

***Charakterystyka fizykochemiczna redoks – aktywnych układów typu miedź – peptyd.
Implikacje dla wolnorodnikowego mechanizmu kancerogenezy***

mgr Paulina Katarzyna Walencik

Promotor: dr hab. Alina Bieńko, Prof. UWr

Promotor pomocniczy: dr Maciej Witwicki

Nadrzędnym celem przedstawionej dysertacji była systematyczna analiza wpływu trwałości termodynamicznej oraz struktury kompleksów Cu^{II} i Cu^{I} na ich aktywność redoks w układach biologicznych. W badaniach wykorzystano dziewięć różnych ligandów peptydowych, które zaprojektowane zostały jako syntetyczne mimetyki aktywnych fragmentów bakteryjnych białek FomA i Aim1. Oba białka wytwarzane są przez bakterię beztlenową z rodzaju *Fusobacterium nucleatum*, a ich oddziaływanie z jonami miedzi uznane zostało za potencjalny czynnik wzrostu komórkowego metabolizmu tlenowego i inicjacji stresu oksydacyjnego. Zastosowana strategia pozwoliła otrzymać i scharakteryzować szereg struktur imitujących redoks-aktywne centra metaloprotein. Wykorzystane ligandy peptydowe stanowiły reprezentacje układów zawierających histydylowe i metionylowe motywy strukturalne typu $-\text{H}(\text{X})_n\text{H}-$ oraz $-\text{H}(\text{X})_n\text{M}-$ (gdzie H, M i X oznaczają odpowiednio histydynę, metioninę oraz dowolną resztę aminokwasową), które cechowały się wysokim powinowactwem względem jonów miedzi.

Realizacja głównego celu pracy, jakim była charakterystyka strukturalna i elektrochemiczna peptydowych kompleksów z jonami Cu^{II} i Cu^{I} , wymagała wszechstronnego podejścia eksperymentalnego. Sposób koordynacji jonów Cu^{I} do ligandów peptydowych oraz stechiometria utworzonych form kompleksowych określona została poprzez zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), a dokładniej eksperymentów ^1H NMR oraz ^1H - ^1H TOCSY. Trwałość termodynamiczna, wyrażona wartością parametrów warunkowych stałych dysocjacji, wyznaczona została przy wykorzystaniu metody miareczkowania kompetycyjnego z użyciem dwóch różnych ligandów chelatujących.

Procesy równowagowe towarzyszące koordynacji jonu Cu^{II} do sekwencji peptydowych scharakteryzowane zostały za pośrednictwem parametrów kumulatywnych i stopniowych stałych trwałości, które wyznaczane były przy wykorzystaniu metody miareczkowania potencjometrycznego. Sposób koordynacji jonu Cu^{II} w powstających kompleksach poddawany był szczegółowej analizie strukturalnej poprzez wykorzystanie komplementarnych technik spektroskopowych: spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis, spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Aktywność elektrochemiczna struktur typu Cu^{II} -peptyd i Cu^{I} -peptyd określona została przy wykorzystaniu metod cyklicznej woltamperometrii (CV) i woltamperometrii różnicowej

pulsowej (DPV). Ponadto dla części z kompleksów przeprowadzone zostały eksperymenty reaktywności względem tlenu cząsteczkowego O₂ i kwasu askorbinowego HAsc.

Korelacja danych elektrochemicznych, spektroskopowych i potencjometrycznych pozwoliła zidentyfikować, w jaki sposób struktura kompleksów i obecność poszczególnych ugrupowań donorowych wpływa na aktywność redoks miedziowego centrum metalicznego i jego potencjał redukcji. Dla większości związków kompleksowych zidentyfikowana została quasiodwracalna przemiana redoks typu $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$, której towarzyszyło utworzenie elektrochemicznych stanów pośrednich.

Wykazano, że związanie jonów Cu^{II} i Cu^I według *bis*-His modelu koordynacji zapewnia swobodną oscylację centrum metalicznego pomiędzy stopniami utlenienia +I i +II. Procesy równowagowe, podczas których w sferze koordynacyjnej akwajonu Cu^{II} cząsteczka wody wymieniana jest na ugrupowanie amidowe powodowały spadek potencjału redoks centrum metalicznego i obniżenie szybkości transferu elektronowego. Wywnioskowano również, że stabilność stopnia utlenienia +II rosła wraz ze wzrostem liczby skoordynowanych azotów amidowych.

Mimo preferencji jonu Cu^I względem ugrupowań siarkowych, mieszane motywy strukturalne -H(X)_nM- nie zapewniały tak skutecznej koordynacji jonu metalu, jak modele typu -H(X)_nH-. Ponadto jednoczesna koordynacja jonu Cu^I do ugrupowania imidazolowego i tioeterowego obniżała efektywność konwersji redoks centrum metalicznego.

Badania reaktywności kompleksów względem HAsc i O₂ pozwoliły sformułować nowatorską koncepcję dotyczącą procesów wolnorodnikowych w układach biologicznych. Wykazano, że rola HAsc nie ogranicza się jedynie do zapoczątkowania cyklu redoks miedziowego centrum metalicznego. W zamian, związek ten razem z O₂ może być generatorem form rodnikowych, zdolnych do wywołania uszkodzeń oksydacyjnych. Ponadto wykazano, że fragmentem peptydów najbardziej narażonym na uszkodzenia oksydacyjne była reszta His.

Badania z wykorzystaniem związków kompleksowych jonów Cu^{II} i Cu^I stanowią cenne wzbogacenie wiedzy z zakresu chemii koordynacyjnej, bionieorganicznej i elektrochemii peptydowych kompleksów. Unikalny charakter pracy podkreśla również fakt, że zaprezentowane badania skoncentrowane były głównie na cyklu redoks miedziowego centrum metalicznego, który uznawany może być za kluczową przyczynę produkcji reaktywnych form tlenu i aktywności prooksydacyjnej różnorodnych układów biologicznych. Na podstawie otrzymanych danych scharakteryzowane zostały mechanizmy konwersji $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-peptyd} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}\text{-peptyd}$ dla wszystkich typów kompleksów utworzonych w pH= 7.50, uznawanym za pH fizjologiczne. Zidentyfikowano również aspekty strukturalne, które w największym stopniu decydują o charakterze przemian redoks i aktywności prooksydacyjnej.