

Spontaniczna asocjacja cząsteczek cholesterolu w pobliżu błony przesyconej cholesterolom modelująca początkowe stadia procesów prowadzących do tworzenia się blaszek miażdżycowych: badania komputerowe i eksperymentalne

Cholesterol (Chol) występuje powszechnie w świecie zwierzęcym, gdzie pełni ważne funkcje biologiczne. Jest kluczowym składnikiem błon plazmatycznych – ponad 90% komórkowego Chol jest związana z błoną. Zawartość Chol w błonach komórkowych jest ściśle regulowana, jednakże procesy degeneracyjne, jak np. utlenianie fosfolipidów i Chol, mogą prowadzić do wzrostu względnej zawartości Chol w błonie. Ten nadmiar Chol powoduje tworzenie się w matrycy lipidowej błony czysto-cholesterolowych mikrodomen. Z badań eksperymentalnych na modelowych błonach fosfolipidowo-cholesterolowych (PC-Chol) wiadomo, że gdy stosunek molowy PC:Chol przekroczy 1, to w błonie tworzą się domeny Chol, a gdy przekroczy 2, to dodatkowo pojawiają się niezwiązane z błoną kryształy Chol. Poza-błonowe kryształy Chol są szkodliwe, gdyż biorą udział w procesach patologicznych prowadzących do powstawania kamieni żółciowych i blaszek miażdżycowych. Geneza kryształów Chol w ścianach naczyń tętniczych nie jest jasna, ale badania *in vitro* wykazały, że mikrodomeny Chol w błonach komórek naczyń mięśni gładkich pojawiają się wcześniej niż blaszki miażdżycowe i przyczyniają się do ich rozwoju. Jedną z możliwych dróg inicjujących poza-błonową krystalizację Chol może być odłączanie się (wytrącenie) pojedynczych cząsteczek Chol z błony przesyconej Chol i ich agregacja. Chol jest cząsteczką amfifilową i jego monomeryczna rozpuszczalność w środowisku wodnym jest bardzo mała, więc poza błoną Chol agreguje tworząc uporządkowane struktury.

Tworzenie się kryształu Chol jest powolnym procesem makroskopowym, przebiegającym przez wiele stanów pośrednich. Pomimo że Chol jest istotną cząsteczką biologiczną, a jego poza-błonowe kryształy są groźne dla organizmu, niewiele wiadomo o stanach pośrednich, a szczególnie o wczesnych etapach jego krystalizacji. To wynika z trudności eksperymentalnych spowodowanych głównie bardzo niską monomeryczną rozpuszczalnością Chol w środowisku wodnym. Co więcej, zupełnie nieznanymi i niebadanymi jest wpływ warunków fizjologicznych, w których przebiegają patologiczne procesy agregacji Chol, na inicjację i wzrost kryształów Chol.

W tym projekcie użyjemy metod modelowania komputerowego i eksperymentalnych. Metodami modelowania komputerowego zbadamy wczesne etapy procesu samo-organizacji Chol w wodzie w sąsiedztwie błony przesyconej Chol, która będzie źródłem agregujących cząsteczek. Metodami eksperymentalnymi zbadamy makroskopowe agregaty Chol. Stosując symulacje dynamiki molekularnej, można obserwować układy pojedynczych cząsteczek z 2-fs rozdzielczością czasową. Będziemy badać wpływ cząsteczki Chol na otaczające ją cząsteczki wody; asocjacje dwóch, trzech i czterech cząsteczek Chol w wodzie i w modelowych warunkach fizjologicznych, tj., w roztworze jonów i utlenionych form Chol (oksysteroli). Również obliczymy energie swobodne hydratacji i asocjacji Chol. Te badania i obliczenia dadzą pełny obraz wczesnych etapów samo-agregacji i samo-organizacji Chol, który zawiera zarówno aspekty energetyczne jak i dynamiczne.

Wyjaśnienie tych elementarnych procesów umożliwi zrozumienie złożonego procesu samo-organizacji wielu cząsteczek Chol w wodzie i w warunkach fizjologicznych. Wpływ oksysteroli na spontanicznie utworzone w wodzie agregaty z dwustu cząsteczek Chol będzie badany w następnej części projektu. Przeanalizujemy własności biofizyczne agregatów Chol dotowanych oksysterolami. Te same biofizyczne własności makroskopowych agregatów Chol z domieszką oksysteroli otrzymane też w procesie spontanicznej samo-organizacji będą zbadane eksperymentalnymi metodami elektronowego rezonansu paramagnetycznego z użyciem znaczników spinowych (SL-EPR) i różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Struktury tych agregatów będą dodatkowo badane metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Pozwoli to na wzajemną weryfikację wyników otrzymanych przy zastosowaniu różnych podejść badawczych. Pozytywna weryfikacja nada wartości naukowej projektu wysoką rangę. Realizacja projektu umożliwi uzyskanie bardzo dokładnych informacji na poziomie atomowym i molekularnym o samo-organizacji Chol w środowisku zbliżonym do fizjologicznego. To pozwoli na lepsze zrozumienie natury tego procesu, który w organizmie ludzkim prowadzi do patologicznych zmian, prowadzących do miażdżycy. To zrozumienie może pomóc w opracowaniu strategii hamowania poza-błonowych procesów agregacji Chol, które wywołują choroby stanowią poważny problem zdrowotny, ale również ekonomiczny.

Badania komputerowe będą przeprowadzone w Zakładzie Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki UJ, badania dyfrakcyjne w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki UJ, a SL-EPR i DSC w Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, USA.