równowagi chemiczne i na ich podstawie formułować sprawdzalne hipotezy biologiczne. Postępując według tego paradygmatu, scharakteryzowaliśmy wiązanie jonów Cu(II) do HSA, peptydów GHK i hepcydyny, a także modeli peptydowych N-końcowego miejsca oddziaływania jonów Cu(II) w receptorze hCtrl. W tych badaniach posługiwaliśmy się metodologią ugruntowaną w pracowni prof. Henryka Kozłowskiego, uwcześniej w Instytucie, a potem Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Metodologia ta obejmuje dokładny ilościowy opis równowag kompleksowania za pomocą potencjometrii z równoczesnym scharakteryzowaniem struktur i reaktywności powstających kompleksów za pomocą spektroskopii UV-vis, dichroizmu kołowego i elektronowego rezonansu paramagnetycznego [12, 13]. W późniejszych latach i w zależności od problemu badawczego techniki te były uzupełniane przez badania elektrochemiczne, kalorymetryczne, spektrometrię mas oraz inne techniki spektroskopowe. Badania te prowadzone są w szerokim zakresie pH, gdyż praktyka wykazuje, że jedynie w ten sposób można wiarygodnie opisać proces kompleksowania dla danych warunków szczegółowych. Technika potencjometryczna nadaje się do stosowania tylko do stosunkowo niewielkich cząsteczek, gdyż ze względu na ograniczenie rozdzielczości pomiaru pH za pomocą elektrody szklanej do 0.002 jednostki pH, w większości przypadków nie można wiarygodnie wyznaczyć wartości stałych protonowania dla cząsteczek, które w roboczym zakresie pH (typowo 2.5-10.5) wymieniają z otoczeniem więcej niż 10 jonów wodorowych. W takich sytuacjach można zastosować uproszczone modele peptydowe, albo posłużyć się ligandami kompetycyjnymi.

Wyjściowym założeniem dla tych badań było przyjęcie, że ze względu na dużą objętość i znaczne fizjologiczne czasy życia poszczególnych aktorów molekularnych, procesy zachodzące dla jonów miedziowych mają charakter równowagowy. W takiej sytuacji *a priori* można poznać charakter układu dzięki wyznaczeniu stałych wiązania dla poszczególnych kompleksów i wyliczeniu na ich podstawie szerszego stanu równowagowego, który może być modyfikowany przez procesy fizjologiczne, na przy-

kład zmianę stężenia poszczególnych cząsteczek wskutek metabolizmu lub procesu chorobowego.

Wyzaczyliśmy więc, a następnie skorygowaliśmy stałą wiązania jonu Cu(II) do głównego miejsca wiązania Cu(II) w HSA. Jest to N-końcowy tripeptyd tego białka, o sekwencji Asp-Ala-His (DAH), tworzący, tak jak inne peptydy typu ATCUN/NTS (dowolny aminokwas z niemodyfikowanym N-końcem w pozycji 1, nieobecność iminokwasu prolina w pozycji 2, obecność histydyny w pozycji 3), bardzo silne kompleksy o płaskiej strukturze kwadratowej, w których jon Cu(II) jest związany z czterema ligandami azotowymi (4N, Rys. 1) [14]. Logarytmiczne wartości warunkowych stałych wiązania dla pH 7,4 ($\log {}^C K_{7,4}$), charakterystycznego dla osocza krwi, znajdują się w zakresie 12-15, co odpowiada femtomolowemu zakresowi stałych dysocjacji.

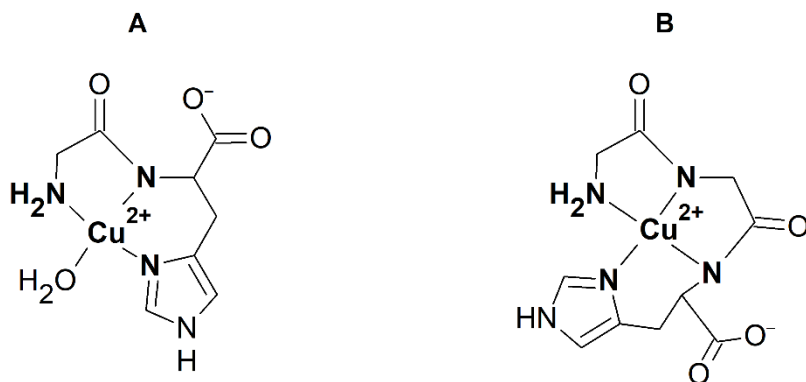
Bezpośrednie wyznaczenie stałej wiązania z tego zakresu nie jest możliwe, ze względu na bardzo niskie stężenie wolnych substratów reakcji kompleksowania w stanie równowagi. Należało więc posłużyć się miareczkowaniem kompetycyjnym z użyciem liganda o znanej stałej wiązania, zbliżonej do stałej poszukiwanej i charakterystyce spektroskopowej, umożliwiającej ilościowy opis reakcji kompetycji. W takich doświadczeniach szczególnie pożądane są sytuacje, gdy kompleksy konkurujących ligandów mają dobrze rozdzielone widma, np. absorpcyjne lub CD, umożliwiające detekcję punktów izobestycznych, zazwyczaj gwarantujących istnienie w równowadze tylko dwóch kompleksów – cząsteczki badanej i kompetytora. Nasz początkowy wynik, otrzymany z użyciem chelatora NTA w roli kompetytora ($\log {}^C K_{7,4} = 12.0$) [15] okazał się niedokładny, gdyż pomimo pozornego spełnienia przez układ badany powyższych warunków, nie uwzględniliśmy tworzenia kompleksów ternarnych NTA z resztami histydyń na powierzchni HSA. Prawidłową wartość, $\log {}^C K_{7,4} = 13.0$ uzyskaliśmy, stosując do reakcji kompetycji tripeptyd Gly-Gly-His, również z rodziny ATCUN/NTS, niezdolny do tworzenia kompleksów ternarnych w pH 7,4 [16].

Taką samą wartość, w granicy błędu eksperymentalnego, otrzymaliśmy dla modeli peptydowych (tripeptydu i tetradekapeptydu) kompleksu ATCUN/NTS, tworzonego przez N-końcową (zewnątrzkomórkową) domenę ludzkiego komórkowego transportera miedziowego hCtr1, o sekwencji Met-Asp-His [17, 18].

Niewiele słabszy okazał się kompleks miedziowy peptydu GHK (Gly-His-Lys), dla którego wyznaczyliśmy $\log {}^C K_{7,4} = 12.62$ [19]. Podobne wartości $\log {}^C K_{7,4}$, w zakresie 12.6-13, obserwuje się dla innych kompleksów, zawierających sekwencję Xaa-His (resztą Xaa nie może być prolina) [20-25]. Struktura tych kompleksów, przedstawiona również na Rys. 1, jest podobna do kompleksu ATCUN/NTS, ale zawiera trzy, a nie cztery ligandy azotowe (3N). Cząsteczka wody w czwartym miejscu koordynacyjnym może zostać podstawiona przez cząsteczkę liganda. Możliwość takiego podstawienia jest ograniczona ze względu na zawadę steryczną, wytwarzaną przez reszty aminokwasowe peptydów Xaa-His-R. W serii publikacji wykazaliśmy, że preferowane w tej pozycji są atomy azotu z pierścieni imidazolowych reszt His z peptydów lub białek, choć mogą się tam wiązać

również grupy tiolowe i karboksylowe [20-25]. Wartości warunkowych stałych równowagi dla wymiany cząsteczki H_2O na ligand ternarny w pH 7.4 $\log {}^TK_{7.4}$ dla małych cząsteczek mieszczą się w zakresie 2-3. Nieco wyższymi wartościami $\log {}^TK_{7.4}$, do 3.5-3.7 charakteryzują się kompleksy, w których donorem pierścienia imidazolowego w czwartym miejscu koordynacyjnym jest dłuższy peptyd, bądź białko (HSA), dzięki możliwości tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych lub jonowych pomiędzy cząsteczkami ligandów [22, 24].

Interesującą cechą takich kompleksów jest zwiększenie względnej efektywności wiązania miedzi w zależności od stężenia liganda ternarnego [20]. Ten efekt, który można wyznaczyć w sposób ilościowy za pomocą metody CI [26], może sprawić, że w sprzyjających warunkach zdolność peptydów Xaa-His-R do wiązania jonów miedziowych może dorównywać peptydom ATCUN/NTS.



Rysunek 1. Struktury kompleksów 3N (A) i 4N (B). Dla uproszczenia pominięto niewiążące łańcuchy boczne aminokwasów

Figure 1. Structures of 3N (A) and 4N (B) complexes. For simplicity the non-bonding amino acid side chains were omitted.

Badaliśmy również szybkość wymiany jonu miedziowego między HSA, a 14-peptydem modelowym transportera hCtr1 [18]. Reakcja ta zachodzi przy $t_{1/2}$ ok. 15 min. W podobnym czasie zachodzi reakcja oddawania jonu $Cu(II)$ od HSA do hepcydyny ($\log {}^CK_{7.4} = 14.66$), występującego w osoczu krwi w niewielkich stężeniach hormonu peptydowego, również zawierającego sekwencję ATCUN/NTS [27].

Wartości równowagowe i dane kinetyczne, uzyskane w tych badaniach, wraz z danymi analitycznymi na temat zakresów stężeń biologicznych poszczególnych cząsteczek, mogą posłużyć do wykonania wstępnych symulacji dystrybucji miedzi w osoczu krwi. Z obliczeń tych wynika na przykład, że peptyd GHK nie może występować w osoczu krwi w znaczących ilościach w formie kompleksu miedziowego, gdyż ze względu na ponad 1000-krotnie niższe stężenie przegrywa konkurencję z HSA. Tworzenie kompleksu ternarnego GHK- $Cu(II)$ -HSA zmienia tę sytuację jedynie niezna-

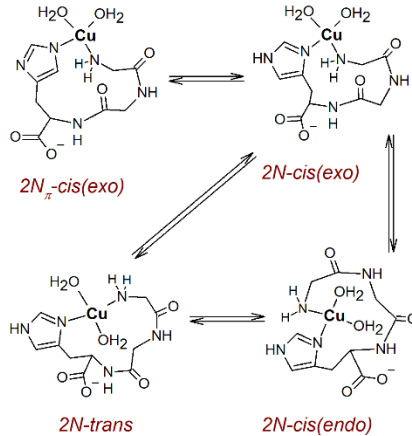
cznie [24]. Odkrycie to jest zaskakujące, gdyż uważa się powszechnie, że GHK, endogenny czynnik wzrostu i hormon tkankowy, jest aktywowany przez wiązanie jonu Cu(II) [28]. Rysuje się jednak możliwość, że niewielka frakcja GHK związana do miedzi w postaci kompleksu binarnego i ternarnych (poniżej 1%), może uczestniczyć w transporcie miedzi, ze względu na dużo większe szybkości wymiany jonu Cu^{2+} , w stosunku do peptydów ATCUN/NTS [29].

Również szybkości wymiany jonu miedziowego między albuminą, a modelem transportera hCtrl, zmierzone w naszych badaniach, budzą wątpliwości, co do ich adekwatności do układu biologicznego. Trudno pogodzić $t_{1/2}$ rzędu 15 min. ze zmierzoną dla hCtrl wydajnością transportu miedzi do komórki rzędu 10 jonów na sekundę [30]. Ponadto dla oddziaływania między dwoma motywami ATCUN/NTS, dedykowanymi do wiązania jonu Cu(II), trudno wskazać ścieżkę, prowadzącą do dostarczenia do kanału transbłonowego hCtrl jonu Cu^+ . Co prawda zaobserwowano pośrednio redukcję kompleksów ATCUN/NTS do niezidentyfikowanych form Cu(I) w obecności kwasu askorbinowego, ale proces ten był również powolny [31]. Ponadto kompleksów miedziowych ATCUN/NTS nawet nie można zredukować elektrochemicznie do kompleksów Cu(I) [32, 33].

2. BADANIA KINETYCZNE

W celu wyjaśnienia tych sprzeczności podjęliśmy badania mechanizmu tworzenia kompleksów miedziowych ATCUN/NTS metodami szybkiej kinetyki. Metody te były dotąd rzadko wykorzystywane w badaniach kompleksów Cu(II) z peptydami. W ostatnich latach badano jedynie tworzenie kompleksów z peptydami beta-amyloidowymi ($\text{A}\beta_{1-x}$) [34-38]. W eksperymentach tych przede wszystkim obserwowano jednoetapowe tworzenie kompleksu końcowego. Tego samego spodziewaliśmy się dla modelowego tripeptydu Gly-Gly-His, zwłaszcza że stała trwałości jego kompleksu miedziowego jest ponad stukrotnie wyższa niż dla peptydów $\text{A}\beta_{1-x}$, co sugerowałoby odpowiednio większą stałą asocjacji [24, 39]. Okazało się jednak, że jest inaczej. We współpracy z laboratorium prof. Petera-Leona Hagedoorna na Uniwersytecie Technicznym w Delft (Niderlandy) dokonaliśmy obserwacji procesów w mikrosekundowej i milisekundowej skali czasowej, co ujawniło istnienie nieznanych dotąd stanów pośrednich. Najciekawsze było zaobserwowanie relatywnie długożyjącego ($t_{1/2} = 97$ ms) kompleksu pośredniego o strukturze 2N przedstawionej na Rys. 2 [40]. Wykazaliśmy, że ten kompleks pośredni może podtrzymywać odwracalną parę redoks Cu(II)/Cu(I), co jest warunkiem niezbędnym dla procesu transportu miedzi przez hCtrl [41]. Analogiczny kompleks pośredni wykryliśmy również we współpracy z laboratorium dr. Liminga Yinga w Imperial College London [42]. W dalszych badaniach, prowadzonych przede wszystkim w naszym laboratorium w IBB PAN, stwierdziliśmy, że do tworzenia kompleksu pośredniego 2N dochodzi zawsze w reakcjach kompleksów miedziowych peptydów ATCUN/NTS. Ponadto w reakcjach z innymi peptydami,

wskutek oddziaływań łańcuchów bocznych, dochodzi do znacznego wydłużenia $t_{1/2}$, nawet dwudziestokrotnego. Pośredni kompleks 2N powstaje również w reakcjach peptydów Xaa-His-R, choć w tym przypadku jego $t_{1/2}$, nie przekracza 10 ms [43]. Obecnie prowadzimy analogiczne badania modeli peptydowych dla domeny zewnątrzkomórkowej hCtr1.



Rysunek 2. Postulowany schemat równowag strukturalnych w obrębie kompleksu 2N (na podstawie [40], [44])

Figure 2. Postulated scheme of structural equilibria within the 2N complex (based on [40], [44])

UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie długożyjących reaktywnych kompleksów przejściowych w reakcji jonu Cu(II), spełniających kryteria chemiczne (czas życia, reaktywność) dla przeniesienia miedzi przez hCtr1, zmienia paradygmat pozakomórkowego transportu miedzi, uprawdopodobniając schematy reakcji z pominięciem tworzenia inertnych kompleksów 4N, które pełniłyby wówczas rolę magazynową dla jonów Cu(II) [44]. Dodatkowym potwierdzeniem dla tej propozycji jest wykrycie kompleksu 2N również na ścieżce dysocjacji kompleksu ATCUN/NTS [45].

Wnioskiem o szerszym znaczeniu jest wykazanie w naszych badaniach, że dla skutecznego modelowania procesów biologicznych z udziałem jonów metali niezbędne jest nie tylko wykonanie badań stanów równowagi i struktur kompleksów, lecz również poznanie ich właściwości kinetycznych.

PODZIĘKOWANIE

Badania opisane w tym artykule zostały sfinansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki Opus 2018/31/N/ST5/02556.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M.C. Linder, *Biochemistry of Copper*. Springer US, 1991.
- [2] L. M. Ruiz, A. Libedinsky, A. A. Elorza, *Front. Mol. Biosci.* 2021, **8**, 771227.
- [3] J.P. Kehrer, *Toxicology* 2000, **149**, 43.
- [4] P. Palumaa, *FEBS Lett.* 2013, **587**, 1902.
- [5] V. Puchkova, M. Broggin, E.V. Polishchuk, E.Y. Ilyechova, R.S. Polishchuk, *Nutrients* 2019, **11**, 1364.
- [6] M. Siotto, R. Squitti, *Coord. Chem. Rev.* 2018, **371**, 86.
- [7] M.C. Linder, *Metallomics*, 2016, **8**, 887.
- [8] R. Squitti, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014, **28**, 482.
- [9] J. Lowe, R. Taveira-da-Silva, E. Hilário-Souza, *IUBMB Life*, 2017, **69**, 255.
- [10] A. G. Ranjbary, M. Mehrzad, H. Dehghani, A. Abdollahi, S. Hosseinkhani, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2020, **194**, 66.
- [11] T. Kirsipuu, A. Zadorožnaja, J. Smirnova, M. Friedemann, T. Plitz, V. Tõugu, P. Palumaa, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 5686.
- [12] W. Bal, L.D. Pettit, B. Lammek, K. Rolka, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.* 1992, **45**, 193.
- [13] I. Zawisza, M. Różga, W. Bal, *Coord. Chem. Rev.* 2012, **256**, 2297.
- [14] P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, I. Raibaut, W. Bal, P. Faller, *Chem. Eur. J.* 2018, **24**, 8029.
- [15] M. Różga, M. Sokołowska, A. M. Protas, W. Bal, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, **12**, 913.
- [16] K. Bossak-Ahmad, T. Frączyk, W. Bal, *S.C. Drew, ChemBioChem* 2020, **21**, 331.
- [17] K. Bossak, S. Drew, E. Stefaniak, D. Płonka, A. Bonna, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.* 2018, **182**, 230.
- [18] E. Stefaniak, D. Płonka, S.C. Drew, K. Bossak-Ahmad, K.L. Haas, M.J. Pushie, P. Faller, N.E. Wezynfeld, W. Bal, *Metallomics*, 2018, **10**, 1723.
- [19] K. Bossak-Ahmad, M. D. Wiśniewska, W. Bal, S.C. Drew, T. Frączyk, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, **21**, 6190.
- [20] K. Bossak, M. Mital, J. Poznański, A. Bonna, S. Drew, W. Bal, *Inorg. Chem.* 2016, **55**, 7829.
- [21] R. Kotuniak, T. Frączyk, P. Skrobecki, D. Płonka, W. Bal, *Inorg. Chem.* 2018, **57**, 15507.
- [22] N. E. Wezynfeld, A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M. Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, *Inorg. Chem.* 2020, **59**, 14000.
- [23] A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U. E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, *Dalton Trans.* 2021, **50**, 2726.
- [24] K. Bossak-Ahmad, W. Bal, T. Frączyk, S.C. Drew, *Inorg. Chem.* 2021, **60**, 16927.
- [25] I. Ufnalska, S. C. Drew, I. Zhukov, K. Szutkowski, U. E. Wawrzyniak, W. Wróblewski, T. Frączyk, W. Bal, *Inorg. Chem.* 2021, **60**, 18048.
- [26] A. Krężel, J. Wójcik, M. Maciejczyk, W. Bal, *Chem. Comm.* 2003, 704.
- [27] D. Płonka, W. Bal, *Inorg. Chim. Acta* 2018, **472**, 76.
- [28] L. Pickart, J.M. Vasquez-Soltero, A. Margolina, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2012, **2012**, 324832.
- [29] C.N. Beuning, L.J. Zocchi, K.P. Malikidogo, C. Esmieu, P. Dorlet, D.C. Crans, C. Hureau, *Inorg. Chem.* 2021, **60**, 7650.
- [30] E.B. Maryon, S.A. Molloy, K. Ivy, H. Yu, J.H. Kaplan, *J. Biol. Chem.* 2013, **288**, 18035.
- [31] A. Santoro, G. Walke, B. Vileno, P. P. Kulkarni, L. Raibaut, P. Faller, *Chem. Commun.* 2018, **54**, 11945.
- [32] 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.
- [33] U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, W. Wróblewski, *J. Electrochem. Soc.* 2017, **164**, G77.
- [34] J.T. Pedersen, K. Teilum N.H.H. Heegaard, J. Østergaard, H.-W. Adolph, L. Hemmingsen, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011, **50**, 2532.
- [35] J.T. Pedersen C.B. Borg T.C.T. Michaels, T.P.J. Knowles, P. Faller, K. Teilum, L. Hemmingsen, *ChemBioChem.* 2015, **16**, 1293.

- [36] T. Branch, P. Girvan, M. Barahona, L. Ying, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2015, **54**, 1227.
- [37] P. Girvan, T. Miyake, X. Teng, T. Branch, L. Ying, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 1732.
- [38] T. Branch, M. Barahona, C. A. Dodson, L. Ying, *ACS Chem. Neurosci.* 2017, **8**, 1970.
- [39] B. Alies, E. Renaglia, M. Różga, W. Bal, P. Faller, C. Hureau. *Anal. Chem.* 2013, **85**, 1501.
- [40] R. Kotuniak, M.J.F. Strampraad, K. Bossak-Ahmad, I. Ufnalska, U. Wawrzyniak, P.-L. Hagedoorn, W. Bal, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, **59**, 11234.
- [41] S. Carlotto, A. Bonna, K. Bossak-Ahmad, W. Bal, M. Porchia, M. Casarin, F. Tisato, *Metallomics* 2019, **11**, 1800.
- [42] X. Teng, E. Stefaniak, P. Girvan, R. Kotuniak, D. Płonka, W. Bal, L. Ying. *Metallomics* 2020, **12**, 470.
- [43] R. Kotuniak, *Rozprawa doktorska*, IBB PAN, Warszawa 2022.
- [44] R. Kotuniak, W. Bal, *Dalton Trans.* 2022, **51**, 14.
- [45] D. Płonka, R. Kotuniak, K. Dąbrowska, W. Bal, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 2021, **32**, 2766.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 maja 2022 r.