

Received: 2013.04.18
Accepted: 2013.08.20
Published: 2013.11.20

Cu-GnRH – nowy analogon gonadoliberiny (GnRH)

Cu-GnRH – new gonadoliberin (GnRH) analog

Kazimierz Kochman

Instytut Fizjologii i Żywnienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Neuroendokrynologii

Streszczenie

W pracy opisano badania skoncentrowane wokół aspektów fizjologicznych i strukturalnych kompleksów metali z GnRH, które otrzymał prof. Henryk Kozłowski z Uniwersytetu Wrocławskiego. Stwierdzono, że kompleksy miedzi, niklu, cynku i kobaltu stymulowały uwalnianie LH i FSH w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Najbardziej trwałe i obiecujące okazał się kompleks miedzi z GnRH (Cu-GnRH), miał większe powinowactwo do swoistego receptora niż natywny GnRH, większą siłę uwalniającą oraz stymulował odmienną ścieżkę sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Ocenia się, że jest on bardzo obiecującym analogonem GnRH i powinien być wykorzystywanym w dalszych badaniach.

Słowa kluczowe:

GnRH · receptor GnRH · analogon GnRH · Cu-GnRH · Ni-GnRH · Co-GnRH · sygnalizacja wewnątrzkomórkowa

Summary

Our research was concentrated about physiological and structural aspects of metal complexes with GnRH, which were synthesized by Professor Henryk Kozłowski from the University of Wrocław. We found that copper, nickel, zinc and cobalt complexes with GnRH stimulated the release of LH and FSH both *in vivo* and *in vitro*. The most stable and active was Cu-GnRH. It also exhibited the higher affinity to specific receptor than GnRH, had higher releasing power for LH and FSH and stimulated differently the intracellular signaling.

We suggest, that this complex is highly promissive as a new analog of GnRH with possible application to further research.

Key words:

GnRH · receptor GnRH · GnRH analogs · Cu-GnRH · Ni-GnRH · Co-GnRH · intracellular signaling

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1076905>

Word count:

2955

Tables:

–

Figures:

11

References:

52

Adres autora:

prof. dr hab. Kazimierz Kochman, Instytut Fizjologii i Żywnienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Neuroendokrynologii, ul. Instytucja 3, 05-110 Jabłonna; e-mail: office@ifzz.pan.pl

Wykaz skrótów:

cAMP - cykliczny adenozyńmonofosforan; **DSMO** - nazwa roztworu używanego do badań; **GnRH** - gonadoliberyna; **¹HNMR** - odmiana NMR; **MR** - jądrowy rezonans magnetyczny; **mRNA** - informacyjny mRNA; **TOCS4**, **ROES4**, **DYANA**, **MALDI-TOFMS** – metody badań struktury peptydów.

WPROWADZENIE

GnRH (gonadoliberina; hormon uwalniający gonadotropiny; mGnRH; GnRH I; pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) został wyizolowany najpierw z podwzgórz owczych, bydłych i świńskich jest w wielu laboratoriach, wśród nich i w naszym [25,26,28], lecz w połowie lat 60 ubiegłego wieku tylko dwa laboratoria mogły skutecznie pracować nad strukturą GnRH. Jego struktura pierwszorzędowa została ustalona przez te dwie niezależne grupy badawcze kierowane przez profesorów Andrew V. Schally'ego i Rogera Guillemina [6,36], którzy zostali uhonorowani za te badania Nagrodą Nobla w roku 1977. Uważano wtedy, że istnieje tylko jedna struktura GnRH u wszystkich zwierząt i u ludzi spełniająca jedną rolę fizjologiczną w regulacji uwalniania i biosyntezy LH i FSH z przedniego płata przysadki mózgowej.

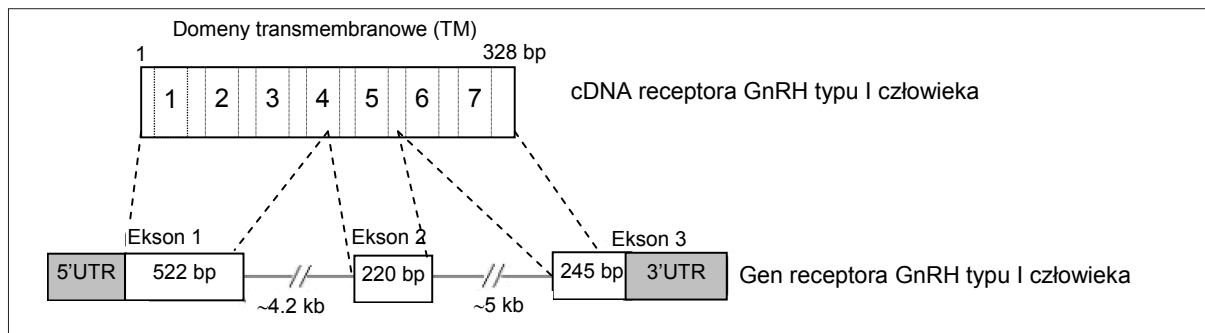
PODSTAWOWE WIADOMOŚCI O GnRH I JEGO RECEPTORZE

GnRH jest głównym peptydem podwzgórzowym przekazującym dyspozycję nerwową do zapoczątkowania całej skomplikowanej kaskady reakcji wewnątrzkomórkowych po jego związaniu się ze swoistym receptorem na powierzchni komórki przedniej części przysadki. Jest on syntetyzowany jako duża cząsteczka prohormonu w neuronach okolicy przedwzrostkowej podwzgórza, a następnie poddany przekształceniom w neuronach z tego dużego prohormonu do aktywnego decapeptydu przez odpowiednie enzymy do postaci aktywnej, a następnie przechowywany w granulach sekrecyjnych, skąd jest transportowany do zewnętrznej wyniosłości pośrodkowej [34,40]. Peptyd ten jest uwalniany w sposób pulsacyjny, w pulsach zsynchronizowanych, z zakończeń nerwowych, z których przez krążenie wrotne

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	Ssak*	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	NH ₂		
2	Kurczak I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	NH ₂		
3	Świnka morska	pGlu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly	NH ₂		
4	Żaba	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly	NH ₂		
5	Seabream ²	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
6	Łosoś***	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH ₂		
7	Ryżanka jap. ¹	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
8	Żebacz	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	NH ₂		
9	Whitefish	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Met	Asn	Pro	Gly	NH ₂		
10	Śledź	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
11	Pies morski	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH ₂		
12	Minóg morski II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Phe	Pro	Gly	NH ₂		
13	Kurczak II**	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly	NH ₂		
14	Minóg morski III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Lys	Pro	Gly	NH ₂		
15	Minóg morski I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly	NH ₂		
16	Chelyosoma I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly	NH ₂		
17	Chelyosoma II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly	NH ₂		
18	Żachwa I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
19	Żachwa II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
20	Żachwa III	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly	NH ₂		
21	Żachwa IV	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Met	Pro	Gly	NH ₂		
22	Żachwa V	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Met	Pro	Gly	NH ₂		
23	Żachwa VI	pGlu	His	Trp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly	NH ₂		
24	Żachwa VII	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly	NH ₂		
25	Ośmiornica	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Pro	Gly	NH ₂
26	Jeż morski	pGlu	Val	His	His	Arg	Phe	Ser	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	NH ₂
27	Zając morski	pGlu	Asn	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Tyr	Ala	-	NH ₂
28	Skałoczep	pGlu	His	Tyr	His	Phe	Ser	Asn	Gly	Trp	Lys	Ser	-	NH ₂
29	Robak morski	pGlu	Ala	Tyr	His	Phe	Ser	His	Gly	Trp	Phe	Pro	-	NH ₂
30	Pijawka	pGlu	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Asn	Ser	Trp	Gln	Pro	-	NH ₂

* ssak GnRH – mGnRH: **GnRH I**; ** kurczak II – cGnRH II: **GnRH II**; *** łosoś GnRH – sGnRH: **GnRH III**

Ryc. 1. Sekwencja reszt aminokwasowych (w kodzie trzyliterowym) naturalnie występujących GnRH, które pojawiły się w ciągu 600 mln lat ewolucji zwierząt. Pogrubione litery skrótów aminokwasów (lewa i prawa strona) pokazują zachowawcze końcowe reszty NH₂- i COOH, które pełnią istotną rolę funkcyjną. Pozostałe reszty są albo niezbyt istotne, albo są ważne tylko dla poszczególnego receptora GnRH. GnRH są nazwane tak jak nazwy gatunkowe zwierząt, u których były odkryte po raz pierwszy, chociaż występują nie tylko u jednego gatunku, np. ssaczy GnRH I jest powszechnie obecny u płazów i prymitywnych ryb ościstych; kurczący GnRH II (chicken II) jest obecny u większości kręgowców, łącznie z człowiekiem; łososiowy GnRH (GnRH III) jest prawdopodobnie obecny u wszystkich ryb kostnoszkieletowych (wg [40,48] – zmodyfikowano). 1) Ryżanka japońska – ryba, której długość nie przekracza 4 cm, charakteryzuje się krótkim okresem rozrodu; w 1994 roku 2 samice i 2 samce tej ryby odbyły 15-dniową podróż w kosmosie, przystąpiły do tarła; złożyły i zapłodniły ikry. Wszystkie osobniki i narybek wróciły żywe na ziemię. 2) Ryba z rodziny Sparidae (Ameryka Płn.). Whitefish: angielska nazwa ryby z rodziny Coregonidae. Numery GnRH: 1-15: kręgowce; 16-24: bezkręgowce, przedstrunowce (*Chelyosoma* i *Gona*); 25-30: bezkręgowce: ośmiornica – głowonóg (*Octopus vulgaris*); jeż morski-szkarłupień (*Strongylocentrotus purpuratus*); zając morski – mięczak (*Aplysia californica*); skałoczep – mięczak (*Lottia gigantea*); robak morski – piersienica (*Capitella teleta*), pijawka – piersienica (*Helobdella robusta*)



Ryc. 2. Struktury cDNA oraz genu ludzkiego receptora GnRH typu I, który jest zlokalizowany na chromosomie 4.21.2 i składa się 3 eksonów przedzielonych dwoma intronami. Ekson 1 zawiera 5'-UTR (region niepodlegający translacji) oraz koduje pierwsze 3 domeny TM (transmembranowe) oraz część czwartej domeny TM. Ekson 2 składa się z 220 par zasad (bp) i koduje pozostałą część czwartej domeny TM, piątą domenę TM oraz część trzeciego wewnątrzkomórkowego zwoju IC. Ekson 3 koduje pozostałe części otwartej ramki odczytu oraz zawiera 3'-UTR (wg [8] – zmodyfikowano)

co 30-120 min dostaje się do przedniej części przysadki. Tam stymuluje uwalnianie i biosyntezę hormonu luteinizującego (LH) i hormonu dopęcherzykowego (FSH) z gonadotropów po uprzednim związaniu się z receptorem GnRH typu I na błonie komórkowej. Każdy puls GnRH stymuluje sekrecję i biosyntezę LH i FSH [8,40], lecz pulsy FSH są mniej wyraźne. LH jest zgromadzony w przedniej przysadce i zależny od związania się GnRH z receptorem na błonie komórki przysadkowej, z której jest uwalniany. Częstotliwość pulsów jest największa podczas wyrzutu owulacyjnego, a najniższa w czasie fazy lutealnej cyklu płciowego. Zsynchronizowany układ wyrzutu LH i FSH wynika ze zmian pulsów GnRH, modulującego wpływu steroidów gonadowych i hormonów peptydowych na działanie stymulacyjne GnRH oraz różnice w okresie półtrwania tych hormonów [34,40].

W czasie intensywnych badań w latach następnych upewniono się, że istnieje wiele odmian tego peptydu u kręgowców; obecnie zidentyfikowano i określono strukturę 30 różnych struktur GnRH. Spośród nich 15 zostało zidentyfikowanych u kręgowców [40,48], 9 form GnRH zidentyfikowano u przedstrunowców, które są przodkami kręgowców [1,18], a także zidentyfikowano ciekawy homolog GnRH mający 12 reszt aminokwasowych u osmiornicy oraz 5 GnRH u innych bezkręgowców (ryc. 1) [1,22,48]. Częściki GnRH są obecne w wielu różnych tkankach u kręgowców, pełniąc w nich różne funkcje, łącznie z funkcją neuroendokrynną. Działają w sposób parakrynnny w łożysku i gonadach, w sposób autokrynnny w neuronach GnRH, komórkach immunogennych oraz pełnią rolę neuroprzekazników i neuromodulatorów w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, np. w zwojach sympatycznych i w śródmózgowiu [40]. Żadna z tych funkcji jednak nie zachodzi przez dostarczenie GnRH do komórki docelowej przez krążenie ogólne. Jedyna postać GnRH byłaby w stanie spełniać wszystkie te funkcje, ale przynajmniej dwie, a nawet trzy różne formy GnRH są obecne u większości kręgowców. GnRH II, wyizolowany początkowo z mózgu kurcząt, jest obecny u zdecydowanej większości gatunków zwierząt. Struktura GnRH II jest zachowana w sposób doskonały w czasie ewolucji i jest obecna u wszystkich gatunków, od ryb kostnoszkieletowych do człowieka. Jest najwcześniejszą wyewoluowaną postacią, nazwana później GnRH II, podczas gdy GnRH podwzgórzowy został nazwany GnRH I [40].

U większości kręgowców zidentyfikowano również trzecią postać GnRH, bardzo zachowawczą (łososiowy GnRH), a zlokalizowaną ją w zakończeniach nerwowych w przednim mózgowiu u ryb kostnoszkieletowych; nazwano ją GnRH III. GnRH III zachował pełną konserwację sekwencji, lecz jest obecny tylko u ryb kostnoszkieletowych, co oznacza, że jego gen został utworzony po ewolucyjnym zróżnicowaniu ryb kostnoszkieletowych i odłączeniu ich od ścieżki ewolucyjnej kręgowców. Należy odnotować interesujący fakt, że w genomie ryby łososiowatej nerki istnieją dwa geny kodujące ten sam GnRH (GnRH III) [40].

Gen receptora GnRH typu I u człowieka jest pojedynczą kopią zlokalizowaną na chromosomie 4q21.2 [2,24,33], przeciwnie do większości białek receptorów związanych z białkiem G (GPCR), które są bez intronów, składa się z trzech eksonów oddzielonych od siebie dwoma intronami i zajmuje więcej niż 15 kb wzdłuż chromosomu [8,15] (ryc. 2). Ekson 1 zawiera region niepodlegający translacji 5'-UTR oraz pierwsze 522 nukleotydy otwartej ramki odczytu, koduje również pierwsze trzy domeny transmembranowe (TM) oraz część czwartej domeny TM. Ekson 2 jest odpowiedzialny za kodowanie następnych 220 nukleotydów w ramce odczytu, zawiera resztę czwartej domeny TM, piątą domenę TM oraz część trzeciego zwoju wewnątrzkomórkowego (IC). Ekson 3 ma resztę sekwencji kodującej oraz 3'-UTR. Granice między eksonami i intronami w ludzkim genie receptora GnRH są dobrze zachowane [8]. Pięć miejsc sygnałnych poliadenylacji jest w okolicy 800 - bp i stanowią wiązkę ulokowaną w 3'-UTR genu ludzkiego receptora GnRH [15]. 3'-UTR zawiera wiele motywów w sekwencji nukleotydów (ATTTA), które są odpowiedzialne za niestabilność mRNA; wykryto je również w wielu innych RNA, które podlegają szybkiej degradacji [17,49]. Wielkość mRNA receptora GnRH wnioskowana z długości sekwencji od 5' do 3'-UTR jest około 5,5 kb, co się doskonale zgadza z opisanym dużym transkryptem (4,7-5 kb), który jest tworzony w wyniku ekspresji genu w ludzkiej przedniej przysadce mózgowej [8].

Związanie się liganda (GnRH) do odpowiadającego mu swoistego receptora, należącego do nadrodziny białek związanych z białkiem G - GPCR, takiego jak receptor GnRH, zawierającego siedem domen transmembranowych (TM), wywołuje

modyfikację konformacyjną tego receptora po powstaniu kompleksu, a to z kolei pozwalała receptorowi na interakcję z białkiem G i na indukcję wymiany nukleotydu guanylowego na podjednostce α białka G i w konsekwencji na uwolnienie podjednostki α oraz $\beta\gamma$ od kompleksu receptora z białkiem G. Białko G inicjuje aktywację klasycznych efektorów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, takich jak fosfolipaza C, cykloazy adenylanowa, kanały wapniowe oraz reguluje poziom wewnątrzkomórkowy fosforanów inozytolu, wapnia, cyklicznego AMP oraz wiele innych przekaźników sygnałów [34,40].

Siłą napędową badań nad strukturą receptora GnRH i jego interakcji z GnRH jest przekonanie, że taka informacja może dać racjonalną podstawę do stworzenia nowych analogonów GnRH o pożądanym własnościach. Aby zrozumieć własności i zależności struktura-funkcja receptora z cząsteczką GnRH oraz zmiany konformacyjne w rodzinie białek G po związaniu się różnych analogonów GnRH, należało również dokładnie zrozumieć i określić „kieszonkę wiążącą” GnRH w receptorze. Aktywacja receptora wpływa na rotacje helis wewnątrzmembranowych (TM) i ruchy części struktur helis TM 2, 3, 6 i 7. Helisy są mocno upakowane w stanie nieaktywnym, a podlegają rozluźnieniu w czasie aktywacji receptora [40].

ROLA MIEDZI W ROZRODZIE

O potencjalnym znaczeniu jonów miedzi w biochemii peptydów mózgu można wnioskować z faktu, że stężenie tego metalu w zakończeniach aksonów podwzgórzowych jest 1-2 albo więcej razy większe niż w plazmie krwi [37]. Peptydy zawierające resztę histydyny są zwykle bardzo dobrymi ligandami dla jonów metali, a zwłaszcza dla Cu^{2+} [35].

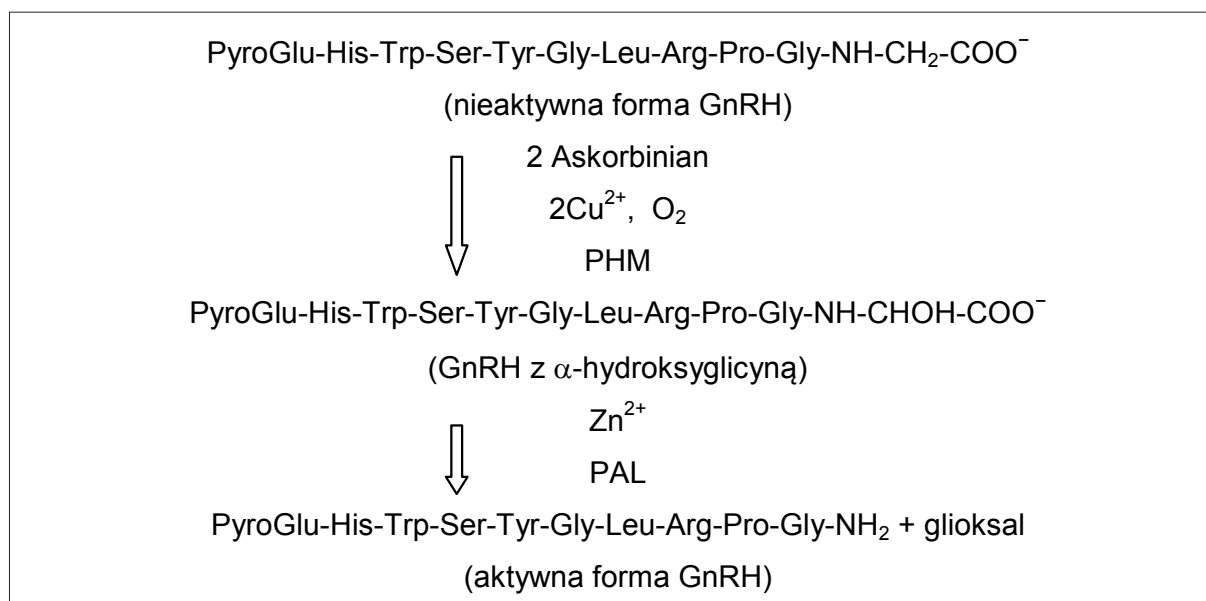
W 1936 r. Fevold i wsp. [16] wykryli jako pierwsi, że owulacja może być indukowana przez dożylną wstrzyknięcie soli miedzi. Od tego czasu wielu innych badaczy wykryło, że podanie

soli miedzi królikom [14,21,50,51,52] oraz owcom prowadzi do owulacji przez jej działanie na poziomie podwzgórza. Jony miedzi stymulowały uwalnianie LH, zarówno podstawowe jak i stymulowane przez GnRH z komórek przysadki niedojrzałych samic szczura *in vitro* [19]. Miedź jest również bardzo dobrym czynnikiem uwalniającym GnRH z izolowanych granul podwzgórzowych, co potwierdza hipotezę, że miedź wpływa na neurony GnRH, a nie tylko na granulę.

Barnea i wsp. w serii interesujących badań wykazali znaczenie miedzi w utrzymaniu stabilności podwzgórzowych granul zawierających GnRH i sugerują mechanizm uwalniania GnRH zarówno z wyizolowanych granul oraz z granul w ekplantach podwzgórzowych [3,9]. Inkubacja wyizolowanych granul z Cu-ATP oraz z Mg-ATP oznaczała, że Cu-ATP stymuluje nie tylko uwalnianie GnRH niezależnie od KCl, ale była o wiele bardziej skuteczna od Mg-ATP. Wydaje się więc, że Cu-ATP oraz Mg-ATP mogą działać przez oddzielne mechanizmy w uwalnianiu GnRH [3], a granulę sekrecyjną mogą być miejscem działania miedzi [3,4].

Amidacja GnRH

Monooksygenaza α -amidująca peptydyloglicyny (PAM) katalizuje reakcję α -amidacji na karboksylowym końcu łańcucha peptydyloglicyny. W wyniku tej reakcji hormony peptydowe i białkowe, nieaktywne biologicznie, są przekształcane do ich właściwych postaci aktywnych w podwzgórzu i przysadce [44,45]. PAM jest umiejscowiona w komórce głównie w kompleksie Golgiego, jest także białkiem błonowym związanym z granulami zawierającymi peptydy. Reakcja amidacji zachodzi w reakcji dwuetapowej, a katalizacja zachodzi za pośrednictwem jej dwóch enzymów składowych: PHM – monooksydazy peptydylo- α -hydroksyglicyny oraz PAL – liazy α -amidującej peptydyloglicylo- α -hydroksyglicyny, które razem noszą nazwę PAM [39].



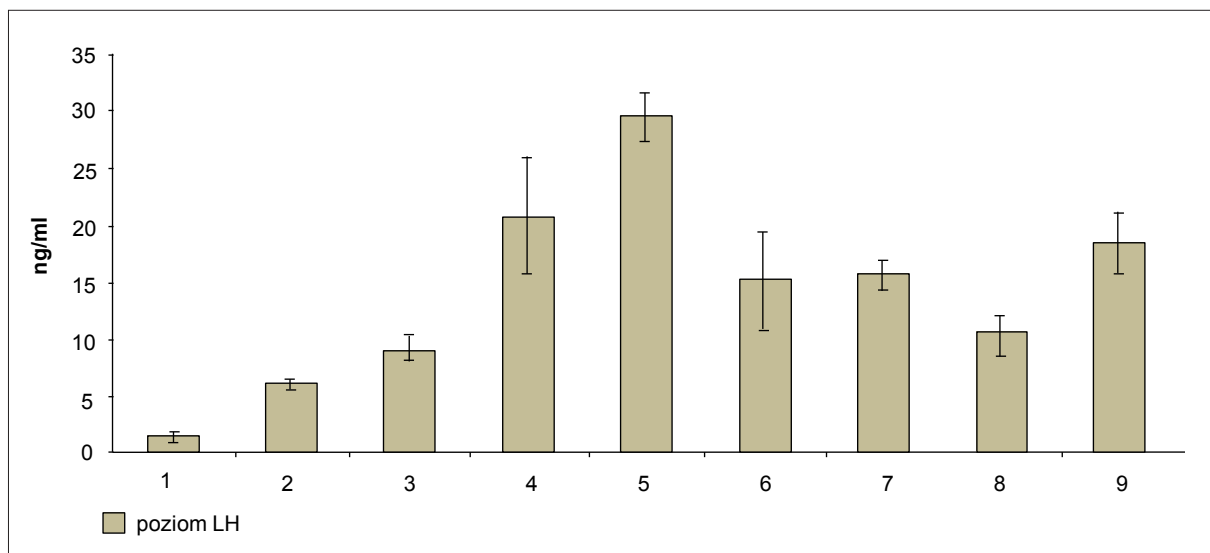
Ryc. 3. Amidacja prohormonu GnRH - bardzo ważna dla uzyskania aktywnej cząsteczki GnRH. PHM: monooksydaza peptydyloglicylo- α -hydroksyglicyny; PAL: liaza α -amidująca peptydyloglicylo- α -hydroksyglicyny (wg [39] zmodyfikowano)

Pierwszy stopień amidacji zachodzi z udziałem PHM, a drugi stopień jest katalizowany przez PAL. PHM zawiera dwa jony miedzi, które są między Cu^{2+} i Cu^+ stanem utlenienia. Taka struktura sugeruje, że reakcja z udziałem PHM poprzedza aktywację substratu przez tlen związany z miedzią. Enzym PAM zawiera również atom cynku, który jest związany z PAL. Aktywność jego może być ograniczona przez takie czynniki chelatujące jak srebro (Ag) czy EDTA i rekonstruowana przez dodanie molarnej nadmiar metali dwuwartościowych (ryc. 3). Aktywność PAM zależy od tlenu cząsteczkowego, askorbinianu i miedzi. Małe stężenia PAM i askorbinianu mogą uczynić reakcję α -amidacji czynnikiem ograniczającym w syntezie biologicznie aktywnego peptydu. Miedź

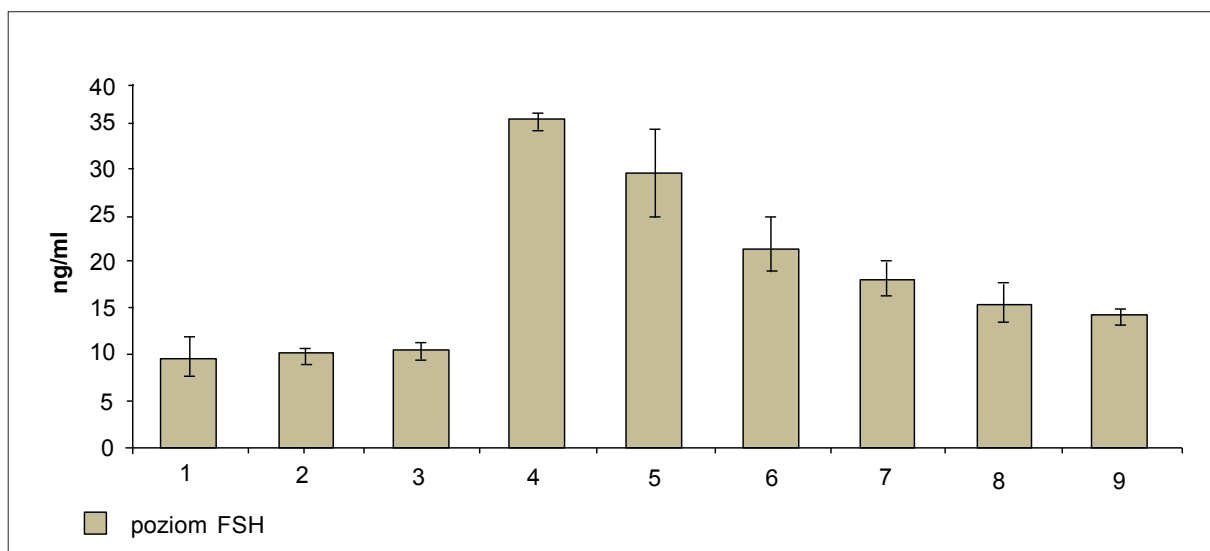
odgrywa istotną rolę w amidacji GnRH i nie może być zastąpiona przez żaden inny metal dwuwartościowy [29,46].

KOMPLEKSY METALI Z GnRH JAKO ANALOGONY GnRH – OSIĄGNIĘCIA POLSKIEJ MYŚLI NAUKOWEJ

Znając rezultaty wielu badań dotyczących roli miedzi w reprodukcji oraz badań nad połączeniem miedzi z aminokwasami, dwoje wybitnych polskich uczonych chemików – prof. Barbara Rzeszotarska zajmująca się syntezą chemiczną GnRH (Uniwersytet Opolski) i prof. Henryk Kozłowski – specjalista od kompleksów miedzi z aminokwasami i peptydami (Uniwersytet Wrocławski) powzięli myśl o syntezie



Ryc. 4. Uwalnianie LH z przysadki do krwi u kastrowanych, potraktowanych uprzednio estradiolem i progesteronem samic szczura *in vivo*, 15 min po dożylnym wstrzyknięciu GnRH (5 mg) albo kompleksów metali GnRH. 1- sól fizjologiczna (NaCl); 2 - GnRH (0,1 mg); 3 - GnRH (1 mg); 4 - Cu-GnRH (1 mg); 5 - Cu-GnRH (5 mg); 6 - Ni-GnRH (1 mg); 7 - Ni-GnRH (1 mg); 8 - Zn-GnRH (1 mg); 9 - Zn-GnRH (10 mg); 4-9 vs 1-3 różnica statystycznie istotna



Ryc. 5. Uwalnianie FSH z przysadki do krwi u kastrowanych samic szczura, potraktowanych uprzednio estradiolem i progesteronem *in vivo*, 15 min po dożylnym wstrzyknięciu GnRH albo kompleksów metali z GnRH. 1- sól fizjologiczna (NaCl); 2 - GnRH (0,1 mg); 3 - GnRH (1 mg); 4 - Cu-GnRH (1 mg); 5 - Cu-GnRH (5 mg); 6 - Ni-GnRH (1 mg); 7 - Ni-GnRH (5 mg); 8 - Zn-GnRH (1 mg); 9 - Zn-GnRH (10 mg); 4-9 vs 1-3 różnica statystycznie istotna

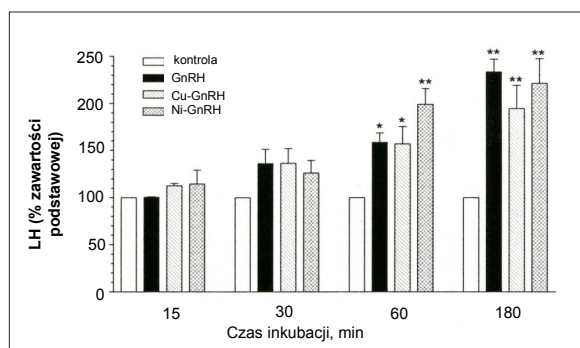
kompleksów GnRH z miedzią, niklem i cynkiem. Pierwsze badania strukturalne i biologiczne wypadły bardzo obiecująco [18,31]. Kompleksy w badaniach *in vivo* indukowały owulację [18]. Te wyniki oznaczały, że w polskim laboratorium narodził się nowy interesujący analogon GnRH - Cu-GnRH. Wyżej wymienieni uczeni zwrócili się do mnie o dalsze kierowanie tymi badaniami.

Dalszym eksperymentem dotyczącym aktywności biologicznej i mocy uwalniającej gonadotropiny przysadkowej była infuzja kompleksów bezpośrednio do przysadki szczurzy, odpowiednio przygotowanej według metody Ramirezza i McCanna, służącej pierwotnie do testowania frakcji przy oczyszczaniu naturalnego GnRH (LHRF).

Infuzja doprzysadkowa była opracowana w Instytucie w Jabłonie przez profesora E. Domańskiego; za pomocą aparatu stereotaktycznego wprowadzono na stałe kaniule do przysadki i po zaleczeniu rany pooperacyjnej użyto do eksperymentu. Rezultaty badań wykazały pełną aktywność uwalniającą LH przez kompleksy metali z GnRH, a zwłaszcza Cu-GnRH, którego siła uwalniania LH była większa od natywnego GnRH.

W następnym doświadczeniu, samicom owariektomizowanym i potraktowanym uprzednio estradiolem i progesteronem, aby zahamować uwalnianie endogennego GnRH, wstrzykiwano GnRH, Cu-GnRH, Ni-GnRH albo Zn-GnRH, aby po 15 minutach od dożylnego wstrzyknięcia pobrać krew i w niej oznaczyć, już nową metodą radioimmunologiczną, LH i FSH (ryc. 4 i 5). Wyniki tych badań wskazują, że uwalnianie LH i FSH przez Cu-GnRH było znacznie wyższe niżeli przez natywny GnRH; Ni-GnRH wykazuje również moc uwalniającą chociaż znacznie niższą od Cu-GnRH [30].

Eksperymenty przeprowadzone na dużych grupach zwierząt i przy precyzyjnym oznaczeniu RIA hormonów ostatecznie potwierdziły dużą aktywność uwalniającą gonadotropiny przez kompleksy, a zwłaszcza dużą moc uwalniającą LH przez Cu-GnRH. W serii badań nad uwalnianiem LH z komórek przysadkowych stwierdzono aktywność uwalniającą kompleksów metali, a zwłaszcza aktywność Cu-GnRH (ryc. 6). W dalszych naszych badaniach nad wiązaniem się kompleksów metali z receptorem wykazaliśmy, że kompleks Cu-GnRH wiązał się do receptora z większym powinowactwem w po-



Ryc. 6. Uwalnianie LH z komórek przedniej części przysadki przez GnRH, Cu-GnRH oraz Ni-GnRH w stosunku do czasu inkubacji. Dane przedstawiają średnią \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

równaniu z naturalnym dekapeptydem GnRH, natomiast kompleks Ni-GnRH wiązał się z receptorami przysadkowymi z mniejszym powinowactwem [29].

Dalsze badania wiązania się badanych kompleksów do receptora przysadki owcy wykazały, że agonista GnRH busarelina (D-Ser-(tBu)⁶-Pro⁹-NHet)-GnRH współzawodniczy z GnRH o swoje miejsca wiążące receptora. Gdy porównywano kompleksy meta1-GnRH z wolnym GnRH stwierdzono, że wolny hormon i kompleks nikiel(II) oraz kobalt(II) wykazują mniejsze powinowactwo do receptora niżeli Cu-GnRH [11]. Wyniki tych badań uzasadniają i poszerzają wcześniejsze wyniki, wykonane w badaniach z użyciem receptora przysadki szczura, owcy i świni [11,29,42] i ostatecznie dowodzą, że jony metali pełnią istotną rolę w modulacji aktywności biologicznej hormonu GnRH.

W dalszych badaniach stwierdziliśmy, że kompleksy metali wykazywały inny profil sygnalizacji wewnątrzkomórkowej niżeli natywny GnRH (ryc. 7 i 8). GnRH generował głównie syntezę fosforanu inozytolu w komórkach przysadki, natomiast wewnątrzkomórkowa synteza cAMP była znacznie podwyższona po stymulacji komórek przysadkowych przez kompleksy metali z GnRH, a szczególnie przez Cu-GnRH [5,27].

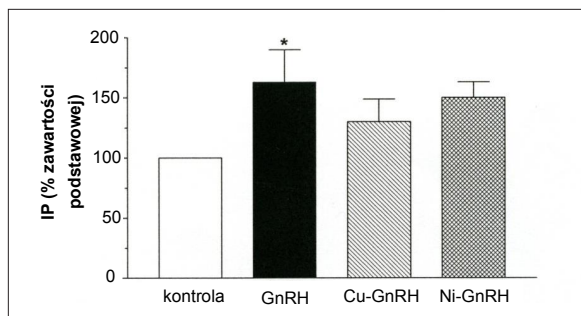
Stwierdziliśmy także, że kompleksy GnRH nie generowały desensytyzacji receptora po dłuższym czasie działania. Cu-GnRH odznacza się także znacznie większą stabilnością i mniejszą podatnością na degradację enzymatyczną [20].

BADANIA STRUKTURALNE KOMPLEKSÓW MIEDZI I NIKLU Z GnRH

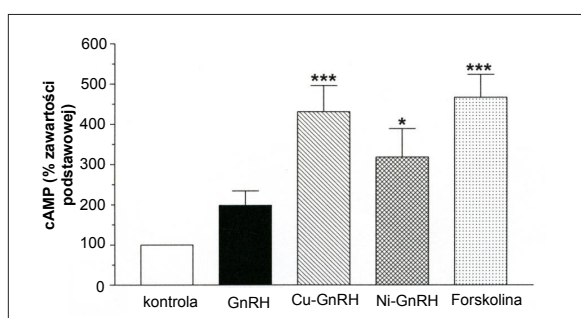
Podjęto wnikliwe badania strukturalne kompleksów Cu-GnRH oraz Ni-GnRH [42,43]. Badania z zastosowaniem jądrowego rezonansu magnetycznego (MR) oraz nowoczesnej metodyki pamięci molekularnej (MM), wykonane w ramach międzyzrządowego porozumienia naukowego polsko-japońskiego; pozwoliły ujawnić obecność dwóch domen strukturalnych w cząsteczce natywnego GnRH, których orientacja przestrzenna jest modulowana przez dużą mobilność glicyny w pozycji 6 sekwencji.

Utworzenie się kompleksów metali z GnRH zostało potwierdzone przez pomiar spektrum metodą MALDI-TOF-MAS. Z tych pomiarów wynika, że kompleks 1:1 Cu(II)-GnRH ($m/z = 1245$) jest najbardziej stabilny ze wszystkich trzech możliwych kompleksów metalu z GnRH, wnioskując z intensywności występujących szczytów. Utworzenie stabilnej formacji kompleksu 1:1 Cu(II) - GnRH zostało również potwierdzone przez badania spektrum masowego FAB ($m/z = 1244$). Metastabilne sygnały odpowiadające $[GnRH]_n-Cu^{m+}$ ($n, m \neq 1$) nie były obserwowane, co sugeruje, że stosunek wiązania GnRH z miedzią (II) jest 1:1.

Wiązanie się GnRH z jonami metalu było również monitorowane przez spektroskopię ¹HNMR. Sygnały protonów z GnRH znacznie się rozszerzały ze zwiększającym się stężeniem jonów Cu(II), aż do stosunku 1:1 GnRH i Cu(II), podczas gdy rozszerzenie się sygnału nie zwiększa się już, gdy stosunek sięga już 1:1. To oznacza, że stosunek wiązania metalu

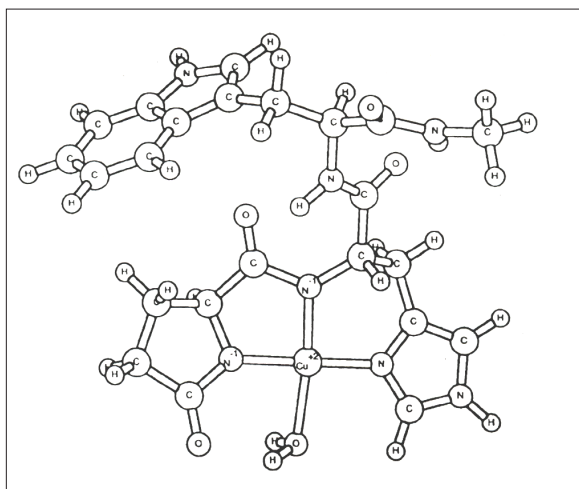


Ryc. 7. Wewnątrzkomórkowa synteza fosforanu inozytu (IP) w komórkach przysadki po 30 min inkubacji z GnRH, Cu-GnRH oraz Ni-GnRH. Stężenia wszystkich peptydów wyniosły 10-7 M. Dane przedstawiają średnią \pm SEM; *P<0,05



Ryc. 8. Akumulacja wewnątrzkomórkowa cAMP w komórkach przysadki po inkubacji z GnRH, Cu-GnRH oraz Ni-GnRH. Wszystkie peptydy w stężeniu 10-7 M. Forskolina (10 mM użyta jako pozytywna kontrola). Dane przedstawiają średnią \pm SEM; *P<0,05; ***P<0,001

do GnRH jest 1:1, co jest zgodne z rezultatami otrzymanymi z zastosowaniem metody MALDI-TOFMAS. Aby określić stosunek wiązania GnRH i jonu miedzi (II), zastosowano metodę ciągłych zmian, którą dostosowano do pomiarów systemu metal-peptyd. Wynik maksimum około $X = 0,5$ oznacza, że stosunek wiązania jest 1:1. Ten wynik jest zgodny z pomiarami metodami MALDI-TOFMAS i ^1H NMR.



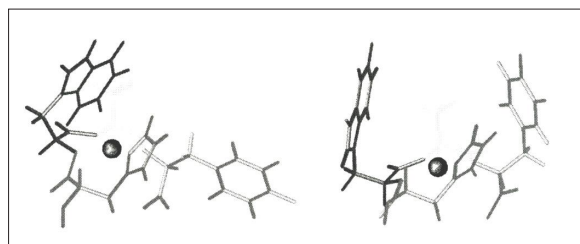
Ryc. 9. Struktura kompleksu PyroGlu-His-Trp-NHCH₃ i miedzi Cu(II) obliczona metodą pamięci cząsteczkowej - MM3

Reszta imidazolowa His jest głównym miejscem wiązania jonu Cu(II), więc struktura kompleksu między PyroGlu-His-Trp-NHCH₃ i jonem metalu została określona przez obliczenia metodą pamięci cząsteczkowej 3(MM3), chociaż nie została doprowadzona idealnie do warunków optymalnych. Możliwe są trzy miejsca koordynacji: azot imidozolu (N⁻ w pozycji 1) reszty histydyny, deprotonowanej azot amidowy (N⁻) reszty histydyny oraz deprotonowany azot (N⁻) amidowy pierścienia kwasu pyroglutaminowego. Czwartym miejscem koordynacji może być tlen (O) cząsteczki wody. Jak wiadomo, dla kompleksów Cu(II) konfiguracja kwadratowa płaska jest faworyzowana. W istocie, kompleks pokazany na ryc. 9 ma taką konfigurację kwadratową płaską [42,43].

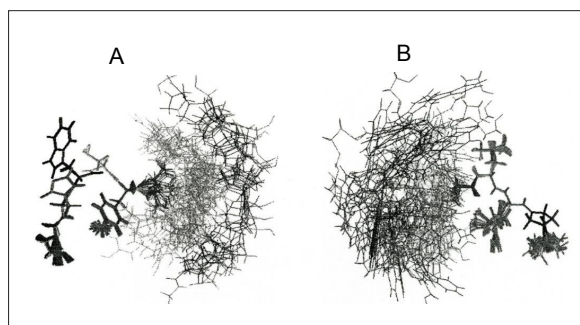
Badania strukturalne kompleksu Ni-GnRH wykonano mierząc spektra ^1H -NMR dla GnRH w DM[S]O przez eksperymenty TOCS4 i ROES4 [11] i są zgodne z danymi dotychczas opublikowanymi [7]. Zaobserwowane metodą ROES4, zachodzące na siebie piki były użyte jako wyznaczniki w obliczeniach dynamiki molekularnej wykonanej za pomocą programu DYANA [11].

Obliczone struktury pokazano na ryc. 10 i 11. Nałożenie szkieletów z 30 najlepszych wyników struktur otrzymanych metodą DYANA pokazuje ogólną tendencję konformacyjną, ale jest względnie słabe, jak to wykazano przez duże wartości średniej RMSD (0,188 \pm 0,74 nm dla szkieletu oraz 0,206 \pm 0,101 nm dla atomów ciężkich).

Otrzymano dokładny wgląd w strukturę przez wzajemne nakładanie obwodów końców łańcucha peptydu. Peptyd jest ułożony strukturalnie prawidłowo na obu końcach, a nieuporządkowanie pochodzi od glicyny w pozycji 6. Mię-



Ryc. 10. Struktura Ni-GnRH o najniższej energii. Obliczone struktury z N-końca łańcucha, 4N obliczone w sferze koordynacyjnej jonów Ni w Ni-GnRH



Ryc. 11. Trzydzieści nakładających się na siebie struktur N-końca łańcucha (A) i C-końca łańcucha (B) części kompleksu peptydu Ni-GnRH

dzycząsteczkowe zachodzenie na siebie pików ROES4 wykryto wcześniej dla obu końców [7] oraz wokół Gly-6, co może spowodować utratę struktury wymuszonej; stwierdzono dużą mobilność Gly-6, a C α stwierdzoną poprzednio [12] w sytuacji małej mobilności węgla szkieletu C α reszt aromatycznych [13]. Wzajemna orientacja części struktur może być modulowana przez mobilność szkieletu przy Gly-6. Taka mobilność wydaje się istotna w konformacyjnym dostosowaniu się do peptydu w miejscu wiązania się z receptorem, jak to sugeruje dramatyczna zmiana aktywności po zastąpieniu Gly-6 przez inny aminokwas [10,23,32,41,47]. Wyraźnie określona wzajemna orientacja pierścieni wewnątrz N' końca łańcucha w tych badaniach nie może być przesadnie korzystnie interpretowana z następujących powodów:

1. Wszystkie możliwe zachodzące na siebie piki wewnątrzcząsteczkowe zostały przekształcone w wymuszone odległości; wśród nich niektóre, takie jak HN- H α albo H α - H β , dają bardzo wyraźne odległości i są po prostu odbiciem średniej konformacji.
2. Te same przymusowe ograniczenia nie są w sprzeczności z innymi, ponieważ odnoszą się one do peryferyjnych części peptydu, które samoistnie mają wyższy stopień swobody poruszania się [11].

Uporządkowanie w łańcuchach bocznych stosunkowo małego peptydu, należy interpretować jako strukturę średnią, gdzie mobilność moduluje względne orientacje pierścieni do siebie. Średnia struktura jest jednak całkowicie wystarczająca, aby wytłumaczyć szeroki szczyt wykryty dla H α histydyny. Takie rozszerzenie szczytu może być wyjaśnione tylko przez wymianę konformacyjną, w skali czasu milisekundy, dając rozkład wielkości przestrzennej zbliżony do wielkości rzeczywistej T $_2$. Obecność wymiany w tej skali, pokazuje ukształtowanie interakcji wewnątrzcząsteczkowej, która z kolei wyjaśnia znaczenie His-2 dla aktywności biologicznej cząsteczki Ni-GnRH [10,12,23,32,41,47].

PODSUMOWANIE

Metale skompleksowane z GnRH [Cu(II)], [Ni(II)], [Co(II)] i [Zn(II)] wywierają istotny modulujący wpływ na wiązanie GnRH z jego receptorem. Kompleks z miedzią dzia-

ła na receptor jako rozbudowany agonista, natomiast wpływ [Ni(II)], [Co(II)] i [Zn(II)] w kompleksie działają mniej zdecydowanie jako agoniści. Zmieniają one również ścieżki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej przez receptor i z tego względu mogą być uważane jako ważne analogony GnRH, zarówno w badaniach nad zróżnicowanym działaniem receptora na sygnalizację w komórce i końcowy efekt fizjologiczny oraz oczekują na zastosowanie ich w klinice po podjęciu badań testowych i klinicznych w tym zakresie.

WSPÓŁPRACA W REALIZACJI BADAŃ

- Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna: Prof. dr hab. Kazimierz Kochman, Dr hab. Alina Gajewska, prof. nadzw., Dr Anna Michaluk, Mgr Helena Kochman
- Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii: Prof. dr hab. Henryk Kozłowski, Dr Kinga Kulon
- Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Opolu, Katedra Chemii (obecnie Uniwersytet Opolski): Prof. dr hab. Barbara Rzeszotarska, Dr Elżbieta Masiukiewicz
- Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Fizjologii: Prof. dr hab. Jadwiga Przała, Dr Iwona Bogacka, Dr Gabriela Siawrys
- Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie: Prof. dr hab. Adam Zięćik, Prof. dr hab. Agnieszka Błitek, Dr Monika Kaczmarek
- Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu: Prof. Lech Zwierzchowski, Dr Dagmara Robakowska-Hyżorek, Dr Paweł Lisowski
- Physiologie de l'axe gonadotrope, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris, France: Prof. Raymond Counis
- Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan: Prof. Hiroaki Okuno, Dr Masato Kodaka, Dr Kazuhiko Nakamura

PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowania Prof. Henrykowi Kozłowskiemu z Uniwersytetu Wrocławskiego za krytyczne przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams B.A., Tello J.A., Erchegyi J., Warby C., Hong D.J., Akinsanya K.O., Mackie G.O., Vale W., Rivier J.E., Sherwood N.M.: Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, 2003; 144: 1907-1919
- [2] Albarracin C.T., Kaiser U.B., Chin W.W.: Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Endocrinology*, 1994; 135: 2300-2306
- [3] Barnea A., Cho G.: Evidence that copper-amino acid complexes are potent stimulators of the release of luteinizing hormone-releasing hormone from isolated hypothalamic granules. *Endocrinology*, 1984; 115: 936-943

- [4] Barnea A., Colombani-Vidal M.: A ligand-specific action of chelated copper on hypothalamic neurons: Stimulation of the release of luteinizing hormone-releasing hormone from median eminence explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 7656-7660
- [5] Błitek A., Zięćik A., Gajewska A., Kodaka M., Counis R., Kochman K.: Cobalt complex with GnRH stimulates the LH release and PKA signaling pathway in pig anterior pituitary cells in vitro. *Brain Res. Bull.*, 2005; 65: 391-396
- [6] Burgus R., Butcher M., Amoss M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Blackwell R., Vale W., Guillemin R.: Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972; 69: 278-282

- [7] Calzolari L., Gaggelli E., Valensin G., Maccotta A.: NMR studies of the luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) decapeptide in DMSO solution. *Magn. Reson. Chem.*, 1994; 32: 540-546
- [8] Cheng C.K., Leung P.C.: Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr. Rev.*, 2005; 26: 283-306
- [9] Colombani-Vidal M., Barnea A.: Copper stimulation of LHRH release from median eminence explants. I. A divalent metal specific process that does not require extracellular calcium. *Neuroendocrinology*, 1986; 43: 664-669
- [10] Coy D.H., Labrie F., Savary M., Coy E.J., Schally A.V.: LH-releasing activity of potent LH-RH analogs in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975; 67: 576-582
- [11] D'Amelio N., Gaggelli E., Gajewska A., Kochman H., Kochman K., Kozłowski H., Latajka Z., Młynarz P., Panek J., Valensin G.: Structural analysis and sheep pituitary receptor binding of GnRH and its complexes with metal ions. *J. Inorg. Biochem.*, 2003; 94: 28-35
- [12] Deslauriers R., Levy G.C., McGregor W.H., Sarantakis K., Smith I.C.: Conformational flexibility of luteinizing hormone-releasing hormone in aqueous solution. A carbon-13 spin-lattice relaxation time study. *Biochemistry*, 1975; 14: 4335-4343
- [13] Deslauriers R., Somorjai R.L.: Internal rotations of side chains and backbone in luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). Analysis of carbon-13 spin-lattice relaxation times. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976; 98: 1931-1939
- [14] Donley S.A., Ilagan B.J., Rim H., Linder M.C.: Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, 2002; 283: E667-E675
- [15] Fan N.C., Peng C., Krisinger J., Leung P.C.: The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995; 107: R1-R8
- [16] Fevold H.L., Hisaw F.L., Greep R.: Augmentation of the gonad-stimulating action of pituitary extracts by inorganic substances, particularly copper salts. *Am. J. Physiol.*, 1936; 117: 68-74
- [17] Gay E., Babajko S.: AUUUA sequences compromise human insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 267: 509-515
- [18] Gerega K., Kozłowski H., Masiukiewicz E., Pettit L.D., Pyburn S., Rzeszotarska B.: Metal complexes of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). Potentiometric and spectroscopic studies. *J. Inorg. Biochem.*, 1988; 33: 11-18
- [19] Hazum E.: Copper and thiol regulation of gonadotropin releasing hormone binding and luteinizing hormone release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983; 112: 306-312
- [20] Herman A., Kozłowski H., Czauderna M., Kochman K., Kulon K., Gajewska A.: Gonadoliberin (GnRH) and its copper complex (Cu-GnRH) enzymatic degradation in hypothalamic and pituitary tissue in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2012; 63: 69-75
- [21] Hiroi M., Sugita S., Suzuki M.: Ovulation induced by implantation of cupric sulfate into the brain of the rabbit. *Endocrinology*, 1965; 77: 963-967
- [22] Itakoshi E., Takuwa-Kuroda K., Fujisawa Y., Hisada M., Ukena K., Tsutsui K., Minakata H.: Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 291: 1187-1193
- [23] Janecka A., Janecki T., Bowers C.Y., Folkers K.: New, highly active antagonists of LHRH with acylated lysine and p-aminophenylalanine in positions 5 and 6. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994; 44: 19-23
- [24] Kakar S.S.: Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur. J. Endocrinol.*, 1997; 137: 183-192
- [25] Kochman K.: Some biochemical properties of LH-releasing factor from ovine hypothalamus. Third International FEBS Meeting, Warsaw 4-7 April, 1966. Book of Abstracts, Abstract F 302, p. 333
- [26] Kochman K.: Purification and properties of LH and FSH releasing factor from ovine hypothalamus. PhD. Thesis. Institute of Applied Biology, Polish Academy of Sciences (Cracow), 1969
- [27] Kochman K., Blitek A., Kaczmarek M., Gajewska A., Siawrys G., COUNIS J., Zięcik A.J.: Different signaling in pig anterior pituitary cells by GnRH and its complexes with copper and nickel. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2005; 26: 377-382
- [28] Kochman K., Domanski E.: Studies on purification of the hypothalamic substances responsible for the release of gonadotropins from the pituitary gland. *Acta Physiol. Pol.*, 1969; 20: 441-453
- [29] Kochman K., Gajewska A., Kochman H., Kozłowski H., Masiukiewicz E., Rzeszotarska B.: Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Ni²⁺-GnRH complexes with the rat pituitary receptor. *J. Inorg. Biochem.*, 1997; 65: 277-279
- [30] Kochman K., Gajewska A., Kozłowski H., Masiukiewicz E., Rzeszotarska B.: Increased LH and FSH release from the anterior pituitary of ovariectomized rat, in vivo, by copper-, nickel-, and zinc-LHRH complexes. *J. Inorg. Biochem.*, 1992; 48: 41-46
- [31] Kozłowski H., Masiukiewicz E., Rzeszotarska B., Potargowicz E., Walczewska-Sumorok A.: Ovulation-inducing activity of luteinizing hormone (LHRH) complexed by copper(II), nickel(II), and zinc(II) ions. *J. Inorg. Biochem.*, 1990; 40: 121-125
- [32] Kutscher B., Bernd M., Beckers T., Polymeropoulos E.E., Engel J.: Chemistry and molecular biology in the search of new LHRH antagonists. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997; 36: 2148-2161
- [33] Leung P.C., Squire J., Peng C., Fan N., Hayden M.R., Olofsson J.I.: Mapping of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene to human chromosome 4q21.2 by fluorescence in situ hybridization. *Mamm. Genome*, 1995; 6: 309-310
- [34] Liu F., Usui I., Evans L.G., Austin D.A., Mellon P.L., Olefsky J.M., Webster N.J.: Involvement of both Gq/11 and Gs proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in β GT2 cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 32099-32108
- [35] Livera C.E., Pettit L.D., Bataille M., Perly B., Kozłowski H., Radomska B.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1987; 16: 661-666
- [36] Matsuo H., Baba Y., Nair R.M., Arimura A., Schally A.V.: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971; 43: 1334-1339
- [37] Merriam G.R., Nunnelley L.L., Trish J.W., Naftolin F.: Sex-related and cyclic variation of trace elements in rat hypothalamus and pituitary. *Brain Res.*, 1979; 171: 503-510
- [38] Michaluk A., Blitek A., Gajewska A., Kaczmarek M.M., Gromadzka-Hliwa K., Kochman H., Zięcik A.J., Kochman K.: LH release by Cu and Ni salts and metal GnRH complexes, in vitro. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2006; 27: 483-486
- [39] Michaluk A., Kochman K.: Involvement of copper in female reproduction. *Reprod. Biol.*, 2007; 7: 193-205
- [40] Millar R.P., Lu Z.L., Pawson A.J., Flanagan C.A., Morgan K., Maudsley S.R.: Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr. Rev.*, 2004; 25: 235-275
- [41] Monahan M.W., Amoss M.S., Anderson H.A., Vale W.: Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor with increased agonist or antagonist properties. *Biochemistry*, 1973; 12: 4616-4620
- [42] Nakamura K., El-Mehasseb I.M., Kodaka M., Okuno H., Kozłowski H., Gajewska A., Kochman H., Kochman K.: Structural and receptor binding analysis of Cu-GnRH, Ni-GnRH and Co-GnRH complexes. Central European Conference of Neurobiology, Cracow, August 11-15, 2001, Abstract 14, p. 58

- [43] Nakamura K., Kodaka M., El-Mehasseb I.M., Gajewska A., Okuno H., Ochwanowska E., Witek B., Kozłowski H., Kochman K.: Further structural analysis of GnRH complexes with metal ions. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2005; 26: 247-252
- [44] O'Donnel P.J., Driscoll W.J., Bäck N., Muth E., Mueller G.P.: Peptidylglycine- α -amidating monooxygenase and pro-atrial natriuretic peptide constitute the major membrane-associated proteins of rat atrial secretory granules. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003; 35: 915-922
- [45] Prigge S.T., Kolhekar A.S., Eipper B.A., Mains R.E., Amzel L.M.: Amidation of bioactive peptides: the structure of peptidylglycine- α -hydroxylating monooxygenase. *Science*, 1997; 278: 1300-1305
- [46] Prigge S.T., Mains R.E., Eipper B.A., Amzel L.M.: New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cel. Mol. Life Sci.*, 2000; 57: 1236-1259
- [47] Rivier J., Vale W., Burgus R., Ling N., Amoss M., Blackwell R., Guillemin J.: Synthetic luteinizing hormone releasing factor analogs. Series of short-chain amide LRF homologs converging to the amino terminus. *J. Med. Chem.*, 1973; 16: 545-549
- [48] Roch G.J., Busby E.R., Sherwood N.M.: Evolution of GnRH: diving deeper. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2011; 171: 1-16
- [49] Ross J.: Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet.*, 1996; 12: 171-175
- [50] Suzuki M., Tnemoto Y., Takahashi K.: The effect of copper salt on ovulation, especially on hypothalamic ovulatory hormone releasing factor. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1972; 108: 9-18
- [51] Suzuki M., Watanabe S., Hoshii M.: Effect of estrogen on copper-induced ovulation in the rabbit. *Endocrinology*, 1965; 76: 1205-1207
- [52] Tsou R.C., Dailey R.A., McLanahan C.S., Parent A.D., Tindall G.T., Neill J.D.: Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) levels in pituitary stalk plasma during the preovulatory gonadotropin surge of rabbits. *Endocrinology*, 1977; 101: 534-539

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.