

Transportery nukleotydo-cukrów jako centra organizacyjne wielkocząsteczkowych kompleksów uczestniczących w glikozylacji

W komórkach eukariotycznych znaczący odsetek białek i lipidów podlega glikozylacji. Proces ten polega na enzymatycznym dołączaniu kolejnych reszt cukrowych do odpowiednich akceptorów i prowadzi do powstania m. in. glikoprotein oraz glikolipidów. Glikozylowane makrocząsteczki pełnią wiele istotnych funkcji w wielokomórkowych organizmach pośrednicząc między innymi w szeregu różnorodnych procesów rozpoznania biologicznego, stąd zaburzenia w przebiegu biosyntezy części cukrowych, zwanych glikanami, są przyczyną ciężkich schorzeń metabolicznych. Dołączanie reszt cukrowych do makrocząsteczek zachodzi z udziałem enzymów zwanych glikozylotransferazami wewnątrz retikulum endoplazmatycznego (ER) oraz aparatu Golgiego (AG). Substratami dla tych enzymów są zaktywowane reszty cukrowe (nukleotydo-cukry). Związki te powstają głównie w cytozolu, co wymaga istnienia wyspecjalizowanych białek o aktywności transportującej, które przenoszą je przez błony wyżej wymienionych organelli czyniąc je dostępnymi dla glikozylotransferaz. Białka te określane są mianem transporterów nukleotydo-cukrów. Proces glikozylacji jest niezwykle złożony i oprócz glikozylotransferaz oraz transporterów nukleotydo-cukrów wymaga udziału szeregu innych białek. Sądzymy, że białka pośredniczące w procesie glikozylacji tworzą wieloskładnikowe kompleksy w błonach ER i AG, dzięki czemu proces glikozylacji jest ściśle regulowany oraz zachodzi z odpowiednią wydajnością oraz dokładnością. Wiemy, że transportery nukleotydo-cukrów oligomeryzują oraz oddziałują z innymi tego typu białkami, a także z funkcjonalnie powiązаныmi glikozylotransferazami. Biorąc pod uwagę wymienione właściwości transporterów nukleotydo-cukrów, a także ich specyficzną budowę (wiele domen transmembranowych pozwalających na „solidne” zakotwiczenie w błonach ER i AG) postulujemy, że białka te stanowią centra organizacyjne wielkocząsteczkowych kompleksów uczestniczących w glikozylacji. Według naszej koncepcji biologiczna funkcja transporterów nukleotydo-cukrów nie sprowadza się tylko do dostarczania substratów do reakcji glikozylacji, ale polega także na wspomaganiu organizacji glikozylotransferaz w większe funkcjonalne kompleksy umożliwiające sprawne i nieprzerwane zachodzenie procesu glikozylacji. Chcemy odkryć, jakie inne białka oprócz transporterów nukleotydo-cukrów i glikozylotransferaz wchodzi w skład proponowanych przez nas kompleksów, poznać mechanizmy i czynniki regulujące oddziaływania pomiędzy tymi dwiema grupami białek oraz dowiedzieć się, gdzie dochodzi do powstawania zawierających je kompleksów. Nasze badania chcemy przeprowadzić z użyciem nowatorskich i bardzo czułych metod wykorzystujących zjawisko bioluminescencji, czyli emisji światła przez żywe komórki. Efekt ten możemy uzyskać przez nadprodukcję białka w połączeniu z enzymem o aktywności lucyferazy. Istnieje też możliwość „rozszczenia” cząsteczki lucyferazy na dwa fragmenty, które z osobna nie przejawiają aktywności, ale stają się zdolne do odtworzenia funkcjonalnego enzymu jeżeli znajdą się w dużej wzajemnej bliskości. Główna stosowana przez nas technika polega na jednoczesnej nadprodukcji w komórkach dwóch białek, które podejrzewamy o oddziaływanie, w połączeniu z fragmentami lucyferazy. Jeżeli badane przez nas białka ze sobą oddziałują, dołączone do nich fragmenty odtwarzają cząsteczkę aktywnego enzymu skutkując emisją światła (do zajścia takiej reakcji jest potrzebny dodatek odpowiedniego substratu). Obecność luminescencji w komórkach można wykryć przy pomocy odpowiedniego czytnika (luminometru), ale też zobrazować przy pomocy wyspecjalizowanego mikroskopu. Wyniki badań zaplanowanych w ramach niniejszego projektu dostarczą nowych informacji na temat mechanizmów pośredniczących w organizacji glikozylotransferaz w funkcjonalne struktury błonowe wyższego rzędu i ujawnią nowe funkcje transporterów nukleotydo-cukrów. Uzyskane przez nas dane mogą mieć też znaczenie dla pełnego zrozumienia podłoża objawów towarzyszących schorzeniom spowodowanym zaburzeniami w procesie glikozylacji powstającymi na skutek mutacji w obrębie genów kodujących badane przez nas enzymy i transportery. Ponadto, glikozylacji podlega wiele białek o zastosowaniu terapeutycznym. Uzyskuje się je z wykorzystaniem linii komórkowych, które poddaje się zwykle modyfikacjom genetycznym mającym służyć ukierunkowanym zmianom w strukturach części cukrowych dołączonych do białka, które chce się wyprodukować. Wiedząc, po co transportery nukleotydo-cukrów i glikozylotransferazy oddziałują ze sobą oraz jakie inne białka wchodzi w skład tworzonych przez nie kompleksów będzie można bardziej skutecznie modulować warunki produkcji glikoprotein terapeutycznych.