

Rola N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77

Ludzka syntaza Gb3/CD77 (α 1,4-galaktozylotransferaza, syntaza P1/P^k, UDP-galactose: β -D-galactosyl- β 1-R 4- α -D-galactosyltransferase; EC 2.4.1.228), kodowana przez gen *A4GALT*, jest glikozylotransferazą należącą do białek transmembranowych typu II. Enzym w zależności od reszty aminokwasowej w pozycji 211 łańcucha polipeptydowego rozpoznaje dwa lub trzy różne akceptory. Głównymi produktami są glikosfingolipidowe antygeny Gb3 (P^k) i P1 (należące do ludzkiego układu grupowego krwi P1PK), zawierające terminalną strukturę Gal α 1 \rightarrow 4Gal. W naszym laboratorium wykazano, że enzym z podstawieniem p.Q211E może syntezować również trzeci produkt nazywany antygenem NOR, zawierający terminalny disacharyd Gal α 1 \rightarrow 4GalNAc; erythrocyty z takimi antygenami są rozpoznawane przez większość ludzkich surowic, a zjawisko to jest nazywane poliaglutynacją NOR. Ostatnie doniesienia wskazują, że ludzka syntaza Gb3/CD77, oprócz akceptorów glikosfingolipidowych, może rozpoznawać także akceptory glikoproteinowe, takie jak kompleksowe N-glikany, w których po dodaniu terminalnej galaktozy powstają terminalne oligosacharydy Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-R, nazywane glikotopami P1.

Antygen Gb3 produkowany przez ludzką syntazę Gb3/CD77 może być receptorem dla patogenów, takich jak uropatogenne szczepy *E. coli* czy zoonotyczne szczepy *S. suis*, oraz toksyn Shiga (Stx) produkowanych przez bakterie *S. dysenteriae* (serotyp 1) oraz *E. coli* (szczepy STEC). Zakażenia tymi bakteriami mogą być przyczyną krwotocznego zapalenia okrężnicy oraz zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS). Badania uzyskane w naszym laboratorium wskazują, że oprócz glikosfingolipidu Gb3, będącego głównym funkcjonalnym receptorem dla toksyn Shiga, także glikotop P1 zlokalizowany na glikoproteinach może wiązać i internalizować toksynę Shiga typu 1, wywołując efekt cytotoksyczny.

Syntaza Gb3/CD77 ma dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji zlokalizowane na resztach asparaginy w pozycjach 121 (motyw N₁₂₁AS i) i 203 (N₂₀₃LT) łańcucha polipeptydowego. W naszym laboratorium wykazano uprzednio, że enzymatyczna deglikozylacja enzymu powoduje utratę jego zdolności katalitycznych, ale podstawy molekularne tego zjawiska pozostawały nieznane. Celem badań zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej było więc określenie roli N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77, a w szczególności: 1) określenie, które miejsca N-glikozylacji znajdujące się w ludzkiej syntazie Gb3/CD77 mają przyłączone reszty cukrowe (wraz z charakterystyką typu struktur cukrowych); 2) zbadanie wpływu miejsc N-glikozylacji ludzkiej syntazy

Gb3/CD77 na właściwości enzymu (aktywność enzymatyczną, swoistość akceptorową oraz lokalizację wewnątrzkomórkową); 3) analiza wrażliwości komórek CHO-Lec2 transfekowanych genami kodującymi warianty glikozylacyjne ludzkiej syntazy Gb3/CD77 na toksyny Shiga; 4) zbadanie wpływu reszt cukrowych na konformację enzymu i określenie ich potencjalnego wpływu na jego aktywność katalityczną (analizy *in silico*). Wyniki badań zrealizowanych w celu odpowiedzi na wyżej wymienione pytania opublikowano w dwóch publikacjach oryginalnych.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej stanowi wprowadzenie teoretyczne do części eksperymentalnej. Zostały w niej omówione następujące zagadnienia: rola N-glikanów w aktywności glikozylotransferaz, molekularne mechanizmy leżące u podstaw zmian aktywności zdeglikozylowanych enzymów, oraz metody badania wpływu N-glikanów na aktywność tej grupy enzymów. W publikacji opisałem 34 glikozylotransferaz, dla których istnieją dane literaturowe na temat związku pomiędzy N-glikozylacją i aktywnością.

Badania nad rolą N-glikozylacji w aktywności ludzkiej syntazy Gb3/CD77 zostały podzielone na analizę enzymu o pełnej długości (zlokalizowanego w aparacie Golgiego) oraz analizę jego formy rozpuszczalnej, pozbawionej hydrofobowego fragmentu transmembranowego. W obu podejściach, otrzymałem warianty glikozylacyjne różniące się resztami aminokwasowymi w pozycji trzeciej sekwencji N-glikozylacji (N₁₂₁AA oraz N₂₀₃LA). Ponadto, analizowałem warianty glikozylacyjne dwóch wersji syntazy Gb3/CD77: enzym Q zawierający w pozycji 211 łańcucha polipeptydowego resztę glutaminy, oraz enzym E z resztą kwasu glutaminowego w tej samej pozycji.

W drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej przedstawiłem badania enzymu o pełnej długości przeprowadzone z wykorzystaniem komórek CHO-Lec2. Wykazałem, że oba miejsca N-glikozylacji ludzkiej syntazy Gb3/CD77 mają przyłączone reszty cukrowe. Analiza aktywności enzymatycznej wariantów glikozylacyjnych wykazała, że enzymy z podstawieniami p.S123A mają podobną aktywność enzymatyczną w porównaniu do enzymów w pełni N-glikozylowanych, natomiast aktywność wariantów z podstawieniami p.T205A jest obniżona. Warianty pozbawione N-glikanów (z podstawieniami p.S123A/p.T205A) wykazały szczątkową aktywność enzymatyczną. Wszystkie warianty glikozylacyjne syntezowały terminalne struktury Gal α 1 \rightarrow 4Gal, zarówno na glikosfingolipidach, jak i glikoproteinach, a wszystkie komórki transfekowane wektorami kodującymi glikowarianty były wrażliwe na oba typy holotoksyn Shiga (Stx1 i Stx2). Spadek żywotności komórek transfekowanych genami kodującymi enzymy pozbawione

N-glikanów (a więc o śladowej aktywności) sugeruje, że nawet śladowe ilości Gb3 na glikosfingolipidach i/lub glikotopów P1 na glikoproteinach mogą powodować efekt cytotoksyczny. Wykazałem także, że N-glikan przyłączony do sekwonu N₂₀₃ ma kluczowe znaczenie dla lokalizacji enzymu w aparacie Golgiego, a jedną z przyczyn znacznego obniżenia aktywności zdeglukozyłowanej ludzkiej syntazy Gb3/CD77 może być nieprawidłowa lokalizacja enzymu.

W badaniach opisanych w trzeciej publikacji analizowałem warianty glikozylacyjne syntazy Gb3/CD77 pozbawione fragmentów transmembranowych, produkowane w komórkach HEK293E. Masa cząsteczkowa wariantów pozbawionych jednego N-glikanu była obniżona, natomiast warianty całkowicie pozbawione N-glikanów nie były obecne w medium. Można je było natomiast zidentyfikować w lizatach komórek HEK293E (frakcja nierozpuszczalna białka). Najprawdopodobniej brak N-glikanów powodował nieprawidłowe fałdowanie białka i jego zatrzymywanie w siateczce śródplazmatycznej (ER), lub znaczące obniżenie jego rozpuszczalności, co uniemożliwiało ich efektywne wydzielanie poza komórkę. Analiza aktywności *in vitro* form rozpuszczalnych wariantów glikozylacyjnych wykazała, że jedynie warianty pozbawione N-glikanu w pozycji N₁₂₁ są aktywne, natomiast enzymy pozbawione N-glikanu w pozycji N₂₀₃ oraz obu miejsc N-glikozylacji jednocześnie nie wykazują aktywności enzymatycznej.

Charakterystyka struktur cukrowych rozpuszczalnych form ludzkiej syntazy Gb3/CD77 wykonana z użyciem glikozydaz o różnej swoistości wykazała obecność dwóch typów struktur N-glikanowych: enzymy w pełni N-glikozylowane zawierały N-glikany kompleksowe i wielomannozowe, natomiast warianty z podstawieniem w jednym sekwonie zawierają tylko N-glikany typu kompleksowego. Z uwagi na brak znanej struktury przestrzennej ludzkiej syntazy Gb3/CD77, przeprowadzono modelowanie białka *in silico* na modelu enzymu z dołączonymi resztami cukrowymi. Uzyskane dane potwierdziły, że N-glikan przyłączony do sekwonu w pozycji N₂₀₃ znajduje się w pobliżu reszt aminokwasowych wchodzących w skład centrum aktywnego enzymu, a dodatkowo wykazały, że region ten charakteryzuje się dużą stabilnością łańcucha polipeptydowego. Z kolei sekwon N₁₂₁ jest zlokalizowany w obrębie labilnej struktury drugorzędowej białka, z dala od centrum aktywnego, przez co nie powinien wpływać na funkcje katalityczne. Dane te sugerują możliwość allosterycznej regulacji aktywności enzymatycznej ludzkiej syntazy Gb3/CD77 przez N-glikan przyłączony do asparaginy w pozycji N₂₀₃.

Dalsze badania nad ludzką syntazą Gb3/CD77 powinny skupić się na poznaniu struktury przestrzennej enzymu, co pozwoli ostatecznie określić rolę N-glikanów

w kształtowaniu katalitycznych właściwości enzymu, a także wyjaśnić molekularne podstawy rozszerzenia swoistości akceptorowej enzymu z podstawieniem p.Q211E. Badania nad tym enzymem mogą też potencjalnie zastosowania aplikacyjne, na przykład w poszukiwaniu nowych metod leczenia nowotworów, ponieważ ludzka syntaza Gb3/CD77 bierze udział w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT), lub w próbie zastosowania glikotopów P1 jako receptorów „wabikowych” w leczeniu zakażeń STEC.