

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA – NAUKI CHEMICZNE/
DZIEDZINA NAUK – NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Aleksandra Magdalena Tobolska

**Projektowanie receptorów molekularnych
wykorzystujących metalokompleksy peptydowe**

Promotorzy

prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski

prof. dr hab. Sławomir Sęk

WARSZAWA 2022

Promotorzy:

Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski (Politechnika Warszawska)

Prof. dr hab. Sławomir Sęk (Uniwersytet Warszawski)

Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Od chemii do bioinnowacji" TRI-BIO-CHEM jest realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Podziękowania

Pragnę złożyć szczególne podziękowania **prof. dr hab. inż. Wojciechowi Wróblewskiemu**, za opiekę naukową, okazane wsparcie, życzliwość oraz nieocenioną pomoc w trakcie realizacji i redagowania pracy doktorskiej.

Serdecznie dziękuję **prof. dr hab. Sławomirowi Sękowi** za cenne rady i możliwość realizacji pracy doktorskiej pod jego opieką.

Serdecznie dziękuję **dr inż. Ninie Wezynfeld** za przekazaną wiedzę, poświęcony czas, niezastąpioną oraz wszechstronną pomoc, jak również wsparcie merytoryczne i wiarę w powodzenie prowadzonych przeze mnie badań.

Dziękuję **dr Urszuli Wawrzyniak** za wprowadzenie w świat elektrochemii, okazaną życzliwość i cenne wskazówki.

Dziękuję **prof. dr hab. inż. Patrycji Ciosek-Skibińskiej** oraz **mgr inż. Klaudii Głowacz** za przeprowadzenie analizy chemometrycznej.

Dziękuję **prof. dr hab. Wojciechowi Balowi** za współpracę, możliwość korzystania z aparatury badawczo-naukowej w Zakładzie Biofizyki IBB PAN, a także cenne dyskusje naukowe.

Dziękuję pracownikom i doktorantom Katedry Biotechnologii Medycznej (**Klaudii, Oli, Patrycji, Kasprowi, Polinie**), za wsparcie, stworzenie przyjaznej atmosfery pracy, okazaną życzliwość i wspólne poszukiwanie rozwiązań problemów badawczych.

Grupie z IBB PAN (**Dawidowi, Paulinie i Dobromile**) za syntezę badanych peptydów.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam **Rodzinie i Przyjaciółom** za motywację, cierpliwość, wyrozumiałość oraz niegasnącą wiarę we mnie.

Pragnę także podziękować **Politechnice Warszawskiej** (IDUB, projekt BIOTECHMED-1 nr. PSP 504/04496/1020/45.010407) oraz **Narodowemu Centrum Nauki** (projekt PRELUDIUM nr 2021/41/N/ST4/00956) za wsparcie finansowe realizowanych przeze mnie badań.

**Politechnika
Warszawska**



Streszczenie

Celem rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie i opis właściwości fizykochemicznych nowej klasy receptorów molekularnych – kompleksów peptydowych wykorzystujących sekwencję β -amyloidu posiadającego domenę wiążącą His2 z kationami metali przejściowych. Wspomniane związki charakteryzują się unikalnymi właściwościami koordynacyjnymi, jednakże nie zostały dotychczas wykorzystane w procesach rozpoznawania molekularnego. Podjęta tematyka jest szczególnie istotna ze względu na potrzebę poszukiwania nowych selektywnych i czułych związków rozpoznających aniony fosforanowe(V) w złożonych próbkach biologicznych oraz środowiskowych.

Badania rozpoczęto od wyselekcjonowania cząsteczki peptydu spośród N-końcowych analogów β -amyloidu ($A\beta$), ściśle związanych z patologią choroby Alzheimera. Dotychczas zidentyfikowano wiele różnych form tego peptydu, w tym formę $A\beta_{5-9}$, zawierającą resztę histydyny w drugiej pozycji w sekwencji aminokwasowej (His2), która nadaje unikalne właściwości koordynacyjne i elektrochemiczne. Szczególnie interesujący pod kątem projektowania peptydowych receptorów molekularnych selektywnych względem anionów okazał się najkrótszy badany analog $A\beta_{5-9}$ o sekwencji Arg-His-Asp-Ser-Gly (RHDSG). W dalszych badaniach skupiono się na szczegółowej analizie oddziaływań kompleksu $Cu(II)$ - $A\beta_{5-9}$ z anionami fosforanowymi(V) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Otrzymane wyniki pozwoliły na oszacowanie warunkowej stałej wiązania anionów fosforanowych(V) przez rozważany metalokompleks oraz potwierdziły selektywne rozpoznawanie tych jonów jak również nukleotydów, które w swojej strukturze zawierają grupy fosforanowe.

Wyróżniającą cechą opracowywanej grupy związków jest możliwość optymalizacji ich zdolności receptorowych, tj. selektywności i czułości względem wybranego analitu, poprzez modyfikację ich struktury. W związku z tym, kolejny etap prac dotyczył badań kompleksu $A\beta_{5-9}$, w którym jon centralny został wymieniony na kation $Ni(II)$. Ze względu na niewielką liczbę doniesień literaturowych opisujących właściwości kompleksów jonów niklu z peptydami $A\beta$, scharakteryzowano proces wiązania jonu $Ni(II)$ przez analog $A\beta_{5-9}$, wyznaczono dystrybucję tworzących się form kompleksowych dla wybranego zakresu pH i stężeń reagentów, a także opisano ich właściwości spektroskopowe oraz elektrochemiczne. Stwierdzono, że rodzaj kationu metalu w centrum koordynacji ma istotny wpływ na właściwości termodynamiczne i strukturalne metalokompleksów peptydowych $A\beta_{5-9}$, co z kolei znalazło odzwierciedlenie w ich odmiennej selektywności względem analizowanych związków

fosforanowych. Wykazano, że zastosowanie kompleksu niklowego, posiadającego geometrię oktaedryczną, umożliwia rozróżnianie nukleotydów posiadających jedno lub trzy ugrupowania fosforanowe (m.in. AMP i ATP), czego nie obserwowano w przypadku płasko-kwadratowego chelatu Cu(II)-A β ₅₋₉.

Ostatnia część badań obejmowała zaprojektowanie oraz syntezę biblioteki peptydów, których sekwencje aminokwasowe opierały się na modelowej cząsteczce A β ₅₋₉. Jej celem była optymalizacja struktury liganda, którego kompleks z jonem Cu(II) charakteryzowałby się największym powinowactwem względem anionów fosforanowych(V). Wykazano, że zmiana struktury peptydu His2 znacząco wpływa na wartość potencjału utleniania jonów Cu(II) w układzie dwuskładnikowym Cu(II)-His2 oraz trójskładnikowym z anionami fosforanowymi. Analiza wyników pozwoliła na wybór peptydów RHGSG i RHRSG, których metalokompleksy wykazywały najwyższą selektywność i czułość względem wspomnianych anionów. Ponadto w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej zaproponowano koncepcję rozróżniania oligopeptydów His2 w oparciu o analizę chemometryczną odpowiedzi elektrochemicznych zarejestrowanych w roztworach zawierających układy dwuskładnikowe i trójskładnikowe. Uzyskano efektywną dyskryminację peptydów His2, przy czym możliwe było rozróżnienie nawet bardzo podobnych strukturalnie oligopeptydów, takich jak RHDSG i DHRSG.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań opracowano nową klasę receptorów molekularnych – kompleksy peptydów o sekwencji His2 z kationami metali przejściowych. Obiecujące właściwości receptorowe tych związków osiągnięto dzięki odpowiedniemu zaprojektowaniu ich struktury, obejmującej rodzaj kationu metalu w centrum koordynacji oraz sekwencję aminokwasową peptydu. Oryginalność proponowanej struktury receptorów wynika z podwójnej roli centrum metalicznego, które jest zarówno miejscem rozpoznającym analit, jak i znacznikiem redoks o właściwościach elektrochemicznych określanych przez otoczenie koordynacyjne. Wyniki przedstawionych badań mają wysoki potencjał aplikacyjny, ponieważ mogą nie tylko przyczynić się do rozwoju nowoczesnych peptydowych biosensorów elektrochemicznych, ale również pomóc w zrozumieniu wielu patologii wynikających z oddziaływań pomiędzy metalokompleksami peptydowymi i biologicznie aktywnymi cząsteczkami, a tym samym doprowadzić do opracowania nowych celów terapeutycznych, czy projektowania innowacyjnych leków.

Słowa kluczowe: receptory molekularne, β -amyloid, metalokompleksy peptydowe, aniony fosforanowe(V), elektrochemia

Abstract

The doctoral thesis aimed to design and describe the physicochemical properties of a new class of molecular receptors – peptide complexes based on a β -amyloid sequence possessing a His2 binding motif with transition metal cations. Despite their distinctive coordination properties, these compounds have not yet been used in molecular recognition. Undertaken research is vital for developing new selective and sensitive receptors that recognize phosphate anions in complex biological and environmental samples.

The first research task was the selection of the peptide molecule among the N-terminal β -amyloid ($A\beta$) analogues closely related to the pathology of Alzheimer's disease. Different forms of $A\beta$ peptide have been identified so far, including $A\beta_{5-x}$, containing histidine residue at the second position in the amino acid sequence (His2), providing unique coordination and electrochemical properties. The shortest derivative, $A\beta_{5-9}$ with the following amino acid sequence Arg-His-Asp-Ser-Gly (RHDSG), turned out to be particularly interesting in designing anion-selective molecular receptors. Further research focused on a detailed analysis of the interactions between the $Cu(II)$ - $A\beta_{5-9}$ and phosphate anions under conditions similar to the physiological ones. The obtained results allowed to estimate the conditional binding constant of the phosphate anions by the studied complex and confirmed the selective recognition of these ions as well as nucleotides that own phosphate groups in the structure.

A distinguishing feature of the developed group of compounds is the possibility of tuning their receptor properties, i.e., selectivity and sensitivity toward selected analyte, by modifying their structure. Therefore the next step of the work concerned $A\beta_{5-9}$ complex studies, in which the central ion has been replaced with the $Ni(II)$. Due to the limited number of literature reports describing the properties of nickel complexes with $A\beta$ peptides, the process of $Ni(II)$ ion binding to the $A\beta_{5-9}$ was characterized, the distribution of complex forms was determined, and their spectroscopic and electrochemical properties were described. It was found that the type of metal ion in the coordination center significantly impacts the thermodynamic and structural properties of $A\beta_{5-9}$ metal complexes, which in turn was reflected in the selectivity toward the analyzed phosphate species. It has been demonstrated that in contrast to square planar $Cu(II)$ - $A\beta_{5-9}$ complex, octahedral $Ni(II)$ - $A\beta_{5-9}$ chelate enables the discrimination of nucleotides with one or three phosphate groups (including AMP and ATP).

The last part of the research focused on the design and synthesis of a peptide library based on the model $A\beta_{5-9}$ sequence to optimize the structure of the ligand whose complex with $Cu(II)$ ion would own the highest affinity for phosphate anions. It was shown that the change in the

structure of the His2 peptide affects the Cu(II) oxidation potential in the binary complex and ternary system with phosphate anions. The analysis of the results allowed for the selection of RHGSG and RHRSG peptides which Cu(II) complexes exhibit the highest selectivity and sensitivity toward phosphate anions. Moreover, during the implementation of the doctoral dissertation, the concept of distinguishing His2 oligopeptides was proposed based on the chemometric analysis of electrochemical responses recorded in solutions containing mentioned binary and ternary systems. An efficient discrimination of His2 peptides was obtained, including the differentiation of even structurally similar oligopeptides such as RHDSG and DHRSG.

In conclusion, the conducted research led to the development of a novel class of molecular receptors – metal complexes of peptides possessing the His2 sequence. The promising receptor properties of these compounds were achieved thanks to the appropriate design of their structure, including the type of metal cation and the peptide amino acid sequence. The proposed receptor structure's originality results from the dual role of the metal center, which is both an analyte recognition site and a redox probe of electrochemical properties determined by the coordination environment. Presented results have a high application potential because they may contribute to the construction of modern peptide-based electrochemical sensors and lead to a better understanding of many pathologies which are related to interactions between metal-peptide complexes with biologically active molecules, thus the establishment of new therapeutic targets or even to the design of innovative drugs.

Keywords: molecular receptors, β -amyloid, metal-peptide complexes, phosphate anions, electrochemistry

Spis treści

Podziękowania	5
Streszczenie.....	7
Abstract	9
Spis treści	11
1. Wprowadzenie – przegląd literatury	13
1.1. Peptydy w procesach rozpoznawania molekularnego.....	13
1.2. Aniony fosforanowe i receptory wykorzystywane do ich rozpoznawania.....	17
2. Cel i zakres pracy doktorskiej	22
3. Wyniki badań	23
3.1. Wybór peptydu z motywem koordynacyjnym His2.....	23
3.2. Badania właściwości kompleksu A β ₅₋₉ z jonami Cu(II).....	25
3.3. Badania właściwości kompleksu A β ₅₋₉ z jonami Ni(II).....	28
3.4. Porównanie właściwości metalokompleksów A β ₅₋₉	31
3.5. Wpływ sekwencji aminokwasowej na właściwości kompleksów peptydów His2 z jonami Cu(II).....	33
4. Podsumowanie	37
5. Bibliografia	40
Oświadczenia współautorów publikacji	47
Cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską	61
P1. A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes.....	63
P2. Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions	77
P3. Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β ₅₋₉ and Phosphates/Nucleotides	84
P4. Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing	95
P5. Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition	101
Dorobek naukowy autorki.....	112

Rozdział 1

Wprowadzenie – przegląd literatury

1.1. Peptydy w procesach rozpoznawania molekularnego

Peptydy są związkami organicznymi powstającymi przez połączenie wiązaniem amidowym (peptydowym) dwóch lub więcej aminokwasów (do około stu). Górna granica liczby aminokwasów dla peptydów jest jednak umowna i służy głównie odróżnieniu peptydów od białek o znacznie dłuższych łańcuchach i bardziej rozbudowanej strukturze [1].

Peptydy występują powszechnie w naturze i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów żywych. Odpowiadają między innymi za homeostazę jonów metali, gojenie ran, a także wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową czy antyoksydacyjną [2,3]. Należy jednak podkreślić, że peptydy biorą również udział w inicjowaniu i rozwoju licznych procesów patologicznych, na skutek których dochodzi m.in. do zmian neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, czy choroba Parkinsona [4,5].

Ze względu na swoje właściwości oraz różnorodność budowy, peptydy stały się obiektem ogromnego zainteresowania naukowców. W dużym stopniu przyczyniło się do tego ich potencjalne zastosowanie w procesach rozpoznawania molekularnego. Związki te mogą selektywnie oddziaływać zarówno z większymi analitami, takimi jak białka czy kwasy nukleinowe, ale również z małymi cząsteczkami np. aminokwasami, neuroprzekaznikami oraz jonami [6,7]. Ogromne znaczenie w zapewnieniu wysokiej selektywności rozpoznawania wybranych związków ma sekwencja aminokwasowa peptydu, a właściwie atomy donorowe łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych. Wykorzystując kombinacje dwudziestu naturalnych aminokwasów, można otrzymać ligandy peptydowe o różnorodnych właściwościach, strukturze i aktywności. Ponadto projektowanie syntetycznych pochodnych peptydowych odbywa się obecnie poprzez badania przesiewowe (ang. *screening*) i optymalizację bibliotek struktur peptydowych z wykorzystaniem zarówno technik biologii molekularnej, jak i chemicznych [8,9]. Takie podejście pozwala na relatywnie szybkie wyselekcjonowanie peptydów i ich pochodnych do określonych zastosowań bioanalitycznych. Bardzo dużą zaletą jest także możliwość automatyzacji syntezy peptydów, którą można prowadzić na podłożu stałym według protokołu Fmoc/tBu, gdzie do tymczasowej ochrony terminalnej grupy aminowej syntezowanego peptydu i grup bocznych aminokwasów stosuje

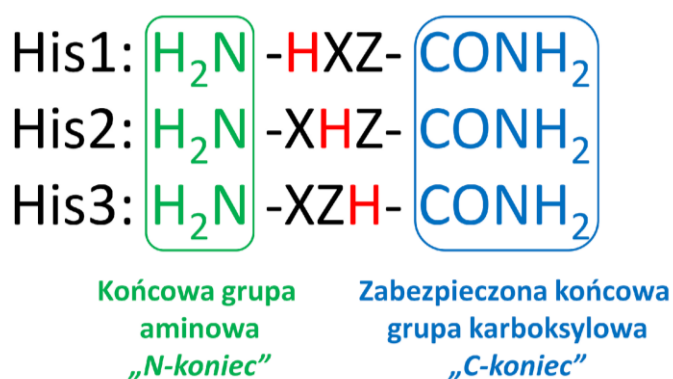
się odpowiednio grupę Fmoc (9-fluorenylometoksykarbonylową) oraz tBu (tert-butyłową) [10–12].

Przypisywane peptydom unikatowe właściwości koordynacyjne, umożliwiają ich praktyczne zastosowanie między innymi w warstwach receptorowych biosensorów [9,13–16]. Według definicji IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), sensor chemiczny jest urządzeniem składającym się z części receptorowej oraz przetwornika, pozwalającym na przekształcenie informacji chemicznej na sygnał użyteczny analitycznie [17]. Jednym z rodzajów sensorów chemicznych są biosensory, których warstwę receptorową stanowi materiał biologiczny, taki jak: peptydy, przeciwciała, kwasy nukleinowe oraz enzymy. Warto jednak zaznaczyć, że najczęściej w wyniku oddziaływania peptydów z analitem nie jest generowany sygnał, który mógłby być odczytany przez przetwornik. Dlatego konstrukcja biosensorów wymaga w wielu przypadkach modyfikacji struktury receptora peptydowego znacznikiem (in. sondą) fluorescencyjnym lub znacznikiem redoks [9].

Jednym z czynników, które decydują o funkcji i aktywności biologicznej peptydów i białek, jest ich oddziaływanie z jonami metali. Peptydy posiadają bowiem zdolność do ich kompleksowania wynikającą z obecności atomów o właściwościach elektronodonorowych takich jak: azot, siarka oraz tlen, występujących zarówno w łańcuchu głównym, jak i bocznym peptydu [18,19]. Z tego względu opisywane związki są wykorzystywane w warstwach receptorowych biosensorów do oznaczania jonów metali [16,20,21]. Znanych jest kilka zasad, którymi należy kierować się podczas projektowania peptydowego receptora selektywnego na wybrany kation. „Twarde” kationy (według klasyfikacji Pearsona) o małej polaryzowalności, takie jak Li(I), K(II), Na(I), Ca(II), Ba(II), Mg(II) oraz Al(III), preferują tworzenie kompleksów poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe, głównie z atomami tlenu obecnymi w grupach karboksylowych peptydu. Z kolei „miękkie” jony metali o dużej polaryzowalności, do których należą Ag(II), Hg(II), Cd(II), chętniej oddziałują z atomami azotu reszt histydyny, argininy, czy lizyny oraz siarki, występującej w reszcie cysteiny. Ponadto należy wyróżnić kationy metali o właściwościach pośrednich (m.in. jony Cu(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II)), które mogą być wiązane przez wszystkie wspomniane atomy donorowe, jednak preferencyjne w tym przypadku wydaje się oddziaływanie z atomami azotu pierścienia imidazolowego histydyny [22].

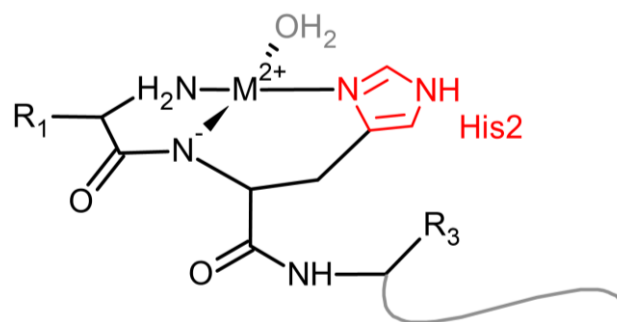
Sekwencje aminokwasowe bogate w reszty histydyłowe są najbardziej charakterystycznymi motywami, występującymi w peptydach i białkach wiążących jony Cu(II). Atom azotu pierścienia imidazolowego jest zazwyczaj miejscem kotwiczącym jon metalu, konkurując o ten kation lub jeszcze częściej – gdy koniec aminowy peptydu nie jest

zablokowany (np. przez grupę acetylową) – współuczestnicząc w jego wiązaniu z grupą aminową. Co więcej, pozycja reszty histydyny wpływa na właściwości strukturalne oraz termodynamiczne tworzącego się kompleksu [18]. Z tego względu wiele zespołów prowadzi szczegółowe badania mające na celu scharakteryzowanie właściwości metalokompleksów peptydów o różnej pozycji histydyny w sekwencji aminokwasowej. Szczególnie obiecujące wyniki i wysokie powinowactwo do jonów metali uzyskano dla peptydów, gdzie reszta histydyny znajduje się w pierwszej, drugiej lub trzeciej pozycji (Rysunek 1) [23,24].



Rysunek 1. Schemat sekwencji peptydowych zawierających najważniejsze motywy koordynacyjne wiążące jony metali przejściowych wraz ze wskazaniem końcowych grup peptydu.

Wśród motywów koordynacyjnych, które efektywnie wiążą biologicznie istotne jony metali takie jak Cu(II) oraz Ni(II), unikalne właściwości receptorowe wykazuje motyw His2 (XHZ), w którym histydyna zajmuje drugie miejsce w sekwencji aminokwasowej. Peptydy o takiej strukturze wiążą jony Cu(II) lub Ni(II) angażując trzy atomy azotu (3N) pochodzące z niezabezpieczonej końcowej grupy aminowej, pierścienia imidazolowego histydyny oraz wiązania peptydowego pomiędzy dwoma pierwszymi resztami aminokwasowymi [N^{am} , N^{im} , N^-]. Kompleks ten jest wyjątkowo trwały, co wynika z powstania stabilnych termodynamicznie pierścieni pięcioczłonowych (między azotem aminowym i amidowym) i sześcioczłonowych (między azotem amidowym i azotem pierścienia imidazolowego histydyny), Rysunek 2. Sfera koordynacyjna jonu centralnego w takim kompleksie dwuskładnikowym (binarnym) jest niewysycona. Czwarte miejsce w pozycji ekwatorialnej zajmują najczęściej cząsteczki wody, które słabo oddziałują z kompleksem binarnym i mogą być zastąpione przez inne związki o znacznie wyższym powinowactwie (np. imidazol) prowadząc do powstania stabilnego układu trójskładnikowego (ternarnego) [25–27].



Rysunek 2. Przykładowa struktura metalokompleksu peptydowego posiadającego motyw koordynacyjny His2. R_1 , R_3 oznacza odpowiednio pierwszą i trzecią resztę aminokwasową, która może być dowolną resztą oprócz Pro i Cys.

Przedstawicielem omawianej grupy peptydów jest naturalnie występujący w organizmach żywych peptyd o sekwencji Gly-His-Lys (GHK) [24]. Jego kompleks z jonami miedzi(II), Cu(II)-GHK, posiada właściwości przeciwzapalne i regeneracyjne oraz znany jest jako czynnik gojenia ran [28,29]. Warto wspomnieć także o peptydach, które są ściśle związane z neurodegeneracyjną chorobą Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's Disease*). U osób chorych na AD zaobserwowano pojawienie się zwyrodnieniowych zmian w mózgu, nazywanych splotami neurofibrylarnymi oraz płytkami starczymi. Wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne składają się głównie z białka tau, a zewnątrzkomórkowe płytki starcze, określane również jako blaszki starcze, z peptydów β -amyloidu ($A\beta$). Wspomniane peptydy $A\beta$ powstają w wyniku enzymatycznego cięcia białka prekursorowego APP (ang. *Amyloid Precursor Protein*). Wyróżnia się dwa szlaki proteolizy APP: nieamyloidogenny oraz amyloidogenny. W przypadku pierwszego z nich, APP trawione jest przez α - oraz γ -sekretazę, co prowadzi do uwolnienia krótkich i nietoksycznych fragmentów białka, ulegających szybkiej degradacji. Natomiast w drugim (amyloidogennym) szlaku białko prekursorowe jest hydrolizowane przez β - oraz γ -sekretazę, co prowadzi do powstawania toksycznych form $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$. Oprócz wspomnianych, w organizmie ludzkim wykryto także inne izoformy $A\beta$, które mogą być skrócone bądź dodatkowo modyfikowane na końcu aminowym: $A\beta_{p3-42}$, $A\beta_{4-42}$ czy $A\beta_{11-42}$. Za ich istnienie odpowiedzialne są takie enzymy jak neprylizyna, plazmina, a także współdziałanie α - i β -sekreteaz [30–32]. W 2012 roku odkryto, że podawanie osobom chorym na AD potencjalnych substancji leczniczych hamujących działanie β -sekreazy 1 (BACE1) prowadzi do aktywowania kaspaz, w wyniku czego wytwarzane są formy $A\beta_{5-42}$ oraz $A\beta_{5-40}$ [33,34]. W ich sekwencji aminokwasowej reszta histydyny występuje w pozycji drugiej, a zatem, podobnie jak GHK, posiadają one motyw wiążący His2, nadający im unikalne właściwości koordynacyjne.

Metalokompleksy peptydów His2 badano także między innymi pod kątem określenia ich właściwości katalitycznych oraz aktywności antybakteryjnej [35,36]. Co więcej, ze względu na strukturę chelatów, badacze skupili się na analizie ich zdolności do tworzenia układów ternarych z innymi ligandami, ponieważ oddziaływania tego typu odgrywają znaczącą rolę w wielu procesach zachodzących w układach biologicznych, takich jak transport związków niskocząsteczkowych oraz jonów [25,27,37,38]. Warto jednak podkreślić, że omawiane właściwości mogą również zostać wykorzystane podczas projektowania nowych receptorów molekularnych selektywnych na aniony.

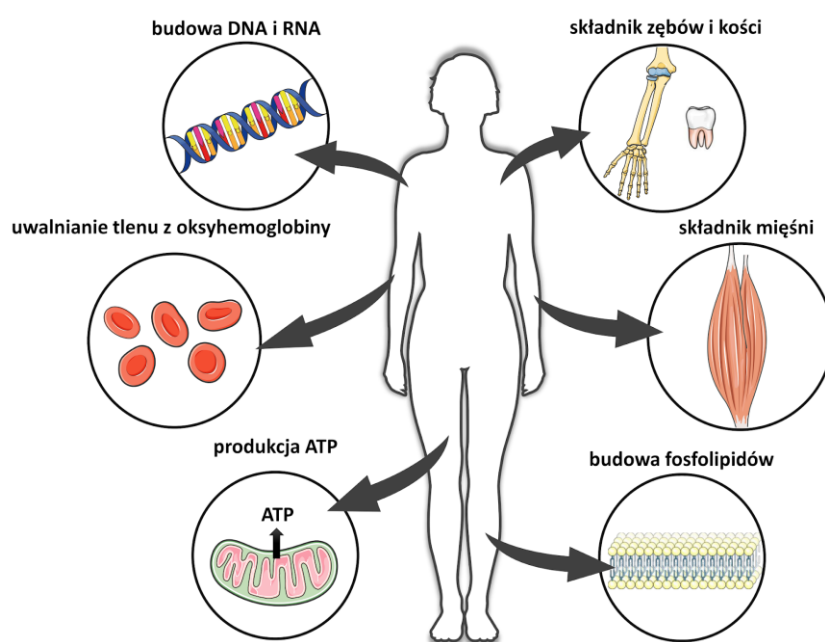
1.2. Aniony fosforanowe i receptory wykorzystywane do ich rozpoznawania

Ujemnie naładowane cząsteczki – aniony, pełnią wiele ważnych funkcji w układach biologicznych, medycynie oraz środowisku. Zaburzenia pracy narządów i stany chorobowe często wiążą się z nieprawidłową homeostazą elektrolitów. Co istotne, większość substratów i kofaktorów enzymów, ale również przekaźniki energii i informacji, ma postać cząsteczek naładowanych ujemnie. Należy także mieć na uwadze problem zanieczyszczenia środowiska naturalnego, np. anionami azotanowymi(V) i fosforanowymi(V), który do tej pory pozostaje nierozwiązany.

Wszechstronne znaczenie anionów od wielu lat skłania naukowców do poszukiwania nowych receptorów i badania mechanizmów ich rozpoznawania. Liczba znanych oraz scharakteryzowanych syntetycznych receptorów anionów jest jednak znacznie mniejsza niż receptorów kationów, a trudności w ich projektowaniu wynikają z istotnych różnic pomiędzy cząsteczkami naładowanymi dodatnio i ujemnie. W przypadku anionów obserwuje się dużą różnorodność kształtu, rozmiaru i ładunku, co zwiększa wymagania dotyczące rozmiaru oraz geometrii miejsc wiążących receptora. Ponadto ze względu na silną hydratację, receptor powinien efektywnie konkurować z cząsteczkami rozpuszczalnika [39]. Równie ważnym czynnikiem jest występowanie ujemnie naładowanych cząsteczek w różnych formach oraz stopniu protonowania zależnym od pH środowiska. Należy zatem pamiętać o zaprojektowaniu receptora w taki sposób, aby grupy odpowiadające za kompleksowanie anionu były zdeprotonowane w zakresie pH występowania jego danej formy.

Na szczególną uwagę wśród anionów zasługują fosforany(V), które wchodzą w skład fosfolipidów, będących podstawowym budulcem błon komórkowych. Ponadto odpowiadają one za syntezę ATP, czyli niezbędnego źródła energii dla procesów komórkowych. Oprócz tego

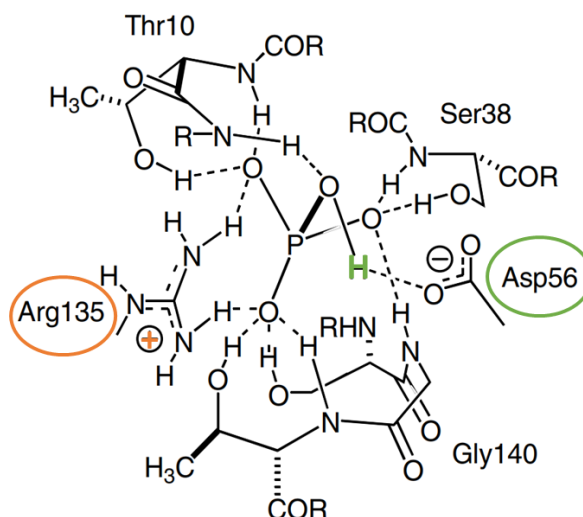
grupy fosforanowe są nośnikami informacji genetycznej, ponieważ stanowią ponad 25% masy DNA. Fosforany to również główny składnik kości i zębów, odpowiadają za mineralizację szkieletu oraz prawidłowe działanie mięśni. Aż 70% fosforanów znajdujących się we krwi ma postać związków organicznych, do których zalicza się fosfolipidy, zaś pozostała część występuje w formie fosforanów nieorganicznych, tj. H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Kontrolowanie stężenia tych jonów we krwi pozwala na diagnostykę chorób kości, nerek i tarczycy. Prawidłowy poziom fosforanów we krwi u osób dorosłych waha się od 0,8 mM do 1,5 mM [40,41]. W płynie mózgowo-rdzeniowym nieorganiczne aniony fosforanowe występują w znacznie niższym stężeniu, które nie powinno przekraczać 0,7 mM [42,43]. Z drugiej strony zawartość wewnątrzkomórkowa jest wyższa niż w płynach ustrojowych i może wynosić, w zależności od rodzaju tkanki, poziomu hormonów oraz pH, od 1,0 do 5,0 mM [40,44]. Zaburzenia homeostazy fosforanów mogą prowadzić do hiper- lub hipofosfatemii, powstawania chorób sercowo-naczyniowych oraz zwiększać ryzyko śmierci.



Rysunek 3. Schemat przedstawiający najważniejsze funkcje fosforanów w organizmie człowieka.

Fosforany(V) mają duże znaczenie dla środowiska naturalnego, a przede wszystkim dla stanu wód powierzchniowych. Ich nadmiar prowadzi bowiem do eutrofizacji wód i zakwitu glonów. Poziom fosforanów w próbkach środowiskowych jest znacznie niższy niż w układach biologicznych. Sumaryczna zawartość anionów fosforanowych w stojących zbiornikach wodnych nie powinna przekraczać $0,25 \mu\text{M}$, z kolei w wodach płynących $1,0 \mu\text{M}$ [40]. Ze względu na tak duże znaczenie fosforanów, wysiłki naukowców skupiają się na opracowaniu nowych metod oznaczania tych anionów. Szczególnie atrakcyjnym rozwiązaniem

W naturze rozpoznawanie anionów fosforanowych(V) odbywa się głównie poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak: elektrostatyczne, π - π stacking, hydrofobowe, a przede wszystkim wiązania wodorowe [39,45]. Peptydy i białka zbudowane z reszt aminokwasowych mogą brać udział we wspomnianych oddziaływaniach, wykorzystując odpowiednie grupy funkcyjne. Przykładem jest białko wiążące aniony fosforanowe (PBP, ang. *phosphate-binding protein*), które występuje w bakteriach. O selektywności rozpoznawania fosforanów przez PBP decyduje przede wszystkim możliwość tworzenia dodatkowego wiązania między atomem tlenu grupy karboksylowej białka, pochodzącej od reszty kwasu asparaginowego w pozycji 56 (Asp56), a atomem wodoru anionu wodorofosforanowego(V) (Rysunek 4). Dodatkowo obecna w białku grupa guanidynowa argininy (Arg135) pełni podwójną funkcję, jest donorem wiązania wodorowego oraz oddziałuje elektrostatycznie z cząsteczką anionu [46].



Badacze coraz częściej sięgają po rozwiązania jakie stosuje natura, dlatego działanie wielu syntetycznych receptorów fosforanów jest inspirowane mechanizmami rozpoznawania mającymi miejsce w układach biologicznych. Jedną z najbardziej znanych grup w literaturze

stanowią związki naładowane dodatnio, tj. receptory z grupami aminowymi, pirolowymi oraz guanidynowymi [47–49]. Oprócz tego coraz większe zainteresowanie skupia się wokół peptydów cyklicznych, które z kolei są głównie neutralnymi cząsteczkami, zbudowanymi z reszt aminokwasowych naprzemiennie z pochodnymi kwasu aminobenzoesowego [50]. Cechą charakterystyczną wspomnianych związków jest sztywna struktura szkieletu, co zapewnia kontrolę nad ich rozmiarem i kształtem. Z drugiej strony możliwa jest również modyfikacja łańcuchów bocznych tych peptydów, co pozwala na zwiększenie selektywności potencjalnego receptora względem rozpoznawanego anionu.

Bardzo dużą wadą związków organicznych naśladujących naturalne receptory jest ich ograniczone zastosowanie w środowisku wodnym ze względu na słabe oddziaływania międzycząsteczkowe, uniemożliwiające przewyciężenie wysokiej entalpii hydratacji anionu fosforanowego. Pokonanie wysokiej energii hydratacji jest możliwe dzięki silniejszym oddziaływaniom takim jak kwas-zasada Lewisa. Bardzo liczną grupą związków, wykorzystującą tego typu oddziaływania, są metalokompleksy (np. metaloporfiryny), w których kation metalu stanowi kwas Lewisa [40,51,52]. Z praktycznego punktu widzenia cechą wyróżniającą tę grupę receptorów jest możliwość zastosowania technik spektroskopowych (jeżeli związek jest chromoforem lub fluoroforem) lub elektrochemicznych (gdy wykazuje aktywność redoks) do śledzenia oddziaływań z analitem. Ponadto w przypadku, gdy chelaty posiadają niewysyconą sferę koordynacyjną jonu centralnego, rozpoznawanie anionu może być związane z oddziaływaniem kwas-zasada Lewisa z kationem metalu i utworzeniem układu trójskładnikowego [40,53].

Metalokompleksy peptydów z motywem koordynacyjnym His2 łączą poszukiwane cechy idealnego receptora anionów fosforanowych(V) występujące w naturalnych białkach rozpoznających aniony oraz w syntetycznych receptorach umożliwiającich ich skuteczną detekcję. Sekwencję peptydów można optymalizować wzbogacając ją o reszty aminokwasowe zapewniające wysokie powinowactwo zarówno do anionów fosforanowych, jak i jonu metalu. Natomiast, obecność w cząsteczce aktywnego redoks kationu metalu przejściowego Cu(II) lub Ni(II) pozwala na badanie oddziaływań receptor-analit za pomocą technik elektrochemicznych [54]. Jednakże, pomimo przedstawionych powyżej bardzo obiecujących właściwości, związki te nie zostały dotychczas szczegółowo zbadane pod kątem ich zdolności receptorowych.

Problematykę tę podjęto w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, a uzyskane wyniki badań dotyczące możliwości opracowania receptorów molekularnych, wykorzystujących

metalokompleksy peptydowe, selektywnych względem wybranych anionów zostały zebrane w cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

P1. N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β_{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, *Inorg. Chem.* 59 (2020) 14000-14011.

P2. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, *Dalton Trans.* 50 (2021) 2726-2730.

P3. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β_{5-9} and Phosphates/Nucleotides, *Inorg. Chem.* 60 (2021) 19448-19456.

P4. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, *Chem. Proc.* 5 (2021) 39_1-39_4.

P5. A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His₂ peptides: phosphate and peptide sequence recognition, *Dalton Trans.* (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K.

Pełne teksty publikacji, w których przedstawiono przegląd literatury tematu, metodykę oraz szczegółowy opis wyników badań zrealizowanych w ramach rozprawy doktorskiej zebrano na końcu niniejszej pracy. W rozdziałach 3-4 zaprezentowano natomiast zwięzłe omówienie i podsumowanie całości uzyskanych rezultatów – komentarz do cyklu artykułów naukowych stanowiących rozprawę doktorską.

Rozdział 2

Cel i zakres pracy doktorskiej

W poprzednim rozdziale wykazano, że istnieje ciągła potrzeba projektowania selektywnych i czułych receptorów molekularnych efektywnie rozpoznających aniony w warunkach fizjologicznych. Jest to zadanie, które do dziś pozostaje wyzwaniem. W związku z powyższym głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowej klasy receptorów molekularnych rozpoznających aniony, wykorzystujących metalokompleksy peptydowe. Wyróżniającą cechą proponowanej grupy związków jest możliwość modyfikacji ich struktury (zmiana jonu centralnego oraz sekwencji aminokwasowej peptydu), która może skutkować poprawą ich właściwości receptorowych. Ponadto obecność centrum metalicznego w układzie pozwala na zastosowanie elektrochemicznych technik detekcji, które stanowią proste i wygodne narzędzie pozwalające na badanie oddziaływań receptora z potencjalnym analitem, a w przyszłości konstrukcję nowych biosensorów. W ramach pracy doktorskiej zaplanowano następujące zadania:

- wybór sekwencji peptydowej spośród β -amyloidów posiadających motyw wiążący His2;
- określenie właściwości fizykochemicznych kompleksów binarnych modelowej cząsteczki peptydu z jonami Cu(II) i Ni(II);
- badanie oddziaływań metalokompleksów z anionami fosforanowymi i wybranymi nukleotydami;
- zaprojektowanie biblioteki peptydów opartej na modelowej sekwencji A β pod kątem optymalizacji struktury i wyselekcjonowania cząsteczki peptydu, której metalokompleks charakteryzuje się największym powinowactwem względem anionów fosforanowych.

W trakcie realizacji powyższych zadań wykorzystane zostały następujące metody i techniki badawcze: spektrofotometria UV-vis, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *Circular Dichroism*), miareczkowanie potencjometryczne, woltamperometria cykliczna (CV, ang. *Cyclic Voltammetry*) oraz woltamperometria pulsowa różnicowa (DPV, ang. *Differential Pulse Voltammetry*). Wszystkie peptydy badane w niniejszej pracy zostały zsyntezowane w grupie prof. Wojciecha Bala (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk).

Rozdział 3

Wyniki badań

3.1. Wybór peptydu z motywem koordynacyjnym His2

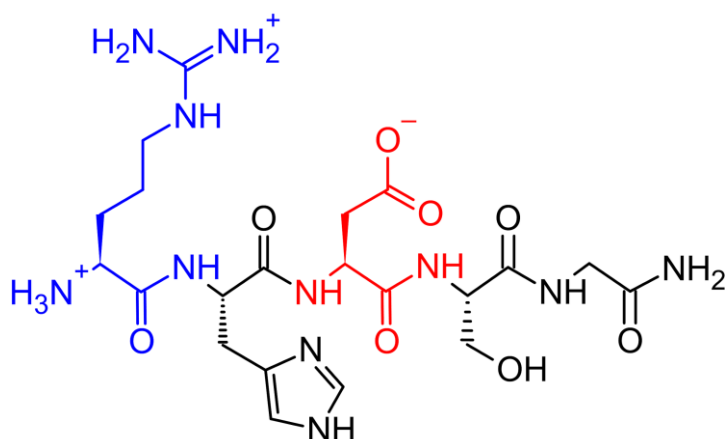
Cykl publikacji naukowych stanowiący niniejszą rozprawę doktorską przedstawia kolejne etapy badań nad opracowaniem nowej klasy receptorów molekularnych wykorzystujących, dotychczas nierozpatrywane pod tym kątem, metalokompleksy peptydowe. Prace rozpoczęto od wyselekcjonowania peptydu zawierającego domenę wiążącą His2, dla którego przeprowadzono dalsze badania. Według założeń miała być to cząsteczka o sekwencji aminokwasowej występującej w peptydach naturalnych. Wyboru dokonano spośród N-końcowych fragmentów β -amyloidu na podstawie wyników badań ich kompleksów z kationem Cu(II), które opisano w publikacji **P1**. $A\beta_{5-x}$ są formami występującymi w niewielkiej ilości w mózgu osób chorych na AD, jednak ich stężenie wzrasta po wdrożeniu leczenia inhibitorami BACE (ang. *β -side APP Cleaving Enzyme*). Zainteresowanie tą grupą peptydów wynikało nie tylko z obecności domeny His2, ale również z bardzo ciekawej sekwencji aminokwasowej, w której przy motywie wiążącym jony Cu(II) usytuowane są reszty Arg i Asp, wykorzystywane także przez inne grupy badawcze w projektowaniu receptorów molekularnych rozpoznających aniony, w szczególności fosforany(V).

Celem badań przedstawionych w pracy **P1**, prowadzonych we współpracy z grupą prof. Wojciecha Bala z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, był termodynamiczny i strukturalny opis oddziaływania jonów Cu(II) z niedawno odkrytą formą β -amyloidu ($A\beta_{5-x}$), a także wyznaczenie właściwości redoks powstałych kompleksów. Szczegółowej analizie poddano następujące analogi: $A\beta_{5-16}$, $A\beta_{5-12}$ oraz $A\beta_{5-9}$. Badania wykazały, że w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (pH 7,4) $A\beta_{5-12}$ oraz $A\beta_{5-9}$ wiążą jony Cu(II) tworząc koordynacyjnie niewysyczone związki typu 3N [N^{am} , N^{im} , $N^{\cdot}$]. Wyniki miareczkowania potencjometrycznego, pomiarów spektroskopowych UV-vis oraz dichroizmu kołowego (CD) pozwoliły na wyznaczenie wartości warunkowych stałych trwałości w pH 7,4 tych dwóch metalokompleksów (K^c), wynoszących ponad $5 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$. Jeszcze wyższą wartością charakteryzował się chelat najdłuższej pochodnej $A\beta_{5-16}$, która oprócz reszty His w pozycji drugiej, posiadała również dwie kolejne reszty histydyny (His13/His14, przyjmując numerację względem sekwencji $A\beta_{1-x}$) w dalszej części peptydu, mogące stanowić dodatkowe miejsce

wiązania jonu Cu(II). Taka struktura umożliwiła utworzenie wyjątkowo stabilnego kompleksu wewnątrzcząsteczkowego, w którym czwarte miejsce w pozycji ekwatorialnej metalu zajmował atom azotu pierścienia imidazolowego His13/14. W pracy przedstawiono także szczegółową analizę właściwości elektrochemicznych powstających chelatów. Wyniki badań wykazały, że w każdym z badanych układów jony Cu(II) ulegały zarówno procesowi redukcji do Cu(I), jak i utleniania do Cu(III) (Rysunek 10, **P1**). Można zatem stwierdzić, że kompleksy Cu(II)-A β _{5-x} łączą w sobie właściwości redoks kompleksu Cu(II)-A β _{1-x}, gdzie zaobserwowano tylko proces redukcji oraz Cu(II)-A β _{4-x}, dla którego następowała reakcja utleniania centrum metalicznego oraz jego redukcja przy bardzo niskim, nieosiągalnym fizjologicznie potencjale wynoszącym -0,96 V vs. Ag/AgCl [55–57]. W przypadku peptydów A β ₅₋₁₂ oraz A β ₅₋₁₆, posiadających w swojej sekwencji aminokwasowej resztę Tyr (Y), zarejestrowano także dodatkowy sygnał związany z procesem utleniania wspomnianej reszty aminokwasowej, występujący przy potencjale zbliżonym do potencjału utleniania centrum metalicznego. Z punktu widzenia niniejszej rozprawy ważnym aspektem badań była również wstępna ocena zdolności metalokompleksów A β _{5-x} do tworzenia układów ternarnych. Wprowadzenie imidazolu (Im), prostej cząsteczki naśladującej reszty His w peptydach i białkach, jako trzeciego składnika do roztworu kompleksów Cu(II) z A β ₅₋₁₂ oraz A β ₅₋₉ wywołało znaczące zmiany w ich właściwościach spektroskopowych i redoks (Rysunek 9-10, **P1**). W przypadku widm zarejestrowanych techniką spektroskopii dichroizmu kołowego odnotowano przesunięcie i wzrost intensywności pasma przejścia *d-d* i CT (ang. *charge transfer*), natomiast na krzywych woltamperometrycznych zaobserwowano zmianę położenia piku utleniania Cu(II)/Cu(III). Rezultaty te wskazały na zastąpienie cząsteczki wody w strukturze 3N przez atom azotu pierścienia imidazolowego, a zatem utworzenie kompleksu ternarnego.

Biorąc pod uwagę wyniki badań wykonanych dla peptydów A β _{5-x} oraz ich kompleksów z jonami Cu(II), do dalszych etapów prac nad projektowaniem receptorów molekularnych wybrano najkrótszy analog A β ₅₋₉, zbudowany z pięciu aminokwasów (Rysunek 5). Decyzję taką podjęto biorąc pod uwagę usytuowanie oraz liczbę reszt His w sekwencji aminokwasowej. Założono, że aby zwiększyć prawdopodobieństwo oddziaływania z potencjalnym analitem peptyd powinien posiadać resztę His jedynie w pozycji drugiej. Obecność dodatkowych motywów His mogłaby doprowadzić do utworzenia zamkniętej struktury wewnątrzcząsteczkowego makrochelatu (tak jak to wykazano dla A β ₅₋₁₆), znacznie utrudniając oddziaływanie ternarne z potencjalnym analitem. Co więcej, według wstępnych założeń, działanie docelowego receptora miało opierać się na zmianie jego właściwości redoks w wyniku oddziaływania

z rozpoznawaną cząsteczką. Z tego powodu drugim kryterium selekcji był charakter elektrochemicznej odpowiedzi metalokompleksów. Jak udowodniono, obecność reszty Tyr w łańcuchu peptydowym A β ₅₋₁₂ utrudniała analizę pomiarów elektrochemicznych, ponieważ jej utlenianie było procesem nieodwracalnym, a rejestrowany sygnał prądowy położony był blisko sygnału odpowiadającego utlenianiu centrum metalicznego. Z tych powodów, w następnych doświadczeniach skupiono się na najkrótszym analogu A β _{5-x} opisanym w pracy **P1**, A β ₅₋₉, posiadającym domenę His2, ale bez dodatkowych motywów zawierających reszty histydyny i tyrozyny.



Rysunek 5. Sekwencja aminokwasowa A β ₅₋₉ występująca w pH 7,4. Kolorem niebieskim i czerwonym wyróżniono odpowiednio resztę Arg i Asp, które potencjalnie mogą brać udział w oddziaływaniu z anionami.

3.2. Badania właściwości kompleksu A β ₅₋₉ z jonami Cu(II)

Celem dalszych badań, przedstawionych w publikacji **P2**, była szczegółowa analiza woltamperometryczna oddziaływań kompleksu Cu(II)-A β ₅₋₉ z anionami fosforanowymi(V). Eksperymenty te uzupełniono o pomiary spektroskopowe CD oraz UV-vis, które pozwoliły na oszacowanie warunkowej stałej wiązania anionów fosforanowych przez badany kompleks. Ponadto rozważając zastosowanie Cu(II)-A β ₅₋₉ w roli receptora molekularnego, zbadano wpływ potencjalnych interferentów na jego właściwości elektrochemiczne i spektralne.

Pomiary rozpoczęto od wstępnej analizy procesów redoks zachodzących w kompleksie Cu(II)-A β ₅₋₉ przed dodaniem i po dodaniu 20-krotnego nadmiaru anionów fosforanowych do układu, z wykorzystaniem techniki woltamperometrii cyklicznej (CV) (Rysunek 2, **P2**). W zakresie ujemnych potencjałów zaobserwowano proces redukcji Cu(II)/Cu(I) w kompleksie binarnym. Warto nadmienić, że duża różnica potencjałów katodowego piku redukcji oraz

anodowego piksu utleniania wskazywała na wolny proces przeniesienia elektronu, związany prawdopodobnie z koniecznością reorganizacji struktury wskutek zmiany stopnia utlenienia jonów Cu(II). Ponadto w badanym kompleksie zarejestrowano proces utleniania Cu(II)/Cu(III), który występował przy potencjale wynoszącym $1,20 \pm 0,01$ V vs. Ag/AgCl. Charakter omawianego procesu redoks można opisać jako nieodwracalny, ze względu na brak piksu katodowego w cyklu powrotnym na krzywej cyklicznej. Powyższe wyniki były zgodne z opisanymi w publikacji **P1**. Następnie do układu wprowadzono aniony fosforanowe(V) i zarejestrowano woltamperogramy w analogicznych zakresach potencjałów. Znaczne zmiany w mierzonej odpowiedzi prądowej odnotowano jedynie dla sygnału związanego z utlenianiem centrum metalicznego w kompleksie (tj. przesunięcie piksu utleniania w kierunku ujemnych wartości o 150 mV), wobec tego proces ten został poddany szczegółowej analizie w dalszej części pracy.

Szczegółowe badania oddziaływań pomiędzy Cu(II)-A β ₅₋₉ a anionami fosforanowymi(V) rozpoczęto od miareczkowania metalokompleksu roztworem fosforanu(V) sodu. W celu wyeliminowania prądu pojemnościowego zastosowano technikę pulsową różnicową (DPV) do monitorowania zmian w zachodzących procesach elektrochemicznych. Począwszy od najniższego stężenia fosforanów zaobserwowano postępujące zmiany w odpowiedzi prądowej, tj. pojawienie się i wzrost intensywności prądu nowego sygnału, świadczące o tworzeniu się układu trójskładnikowego Cu(II)-A β ₅₋₉/fosforan (Rysunek 3, **P2**). Warto wspomnieć, że przesunięcie potencjału utleniania Cu(II)/Cu(III) w kierunku mniej dodatnich wartości wskazało także na stabilizację formy Cu(III) w badanym układzie. Aby zweryfikować wyniki pomiarów elektrochemicznych, wykonano podobny eksperyment z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego w zakresie UV-vis. Sukcesywne zmiany w obrębie pasma przejścia *d-d* oraz pasma CT potwierdziły tworzenie kompleksu ternarnego oraz pozwoliły na oszacowanie warunkowej stałej wiązania anionów fosforanowych przez Cu(II)-A β ₅₋₉, która wyniosła 52 M⁻¹ (Rysunek 4, **P1**). Wyniki te sugerują, że oddziaływanie metalokompleksu z ligandem jest słabe, jednakże obserwowane zmiany mogą świadczyć o zastąpieniu cząsteczki wody, znajdującej się w pozycji ekwatorialnej jonu centralnego, atomem tlenu anionu fosforanowego.

W kolejnym etapie prac dokonano oceny selektywności rozpoznawania anionów fosforanowych(V) przez kompleks Cu(II)-A β ₅₋₉. W tym celu wykonano pomiary DPV w roztworze zawierającym badany związek i jony chlorkowe, siarczanowe(VI) oraz octanowe, które mogą być potencjalnymi anionami przeszkadzającym (interferentami). Nie zaobserwo-

wano znaczącego wpływu jonów chlorkowych a także siarczanowych na odpowiedź prądową rejestrowaną dla kompleksu Cu(II)-Aβ₅₋₉, mimo że te drugie charakteryzują się zbliżoną do fosforanowych geometrią oraz hydrofilowością. Zauważono natomiast przesunięcie potencjału utleniania jonów Cu(II) w metalokompleksie w obecności anionów octanowych. Warto jednak podkreślić, że w tym przypadku sygnał prądowy wystąpił przy wyższej wartości potencjału w porównaniu do sygnału mierzonego dla układu ternarnego z fosforanami. Co więcej, eksperymenty prowadzone w roztworze mieszaniny wspomnianych jonów potwierdziły selektywność Cu(II)-Aβ₅₋₉ wobec anionów fosforanowych. Podobne wyniki uzyskano na podstawie komplementarnych pomiarów spektroskopowych – niewielki efekt tj. zmianę intensywności pasma CT występującego przy 320 nm, zaobserwowano jedynie przy bardzo wysokim nadmiarze molowym jonów siarczanowych lub octanowych w roztworze. Otrzymane rezultaty wykazały największy wpływ anionów fosforanowych na właściwości elektrochemiczne i spektroskopowe Cu(II)-Aβ₅₋₉, a także podkreśliły zalety technik elektrochemicznych (np. w porównaniu do technik spektroskopowych) w badaniu oddziaływań metalokompleksów peptydowych z innymi ligandami.

Rozpoznawana przez badane metalokompleksy grupa fosforanowa występuje nie tylko w postaci anionu nieorganicznego, ale także wchodzi w skład bardziej skomplikowanych biocząsteczek, takich jak np. nukleotydy. Związki te są podstawowym składnikiem kwasów nukleinowych oraz przekaźnikami sygnałów potrzebnych do przeprowadzenia podstawowych procesów zachodzących w komórkach. Oprócz ugrupowań fosforanowych, nukleotydy zbudowane są z pierścienia pirymidynowego lub purynowego, składającego się ze skondensowanych pierścieni pirymidyny i imidazolu. Posiadają zatem kilka dodatkowych potencjalnych atomów donorowych, które mogą brać udział w wiązaniu jonów Cu(II). Mając na uwadze obiecujące rezultaty dotyczące rozpoznawania anionów fosforanowych przez kompleks Cu(II)-Aβ₅₋₉, w kolejnym etapie badań określono wpływ adenozyno-5'-mono-fosforanu (AMP) oraz adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) na jego aktywność elektrochemiczną. Obecność AMP lub ATP w roztworze Cu(II)-Aβ₅₋₉ spowodowało opisywaną wcześniej zmianę położenia sygnału prądowego. Zbliżone wartości potencjałów utleniania jonów Cu(II) w układzie ternarnym z anionami fosforanowymi(V) oraz AMP i ATP sugerują oddziaływanie metalokompleksu z grupami fosforanowymi nukleotydów. Aby zweryfikować, który z atomów donorowych nukleotydu jest zaangażowany w te oddziaływania, zarejestrowano krzywe woltamperometryczne oraz widma UV-vis (Rysunek 5, **P2**) dla trójskładnikowych układów Cu(II)-Aβ₅₋₉ z anionami fosforanowymi(V), nukleotydami oraz adeniną. Niewielkie zmiany

położenia pasma przejścia $d-d$ w porównaniu z kompleksem binarnym Cu(II)-A β ₅₋₉ oraz zbliżone położenie sygnałów prądowych zarejestrowanych dla układów ternarnych z fosforanami i nukleotydami sugerowały, że cząsteczki ATP oraz AMP oddziałują z chelatem angażując atom tlenu grupy fosforanowej, a nie atom azotu pierścienia purynowego.

Podsumowując, wyniki przedstawione w pracy **P2** wykazały, że metalokompleks peptydowy Cu(II)-A β ₅₋₉ charakteryzuje się obiecującymi właściwościami receptorowymi, a obserwowane istotne zmiany w wartościach potencjału utleniania jonu centralnego w chelacie związane są z tworzeniem układów trójskładnikowych z anionami fosforanowymi. Efekt ten może być wykorzystany do rozpoznawania molekularnego cząsteczek zawierających grupy fosforanowe.

3.3. Badania właściwości kompleksu A β ₅₋₉ z jonami Ni(II)

Optymalizację właściwości receptorowych (czułości i selektywności) metalokompleksów peptydowych można uzyskać poprzez modyfikację ich struktury. W związku z tym, kolejny etap prac dotyczył określenia właściwości fizykochemicznych chelatu, w którym jon centralny został wymieniony na kation Ni(II). Rezultaty tych badań przedstawiono w pracy **P3**.

Ze względu na potencjalną zależność pomiędzy wiązaniem jonów Cu(II) przez peptydy β -amyloidu a wzrostem stresu oksydacyjnego w komórkach mózgu, kompleksy miedziowe są obiektem większości badań naukowych. Zdecydowanie słabiej poznane i opisane w literaturze są ich analogi z jonami Ni(II) w centrum koordynacji. Z tego względu podjęto próbę opisu wiązania jonów Ni(II) przez peptyd A β ₅₋₉ z wykorzystaniem miareczkowania potencjometrycznego oraz technik spektroskopowych UV-vis i CD. Roztwory peptydu oraz jego chelatu z jonami Ni(II) miareczkowano za pomocą stężonego roztworu wodorotlenku sodu, przy stałej kontroli pH. Zastosowanie miareczkowania potencjometrycznego było uzasadnione, ponieważ proces kompleksowania jonu metalu sprzężony jest z deprotonacją grup znajdujących się w peptydzie. Przeprowadzone eksperymenty umożliwiły wyznaczenie wartości stałych protonowania peptydu (pK_a), które następnie zostały wykorzystane do obliczenia stałych trwałości związków koordynacyjnych ($\log\beta$) na podstawie pomiarów dla roztworu peptydu z jonami Ni(II). Dzięki znajomości wartości $\log\beta$, zastosowaniu metod numerycznych oraz dobraniu odpowiedniego modelu wiązania, wyznaczono dystrybucję poszczególnych form kompleksowych Ni(II)-A β ₅₋₉ dla danych warunków (Rysunek 1, **P3**). Dodatkowo obliczono warunkową stałą trwałości chelatu w pH 7,4 ($1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). W celu walidacji otrzymanych danych potencjometrycznych wykonano także miareczkowania kwasowo-zasadowe z detekcją

spektroskopową (UV-vis, CD), które potwierdziły poprawność przyjętego modelu wiązania. Otrzymane widma stanowiły również cenne źródło informacji o otoczeniu i sposobie koordynacji kationu metalu przez peptyd.

Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, że w zależności od pH peptyd A β ₅₋₉ tworzy z jonami Ni(II) trzy różne formy kompleksowe. Strukturą dominującą w pH 7,4 jest oktaedryczny kompleks wysokospinowy, o czym świadczyły trzy charakterystyczne pasma o niskiej intensywności obecne na widmach UV-vis (Rysunek 2A, **P3**). Analiza danych eksperymentalnych wykazała, że jest to tryb koordynacji typu 3N [N^{am}, N^{im}, N⁻], podobny do trybu zaobserwowanego dla kompleksu Cu(II)-A β ₅₋₉. Jednakże ze względu na odmienną geometrię, w przypadku Ni(II)-A β ₅₋₉ pozostałe miejsca w sferze koordynacyjnej metalu prawdopodobnie zajmują aż trzy cząsteczki wody: jedna w pozycji ekwatorialnej, dwie zaś w pozycji aksjalnej. Wraz ze wzrostem pH zaobserwowano charakterystyczną zmianę barwy badanego roztworu z zielonej na żółtą, a na widmie UV-vis powstanie jednego intensywnego pasma przy długości fali w zakresie 440-415 nm. W przypadku widm CD (Rysunek 2B, **P3**), efekt ten był szczególnie widoczny w obrębie pasm przejścia *d-d*, wrażliwych na zmiany konformacyjne metalokompleksów peptydowych, i wiązał się z przeorganizowaniem struktury oktaedrycznego chelatu wysokospinowego w niskospinowy o geometrii płasko-kwadratowej. Reorganizacja struktury związku koordynacyjnego była spowodowana deprotonacją cząsteczki wody w pozycji ekwatorialnej, a w pH powyżej 10 – grup amidowych wiązania peptydowego. Doprowadziło to do utworzenia odpowiednio formy 3N+OH⁻ [N^{am}, N^{im}, N⁻, OH⁻] oraz 4N [N^{am}, 3N⁻]. We współpracy z grupą prof. Sławomira Sęka z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego wykonano serię pomiarów widm roztworu Ni(II)-A β ₅₋₉ z wykorzystaniem techniki spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR, ang. *Attenuated Total Reflectance*). Widma metalokompleksu zarejestrowane w roztworze o pH 7,4 oraz 11,0 potwierdziły znaczne zmiany konformacyjne, jednak precyzyjny opis charakteru tych zmian wymagałby dalszych szczegółowych badań metalokompleksów z zastosowaniem techniki ATR-IR. Z tego powodu wyniki te nie zostały zamieszczone w pracy **P3**, jednak planowana jest kontynuacja tej tematyki w ramach kolejnych projektów dotyczących badań kompleksów peptydów His2 z jonami Ni(II).

W związku z występowaniem różnych struktur kompleksu Ni(II)-A β ₅₋₉, zarejestrowana odpowiedź prądowa (w szczególności wartość potencjału utleniania Ni(II) oraz charakter procesu redoks) badanego układu była zależna od pH (Rysunek 3, **P3**). Biorąc jednak pod uwagę zastosowanie Ni(II)-A β ₅₋₉ w roli receptora anionów fosforanowych, dalsze badania

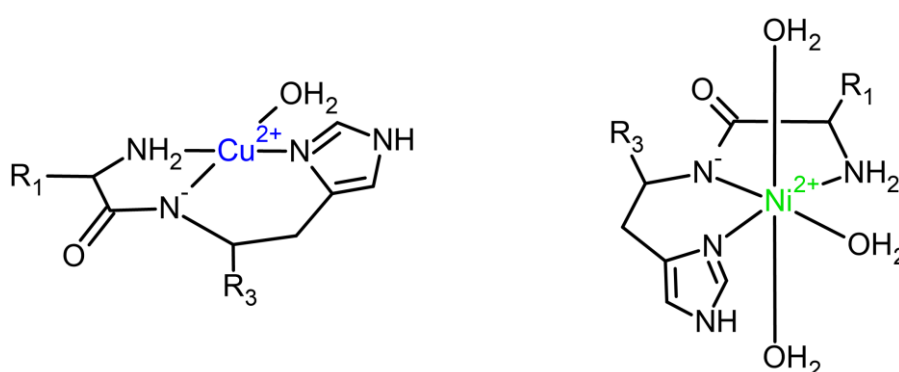
przeprowadzono w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (pH 7,4). Ów wybór był ponadto uzasadniony oktaedryczną geometrią metalokompleksu, posiadającego więcej niż jedno potencjalne miejsce wiązania analitu. Pomiarы elektrochemiczne wykazały, że centrum metaliczne w Ni(II)-A β ₅₋₉ w badanych warunkach może ulegać jedynie reakcji utleniania do Ni(III). Omawiany proces był elektrochemicznie nieodwracalny i występował przy potencjale $1,02 \pm 0,01$ V vs. Ag/AgCl, a więc prawie 200 mV niższym niż w przypadku utleniania jonów Cu(II) w metalokompleksie peptydowym A β ₅₋₉.

Ocena zdolności receptorowych kompleksu Ni(II)-A β ₅₋₉ obejmowała przeprowadzanie eksperymentów analogicznych do tych, które miały miejsce w przypadku jego odpowiednika z jonem Cu(II) w centrum koordynacji. W wyniku oddziaływania chelatu z anionami fosforanowymi(V) zaobserwowano zmianę położenia pików utleniania Ni(II)/Ni(III), a spośród testowanych interferentów jedynie obecność jonów octanowych miała wpływ na położenie sygnału prądowego. Wykazano jednak, że Ni(II)-A β ₅₋₉ preferencyjnie wiąże aniony fosforanowe (Rysunek 4, **P3**). W porównaniu z badaniami opisanymi w poprzednim rozdziale, rozszerzono zakres eksperymentów związanych z analizą wpływu biocząsteczek zawierających grupy fosforanowe (nukleotydów) na właściwości redoks analizowanego metalokompleksu. W pomiarach uwzględniono zarówno mono- jak i trifosforany: adenozyne – AMP, ATP, cytozyny – CMP, CTP oraz urydyny – UMP, UTP. Odnotowano inne położenie sygnału prądowego Ni(II)/Ni(III) dla układów ternarnych z nukleotydami posiadającymi jedno i trzy ugrupowania fosforanowe, przy czym rodzaj zasady azotowej nie odgrywał znaczącej roli (Rysunek 5, **P3**). Największy wpływ na właściwości redoks kompleksu Ni(II)-A β ₅₋₉ miały nukleotydy ATP, CTP oraz UTP. W ich obecności odnotowano między innymi przesunięcie potencjału utleniania Ni(II) o ok. 240 mV w stronę ujemnych wartości, znaczny spadek natężenia prądu sygnału Ni(II)/Ni(III) oraz zmianę charakteru omawianego procesu na quasi-odwracalny. Powyższy efekt nie był obserwowany w trakcie pomiarów elektrochemicznych prowadzonych w roztworze kompleksu Cu(II)-A β ₅₋₉; może to wynikać ze zdolności oktaedrycznego kompleksu niklowego do wiązania więcej niż jednej nukleotydowej grupy fosforanowej oraz jego preferencji w oddziaływaniu z grupami fosforanowymi względem zasad azotowych. Dodatkowo w przypadku sześciokoordynacyjnego związku ułatwione są oddziaływania elektrostatyczne oraz oddziaływania typu π - π pomiędzy pierścieniem imidazolowym His a pierścieniem purynowym lub pirymidynowym zasady azotowej, co ze względów sterycznych jest znacznie mniej prawdopodobne dla płasko-kwadratowej struktury Cu(II)-A β ₅₋₉.

Na podstawie przedstawionych rezultatów można wnioskować, że metalokompleks Ni(II)-A β ₅₋₉ umożliwia nie tylko rozpoznawanie jonów fosforanowych, ale także rozróżnianie nukleotydu AMP od ATP, co może zostać wykorzystane m.in. do monitorowania reakcji enzymatycznych. Podkreślić należy, że uzyskane wyniki są niezwykle obiecujące, istnieje bowiem tylko niewielka grupa receptorów charakteryzująca się taką selektywnością [58].

3.4. Porównanie właściwości metalokompleksów A β ₅₋₉

Podsumowanie opisanych dotychczas badań w ramach rozprawy doktorskiej stanowi praca **P4**. W artykule porównano właściwości koordynacyjne i elektrochemiczne kompleksów A β ₅₋₉ z jonami Cu(II) oraz Ni(II), a także ich zdolność do rozpoznawania anionów i grup fosforanowych w wybranych nukleotydach. Podkreślono przede wszystkim znaczne różnice w wartościach warunkowych stałych trwałości badanych chelatów – dla kompleksu Ni(II)-A β ₅₋₉ wartość ta jest o pięć rzędów wielkości niższa niż dla Cu(II)-A β ₅₋₉ (odpowiednio $1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ i $5,8 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$). Uzyskane wyniki pozwoliły jednak na stwierdzenie, że w przypadku kompleksu Ni(II)-A β ₅₋₉ jest to wartość wystarczająca na jego zastosowanie w roli receptora fosforanów(V). Analizowany peptyd w roztworze o pH 7,4 preferuje wiązanie jonu Ni(II) z utworzeniem struktury o geometrii oktaedrycznej, podczas gdy z kationem Cu(II) tworzy on kompleks płasko-kwadratowy (Rysunek 6). Różnice we właściwościach termodynamicznych i strukturalnych związków wpływają na ich odmienną aktywność elektrochemiczną, tj. rodzaj zachodzących procesów redoks (utlenianie i/lub redukcja) oraz wartość potencjału utleniania centrum metalicznego.



Rysunek 6. Schematyczne struktury metalokompleksów A β ₅₋₉ z jonami Cu(II) i Ni(II) występujące w pH 7,4. R₁, R₃ oznaczają pierwszą i trzecią resztę aminokwasową, którą stanowią odpowiednio Arg i Asp.

Rozważając potencjalne właściwości receptorowe analizowanych metalokompleksów, zaobserwowano, że bez względu na rodzaj jonu metalu zmiany w ich odpowiedzi prądowej wywołane obecnością anionów fosforanowych były zbliżone. W obu przypadkach odnotowano

przesunięcie potencjału utleniania centrum metalicznego ($\Delta E_{M(II)/M(III)}$) w stronę ujemnych potencjałów o ok. 150-160 mV, co może wynikać z podobnej kwasowości Lewisa kationów Cu(II) i Ni(II). Badane kompleksy różni jednak ich selektywność rozpoznawania nukleotydów. Sygnał prądowy związany z utlenianiem Ni(II)-A β ₅₋₉ mierzony był przy różnych wartościach potencjału w obecności mono- i trifosforanu adenozy, w przeciwieństwie do Cu(II)-A β ₅₋₉ (wartości potencjałów utleniania centrum metalicznego w metalokompleksach A β ₅₋₉ w obecności wybranych anionów i nukleotydów zestawiono w Tabeli 1). Różnice te wynikają najprawdopodobniej z odmiennych struktur metalokompleksów, które mogą mieć wpływ na charakter ich oddziaływania z cząsteczką AMP oraz ATP.

Tabela 1. Wartości potencjałów utleniania centrum metalicznego wyznaczone na podstawie krzywych DPV zarejestrowanych w roztworze 0,45 mM kompleksu Cu(II)/Ni(II)-A β ₅₋₉ w obecności 10 mM wybranych anionów i nukleotydów (średnie z trzech niezależnych powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym).

Anion	$E_{Cu(II)/Cu(III)}$ (V)	$E_{Ni(II)/Ni(III)}$ (V)
	vs. Ag/AgCl $\pm$ SD	
Cl ⁻	1,204 $\pm$ 0,002	1,008 $\pm$ 0,002
SO ₄ ²⁻	1,196 $\pm$ 0,004	0,995 $\pm$ 0,008
CH ₃ COO ⁻	1,120 $\pm$ 0,004	0,948 $\pm$ 0,006
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	1,056 $\pm$ 0,006	0,860 $\pm$ 0,002
AMP	1,068 $\pm$ 0,008	0,890 $\pm$ 0,006
ATP	1,052 $\pm$ 0,006	0,786 $\pm$ 0,004
UMP	–	0,912 $\pm$ 0,008
UTP	–	0,788 $\pm$ 0,002
CMP	–	0,912 $\pm$ 0,008
CTP	–	0,824 $\pm$ 0,016

Podsumowując, zmiana centrum metalicznego kompleksów peptydowych A β ₅₋₉ znacznie wpływa na ich właściwości koordynacyjne oraz redoks, co znajduje odzwierciedlenie w ich różnych zdolnościach do oddziaływania, a w szczególności selektywnego rozpoznawania anionów fosforanowych(V). Niemniej jednak wykazano, że oba badane metalokompleksy charakteryzują się obiecującymi właściwościami receptorowymi, a otrzymane wyniki mogą okazać się istotne z punktu widzenia projektowania nowych struktur peptydowych selektywnie rozpoznających aniony o znaczeniu biologicznym.

3.5. Wpływ sekwencji aminokwasowej na właściwości kompleksów peptydów His2 z jonami Cu(II)

Ostatnia część zaplanowanych prac badawczych obejmowała zaprojektowanie oraz syntezę peptydów (biblioteka peptydów), których sekwencje aminokwasowe bazowały na modelowej cząsteczce A β ₅₋₉ (Arg-His-Asp-Ser-Gly, RHDSG) pod kątem wyselekcjonowania struktury liganda, którego metalokompleks charakteryzowałby się największym powinowactwem względem anionów fosforanowych(V). Rezultaty tych badań zostały zamieszczone w publikacji **P5**.

Badana biblioteka peptydów zawierała osiem analogów A β ₅₋₉ (Tabela 1, **P5**) i powstała poprzez wymianę pierwszej oraz trzeciej reszty aminokwasowej (tj. reszt w bezpośrednim sąsiedztwie His2) na argininę lub kwas asparginowy, które potencjalnie mogą brać udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych (wiązania wodorowe i/lub oddziaływania elektrostatyczne), bądź glicynę – najmniejszy aminokwas bez łańcucha bocznego. Wzorem poprzednich prac, przeprowadzono szczegółową analizę właściwości koordynacyjnych i redoks pochodnych peptydów oraz ich kompleksów dwuskładnikowych z jonami Cu(II). Oprócz tego dokonano oceny oraz porównania właściwości receptorowych tych związków względem wybranych anionów.

Pierwszym etapem badań w pracy **P5** było określenie charakteru wiązania jonów Cu(II) przez pochodne peptydów His2 oraz opis właściwości spektroskopowych tworzących się kompleksów. W tym celu przeprowadzono miareczkowania kwasowo-zasadowe roztworów chelatów, rejestrując widma spektroskopii UV-vis. Podczas eksperymentów zaobserwowano trzy główne pasma. Pierwsze, występujące w najbardziej kwaśnym środowisku, przy długości fali 820 nm charakterystyczne było dla jonu Cu(II) niezwiązanego przez ligand peptydowy. Jego koordynację zaobserwowano w pH powyżej 3, co skutkowało pojawieniem się pasma przejścia *d-d* przy ok. 605 nm i świadczyło o utworzeniu płasko-kwadratowego kompleksu typu 3N [N^{am}, N^{im}, N⁻]. W miarę wzrostu pH, na widmie absorpcji odnotowano przesunięcie hipsochromowe powyższego sygnału do ok. 520 nm. Efekt ten został wywołany deprotonacją cząsteczki wody w pozycji ekwatorialnej i powstaniem formy 3N+OH⁻ [N^{am}, N^{im}, N⁻, OH⁻]. Pojawianie się poszczególnych pasm oraz ich położenie na widmie (w funkcji pH) różniło się w zależności od sekwencji aminokwasowej badanego peptydu (Rysunek 2, **P5**). Na tej podstawie dokonano analizy zależności wartości absorbancji w funkcji pH przy długościach fal związanych z powstaniem dwóch głównych form kompleksowych Cu(II)-His2. Wykorzystując

równanie Hilla obliczono dla poszczególnych metalokompleksów wartości pK , odpowiadające wartości pH , przy której połowa całkowitej ilości jonów $Cu(II)$ w układzie występuje w postaci struktury typu 3N (wartość pK może zatem służyć do porównania siły wiązania jonów $Cu(II)$ przez poszczególne peptydy). Najwyższą wartość pK tworzenia chelatu 3N otrzymano dla peptydów posiadających w pierwszej pozycji resztę Gly (Gly1), co wskazuje na najmniejszą trwałość tych kompleksów (Tabela 2, **P5**). Najniższą wartością pK charakteryzował się peptyd RHRSRG. Lokalizacja reszt Arg w pobliżu grup biorących udział w wiązaniu kationu $Cu(II)$ w kompleksie 3N prawdopodobnie ułatwia ich deprotonację (obniża ich wartość pK_a), w konsekwencji zwiększając stabilność chelatu. Udowodniono również, że w pH 7,4 przeważa forma 3N kompleksów dla wszystkich badanych peptydów, co zapewnia labilne miejsce koordynacyjne w tych warunkach i jest kluczowe z punktu widzenia oddziaływań tych metalokompleksów z rozpoznawanymi anionami.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu sekwencji aminokwasowej peptydu na właściwości elektrochemiczne jego związków koordynacyjnych (Tabela 3 oraz Rysunek 3, **P5**). Zgodnie z oczekiwaniami we wszystkich badanych układach kation $Cu(II)$ ulegał tym samym procesom redoks, które opisane zostały wcześniej dla chelatu $Cu(II)$ -A β ₅₋₉ (**P2**). Ciekawą obserwacją była jednak zależność procesu utleniania $Cu(II)/Cu(III)$ od rodzaju pierwszej reszty aminokwasowej peptydu (Rysunek 3, **P5**). Najwyższy potencjał wspomnianej reakcji odnotowano dla kompleksów peptydów posiadających w tym miejscu glicynę (Gly1), zaś w przypadku peptydów, w których pierwszą resztą był kwas asparaginowy (Asp1) lub arginina (Arg1), sygnał utleniania przesunął się o ok. 30-50 mV w kierunku wartości ujemnych, co może wskazywać na stabilizację jonu $Cu(III)$ w chelatach. Zanotowano jednak niższą wartość prądu piku utleniania dla układów Arg1, związaną prawdopodobnie z utrudnionym procesem dyfuzji tych kompleksów z głębi roztworu do powierzchni elektrody pracującej ze względu na rozbudowaną grupę boczną argininy. Podczas analizy wyników zwrócono także uwagę na możliwy wpływ ładunku chelatów na podatność centrum metalicznego na wspomniany proces. Według literatury bardziej ujemny ładunek kompleksu może sprzyjać wymianie elektronów i w konsekwencji obniżać potencjał utleniania takiego związku. W przypadku badanych układów nie zaobserwowano jednak takiego efektu.

W dalszej części pracy analizowano wpływ obecności w roztworze anionów chlorkowych, siarczanowych(VI), octanowych i fosforanowych(V) na proces utleniania jonów $Cu(II)$ w kompleksach peptydów His2, co umożliwiło ocenę ich selektywności rozpoznawania anionów fosforanowych. Wspólną cechą badanych chelatów okazały się bardzo słabe

oddziaływania z jonami chlorkowymi i siarczanowymi; warto jednak podkreślić różnice w charakterze ich interakcji z anionami octanowymi i fosforanowymi w zależności od struktury peptydu. Sygnał utleniania Cu(II)/Cu(III) w kompleksie peptydu DHDSG w obecności wspomnianych jonów występował przy zbliżonym potencjale, co sugeruje jego niską selektywność w stosunku do fosforanów (Tabela 3 oraz Rysunek 4, **P5**). Powodem może być niski ładunek chelatu, wynikający z obecności w pH 7,4 zdeprotonowanych reszt Asp, które przyczyniają się do słabszych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy analizowanymi cząsteczkami. Odmienny efekt zaobserwowano dla metalokompleksów peptydów RHGSG oraz RHRSG, wykazujących najwyższe powinowactwo do anionów fosforanowych, tj. najwyższą różnicę w wartościach potencjału utleniania Cu(II) w układzie dwuskładnikowym i trójskładnikowym z fosforanami. Wynik ten można tłumaczyć wysokim ładunkiem metalokompleksów (odpowiednio +4 i +5), jak również usytuowaniem reszty Arg, posiadającej dodatnio naładowaną grupę guanidynową w pobliżu miejsc zaangażowanych w wiązanie jonu Cu(II) (tj. końcowej grupy aminowej Arg1, wiązania peptydowego pomiędzy Arg1 a His2 oraz pierścienia imidazolowego His2).

Na podstawie uzyskanych rezultatów badań stwierdzono, że zmiana struktury peptydu His2 wpływa istotnie na wartość potencjału utleniania jonów Cu(II) ($E_{Cu(II)/Cu(III)}$) w obydwu układach: dwuskładnikowym Cu(II)-His2 oraz trójskładnikowym z jonami fosforanowymi(V). Analizując wartości tego parametru dla wszystkich kompleksów zaobserwowano grupowanie badanych ligandów peptydowych w zależności od ich sekwencji aminokwasowej (Rysunek 5, **P5**). Pierwsza grupa zawierała peptydy Gly1 i charakteryzowała się najwyższymi wartościami $E_{Cu(II)/Cu(III)}$ dla obydwu układów. Druga składała się z peptydów z resztami Asp, ale bez Gly1, zaś trzecia z peptydów Arg1 bez Asp, w których utlenianie Cu(II) w kompleksach zachodziło przy najniższym potencjale. Warto zauważyć, że rejestrowane wyniki pomiarów woltamperometrycznych dostarczają nie tylko informacji dotyczących położenia sygnałów prądowych (wartości $E_{Cu(II)/Cu(III)}$), ale także m.in. ich intensywności i kształtu. Z tego względu, we współpracy z mgr inż. Klaudią Głowacz i prof. Patrycją Ciosek-Skibińską (Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska), podjęto próbę zastosowania chemometrycznej analizy odpowiedzi elektrochemicznych, zmierzonych w roztworach kompleksów pochodnych A β ₅₋₉ z jonami Cu(II) oraz układów ternarnych z anionami fosforanowymi(V), w celu sprawdzenia możliwości rozróżnienia oligopeptydów z motywem koordynacyjnym His2. Wykorzystując metodę analizy głównych składowych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) oraz hierarchicznej analizy skupień (HCA, ang. *Hierarchical Cluster Analysis*) uzyskano efektywną

dyskryminację peptydów His2, przy czym możliwe było rozróżnienie nawet bardzo podobnych strukturalnie oligopeptydów, takich jak RHDSG i DHRSG (Rysunek 6, **P5**). Otrzymane wstępne rezultaty są niezwykle obiecujące i mogą stanowić podstawę do opracowania szybkich i prostych metod rozpoznawania sekwencji peptydowych za pomocą woltamperometrycznego elektronicznego języka.

Rozdział 4

Podsumowanie

W niniejszej rozprawie doktorskiej, stanowiącej powiązany tematycznie cykl publikacji, przedstawiono wyniki badań mających na celu opracowanie nowej klasy receptorów molekularnych, wykorzystujących metalokompleksy peptydowe, selektywnych względem anionów fosforanowych(V). Badane związki zbudowane były z kationu metalu przejściowego (Cu(II) lub Ni(II)), odgrywającego rolę centrum koordynacji, oraz ligandu peptydowego, posiadającego w swojej sekwencji aminokwasowej histydynę w pozycji drugiej (His2). Takie usytuowanie reszty His miało istotne znaczenie z dwóch powodów. Po pierwsze, peptydy z takim motywem koordynacyjnym efektywnie wiążą kationy metali przejściowych; po drugie, powstające kompleksy tworzą stabilne termodynamicznie układy typu 3N charakteryzujące się niewysyconą sferą koordynacyjną (co jest niezwykle istotne z punktu widzenia ich zdolności do rozpoznawania anionów). Ponadto obecność jonu metalu przejściowego umożliwia śledzenie oddziaływań receptor-analit za pomocą technik elektrochemicznych. W tym miejscu należy podkreślić oryginalność proponowanej struktury receptora, w której kation metalu pełni funkcję zarówno centrum rozpoznającego analit, jak i znacznika redoks.

Wstępne badania przeprowadzone dla kompleksów peptydów β -amyloidu z rodziny $A\beta_{5-x}$ z jonami Cu(II) pozwoliły na wybór zbudowanego z pięciu aminokwasów analogu $A\beta_{5-9}$ (RHDSG) o potencjalnych właściwościach receptorowych. Wykorzystując szereg technik pomiarowych określono właściwości fizykochemiczne jego kompleksów z jonami Cu(II) oraz Ni(II), a także wykazano, że w roztworze o pH 7,4 związki te preferencyjnie oddziałują z anionami fosforanowymi(V) oraz grupami fosforanowymi nukleotydów, co związane jest ze znacznym obniżeniem potencjału utleniania ich centrum metalicznego (układu M(II)/M(III)). Dodatkowo, w przypadku kompleksów Ni(II)- $A\beta_{5-9}$, zarejestrowano zróżnicowane odpowiedzi prądowe w obecności nukleotydów posiadających jedno oraz trzy ugrupowania fosforanowe, co wydaje się kluczowe z punktu widzenia możliwości rozróżniania tego typu związków.

Na podstawie wyników, jakie uzyskano dla kolejnych eksperymentów, udowodniono, że budowa metalokompleksu peptydowego (rodzaj kationu centralnego oraz sekwencja aminokwasowa peptydu) wpływa nie tylko na proces wiązania kationu metalu, właściwości strukturalne i elektrochemiczne powstających kompleksów, ale co najważniejsze z punktu

widzenia projektowania receptorów molekularnych, na ich selektywność rozpoznawania anionów fosforanowych(V). Dalsze prace wykorzystujące zaprojektowaną bibliotekę peptydów pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch sekwencji: RHGSG oraz RHRSG, o najbardziej obiecujących właściwościach receptorowych, tj. o najwyższej selektywności rozpoznawania anionów fosforanowych. Należy podkreślić znaczną poprawę tego parametru w stosunku do kompleksu modelowej sekwencji aminokwasowej peptydu A β ₅₋₉. Dalsza optymalizacja struktury potencjalnego receptora, np. wprowadzenie większej liczby reszt argininy w sekwencji aminokwasowej peptydu, może doprowadzić do opracowania nowych sensorów elektrochemicznych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe w warstwach receptorowych, umożliwiających oznaczanie istotnych biologicznie związków fosforanowych.

Interesującym i obiecującym rezultatem uzyskanym w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej jest również możliwość zastosowania metalokompleksów peptydowych nie tylko w procesie rozpoznawania grup fosforanowych, ale także do dyskryminacji oligopeptydów His2 w oparciu o analizę chemometryczną sygnałów elektrochemicznych mierzonych w roztworach ich układów binarnych i trójskładnikowych. Różnorodność sekwencji peptydowych jest jednak znacznie szersza i nie ogranicza się tylko do peptydów z motywem His2. Rozważając rodzinę peptydów β -amyloidu, których kompleksy z jonami Cu(II) wykazują odmienne właściwości redoks, istnieje potencjalna możliwość wykorzystania takiego podejścia do rozróżniania peptydów, istotnych z punktu widzenia choroby Alzheimera. Jest to nowy kierunek badań, który zostanie podjęty w dalszej pracy badawczej autorki niniejszej rozprawy.

Podsumowując, wyniki zaplanowanych i przeprowadzonych badań dostarczyły ważnych informacji o możliwych oddziaływaniach pomiędzy związkami koordynacyjnymi jonów metali z białkami/peptydami a anionami fosforanowymi(V) powszechnie występującymi w układach biologicznych. Wyjaśnienie natury tych interakcji jest kluczowe dla zrozumienia wielu patologii wywołanych nadmiernym generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT), który doprowadza do stresu oksydacyjnego. Warto również podkreślić wyniki analizy właściwości fizykochemicznych badanego kompleksu peptydowego z jonami Ni(II). Grupy fosforanowe są integralną częścią struktury DNA i prawdopodobne jest ich oddziaływanie z niklowymi kompleksami peptydów z domeną wiążącą His2, co może skutkować podwyższeniem poziomu RFT generowanych przez parę redoks Ni(II)/Ni(III) i w konsekwencji doprowadzać do uszkodzenia DNA. Jak wykazano interakcja z grupami fosforanowymi zmniejsza potencjał utleniania Ni(II) w chelacie nawet do 0,8 V vs. Ag/AgCl (jest to wartość potencjału jaką

obserwowano dla opisanych w literaturze katalizatorów oksydacyjnej degradacji DNA). W związku z powyższym, kontynuacją badań opisanych w ramach niniejszej pracy będzie analiza aktywności biologicznej (typu nukleaza) kompleksów niklowych z ligandami peptydowymi posiadającymi sekwencję His2, która może okazać się kluczowa z punktu widzenia wyjaśnienia toksykologii jonów niklu.

Rozdział 5

Bibliografia

- [1] D.J. Dietzen, Amino Acids, Peptides, and Proteins, in: R. Nader, A.R. Horvath, C. T. (Eds.), *Princ. Appl. Mol. Diagnostics*, Elsevier, 2018: pp. 345–380.
- [2] E.D. Harris, Copper Homeostasis: The Role of Cellular Transporters, *Nutr. Rev.* 59 (2001) 281–285.
- [3] H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive peptides: Production and functionality, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 945–960.
- [4] K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, Alzheimer's disease. *Lancet.* 368 (2006) 387–403.
- [5] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science.* 276 (1997) 2045–2047.
- [6] I.E. Tothill, Peptides as molecular receptors, in: Zourob, M. (eds) *Recognition Receptors in Biosensors*, Springer New York, 2010: pp. 249–274.
- [7] W.J. Cooper, M.L. Waters, Molecular recognition with designed peptides and proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 627–631.
- [8] M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli, Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects, *Angew. Chemie Int. Ed.* 51 (2012) 1316–1332.
- [9] S. Pavan, F. Berti, Short peptides as biosensor transducers, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3055–3070.
- [10] M. Bodanszky, In search of new methods in peptide synthesis. A review of the last three decades, *Int. J. Pept. Protein Res.* 25 (1985) 449–474.
- [11] P.M. Fischer, The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: a critical review, *Curr. Protein Pept. Sci.* 4 (2003) 339–356.

- [12] A.R. Mitchell, Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment, *Biopolymers*. 90 (2008) 175–184.
- [13] L. Yuan, L. Liu, Peptide-based electrochemical biosensing, *Sensors Actuators B Chem.* 344 (2021) 130232.
- [14] Q. Liu, J. Wang, B.J. Boyd, Peptide-based biosensors, *Talanta*. 136 (2015) 114–127.
- [15] A. Karimzadeh, M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Peptide based biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 107 (2018) 1–20.
- [16] J.J. Gooding, D.B. Hibbert, W. Yang, Electrochemical Metal Ion Sensors. Exploiting Amino Acids and Peptides as Recognition Elements, *Sensors* 1 (2001) 75-90.
- [17] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical sensors definitions and classification, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250.
- [18] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, Specific structure–stability relations in metallopeptides, *Coord. Chem. Rev.* 184 (1999) 319–346.
- [19] H. Sigel, R.B. Martin, Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands, *Chem. Rev.* 82 (1982) 385–426.
- [20] E. Chow, J.J. Gooding, Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors, *Electroanalysis*. 18 (2006) 1437–1448.
- [21] P.S. Sfragano, G. Moro, F. Polo, I. Palchetti, The Role of Peptides in the Design of Electrochemical Biosensors for Clinical Diagnostics, *Biosensors*. 11 (2021) 246.
- [22] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi, Á. Grenács, Coordinating properties of peptides containing histidyl residues, *Coord. Chem. Rev.* 327–328 (2016) 43–54.
- [23] P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, L. Raibaut, W. Bal, P. Faller, N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications, *Chem. Eur. J.* 24 (2018) 8029–8041.
- [24] T. Frączyk, Cu(II)-Binding N-Terminal Sequences of Human Proteins, *Chem. Biodivers.* 18 (2021) e2100043.
- [25] R. Kotuniak, T. Frączyk, P. Skrobecki, D. Płonka, W. Bal, Gly-His-Thr-Asp-Amide, an Insulin-Activating Peptide from the Human Pancreas Is a Strong Cu(II) but a Weak

- Zn(II) Chelator, *Inorg. Chem.* 57 (2018) 15507–15516.
- [26] K. Bossak, M. Mital, J. Poznański, A. Bonna, S. Drew, W. Bal, Interactions of α -Factor-1, a Yeast Pheromone, and Its Analogue with Copper(II) Ions and Low-Molecular-Weight Ligands Yield Very Stable Complexes, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 7829–7831.
- [27] K. Bossak-Ahmad, M.D. Wiśniewska, W. Bal, S.C. Drew, T. Frączyk, Ternary Cu(II) Complex with GHK Peptide and Cis-Urocanic Acid as a Potential Physiologically Functional Copper Chelate, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 6190.
- [28] L. Pickart, J.M. Vasquez-Soltero, A. Margolina, GHK-Cu may prevent oxidative stress in skin by regulating copper and modifying expression of numerous antioxidant genes, *Cosmetics*. 2 (2015) 236–247.
- [29] L. Pickart, A. Margolina, Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1987.
- [30] N.C. Wildburger, T.J. Esparza, R.D. Leduc, R.T. Fellers, P.M. Thomas, N.J. Cairns, N.L. Kelleher, R.J. Bateman, D.L. Brody, Diversity of Amyloid-beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9520.
- [31] S.C. Drew, C.L. Masters, K.J. Barnham, Alzheimer's A β Peptides with Disease-Associated N-Terminal Modifications: Influence of Isomerisation, Truncation and Mutation on Cu²⁺ Coordination, *PLoS One*. 5 (2010) e15875.
- [32] H. Kanemitsu, T. Tomiyama, H. Mori, Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form, *Neurosci. Lett.* 350 (2003) 113–116.
- [33] N. Mattsson, L. Rajendran, H. Zetterberg, M. Gustavsson, U. Andreasson, M. Olsson, G. Brinkmalm, J. Lundkvist, L.H. Jacobson, L. Perrot, U. Neumann, H. Borghys, M. Mercken, D. Dhuyvetter, F. Jeppsson, K. Blennow, E. Portelius, BACE1 Inhibition Induces a Specific Cerebrospinal Fluid β -Amyloid Pattern That Identifies Drug Effects in the Central Nervous System, *PLoS One*. 7 (2012) e31084.
- [34] E. Portelius, M. Olsson, G. Brinkmalm, U. Rüetschi, N. Mattsson, U. Andreasson, J. Gobom, A. Brinkmalm, M. Hölttä, K. Blennow, H. Zetterberg, Mass Spectrometric Characterization of Amyloid- β Species in the 7PA2 Cell Model of Alzheimer's Disease, *J. Alzheimer's Dis.* 33 (2013) 85–93.

- [35] M. Bouraguba, E. Glattard, M. Naudé, R. Pelletier, C. Aisenbrey, B. Bechinger, L. Raibaut, V. Lebrun, P. Faller, Copper-binding motifs Xxx-His or Xxx-Zzz-His (ATCUN) linked to an antimicrobial peptide: Cu-binding, antimicrobial activity and ROS production, *J. Inorg. Biochem.* 213 (2020) 111255.
- [36] N. Xia, G. Liu, S. Zhang, Z. Shang, Y. Yang, Y. Li, L. Liu, Oxidase-mimicking peptide-copper complexes and their applications in sandwich affinity biosensors, *Anal. Chim. Acta.* 1214 (2022) 339965.
- [37] K. Bossak, M. Mital, J. Poznański, A. Bonna, S. Drew, W. Bal, Interactions of α -Factor-1, a Yeast Pheromone, and Its Analogue with Copper(II) Ions and Low-Molecular-Weight Ligands Yield Very Stable Complexes, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 7829–7831.
- [38] P. Gonzalez, K. Bossak-Ahmad, B. Vilenó, N.E. Wezynfeld, Y. El Khoury, P. Hellwig, C. Hureau, W. Bal, P. Faller, Triggering Cu-coordination change in Cu(II)-Ala-His-His by external ligands, *Chem. Commun.* 55 (2019) 8110–8113.
- [39] P.D. Beer, P.A. Gale, Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 486–516.
- [40] M. V. Ramakrishnam Raju, S.M. Harris, V.C. Pierre, Design and applications of metal-based molecular receptors and probes for inorganic phosphate, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 1090–1108.
- [41] J.P. Knochel, The Pathophysiology and Clinical Characteristics of Severe Hypophosphatemia, *Arch. Intern. Med.* 137 (1977) 203–220.
- [42] R. Heipertz, K. Eickhoff, K.H. Karstens, Cerebrospinal fluid concentrations of magnesium and inorganic phosphate in epilepsy, *J. Neurol. Sci.* 41 (1979) 55–60.
- [43] N. Jensen, J.K. Autzen, L. Pedersen, Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid, *Neurogenetics.* 17 (2016) 125–130.
- [44] A. Bevington, K.I. Mundy, A.J.P. Yates, J.A. Kanis, R.G. Russell, D.J. Taylor, B. Rajagopalan, G.K. Radda, A study of intracellular orthophosphate concentration in human muscle and erythrocytes by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and selective chemical assay, *Clin. Sci.* 71 (1986) 729–735.
- [45] M.J. Langton, C.J. Serpell, P.D. Beer, Anion Recognition in Water: Recent Advances from a Supramolecular and Macromolecular Perspective, *Angew. Chemie Int. Ed.* 55

- (2016) 1974–1987.
- [46] S. Kubik, C. Reyheller, S. Stüwe, Recognition of Anions by Synthetic Receptors in Aqueous Solution, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 52 (2005) 137–187.
- [47] P.A. Gale, Amidopyrroles: from anion receptors to membrane transport agents, *Chem. Commun.* (2005) 3761–3772.
- [48] E. García-España, P. Díaz, J.M. Llinares, A. Bianchi, Anion coordination chemistry in aqueous solution of polyammonium receptors, *Coord. Chem. Rev.* 250 (2006) 2952–2986.
- [49] C. Caltagirone, P.A. Gale, Anion receptor chemistry: highlights from 2007, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 520–563.
- [50] R.B.P. Elmes, K.A. Jolliffe, Anion recognition by cyclic peptides, *Chem. Commun.* 51 (2015) 4951–4968.
- [51] L. Fabbrizzi, A. Poggi, Anion recognition by coordinative interactions: Metal–amine complexes as receptors, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1681–1699.
- [52] P.D. Beer, S.R. Bayly, Anion Sensing by Metal-Based Receptors, in: Stibor, I. (eds) *Anion Sensing. Topics in Current Chemistry*, vol 255. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005: pp. 125–162.
- [53] M. Boiocchi, A. Broglia, L. Fabbrizzi, N. Fusco, C. Mangano, Anion receptors containing coordinatively unsaturated metal ions: copper(II) complexes with cyclam derivatives, *Can. J. Chem.* 92 (2014) 794–802.
- [54] R. Hein, P.D. Beer, J.J. Davis, Electrochemical Anion Sensing: Supramolecular Approaches, *Chem. Rev.* 120 (2020) 1888–1935.
- [55] M.Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, S.C. Drew, W. Wróblewski, Tuning the redox properties of copper(II) complexes with amyloid- β peptides, *J. Electrochem. Soc.* 163 (2016) G196–G199.
- [56] M. Mital, N.E. Wezynyfeld, T. Frączyk, M.Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, A. Bonna, C. Tumpach, K.J. Barnham, C.L. Haigh, W. Bal, S.C. Drew, A Functional Role for A β in Metal Homeostasis? N-Truncation and High-Affinity Copper Binding, *Angew. Chemie Int. Ed.* 54 (2015) 10460–10464.

- [57] C. Esmieu, G. Ferrand, V. Borghesani, C. Hureau, Impact of N-Truncated A β Peptides on Cu- and Cu(A β)-Generated ROS: CuI Matters!, *Chem. Eur. J.* 27 (2021) 1777–1786.
- [58] S.E. Bodman, C. Breen, S. Kirkland, S. Wheeler, E. Robertson, F. Plasser, S.J. Butler, Sterically demanding macrocyclic Eu(III) complexes for selective recognition of phosphate and real-time monitoring of enzymatically generated adenosine monophosphate, *Chem. Sci.* 13 (2022) 3386–3394.

Oświadczenia współautorów publikacji

- mgr inż. Aleksandra Tobolska (P1-P5)
- prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski (P1-P5)
- dr inż. Nina Wezynfeld (P1-P5)
- prof. dr hab. Wojciech Bal (P1-P5)
- dr Urszula Wawrzyniak (P1-P4)
- dr inż. Magdalena Wiloch (P1)
- dr Karolina Bossak-Ahmad (P1)
- dr Mariusz Mital (P1)
- mgr Dawid Płonka (P1)
- mgr inż. Klaudia Głowacz (P5)
- prof. dr hab. inż. Patrycja Ciosek-Skibińska (P5)

mgr inż. Aleksandra Magdalena Tobolska
Katedra Biotechnologii Medycznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
aleksandra.tobolska@pw.edu.pl

Warszawa, 28.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

polegał na wykonaniu eksperymentów woltamperometrycznych oraz pomiarów spektroskopowych dotyczących ternarnych oddziaływań kompleksów Cu(II)-A β _{5-x}, współudziale w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz współudziale w przygotowaniu części artykułu dot. elektrochemii.

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, Dalton Trans. 50 (2021) 2726-2730.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β ₅₋₉ and Phosphates/Nucleotides, Inorg. Chem. 60 (2021) 19448-19456.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, Chem. Proc. 5 (2021) 39_1-39_4.
- A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K.

polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaprojektowaniu eksperymentów elektrochemicznych i ich wykonaniu, przeprowadzeniu pomiarów spektroskopowych i potencjometrycznych, współudziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu i współredagowaniu manuskryptu oraz współprowadzeniu korespondencji z edytorem (autor korespondencyjny).

Aleksandra Tobolska

Prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski
Katedra Biotechnologii Medycznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

Warszawa, 18.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β_{5-9} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

dotyczył opieki merytorycznej nad prowadzonymi pomiarami elektrochemicznymi a także współredagowania części manuskryptu poświęconej wynikom tych eksperymentów.

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, Dalton Trans. 50 (2021) 2726-2730.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β_{5-9} and Phosphates/Nucleotides, Inorg. Chem. 60 (2021) 19448-19456.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, Chem. Proc. 5 (2021) 39_1-39_4.
- A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K.

polegał na opiece merytorycznej nad opracowaniem koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współredagowaniu manuskryptów.



Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, Dalton Trans. 50 (2021) 2726-2730.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β ₅₋₉ and Phosphates/Nucleotides, Inorg. Chem. 60 (2021) 19448-19456.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, Chem. Proc. 5 (2021) 39_1-39_4.
- A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K

polegał na projektowaniu doświadczeń spektrofotometrycznych i potencjometrycznych, opiece merytorycznej podczas analizy wyników z tych doświadczeń i ogólnej dyskusji, współredagowaniu manuskryptów i współkierowaniu pracami podczas ich przygotowania.

.....*NWezynfeld*.....

Prof. dr hab., Wojciech Bal
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a 02-106 Warszawa
wbal@ibb.waw.pl

Warszawa, 16.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, *Inorg. Chem.* 59 (2020) 14000-14011.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, *Dalton Trans.* 50 (2021) 2726-2730.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β ₅₋₉ and Phosphates/Nucleotides, *Inorg. Chem.* 60 (2021) 19448-19456.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, *Chem. Proc.* 5 (2021) 39_1-39_4.
- A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, *Dalton Trans.* (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K

polegał na współpracy przy dyskusji wyników

Wojciech Bal

dr Urszula Wawrzyniak
Państwowy Instytut Geologiczny-
Państwowy Instytut Badawczy
w Warszawie

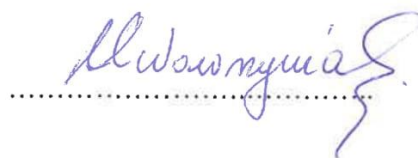
Warszawa, 23.11.2022 r.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β_{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, Dalton Trans. 50 (2021) 2726-2730.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β_{5-9} and Phosphates/Nucleotides, Inorg. Chem. 60 (2021) 19448-19456.
- A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, Chem. Proc. 5 (2021) 39_1-39_4.

polegał na współtworzeniu koncepcji i metodyki badań z wykorzystaniem technik prądowych, pomocy w analizie uzyskanych wyników doświadczeń elektrochemicznych, ogólnej dyskusji oraz współredagowaniu manuskryptów.



Dr inż. Magdalena Wiloch

Warszawa, 16.11.2022

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52 01-224 Warszawa
mwiloch@ichf.edu.pl

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β_{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

polegał na wykonaniu występných badań elektrochemicznych kompleksu Cu(II)-A β_{5-x} wraz z interpretacją uzyskanych wyników

.....
Hibz

dr Karolina Bossak-Ahmad
Staroszkolna 9/2
85-209 Bydgoszcz

Bydgoszcz, 16.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, $A\beta_{5-9}$ Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

polegał na wstępnych badaniach peptydu $A\beta_{5-16}$ przy pomocy spektroskopii CD i UV-vis oraz wykonaniu potencjometrii peptydu $A\beta_{5-9}$ z jonami miedzi(II).

K. Bossak-Ahmad.....

dr Mariusz Mital

Warszawa, 22.11.2022

e-mail: 1988.mariusz.m@gmail.com

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

polegał na udziale w badaniach spektrofotometrycznych (UV-vis, CD) i potencjometrycznych peptydów A β _{5-x} i ich kompleksów z jonami Cu(II).

.....Mariusz Mital.....

Mgr Dawid Płonka
Tel. 694 106 582
e-mail d.plonka@ibb.waw.pl

Toruń, 16.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

- N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011.

polegał na przygotowaniu materiału do badań – opracowaniu metody i wykonaniu syntezy peptydów.

.....*Dawid Płonka*.....

mgr inż. Klaudia Głowacz

Warszawa, 21.11.2022

Katedra Biotechnologii Medycznej

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

e-mail: klaudia.glowacz.dokt@pw.edu.pl

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K

polegał na sformułowaniu koncepcji identyfikacji peptydów za pomocą analizy chemometrycznej, przeprowadzeniu i interpretacji wyników analizy PCA oraz przygotowaniu części artykułu dot. analizy chemometrycznej.

K. Głowacz

Prof. dr hab. inż. Patrycja Ciosek-Skibińska
Katedra Biotechnologii Medycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska

Warszawa, 14.11.2022

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bał, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K

polegał na przeprowadzeniu i interpretacji analizy HCA oraz korekcie części artykułu dot. analizy chemometrycznej



Cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską

Publikacja 1 (P1)

A β _{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes

Nina E. Wezynfeld, Aleksandra Tobolska, Mariusz Mital, Urszula E. Wawrzyniak, Magdalena Z. Wiloch, Dawid Płonka, Karolina Bossak-Ahmad, Wojciech Wróblewski, Wojciech Bal

Inorganic Chemistry 59 (2020) 14000-14011

DOI: 10.1021/acs.inorgchem.0c01773

$A\beta_{5-x}$ Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes

Nina E. Wezynfeld, Aleksandra Tobolska, Mariusz Mital, Urszula E. Wawrzyniak, Magdalena Z. Wiloch, Dawid Plonka, Karolina Bossak-Ahmad, Wojciech Wróblewski, and Wojciech Bal*



Cite This: *Inorg. Chem.* 2020, 59, 14000–14011



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

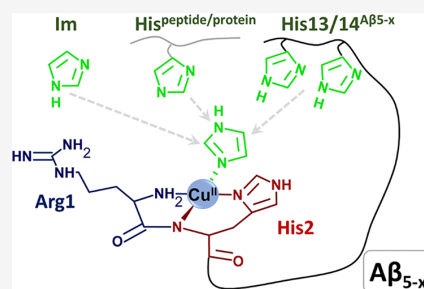


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The $A\beta_{5-x}$ peptides ($x = 38, 40, 42$) are minor $A\beta$ species in normal brains but elevated upon the application of inhibitors of $A\beta$ processing enzymes. They are interesting from the point of view of coordination chemistry for the presence of an Arg-His metal binding sequence at their N-terminus capable of forming a 3-nitrogen (3N) three-coordinate chelate system. Similar sequences in other bioactive peptides were shown to bind Cu(II) ions in biological systems. Therefore, we investigated Cu(II) complex formation and reactivity of a series of truncated $A\beta_{5-x}$ peptide models comprising the metal binding site: $A\beta_{5-9}$, $A\beta_{5-12}$, $A\beta_{5-12}Y10F$, and $A\beta_{5-16}$. Using CD and UV–vis spectroscopies and potentiometry, we found that all peptides coordinated the Cu(II) ion with substantial affinities higher than $3 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ at pH 7.4 for $A\beta_{5-9}$ and $A\beta_{5-12}$. This affinity was elevated 3-fold in $A\beta_{5-16}$ by the formation of the internal macrochelate with the fourth coordination site occupied by the imidazole nitrogen of the His13 or His14 residue. A much higher boost of affinity could be achieved in $A\beta_{5-9}$ and $A\beta_{5-12}$ by adding appropriate amounts of the external imidazole ligand. The 3N Cu- $A\beta_{5-x}$ complexes could be irreversibly reduced to Cu(I) at about -0.6 V vs Ag/AgCl and oxidized to Cu(III) at about 1.2 V vs Ag/AgCl. The internal or external imidazole coordination to the 3N core resulted in a slight destabilization of the Cu(I) state and stabilization of the Cu(III) state. Taken together these results indicate that $A\beta_{5-x}$ peptides, which bind Cu(II) ions much more strongly than $A\beta_{1-x}$ peptides and only slightly weaker than $A\beta_{4-x}$ peptides could interfere with Cu(II) handling by these peptides, adding to copper dyshomeostasis in Alzheimer brains.



INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) accounts for approximately 50–70% cases of dementia, over 50 million people worldwide.^{1,2} Amyloid- β ($A\beta$) peptides are at the center of AD pathology. They compose amyloid plaques, a historic hallmark of the disease, and were more recently demonstrated to form neurotoxic oligomers.^{3,4} $A\beta$ peptides are derived from the amyloid precursor protein (APP), which undergoes alternative proteolytic cleavage pathways in amyloidogenic and non-amyloidogenic processes. In the amyloidogenic pathway APP is cleaved by β -secretase (BACE1), a membrane-anchored aspartyl protease which cleaves APP before position 1 of the $A\beta$ domain, and γ -secretase, a membrane-bound protease complex responsible for creation of the $A\beta$ C-terminus.⁵ The $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ peptides formed in this pathway are further processed hydrolytically to N-terminally truncated species, which represent more than 60% of all $A\beta$ species in AD brains. $A\beta_{4-42}$ is the most abundant of these peptides.^{6–9} Another is $A\beta_{5-42}$, detected in $A\beta$ deposits in brains of sporadic and familial AD victims and in transgenic mouse models.^{9–11}

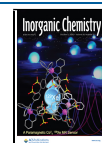
The origin of $A\beta_{5-x}$ species ($x = 38, 40, 42$) is unclear. They were shown to be elevated in the course of application of inhibitors of BACE1 in experimental animals.^{5,12} This suggests

direct alternative cleavage of APP, becoming possible when the main pathway is inhibited. They can also be produced by caspases, largely cellular apoptotic proteases implicated in AD neurodegeneration.¹³

$A\beta_{5-x}$ peptides contain His in the second position (Xaa-His). Such Xaa-His arrangement creates a specific Cu(II) binding site distinct from both the dynamic ensemble of macrochelate species of $A\beta_{1-x}$ peptides^{14,15} and the rigid ATCUN/NTS chelate system of $A\beta_{4-x}$ peptides.^{16–18} The basic structure of Xaa-His-Zaa cupric complexes, derived from X-ray studies of Gly-His-Lys (GHK) and spectroscopic studies of many oligopeptides bearing various Xaa substitutions is three-coordinate, with the Xaa N-terminus, the Xaa-His peptide bond, and the His imidazole providing three nitrogen ligands arranged in a square-planar fashion around the Cu(II) ion (3N species). The fourth position can be occupied by a

Received: June 15, 2020

Published: September 14, 2020



water molecule or other ligands, such as imidazoles or carboxylates from other peptide molecules, phosphate ions, etc.^{19–21} The amino acid residue directly following His (Zaa in Xaa-His-Zaa... sequences) cannot participate in the coordination for sterical reasons. The stability constants available in the literature indicate that the effective stability constants of Cu(II) complexes of Xaa-His-Zaa peptides are in the range of 10^{12} – 10^{13} M^{−1}, slightly less than those of ATCUN/NTS motifs.^{18,21–23} We demonstrated, however, that at a sufficiently high concentration of the ternary ligand the effective stability constants of such a ternary XHZ-Cu(II)-L complex may be elevated by one or 2 orders of magnitude.²⁰

In this work, we aimed to characterize Cu(II) coordination and electrochemical properties of resulting complexes, $A\beta_{5-9}$ peptides, by using $A\beta_{5-16}$ as a suitable well-soluble model, analogously to $A\beta_{1-16}$ and $A\beta_{4-16}$ model peptides.^{15,16} Because of the presence of two metal binding regions in this peptide, one at the N-terminus and another at the His13-His14 couple, we also used shorter peptides, $A\beta_{5-9}$ and $A\beta_{5-12}$ as simplified models. For a better understanding of the role of Tyr10 in the studied processes, we also used a modified $A\beta_{5-12}$ Y10F ($A\beta_{5-12F}$) peptide in some experiments (see Scheme 1 for

Scheme 1. Sequences of $A\beta_{5-x}$ Peptides Studied in This Work^a

$A\beta_{5-9}$	RHDSG-NH ₂
$A\beta_{5-12}$	RHDSGYEV-NH ₂
$A\beta_{5-12F}$	RHDSGFVEV-NH ₂
$A\beta_{5-16}$	RHDSGYEVHHQK-NH ₂

^aResidues whose side chains contribute to Cu(II) binding are highlighted in red (His) and blue (Tyr).

sequences). Spectroscopic (UV–vis, CD, fluorescence) and potentiometric experiments were used to decipher and quantify the set of complex species formed in a broad pH range, while their redox properties were investigated using voltammetry (CV and DPV). Then, spectroscopic and electrochemical titrations of Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ complexes with imidazole, a model of His residues in proteins, were employed to estimate the influence of such interactions on the stability and reactivity of studied complexes. The obtained quantitative description allowed us to assess the potential role of $A\beta_{5-x}$ peptides in copper physiology in the brain.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials. N- α -9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) amino acids were purchased from Novabiochem. Trifluoroacetic acid (TFA), piperidine, and N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) were obtained from Merck. Triisopropylsilane (TIS), N,N-diisopropylethylamine (DIEA), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), CuCl₂, Cu(NO₃)₂·H₂O, NaOH, KOH, HCl, KNO₃, HNO₃, and imidazole were from Sigma. The TentaGel S RAM resin was purchased from RAPP Polymere. Diethyl ether and dichloromethane (DCM) were from Chempur. Acetonitrile and calibrated 0.1 M NaOH solution for potentiometry were from POCH, and dimethylformamide (DMF) was from Roth.

Peptide Synthesis. $A\beta_{5-16}$ (RHDSGYEVHHQK-NH₂), $A\beta_{5-12}$ (RHDSGYEV-NH₂), $A\beta_{5-9}$ (RHDSG-NH₂), and $A\beta_{5-12F}$ (RHDSGFVEV-NH₂) were synthesized by solid-phase peptide synthesis using a CEM Liberty microwave peptide synthesizer (Applied Biosystems) according to a Fmoc/tBu protocol with HBTU and

DIEA as coupling reagents and 20% piperidine in DMF as a Fmoc removal agent.²⁴ TentaGel S RAM resin was used as a solid phase. The peptides were cleaved from the resin in TFA/TIS/water 95:2.5:2.5 v/v/v for 2 h. Then, the peptides were precipitated with cold diethyl ether, centrifuged, dissolved in water, and lyophilized. The crude peptides were purified by HPLC (Waters) following a detection at 220 nm/280 nm using a mix of eluting solvents A (0.1% (v/v) TFA in water) and B (0.1% (v/v) TFA in 90% (v/v) acetonitrile). The purification method was a gradient of eluents 5–45% of B within 40 min, flow 2 mL/min. The mass of the pure peptides was further verified by ESI-MS. The concentrations of initial peptide stock solutions were determined by potentiometric titrations. Concentrations of secondary and subsequent stock solutions of $A\beta_{5-12}$ and $A\beta_{5-16}$ were determined using an extinction coefficient ϵ of 1375 M^{−1} cm^{−1} at 275 nm. For $A\beta_{5-12F}$ and $A\beta_{5-9}$, ϵ values of 200 M^{−1} cm^{−1} at 258 nm and ϵ of 9032 M^{−1} cm^{−1} at 214 nm were used.²⁵

UV–vis, CD, and Fluorescence Spectroscopy. The UV–vis spectra were obtained on a PerkinElmer spectrophotometer over the spectral range of 200–900 nm. The circular dichroism (CD) spectra were recorded over the range of 250–800 nm on a Jasco 815 spectropolarimeter. All spectroscopic measurements were performed at 25 °C in a 1 cm path length quartz cuvette.

Titrations with NaOH (pH dependence): Samples containing 1 mM $A\beta$ ($A\beta_{5-9}$, $A\beta_{5-12}$, $A\beta_{5-12F}$, $A\beta_{5-16}$), and 0.9 mM Cu(II) or 1 mM $A\beta$ ($A\beta_{5-16}$) and 1.8 mM Cu(II) were titrated with a small portion of concentrated NaOH in the pH range 2.5–10.

Titrations with imidazole/ $A\beta_{5-9}$ / $A\beta_{1-16}$: Samples containing 1 mM $A\beta$ ($A\beta_{5-9}$, $A\beta_{5-12}$, $A\beta_{5-12F}$, $A\beta_{5-16}$) and 0.8 mM Cu(II) at pH 7.4 were titrated with a small portion of imidazole/ $A\beta_{5-9}$ / $A\beta_{1-16}$ stock solution. The pH of the sample was strictly controlled during the experiment and adjusted if necessary.

Kinetic Experiment. $A\beta_{4-9}$ was added to the sample containing 0.9 mM Cu(II) and 1 mM $A\beta_{5-9}$ in 20 mM HEPES pH 7.4 to the final $A\beta_{4-9}$ concentration of 1 mM. The changes in UV–vis spectra were monitored for 24 h.

Fluorescence spectra were registered using a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian) with the excitation wavelength of 275 nm and detection of emission in the range of 280–400 nm. All fluorescence measurements were performed at 25 °C in a 1 cm path length quartz cuvette. The samples of 20 μ M $A\beta_{5-12}$ or 20 μ M $A\beta_{5-12}$ /19 μ M CuCl₂ were titrated with NaOH from pH 4.2 to 12.2.

The pK values were calculated using Hill equations eq 1 and eq 2: (i) for a single process

$$F = \frac{p_1 + p_2 \times 10^{n(pH-pK)}}{1 + 10^{n(pH-pK)}} \quad (1)$$

(ii) for a two-step process

$$F = \frac{p_1 + p_x \times 10^{n_1(pH-pK_1)} + p_2 \times 10^{n_1(pH-pK_1)+n_2(pH-pK_2)}}{1 + 10^{n_1(pH-pK_1)+n_2(pH-pK_2)}} \quad (2)$$

where F stands for spectroscopic intensity at given pH; p_1 and p_2 stand for spectroscopic intensity for the fully protonated or deprotonated state, respectively; p_x stands for the spectroscopic intensity of the first step in the two-step process; and n , n_1 , and n_2 stand for Hill coefficients.

Potentiometry. Potentiometric titrations were performed on a Titrand 907 automatic titrator (Metrohm) using a combined glass-Ag/AgCl electrode (InLabMicro, Mettler Toledo, Switzerland). The electrode was calibrated daily by titrating nitric acid.²⁶ The CO₂-free solution of 0.1 M NaOH was used as the titrant. All experiments were performed under argon at 25 °C. Sample volumes were 1.5 mL. The samples contained 1.0 mM $A\beta$ peptide ($A\beta_{5-16}$, $A\beta_{5-12}$, $A\beta_{5-9}$) dissolved in 4 mM HNO₃/96 mM KNO₃. The Cu(II) complex formation was studied for the different peptide:metal stoichiometries (1:2, 1:1, 1:0.5) using a 5–10% excess of peptides over metal ions, over the pH range from 2.3 to 12.2. SUPERQUAD and HYPERQUAD were used to analyze the data.^{27,28} At least three titrations

were performed separately to determine the protonation and Cu(II) stability constants of the studied compounds.

Voltammetry. The electrochemical experiments were done in a three-electrode arrangement with Ag/AgCl as the reference, platinum wire as the counter, and glassy carbon electrode (GCE, BASi, 3 mm diameter) as the working electrode. The reference electrode was separated from the working solution by an electrolytic bridge filled with 4 mM HNO₃/96 mM KNO₃ solution. The GC electrode was sequentially mechanically polished with 1.0 and 0.3 μ m alumina powder on a Buehler polishing cloth to a mirror-like surface. In order to remove the remaining powder, the electrode was sonicated for 1 min in deionized water. All electrochemical measurements were carried out in 96 mM KNO₃ solutions containing 4 mM HNO₃ solution at pH 7.4. The pH was adjusted by adding small volumes of concentrated KOH or HNO₃ solutions; the concentrations of peptides were 0.5 mM and the ligand-to-Cu(II) ratio was 1:0.8 in all cases (a small Cu(II) deficiency was applied to avoid the interference from uncomplexed Cu(II) cations). In ternary complex investigations imidazole was added to the Cu(II)–peptide complex up to 10 mM concentration. The pH was closely controlled before, during, and at the end of each voltammetric measurement. Oxygen was removed from the sample solution by passing argon for 5–10 min before all measurements, and an argon blanket was maintained over the solution during the experiments carried out at 25 °C.

Cyclic (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) experiments were performed using the CHI 1030 potentiostat (CH Instrument, Austin, USA). For all presented CV curves, the scan rate (ν) was 100 mV/s. The following parameters were used in DPV: pulse amplitude 50 mV, pulse time 100 ms.

RESULTS AND DISCUSSION

A β _{5–9} Complexes. We first performed a set of pH-metric titrations of the studied peptides in the absence and presence of Cu(II) ions. The protonation constants calculated from these experiments are presented in Table 1. The assignments of proton exchanging groups mainly contributing to given

Table 1. Protonation Constants (log β^a and pK_a Values) of A β _{5–9}, A β _{5–12}, and A β _{5–16} (L) at I = 0.1 M (KNO₃), Determined by Potentiometry at 25 °C^{b,16,29,30}

Species	Log β^a	pK _a	Assignment
Aβ_{5–9}			
HL	7.37(1)	7.37	Arg5 N-term.
H ₂ L	13.51(1)	6.13	His6
H ₃ L	16.67(1)	3.17	Asp7
Aβ_{5–12}			
HL	10.08(1)	10.08	Tyr10
H ₂ L	17.60(1)	7.52	Arg5 N-term.
H ₃ L	23.84(1)	6.25	His6
H ₄ L	28.21(1)	4.37	Glu11
H ₅ L	30.94(1)	2.73	Asp7
Aβ_{5–16}			
HL	10.39(1)	10.39	Tyr10/Lys16
H ₂ L	20.35(1)	9.96	
H ₃ L	27.94(1)	7.60	Arg5 N-term.
H ₄ L	34.61(1)	6.67	His6/13/14
H ₅ L	40.92(1)	6.31	
H ₆ L	46.43(1)	5.50	
H ₇ L	50.35(1)	3.92	Glu11
H ₈ L	52.83(1)	2.48	Asp7

^a $\beta(H_nL) = [H_nL]/([L][H^+]^n)$. ^bStandard deviations on the last digits provided by HYPERQUAD,²⁸ given in parentheses, represent statistical errors of constant determinations. Assignments are based on literature values.

protonation constants are based on previous studies of analogous peptides.^{16,29,30} The pK_a values are typical for the respective groups and sufficiently well separated to make these assignments unambiguous.³¹

The potentiometric titrations performed at various Cu(II)/peptide ratios for A β _{5–9} indicated the formation of complexes having solely a 1:1 copper-to-peptide stoichiometry and differing by the number of bound/released hydrogen ions (Table 2). The CD and UV–vis spectra of Cu(II)–A β _{5–9}

Table 2. Stability Constants (log β^a and pK_a Values) of Cu(II) Complexes of A β _{5–9}, A β _{5–12}, and A β _{5–16} (L) at I = 0.1 M (KNO₃), Determined by Potentiometry at 25 °C^b

Species	Log β^a	pK _a	Assignment	Coordination Mode
Aβ_{5–9}				
CuL	9.48(1)			3N+H ₂ O
CuH _{–1} L	5.66(1)	3.82	Asp7	3N+H ₂ O
CuH _{–2} L	–3.69(1)	9.35	Equatorial H ₂ O	3N+OH [–]
Total 3N + H ₂ O		3.61		3N+H ₂ O
Aβ_{5–12}				
CuH ₂ L	23.72(3)			3N+H ₂ O
CuHL	20.44(1)	3.23	Asp7	3N+H ₂ O
CuL	15.76(1)	4.69	Glu11	3N+H ₂ O
CuH _{–1} L	6.29(2)	9.47	Tyr10/H ₂ O	3N/Tyr10 and 3N+OH [–]
CuH _{–2} L	–3.76(2)	10.05	H ₂ O/Tyr10	3N+OH [–]
Total 3N + H ₂ O		3.66		
Aβ_{5–16}				
CuH ₃ L	46.00(2)			3N+H ₂ O
CuH ₄ L	42.79(1)	3.212	Asp7	3N+H ₂ O
CuH ₃ L	38.62(1)	4.169	Glu11	3N+H ₂ O
CuH ₂ L	33.46(1)	5.159	His13/14	3N+N
CuHL	26.11(2)	7.35	His13/14	3N+N
CuL	16.43(3)	9.68	Equatorial H ₂ O/Tyr10/Lys16	3N+N/3N + OH [–]
CuH _{–1} L	6.56(3)	9.87		
CuH _{–2} L	–3.38(2)	9.94		
Cu ₂ HL	31.50(1)			
Cu ₂ L	25.37(1)	6.134	His13/14 N [–]	3N+H ₂ O + 2N
Cu ₂ H _{–1} L	19.08(1)	6.29		3N+H ₂ O + 3N
Cu ₂ H _{–2} L	10.15(1)	8.93	Val12/Glu11 N [–]	3N+H ₂ O + 4N
Cu ₂ H _{–3} L	1.05(1)	9.1	Equatorial H ₂ O	3N/OH [–] + 4N
Cu ₂ H _{–4} L	–9.4(1)	10.45	Lys16/Tyr10	3N/OH [–] + 4N
Cu ₂ H _{–5} L	–19.94(9)	10.54		3N/OH [–] + 4N
Total 3N + H ₂ O		3.62		

^a $\beta(Cu_mH_nL) = [M_mH_nL]/([M]_m[L][H^+]^n)$. ^bStandard deviations on the last digits provided by HYPERQUAD,²⁸ given in parentheses, represent statistical errors of constant determinations. Assignments are based on literature values.^{20,21,29,30} Coordination modes are derived from the analysis presented below.

complexes are presented in Figures 1 and S1, respectively. Figure 2 demonstrates the potentiometric species distribution compared to parameters derived from these spectra. The quantitative agreement of these results allowed us to calculate the spectroscopic parameters for individual complexes, as given in Table 3. The first complex formed is a 3N species with spectroscopic parameters analogous to those recorded earlier for GHK, WHWSKNR-NH₂, and GHTD-NH₂ peptides,^{19–23} with the fourth equatorial site occupied by a water molecule. It

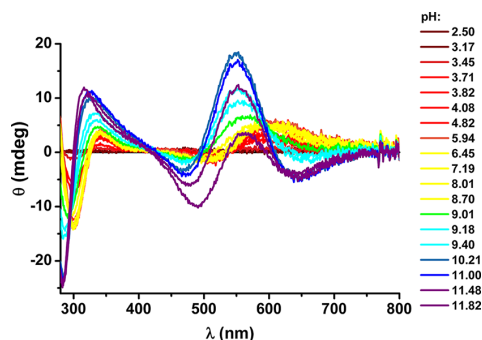


Figure 1. pH dependence of CD spectra recorded at 25 °C for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM Aβ₅₋₉, at pH values color coded on the graphs.

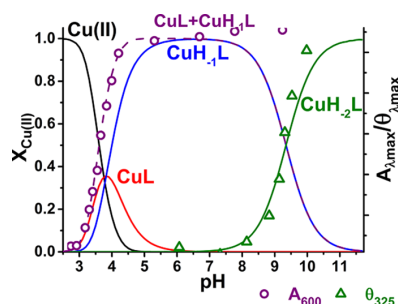


Figure 2. Species distribution calculated for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM Aβ₅₋₉, on the basis of constants presented in Tables 1 and 2, with selected spectroscopic parameters overlaid.

contains two spectroscopic forms, CuL and CuH₁L, differing by deprotonation of the Asp7 side chain carboxyl function. This event, recorded by potentiometry with the pK_a of 3.82, does not affect the spectroscopic parameters (Tables 2 and 3). It is not surprising, as the coordination of the Asp7 carboxylate to the Cu(II) ion bound in the 3N core provided by Arg5 and His6 is excluded by the complete geometry. The elevation of Asp7 pK_a by 0.65 pH units can be explained by lowering the overall molecular charge by Cu(II) coordination by one, compared to the unbound peptide.

The next recorded deprotonation occurred with the pK_a of 9.35 and was associated by a significant blue shift of the *d*–*d* band maximum, the change of its symmetry in CD, and concomitant alterations in charge transfer bands (Figure 1, Table 3). These changes are due to the deprotonation of the coordinated water molecule.^{20,21} The additional split in the *d*–*d* band, not observed in titrations of WHWSKNR-NH₂ and GHTD-NH₂ complexes,^{19,20} is indicative of an additional interaction involving the coordinated hydroxyl anion, most likely with the cationic Arg side chain.

At still higher pH above 10 a further set of changes appeared in the CD spectra, with a characteristic strong negative feature at 500 nm. According to the literature, they are due to the replacement of the hydroxyl group by the deprotonated N τ of the imidazole ring, possibly resulting in imidazole-bridged oligomers.^{21,32,33}

The potentiometric titrations did not provide evidence for the presence of a CuL₂-type complex. Such complexes were reported previously for simpler XHZ peptides by potentiometry, but with little support by independent direct techniques

Table 3. Spectroscopic Parameters for Cu(II) Mono-complexes of Aβ_{5-x} Peptides at 25 °C

Complex	Mode (species)	UV–vis	CD
		$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{ext}}/\text{nm}$ ($\Delta\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Cu(II)-Aβ ₅₋₉	3N+H ₂ O (CuL + CuH ₁ L)	600 (47) ^a	600 (+0.17) ^a
			505 (−0.05) ^a
			341 (+0.12) ^b
			300 (−0.46) ^c
			267 (+0.53) ^d
	3N+OH [−] (CuH ₂ L)	555 (63) ^a	650 (−0.1) ^a
			546 (+0.61) ^a
			470 (−0.11) ^a
			325 (+0.38) ^{b,c}
			285 (−0.76) ^d
Cu(II)-Aβ ₅₋₁₂	3N+H ₂ O (CuH ₃ L + CuHL + CuL)	600 (60) ^a	600 (+0.14) ^a
			503 (−0.05) ^a
			341 (+0.09) ^b
			301 (−0.37) ^c
			650 (−0.09) ^a
	3N/Tyr10 and 3N+OH [−] (CuH ₁ L)	560 (89) ^a 400sh (82) ^e	548 (+0.29) ^a
			470 (−0.09) ^a
			400 (+0.09) ^c
			325 (+0.25) ^b
			605 (+0.16) ^a
Cu(II)-Aβ _{5-12F}	3N+H ₂ O	600 (60) ^a	513 (−0.05) ^a
			341 (+0.08) ^b
			301 (−0.39) ^c
			650 (−0.08) ^a
			553 (+0.44) ^a
	3N+OH [−]	555 (85) ^a	470 (−0.09) ^a
			323 (+0.28) ^{b,c}
			283 (−0.64) ^d
			605 (+0.19) ^a
			506 (−0.05) ^a
Cu(II)-Aβ ₅₋₁₆	3N+H ₂ O (CuH ₃ L + CuH ₄ L + CuH ₅ L)	600 (58) ^a	341 (+0.11) ^b
			301 (−0.47) ^c
			640 (−0.05) ^a
			553 (+0.16) ^a
			478 (−0.09) ^a
	3N+N (CuH ₂ L + CuHL)	565 (66) ^a	336 (+0.12) ^b
			300 (−0.35) ^c
			640 (−0.07) ^a
			553 (+0.20) ^a
			478 (−0.10) ^a
	3N+OH [−] (CuL + CuH ₁ L + CuH ₂ L)	560 (73) ^a	336 (+0.17) ^{b,c}

^a *d*–*d* transition. ^b N^{im}–Cu^{II} charge transfer (CT). ^c N[−]–Cu^{II} CT. ^d N^{am}–Cu^{II} CT. ^e Tyr O[−]–Cu^{II} CT.

in solution.^{17,19,23,32–35} No such complex was detected for WHWSKNR-NH₂. It was also invisible for potentiometry in the study of GHTD-NH₂ complexes, due to insufficient stability at submillimolar peptide concentrations, but a spectroscopic titration with the peptide excess demonstrated its existence at pH 7.4.²¹ Here we used the same approach to detect it, as shown in Figure 3. The associated spectral changes were very similar to those observed for GHTD-NH₂, indicating the formation of a 3 + 1N complex, with the water molecule replaced by an imidazole nitrogen of the second peptide molecule. The conditional stability constant derived from this titration is provided in Table 4, and the spectral parameters of

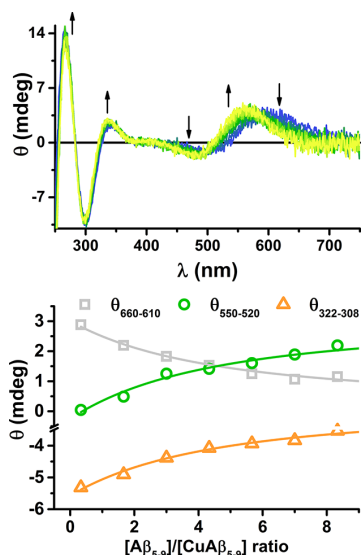


Figure 3. Top: the titration of 0.8 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-9}$ at 25 °C and pH 7.4 with the excess of $A\beta_{5-9}$, up to 15 mM, monitored by CD. Arrows mark the direction of changes. Bottom: the fit of the conditional stability constant of the CuL_2 complex at spectral areas of maximum change: 635 nm (gray), 535 nm (green), and 315 nm (orange).

this complex are given in Table 5, along with the parameters of ternary complexes with imidazole.

Table 4. Conditional Stability Constants (M^{-1}) for Binary (${}^cK_{7,4}$) and Ternary (${}^tK_{7,4}$) for Cu(II) Complexes of $A\beta_{5-x}$ Peptides at pH 7.4^a

Peptide	${}^cK_{7,4}$	${}^tK_{7,4}$		
		imidazole	$A\beta_{5-9}$	$A\beta_{1-16}$
$A\beta_{5-9}$	5.75×10^{12}	870 ± 69	283 ± 50	5200 ± 200
$A\beta_{5-12}$	5.13×10^{12}	557 ± 36	n.a.	n.a.
$A\beta_{5-16}$	9.55×10^{12}	98 ± 27	n.a.	n.a.

^a ${}^cK_{7,4}$ values were calculated from potentiometric data using the CI approach. Competitivity index (CI) was calculated for Cu(II), peptide, and ligand (Z) concentrations of 0.001 M. CI is the value of $\log K_{CuZ}$ such as the condition $\sum_{ijk}([Cu_iH_jL_k]) = [CuZ]$ is fulfilled, where Z is a theoretical competitor. n. a. stands for not analyzed. ^t ${}^tK_{7,4}$ were calculated directly from spectroscopic titrations using eq 1.

$A\beta_{5-12}$ and $A\beta_{5-12F}$ Complexes. The extension of the sequence by residues 10–12, YEV, added two proton-exchanging side chains, Tyr10 and Glu11 in $A\beta_{5-12}$. Their characteristic pK_a values about 10 and 4, respectively, together with the data for $A\beta_{5-9}$, allowed us to directly assign the respective protonation events to individual groups, as provided in Table 1 and presented in Figure 4.

Accordingly, the lowest-pH complex of $A\beta_{5-12}$ has the CuH_2L stoichiometry, but the same 3N coordination as the CuL complex of $A\beta_{5-9}$, as seen in CD and UV-vis spectra, presented in Figures 5A and S2, respectively. The next two deprotonations under pH 5 did not affect the spectra and can be assigned to Asp7 and Glu11 carboxyl deprotonations. The spectra became more complicated above pH 8, where two overlapping deprotonations took place. In order to facilitate

Table 5. Spectroscopic Parameters of Ternary Complexes of Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ with Imidazole (Im) or $A\beta_{5-x}$ at 25 °C

Ternary complex	Mode	UV-vis		CD	
		λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$)		λ_{ext}/nm ($\Delta\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$)	
Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ + $A\beta_{5-9}$	3N+N $A\beta_{5-9}$	566 (79) ^a		560 (+0.20) ^a	
				478 (−0.08) ^a	
				335 (+0.15) ^b	
				300 (−0.37) ^c	
				267 (+0.51) ^d	
Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ + $A\beta_{1-16}$	3N+N $A\beta_{1-16}$	575 (76) ^a		564 (+0.22) ^a	
				482 (−0.07) ^a	
				337 (+0.17) ^b	
				298 (−0.37) ^c	
				267 (+0.51) ^d	
Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ + Im	3N+N ^{Im}	566 (75) ^a		645 (−0.11) ^a	
				551 (+0.17) ^a	
				478 (−0.08) ^a	
				332 (+0.11) ^b	
				296 (−0.35) ^c	
Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ + Im	3N+N ^{Im}	562 (81) ^a		644 (−0.11) ^a	
				550 (+0.17) ^a	
				478 (−0.11) ^a	
				333 (+0.13) ^b	
				297 (−0.40) ^c	
Cu(II)- $A\beta_{5-16}$ + Im	3N+N ^{Im}	564 (70) ^a		645 (−0.08) ^a	
				553 (+0.19) ^a	
				478 (−0.06) ^a	
				330 (+0.12) ^b	
				297 (−0.35) ^c	

^ad–d transition. ^bN^{Im}–Cu^{II} charge transfer (CT). ^cN[−]–Cu^{II} CT. ^dN^{am}–Cu^{II} CT.

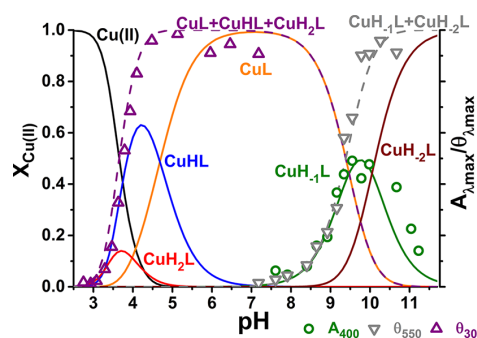


Figure 4. Species distribution calculated for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-12}$, on the basis of constants presented in Tables 1 and 2, with selected spectroscopic parameters of $A\beta_{5-12}$ overlaid.

the analysis, we performed spectroscopic titrations of Cu(II)- $A\beta_{5-12F}$, the analog having Tyr replaced with Phe. The respective CD and UV-vis results are presented in Figures 5B and S3.

The pK_a values for the 3N complex formation obtained from CD titrations were 3.77(1) and 3.51(2) for the formation of 3N complexes of $A\beta_{5-12}$ and $A\beta_{5-12F}$, respectively. The former value is in a good agreement with the potentiometry-derived value of 3.66. Based on the characteristic CT band at 400 nm, seen particularly clearly in UV-vis spectra of Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ contrasted with Cu(II)- $A\beta_{5-12F}$ in the pH range 7–10 (Figure 6A) and CD titrations monitored at 370–380 nm (Figure 6B),

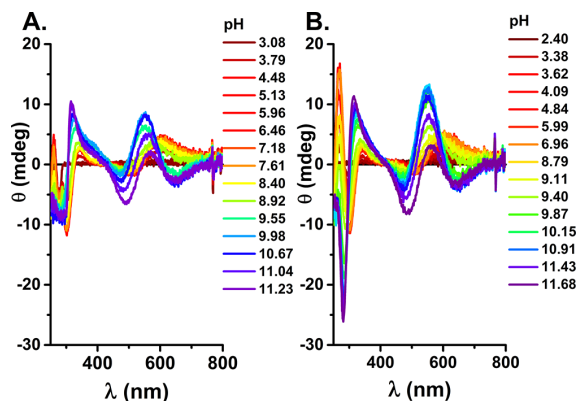


Figure 5. CD spectra recorded at 25 °C for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-12}$ (A) or 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-12F}$ (B) at pH values color coded on the graphs.

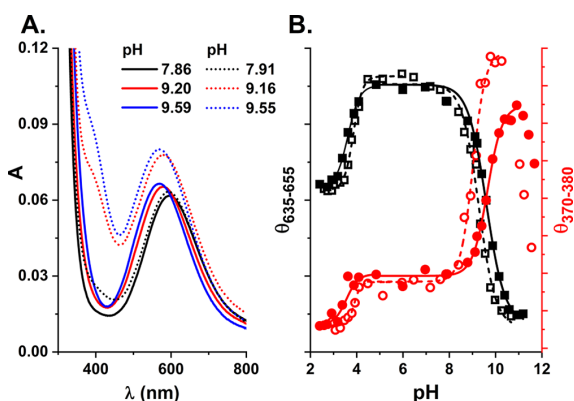


Figure 6. (A) Comparison of UV–vis spectra of Cu(II) complexes of spectra recorded at 25 °C for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-12F}$ (solid lines) or $A\beta_{5-12}$ (dotted lines) at pH values indicated on the graph. (B) pH dependence of CD signals at 370–380 nm (red circles) or 635–655 nm (black squares) derived from CD spectra shown in Figure 5 for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-12F}$ (full symbols) or $A\beta_{5-12}$ (open symbols).

we can assign the deprotonation event about pH 9 (8.89(3) from CD, 8.95(7) from UV–vis) to deprotonation and equatorial Cu(II) coordination of Tyr10 phenolate oxygen.^{36,37} This band disappears gradually above pH 9.5, in accord with another deprotonation, which can thus be assigned to the replacement of Tyr O[−] by the solution-derived OH[−] group, with $pK_a = 9.92(5)$. At very high pH an imidazole bridged species is formed as in Cu(II)- $A\beta_{5-9}$.

The comparison of pK_a values for uncoordinated Tyr, 10.08, coordinated Tyr, 8.89, and deprotonated water in Cu(II)- $A\beta_{5-12}$, 9.92 vs 9.3 for Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ (average of potentiometric and spectroscopy calculations) and 9.62(3) in $A\beta_{5-12F}$ (from spectroscopy), allowed us to estimate the ratio of Cu(II) affinities of Tyr phenolate vs the hydroxyl group at pH 9 as ca. 8.3. The physiological relevance of this interaction is limited, however, as the Cu(II) occupancy by Tyr phenolate at pH 7.4 is 3% or less, estimated from potentiometric data compared to fluorescence titrations of $A\beta_{5-12}$ and Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ (Figure S4).

$A\beta_{5-16}$ Complexes. A further C-terminal peptide sequence extension by residues 13–16, VHHQK, added three proton-exchanging side chains, compared to $A\beta_{5-12}$, His13, His14, and Lys16. As a result, the separation of contributions to potentiometric macroconstants of Tyr10 and Lys16 on one hand and of His6, His13, and His14 on another was not possible, due to overlapping protonation processes. The differences between the respective pK_a values, presented in Table 1, are close to statistical values for two and three equivalent groups, 0.6 and 0.48 pH units, respectively.³¹ All these values remain in their typical ranges.

Due to the presence of two distinct Cu(II) binding sites in $A\beta_{5-16}$, the spectroscopic and potentiometric experiments were performed at the 1.8:1 Cu(II):peptide ratio, in addition to the 0.9:1 ratio used for shorter analogs. The CD titration for the 0.9:1 ratio is presented in Figure 7, the UV–vis titration in Figure S5, and the species distribution plots in Figure 8. The respective data for the 1.8:1 ratio are presented in Figures S6, S7, and S8.

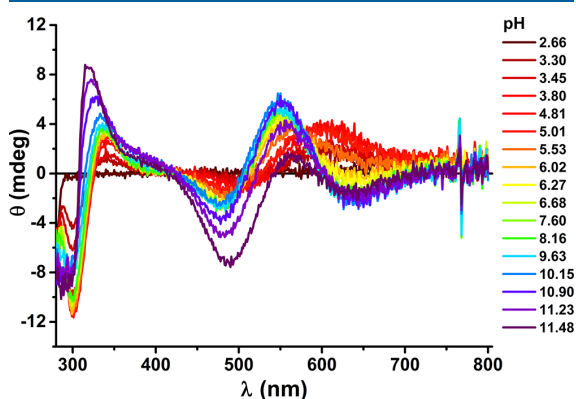


Figure 7. pH dependence of CD spectra recorded at 25 °C for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-16}$, at pH values color coded on the graph.

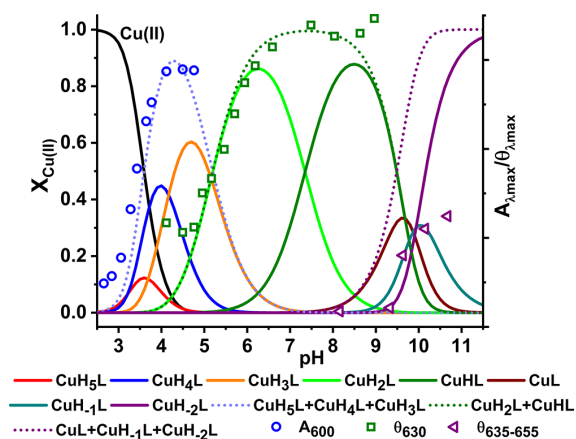


Figure 8. Species distribution calculated for 0.9 mM Cu(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-16}$, on the basis of constants presented in Tables 1 and 2, with selected spectroscopic parameters of $A\beta_{5-16}$ overlaid.

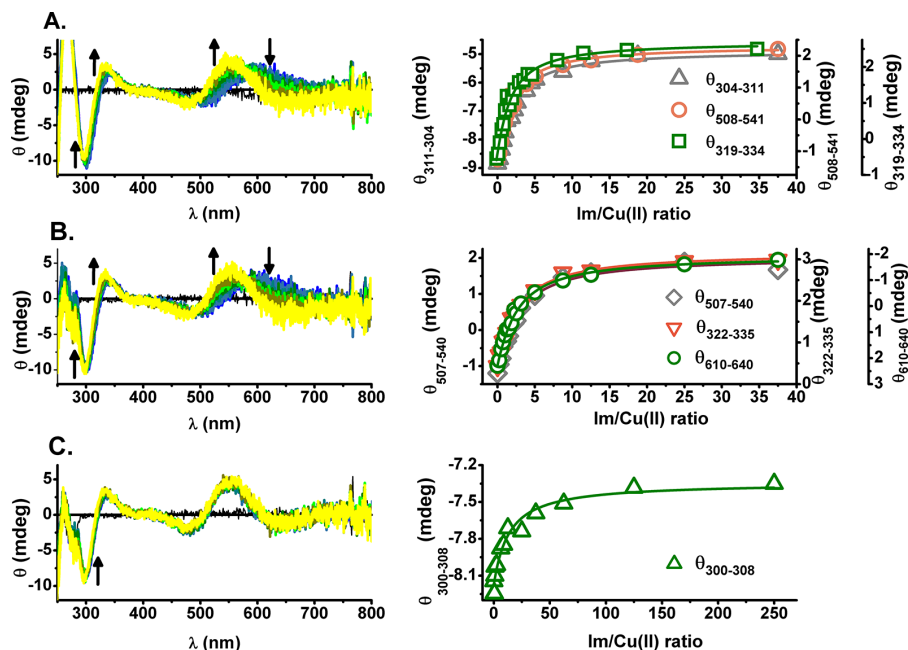


Figure 9. CD titrations and resulting titration curves for Cu(II) complexes of $A\beta_{5-9}$ (A), $A\beta_{5-12}$ (B), and $A\beta_{5-16}$ (C) with imidazole (Im) for 1 mM $A\beta_{5-x}$ and 0.8 mM Cu(II) at pH 7.4. The increasing Im concentrations are color-coded from blue to yellow. The directions of changes are marked by arrows. The titration curves were generated by averaging spectral intensities over the given wavelength ranges for better signal-to-noise ratios. There were no spectral changes in the $d-d$ range for $A\beta_{5-16}$.

At the 0.9:1 ratio the CuH_5L and CuH_4L and CuH_3L complexes present at low pH correspond to the 3N complex. Its spectroscopic parameters with $d-d$ bands at 600 nm at the UV-vis spectrum as well as at 506 and 605 nm at the CD spectrum are very similar to those observed for the 3N complexes of $A\beta_{5-9}$ and $A\beta_{5-12}$. The pK_a of formation of this complex calculated from spectroscopic and potentiometric data is 3.4–3.6. This spectroscopic species is superseded with another, comprising the CuH_2L and $CuHL$ stoichiometries, which exhibited a 35 nm blue shift of the $d-d$ band in the UV-vis spectra and significant changes in the CD pattern (see Table 3, Figure 7, and Figure S5). The pK_a of this process derived from spectroscopy is 5.55. The only residues that can release a proton in this pH range are His13 and His14. These residues are essentially equivalent in the apo-peptide, but their pK_a values in the complex are 5.16 and 7.35. These features clearly indicate that His13 or His14 replaces the water molecule in the fourth equatorial coordination site. This observation is further supported by the lack of Tyr phenolate coordination (the absence of a 400 nm band) above pH 8 in $Cu(II)-A\beta_{5-16}$. As a result the $Cu(II)$ -independent Tyr10 and Lys16 deprotonations occur at pH 9.5–10, along with the third proton release, which must originate from the replacement of N^{im} by OH^- in the fourth site. This replacement induces a small change in CD spectra as shown in Figure 8, indicating that the pK_a for this process is ca. 9.65, about 0.3 log units higher than in $Cu(II)-A\beta_{5-9}$. As for all other $A\beta_{5-x}$ peptides a major spectral change above pH 11 was noted, tentatively assigned to the formation of the imidazole bridged tetramer. The protonic equivalence of His13 and His14 and their similar distancing to the N-terminally coordinated Cu(II) ion suggests that the 3 + 1N complex is

actually a mixture of His13 and His14 coordinated species, perhaps with a slight distance-wise preference for His13.

The experiments performed at the Cu(II) excess indicate that the 3N complex is formed in a fashion similar to that at the 1:1 ratio, but it is followed by the additive formation of a novel spectral band (~ 579 nm) with the pK_a of 5.90. This complex is analogous to that observed before for $Cu(II)-A\beta_{4-16}$ and corresponds to an independent formation of the second Cu(II) ion at the His13 and His14 residues.¹⁶ As expected, the binding of the second Cu(II) ion at His13/His14 prevented the entry of His13/His14 N^{im} to the coordination sphere of the N-terminal 3N complex.

Ternary Complexes. To further investigate the role of the fourth equatorial site in Cu(II) coordination of $A\beta_{5-x}$ peptides, we performed CD titrations of $Cu(II)-A\beta_{5-9}/A\beta_{5-12}/A\beta_{5-16}$ complexes with imidazole (Im). The respective CD spectra and titration curves are provided in Figure 9.

The addition of Im resulted in a blue-shift of $d-d$ bands of $Cu(II)-A\beta_{5-9}/A\beta_{5-12}$ from 600 to 550 nm as shown in Figure 9A and 9B, respectively. These changes were accompanied by a 10 nm blue-shift and an increase of intensity of CT bands at 340 and 300 nm. No changes in the $d-d$ bands and only a slight effect in CT signals were noticed during the analogous titration of $Cu(II)-A\beta_{5-16}$ (see Figure 9C), even at the final 250-fold excess of Im over Cu(II).

The effects seen for $Cu(II)-A\beta_{5-9}/A\beta_{5-12}$ complexes were analogous to those seen previously for Im titrations of all Xaa-His peptides studied by us recently, including WHWSKNR-NH₂, GHTD-NH₂, and GHK^{20,21,38} and are consistent with the replacement of the equatorially coordinated water molecule in the 3N coordination mode (N^{am} , N^{im} , N^-) dominant at pH 7.4, with the Im nitrogen, forming the ternary

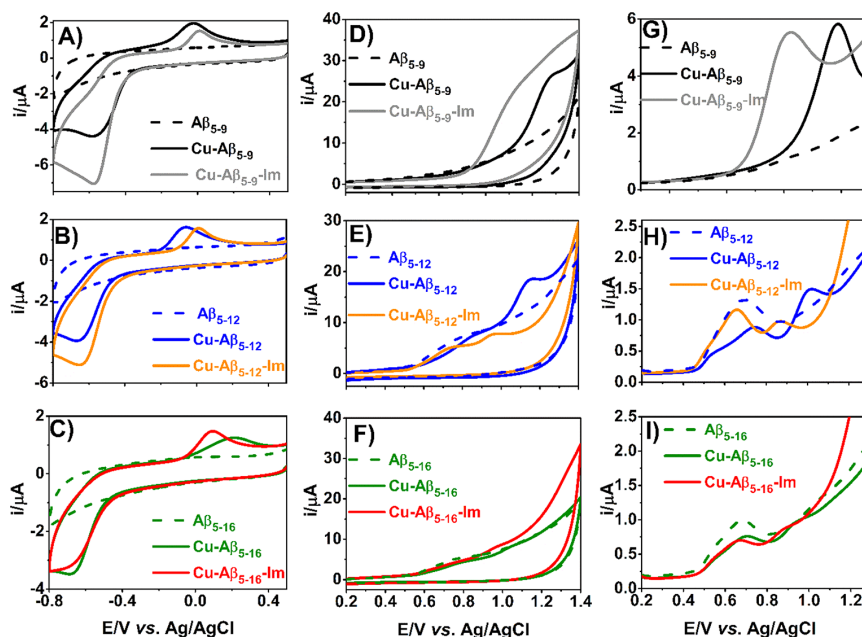


Figure 10. CV (A–F) and DPV (G–I) curves of 0.5 mM $A\beta_{5-9}$ (A, D, G), $A\beta_{5-12}$ (B, E, H), and $A\beta_{5-16}$ (C, F, I) recorded in the absence (dashed line) or the presence of 0.40 mM Cu(II) and 5.0 mM imidazole, pH 7.4.

Table 6. Properties of Redox Processes from CV and DPV Curves of $A\beta_{5-x}$ Binary and Ternary Complexes^a

Complex	Cu(II)/Cu(I)				Cu(II)/Cu(III)		
	E_{CV}^{RED}	E_{CV}^{OX}	E_{DPV}	I_{DPV} (μA)	E_{CV}^{OX}	E_{DPV}	I_{DPV} (μA)
Cu(II)- $A\beta_{5-9}$	−0.579(5)	−0.025(1)	−0.453(5)	−1.318(4)	1.297(2)	1.184(4)	2.77(5)
Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ -Im	−0.576(1)	0.011(4)	−0.492(1)	−1.490(7)	1.094(5)	1.024(2)	2.918(9)
Cu(II)- $A\beta_{5-12}$	−0.633(5)	0.054(3)	−0.540(1)	−1.473(6)	1.269(5)	1.158(2)	3.02(5)
Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ -Im	−0.669(1)	−0.062(2)	−0.523(2)	−1.037(5)	1.159(2)	1.018(2)	0.469(5)
Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ -Im	−0.647(3)	0.008(3)	−0.516(1)	−1.000(6)	0.955(4)	0.863(2)	0.145(1)
Cu(II)- $A\beta_{5-16}$	−0.680(4)	0.200(5)	−0.557(2)	−0.434(5)	1.058(4)	0.938(3)	0.065(4)
Cu(II)- $A\beta_{5-16}$ -Im	−0.688(2)	0.093(2)	−0.560(6)	−0.383(7)	0.973(1)	0.876(6)	0.052(2)

^aE values are given in V vs Ag/AgCl.

3N+1N (N^{am} , N^{imHis6} , $N^- + N^{Im}$) complex. The same effects were observed for titrations of 3N complexes with the excess of the parent peptide for GHTD-NH₂ and GHK^{21,38} and $A\beta_{5-9}$ in this work. The much less pronounced response of Cu(II)- $A\beta_{5-16}$ to Im can be readily explained by the intramolecular 3 + 1N coordination in this complex, employing His13/His14 residues. Nevertheless, a slight change of intensity of the CT band at 304 nm, along with the absence of changes in $d-d$ bands can be ascribed to the forced replacement of the intramolecular ligand by external Im. The conditional stability constants (K_T) for Im binding to Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ complexes were obtained by global fitting of multiple titration curves according to eq 3:

$$K_T = \frac{[CuL(Im)]}{[CuL][Im]} \quad (3)$$

where L is the $A\beta_{5-x}$ peptide from the initial binary Cu(II) complex.

The K_T values are provided in Table 4. The strongest ternary complex was formed for Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ followed by Cu(II)- $A\beta_{5-12}$. The lower K_T for the latter could be caused by steric

hindrance from additional residues in the $A\beta_{5-12}$ sequence. Such effect is evident in the 3-fold lower K_T for the second $A\beta_{5-9}$ molecule, compared to Im. A further 5-fold lowering of K_T for Cu(II)- $A\beta_{5-16}$ compared to Cu(II)- $A\beta_{5-12}$ is apparently a combination of additional hindrance and the competition from the intramolecular His13/His14 binding. The comparison of cK values presented in Table 4 indicates that this interaction increases the overall Cu(II) affinity of $A\beta_{5-16}$ by 1.8 times. This value is in excellent agreement with that derived from the 0.33 pH units shift of OH[−] coordination ($A\beta_{5-9}$ vs $A\beta_{5-16}$, 2.1 times). Therefore, the lowering of Im affinity to Cu(II)- $A\beta_{5-16}$ is a combination of competition between Im and His13/His14 and the increased hampering of Im access to the Cu(II) binding site.

Additionally, we performed a titration of Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ with $A\beta_{1-16}$ (SI, Figure S9). Partial precipitation of the ternary complex limited the accuracy of the $^cK_{7,4}$ determination, which was estimated as 5200 M^{−1} (Table 4). This high stability compared to other ternary complexes of Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ can be attributed in part to the presence of three His imidazole ligands in $A\beta_{1-16}$ available for the binding, and in part to intermolecular interactions between the Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ pep-

tides. We also attempted the study of the Cu(II)-A β_{5-16} + A β_{1-16} system, but it was precluded by poor solubility of the ternary complex and the apparently weak interaction.

Voltammetry. For further characterization of A β_{5-x} peptides, their binary Cu(II) complexes, and ternary complexes with Im, we performed a series of electrochemical experiments using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The CV results for A β_{5-9} , A β_{5-12} , and A β_{5-16} are presented in Figure 10, with auxiliary CV results for A β_{5-12F} provided in Figure S10. All apo-peptides were electrochemically inactive in the studied range of potentials (initially scanning from 0.5 V toward the negative direction, Figure 10A–C, black, blue, green, dashed lines; gray dashed line in Figure S10A), except for broad peaks observed at 0.6–0.9 V for A β_{5-12} and A β_{5-16} (Figure 10E–F, H–I, blue and green dashed lines) assigned to the Tyr10 phenol ring oxidation to a thermodynamically unstable tyrosyl radical subsequently converted into orthoquinone.^{40–42} A β_{5-9} and A β_{5-12F} were redox silent in this range, as expected (Figure 10D, G; Figure S10B).

The 3N Cu(II)-A β_{5-x} complexes yielded irreversible reduction peaks in voltammograms recorded from +0.5 V to –0.8 V (Figure 10A–C, Figure S11, black, blue, and green solid lines and Figure S10A, gray solid line, see Table 6 for CV and DPV-derived potentials). A significant separation between the cathodic and anodic peaks suggests a slow electron transfer and/or a reorganization of the complex structure upon Cu(II) reduction. This can be explained by the incompatibility of the planar 3N chelate of A β_{5-x} peptides with geometrical preferences of Cu(I) ions, as pointed out previously by Hureau et al. in their Cu(II)-GHK study.¹⁹ The cathodic peak of Cu(II)-A β_{5-16} had an altered shape, appeared at the most negative potential, and had the lowest peak current (Figure 10C green solid line, Table 6). These effects are compatible with the formation of the 3 + 1N coordination structure supplanted by the His-13/His-14 imidazole nitrogen.

The Cu(II)-A β_{5-x} complexes can generate a Cu(II)/Cu(III) redox couple at potentials around 1 V and higher (Figure 10D–I (black, blue, and green solid lines) and Figure S10B (solid gray line)). For binary Cu(II)-A β_{5-x} complexes with Tyr-containing peptides, the Cu(II)/Cu(III) redox signal was preceded by Tyr10 oxidation peaks of decreased intensity and shifted to more positive potentials relative to apo-peptides, in agreement with the literature.⁴¹ The lack of Cu(III)/Cu(II) reduction peaks in the studied complexes may be attributed to the catalytic oxidation of peptide ligands via the electro-generated (highly oxidizing) Cu(III) species according to an EC (electrochemical-chemical) mechanism. In addition to the Tyr phenolic ring, His imidazoles in Cu(II)-A β_{5-16} can also be oxidized by Cu(III) at such potentials, ($E^{\text{ox}} \sim 1.25$ V for L-His⁴² and ~ 1.0 V for His in A β_{42} /A β_{16} ⁴³). The use of faster scan rates (0.5–5 V/s) did not improve the reversibility of the studied process (data not shown). The EC mechanism explains the irreversibility of these Cu(II)/Cu(III) couples, in contrast to the reversible Cu(II)/Cu(III) process in A β_{4-8} and A β_{4-10F} complexes.⁴⁴ The potentials of Cu(II)/Cu(III) peaks for A β_{5-x} complexes appeared in the following decreasing order: Cu(II)-A β_{5-16} > Cu(II)-A β_{5-12} > Cu(II)-A β_{5-12F} > Cu(II)-A β_{5-9} (see Table 6 for values). Additionally, the intensity of the oxidation current increased in the same sequence.

Finally, electrochemical measurements for ternary Im complexes of Cu(II)-A β_{5-x} were done (Figure 10A–I, gray, orange, and red solid lines). A 12.5-fold Im excess over Cu(II)

excess was used to ensure full saturation of Cu(II) with Im for Cu(II)-A β_{5-9} and Cu(II)-A β_{5-12} and 50% saturation for A β_{5-16} , according to equilibrium titrations. No significant changes in the voltammetric signature were noticed in the range of negative potentials (Figure 10A–C, Figure S11), but according to CV and DPV curves registered in the 0.2–1.3 V potential range (Figure 10D–I), the Im addition shifted both the Cu(II)/Cu(III) and Tyr10 oxidation toward less positive potentials. This is in accord with the presence of the 3 + 1N coordination of Cu(II) in the ternary complex, which stabilizes Cu(III) better.⁴⁵ The largest shifts in electrochemical responses occurred for Cu(II)-A β_{5-9} -Im and Cu(II)-A β_{5-12} -Im in relation to the binary complexes. In contrast, a weaker interaction between Cu(II)-A β_{5-16} and imidazole due to the presence of the autoternary complex resulted in a smaller change in redox activity of this chelate. Still, the potentials of formation of Cu(III) species are probably too high to have a biological relevance.

Cu(II) Exchange and Biological Relevance. The stability of a complex is a key property in considering its biological relevance, as biological fluids are teeming with small molecules and proteins ready to compete for copper. A β peptides are essentially extracellular, and their toxicity is exerted mostly in synapses. Not much is known quantitatively about the fast-changing composition of synaptic cleft fluid. Therefore, we are forced to make educated guesses regarding Cu(II) complexation by A β peptides. The A β_{1-x} family peptides bind the Cu(II) ion with $\log K_{7,4} = 10.04$ ($x = 16$) and 10.43 ($x = 40$).⁴⁶ Much higher Cu(II) affinities were determined for A β_{4-x} family peptides,⁸ $\log K_{7,4} = 13.53$ ($x = 16$),¹⁶ and 14.18 ($x = 9$).⁴⁷ The affinities of binary Cu(II)-A β_{5-x} peptides are closer to Cu(II)-A β_{4-x} , $\log K_{7,4} = 12.76$ ($x = 9$), and 12.98 ($x = 16$). However, unlike A β_{4-x} , the A β_{5-x} peptides can elevate their Cu(II) binding capability via ternary complexes, which is a feature shared with other Xaa-His peptides.^{17,20,21,37} Figure 11 presents the evolution of $\log K_{7,4}$ of ternary Im and A β_{1-16} complexes of Cu(II)-A β_{5-9} and Cu(II)-A β_{5-16} calculated using the data presented in Tables 1, 2, and 4.

This simulation clearly shows that in the presence of a ~ 1 mM amount of external imidazole-bearing ligands A β_{5-9} can become a stronger Cu(II) chelator than the longer A β_{5-x} species. Furthermore, at ca. 30 mM Im the Cu(II) binding ability of A β_{5-16} equals that of A β_{4-16} , and that of A β_{5-9}

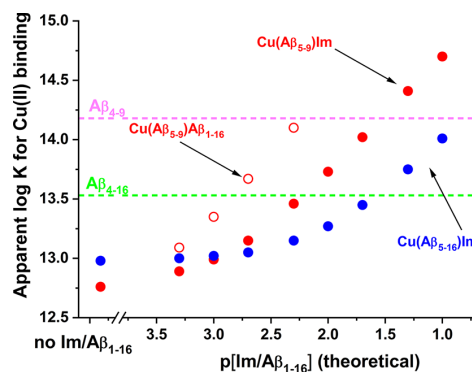


Figure 11. Theoretical evolution of $\log K_{7,4}$ of ternary complexes Cu(II)-A β_{5-9} /Im, Cu(II)-A β_{5-16} /Im, and Cu(II)-A β_{5-9} /A β_{1-16} calculated using the data presented in Tables 1, 2, and 4.

matches $A\beta_{4-9}$. While the actual role of $A\beta_{4-x}$ peptides in brain copper metabolism remains speculative, we postulate that the longer species serve to mop up the excess of Cu(II) ions from the synaptic cleft,¹⁸ and $A\beta_{4-9}$, as product of $A\beta_{4-40}$ cleavage by neprilysin may participate in the export of copper across the blood–brain barrier.^{48,49} $A\beta_{5-x}$ peptides are normally only very minor contributors to the overall β -amyloid pool but our results indicate that these peptides, when multiplied as a result of therapeutic intervention, may interfere with the synaptic and extrasynaptic Cu(II) handling. The affinity of the Cu(II)- $A\beta_{5-9}/A\beta_{1-16}$ complex, much higher than that of imidazole, points at a possibility of strong, specific interactions with larger ligands that can be recruited from the $A\beta$ family or other synaptic proteins. Despite the similar overall affinity, Cu(II)-Xaa-His and Cu(II)-Xaa-Zaa-His (ATCUN) complexes differ in the Cu(II) exchange kinetics, with Cu(II)-Xaa-His complexes reported as much more labile.⁵⁰ They could thus interfere with proper Cu(II) delivery. In particular, $A\beta_{5-9}$ which most likely could be generated by neprilysin analogously to $A\beta_{4-9}$, could theoretically intercept Cu(II) ions faster than the ATCUN peptides and release them off target, e.g. intracellularly, causing oxidative stress in brain cells.⁴⁹

In order to directly find out how $A\beta_{5-x}$ and $A\beta_{4-x}$ peptides could compete for Cu(II) ions, we contacted them directly, by forming the Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ complex at pH 7.4 and then contacting it with equimolar $A\beta_{4-9}$. The reaction was then followed for 24 h, as presented in Figure 12.

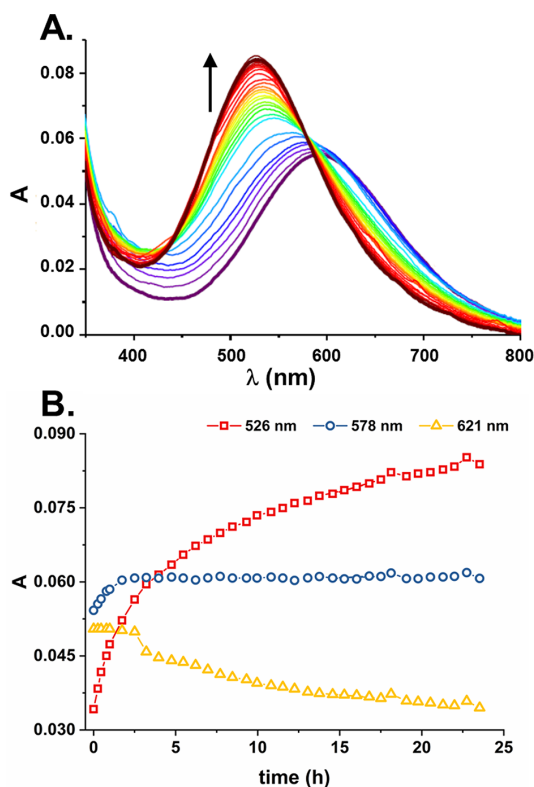


Figure 12. Course of reaction of 1 mM Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ with 1 mM $A\beta_{4-9}$ at pH 7.4 (20 mM HEPES) at 25 °C: (A) evolution of $d-d$ bands; (B) reaction traces at 526, 578, and 621 nm.

By comparing its course with the spectra presented above and with those published previously by Bossak-Ahmad et al.⁴⁷ one can clearly see that the process of Cu(II) transfer from $A\beta_{5-x}$ to $A\beta_{4-x}$, along the gradient of affinities, is mediated by the formation of the ternary $3N+N_{A\beta(4-9)}$ complex. Interestingly, however, the overall process, measured at the maximum of Cu(II)- $A\beta_{4-x}$ absorption, was very slow, taking more than 24 h to complete. Even more interestingly, the reaction had not one, but two slow steps. The first one, taking the first 2.5 h of incubation and characterized by an isosbestic point at 621 nm, was apparently the formation of the ternary complex, which then re-equilibrated into the final $4N$ Cu(II)- $A\beta_{4-9}$ species with the isosbestic point at 578 nm. This experiment shows that the formation of ternary complexes can stabilize the Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ complexes not just thermodynamically, but also kinetically. Taking into account the milliseconds to seconds to minutes time scale of chemical processes in the synapses, such slow equilibrations between $A\beta_{5-x}$ and $A\beta_{4-x}$ indicate that ternary Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ complexes with external ligands, including other $A\beta$ peptides, may indeed interfere with copper brain physiology.

Electrochemical properties of Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ complexes may further contribute to the impairment of brain copper metabolism by enabling the Cu(II)/Cu(I) cycle in the high-affinity Cu(II) pool, not accessible to much weaker Cu(II)- $A\beta_{1-x}$ complexes. In this fashion the overproduction of $A\beta_{5-x}$ peptides could also enhance the oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) generation, normally ascribed to Cu(II)- $A\beta_{1-x}$ species.^{51–53} On the other hand, the oxidation of Cu(II) ions in $A\beta_{5-x}$ complexes to Cu(III) is even less likely than in $A\beta_{4-x}$ complexes, but the presence of imidazole shifted the oxidation potential of the Cu(II)/Cu(III) couple toward less positive potential values, thus slightly increasing the probability of this reaction *in vivo*. Taken together, our results indicate that $A\beta_{5-x}$ peptides, which bind Cu(II) ions much more strongly than $A\beta_{1-x}$ peptides⁴⁶ and only slightly more weakly than $A\beta_{4-x}$ peptides,^{18,47} could interfere with Cu(II) handling by these peptides, adding to copper dyshomeostasis in Alzheimer brains, especially in the presence of auxiliary imidazole ligands, such as His side chains in other peptides and proteins.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.0c01773>.

pH dependence of UV–vis spectra for Cu(II)- $A\beta_{5-x}$ samples, fluorescence titrations of $A\beta_{5-12}$ and Cu(II)- $A\beta_{5-12}$, spectroscopic results and species distribution for 1 mM $A\beta_{5-16}$ and 1.8 mM Cu(II), spectroscopic titration of Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ with $A\beta_{1-16}$, CV for $A\beta_{5-12F}/$ Cu(II)- $A\beta_{5-12F}$, and DPV for $A\beta_{5-x}/$ Cu(II)/Im over 0.2 to -0.8 V potential range (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Wojciech Bal – Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0003-3780-083X; Email: wbal@ibb.waw.pl

Authors

Nina E. Wezynfeld – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, 00-664 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-6206-4195

Aleksandra Tobolska – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, 00-664 Warsaw, Poland; Faculty of Chemistry, University of Warsaw, 02-093 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-4643-7000

Mariusz Mital – Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland

Urszula E. Wawrzyniak – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, 00-664 Warsaw, Poland

Magdalena Z. Wiloch – Charge Transfer Processes in Hydrodynamic Systems Group, Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, 01-224 Warsaw, Poland

Dawid Plonka – Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-4076-9231

Karolina Bossak-Ahmad – Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 02-106 Warsaw, Poland

Wojciech Wróblewski – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, 00-664 Warsaw, Poland

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01773>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Science Center (Poland) OPUS project no. 2014/15/B/ST5/05229 and by Warsaw University of Technology under the program Excellence Initiative: Research University (ID-UB), BIOTECHMED-1 project no. PSP 504/04496/1020/45.010407. The contribution of Aleksandra Tobolska was financially supported and implemented as a part of the Operational Program Knowledge Education Development 2014–2020 (Project No POWR.03.02.00-00-1007/16-00) cofinanced by the European Social Fund.

REFERENCES

- (1) Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2019. Attitudes to dementia*. www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf.
- (2) Haaksma, M. L.; Vilela, L. R.; Marengoni, A.; Calderón-Larrañaga, A.; Leoutsakos, J.-M. S.; Olde Rikkert, M. G. M.; Melis, R. J. F. Comorbidity and Progression of Late Onset Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *PLoS One* **2017**, *12* (5), No. e0177044.
- (3) He, Y.; Wei, M.; Wu, Y.; Qin, H.; Li, W.; Ma, X.; Cheng, J.; Ren, J.; Shen, Y.; Chen, Z.; Sun, B.; Huang, F. D.; Shen, Y.; Zhou, Y. D. Amyloid β oligomers suppress excitatory transmitter release via presynaptic depletion of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1193.
- (4) Zott, B.; Simon, M. M.; Hong, W.; Unger, F.; Chen-Engerer, H.-J.; Frosch, M. P.; Sakmann, B.; Walsh, D. M.; Konnerth, A. A vicious cycle of amyloid β -dependent neuronal hyperactivation. *Science* **2019**, *365*, 559–565.
- (5) Mattsson, N.; Rajendran, L.; Zetterberg, H.; Gustavsson, M.; Andreasson, U.; Olsson, M.; Brinkmalm, G.; Lundkvist, J.; Jacobson, L. H.; Perrot, L.; Neumann, U.; Borghys, H.; Mercken, M.; Dhuyvetter, D.; Jeppsson, F.; Blennow, K.; Portelius, E. BACE1 inhibition induces a specific cerebrospinal fluid β -amyloid pattern that identifies drug effects in the central nervous system. *PLoS One* **2012**, *7* (2), No. e31084.
- (6) Lewis, H.; Beher, D.; Cookson, N.; Oakley, A.; Piggott, M.; Morris, C. M.; Jaros, E.; Perry, R.; Ince, P.; Kenny, R. A.; Ballard, C. G.; Shearman, M. S.; Kalaria, R. N. Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: Age-related accumulation of amyloid- β (42) peptide in vascular dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2006**, *32*, 103–118.
- (7) Murayama, K. S.; Kametani, F.; Tabira, T.; Araki, W. A novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated beta-amyloid Abeta5–40/42 produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Methods* **2007**, *161*, 244–249.
- (8) Portelius, E.; Bogdanovic, N.; Gustavsson, M. K.; Volkman, I.; Brinkmalm, G.; Zetterberg, H.; Winblad, B.; Blennow, K. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2010**, *120*, 185–193.
- (9) Wirths, O.; Zampar, S.; Weggen, S. In *N-Terminally Truncated A β Peptide Variants in Alzheimer's Disease in Alzheimer's Disease*; Wisniewski, T., Ed.; Codon Publications: Brisbane, Australia, 2019; pp 107–122, ISBN: 978-0-6468096-8-7, DOI: 10.15586/alzheimers-disease.
- (10) Gkanatsiou, E.; Portelius, E.; Toomey, C. E.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Lashley, T.; Brinkmalm, G. A distinct brain beta amyloid signature in cerebral amyloid angiopathy compared to Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **2019**, *701*, 125–131.
- (11) Reinert, J.; Richard, B. C.; Klafki, H. W.; Friedrich, B.; Bayer, T. A.; Wiltfang, J.; Kovacs, G. G.; Ingelsson, M.; Lannfelt, L.; Paetau, A.; Bergquist, J.; Wirths, O. Deposition of C-terminally truncated A β species A β 37 and A β 39 in Alzheimer's disease and transgenic mouse models. *Acta Neuropathol. Comm.* **2016**, *4*, 24.
- (12) Portelius, E.; Olsson, M.; Brinkmalm, G.; Ruetschi, U.; Mattsson, N.; Andreasson, U.; Gobom, J.; Brinkmalm, A.; Holtta, M.; Blennow, K. Mass spectrometric characterization of amyloid- β species in the 7PA2 cell model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *33*, 85–93.
- (13) Takeda, K.; Araki, W.; Akiyama, H.; Tabira, T. Amino-truncated amyloid beta-peptide (Abeta5–40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. *FASEB J.* **2004**, *18* (14), 1755–7.
- (14) Drew, S. C.; Barnham, K. J. The Heterogeneous Nature of Cu²⁺ interactions with Alzheimer's Amyloid- β Peptide. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (11), 1146–1155.
- (15) Atrián-Blasco, E.; Gonzalez, P.; Santoro, A.; Alies, B.; Faller, P.; Hureau, C. Cu and Zn Coordination to Amyloid Peptides: From Fascinating Chemistry to Debated Pathological Relevance. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *371*, 38–55.
- (16) Mital, M.; Wezynfeld, N. E.; Frączyk, T.; Wiloch, M. Z.; Wawrzyniak, U. E.; Bonna, A.; Tumpach, C.; Barnham, K. J.; Haigh, C. L.; Bal, W.; Drew, S. C. A Functional Role for A β in Metal Homeostasis? N-Truncation and High-Affinity Copper Binding. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 10460–10464.
- (17) Gonzalez, P.; Bossak, K.; Stefaniak, E.; Hureau, C.; Raibaut, L.; Bal, W.; Faller, P. N-terminal Cu Binding Motifs Xxx-Zzz-His (ATCUN) and Xxx-His and their derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 8029–8041.
- (18) Stefaniak, E.; Bal, W. Cu^{II} binding properties of N-truncated A β peptides: in search of biological function. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 13561–13577.
- (19) Hureau, C.; Eury, H.; Guillot, R.; Bijani, C.; Sayen, S.; Solari, P. L.; Guillon, E.; Faller, P.; Dorlet, P. X-ray and solution structures of Cu(II) GHK and Cu(II) DAHK complexes: influence on their redox properties. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 10151–10160.
- (20) Bossak, K.; Mital, M.; Poznański, J.; Bonna, A.; Drew, S.; Bal, W. Interactions of α -factor-1, a yeast pheromone, and its analog with copper(II) ions and low molecular weight ligands yield very stable complexes. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 7829–7831.

- (21) Kotuniak, R.; Frączyk, T.; Skrobecki, P.; Plonka, D.; Bal, W. GHTD-amide, an insulin activating peptide from human pancreas is a strong Cu(II) chelator. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 15507–15516.
- (22) Trapaidze, A.; Hureau, C.; Bal, W.; Winterhalter, M.; Faller, P. Thermodynamic study of Cu²⁺ binding to the DAHK and GHK peptides by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 37–47.
- (23) Conato, C.; Gavioli, R.; Guerrini, R.; Kolzowski, H.; Mlynarz, P.; Pasti, C.; Pulidori, F.; Remelli, M. Copper complexes of glycylhistidyl-lysine and two of its synthetic analogues: chemical behavior and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2001**, *1526*, 199–210.
- (24) Chan, W. C.; White, P. D. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press: New York, 2000; pp 41–76.
- (25) Kuipers, B. J. H.; Gruppen, H. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, S445–S451.
- (26) Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, L. D. A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Anal. Chim. Acta* **1967**, *38*, 475–488.
- (27) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195–1199.
- (28) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- (29) Kowalik-Jankowska, T.; Ruta, M.; Wiśniewska, K.; Lankiewicz, L. Coordination Abilities of the 1–16 and 1–28 Fragments of Beta-Amyloid Peptide towards Copper(II) Ions: A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95* (4), 270–282.
- (30) Damante, C. A.; Ősz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; S  v  g  , I. The Metal Loading Ability of β -Amyloid N-Terminus: A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Copper(II) Complexes with β -Amyloid(1–16), Its Short or Mutated Peptide Fragments, and Its Polyethylene Glycol (PEG)-ylated Analogue. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 9669–9683.
- (31) Szak  cs, Z.; Kraszn  , M.; Nosz  l, B. Determination of microscopic acid–base parameters from NMR–pH titrations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1428–1448.
- (32) Daniele, P.; Zerbinati, O.; Zelano, V.; Ostacoli, G. Thermodynamic and spectroscopic study of copper(II)-glycyl-L-histidylglycine complexes in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1991**, 2711–2715.
- (33) Farkas, E.; S  v  g  , I.; Kiss, T.; Gergely, A. Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, 611–614.
- (34) Brookes, G.; Pettit, L. Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1975**, 2106–2112.
- (35) Arena, G.; Cucinotta, V.; Musumeci, S.; Purrello, R.; Rizzarelli, E. Formation and stability of simple and mixed complexes of glycyl-L-histidine in aqueous solution. *Ann. Chim. (Rome)* **1984**, *74*, 399–402.
- (36) Pettit, L. D.; Steel, I.; Kowalik, T.; Kozlowski, H.; Bataille, M. Specific binding of the tyrosine residue in copper(II) complexes of Tyr-Pro-Gly-Tyr and Tyr-Gly-Pro-Tyr. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1201–1205.
- (37) Livera, C.; Pettit, L. D.; Bataille, M.; Krembel, J.; Bal, W.; Kozlowski, H. Copper(II) complexes with some tetrapeptides containing the ‘break-point’ prolyl residue in the third position. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 1357–1360.
- (38) Bossak-Ahmad, K.; Wi  sniewska, M. D.; Bal, W.; Drew, S. C.; Fr  czyk, T. Ternary Cu(II) complex with GHK peptide and cis-urocanic acid as a potential physiologically functional copper chelate. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6190.
- (39) Kr    el, A.; W  jcik, J.; Maciejczyk, M.; Bal, W. May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. *Chem. Commun.* **2003**, 704–705.
- (40) Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *655*, 9–16.
- (41) Suprun, E. V.; Zaryanov, N. V.; Radko, S. P.; Kulikova, A. A.; Kozin, S. A.; Makarov, A. A.; Archakov, A. I.; Shumyantseva, V. V. Tyrosine Based Electrochemical Analysis of Amyloid- β Fragment (1–16) Binding to Metal(II) Ions. *Electrochim. Acta* **2015**, *179*, 93–99.
- (42) Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* **2013**, *89*, 11–18.
- (43) Suprun, E. V.; Khmeleva, S. A.; Radko, S. P.; Kozin, S. A.; Archakov, A. I.; Shumyantseva, V. V. Direct electrochemical oxidation of amyloid- β peptides via tyrosine, histidine, and methionine residues. *Electrochem. Commun.* **2016**, *65*, 53–56.
- (44) Wiloch, M. Z.; Wawrzyniak, U. E.; Ufnalska, I.; Bonna, A.; Bal, W.; Drew, S. C.; Wroblewski, W. Tuning the Redox Properties of Copper(II) Complexes with Amyloid-Beta Peptides. *J. Electrochem. Soc.* **2016**, *163* (13), G196–G199.
- (45) Ufnalska, I.; Warzyniak, U. E.; Bossak-Ahmad, K.; Bal, W.; Wroblewski, W. Electrochemical studies of binary and ternary copper(II) complexes with α -factor analogues. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *862*, 114003.
- (46) Alies, B.; Renaglia, E.; R  zga, M.; Bal, W.; Faller, P.; Hureau, C. Cu(II) affinity for the Alzheimer’s peptide: Tyrosine fluorescence studies revisited. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1501–1508.
- (47) Bossak-Ahmad, K.; Mital, M.; Plonka, D.; Drew, S. C.; Bal, W. Oligopeptides Generated by Neprilysin Degradation of β -Amyloid Have the Highest Cu(II) Affinity in the Whole A β Family. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (1), 932–943.
- (48) Mital, M.; Bal, W.; Fr  czyk, T.; Drew, S. C. Interplay between copper, neprilysin and N-truncation of β -amyloid. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 6193–6197.
- (49) Stefaniak, E.; Plonka, D.; Szczerba, P.; Wezinfeld, N. E.; Bal, W. Copper transporters? Glutathione reactivity of products of Cu-A β digestion by neprilysin. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 4186–4190.
- (50) Beuning, C. K.; Mestre-Voegt  , B.; Faller, P.; Hureau, C.; Crans, D. C. Measurement of Interpeptidic Cu(II) Exchange Rate Constants by Static Fluorescence Quenching of Tryptophan. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 4791–4794.
- (51) Cheignon, C.; Jones, M.; Atrian-Blasco, E.; Kieffer, I.; Faller, P.; Collin, F.; Hureau, C. Identification of key structural features of the elusive Cu-A β complex that generates ROS in Alzheimer’s disease. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5107–5118.
- (52) Atrian-Blasco, E.; Del Barrio, M.; Faller, P.; Hureau, C. Ascorbate Oxidation by Cu(Amyloid- β) Complexes: Determination of the Intrinsic Rate as a Function of Alterations in the Peptide Sequence Revealing Key Residues for Reactive Oxygen Species Production. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (9), 5909–5915.
- (53) Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer’s Disease. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464.

Publikacja 2 (P2)

Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions

Aleksandra Tobolska, Nina E. Wezynfeld, Urszula E. Wawrzyniak, Wojciech Bał, Wojciech Wróblewski

Dalton Transactions 50 (2021) 2726-2730

DOI: 10.1039/D0DT03898A

Link do publikacji:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/dt/d0dt03898a>

Link do publikacji:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/dt/d0dt03898a>

Link do publikacji:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/dt/d0dt03898a>

Link do publikacji:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/dt/d0dt03898a>

Link do publikacji:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/dt/d0dt03898a>

Publikacja 3 (P3)

Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes.

Studies on the Interaction between Ni(II)-A β ₅₋₉ and Phosphates/Nucleotides

Aleksandra Tobolska, Nina E. Wezynfeld, Urszula E. Wawrzyniak, Wojciech Bał, Wojciech Wróblewski

Inorganic Chemistry 60 (2021) 19448-19456.

DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c03285

Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)–A β_{5-9} and Phosphates/ Nucleotides

Aleksandra Tobolska,* Nina E. Wezynfeld,* Urszula E. Wawrzyniak, Wojciech Bal, and Wojciech Wróblewski



Cite This: *Inorg. Chem.* 2021, 60, 19448–19456



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

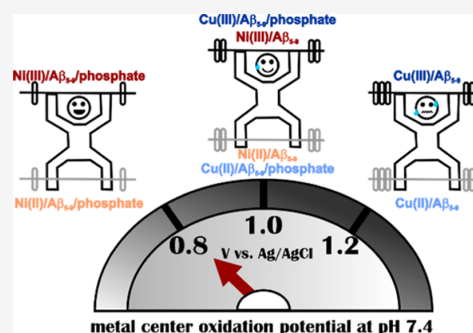


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Amyloid-beta ($A\beta$) peptides, potentially relevant in the pathology of Alzheimer's disease, possess distinctive coordination properties, enabling an effective binding of transition-metal ions, with a preference for Cu(II). In this work, we found that a N-truncated $A\beta$ analogue bearing a His-2 motif, $A\beta_{5-9}$, forms a stable Ni(II) high-spin octahedral complex at a physiological pH of 7.4 with labile coordination sites and facilitates ternary interactions with phosphates and nucleotides. As the pH increased above 9, a spin transition from a high-spin to a low-spin square-planar Ni(II) complex was observed. Employing electrochemical techniques, we showed that interactions between the binary Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex and phosphate species result in significant changes in the Ni(II) oxidation signal. Thus, the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex could potentially serve as a receptor in electrochemical biosensors for phosphate species. The obtained results could also be important for nickel toxicology.



INTRODUCTION

Peptides and proteins are common and efficient metal-binding ligands. Many of them, including amyloid- β ($A\beta$) related to Alzheimer's disease, are rich in histidine (His) residues. The location of His residues in the peptide chain and the nature of the metal ion result in a variety of coordination properties and thermodynamic stabilities of the resulting chelates.¹ The presence of the His residue near the free N-terminus of peptides and proteins prompts high affinities of these ligands to transition-metal ions such as Cu(II) and Ni(II) through unique His-2 (XH) and His-3 (XZH) metal binding motifs (X stands for any amino acid residue and Z for any residue excluding Pro).^{2,3} Peptides with these motifs have been employed in biological and medicinal applications, including copper sensing,⁴ biomolecule (e.g., DNA) degradation,⁵ biological imaging,⁶ and ROS quenching.⁷ Most studies published in the literature have focused on the His-3 motif,⁸ but the His-2 one could be even more appealing due to the labile coordination sites and, in consequence, the propensity to form ternary complexes.^{9–13} This feature seems to be of great importance for selective recognition of biomolecules such as anions.

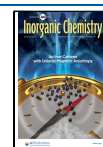
Recently, we demonstrated that a Cu(II) complex with an N-truncated $A\beta$ analogue $A\beta_{5-9}$ (Arg–His–Asp–Ser–Gly–NH₂, where –NH₂ stands for C-terminal amidation) is a promising molecular receptor for phosphates at physiological conditions.¹⁴ In this complex, Cu(II) is bound to the N-

terminal amine, the imidazole of His2, and the intervening deprotonated amide N[–], forming a 3N complex with the fourth labile equatorial position that could be occupied by a water molecule, a buffer molecule, or another peptide group.¹² We proved that phosphates could replace the water molecule in the 3N Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ complex, where the Arg1 side chain stabilizes the interaction between phosphates and the complex by intermolecular forces.

The activity of peptides and proteins with the His-2 motif has been related to their Cu(II) complexes, with GHK as the most notable case.^{15,16} In contrast, nickel is considered mostly a toxic metal for the human body, and therefore, Ni(II) complexes of the His-2 peptides have been less studied. Ni(II)–peptide complexes generally are characterized by a higher pK of the metal-driven amide deprotonation compared to their Cu(II) counterparts, and consequently, the complexation processes are shifted to higher pH. Additionally, Ni(II) complexes exhibit high-spin/low-spin equilibria. In complexes with the His-2 peptides, the high-spin, hexa-, or penta-

Received: October 21, 2021

Published: December 8, 2021



coordinated species prevail mostly at pH 6–7, while the low-spin complexes structurally analogous to Cu(II) species are generally formed at higher pH values.^{17,18} These features can be expected to affect the properties of metal–peptide complexes as anion receptors. Moreover, the oxidation of the metal center for Ni(II) complexes is expected to occur at lower potentials than for the Cu(II)–peptide complexes^{19,20} due to a smaller gain in the crystal field stabilization energy for the transition from d^8 Ni(II) to d^7 Ni(III) compared to the transition from d^9 Cu(II) to d^8 Cu(III). Accordingly, it could improve the recognition of a given analyte by the metal–peptide receptor in electrochemical biosensors. Thus, we decided to explore the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex to improve the recognition of phosphates by the His-2 complexes.

In this work, we investigated Ni(II) coordination to $A\beta_{5-9}$ and the electrochemical properties of the resulting complexes. Next, we explored the ability of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ to bind biologically relevant anions, including phosphates and nucleotides, with a focus on the redox properties of such ternary systems. On this basis, we determined the sensitivity and selectivity of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex toward selected analytes. Potentiometry and spectroscopy [UV–vis and circular dichroism (CD)] were employed to describe the structures and stabilities of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ binary complexes, while their redox properties and the effects of anions were investigated by voltammetry [cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV)].

■ EXPERIMENTAL METHODS

Chemicals and Reagents. Fmoc amino acids were purchased from Novabiochem. The TentaGel S RAM resin was obtained from RAPP Polymere. Diethyl ether was purchased from Chempur. Acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were received from Avantor and Merck, respectively. Potassium nitrate, nitric acid, hydrochloric acid, potassium hydroxide, sodium hydroxide, nickel(II) chloride hexahydrate (99.999% trace-metal basis), sodium chloride, sodium acetate anhydrous, sodium phosphate monobasic, adenosine 5′-monophosphate (AMP) sodium salt, cytidine 5′-monophosphate (CMP) disodium salt, uridine 5′-monophosphate (UMP) disodium salt, adenosine 5′-triphosphate (ATP) disodium salt, cytidine 5′-triphosphate (CTP) disodium salt, and uridine 5′-triphosphate (UTP) trisodium salt dihydrate were received from Sigma-Aldrich. Nickel(II) nitrate hexahydrate (purity 99.999%) and dimethylformamide were purchased from Carl Roth. Sodium sulfate anhydrous was supplied by Fluka. All solutions were prepared daily with deionized water (the resistivity was 18 M Ω ·cm) passed through an Arium mini Lab Water System (Sartorius). In order to prevent nucleotide hydrolysis, the pH of each stock solution was adjusted to 7.0–7.4 and the stock solutions were kept on ice during experiments. The glassware was rinsed with 6 M HNO₃, followed by deionized water before use to avoid metal ion contamination.

Peptide Synthesis. The $A\beta_{5-9}$ peptide (Arg–His–Asp–Ser–Gly–NH₂) was synthesized on a Prelude peptide synthesizer (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ) according to the Fmoc strategy.²¹ The peptide crude was purified by HPLC on a Breeze system (Waters) equipped with a Vydac semipreparative column (5 mm particle size, 10 × 250 mm). The mobile phase was a linear gradient of solution B [0.1% (v/v) TFA/90% (v/v) acetonitrile/9.9% (v/v) water] in solution A [0.1% (v/v) TFA/99.9% (v/v) water]. The purity of the lyophilized peptide was verified by a Q-ToF Premier mass spectrometer (Waters) exhibiting correct molecular masses.

Potentiometric Titrations. Potentiometric titration of the $A\beta_{5-9}$ peptide and its Ni(II) complexes was performed on a 907 Titrand automatic titrator (Metrohm, Herisau, Switzerland) using a Biotrode combined glass electrode (Metrohm, Herisau, Switzerland) calibrated daily by nitric acid titrations. 100 mM NaOH (carbon dioxide-free)

was used as a titrant. 1.5 mL samples were prepared in a 96 mM KNO₃/4 mM HNO₃ solution. Complex formation was studied using 1:0.33, 1:0.45, and 1:0.9 peptide-to-Ni(II) molar ratios. All experiments were performed under argon at 25 °C in the pH range of 2.7–11.5. The obtained data were analyzed using the SUPERQUAD and HYPERQUAD programs.^{22,23}

UV–Vis and CD Titrations. The pH-metric titrations were recorded at 25 °C on a Varian Cary 50 spectrophotometer (Agilent) over the spectral range 200–900 nm and on a J-815 CD spectropolarimeter (JASCO) covering the spectral range of 228–850 nm with a 1 cm-path quartz cuvette (Helma). NiCl₂ solution was added to the samples to reach a 1:0.9 peptide-to-metal ratio. Titrations were performed in water by adding small amounts of concentrated NaOH solution. The pH stability was checked for each titration point and adjusted with small amounts of concentrated NaOH or HCl solutions. Dilutions were included in the calculations.

Voltammetric Experiments. Electrochemical measurements were performed using a CHI 1030 potentiostat (CH Instrument, Austin, USA) in a three-electrode arrangement: glassy carbon electrode (GCE, BASi, $\varnothing$ = 3 mm) as the working electrode, an Ag/AgCl, 3 M KCl electrode (MINERAL, Poland) as the reference (electrolytic bridge filled with 100 mM KNO₃), and a platinum wire as the counter electrode (MINERAL, Poland). The working electrode was sequentially polished with 1.0 μ m and 0.3 μ m alumina powder on a polishing cloth to the mirror-like surface, followed by 1 min ultrasonication in deionized water. All electrochemical measurements were carried out in 100 mM KNO₃ at room temperature under an argon atmosphere. The concentration of peptide was 0.5 mM, whereas the Ni(NO₃)₂ solution was added to the samples to obtain a 1:0.9 peptide/Ni(II) molar ratio to avoid Ni(OH)₂ precipitation.

The concentration of anions (in selectivity tests) and nucleotides was 10-fold higher than the initial concentration of the peptide. The pH was adjusted by adding small amounts of concentrated KOH or HNO₃ solutions and controlled using a SevenCompact pH meter (Mettler-Toledo) with an InLab Micro Pro combination pH electrode (Mettler-Toledo). The applied techniques were CV and DPV. During CV measurements, various scan rates (v) were applied, whereas the following parameters were used in DPV: a pulse amplitude of 0.05 V, a pulse width of 0.1 s, a sample width of 0.005 s, and a pulse period of 1 s.

■ RESULTS AND DISCUSSION

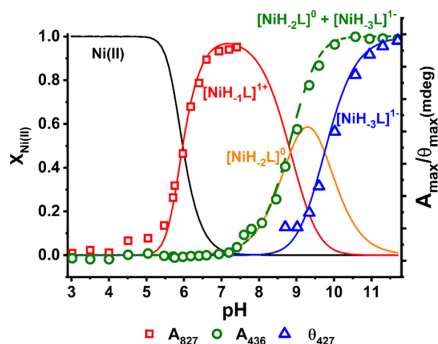
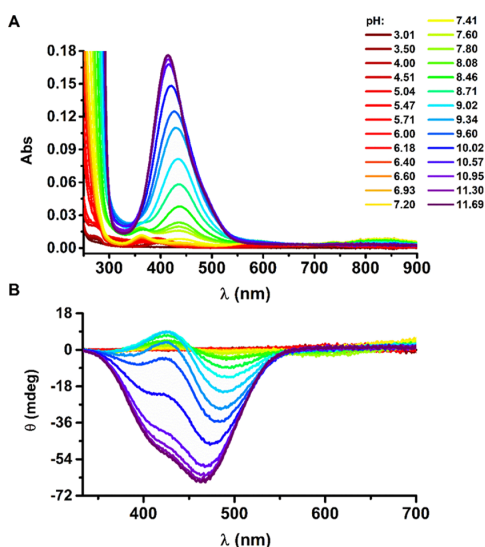
Coordination of $A\beta_{5-9}$ by Ni(II). A set of potentiometric titrations of the $A\beta_{5-9}$ peptide in the absence and in the presence of Ni(II) ions were performed to determine the stability of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complexes. The values of cumulative protonation constants (given as logarithms of cumulative association constants $\log \beta$) and the respective values of stepwise constants (given as negative logarithms of stepwise acidic dissociation constants pK_a) for the $A\beta_{5-9}$ peptide are collected in Table 1. These values are in agreement with a previous determination.¹² As described in Table 1 in a descending order, they are associated with the protonation/deprotonation of the N-terminal amine, the imidazole ring of His2, and the carboxyl group of Asp3.

In the next step, we calculated the stability constants of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complexes. Their values for the most reliable coordination model are depicted in Table 1, whereas the respective species distribution is shown in Figure 1. We distinguished three major species. The formation of the first one, $[NiH_1L]^+$, started at a pH around 5 and reached a maximum at a physiological pH around 7.4. The second one, $[NiH_2L]^0$, appeared at a pH above 7, followed by $[NiH_3L]^{1-}$ that emerged at a pH above 8.5. The applied model of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ coordination was further verified by CD and UV–vis titration results derived from spectra that are shown in Figure 2. The pH dependence of absorbance at characteristic

Table 1. Cumulative Protonation and Stability Constants ($\log \beta$) and Stepwise Constant (pK_a) Values for $A\beta_{5-9}$ (L) and Its Ni(II) Complexes at $I = 0.1$ M (KNO_3) and $25^\circ C$ ^a

species	$\log \beta^b$	pK_a	assignment	coordination mode
$[HL]^{1+}$	7.37(1)	7.37	Arg1 N-term.	
$[H_2L]^{2+}$	13.51(1)	6.13	His-2	
$[H_3L]^{3+}$	16.67(1)	3.17	Asp3	
$[NiH_{-1}L]^{1+}$	-0.90(1)	5.96 ^c		3N $[N^{am}, N^-, N^{im}] + H_2O$
$[NiH_{-2}L]^0$	-9.74(1)	8.84		3N $[N^{am}, N^-, N^{im}] + OH^-$
$[NiH_{-3}L]^{1-}$	-19.49(1)	9.75		4N $[N^{am}, 3 N^-]$

^a K_a stands for an acidic dissociation constant. ^bFor a general species $Ni_pH_qL_r$, the stability constant β is defined as $\beta_{Ni_pH_qL_r} = [Ni_pH_qL_r] / ([Ni] \times [H^+]^q \times [L]^r)$. Standard deviations on the last digits provided by HYPERQUAD, given in parentheses, represent the statistical errors of constant determinations. Assignments are based on literature values.^{12,18,24} ^cCalculated based on the distribution diagram presented in Figure 1.

**Figure 1.** Species distribution calculated for 0.9 mM Ni(II) and 1.0 mM $A\beta_{5-9}$ using stability constants presented in Table 1, with selected spectroscopic parameters overlaid.**Figure 2.** UV-vis (A) and CD (B) spectra of titrations of 1.0 mM $A\beta_{5-9}$ and 0.9 mM $NiCl_2$ with NaOH coded with rainbow colors from red to purple, pH range: 3.0–11.7.

wavelengths was merged with the species distribution, as shown in Figure 1. Such a high degree of convergence of spectroscopic and potentiometric data confirms the proposed coordination model. It also allowed us to estimate the spectroscopic parameters for individual complexes given in Table 2 (see also spectral patterns in Supporting Information, Figure S1).

Table 2. Spectroscopic Parameters of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ Complexes

species	UV-vis λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$)	CD λ_{ext}/nm ($\Delta\epsilon/M^{-1} cm^{-1}$)
$[NiH_{-1}L]^{1+}$	827 (9.6)	
	586 (6.0)	235 (−3.30)
	363 (12.2)	
$[NiH_{-2}L]^0$	438 (135.6)	488 (−1.34)
		426 (0.19)
		464 (−2.20)
$[NiH_{-3}L]^{1-}$	415 (195.8)	415 (−1.64) sh ^a

^ash stands for a spectral shoulder.

We observed three low-intensity bands at UV-vis spectra for $[NiH_{-1}L]^{1+}$ at 363, 586, and 827 nm (Table 2, Figure 2A), significantly blue-shifted from those registered for Ni(II) aqua ions (without peptide) (see Supporting Information, Figure S1). It demonstrates that $[NiH_{-1}L]^{1+}$ is a high-spin, octahedral complex, where Ni(II) is bound to several nitrogen ligands.²⁵ Simultaneously, the $[NiH_{-1}L]^{1+}$ stoichiometry indicates that its formation was enabled by deprotonation of four peptide groups, including at least one that does not undergo deprotonation for the peptide alone at the studied pH range 2.7–11.7. Based on literature data,¹⁸ we propose that for $[NiH_{-1}L]^{1+}$, the Ni(II) ion is bound through the Arg1 N-terminal amine, His2 amide, and His2 imidazole nitrogen, forming a 3N complex ($3N [N^{am}, N^-, N^{im}] + H_2O$) with a deprotonated Asp3 carboxyl side chain. The remaining positions in the coordination sphere are likely occupied by a water molecule and also by the Asp3 carboxyl or the carbonyl oxygen.²⁶ The CD spectra (Table 2) reveal only one negative CT band at 235 nm described in the literature as the $N^{am} \rightarrow Ni(II)$ CT band (with a possible contribution of the imidazole nitrogen),²⁷ confirming the proposed coordination mode.

The subsequent deprotonation resulted in the formation of the $[NiH_{-2}L]^0$ species that caused major changes in UV-vis and CD spectral patterns (Figure 2). The position of d–d bands at 438 nm for UV-vis and at 426/488 nm for CD (the positive/negative band) suggests that $[NiH_{-2}L]^0$ is a low-spin, square-planar complex (see Table 2). This transition from a high-spin to a low-spin Ni(II) complex could be associated with the deprotonation of a water molecule, resulting in the ($3N [N^{am}, N^-, N^{im}] + OH^-$) complex. The metal ion-induced water deprotonation is a common feature in Ni(II) peptidic complexes.²⁸ It is also sufficient to trigger the spin transition.²⁵ The proposed coordination pattern is confirmed by the alternate pattern of d–d bands in the CD spectra, associated with the presence of the six-membered chelate ring enabled by His imidazole coordination next to the metal ion–peptide nitrogen bond in Cu(II) and Ni(II) complexes.^{17,29,30}

The $[NiH_{-3}L]^{1-}$ species occurs under the most alkaline conditions and causes further changes in CD spectra with two negative signals, a band at 464 nm and a shoulder at 415 nm, of much higher intensity compared to that of $[NiH_{-2}L]^0$, as well

as a 23 nm blue shift of the d–d band in the UV–vis spectra. The stoichiometry of this final complex associated with the change of sign of CD d–d bands to uniformly negative indicates the coordination of the Arg1 amine and three subsequent peptide nitrogens (His2, Asp3, and Ser4).^{31,32} It is a result of the pH-driven deprotonation of the second and the third amides and the removal of the imidazole of His2 from the Ni(II) coordination sphere with the formation of a 4N [N^{am}, 3N[–]] complex.

The ligand exchange kinetics of Ni(II) complexes, especially that associated with the spin transition, is usually a slow process, which requires the rearrangement of the electronic structure and ligand exchange.³³ Therefore, we checked the kinetics of the spin transition in the studied system. The UV–vis signals of Ni(II)/Aβ_{5–9} at pH 7.4 appeared just after reagent mixing/pH adjustment and were stable overnight (including the band of the low-spin complex at 438 nm), as shown in Supporting Information, Figure S2. Likewise, the pH change from 7.0 to 10.5 led to substantial changes in the UV–vis spectra immediately upon the pH adjustment, and only a slight increase of about 5% was noted during the overnight incubation (see Supporting Information, Figure S3). This confirms that the kinetics of the formation of low-spin Ni(II)–Aβ_{5–9} according to the applied procedure (with no external buffer but with the pH adjustment and pH control before each measurement) should not significantly alter our analysis.

Electrochemistry of Ni(II)–Aβ_{5–9} Binary Complexes. The cyclic voltammograms of Ni(II)–Aβ_{5–9} recorded at pH 7.4 are depicted in Figures S4 and S5 (Supporting Information) and in Figure 3 (red curves). As expected, no

mostly by deprotonated peptide nitrogens. Ni(II)–Aβ_{5–9} forms predominantly an octahedral complex at pH 7.4 with just a few percent of the [NiH₂L]⁰ square-planar species present in equilibrium. The high-spin complex requires a significant structural rearrangement on the pathway to Ni(III) as similar Ni(III)–peptide complexes are described as tetragonal with the approximately square-planar arrangement of coordinated peptide nitrogens.^{34,35} However, there are also known examples of Ni(III) square-pyramidal complexes formed by NiSOD-inspired peptides.³⁶ The Ni(III)–peptide species demonstrate pro-oxidative properties, often causing peptide oxidation^{37–39} and likely resulting in the almost irreversible Ni(II) oxidation for Ni(II)–Aβ_{5–9} at slower potential sweeps. Considering a slow electron transport in the Ni(II)/Ni(III) cycle and associated difficulties in the analysis of the CV data, the DPV technique was mainly used in further studies.

To fully characterize the redox properties of the binary complex, we analyzed the pH dependence of the Ni(II)–Aβ_{5–9} electrochemical signal (Figure 3A). The Ni(II) oxidation potentials for the individual species are provided in Table 3. As

Table 3. Oxidation Potential Values Determined from the DPV Curves of the Ni(II)–Aβ_{5–9} Complexes

Ni(II)–Aβ _{5–9}	E _{Ni(II)/Ni(III)} (V) vs Ag/AgCl ± SD
[NiH _{–1} L] ¹⁺	1.016 ± 0.008
[NiH _{–2} L] ⁰	0.790 ± 0.005
[NiH _{–3} L] ^{1–}	0.512 ± 0.012

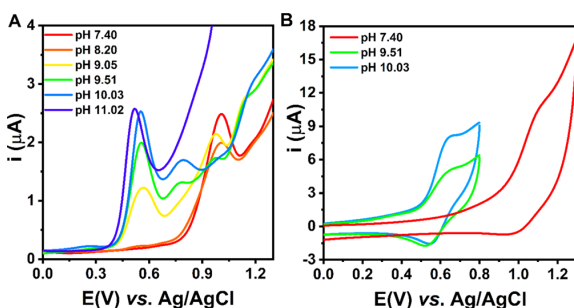


Figure 3. DPV (A) and selected CV (B) curves of the titration of Ni(II)–Aβ_{5–9} (0.9:1.0 ratio) with KOH, recorded in 100 mM KNO₃, scan rate: $\nu = 0.1$ V/s. The CV curves at pH 9–10 in panel B were recorded in a shorter potential range to avoid the effect of the other processes at high potentials on the Ni(III) reduction in the reverse scan.

electrochemical reduction of the complex metal center was observed (Figure S4). The CV curves recorded in the positive potential range showed the oxidation of Ni(II) at pH 7.4 with a very weak signal of Ni(III) reduction on the reverse scan (Figure 3B). An increase in the scan rate slightly intensified the Ni(III) reduction (see Supporting Information, Figure S5). However, the separation of anodic and cathodic peaks ($\Delta E_p = 90$ mV) indicates a slow electron transfer. In the literature, reversible or quasi-reversible Ni(II)/Ni(III) redox processes ($\Delta E_p = 83$ mV) were observed for ATCUN (His-3) complexes, or generally, for square-planar complex structures.¹⁹ They are associated with a strong stabilization of electrogenerated Ni(III) species in these chelates provided

pH increased above 7.4, the intensity of the signal related to the Ni(II)/Ni(III) couple (around 1.0 V vs Ag/AgCl) decreased. At a pH of about 9.5, we observed three independent peaks likely associated with the metal center oxidation in the three coordinating forms that coexisted in the mixture ([NiH_{–1}L]¹⁺, [NiH_{–2}L]⁰, and [NiH_{–3}L]^{1–}). At high alkaline pH values, only one peak appeared (around 0.5 V vs Ag/AgCl), in agreement with the predominant role of a square-planar (4N [N^{am}, 3N[–]]) system of (5-5-5)-membered chelate rings in Ni(II) coordination. A similar Ni(II) oxidation potential value (around 0.6 V vs Ag/AgCl) was reported for Ni(II) complexes of tetrapeptides consisting of glycine and alanine residues,²⁰ confirming the proposed coordination mode for the [NiH_{–3}L]^{1–} species of Ni(II)–Aβ_{5–9}. As demonstrated previously, such systems are most suitable to stabilize Ni(III) species.^{20,40} On the other hand, Bossu and Margerum showed that the contribution of histidine residues in the Ni(II) coordination and a reduced number of amide donors shifted the Ni(II) oxidation potential toward more positive values. For example, a shift to around 0.7 V versus Ag/AgCl was noticed for the ATCUN complexes due to the presence of a (5-5-6)-membered chelate ring and/or an occurrence of the π -back-bonding in addition to the σ -bonding between imidazole nitrogen and Ni(II) ions, while the shift to around 0.6–0.7 V versus Ag/AgCl was reported for tripeptides of noncoordinating side chains as a result of a lower number of amide groups that stabilize Ni(III) due to their stronger electron donor properties compared to amine or carboxylate groups.²⁰ Both these effects are also expected to increase the potential of Ni(II) oxidation for the [NiH_{–2}L]⁰ species of Ni(II)–Aβ_{5–9} compared to [NiH_{–3}L]^{1–}. Moreover, CV data indicate a quasi-reversible Ni(II) oxidation ($\Delta E_p = 77$ mV;

Figure 3B, a light-blue line), confirming the Ni(III) stabilization in the 4N chelate.

The observed shift of the Ni(II) oxidation toward less positive potentials for higher pH values is also consistent with an expected impact of the complex charge on the redox process. More negative charge of the complex should favor the electron release and, consequently, result in the lower potential of Ni(II) oxidation^{41,42} as observed for the studied Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ system (see Table 3).

Interactions with Phosphate Anions and Nucleotides.

Based on the potentiometric (Figure 1) and the voltammetric (Figure 3) results, the pH value of 7.4 was chosen for further studies due to its close resemblance to the physiological pH and the predominance of the octahedral form of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex that may possess more than one available analyte binding site. The investigation of the interaction between Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ and phosphate species by spectroscopic methods was very problematic due to the low intensity of the basal signal of the metal complex and small spectral changes in the course of the titration with phosphates, as shown in Supporting Information, Figure S6. These results suggest a very weak interaction (with the estimated K_a about $16 \pm 5 \text{ M}^{-1}$), even weaker than those reported between phosphates and Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ (K_a about 50 M^{-1}).¹⁴ However, in the previous paper, we showed that electrochemical methods could be very useful in the studies of similar systems¹⁴ as the redox activity could be triggered even by small changes in the coordination sphere. Therefore, we mostly employed CV and DPV techniques in this work to check if phosphates could also alter Ni(II)/Ni(III) oxidation.

We started with a titration of the binary Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex with phosphate solution, monitoring changes in DPV signals (Figure 4A). As the $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ concentration

the other hand, the most extensive changes were observed up to 5 mM of phosphates (see also Supporting Information, Figure S7), which is consistent with the limit value of the reported intracellular range of phosphate concentration of 0.5–5 mM.⁴⁴ As such, the pattern of the response of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ to phosphates is very promising for the phosphate sensing in the cell by the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex.

Continuing the studies on the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex as the potential molecular receptor, we also analyzed the response of the studied binary system toward selected anionic species. Therefore, we performed DPV measurements for the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ solution containing interfering physiological and environmental anions (Figure 4B). The noteworthy changes for the Ni(II) oxidation signal were observed only in the presence of acetate and phosphate anions (Figure 4B, a green line and a blue line, respectively); for about a 20-fold excess of the anions over Ni(II)– $A\beta_{5-9}$, the Ni(II) oxidation potential decreased by 70 mV after the addition of acetate and even more, by 160 mV, for phosphate (see Supporting Information, Table S1). Nevertheless, the electrochemical response registered in a mixture of all tested anions (phosphate, chloride, sulfate, and acetate) indicated a significant selectivity toward the phosphate (Figure 4B, a cyan line).

The selectivity of receptors designed for phosphate anion recognition remains problematic, especially for inorganic phosphates over phosphorylated biomolecules. Thus, we tested the effect of the addition of various nucleotides on Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ redox properties. As nucleotides are electroactive species,⁴⁵ we examined molecules whose oxidation potential is higher than 1.0 V (vs Ag/AgCl) at pH 7.4. We rejected the guanosine phosphates based on these criteria and chose adenosine, cytidine, and uridine phosphates for further studies.

It is well known from the literature that nucleotides coordinate metal ions. For complexes of all types of nucleotides, the metal ion is bound via the most basic terminal phosphate group and also in the purine nucleotides partially by nitrogen (N7) of the purine moiety.⁴⁶ The control DPV curves for the respective Ni(II)–nucleotide binary systems did not yield peaks in the potential range from 0.5 to 1.0 V, and the only signals visible at the potential higher than 1.2 V were related to the nucleobase oxidation (see the DPV curves obtained for ATP in the absence and presence of Ni(II) ions in Supporting Information, Figure S8). Hence, this proved that the voltammetric signal observed around 0.8–1.0 V for the ternary system with nucleotides was not associated with the redox process of the binary Ni(II)–nucleotide complex.

The presence of nucleotides in the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ solution shifted the oxidation peak toward less positive potentials (Figure 5). It could be associated with the destabilization of the Ni(II) complex structure and the stabilization of the electrogenerated Ni(III) form in a ternary system facilitated by electrostatic and stacking interactions between the His imidazole ring and the nucleobase.⁴⁷ However, in contrast to the previous study,¹⁴ the signal in the DPV curves occurred at different potentials for mono- and triphosphates (but only a slight shift of oxidation peak toward less positive potentials was observed with an increase of the AMP concentration from 10 mM to 30 mM). This can be explained by the ability of octahedral Ni(II) to interact with more than one nucleotide phosphate group due to the possible chelating effect and preference for phosphates over nucleobase nitrogens,⁴⁸ in contrast to the more rigid four-coordinate planar structure of Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ complexes.

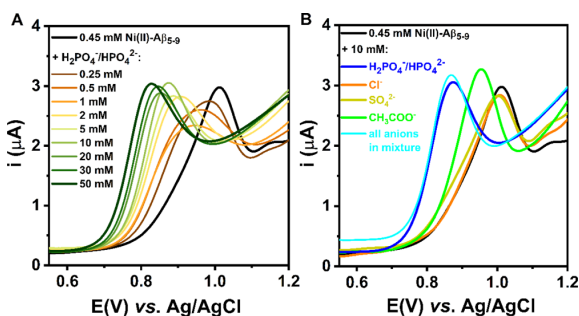


Figure 4. DPV curves of the titration of 0.45 mM Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ (0.9:1.0 ratio) with $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (A) and DPV curves obtained for 0.45 mM Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ alone and after the addition of 10 mM of selected anions (B), recorded in 100 mM KNO_3 at pH 7.4.

increased, the oxidation peak of the Ni(II)/Ni(III) couple successively shifted toward less positive values. At the end of the titration, for about a 100-fold excess of phosphate over Ni(II)– $A\beta_{5-9}$, the oxidation signal occurred at a potential lower by ca. 175 mV than that of the source Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex. The large facilitation of the Ni(II)/Ni(III) redox process in the presence of phosphate species illustrates that the phosphate buffer used routinely in many experiments in the concentration range of 20–100 mM could drastically impact the results and analysis (e.g., during the investigation of an extracellular process in a 50 mM phosphate buffer, whereas the extracellular phosphate concentration is about 1 mM⁴³). On

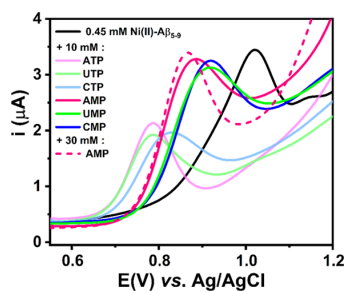


Figure 5. DPV curves obtained for 0.45 mM Ni(II)–Aβ_{5–9} alone (a black curve), after the addition of 10 mM nucleoside monophosphates (pink, blue, and green curves) or nucleoside triphosphates (faded pink, blue, and green curves), and after the addition of 30 mM adenosine monophosphate (a dashed pink curve). The measurements were done in 100 mM KNO₃ at pH 7.4.

In accordance with the above considerations, the most facilitated ($\Delta E_{\text{ox}} \sim 240$ mV) Ni(II) oxidation process was noticed for ternary systems with nucleoside triphosphates (see [Supporting Information](#), Table S1). This feature was evident for the obtained CV curves that showed a more reversible Ni(II)/Ni(III) redox process in the presence of nucleoside triphosphates (see [Supporting Information](#), Figure S9). In addition, a signal intensity decrease observed after the triphosphate addition may be the result of slower diffusion of the complex to the electrode surface due to the increased size of the chelate.

Comparison with the Ni(II) Complexes of Other His-2 Peptides. We compared the properties of the Ni(II)–Aβ_{5–9} complex to the literature data of Ni(II) complexes of His-2 peptides. However, it was not straightforward due to multiple binding models, different stoichiometries, and the formation of multimeric species proposed for these systems. Therefore, we calculated a pNi parameter according to the following equation

$$\text{pNi} = -\log C_{\text{Ni(II)}}$$

where $C_{\text{Ni(II)}}$ is the concentration of Ni(II) aqua ions.

The simulation was performed by the Hyss software⁴⁹ for 1 mM Ni(II), 1–5 mM peptide, and pH 7.4 (see [Figure 6](#)). The pNi values for the Ni(II)/Aβ_{5–9} system are in the middle of pNi values estimated for the previously studied Ni(II)/peptide system. Aβ_{5–9} has been found to have a higher affinity to

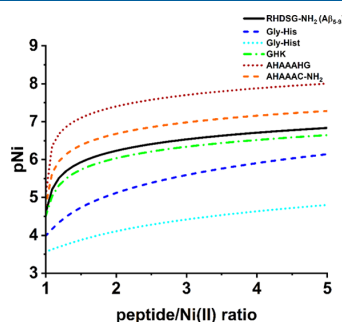


Figure 6. Dependence of pNi values on the peptide/Ni(II) molar ratio for different peptides calculated for 1 mM Ni(II) and 1–5 mM peptide at pH 7.4 based on potentiometric results obtained in this work for Aβ_{5–9} and published previously.^{18,24,28,50,52} Hist stands for histamine.

Ni(II) ions compared to dipeptides (Gly–His and Gly–Hist),^{28,50} very similar to that of the tripeptide GHK,¹⁸ and lower than longer peptides with additional Ni(II) binding sites provided by further His or Cys residues.^{24,51} For all of them, the primary Ni(II) binding sites are believed to occur at the N-terminus composed of the N-terminal amine, the His2 amide, and the His2 imidazole forming the 3N complex. However, other than 1:1 stoichiometries have been proposed especially for shorter peptides due to the formation of oligomeric Ni(II):peptide species.^{18,28,43} The model proposed by us for Ni(II)/Aβ_{5–9} does not include multimeric species as their implementation did not improve the fitting. In accordance, the UV–vis titration of 0.9 mM Ni(II)/1 mM Aβ_{5–9} with the Aβ_{5–9} peptide did not show clear signs of such species (see [Supporting Information](#), Figure S10). The addition of the peptide caused an increase in the intensity of the Ni(II) complex bands, but it was correlated with the general rise in neighboring signals of the high-intensity bands in the UV region due to the higher peptide concentration. Overall, we could not exclude the presence of multimeric species for Ni(II)/Aβ_{5–9}, but their stability (if they exist) would be very low. Moreover, the presence of positively charged Arg1 should successfully hinder the interaction with other peptide molecules.

Finally, the highest pNi values were observed for the AHAAAHG/AHAAAC-NH₂ peptides.^{24,51} The presence of another His/Cys residue at the C-terminus of AHAAAHG/AHAAAC-NH₂ peptides indeed increased the affinity to Ni(II) ions compared to Aβ_{5–9} or GHK. However, this amplification resulted likely from the interaction typical for His-2 peptides 3N chelating with the His/Cys residue further. Such interactions are not favored for our system as 3N [N^{am}, N[–], N^{im}] + H₂O is supposed to interact with phosphate and not compete with other groups of the peptide.

As such, the sequence of Aβ_{5–9} provides beneficial features compared to other peptides bearing the His-2 motif for its application as a Ni(II) complex in the receptor system of the sensor for the phosphate species. The Ni(II) affinity of Aβ_{5–9} should ensure a robust anchoring site for Ni(II) ions. On the other hand, the 3N [N^{am}, N[–], N^{im}] + H₂O species of the Ni(II)/Aβ_{5–9} complex, the core of the potential recognition of phosphates, is less susceptible to interaction with other peptide-derived groups of the intermolecular (as for Gly–His, Gly–Hist and also GHK at a slightly higher pH) or intramolecular character (as for peptides containing His/Cys residues at further positions).

Effect of Altering the Metal Center of the Aβ_{5–9} Complex. At pH 7.4, the conditional stability constant of the Ni(II)–Aβ_{5–9} complex for 1 mM concentrations of reagents ($K^c = 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) is more than 5 orders of magnitude lower than for Cu(II)–Aβ_{5–9} ($K^c = 5.8 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$). As such, the peptide Aβ_{5–9} would primarily form complexes with Cu(II) ions for the equimolar amounts of Cu(II)/Ni(II)/Aβ_{5–9} at pH 7.4 and generally at pH higher than 3.6, as calculated based on the potentiometric constants (see [Supporting Information](#), Figure S11). Also, we checked the kinetics of the ligand exchange between Cu(II) and Ni(II) complexes adding an equimolar amount of Cu(II) ions to the Ni(II)–Aβ_{5–9} complex at pH 7.4. As shown in [Supporting Information](#), Figure S12, the transfer was accomplished within the mixing time and the time of pH adjustment, confirming the dominance of Cu(II) complexes in the analyzed mixture.

On the other hand, the binding of Ni(II) to $A\beta_{5-9}$ was strong enough to prevent the $Ni(OH)_2$ precipitation noticed for other biomolecules, such as isomers of urocanic acid or peptide models of the prion protein.^{53,54} Thus, the stability of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex should be sufficient for its employment as a receptor for molecules of low Ni(II) affinity (such as phosphates).

Considering the electrochemical behavior of the studied system, the change of the metal center in the $A\beta_{5-9}$ complex from Cu(II) to Ni(II) facilitated the oxidation of the metal center (Table 4) due to different geometries and stabilities of

Table 4. Comparison of the Oxidation Potential Values $E_{M(II)/M(III)}$ at pH 7.4 Determined from DPV Curves of Binary Ni(II)/Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ Complexes Alone and in the Presence of 10 mM Phosphates

studied complex	$E_{M(II)/M(III)}$ (V) vs Ag/AgCl $\pm$ SD		ΔE_{ox} (mV) ^a
	binary complex	binary complex + 10 mM phosphates	
Ni(II)– $A\beta_{5-9}$	1.016 $\pm$ 0.008	0.860 $\pm$ 0.002	–160
Cu(II)– $A\beta_{5-9}$	1.204 $\pm$ 0.005	1.056 $\pm$ 0.006	–150

^a ΔE_{ox} is the difference in the potential values in mV of Cu(II) or Ni(II) oxidation of the ternary system with phosphates and the binary complex round to the nearest tens.

the complexes. This effect favors the application of the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex in the receptor layer of an electrochemical biosensor. However, changes in the electrochemical response of such a complex upon phosphate anions addition were similar to those obtained for Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ (see Supporting Information, Figure S7 and Table 4). Thus, the sensitivity of anion recognition of both chelates is comparable. These results are related to similar Lewis acidities of Cu(II) and Ni(II) and suggest that despite potentially accessible axial sites in the Ni(II) complex, the phosphate anion's favorable binding site is the equatorial position in the coordination sphere of the metal.

Nevertheless, an enhanced affinity for chloride and sulfate anions was observed for the Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex, which may be caused by the increased impact of electrostatic effects on the octahedral geometry of the binary complex (Figure 7).

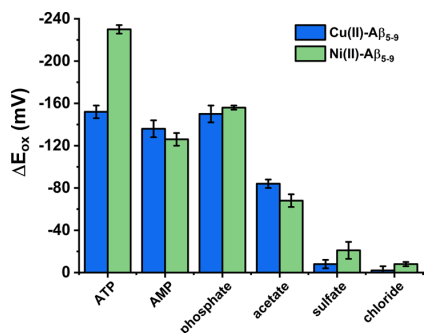


Figure 7. Comparison of selectivity of phosphate anion recognition at pH 7.4 between Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ and a Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ complex described previously.¹⁴ ΔE_{ox} is the difference in the potential values of Cu(II) or Ni(II) oxidation of the respective ternary system and the binary complex. Concentrations of reagents: 0.5 mM $A\beta_{5-9}$, 0.45 mM Cu(II) or Ni(II), and 10 mM anions or nucleotides.

The most significant difference in receptor properties of Cu(II)–/Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ is reflected in the interactions between nucleotides and the studied complexes. Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ is a square-planar Jahn–Teller distorted complex. Thus, it has a strong tendency to coordinate ligands in the equatorial position and prefer an interaction with the nucleotide's most basic phosphate group, which resulted in a similar oxidation peak potential of Cu(II)– $A\beta_{5-9}$ after AMP and ATP addition (Figure 7).¹⁴ The accompanying intermolecular forces, such as stacking interactions, will be preferred in the high-spin Ni(II)– $A\beta_{5-9}$. The presence of the oxidation peak at a similar potential upon the addition of the same amount of phosphate anions and monophosphate nucleosides but at different potentials upon the addition of the same amount of triphosphates suggests a strong dependence of the Ni(II) oxidation potential on the number of phosphate groups in the phosphate species. Moreover, the signal related to Ni(II)/Ni(III) in that ternary system with $A\beta_{5-9}$ occurs at the same potential value for pyrimidine and purine nucleotides, indicating irrelevance of the nucleobase type in such interactions.

Biological Relevance. The facilitated Ni(II) oxidation of Ni(II) complexes of His-2 peptides in the presence of phosphates could also be very important for nickel toxicity. As phosphates are an integral part of the DNA structure, the DNA phosphate groups could attract the Ni(II) complexes of the His-2 peptides, increase the oxidative stress level provided by the Ni(II)/Ni(III) couple, and, in consequence, assist in the DNA cleavage. Previously, oxidative DNA cleavage was described mainly in the presence of Ni(II) complexes of His-3 peptides.^{55–57} The Ni(II) oxidation potential of such complexes was reported at about 0.7–0.9 V versus Ag/AgCl^{20,34,58} and was much lower than that of Ni(II) high-spin complexes with the His-2 peptides (about 1.0 V versus Ag/AgCl at pH 7.4). As shown by us, the interaction with phosphate could decrease the oxidation potential of the Ni(II) complexes of the His-2 peptides even to 0.8 V versus Ag/AgCl at pH 7.4. This value was reported for the known DNA cleavage catalysts – Ni(II) complexes of the His-3 peptides. The oxidative activity of Ni(II) complexes of the His-2 peptides has to be further proven by appropriate methods. However, the results obtained by us could be vital for studies of nickel toxicology.

CONCLUSIONS

The Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ complex offers beneficial features as a potential receptor of phosphate anions. The sequence of the peptide with a histidine residue at the second position and with no further Ni(II)-binding sites should ensure a relatively strong Ni(II) binding (anchored at the His2 residue) with labile coordination sites eager to interact with phosphates. Such an interaction prompts a strong electrochemical response that could be valuable for phosphate sensing, including the detection of phosphate groups in more complex structures such as nucleotides.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.1c03285>.

Spectra of particular Ni(II) species; kinetic measurements of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ formation; CV curves recorded in the Ni(II)/ $A\beta_{5-9}$ mixture toward negative values and

toward more positive values at different scan rates; UV–vis titration of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ with phosphates; comparison of the oxidation potentials for Ni(II) and Cu(II) complexes of $A\beta_{5-9}$; DPV curves for ATP and Ni(II)/ATP mixtures; CV curves of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ in the presence of nucleoside monophosphates and nucleoside triphosphates; UV–vis titration of Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ with $A\beta_{5-9}$; theoretical ligand distribution in the mixture of $A\beta_{5-9}$ /Ni(II)/Cu(II); competition experiment between Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ and Cu(II) ions; and oxidation potential values for Ni(II)– $A\beta_{5-9}$ in the presence of selected anions and nucleotides (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Aleksandra Tobolska – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-664, Poland; Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Warsaw 02-093, Poland; orcid.org/0000-0002-4643-7000; Email: atobolska@ch.pw.edu.pl

Nina E. Wezynfeld – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-664, Poland; orcid.org/0000-0002-6206-4195; Email: nwezynfeld@ch.pw.edu.pl

Authors

Urszula E. Wawrzyniak – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-664, Poland

Wojciech Bal – Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw 02-106, Poland; orcid.org/0000-0003-3780-083X

Wojciech Wróblewski – Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw 00-664, Poland; orcid.org/0000-0002-2806-4220

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.inorgchem.1c03285>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been financially supported by the Warsaw University of Technology under the program Excellence Initiative, Research University (ID-UB), BIOTECHMED-1 project no. PSP 504/04496/1020/45.010407 and implemented as a part of the Operational Program Knowledge Education Development 2014-2020 (project no. POWR.03.02.00-00-1007/16-00) cofinanced by the European Social Fund (A.T.). We gratefully acknowledge the assistance of Dawid Plonka (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences) in peptide synthesis.

REFERENCES

- (1) Sívagó, I.; Várnagy, K.; Lihi, N.; Grenács, Á. Coordinating Properties of Peptides Containing Histidyl Residues. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *327*–328, 43–54.
- (2) Gonzalez, P.; Bossak, P.; Stefaniak, E.; Hureau, C.; Raibaut, L.; Bal, W.; Faller, P. N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications. *Chem.—Eur. J.* **2018**, *24*, 8029–8041.
- (3) Bouraguba, M.; Glattard, E.; Naudé, M.; Pelletier, R.; Aisenbrey, C.; Bechinger, B.; Raibaut, L.; Lebrun, V.; Faller, P. Copper-Binding Motifs Xxx-His or Xxx-Zzz-His (ATCUN) Linked to an Antimicrobial Peptide: Cu-Binding, Antimicrobial Activity and ROS Production. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *213*, 111255.
- (4) Torrado, A.; Walkup, G. K.; Imperiali, B. Exploiting Polypeptide Motifs for the Design of Selective Cu(II) Ion Chemosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 609–610.
- (5) Agbale, C. M.; Cardoso, M. H.; Galyuon, I. K.; Franco, O. L. Designing Metallodrugs with Nuclease and Protease Activity. *Metallomics* **2016**, *8*, 1159–1169.
- (6) Miyamoto, T.; Fukino, Y.; Kamino, S.; Ueda, M.; Enomoto, S. Enhanced Stability of Cu²⁺-ATCUN Complexes under Physiologically Relevant Conditions by Insertion of Structurally Bulky and Hydrophobic Amino Acid Residues into the ATCUN Motif. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 9436–9445.
- (7) Hureau, C.; Sasaki, I.; Gras, E.; Faller, P. Two Functions, One Molecule: A Metal-Binding and a Targeting Moiety to Combat Alzheimer's Disease. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 950–953.
- (8) Harford, C.; Sarkar, B. Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 123–130.
- (9) Kotuniak, R.; Frączyk, T.; Skrobecki, P.; Plonka, D.; Bal, W. Gly-His-Thr-Asp-Amide, an Insulin-Activating Peptide from the Human Pancreas Is a Strong Cu(II) but a Weak Zn(II) Chelator. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 15507–15516.
- (10) Bossak, K.; Mital, M.; Poznański, J.; Bonna, A.; Drew, S.; Bal, W. Interactions of α -Factor-1, a Yeast Pheromone, and Its Analogue with Copper(II) Ions and Low-Molecular-Weight Ligands Yield Very Stable Complexes. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 7829–7831.
- (11) Bossak-Ahmad, K.; Wiśniewska, M. D.; Bal, W.; Drew, S. C.; Frączyk, T. Ternary Cu(II) Complex with GHK Peptide and Cis-Urocanic Acid as a Potential Physiologically Functional Copper Chelate. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6190.
- (12) Wezynfeld, N. E.; Tobolska, A.; Mital, M.; Wawrzyniak, U. E.; Wiloch, M. Z.; Plonka, D.; Bossak-Ahmad, K.; Wróblewski, W.; Bal, W. $A\beta_{5-9}$ -x Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 14000–14011.
- (13) Hureau, C.; Eury, H.; Guillot, R.; Bijani, C.; Sayen, S.; Solari, P.-L.; Guillon, E.; Faller, P.; Dorlet, P. X-ray and Solution Structures of Cu^{II}GHK and Cu^{II}DAHK Complexes: Influence on Their Redox Properties. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 10151–10160.
- (14) Tobolska, A.; Wezynfeld, N. E.; Wawrzyniak, U. E.; Bal, W.; Wróblewski, W. Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 2726–2730.
- (15) Pickart, L.; Margolina, A. Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1987.
- (16) Pickart, L.; Thaler, M. M. Tripeptide in Human Serum Which Prolongs Survival of Normal Liver Cells and Stimulates Growth in Neoplastic Liver. *Nat. New Biol.* **1973**, *243*, 85–87.
- (17) Kozłowski, H.; Bal, W.; Dyba, M.; Kowalik-Jankowska, T. Specific Structure-Stability Relations in Metallopeptides. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 319–346.
- (18) Conato, C.; Kozłowski, H.; Swiatek-Kozłowska, J.; Młynarz, P.; Remelli, M.; Silvestri, S. Formation Equilibria of Nickel Complexes with Glycyl-Histidyl-Lysine and Two Synthetic Analogues. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 153–160.
- (19) Neupane, K. P.; Aldous, A. R.; Kritzer, J. A. Metal-Binding and Redox Properties of Substituted Linear and Cyclic ATCUN Motifs. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *139*, 65–76.
- (20) Bossu, F. P.; Margerum, D. W. Electrode potentials of nickel(III)- and nickel(II)-peptide complexes. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 1210–1214.
- (21) Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press: New York, 2000; pp 41–76.

- (22) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. SUPERQUAD: An Improved General Program for Computation of Formation Constants from Potentiometric Data. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 6, 1195–1200.
- (23) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, 43, 1739–1753.
- (24) Grenács, Á.; Kaluha, A.; Kállay, C.; Józai, V.; Sanna, D.; Sóvágó, I. Binary and Ternary Mixed Metal Complexes of Terminally Free Peptides Containing Two Different Histidyl Binding Sites. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 128, 17–25.
- (25) Kurzak, B.; Bal, W.; Kozłowski, H. Nickel(II) Complexes of Hydroxamic Analogues of Aminoacids. *J. Inorg. Biochem.* **1990**, 38, 9–16.
- (26) Kozłowski, H.; Lebkiri, A.; Onindo, C. O.; Pettit, L. D.; Galey, J.-F. The Influence of Aspartic or Glutamic Acid Residues in Tetrapeptides on the Formation of Complexes with Nickel(II) and Zinc(II). *Polyhedron* **1995**, 14, 211–218.
- (27) Bal, W.; Jeżowska-Bojczuk, M.; Kasprzak, K. S. Binding of Nickel(II) and Copper(II) to the N-Terminal Sequence of Human Protamine HP2. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 906–914.
- (28) Gajda, T.; Henry, B.; Delpuech, J.-J. Potentiometric and Spectroscopic Study of Nickel(II) and Cobalt(II) Complexes of Histamine-Containing Dipeptides. *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2455–2460.
- (29) Kurowska, E.; Bonna, A.; Goch, G.; Bal, W. Salivary Histatin-5, a Physiologically Relevant Ligand for Ni(II) Ions. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, 105, 1220–1225.
- (30) Zawisza, I.; Mital, M.; Polkowska-Nowakowska, A.; Bonna, A.; Bal, W. The Impact of Synthetic Analogs of Histidine on Copper(II) and Nickel(II) Coordination Properties to an Albumin-like Peptide. Possible Leads towards New Metallodrugs. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, 139, 1–8.
- (31) Pettit, L. D.; Pyburn, S.; Kozłowski, H.; Decock-Le Reverend, B.; Liman, F. Co-Ordination of Nickel(II) Ions by Angiotensin II and Its Peptide Fragments. A Potentiometric, Proton Nuclear Magnetic Resonance and Circular Dichroism Spectroscopic Study. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1989**, 8, 1471–1475.
- (32) Sigel, H.; Martin, R. B. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chem. Rev.* **1982**, 82, 385–426.
- (33) Bannister, C. E.; Raycheba, J. M. T.; Margerum, D. W. Kinetics of Nickel(II) Glycylglycyl-L-Histidine Reactions with Acids and Triethylenetetramine. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 1106–1112.
- (34) Maiti, B. K.; Govil, N.; Kundu, T.; Moura, J. J. G. Designed Metal-ATCUN Derivatives: Redox- and Non-Redox-Based Applications Relevant for Chemistry, Biology, and Medicine. *iScience* **2020**, 23, 101792.
- (35) Lappin, A. G.; Murray, C. K.; Margerum, D. W. Electron Paramagnetic Resonance Studies of Nickel(III)-Oligopeptide Complexes. *Inorg. Chem.* **1978**, 17, 1630–1634.
- (36) Domergue, J.; Guinard, P.; Douillard, M.; Pécaut, J.; Proux, O.; Lebrun, C.; Le Goff, A.; Maldivi, P.; Delangle, P.; Duboc, C. A Bioinspired NiII Superoxide Dismutase Catalyst Designed on an ATCUN-like Binding Motif. *Inorg. Chem.* **2021**, 60, 12772–12780.
- (37) Wezynfeld, N. E.; Bonna, A.; Bal, W.; Frączyk, T. Ni(II) Ions Cleave and Inactivate Human Alpha-1 Antitrypsin Hydrolytically, Implicating Nickel Exposure as a Contributing Factor in Pathologies Related to Antitrypsin Deficiency. *Metallomics* **2015**, 7, 596–604.
- (38) Bossu, F. P.; Paniago, E. B.; Margerum, D. W.; Kirksey, S. T.; Kurtz, J. L. Trivalent Nickel Catalysis of the Autoxidation of Nickel(II) Tetraglycine. *Inorg. Chem.* **1978**, 17, 1034–1042.
- (39) Levine, J.; Etter, J.; Apostol, I. Nickel-Catalyzed N-Terminal Oxidative Deamination in Peptides Containing Histidine at Position 2 Coupled with Sulfite Oxidation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4848–4857.
- (40) Murray, C. K.; Margerum, D. W. Axial Coordination of Monodentate Ligands with Nickel(III) Peptide Complexes. *Inorg. Chem.* **1982**, 21, 3501–3506.
- (41) Heering, H. A.; Bultink, Y. B. M.; Hagen, W. R.; Meyer, T. E. Influence of Charge and Polarity on the Redox Potentials of High-Potential Iron-Sulfur Proteins: Evidence for the Existence of Two Groups. *Biochemistry* **1995**, 34, 14675–14686.
- (42) Hosseinzadeh, P.; Lu, Y. Design and Fine-Tuning Redox Potentials of Metalloproteins Involved in Electron Transfer in Bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, 1857, 557–581.
- (43) Tonelli, M.; Sacks, F.; Pfeffer, M.; Gao, Z.; Curhan, G. Relation between Serum Phosphate Level and Cardiovascular Event Rate in People with Coronary Disease. *Circulation* **2005**, 112, 2627–2633.
- (44) Bergwitz, C.; Jüppner, H. Phosphate Sensing. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2011**, 18, 132–144.
- (45) Paleček, E.; Bartošík, M. Electrochemistry of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3427–3481.
- (46) Sigel, H.; Griesser, R. Nucleoside 5'-triphosphates: self-association, acid-base, and metal ion-binding properties in solution. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 875–900.
- (47) Kaczmarek, P.; Szczepanik, W.; Jeżowska-Bojczuk, M. Acid-Base, Coordination and Oxidative Properties of Systems Containing ATP, L-Histidine and Ni(II) Ions. *Dalton Trans.* **2005**, 22, 3653–3657.
- (48) Sigel, H. Interactions of Metal Ions with Nucleotides and Nucleic Acids and Their Constituents. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 255–267.
- (49) Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): A Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.
- (50) Farkas, E.; Sóvágó, I.; Gergely, A. Studies on Transition-Metal-Peptide Complexes. Part 8. Parent and Mixed-Ligand Complexes of Histidine-Containing Dipeptides. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1983**, 8, 1545–1551.
- (51) Brookes, G.; Pettit, L. D. Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1975**, 74, 2112–2117.
- (52) Raics, M.; Lihi, N.; Laskai, A.; Kállay, C.; Várnagy, K.; Sóvágó, I. Nickel(II), Zinc(II) and Cadmium(II) Complexes of Hexapeptides Containing Separate Histidyl and Cysteiny Binding Sites. *New J. Chem.* **2016**, 40, 5420–5427.
- (53) Turi, I.; Kállay, C.; Szikszai, D.; Pappalardo, G.; Di Natale, G.; De Bona, P.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. Nickel(II) Complexes of the Multihistidine Peptide Fragments of Human Prion Protein. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 885–891.
- (54) Wezynfeld, N. E.; Goch, W.; Bal, W.; Frączyk, T. Cis-Urocanic Acid as a Potential Nickel(II) Binding Molecule in the Human Skin. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 3196–3201.
- (55) Solaini, G. Spermine Antagonizes the Binding of Adriamycin to the Inner Membrane of Heart Mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 159, 791–798.
- (56) Shullenberger, D. F.; Eason, P. D.; Long, E. C. Design and Synthesis of a Versatile DNA-Cleaving Metallopeptide Structural Domain. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11038–11039.
- (57) Bal, W.; Liang, R.; Lukszo, J.; Lee, S.-H.; Dizdaroğlu, M.; Kasprzak, K. S. Ni(II) Specifically Cleaves the C-Terminal Tail of the Major Variant of Histone H2A and Forms an Oxidative Damage-Mediating Complex with the Cleaved-Off Octapeptide. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 616–624.
- (58) Jin, Y.; Lewis, M. A.; Gokhale, N. H.; Long, E. C.; Cowan, J. A. Influence of Stereochemistry and Redox Potentials on the Single- and Double-Strand DNA Cleavage Efficiency of Cu(II) and Ni(II)-Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8353–8361.

Publikacja 4 (P4)

Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing

Aleksandra Tobolska, Nina E. Wezynfeld, Urszula E. Wawrzyniak, Wojciech Bał, Wojciech Wróblewski

Chemistry Proceedings 5 (2021) 39_1-39_4

DOI: 10.3390/CSAC2021-10449

Proceeding Paper

Metal–Peptide Complexes—A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing [†]

Aleksandra Tobolska ^{1,2,*} , Nina E. Wezynfeld ¹, Urszula E. Wawrzyniak ¹, Wojciech Bal ³  and Wojciech Wróblewski ¹ 

¹ Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland; nwezynfeld@ch.pw.edu.pl (N.E.W.); uwawrzyniak@ch.pw.edu.pl (U.E.W.); wuwu@ch.pw.edu.pl (W.W.)

² Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland

³ Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland; wbal@ibb.waw.pl

* Correspondence: atobolska@ch.pw.edu.pl

[†] Presented at the 1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry, 1–15 July 2021; Available online: <https://csac2021.sciforum.net/>.

Abstract: Amyloid- β (A β) peptides are crucial in the pathology of Alzheimer’s disease. On the other hand, their metal complexes possess distinctive coordination properties that could be of great importance in the selective recognition of (bio)analytes, such as anions. Here, we report a novel group of molecular receptors for phosphate anions recognition: metal–peptide complexes of A β peptides, which combine features of synthetic inorganic ligands and naturally occurring binding proteins. The influence of the change in the metal ion center on the coordination and redox properties of binary Cu(II)/Ni(II)-A β complexes, as well as the affinity of these complexes towards phosphate species, were analyzed. This approach offers the possibility of fine-tuning the receptor affinity for desired applications.

Keywords: metal–peptide complexes; voltammetry; molecular receptors



Citation: Tobolska, A.; Wezynfeld, N.E.; Wawrzyniak, U.E.; Bal, W.; Wróblewski, W. Metal–Peptide Complexes—A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing. *Chem. Proc.* **2021**, *5*, 39. <https://doi.org/10.3390/CSAC2021-10449>

Academic Editor: Nicole Jaffrezic-Renault

Published: 30 June 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The determination of phosphate anions in body fluids provides information about various disorders such as hyperparathyroidism or vitamin D deficiency [1]. Therefore, the monitoring of phosphate levels is of interest for human health. Chemical sensors are an ideal alternative to classic analytical methods, but their construction requires the synthesis of appropriate receptors, selectively binding to the analyte.

Amyloid β peptides (A β) related to Alzheimer’s disease are well known for their neurotoxic properties [2]. However, metal complexes, with their N-terminally truncated analogs, have unique coordination properties that could be employed in the design of potential receptors for biorelevant anionic species [3,4]. The A β_{5-9} (Arg-His-Asp-Ser-Gly-NH₂) peptide possesses a His-2 binding motif, and thus forms stable complexes with transition metal ions such as Cu(II) or Ni(II). At pH 7.4, the Cu(II) or Ni(II) ion is bound by three nitrogen atoms (3N) from the His residue, the N-terminal amine, and the peptide backbone amide [5]. The resulting chelates also exhibit a labile coordination site, enabling ternary interactions. Hence, metal–peptide complexes offer the possibility of fine-tuning their affinity for desired applications by altering the amino acid sequence and the metal ion center.

The present work explores and compares the coordination and redox properties of Cu(II) and Ni(II) complexes of the A β_{5-9} peptide, followed by their ability to interact with biologically relevant phosphate anions and nucleotides.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals were purchased from Merck and Sigma Aldrich. All solutions were prepared daily with deionized water (18 M Ω -cm). In order to avoid Cu(II)/Ni(II) contamination, the glassware was raised with 6 M HNO₃ followed by deionized water. AMP and ATP stock solutions were adjusted to pH 7.0–7.4 and kept on ice during measurements to prevent nucleotides hydrolysis.

2.2. Peptide Synthesis

Synthesis of the A β ₅₋₉ peptide was performed according to the Fmoc/tBu strategy [6] on a Prelude™ peptide synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ, USA). The crude was purified by HPLC with the UV detection (Waters, Milford, MA, USA) at 220 nm. The purity of the peptide was verified by ESI-MS (Waters, Milford, MA, USA).

2.3. Voltammetry

Electrochemical measurements (CV, DPV) were performed using the CHI 1030 potentiostat (CH Instrument, Austin, TX, USA) in a three-electrode arrangement with a GCE (BASi, 3 mm diameter) as a working electrode, an Ag/AgCl electrode (Mineral, Warsaw, Poland) as a reference, and a platinum wire as an auxiliary electrode. The GCE was sequentially polished with the alumina powder (1.0 μ m and 0.3 μ m) on a Buehler polishing cloth. Then, the working electrode was sonicated for 1 min and rinsed thoroughly with deionized water. All voltametric experiments were carried out in 100 mM KNO₃ at pH 7.4 under argon. The pH was adjusted with small aliquots of concentrated KOH or HNO₃ solutions. The peptide-to-metal(II) ratio was 1.0:0.9.

3. Results and Discussion

The electrochemical response for the A β ₅₋₉ metal complexes recorded at pH 7.4 is depicted in Figure 1. The binary Cu(II)-A β ₅₋₉ complex enabled both the reduction (Figure 1A, blue line) and oxidation of Cu(II) ions (Figure 1B, blue line). The exchange of the metal center complex to Ni(II) caused significant differences in the redox behavior, with a decrease in metal center oxidation by 188 mV compared to Cu(II) complexes (Figure 1B, green line). We did not observe any signals associated with Ni(II) reduction (Figure 1A, green line).

Distinct electrochemical properties are likely caused by the differences in geometry and the stabilities of the A β ₅₋₉ complexes. Under studied conditions, Cu(II) complex is square-planar, while Ni(II) complexes are mostly octahedral. Additionally, the conditional stability constant of the Cu(II)-A β ₅₋₉ ($5.8 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$) is about five orders magnitude higher than for Ni(II)-A β ₅₋₉ ($1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [3,5].

Considering the application of the metal complexes of A β ₅₋₉ as a recognition element, we studied their response to selected anionic species. Observed changes in the oxidation potentials of the metal center upon the addition of 10 mM phosphates were similar (~150–160 mV) for Cu(II) and Ni(II) complexes of A β ₅₋₉. Comparable sensitivity of chelates is probably related to a similar Lewis acidity of the metal centers. Furthermore, both complexes exhibit a good selectivity towards phosphates in the presence of chlorides and sulfates (Table 1). Aside from phosphates, only acetates, among other tested analytes, interacted with the metal-peptide complexes, causing changes in redox activity. Nevertheless, the voltametric signals for acetates occurred at different potentials than for phosphates.

Since the intercellular level of organic phosphates can be 20 times higher than inorganic phosphates, we decided to investigate the affinities of the studied metal-peptide complexes for selected nucleotides (AMP, ATP). Similar to phosphate anions, the presence of nucleotides shifted the oxidation peak to less positive values. However, in contrast to Cu(II)-A β ₅₋₉, the signal of the metal center oxidation for Ni(II)-A β ₅₋₉ occurs at different potentials for mono- and triphosphates (see Table 1). We suggest that this is due to the ability of the octahedral nickel complex to interact with more than one phosphate group of ATP as a result of the chelate effect.

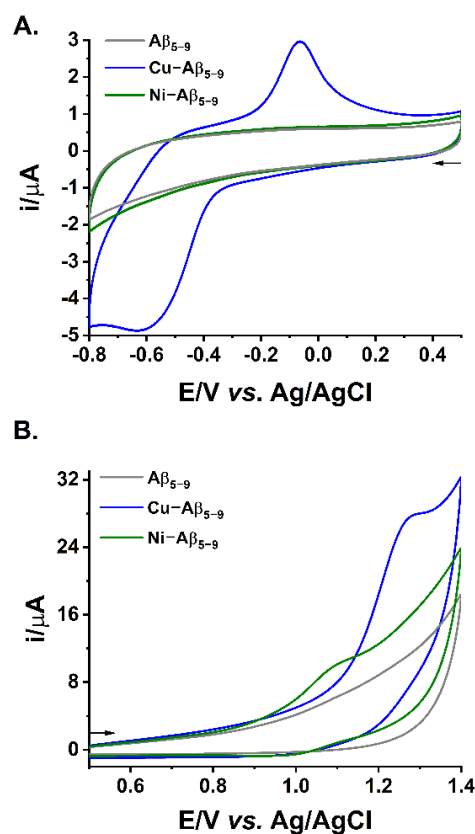


Figure 1. CV curves registered for 0.5 mM $A\beta_{5-9}$ in absence (grey line) and in the presence of 0.45 mM Cu(II) (blue line), or 0.45 mM Ni(II) (green line) scanned towards negative (A) and positive (B) potentials and recorded in 100 mM KNO_3 at pH 7.4, scan rate $v = 0.1$ V/s. Analyzed based on data published in the literature [3–5].

Table 1. Comparison of the affinity towards selected anions and nucleotides of the Cu(II)- $A\beta_{5-9}$ and Ni(II)- $A\beta_{5-9}$ complexes. $\Delta E_{M(II)/M(III)}$ is the difference of the potential values of Cu(II) or Ni(II) oxidation of the respective ternary system and the binary complex. Calculated based on results published previously [3,4].

Anion	$\Delta E_{Cu(II)/Cu(III)}$ (mV)	$\Delta E_{Ni(II)/Ni(III)}$ (mV)
Cl^-	−2	−8
SO_4^{2-}	−8	−21
CH_3COO^-	−84	−68
$H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$	−150	−156
AMP	−136	−126
ATP	−152	−230

4. Conclusions

Metal–peptide complexes of peptides possessing the His-2 motif ensure there are labile coordination sites, enabling ternary interactions with phosphate anions and nucleotides. Such interactions lead to a strong electrochemical response, which could be valuable for designing a promising class of peptide-based molecular receptors with poten-

tial applications as recognition elements in electrochemical biosensors and in vitro clinical diagnostics. Our research proved that the change in the metallic center of the $A\beta_{5-9}$ complex significantly influences its coordination properties and redox activity. Nevertheless, altering the metal center from Cu(II) to Ni(II) does not change the sensitivity of the complex toward phosphate anions.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/CSAC2021-10449/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, W.B., N.E.W. and U.E.W.; methodology, W.W., U.E.W. and N.E.W.; formal analysis, A.T., U.E.W. and N.E.W.; investigation, A.T.; resources, W.W. and W.B.; data curation, A.T., U.E.W. and N.E.W.; writing—original draft preparation, A.T.; writing—review and editing, A.T., N.E.W. and W.W.; visualization, A.T.; supervision, N.E.W., W.W. and W.B.; project administration, N.E.W. and A.T.; funding acquisition, N.E.W. and A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the Warsaw University of Technology under the program Excellence Initiative, Research University (ID-UB), BIOTECHMED-1 project no. PSP 504/04496/1020/45.010407 (N.E.W.) and implemented as a part of the Operational Program Knowledge Education Development 2014–2020 (Project No POWR.03.02.00-00-I007/16-00) co-financed by the European Social Fund (A.T.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the assistance of Dawid Płonka (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences) in peptide synthesis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ramakrishnam Raju, M.V.; Harris, S.M.; Pierre, V.C. Design and applications of metal-based molecular receptors and probes for inorganic phosphate. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1090–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rauk, A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans.* **2008**, 1273–1282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tobolska, A.; Wezynfeld, N.E.; Wawrzyniak, U.E.; Bal, W.; Wróblewski, W. Tuning Receptor Properties of Metal-Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)- $A\beta_{5-9}$ and Phosphates/Nucleotides. *Inorg. Chem.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tobolska, A.; Wezynfeld, N.E.; Wawrzyniak, U.E.; Bal, W.; Wróblewski, W. Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions. *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 2726–2730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wezynfeld, N.E.; Tobolska, A.; Mital, M.; Wawrzyniak, U.E.; Wiloch, M.Z.; Płonka, D.; Bossak-Ahmad, K.; Wroblewski, W.; Bal, W. $A\beta_{5-x}$ Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 14000–14011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chan, W.C.; White, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W.C., White, P.D., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2000; pp. 41–76.

Publikacja 5 (P5)

Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition

Aleksandra Tobolska, Klaudia Głowacz, Patrycja Ciosek-Skibińska, Wojciech Bal, Wojciech Wróblewski, N.E. Wezynyfeld

Dalton Transactions (2022)

DOI: 10.1039/D2DT03078K



Cite this: DOI: 10.1039/d2dt03078k

Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition†

Aleksandra Tobolska, ^{a,b} Klaudia Głowacz, ^a Patrycja Ciosek-Skibińska, ^a Wojciech Bał, ^c Wojciech Wróblewski ^a and Nina E. Wezyńfeld ^{a*}

Copper(II) complexes of peptides with a histidine residue at the second position (His2 peptides) provide a unique profile of electrochemical behavior, offering signals of both Cu(II) reduction and Cu(II) oxidation. Furthermore, their structures with vacant positions in the equatorial coordination plane could facilitate interactions with other biomolecules. In this work, we designed a library of His2 peptides based on the sequence of Aβ_{5–9} (RHDSG), an amyloid beta peptide derivative. The changes in the Aβ_{5–9} sequence highly affect the Cu(II) oxidation signals, altered further by anionic species. As a result, Cu(II) complexes of Arg1 peptides without Asp residues were chosen as the most promising peptide-based molecular receptors for phosphates. The voltammetric data on Cu(II) oxidation for binary Cu(II)–His2 peptide complexes and ternary Cu(II)–His2 peptide/phosphate systems were also tested for His2 peptide recognition. We achieved a highly promising identification of subtle modifications in the peptide sequence. Thus, we introduce voltammetric measurement as a potential novel tool for peptide sequence recognition.

Received 21st September 2022,
Accepted 9th November 2022

DOI: 10.1039/d2dt03078k

rsc.li/dalton

Introduction

Amyloid β (Aβ) peptides are at the center of Alzheimer's disease (AD) research. They are the main constituents of amyloid plaques. Several forms of Aβ with different lengths and modifications have been found *in vivo*, including Aβ_{1–x} and N-terminal truncated Aβ_{p3–x}, Aβ_{4–x}, Aβ_{5–x}, Aβ_{p11–x}, and Aβ_{11–x} (predominant x values 40 and 42).^{1–3} Previous studies demonstrated that each of them binds to Cu(II) ions, although the N-terminal modifications significantly impact their affinity and Cu(II)-binding sites.^{4–6} The structures and properties of Cu(II)–Aβ complexes depend mostly on the localization of His residues in the peptide sequence.

The diversity of Cu(II)–Aβ complexes also results in their various redox properties, which could be crucial for the understanding of the elevated oxidative stress level in AD.^{7–9} For

example, Cu(II) complexes of two major Aβ forms in the brain, Aβ_{1–x} and Aβ_{4–x}, show contrasting electrochemical properties. The heterogeneous Cu(II) binding site in Aβ_{1–x}, involving the N-terminus and His6, His13, and His14, could be reduced at pH 7.4, easily entering the Cu(II)/Cu(I) cycle,^{10,11} which fuels the generation of reactive oxygen species.¹² The electrochemical Cu(II) oxidation has not been reported for this species at this pH. In contrast, Cu(II) in complex with Aβ_{4–x}, where His3 plays a dominant role in the metal ion coordination, could be oxidized to Cu(III),^{5,11,13,14} but it is highly resistant to the reduction to Cu(I).¹⁵ Interestingly, another form, Aβ_{5–x}, which contains His2, binds to Cu(II) in such a way that it enables both Cu(II) reduction and Cu(II) oxidation. The coordination mode of the Cu(II)–Aβ_{5–x} complex comprised three nitrogen atoms (3N) from the N-terminal amine, the first amide, and the imidazole ring of His2 (N^{am}, N⁺, and N^{im}) with a vacant fourth equatorial site.⁴ The structure of the 3N complex of Cu(II)–Aβ_{5–x} is provided in Fig. 1. The vacant position is occupied mostly by loosely bound water molecules, which could be a gate for interactions with other biomolecules under physiological conditions and could be utilized in the design of biosensors.^{4,16,17}

Anions are molecules of great concern to human and environmental health.^{18,19} Among them, phosphate anions deserve special attention. Monitoring phosphate levels, *e.g.*, in blood, allows the diagnosis of bone, kidney, and thyroid diseases.²⁰ The recognition of phosphates is particularly challen-

^aChair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland.

E-mail: aleksandra.tobolska@pw.edu.pl, nina.wezynfeld@pw.edu.pl

^bFaculty of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland

^cInstitute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland

†Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental methods; UV-vis spectra of titrations with NaOH, spectral parameters of the 3N + OH[–] species; CV curves of Cu(II)–His2 complexes; DPV curves of Cu(II)–His2 complexes in the presence of anions; loading plots; HCA diagrams. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2dt03078k>



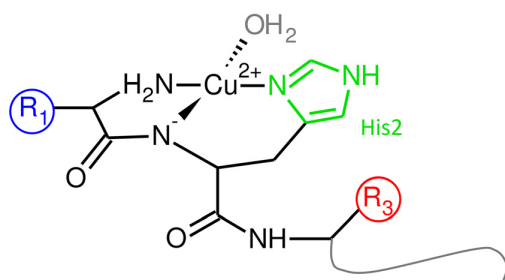


Fig. 1 The scheme of the general structures of the Cu(II) complexes of His2 peptides. The vacant equatorial site is highlighted in grey. R1 and R3 stand for the first and the third residues in the His2 peptide sequence, which were exchanged in this work for Arg, Asp, and Gly.

ging because they are highly hydrated.²¹ Therefore, the development of new methods for determining these anions is an important scientific goal. We recently demonstrated that Cu(II) complexes of Aβ₅₋₉ could interact with phosphates, extensively altering the potential of Cu(II)/Cu(III) oxidation.^{4,16,17,22} Moreover, the studied peptide also possesses Arg (R) and Asp (D), residues that are commonly applied in designing selective molecular receptors towards anions.^{19,23} Thus, their presence in the peptide sequence could provide additional interactions such as electrostatic forces and/or hydrogen bonding.

Taking into account the distinctive properties of Cu(II)–Aβ₅₋₉, we designed a library of nine His2 peptides consisting of Aβ₅₋₉ (Arg–His–Asp–Ser–Gly) and its eight analogs (Table 1), whose binary Cu(II) complexes represent potential phosphate-binding receptors. We exchanged the first and the third amino acid residues for Arg and Asp, potentially contributing to intramolecular interactions, or Gly (G) as the smallest building block of peptides, without the side chain. For simplicity, all oligopeptides will be described with the first three residues of their sequences, as provided in Table 1. We performed initial UV-vis spectroscopic studies on the formation of Cu(II)–peptide complexes. Then, we employed Cyclic Voltammetry (CV) and Differential Pulse Voltammetry (DPV) to check the electrochemical properties of binary Cu(II) complexes of His2 peptides as well as to compare the response of the complexes toward the selected anions. In the last part of the paper, we

have proposed another approach. Using the same data set, *i.e.*, voltammetric curves registered for binary (Cu(II)–His2 peptides) and ternary (Cu(II)–His2 peptides/phosphates) systems, we discriminated the His2 peptide sequences by Principal Component Analysis (PCA). Thus, we demonstrated that the analysis of the Cu(II) oxidation process in the metallocomplex provides a dual application: the recognition of phosphate species and the identification of His2 peptide sequences.

Results and discussion

Influence of the His2 peptide sequence on Cu(II) coordination – spectroscopic studies

We started with spectroscopic studies on Cu(II) coordination with the His2 peptides, whose sequences are compiled in Table 1. As they differ primarily by the acid–base properties of their first and third residues, we performed pH-metric titrations of solutions containing Cu(II) ions and the peptides. The UV-vis spectra are provided in Fig. S2,† pH dependence of the formation of Cu(II) complexes of His2 peptides is given in Fig. 2, and the detailed spectroscopic parameters related to 3N and 3N + OH[−] complexes are shown in Table 2 and Table S1,† respectively.

In general, during all titrations, two d–d bands for Cu(II)–peptide complexes were observed. The first one, around 605 nm, appeared at pH above 3 (see Fig. 2, open symbols) and is characteristic of the 3N [N^{am}, N^{im}, N[−]] square planar Cu(II) complex of the His2 peptides.^{4,16,24–26} What is important for this work is the presence of the 3N complex as the main Cu(II) coordination mode for all the studied complexes at physiological pH 7.4. The second d–d band around 520 nm was noticed at pH higher than 9 (see Fig. 2, full symbols) and corresponded to the formation of the 3N + OH[−] [N^{am}, N^{im}, N[−], OH[−]] complex due to the deprotonation of a water molecule.

Despite these similarities, we found significant differences between the peptides in the formation of both 3N and 3N + OH[−] species. For example, the 3N complex appears at higher pH values for the peptides possessing the Gly residue at the first position (Gly1), Fig. 2. This is also reflected in the highest pK values calculated for those complexes, pK 3.9–4.0. In this work, pK is defined as the pH value at which half of the total copper amount is in the form of the given species (here, 3N complex). The pK values were obtained by fitting the spectroscopic data for 3N complexes provided in Fig. 2 (open symbols) to the Hill equation (see the ESI,† eqn (S1) for the fitting description and Table 2 for the detailed pK values). As such, the higher pK values for 3N complexes of Gly1 peptides are associated with the lower stability of these complexes. The pK values calculated for 3N Cu(II) complexes of the remaining His2 peptides were in the range of 3.5–3.8, with the lowest value for RHR. In this case, Arg residues likely decrease the deprotonation pK_a values of Cu(II) binding groups, such as the Arg1 amine, peptide bond Arg1–His2, and His2 imidazole, which occur in the proximity of the Arg residues in the designed peptides. This, in consequence, facilitates the for-

Table 1 Sequences of the studied His2 peptides. All possess free N-terminal amines and amidated C-termini (–NH₂)

His2 peptide sequence	Abbreviation
The maternal sequence	
Arg–His–Asp–Ser–Gly–NH ₂ (Aβ ₅₋₉)	RHD
Analogues	
Arg–His–Gly–Ser–Gly–NH ₂	RHG
Arg–His–Arg–Ser–Gly–NH ₂	RHR
Asp–His–Asp–Ser–Gly–NH ₂	DHD
Asp–His–Arg–Ser–Gly–NH ₂	DHR
Asp–His–Gly–Ser–Gly–NH ₂	DHG
Gly–His–Gly–Ser–Gly–NH ₂	GHG
Gly–His–Asp–Ser–Gly–NH ₂	GHD
Gly–His–Arg–Ser–Gly–NH ₂	GHR

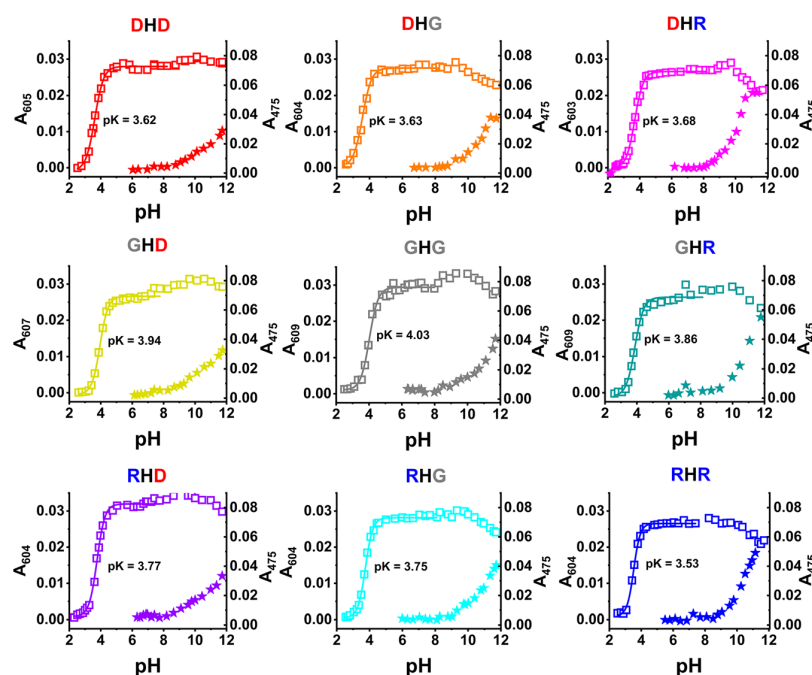


Fig. 2 The pH dependence of absorbance at wavelengths associated with the formation of the two main species of Cu(II) complexes of the His2 peptides, 3N complex (open symbols) and 3N + OH[−] (full symbols), based on the spectra from Fig. S2.† The solid lines represent fits to the Hill equation and the pK values calculated for 3N species of each peptide are given in the corresponding graph, while their detailed values are given in Table 2.

Table 2 Spectroscopic parameters for Cu(II) 3N complexes of His2 peptides calculated on the basis of the UV-vis spectra at pH 7.4 together with the pK values of the 3N complex formation. The complexes and their parameters are sorted in the ascending order of pK values

3N complex	pH 7.4		
	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ (M ^{−1} cm ^{−1})	pK ± SE ^a
Cu(II)–RHR	603	58	3.53 ± 0.02
Cu(II)–DHD	604	59	3.62 ± 0.02
Cu(II)–DHG	603	60	3.63 ± 0.05
Cu(II)–DHR	602	59	3.68 ± 0.02
Cu(II)–RHG	603	61	3.75 ± 0.02
Cu(II)–RHD	604	69	3.77 ± 0.02
(Cu(II)–Aβ _{5–9})			
Cu(II)–GHR	608	58	3.86 ± 0.02
Cu(II)–GHD	606	59	3.94 ± 0.02
Cu(II)–GHG	608	63	4.03 ± 0.03

^a SE stands for the standard error and represents the statistical error of pK determinations.

mation of Cu(II) complexes by Arg-containing peptides and increases their stability. The maximum of d–d bands of 3N Gly1 complexes occurred at slightly longer wavelengths (608–609 nm) than those for the 3N complexes of other peptides (Table 2). But, no systematic dependence on the peptide sequence was found for their molar extinction coefficients ranging from 58 to 69 M^{−1} cm^{−1}.

The formation of the second observed species, 3N + OH[−], was likely not accomplished at the highest measured pH, 11.7, as the endpoints of the titration curves for these complexes were not established (Fig. 2, solid symbols). Moreover, in the case of complexes with Asp3 peptides, the d–d band still shifted towards lower wavelengths at around pH 11.7, as given in Fig. S3.† However, we did not continue the measurements due to the non-Nernstian response of the employed glass electrode at higher pH values. During the 3N + OH[−] species analysis, we focused on spectroscopic parameters at the highest measured pH 11.7 given in Table S1,† which mostly resemble those of 3N + OH[−] Cu(II) complexes. In addition, we followed the pH dependence of A₄₇₅, shifted to lower wavelengths from the maximum of the d–d band of 3N + OH[−], as the signal derived exclusively from this species, without the contribution of the adjacent band of 3N species, Fig. 2 (solid symbols). At pH 11.7, the less pronounced blue shift (Table S1†) and the lowest A₄₇₅ (Fig. 2, entries DHD, GHD and RHD) were noticed for the Asp3 peptides. In contrast, the most pronounced blue shift (Table S1†) and the highest A₄₇₅ (Fig. 2, entries DHR, GHR and RHR) were observed for the Cu(II) complexes of Arg3 peptides.

To conclude, the first residue of His2 peptides primarily affects the 3N Cu(II) complex formation, with a destabilizing role of Gly1. On the other hand, the third residue of His2 peptides mainly impacts the formation of the following 3N + OH[−] complex, which Asp3 could weaken.

Influence of the His2 peptide sequence on the electrochemical response of the Cu(II) complexes

In our previous study on Cu(II) complexes with A β_{5-9} (RHD),^{4,16} we showed that the 3N chelate exhibited two redox couples: the Cu(II)/Cu(I) reduction at -0.45 V vs. Ag/AgCl, and the Cu(II)/Cu(III) oxidation around 1.20 V vs. Ag/AgCl at pH 7.4. We proved that those signals are characteristic of Cu(II) bound to His2 peptides and do not appear in the control measurements of peptide/KNO₃ or Cu(II)/KNO₃ mixtures.⁴

The cyclic voltammograms of the 3N complexes of the His2 peptides obtained in this work and shown in Fig. S4† demonstrated similar electrochemical behaviour for all the studied analogs, but with considerable differences in the position of the peaks. Analyzing the negative range of potentials, we observed Cu(II) reduction in the potential range from -0.55 V to -0.70 V, and, in the reverse scan, Cu(I) oxidation from around -0.08 V to 0.12 V (Fig. S4A†). This significant separation between the cathodic and anodic peaks suggested a slow

electron transfer, which likely results from the differences between Cu(II) and Cu(I) complex structures and their reorganization upon the redox reactions.^{4,27–29} A more detailed analysis revealed some dependence between the positions of the peaks of the Cu(II)/Cu(I) cycle and the His2 peptide sequence (Fig. S5†). The lowest potential of Cu(II) reduction was registered for Asp1 peptides, whereas the highest Cu(I) oxidation potential was noticed for peptide complexes containing Arg1 or/and Arg3 residues. However, in general, the differences between the peptide complexes for the Cu(II)/Cu(I) cycle were minor, with considerable variability among replicates.

A more pronounced effect of the peptide sequence was observed for the Cu(II)/Cu(III) oxidation (Fig. S4B†). In all cases, the processes were irreversible (lack of the cathodic signal in the reverse CV scan). Considering the character of the studied reactions and limitations of cyclic voltammetry, *e.g.*, lower sensitivity due to the large capacitive current contribution, we chose the pulse technique (DPV) for further studies. The DPV results obtained for the binary systems (Cu(II)–His2 peptides) are shown in Fig. 3, and the potential values are given in Table 3.

The presence of Gly1 increased the Cu(II) oxidation potential ($E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$) by 0.03 – 0.05 V (Fig. 3 and Table 3) compared to the complex of the maternal RHD sequence of A β_{5-9} ($E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}} = 1.20$ V). Conversely, the lowest $E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$ of 1.18 V was determined for Cu(II)–RHG. Such a decrease in the Cu(II) oxidation potential for the Arg1 peptide could be caused by electrostatic interactions with δ -donor groups, which stabilize the Cu(III) state. This is in line with the results reported for the Cu(II) complexes of His3 peptides containing Lys residues.³⁰ The Cu(II) oxidation potential values in the presence of other His2 peptide complexes were similar, in the range of 1.19 – 1.20 V (Table 3). Additionally, we studied the possible impact of the charge of the complex on its redox properties. A more negative complex charge could favor the electron release and decrease of the potential value of metal center oxidation.

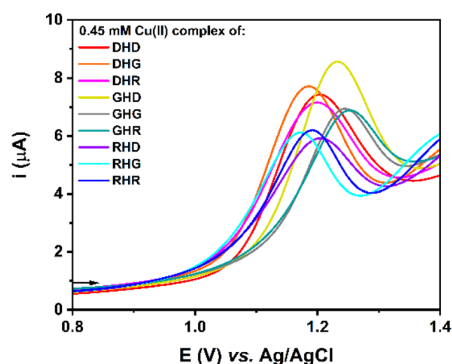


Fig. 3 DPV curves obtained for the Cu(II) complexes of His2 peptides (0.9 : 1.0 ratio) recorded in 100 mM KNO₃, pH 7.4.

Table 3 Oxidation peak potential ($E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$) average values for binary Cu(II)–His2 peptide complexes and ternary Cu(II)–His2 peptide/anion systems at pH 7.4 determined from the DPV curves depicted in Fig. 3, Fig. S6† and literature data¹⁶

His2 peptide	Binary system Cu(II)–His2 peptide	$E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}} \text{ (V) vs. Ag/AgCl} \pm \text{SD}^a$			
		Ternary system Cu(II)–His2 peptide/anion			
		H ₂ PO ₄ [−] /HPO ₄ ^{2−}	CH ₃ COO [−]	SO ₄ ^{2−}	Cl [−]
RHG	1.180 ± 0.005	0.987 ± 0.015	1.096 ± 0.003	1.184 ± 0.003	1.180 ± 0.001
RHR	1.191 ± 0.003	0.996 ± 0.005	1.107 ± 0.003	1.175 ± 0.001	1.179 ± 0.001
DHR	1.204 ± 0.005	1.040 ± 0.003	1.120 ± 0.006	1.194 ± 0.003	1.196 ± 0.001
DHG	1.187 ± 0.003	1.048 ± 0.003	1.100 ± 0.001	1.180 ± 0.001	1.184 ± 0.001
RHD ¹⁶	1.204 ± 0.005	1.056 ± 0.006	1.120 ± 0.004	1.196 ± 0.004	1.204 ± 0.002
(A β_{5-9})					
DHD	1.203 ± 0.003	1.088 ± 0.007	1.119 ± 0.003	1.194 ± 0.004	1.199 ± 0.002
GHG	1.245 ± 0.003	1.087 ± 0.003	1.178 ± 0.003	1.237 ± 0.003	1.237 ± 0.001
GHR	1.253 ± 0.003	1.112 ± 0.003	1.191 ± 0.003	1.231 ± 0.003	1.239 ± 0.003
GHD	1.231 ± 0.004	1.113 ± 0.003	1.181 ± 0.003	1.227 ± 0.003	1.231 ± 0.001

^a $E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$ values calculated as the mean of three independent repetitions together with the standard deviation (SD) for binary and ternary Cu(II)–His2 peptide/phosphate systems. The values for other ternary systems are given for comparison and are based on at least two independent repetitions.





However, such an effect was not observed. For example, the $[\text{Cu}(\text{II})\text{-DHD}]^+$ complex underwent $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})$ oxidation at a potential similar to that of the most positively charged $[\text{Cu}(\text{II})\text{-RHR}]^{5+}$ chelate.

Another factor that could impact the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation is the size of the first and the third residues. Indeed, we noticed some tendencies for peptides containing Gly, the smallest residue in the studied peptides. However, those effects were contrasting for the first and the third positions. While Gly3 facilitates $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation (the lowest $E_{\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})}$ for RHG and DHG, Table 3), Gly1 hinders this process (the highest $E_{\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})}$ for GHR, GHG, and GHD, Table 3). Interestingly, the GHG peptide belongs to the second group, whose complexes exhibit the highest oxidation potential values indicating that the effects of Gly1 prevail over those of Gly3. On the other hand, the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation in the $\text{Cu}(\text{II})$ complex of FHFSKNR- NH_2 (FHF), the peptide with bulky Phe1 and Phe3 residues, was reported at around 1.25 V vs. Ag/AgCl , a very similar $E_{\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})}$ to that observed by us for the GHG complex.¹⁷ Other data refer to complexes of His2 peptides, which contain a redox-active Trp residue. Its oxidation potential peak is very close to the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation peak of $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptides.^{17,31} In consequence, the analysis of such data is challenging. However, the observed order of these peptides toward higher oxidation potentials, $\text{FHW} \approx \text{WHF} < \text{WHW} < \text{FHF}$,¹⁷ agrees with the general conclusion of our studies that there is no single specific feature of His2 peptides which defines the susceptibility to $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation of their complexes. Instead, the particular positions of the acidic/basic/small/bulk residues and their combination in the proximity of His2 seem vital for this process.

Effect of anions on $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation in complexes of the His2 peptides

Next, we introduced anions into the above-described $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide systems. Our recent studies showed that phosphate only slightly impacts the UV-vis spectra of 3N complexes. In contrast, the electrochemical signals were much more affected by anion addition.^{16,22} We have found that DPV is a particularly promising technique in the studies on weak but physiologically relevant interactions between metal-peptide complexes and anions.^{16,22} Therefore, we also chose DPV in this work to check how the amino acid sequence of the His2 peptides affects the phosphate recognition by their $\text{Cu}(\text{II})$ complexes. DPV measurements were performed at pH 7.4, which ensures 3N coordination mode with a vacancy in the equatorial site for the $\text{Cu}(\text{II})$ complexes of all the studied His2 peptides as demonstrated by the above-described spectroscopic studies. The DPV curves of the $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide complexes in the presence of environmentally and biologically relevant anions are depicted in the ESI,† Fig. S6. The $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation potential values for the binary $\text{Cu}(\text{II})$ -peptide and ternary $\text{Cu}(\text{II})$ -peptide/anion systems are provided in Table 3. The column chart presenting the differences in the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation potential values between the ternary and the binary systems (ΔE) is given in Fig. 4.

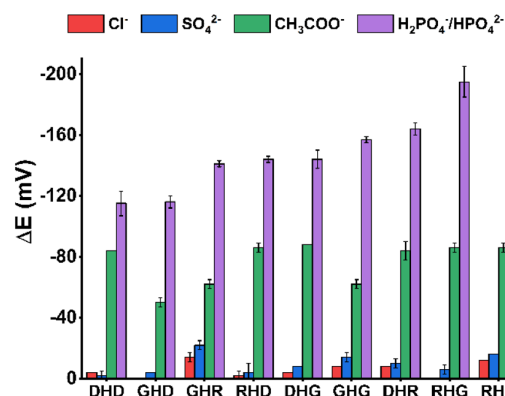


Fig. 4 Differences between the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation potential values in ternary $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide/anion and binary $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide systems (ΔE) calculated on the basis of the results shown in Table 3, Fig. S6,† and the literature data.¹⁶

Chloride and sulfate anions only slightly affected the redox properties of all the studied $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide complexes. It is in line with our previous observations.¹⁶ Distinct changes in the voltammetric curves were observed in the presence of acetate or phosphate anions, *i.e.*, the oxidation peak corresponding to the $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})$ process for ternary $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide/phosphate or $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide/acetate systems occurred at lower potentials than that of the respective binary $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide complex. Furthermore, the voltammetric signals obtained for chelates in the mixture of all the studied anions (Fig. S6,† dotted violet lines) resembled those recorded for the ternary $\text{Cu}(\text{II})$ -His2 peptide/phosphate system (Fig. S6,† solid violet lines). The only exception is $\text{Cu}(\text{II})$ -DHD, with very similar responses to phosphates and acetates, and in consequence, to the mixture of anions (Fig. S6†). Nevertheless, these results demonstrated the high selectivity of electrochemical phosphate recognition by $\text{Cu}(\text{II})$ complexes of most of the investigated His2 peptides.

The greatest shift of the $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})$ peak (the highest ΔE value) was observed after the phosphate addition to the $\text{Cu}(\text{II})$ complexes of RHG and RHR, the Arg1 peptides without the Asp residue (Fig. 4, the detailed values are listed in Table 3). This result can be explained by the favorable high positive charge of those chelates, $[\text{Cu}(\text{II})\text{-RHG}]^{4+}$ and $[\text{Cu}(\text{II})\text{-RHR}]^{5+}$, and the presence of the Arg1 residue in the closest neighborhood to the groups directly engaged in the $\text{Cu}(\text{II})$ coordination. In contrast, minor changes of the $\text{Cu}(\text{II})$ oxidation signal in the presence of anionic species were noticed for GHD, but particularly for DHD (Fig. 4). As mentioned, the $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})$ oxidation peaks for $\text{Cu}(\text{II})$ -DHD appeared relatively close to each other in the presence of acetate and phosphate anions (see Table 3). This revealed a worse selectivity of $\text{Cu}(\text{II})$ -DHD towards phosphates, likely caused by the lower complex charge $[\text{Cu}(\text{II})\text{-DHD}]^+$ provided by deprotonated Asp residues, and thus weaker electrostatic interactions between the $\text{Cu}(\text{II})$ -DHD and the anions.



Our studies are limited to the His2 peptides, in which the first and the third positions are occupied by three representative residues, Arg, Asp, and Gly. However, one could expect that the selectivity of Cu(II) complexes of peptides containing other negatively charged residues, such as Glu, would be similar to those containing Asp, which is insufficient for a good phosphate receptor. Alternatively, Lys-containing peptides could provide advantageous features like those observed for positively-charged Arg analogs. Furthermore, elongation of the aliphatic side chain (as for Ile/Leu) and incorporation of uncharged polar residues (such as Ser/Thr/Asn/Gln) could have an effect as well; the former likely by the stabilization of the Cu(II)–peptide complex structure and as a steric hindrance during the ternary interaction; whereas the latter by the formation of hydrogen bonds between the side chain and the phosphate molecule.³² Therefore, in our next projects, we would also like to check other sequences based on the above consideration to improve further the receptor properties of Cu(II)–His2 peptides towards phosphates.

Chemometric modeling of voltammetric data for peptide recognition

The results presented above demonstrated that the changes in the His2 peptide sequence affect the Cu(II) oxidation potential of both systems, the binary Cu(II)–His2 peptide and the ternary Cu(II)–His2 peptide/phosphate. Therefore, we combined these values for all the studied complexes in Fig. 5. This analysis provided a clear formation of three groups (clusters) of His2 peptides, depending on their sequence. The first group contained the Gly1 peptides, and it was characterized by the highest values of Cu(II) oxidation potential in both systems. The second group gathered the peptides with Asp residues but without Gly1. The third cluster consists of the Arg1 peptides without Asp, exhibiting the lowest Cu(II) oxidation potential. Accordingly, we showed that the electrochemical properties of

Cu(II) complexes of His2 peptides could be employed not only for the recognition of phosphate species but also to distinguish the types of residues in the proximity of His2 in the peptide sequence.

Since the obtained voltammetric data carry much more information than the Cu(II) oxidation potential, we decided to employ chemometric modeling in the follow-up studies on the voltammetric detection systems for identifying His2 peptides. The application of chemometric methods for voltammetric data processing allowed us to track signal changes observed for various peptide complexes in the entire voltammograms (*i.e.*, intensity, signal location, and shape of the observed signals). First, we applied Principal Component Analysis (PCA), aiming to reduce the dimensionality of large data sets by determining new variables (PCs, Principal Components), which are a linear combination of original variables and order the variance contained in the data. Thus, one could assess the initial patterns in the data by analyzing the so-called score plot. Such visualization on a two- or three-dimensional graph leads to grouping objects with similar properties. To determine which variables of the original data are the most significant for the discrimination of the samples, one could also use loading plots, where the higher the absolute value of loading, the higher the contribution of the original variable in the given PC.^{33,34}

Another chemometric model used for sample (dis)similarity evaluation is Hierarchical Cluster Analysis (HCA). In this method, the most similar objects are linked together on the dendrogram, and the length of its branches is a measure of (dis)similarity between samples, *i.e.*, the shorter the branches in the dendrogram linking the specified objects, the higher the similarity of the objects.³⁵

We tested three different sets of DPV data registered for (i) the binary Cu(II)–His2 peptide complex; (ii) the ternary Cu(II)–His2 peptide/phosphate system; (iii) the data fusion of Cu(II)–His2 peptide + Cu(II)–His2 peptide/phosphate. In all cases, the information contained in the first two PCs allowed us to assess the possibility of distinguishing His2 peptides based on the interactions of the peptide with Cu(II) and of the Cu(II)–peptide complex with phosphate anions. The resulting score plots are depicted in Fig. 6, the corresponding loading plots are presented in Fig. S7 and S8,† and the hierarchical cluster analysis is given in Fig. S9.†

First, we examined the ability of His2 peptide recognition when employing only the data registered for their binary Cu(II) complexes (Fig. 6A). The samples representing each His2 peptide formed separated clusters, with little overlap of RHR and RHD, as well as DHR and DHD (also confirmed by HCA, see Fig. S9A†). The cluster positions in the PCA space primarily depend on the first residue of His2 peptides. The most easily recognized ones were Gly1 analogs, characterized by positive scores on PC1. At the same time, peptides containing Asp1 and Arg1 residues exhibited negative PC1 scores. As provided in Fig. S7A,† the highest value of the PC1 loading was noticed around the maximum of the Cu(II) oxidation peak. As such, the variation in $E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$ values contributes the most to the peptide grouping against PC1. Interestingly, the distinction

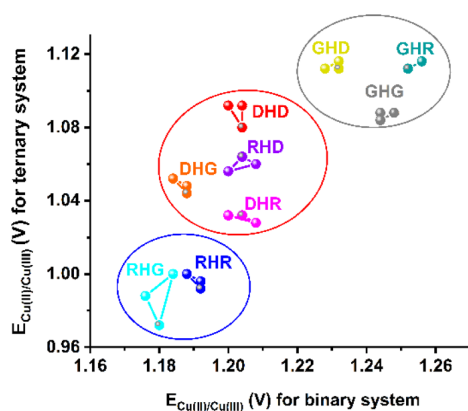


Fig. 5 Cu(II) oxidation potential for binary systems of Cu(II)–His2 peptide and ternary systems of Cu(II)–His2 peptide/phosphate. The $E_{\text{Cu(II)/Cu(III)}}$ values are given for three independent DPV repetitions for each His2 peptide and the following concentrations of reagents: 0.45 mM Cu(II), 0.50 mM His2 peptide, and 10 mM phosphate.

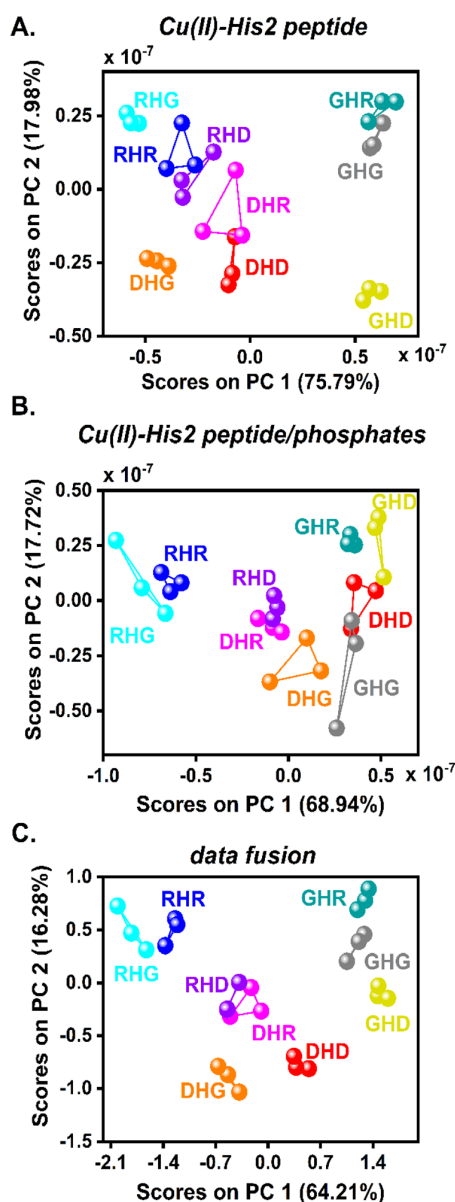


Fig. 6 Principal component analysis (PCA) score plots showing the discrimination of the His2 peptides depending on the origin of voltammetric data. (A) Binary system Cu(II)-His2 peptide, (B) ternary system Cu(II)-His2 peptide/phosphate, and (C) data fusion (upon the combination of data from binary and ternary systems).

between Arg1 and Asp1 peptides with similar $E_{\text{Cu(II)/Cu(I)}}$ values is provided by the information included in PC2, with $\text{PC2} > 0$ for Arg1 and $\text{PC2} < 0$ for Asp1 peptides. A similar pattern was observed for Gly1 peptides with Arg3 ($\text{PC2} > 0$) or Asp3 ($\text{PC2} < 0$). In those cases, the differences in the shape of voltammetric curves, including the position of inflection points, likely separated those groups (see loadings on PC2 in Fig. S7B†).

In the next step, we checked how the presence of phosphate anions impacts the peptide recognition based on the oxidation

signals of the Cu(II) complexes. As presented in Fig. 6B, in this case, Arg1 peptides without the Asp residue were the most easily discerned, exhibiting $\text{PC1} < -0.5$. Once again, PC1 carries information related to the position of the Cu(II) oxidation signal, as suggested by the loadings on PC1 in Fig. S7C,† but with a higher contribution of other peak attributes than that noticed in the case of the binary system (for comparison see Fig. S7A†). The presence of Asp in the sequence, either in the first or third position, seems to be related to a higher degree of cluster overlap in the case of the ternary system. The RHD peptide clustered in the close proximity of DHR, whereas DHD groups alongside GHD close to GHG (also confirmed by HCA, see Fig. S9B†).

Since the results presented above suggested that both approaches likely provided additional complementary information (better discrimination of different peptides), we finally performed a fusion of DPV data obtained for Cu(II)-His2 peptide and Cu(II)-His2 peptide/phosphate systems. In line with the previous cases, the position of the Cu(II) oxidation peaks impacts mostly PC1, as confirmed by loadings in Fig. S8A.† More changes were noticed in the loadings on PC2 (Fig. S8B†), suggesting that other parts of the voltammetric curves affect the grouping of the peptides against PC2 for data fusion compared to that for binary and ternary systems separately. By analyzing Fig. 6C, it is evident that this approach resulted in a better separation of the His2 peptides (a smaller degree of cluster overlap). Each investigated peptide was the most easily recognized compared to the previous cases. Only objects representing RHD and DHR overlapped, which is interesting considering that they contain the same residues in the proximity of His2, but at different positions. Similar conclusions were derived from the HCA given in Fig. S9C.† However, employing a different approach for the HCA analysis, the clustering based on current values, allowed us to discriminate the RHD and DHR sequences (see Fig. S9D†).

Thus, we showed that the analysis of voltammetric data for Cu(II) complexes of His2 peptides provides a solid foundation for the development of voltammetric detection systems employing chemometric analysis for the recognition of peptide sequences. As described at the end of previous sections, one could expect that additional features of side chains could prevail for other peptides in the binary and ternary systems. For example, the introduction of the redox-active residues (*i.e.* Tyr, Trp, and Met) would generate an additional signal on the voltammetric curves, more bulky side chains could alter the stability of binary complexes, and the exchange of negatively charged Asp residues to uncharged polar Asn residues could change the electrochemical response to phosphates. Moreover, different patterns of the electrochemical signals can be obtained by tuning the structure/environment of the coordination site, leading to the discrimination of various sets of samples. One could also utilize the fusion of data from different experimental conditions and/or variously modified electrodes to considerably improve the peptide sequence identification by means of an electronic tongue-sensing strategy.

Conclusions

The results obtained in this work showed the high potential of voltammetric methods in both recognition of phosphate species using a novel class of peptide-based receptors (Cu(II) complexes of His2 peptides) and the discrimination of His2 peptide sequences based on the Cu(II) oxidation signals of their complexes.

We demonstrated that the type of His2 adjacent residue influenced the formation of Cu(II) complexes studied by UV-vis spectroscopy, as well as their redox activity investigated by voltammetric techniques, CV and DPV. The most notable changes among the His2 peptides were observed in the oxidation signals of their Cu(II) complexes. Due to the typically high Cu(II) oxidation values for His2 peptide complexes at pH 7.4, this reaction is believed to be of negligible importance for biological processes. However, we believe that our research will draw attention to its high potential as a source of analytical signal in various sensing applications.

The Cu(II) oxidation potential varied among the Cu(II)-His2 peptide chelates upon the addition of the anions. The most promising results were obtained for the Cu(II) complexes of the Arg1 analogs without the Asp residue, which exhibit the highest selectivity towards phosphates. Moreover, the analysis of voltammetric data, including chemometric modeling of the DPV curves of the copper complexes with and without phosphate anions, showed that these measurements could also be employed to recognize His2 peptide sequences. The results presented in this article for the first time disclose that such similar peptide analogs can be distinguished using voltammetry coupled with chemometrics.

The variety of peptide sequences is, however, much wider than that of His2 peptides. Even the family of A β peptides provides a vast diversity of redox properties of their copper complexes, which could be applied to discriminate peptides or other biomolecules. Besides this, one could employ other redox active metal centers and change the pattern of the obtained results. Therefore, taking into account the sensitivity of the electrochemical methods to minor changes in the environment of the redox center, we believe that our work gives a fresh perspective on studies on metal-peptide complexes and their potential applications.

Data availability

The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Author contributions

N. E. W., A. T., W. B., and W. W. formulated the concepts of the study. The experimental work was performed by A. T. The analyses of spectroscopic and electrochemical data were performed by A. T. and N. E. W. K. G. formulated the concept of

peptide discrimination by chemometric analysis. The chemometric analysis was performed by K. G. and P. C. S. The original draft was written by A. T., K. G., and N. E. W. All authors participated in the review and editing of the paper and have given approval regarding the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This research was financed by the National Science Centre in Poland under the project PRELUDIUM (No. 2021/41/N/ST4/00956) and implemented as part of the Operational Program Knowledge Education Development 2014–2020 (Project No. POWR.03.02.00-00-I007/16-00) co-financed by the European Social Fund (A. T.). P. C. S. acknowledges the financial support from the National Science Centre, Poland, in the frame of SONATA BIS project No. UMO-2018/30/E/ST4/00481. K. G. acknowledges the financial support from the IDUB project (Scholarship Plus programme). We gratefully acknowledge Paulina Szczerba and Dawid Płonka from Prof. Wojciech Bal's group (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences) for performing the synthesis and purification of the peptides. A. T. would like to thank Prof. Sławomir Sęk (Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw) for his support and helpful discussions.

Notes and references

- 1 N. C. Wildburger, T. J. Esparza, R. D. Leduc, R. T. Fellers, P. M. Thomas, N. J. Cairns, N. L. Kelleher, R. J. Bateman and D. L. Brody, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 9520.
- 2 E. Portelius, N. Bogdanovic, M. K. Gustavsson, I. Volkman, G. Brinkmalm, H. Zetterberg, B. Winblad and K. Blennow, *Acta Neuropathol.*, 2010, **120**, 185–193.
- 3 E. Stefaniak and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 13561–13577.
- 4 N. E. Wezynfeld, A. Tobolska, M. Mital, U. E. Wawrzyniak, M. Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 14000–14011.
- 5 M. Mital, N. E. Wezynfeld, T. Frączyk, M. Z. Wiloch, U. E. Wawrzyniak, A. Bonna, C. Tumpach, K. J. Barnham, C. L. Haigh, W. Bal and S. C. Drew, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 10460–10464.
- 6 K. Bossak-Ahmad, M. Mital, D. Płonka, S. C. Drew and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 932–943.
- 7 E. Stefaniak, D. Płonka, P. Szczerba, N. E. Wezynfeld and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 4186–4190.
- 8 M. Z. Wiloch and M. Jönsson-Niedziółka, *J. Electroanal. Chem.*, 2022, **922**, 116746.



- 9 M. Z. Wiloch, N. Baran and M. Jönsson-Niedziółka, *ChemElectroChem*, 2022, **9**, e202200623.
- 10 C. Hureau, V. Baland, Y. Coppel, P. L. Solari, E. Fonda and P. Faller, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 995–1000.
- 11 M. Z. Wiloch, U. E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, S. C. Drew and W. Wróblewski, *J. Electrochem. Soc.*, 2016, **163**, G196–G199.
- 12 E. Atrián-Blasco, M. Del Barrio, P. Faller and C. Hureau, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 5909–5915.
- 13 C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P. L. Solari, E. Guillon, P. Faller and P. Dorlet, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 10151–10160.
- 14 K. P. Neupane, A. R. Aldous and J. A. Kritzer, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **139**, 65–76.
- 15 C. Esmieu, G. Ferrand, V. Borghesani and C. Hureau, *Chem. – Eur. J.*, 2021, **27**, 1777–1786.
- 16 A. Tobolska, N. E. Wezynfeld, U. E. Wawrzyniak, W. Bal and W. Wróblewski, *Dalton Trans.*, 2021, **50**, 2726–2730.
- 17 I. Ufnalska, U. E. Wawrzyniak, K. Bossak-Ahmad, W. Bal and W. Wróblewski, *J. Electroanal. Chem.*, 2020, **862**, 114003.
- 18 M. J. Langton, C. J. Serpell and P. D. Beer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 1974–1987.
- 19 P. D. Beer and P. A. Gale, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 486–516.
- 20 M. Christov and H. Jüppner, *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.*, 2018, **32**, 685–706.
- 21 M. V. Ramakrishnam Raju, S. M. Harris and V. C. Pierre, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 1090–1108.
- 22 A. Tobolska, N. E. Wezynfeld, U. E. Wawrzyniak, W. Bal and W. Wróblewski, *Inorg. Chem.*, 2021, **60**, 19448–19456.
- 23 S. Kubik, C. Reyheller and S. Stüwe, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2005, **52**, 137–187.
- 24 K. Bossak, M. Mital, J. Poznański, A. Bonna, S. Drew and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 7829–7831.
- 25 K. Bossak-Ahmad, M. D. Wiśniewska, W. Bal, S. C. Drew and T. Frączyk, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 6190.
- 26 R. Kotuniak, T. Frączyk, P. Skrobecki, D. Płonka and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 15507–15516.
- 27 C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari, E. Guillon, P. Faller and P. Dorlet, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 10151–10160.
- 28 I. Ufnalska, S. C. Drew, I. Zhukov, K. Szutkowski, U. E. Wawrzyniak, W. Wróblewski, T. Frączyk and W. Bal, *Inorg. Chem.*, 2021, **60**, 18048–18057.
- 29 S. Carlotto, A. Bonna, K. Bossak-Ahmad, W. Bal, M. Porchia, M. Casarin and F. Tisato, *Metallomics*, 2019, **11**, 1800–1804.
- 30 Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long and J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8353–8361.
- 31 S. Mena, A. Mirats, A. B. Caballero, G. Guirado, L. A. Barrios, S. J. Teat, L. Rodriguez-Santiago, M. Sodupe and P. Gamez, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 5153–5162.
- 32 P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, L. Raibaut, W. Bal and P. Faller, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 8029–8041.
- 33 R. Bro and A. K. Smilde, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 2812–2831.
- 34 M. Wang, X. Cetó and M. del Valle, *Biosens. Bioelectron.*, 2022, **198**, 113807.
- 35 K. Drab and M. Daszykowski, *J. AOAC Int.*, 2014, **97**, 29–38.



Dorobek naukowy autorki

Artykuły naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej

1. N.E. Wezynfeld A. Tobolska, M. Mital, U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, D. Płonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wróblewski, W. Bal, A β_{5-x} Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu(II) Complexes, Inorg. Chem. 59 (2020) 14000-14011. **IF: 5,346**
2. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Copper(II) complex of N-truncated amyloid- β peptide bearing a His-2 motif as a potential receptor for phosphate anions, Dalton Trans. 50 (2021) 2726-2730. **IF: 4,569**
3. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning Receptor Properties of Metal–Amyloid Beta Complexes. Studies on the Interaction between Ni(II)-A β_{5-9} and Phosphates/Nucleotides, Inorg. Chem. 60 (2021) 19448-19456. **IF: 5,346**
4. A. Kasprzak, A. Tobolska, H. Sakurai, W. Wróblewski, Tuning the sumanene receptor structure towards the development of potentiometric sensors, Dalton Trans. 51 (2022) 468-472. **IF: 4,569**
5. A. Tobolska, K. Głowacz, P. Ciosek-Skibińska, W. Bal, W. Wróblewski, N.E. Wezynfeld, Dual mode of voltammetric studies on Cu(II) complexes of His2 peptides: phosphate and peptide sequence recognition, Dalton Trans. (2022) DOI: 10.1039/D2DT03078K. **IF: 4,569**

Publikacje w materiałach recenzowanych

1. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-Peptide Complexes – A Novel Class of Molecular Receptors for Electrochemical Phosphate Sensing, Chem. Proc. 5 (2021) 39_1-39_4.

Udział w projektach badawczych

1. Projektowanie selektywnych metalokompleksów peptydowych opartych na sekwencji amyloidu β z motywem koordynacyjnym His-2 jako receptorów w biosensorach elektrochemicznych, PRELUDIUM (nr 2021/41/N/ST4/00956), Narodowe Centrum Nauki, 2022/2024 - kierownik projektu
2. Badanie aktywności redoks trójskładnikowych kompleksów peptydów modelowych A β i Ctr, jonów Cu(II)/Ni(II) oraz wybranych neuroprzekaźników”, Politechnika Warszawska, Inicjatywa Doskonałości, Uczelnia Badawcza (ID-UB), BIOTECHMED-1 (nr. PSP 504/04496/1020/45.010407), 2020/2021 - wykonawca projektu

3. Obrazowanie (bio)elektrochemiczne jako narzędzie mikrofizjometrii komórkowej, OPUS (nr 2014/15/B/ST4/04807), Narodowe Centrum Nauki, 2019 - wykonawca projektu

Udział w konferencjach naukowych w kraju i zagranicą

1. U.E. Wawrzyniak., A. Tobolska, I. Ufnalska, E. Stefaniak, W. Bal, Voltammetric studies on selected fragments of CTR1 protein and their complexes with copper(II) ions, *2nd International Symposium on Bioactive Peptides*, Walencja, Hiszpania, 2019.
2. A. Tobolska, U.E. Wawrzyniak, S. Sęk, W. Bal, W. Wróblewski, Metalokompleksy peptydowe jako nowa klasa receptorów anionów fosforanowych - badania elektrochemiczne, *ChemSession*, Warszawa, Polska, 2019.
3. A. Tobolska, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Badania elektrochemiczne metalokompleksów peptydowych działających jako receptory anionów fosforanowych, *62 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego*, Warszawa, Polska, 2019.
4. U.E. Wawrzyniak, M.Z. Wiloch, A. Tobolska, I. Ufnalska, W. Bal, W. Wróblewski, Elektrochemiczne badania dwu- i trójskładnikowych kompleksów pochodnych β -amyloidu z kationami metali przejściowych, *62 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego*, Warszawa, Polska, 2019.
5. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Kompleksy Amyloidu- β z jonami Ni(II) szansą na warstwę receptorową nowego elektrochemicznego biosensora?, *Pierwsza Wirtualna Konferencja Kampusu Ochota*, ON-LINE, 2020.
6. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Redox-active Cu(II) complex of N-truncated Amyloid- β peptide bearing a His-2 binding motif as a potential phosphate receptor, *72nd ISE Annual Meeting in Jeju*, Dżedżu, Korea Południowa (udział ON-LINE), 2021.
7. A. Tobolska, A. Jabłońska, N.E. Wezynfeld, W. Wróblewski, Wpływ substancji niskocząsteczkowych na właściwości redoks kompleksów pochodnej β -amyloidu z jonami miedzi(II), *Drua Wirtualna Konferencja Kampusu Ochota*, ON-LINE, 2021.
8. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, U.E. Wawrzyniak, W. Bal, W. Wróblewski, Metal-peptide complexes - a novel class of molecular receptors for electrochemical phosphate sensing, *1st International Electronic Conference on Chemical Sensors and Analytical Chemistry*, ON-LINE, 2021.

9. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, W. Bal, W. Wróblewski, Tuning the structure of metal-peptide complexes towards the development of efficient receptors for phosphate species, *7th International Conference on Bio-Sensing Technology*, Sitges, Hiszpania, 2022.
10. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, W. Bal, W. Wróblewski, Projektowanie receptorów molekularnych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe, *XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej*, Lublin, Polska, 2022.
11. A. Tobolska, N.E. Wezynfeld, W. Bal, W. Wróblewski, Influence of the amino acid sequence on the redox activity of Cu(II)-A β complexes and their receptor properties towards phosphates, *International Conference on Metal-Binding Peptides: Methodologies and Applications*, Nancy, Francja, 2022.