

Streszczenie

Wszystkie organizmy eukariotyczne i wiele prokariotycznych potrzebuje miedzi do życia. Jony tego metalu zaangażowane są m.in. w ochronę przed stresem oksydacyjnym, oddychanie czy krzepnięcie krwi; jednakże miedź może być również toksyczna. Nadmierna jej ilość lub jej zła dystrybucja może doprowadzić do rozwinięcia choroby Menkes czy Wilsona. Dodatkowo niekontrolowany nadmiar miedzi może wzmacniać uszkodzenia oksydacyjne kwasów nukleinowych, białek i lipidów poprzez negatywny wpływ Reaktywnych Form Tlenu. Dualistyczna natura miedzi wymusiła na organizmach wypracowanie zaawansowanych technik jej dystrybucji oraz rozdzielania pomiędzy przedziałami komórkowymi.

Najczęściej studiowaną sekwencją wiążącą jony miedzi jest motyw Xaa-Zaa-His, który posiada resztę histydyny w trzeciej pozycji od końca aminowego tak jak np. w albuminie surowicy ludzkiej (DAHK-), białku transportującym. Gdy reszta histydyny jest w pozycji drugiej od końca aminowego (His2), to wówczas powstają kompleksy miedziowe typu 3N gdzie Cu(II) koordynowana jest przez trzy atomy azotu (aminowy, amidowy oraz imidazolowy). W przeciwieństwie do wiązań typu 4N, tak jak w przypadku sekwencji His3, peptydy i białka His2 mają „wolne” czwarte miejsce wiązania (najczęściej w tym miejscu dołączona jest cząsteczka rozpuszczalnika) co sprzyja tworzeniu się kompleksów ternarnych z zewnętrznymi ligandami.

Podczas moich badań pracowałam z trzema peptydami His2: feromonem drożdżowym - faktorem α (WHWLQLKPGQPMY), ludzkim czynnikiem gojenia się ran (CHK) oraz modelowym peptydem typu bis-His (AHH). Wszystkie studiowane przeze mnie peptydy okazały się dobrymi chelatorami miedzi(II) z warunkową stałą wiązania rzędu $^{\circ}K_{7,4} \sim 10^{12}-10^{13} \text{ M}^{-1}$. Dodatkowo, wszystkie studiowane peptydy wykazały zdolność tworzenia kompleksów ternarnych ze związkami zawierającymi imidazol. Co ważniejsze, tworzenie się takich kompleksów podwyższało efektywną stałą wiązania do $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$, przewyższając tym samym stałe dla miedziowych kompleksów albuminy czy hCTR1. Podobne wyniki zostały otrzymane dla oddziaływań pomiędzy Cu(GHK) i kwasem *cis*-urokanowym (UCA).

Odkrycia te mogą mieć szersze implikacje w sposobie dystrybucji miedzi i wpływu małych nośników miedziowych na homeostazę tego metalu. Bazując na obliczeniach uzyskanych dla kompleksów Cu(GHK)(UCA) można wnioskować, że tworzenie kompleksów ternarnych może być korzystniejsze, co przekłada się na ich zwiększone znaczenie biologiczne

Summary

All eukaryotic and the majority of prokaryotic organisms need copper for survival. It is involved in crucial biological functions such as oxidative stress protection, respiration or blood clotting but copper may also be toxic. Excessive amounts of this metal or a misplaced distribution may cause life threatening diseases such as Menkes or Wilson's, and may induce oxidative damage to nucleic acids, proteins or lipids via Reactive Oxygen Species formation. Such dualistic nature of copper forced organisms to adjust and create elaborated distribution network that allows for strict compartmentalization.

Peptides and proteins are very efficient receptors of Cu ions specifically when having a histidine residue within its sequence. The most studied copper binding sequence is Xaa-Zaa-His- a motif with histidine residue at the third position from the N-terminus. Such sequence can be found in e.g. Human Serum Albumin (sequence Asp-Ala-His-), a copper transporter in human serum. When His residue is in the second position (His2), the 3N type complexes are formed, where Cu(II) is coordinated *via* three nitrogen donor atoms from N-terminal amine, amide and histidine's imidazole. In contrast to the His3 (4N) coordination, the His2 peptides have a fourth binding site "free" (usually occupied by solvent molecule). Such a situation creates a possibility for ternary complex formation with external ligands.

During my studies I investigated three His2 peptides: yeast pheromone known as α -factor (WHWLQLKPGQPMY), human wound healing factor (GHK) and a model bis-His peptide (AHH). All of those peptides turned out to be good Cu(II) chelators with $^{\circ}K_{7.4} \sim 10^{12}$ - 10^{13} M^{-1} . Despite the differences in the surrounding amino acid residues they were able to form ternary complexes with external ligands, specifically with imidazole. Formation of the ternary complex Cu(Peptide)(Im) increased the effective affinity constant towards copper to $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$, exceeding the affinity of His3 complexes such as HSA or hCTR1. A similar result was observed for the interaction of Cu(GHK) with *cis*-urocanic acid (UCA).

My findings have further implications on general copper distribution and the role of small copper carriers in copper homeostasis. Also, based on calculated binding constants for Cu(GHK)(UCA), one can postulate that ternary complexes of those molecules are biologically relevant active forms, which further translates into a mechanistic explanation of some of the functions of the above mentioned molecules.