

Warszawa, dn. 18.10.2021 r.

mgr inż. Iwona Magdalena Ufnalska
Katedra Biotechnologii Medycznej
Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

*„Badanie procesu redukcji jonów Cu(II) związanych z tripeptydem GHK
z udziałem glutationu”*

Prace realizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wpisują się w nurt badań dotyczących homeostazy jonów miedzi w organizmach żywych. Miedź, należąca do pierwiastków śladowych, warunkuje prawidłowe funkcjonowanie wszystkich komórek ludzkiego organizmu. Jony tego metalu aktywnie uczestniczą m.in.: w procesach oddychania komórkowego, melanogenezy, neutralizacji wolnych rodników czy gospodarce jonów żelaza, przy czym nawet niewielkie naruszenie stanu równowagi tego pierwiastka może skutkować zaburzeniem przebiegu podstawowych procesów życiowych komórek. Dlatego organizmy żywe wypracowały precyzyjny mechanizm, pozwalający na regulację stężenia jonów miedzi zarówno na poziomie komórkowym, jak i w obrębie całego organizmu.

Zagadnieniem, które szczegółowo przedstawiono i dyskutowano w przeglądzie literaturowym rozprawy był sposób pozyskiwania jonów miedzi przez komórki. Przytoczone wyniki dotychczasowych badań wskazują, iż jony metalu dostarczane są do cytoplazmy poprzez kanał utworzony przez białko hCTR1 w postaci Cu(I). Oznacza to, że transport przez błonę komórkową poprzedzony jest redukcją zewnątrzkomórkowej formy Cu(II) do Cu(I), której mechanizm do tej pory nie został całkowicie wyjaśniony. Zgodnie z jedną z hipotez, transfer elektronu może się odbywać przy udziale bliżej niezidentyfikowanej metaloreduktazy obecnej na powierzchni komórki (analogicznie jak w przypadku drożdży). Wedle innej koncepcji, redukcja jonów Cu(II) zachodzi na skutek oddziaływań naturalnie występujących w środowisku zewnątrzkomórkowym chelatorów jonów Cu(II) z biologicznymi reduktorami (takimi jak kwas askorbinowy czy glutation). Powyższa ścieżka wydaje się być istotna w odniesieniu do ligandów peptydowych, których kompleksy z jonami miedzi(II) charakteryzuje duża różnorodności strukturalna, decydująca m.in. o właściwościach redoks centrum metalicznego czy ich aktywności biologicznej.

W myśl jednej z przytoczonych koncepcji, celem prowadzonych prac eksperymentalnych w ramach rozprawy doktorskiej było określenie charakteru interakcji glutationu z naturalnie występującym w ludzkim osoczu kompleksem Cu(II) z tripeptydem GHK (gdzie: G – glicyna, H – histydyna, K – lizyna), jako potencjalnej drogi dostarczania jonów Cu(I) do komórek organizmów żywych. Wybór peptydu GHK podyktowany był dobrze udokumentowaną aktywnością biologiczną powyższego kompleksu, a także jego unikalnymi właściwościami koordynacyjnymi związanymi ze zdolnością tworzenia kompleksów trójskładnikowych. Przebieg reakcji GSH z Cu(II)GHK badano głównie przy użyciu technik spektroskopowych, wśród których wiodącą rolę odegrała spektroskopia UV-Vis. Niemniej jednak, w celu dokładnego opisu mechanizmu badanego procesu posłużono się dodatkowo technikami Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR) oraz Jądrowego Rezonansu Magnetycznego (NMR). Podatność centrum metalicznego na proces redukcji badano natomiast przy użyciu metod woltamperometrycznych.

Pierwszy etap prowadzonych prac obejmował analizę różnic w widmach elektronowych odwzorowujących oddziaływanie Cu(II)GHK z GSH w zależności od środowiska reakcji, co uwidocznilo złożoność badanego procesu, a także wpływ cząsteczek buforu HEPES oraz anionów fosforanowych na proces redukcji kationów miedzi(II). Powstawanie jonów Cu(I) *in situ* potwierdzono przy pomocy kwasu bichoninowego (BCA), tworzącego z kationem Cu(I) kompleks o charakterystycznej fioletowej barwie i wysokim molowym współczynnikiem absorpcji. W kolejnych etapach prac rozważono wpływ szeregu czynników: temperatury, stężenia reagentów (w tym obecność tlenu), produktów ubocznych reakcji czy obecności imidazolu (tworzącego z Cu(II)GHK kompleksy trójskładnikowe), na szybkość oraz wydajność zachodzących procesów, w szczególności reakcji redukcji centrum metalicznego. Jednak niejednoznaczność interpretacji uzyskanych wyników skłoniła do rozszerzenia prowadzonych prac badawczych o inne układy koordynacyjne (CuGGH) oraz dodatkowe związki tiolowe (merkaptoetanol, sól sodowa metanotiolu), które okazały się być bardzo pomocne przy ostatecznej analizie danych eksperymentalnych. Z kolei decydującą rolę w ustalaniu struktur koordynacyjnych jonów Cu(II) oraz Cu(I) odegrały wyniki otrzymane z wykorzystaniem technik EPR oraz NMR, które potwierdziły odpowiednio tworzenie krótkożyciowego (w odniesieniu do skali czasowej pomiarów) kompleksu trójskładnikowego Cu(II)GHK z GSH za pośrednictwem grupy tiolowej oraz klastru Cu(I) z GSH o stechiometrii Cu₄GSH₆. Na tej podstawie, powiązано koordynację GSH do kompleksu binarnego z przesunięciem sygnału

katodowego na woltamperogramie cyklicznym w kierunku potencjałów dodatnich, co świadczy o zwiększonej podatności centrum metalicznego na proces redukcji.

W oparciu o zgromadzony materiał badawczy zaproponowano mechanizm interakcji Cu(II)GHK z GSH, który w dużej mierze inspirowany był niedawnym odkryciem formy 2N w procesie koordynacji Cu(II) przez GGH oraz bliskiego analogu tripeptydu GHK – sekwencji GHTD. Istotnym osiągnięciem było określenie struktury oraz właściwości redoks tworzącego się przejściowego kompleksu trójskładnikowego z GSH, którego względnie niska trwałość kompensowana jest stosunkowo długim czasem życia (z punktu widzenia interakcji w układach biologicznych); stanowiło to ważny punkt w dyskusji na temat jego potencjalnego znaczenia biologicznego. Uzyskane wyniki wskazują, że kompleks GSH-Cu(II)GHK prawdopodobnie nie jest jedyną, ale za to kluczową formą kompleksową w procesie redukcji kationu miedzi(II) w badanym układzie. Warto więc podkreślić, że opisane w rozprawie doktorskiej interakcje Cu(II)GHK z GSH mogą nie tylko tłumaczyć w jaki sposób jony Cu(I) są dostarczane do białka transbłonowego hCTR1, ale także stanowić wyjaśnienie mechanizmu działania Cu(II)GHK w organizmie ludzkim.

Słowa kluczowe: homeostaza miedzi, redukcja jonów Cu(II), transport Cu(I) do komórek, kompleksy Cu(II)-peptydy, kompleksy trójskładnikowe, glutation, tripeptyd GHK