

Chociaż procesy życiowe mogą przejawiać się w organizmach żywych różnorodnie, to jednak podstawowym kryterium życia jest obecność przemian metabolicznych. Metabolizm jest systemem reakcji chemicznych i powiązanych z nim przemian energetycznych, które zachodzą w każdej żywej komórce. Reakcje te są zorganizowane w szlaki metaboliczne, które działają dzięki enzymom - białkom zdolnym do katalizy przemian chemicznych.

Blisko wiek intensywnych badań biochemicznym zaowocował bogatą wiedzą na temat szlaków metabolicznych, sprawiając wrażenie, że wszystkie przemiany metaboliczne w organizmach żywych zostały już dobrze poznane. Jednak wyniki badań nad poznaniem genomów licznych organizmów jasno wskazują na obecność wielu enzymów o nieznannej funkcji, które mogą tworzyć nowe, dotąd nieopisane, szlaki metaboliczne.

W organizmie człowieka oraz innych kręgowców występuje L-fukoza - cukier, który bierze udział w determinacji grup krwi AB0 oraz w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Proces biosyntezy L-fukozy jest dobrze poznany, jednak bardzo niewiele wiadomo jak organizm rozkłada „nadwyżki” tego związku. Wiadomo natomiast, że taki proces zachodzi szczególnie intensywnie w wątrobie i nerkach człowieka i innych ssaków. W naszym laboratorium prowadzimy obecnie intensywne badania nad poznaniem wszystkich enzymów szlaku degradacji L-fukozy u ssaków. Wyniki naszych najnowszych prac pozwoliły ustalić tożsamość molekularną (zidentyfikować gen) jednego z enzymów szlaku – dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej. Co ciekawe, wykazano, że utracie tego enzymu u myszy towarzyszą poważne zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza. Jednak dokładny mechanizm tych zmian pozostaje nieznany.

Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie wiedzy o procesach metabolicznych dla pełnego zrozumienia funkcjonowania komórek, zarówno prawidłowych jak i zmienionych chorobowo, celem niniejszego projektu jest:

- 1) wytworzenie metodami inżynierii genetycznej „syntetycznych” rekombinowanych form ludzkiej i mysiej dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej oraz wykonanie ich pełnej charakterystyki biochemicznej i funkcjonalnej,
- 2) wytworzenie mysich komórek pozbawionych aktywności dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej, a następnie ich wykorzystanie do identyfikacji zaburzeń metabolicznych towarzyszących utracie badanego enzymu,
- 3) poznanie mechanizmu odpowiedzialnego za zaburzenia homeostazy żelaza w komórkach pozbawionych aktywności dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej.

Rekombinowane formy badanych enzymów będą wytwarzane w komórkach bakterii *Escherichia coli*, a ich aktywność enzymatyczna będzie mierzona spektrofotometrycznie. Natomiast tożsamość chemiczna wytworzonych produktów będzie weryfikowana metodami chromatograficznymi. Wykorzystując technikę CRISPR/Cas9 zostaną przygotowane mysie komórki pozbawione genu kodującego dehydrogenazę 2-keto-3-deoksy-L-fukonianową. Komórki te posłużą identyfikacji zaburzeń biochemicznych towarzyszących utracie zdolności do rozkładu L-fukozy. Metabolity szlaku degradacji L-fukozy będą oznaczane metodami chromatograficznymi, natomiast zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości żelaza będą mierzone techniką radioizotopową.

Oczekujemy, że realizacja projektu doprowadzi do pełnej charakterystyki biochemicznej oraz funkcjonalnej dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej ssaków. Zostanie zatem określona rola tego enzymu u człowieka, ale przede wszystkim zostanie wyjaśniony mechanizm warunkujący nadmierną akumulację żelaza w komórkach pozbawionych aktywności dehydrogenazy 2-keto-3-deoksy-L-fukonianowej. Liczymy także, że uzyskane wyniki przyczynią się do identyfikacji nowych schorzeń człowieka, w których patogenezie mogą być zaangażowane enzymy degradacji L-fukozy.