Błona biologiczna jako podmiot w biochemii miedzi: modele chemiczne, neuromodulatory i walidujący biotest

Kompartmenty biologiczne są otoczone błonami – barierami, które pozwalają komórkom i organizmom na kontrolę i podtrzymywanie stabilnego środowiska wewnętrznego dla skomplikowanych sieci reakcji chemicznych, które składają się na życie. Te bariery składają się z fosfolipidów, cząsteczek zawierających węglowodorowe ogonki i fosforanowe główki, które mogą być dalej rozbudowywane. Te cząsteczki, zwane amfifilicznymi, mają skłonność do samoorganizacji w duże struktury – warstwy podwójne, w których ogonki węglowodorowe sąsiadujących cząsteczek układają się względem siebie, a główki fosforanowe wystają na zewnątrz. Wnętrze takiej struktury jest hydrofobowe – nie miesza się z wodą, a zewnętrze jest hydrofilowe, tworzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Białka są istotnym składnikiem błon biologicznych jako miejsca importu i eksportu metabolitów, a także komunikacji z innymi komórkami. Z tego powodu funkcje błon biologicznych są zwykle rozważane w powiązaniu z odpowiednimi białkami. Fosfolipidy i pokrewne cząsteczki amfifiliczne mogą również tworzyć mniejsze struktury, takie jak pęcherzyki (liposomy) i micele. Rośnie jednak liczba funkcji przypisywanych błonom poza ich składowymi białkami. Jedną z nich jest stabilizacja alternatywnych struktur białek/peptydów błonowych, np. zmieniających ich toksyczność.

Celem tego projektu jest wyjaśnienie jeszcze innej funkcji błon, postulowanej przez nas na podstawie wstępnych wyników doświadczalnych, uzyskanych w naszym laboratorium: wpływ środowiska błonowego na właściwości chemiczne jonów miedzi, w których mogą pośredniczyć neuromodulatory, peptydy biologiczne obecne w mózgu i innych częściach układu nerwowego. Do funkcji neuromodulatorów należy modyfikowanie, wzmacnianie lub osłabianie reakcji neuronów na bodźce, przez co układ nerwowy nabiera zdolności do elastycznego działania. Jony miedzi uczestniczą również w tych procesach na licznych poziomach. Natomiast wszelkie te efekty regulacyjne zachodzą na poziomie indywidualnych synaps, połączeń między komórkami nerwowymi. Zakończenia neuronów są rozdzielone przez niezwykle wąskie odstępy, zwane szczelinami synaptycznymi. Jony miedzi są uwalniane do tych szczelin w odpowiedzi na nadchodzący sygnał i powinny zostać usunięte, a następnie ponownie uwolnione do następnego sygnału. Problemem jest fakt, że te sygnały mogą nadchodzić bardzo często, na przykład co 100 ms, ale znane reakcje chemiczne jonów miedzi z cząsteczkami obecnymi w miejscu są powolniejsze. Hipoteza projektu stanowi, że błona dostarcza warunków dla przyspieszenia znanych reakcji lub stwarza je dla procesów alternatywnych. Ta postulowana rola błony w chemii synapsy nabiera większej wagi w związku ze szczególnie wysokim stosunkiem powierzchni błony do objętości szczeliny synaptycznej. Badanie reakcji chemicznej z użyciem rzeczywistych synaps jest technicznie niemożliwe, a nawet użycie błon fosfolipidowych stwarza problemy. W to miejsce proponujemy wyznaczenie podstawowych właściwości chemicznych środowiska amfifilicznego wobec jonów miedzi z użyciem syntetycznych micel na bazie detergentu SDS, używanego w badaniach strukturalnych białek. Na tej podstawie wykonamy badania na liposomach i żywych komórkach. W ten sposób zbierzemy dokładne dane chemiczne w prostych fizycznie układach i zwalidfujemy je w realistycznych modelach. Takie dane będzie można ekstrapolować do warunków w synapsach, z użyciem dodatkowych informacji z badań biologicznych, takich jak czasy trwania procesów, stężenia białek i małych cząsteczek itp. Uzyskana wiedza zostanie wykorzystana do projektowania innowacyjnych metaloleków i terapii.

Podzieliliśmy projekt na dziewięć zadań: (i) synteza chemiczna neuromodulatorów; (ii) badania efektu środowiska micelarnego na powinowactwo Cu(II) do neuromodulatorów, z użyciem kilku rodzajów micel; (iii) wyznaczenie struktury trójwymiarowej wybranych (najciekawszych) kompleksów tworzonych w danych typach micel, z użyciem wielowymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i specjalnych metod badawczych pozwalających na uzyskiwanie danych strukturalnych pomimo zakłóceń ze strony jonów Cu(II); (iv) badania podatności wybranych układów kompleks/micela na kompetycję ze strony małych ligandów hydrofilowych: na podstawie badań wstępnych możemy oczekiwać, że obecność miceli będzie osłabiać pewne oddziaływania jonów Cu(II) z neuromodulatorami, co może otworzyć drogę dla nowych reakcji z małymi cząsteczkami obficie występującymi w mózgu, jak kwas glutaminowy, histydyna, karnozyna, tauryna, a także dopamina, acetylocholina, noradrenalina i serotonina, oraz krótkie peptydy histydynowe; (v) badania podatności wybranych układów kompleks/micela na redukcję chemiczną do kompleksu Cu(I), co jest konieczne dla transportu miedzi poza szczelinę synaptyczną; (vi) badania efektu środowiska micelarnego na szybkość wymiany jonów Cu(II) między neuromodulatorami i innymi ligandami synaptycznymi w zakresie czasów milisekundowych i krótszych; (vii) utworzenie micel bezpośrednio wiążących jony Cu(II) w uzupełnieniu do oddziaływań z neuromodulatorami. Da to nowy model dla wiązania Cu(II) przez fosfatydyloserynę, składnik naturalnych błon; (viii) badania oddziaływań kompleksów Cu(II) z naładowanymi ujemnie, obojętnymi i wiążącymi Cu(II) liposomami, małymi strukturami błonopodobnymi dla walidacji modeli micelarnych i (ix) dalsza walidacja tych modeli za pomocą testu pobierania miedzi przez komórki, opracowanego w naszym laboratorium, który umożliwia badanie bezpośrednich efektów różnych cząsteczek w linii komórkowej HEK293. Realizacja tych zadań zapewni solidny i zrozumiały krajobraz chemiczny dla roli błony w wypełnianiu synaptycznych funkcji miedzi.