

Fizykochemiczne i strukturalne aspekty fibrylogenezy modulowanej halogenowymi pochodnymi chalkonu w obecności błon lipidowych

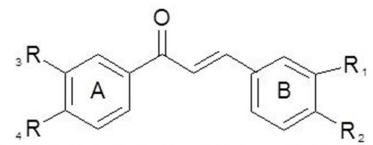
U podstaw chorób neurodegeneracyjnych, takich jak Alzheimer, Huntington czy Parkinson, leży proces fibrylogenezy, czyli przechodzenie białek ze struktury natywnej w postać fibrylarną. Znacząca liczba białek pełniących w swojej natywnej strukturze szeregiwa funkcje biologiczne ma zdolność przechodzenia w postać fibryli amyloidowych i wywoływania amyloidowozależnych schorzeń. Dodatkowo w ostatnich latach zauważono, że mutacje genetyczne prowadzą do powstawania homo-aminokwasowych obszarów w pewnych rejonach łańcucha peptydowego białka natywnego odpowiedzialne za przechodzenie jego struktury w chorobową postać amyloidów. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku choroby Huntingтона II typu wywołanej powstawaniem obszarów poli-glutaminowych (PQ) lub poli-leucynowych (PL).

Pierwszym stadium rozwoju chorób amyloidowych jest tworzenie się białkowych złogów fibrylarnych, dlatego też poszukiwanie skutecznych leków jest skierowane na badania związków mających zdolność hamowania różnych stadiów fibrylogenezy lub zaburzenia już istniejących struktur fibrylarnych. Daje to możliwość nie tylko powstrzymania rozwoju choroby, ale i nadzieje na cofanie się jej objawów. Związki chalkonu zajmują czołowe miejsce na liście najefektywniejszych kandydatów na leki anty-amyloidowe, ponieważ oprócz modyfikacji struktur fibrylarnych związki te zmniejszają amyloidowo-indukowany stres oksydacyjny i neurodegenerację chorych komórek [1]. Proponowane w literaturze efektywne inhibitory amyloidogenezy posiadają wspólny motyw strukturalny reprezentowany przez schemat: aromatyczny pierścień (C6)-1 cznik-aromatyczny pierścień (C6) [2,3], który odnajdujemy również w strukturze trans-chalkonu. Dodatkowo stwierdzono, że dla wielu związków organicznych, obecność grup halogenowych podwyższa ich aktywność anty-amyloidową. Związki organohalogenowe, w szczególności organofluorowce, stanowią około 20% obecnie stosowanych leków o różnym działaniu. Atomy fluorowców spotyka się w setkach struktur białkowych, gdzie tworzą oddziaływania typu C-X... (X - atomy fluorowców), w zbieżności z zasadami Lewisa i współuczestnicząc w tworzeniu sieci wiązań wodorowych [4, 5]. Obecność atomów fluorowców w chalkonowych modyfikatorach pozwoli na modyfikację struktur białkowych obecnych w procesie fibrylogenezy poprzez zmiany geometrycznej sieci białkowych wiązań wodorowych.

Błony lipidowe katalizują proces fibrylogenezy, tworząc odpowiednie środowisko do osiadczenia stanów konformacyjnych i orientacji promujących powstawanie fibryli [6-8]. Toksyczność białek amyloidowych często wynika z destrukcyjnego wpływu fibryli białkowych na strukturę błon lipidowych.

Określenie wpływu halogenowych (X = F, Cl, Br, I) pochodnych trans-chalkonu (patrz Rys. 1) na fizykochemiczne i strukturalne aspekty fibrylogenezy wybranych białek i peptydów amyloidowych oraz zbadanie regulacji tych modyfikacji obecności błon lipidowych jest więc uzasadnionym celem proponowanego projektu. W celu stworzenia modelu o charakterze uniwersalnym, który będzie opisywał mechanizm modulującego wpływu halogeno-chalkonów na fibrynogenezę, będącym prowadzone badania na kilku wybranych białkach (insulina i lizozym zostaną użyte jako modele struktur amyloidowych) i homo-peptydach (glutaminy (PQ), kwasu glutaminowego (PE), lizyny (PK) i treoniny (PT)) oraz błonach lipidowych również o różnym składzie lipidowym (PC, PS, PE, PG, SM i cholesterol) odzwierciedlającym różnorodność w budowie błon biologicznych.

Pierwszy etap realizacji projektu obejmować będzie badania przy użyciu spektroskopii w podczerwieni (IR) w technice transmisyjnej i osłabionego wewnętrznego odbicia (z ang. ATR). Zostanie określona rola modyfikacji struktur drugorzędowych w hamowaniu fibrylogenezy poprzez prowadzenie analiz ilościowych i jakościowych zmian udziału struktur drugorzędowych w proponowanych białkach i peptydach modyfikowanych halogenowymi związkami chalkonu. Dynamika procesów rozfałdowywania się białka i tworzenia stanów przejściowych z cząsteczkowo rozfałdowanymi strukturami białkowymi promującymi fibrynogenezę będzie prowadzona poprzez kontrolę tempa wymiany H-D (wodór-deuter). Następnie przejdziemy do określenia roli obecności błon lipidowych na w/w procesy. Zostanie określony wpływ modyfikowanych układów białkowych na strukturę obszarów polarnych i niepolarnych błon lipidowych oraz ich właściwości fizykochemiczne. W kolejnym kroku dynamiczny charakter ewolucji właściwości chiralnych w postaciach fibrylogenezy modulowanej związkami chalkonu i błonami lipidowymi, lub nawet podczas wzrostu wieńców powstających fibryli, będzie badany przy wykorzystaniu techniki oscylacyjnego dichroizmu kołowego (VCD). Supramolekularna chiralność fibryli determinująca przestrzenne strukturę fibryli amyloidowych jest obecnie jednym z najnowszych i czołowych odkryć przybliżających charakter fibrylogenezy [9, 10]. Obrazy zmian morfologii struktur fibrylarnych wykonane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) techniką negatywnego barwienia pozwolą skorelować różnice właściwości chiralnych z morfologią fibryli, która determinuje cytotoksyczność tych struktur. W badaniach mikrokalorymetrycznych (DSC) zostaną wyznaczone termodynamiczne parametry (entalpia, ciepło tworzenia, temperatury przejść fazowych, itd.) modyfikowanej fibrylogenezy jak i zaburzonej obecności białek fibrylarnych struktur lipidowych. Kolejny obszar badań obejmie techniki fluorescencyjne. Lipidowy jak i białkowy składnik badanych układów będzie monitorowany oddzielnymi sondami fluorescencyjnymi. Metoda ta pozwoli na śledzenie dynamiki foldingu białka, detekcję powstających fibryli czy rozfałdowanych postaci białkowych występujących we wcześniejszych fazach rozwoju fibrylogenezy oraz zmiany strukturalne (rozluźnienie struktury, zmiany stopnia hydratacji) w różnych obszarach błon lipidowych wywołane obecnością modyfikowanych białek amyloidowych. Dzięki zastosowaniu



trans-chalkon z halogenowymi podstawnikami
X = F, Cl, Br, I w pozycjach R₁, R₂, R₃, R₄

Rysunek 1. Schemat struktury cząsteczki halogenowych pochodnych trans-chalkonu.

dwuwymiarowych metod analizy danych spektralnych (np. PCA, MCR-ALS, 2DCOS, itd.) uzyskamy lepszy obraz zmian strukturalnych w obrębie badanych układów.

Badanie jednego procesu wieloma technikami umożliwia spojrzenie pod różnym kątem na wiele aspektów modulacji fibrylogenezy halogenowymi związkami chalkonu i błonami lipidowymi. W efekcie końcowym będziemy w stanie przedstawić pełniejszy obraz mechanizmu regulacji fibrylogenezy wybranymi przez nas innowacyjnymi czynnikami modulującymi.

Literatura:

- [1] Mi Jeong Kim, Yoo Hyun Lee, Ji Eun Kwak, Young Hwa Na, Ho Geun Yoon, *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 44 (2011) 730.
- [2] Rivière C., Richard T., Vitrac X., Mérillon J. M., Valls J., Monti J. P., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008) 828.
- [3] Reinke A. A., Gestwicki J. E., *Chemical Biology and Drug Design* 70 (2007) 206.
- [4] Fourmigué M., *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 13 (2009) 36.
- [5] Zhou P., Lv J., Zou J., Tian F., Shang Z., *Journal of Structural Biology*, 169 (2010) 172.
- [6] Gorbenko G. P., Kinnunen P. K. J., *Chemistry and Physics of Lipids*, 141 (2006) 72.
- [7] Cecchi C., Stefani M., *Biophysical Chemistry*, 182 (2013) 30.
- [8] Berthelot K., Cullin C., Lecomte S., *Biochimie*, 95 (2013) 12.
- [9] Kurouski D., Dukor R. K., Lu X., Nafie L. A., Lednev I. K., *Chemical Communication*, 48 (2012) 2837.
- [10] Ma S., Cao X., Mak M., Sadik A., Walkner C., Freedman T. B., Lednev I. K., Dukor R. K., Nafie L. A., *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 12364.