

Celem projektu jest identyfikacja nieuchwytnego Małego Nośnika Miedzi (Small Copper Carrier SCC), wskazanego uprzednio jako względnie małej cząsteczki, mającej wiązać jony Cu^{2+} i uczestniczyć w ich transporcie we krwi wielu, być może wszystkich ssaków. SCC został częściowo wyizolowany, początkowo z krwi zwierząt eksperymentalnych odtwarzających aspekty choroby Wilsona, wady genetycznej powodującej akumulację miedzi w wątrobie, innych organach, a także krwi. Takie niekontrolowane złogi miedziowe mają szerokie spektrum toksyczności, włączając opóźnienie umysłowe. SCC znaleziono również w dużo mniejszych ilościach we krwi zdrowych ludzi, a także owiec, krów, świń i myszy. Nie został on jednak oczyszczony, a jedynie częściowo scharakteryzowany, co jest dość zaskakujące. Raportowane trudności z identyfikacją jego natury chemicznej są dość tajemnicze. Spekuluje się, że SCC stanowi tak zwaną labilną miedź we krwi. Jest to pula jonów miedzi oznaczona po usunięciu białek krwi, które wiążą miedź, głównie ceruloplazminy i albuminy. Labilna miedź we krwi jest podwyższona w wielu przypadkach choroby Alzheimera (AD). Zaobserwowano to również w cukrzycy typu 2 i licznych nowotworach. Miedź jest podstawowym mikroelementem u eukariontów, ponieważ jest wymagana dla utylizacji tlenu przez oksydazę cytochromu c w mitochondriach i detoksykacji przez dysmutazę ponadtlenkową Cu/Zn w cytozolu. Zatem każda komórka ciała człowieka musi być adekwatnie suplementowana miedzią dostarczoną przez krew. Miedź jest pobierana z pożywienia w jelicie cienkim, a następnie transportowana do wątroby, gdzie są biosyntetyzowane dwa główne białka miedziowe krwi, ceruloplazmina i albumina (HSA u człowieka), a mała pozostałość miedzi, być może 2% całości lub mniej, jest związana z ligandami o małej masie komórkowej, przypuszczalnie SCC. Dwa główne poglądy koncentrują się na HSA i SCC jako kandydatach do odgrywania tej roli. Wyjaśnienie składu, struktury, trwałości i właściwości kinetycznych SCC będzie zatem niezbędne w określeniu, czy jest on czynnikiem dobroczynnym, czy toksycznym w AD i innych chorobach. Miedź jest również kofaktorem wielu nowych leków przeciwnowotworowych. Zrozumienie, jak jest ona przenoszona w krwiobiegu, jest niezbędne dla ustalenia, czy powinna być celem interwencji farmakologicznej i jakie powinny być właściwości potencjalnych leków miedziowych lub przeciwmiedziowych, by były one efektywne. Płodowa surowica cielęca (Fetal Calf Serum, FCS) jest bezkomórkową frakcją krwi płodów cielęcych, zawierającą ponad 1000 składników, spośród których wiele nie zostało określonych. FCS jest niezbędny dla podtrzymania wzrostu hodowanych komórek eukariotycznych, co koniecznie musi obejmować dostarczanie miedzi. Sformułowaliśmy zatem hipotezę, że FCS powinien zawierać SCC. FCS jest certyfikowanym odczynnikiem laboratoryjnym dostępnym w dużych ilościach, co czyni je doskonałym źródłem dla wielkoskalowej izolacji SCC. SCC stanowi problem konceptualny, gdyż wysokie stężenie i wysokie powinowactwo HSA do Cu(II) nakładają ściśle ograniczenia dla właściwości SCC, by mógł on współzawodniczyć o jony Cu^{2+} . Wymagane jest powinowactwo SCC do Cu(II) wyższe, niż można się spodziewać na podstawie jego właściwości spektroskopowych lub stężenie dużo wyższe niż HSA, a więc milimolowe. Należy tu rozważyć następujące opcje: **(i)** kompleks SCC ma niezwykłą strukturę i jego wysoką trwałość; **(ii)** SCC jest kompleksem ternarnym lub rodziną takich kompleksów; **(iii)** SCC jest trwały raczej kinetycznie, niż termodynamicznie; **(iv)** SCC jest artefaktem. Dla wyjaśnienia tych punktów proponujemy wykonanie następujących badań, podzielonych na cztery zadania. W Zadaniu 1. SCC i inne nośniki Cu(II) w FCS zostaną zidentyfikowane przez frakcjonowanie pod względem wiązania miedzi i masy cząsteczkowej, rozwiązując problem (iv). W Zadaniu 2. zidentyfikowane kandydaty na SCC zostaną zsyntezowane w dużych ilościach, a ich kompleksy z Cu(II) scharakteryzowane pod względem struktury, powinowactwa do Cu(II) i podatności na redukcję Cu(II) do Cu(I) . Wyniki Zadania 2. odpowiedzą na problemy (i) i (ii). W Zadaniu 3. wymiar czasowy aktywności SCC zostanie zbadany w odniesieniu do zdolności do wymiany miedzi, w odniesieniu do HSA. Kwestia szybkości reakcji jest kluczowa dla całego projektu, gdyż może ona zwalidować SCC jako funkcjonalnego partnera w systemie dystrybucji miedzi, a zatem aktora w zakresie zdrowia i chorób człowieka. Badania obejmą reakcje Cu^{2+} i Cu^{+} z HSA, SCC z Zadania 2 i innymi małymi cząsteczkami obecnymi we krwi, które mogą działać jako katalizatory lub inhibitory reakcji wiązania/wymiany. Zakres naszego instrumentu jest ograniczony do czasów reakcji dłuższych, niż 2 ms. Badania dla krótszych czasów zostaną wykonane podczas 6-miesięcznego pobytu badawczego doktoranta/ki w TU Delft. Zrealizowane Zadanie 3 da odpowiedź na problem (iii). Ostateczny test funkcji SCC będzie wykonany w Zadaniu 4. in Task 4. gdzie zdolność SCC do dostarczania miedzi do hodowli komórek HEK293 zostanie zbadana za pomocą metodologii opracowanej w naszym laboratorium. Również FCS i całe frakcje FCS zostaną zbadane jako kontrole. Te badania umożliwią domknięcie kwestii SCC, umożliwiając nam sformułowanie hipotez fizjologicznych i zaplanowanie eksperymentów biologicznych. Projekt niesie ryzyko. SCC może być artefaktem lub cząsteczką patologiczną. Jego funkcję mogą wykonywać znane nośniki, np. HSA lub histydyna. Plan projektu jest odporny na te zagrożenia, gdyż nie naśladuje literatury na temat SCC, ale obejmuje jej pełną weryfikację. Alternatywnie SCC może istnieć, ale nie w FCS. Jeśli w projekcie uzyskany zostanie taki mało prawdopodobny wynik, to i tak dostarczy on dużej ilości danych do wykorzystania w przyszłych badaniach. Metodologia planowana do użycia jest pewna i sprawdzona, zapewniając wykonanie projektu. Cała potrzebna aparatura jest w pełni dostępna bezpośrednio w IBB lub przez ustalone współprace.