

16. CHEMICZNE MODYFIKACJE RESZT AMINOKWASOWYCH

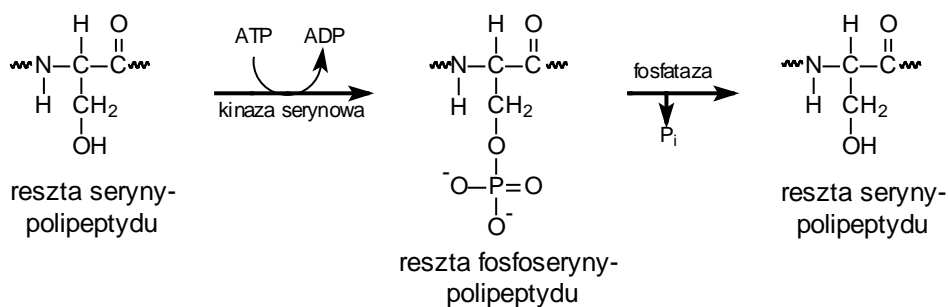
Iwona Żak

Posttranslacyjnym modyfikacjom łańcuchów bocznych aminokwasów ulega 15, spośród 20 aminokwasów białkowych, z wyjątkiem alaniny, waliny, leucyny, izoleucyny i metioniny.

Chemiczne modyfikacje reszt aminokwasowych w białkach polegają na reakcjach: fosforylacji, γ -karboksylacji, acetylacji, metylacji, hydroksylacji, acylacji: mirystylacji i palmitylacji, prenylacji: farnesylacji i geranylogeranylacji, tworzenia glikozylofosfatydyloinozytolowych (GIP)-pochodnych, racemizacji, ADP-rybozylacji, adenylacji, ubikwitynacji, sieciowania białek z udziałem poliamin, tworzenia allizyny i poprzecznych wiązań między łańcuchami polipeptydowymi, glikozylacji oraz glikacji nieenzymatycznej.

FOSFORYLACJA

Reakcje fosforylacji polegają na przeniesieniu końcowej grupy fosforanowej (czyli γ) z ATP na atom tlenu grupy hydroksylowej specyficznej reszty aminokwasowej, mianowicie: Ser, Thr lub Tyr.



Zmodyfikowane białko na skutek fosforylacji uzyskuje dwa dodatkowe ujemne ładunki. Fosforylacja reszty seryny w polipeptydzie zmniejsza podatność białka na proteolizę. Fosforylacja histonu H1 towarzyszy kondensacji chromosomów podczas mitozy.

Dołączona do białka grupa fosforanowa może tworzyć trzy wiązania wodorowe, które dzięki tetraedrycznemu układowi przestrzennemu są silnie ukierunkowane. Zmiany te mogą powodować znoszenie dotychczasowych oddziaływań elektrostatycznych w białku i przyczyniać się do tworzenia nowych oddziaływań. Powstające w ten sposób zmiany strukturalne mogą zasadniczo zmieniać aktywność biologiczną białka, w tym aktywność katalityczną, wiązanie substratu, jeśli fosforylowanym białkiem jest enzym.

Fosforylacja jest skutecznym sposobem aktywacji wielu białek, ale są i takie białka, które w wyniku fosforylacji ulegają inaktywacji (np. fosforylaza glikogenowa jest aktywowana, a syntaza glikogenowa inaktywowana). Wiele enzymów, kanałów i innych białek wewnątrzkomórkowych jest regulowana dzięki fosforylacji. Proces ten zachodzi wewnątrz komórki, gdzie jest duże stężenie ATP. Białka zewnątrzkomórkowe nie są regulowane przez odwracalną fosforylację.

Reakcje fosforylacji, zachodzące w organizmie są katalizowane enzymatycznie przez kinazy (fosfotransferazy), wśród których wyróżnia się dwie klasy: kinazy białkowe fosforylujące Ser lub Thr (klasa I) i kinazy białkowe fosforylujące Tyr (klasa II). Defosforylację, czyli hydrolizę wiązania z regeneracją grupy wodorotlenowej aminokwasu w białku i uwolnieniem ortofosforanu (P_i), katalizują fosfatazy, które znoszą skutki działania kinaz.

Białka mogą podlegać cyklicznej przemianie między formą ufosforylowaną i nieufosforylowaną, z szybkością zależną od aktywności kinaz i fosfataz w komórce. Fosforylacja i defosforylacja mogą przebiegać w czasie krótszym niż jedna sekunda lub trwać kilka godzin. Skutkiem fosforylacji jest często silne wzmocnienie początkowego sygnału np. hormonalnego. Jedna cząsteczka zaktywowanej kinazy może w krótkich odstępach czasu ufosforylować setki białek docelowych, które jeśli są enzymami, przekształcają dużą ilość substratu.

KARBOKSYLACJA

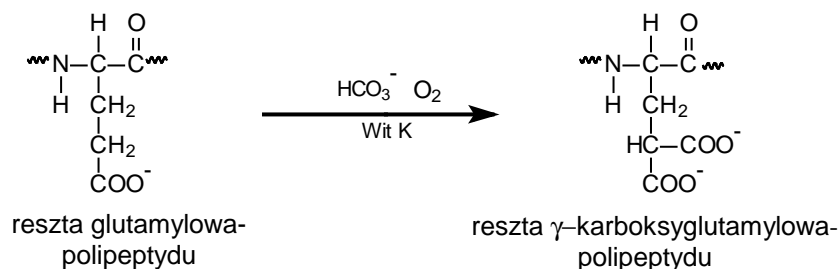
Karboksylacja reszt glutaminianu do γ -karboksylglutaminianu w białkach uczestniczących w krzepnięciu krwi dostarcza miejsc wiążących jony Ca^{+2} , przekształcając je ze słabych chelatorów wapnia w silne. Reakcja katalizowana jest przez system enzymatyczny zależny od witaminy K.

Jednym z białek uczestniczących w krzepnięciu krwi jest protrombina, która w rejonie swego N-końca polipeptydu posiada 10 reszt glutaminianu, ulegających procesowi karboksylacji. Wytworzone γ -karboksylglutaminiany w protrombinie wiążą jony wapnia, dzięki czemu protrombina wiąże się z fosfolipidami błonowymi płytek krwi.

Związanie protrombiny z powierzchnią płytek krwi uprzystępnia ją innym czynnikom krzepnięcia (mianowicie: czynnikowi X i V), które przekształcają pro-

trombinę w trombinę. Aktywna trombina może przekształcać fibrynogen w fibrynę.

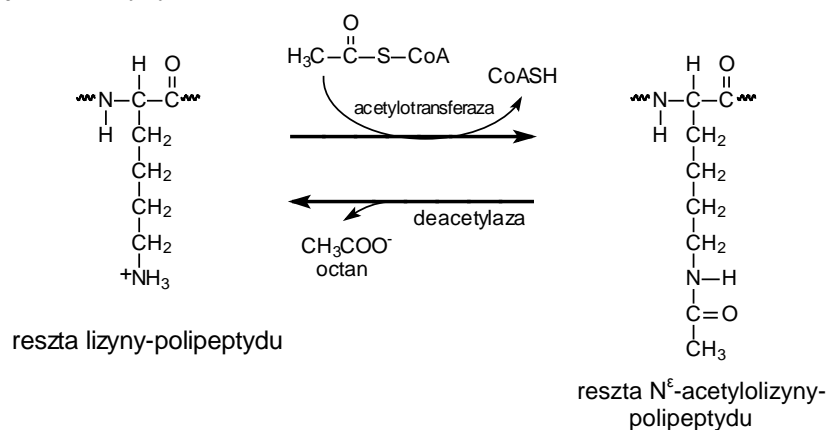
Pod wpływem antykoagulantów (np. dikumarolu) lub gdy w organizmie brak jest witaminy K, protrombina nie zawiera γ -karboksylglutaminianów, dlatego nie wiąże jonów Ca i proces krzepnięcia krwi zostaje zahamowany.



Karboksylacja grup ϵ -aminowych lizyny w białku zwiększa jego podatność na proteolizę.

ACETYLACJA

Acetylacja jest modyfikacją chemiczną szczególnie rozpowszechnioną wśród białek jąder komórkowych. Proces ten katalizują acylotransferazy przenoszące resztę acetylową z acetylo-CoA na grupę ϵ -aminową łańcucha bocznego lizyny. W wyniku tej odwracalnej reakcji acetylacji powstaje N^ϵ -acetylolizyna. Acetylacja obniża ładunek dodatni lizyny. Acetylacja reszt lizyny w N-końcowych domenach histonów rdzeniowych oktameru nukleosomowego towarzyszy aktywnej transkrypcji chromatyny.

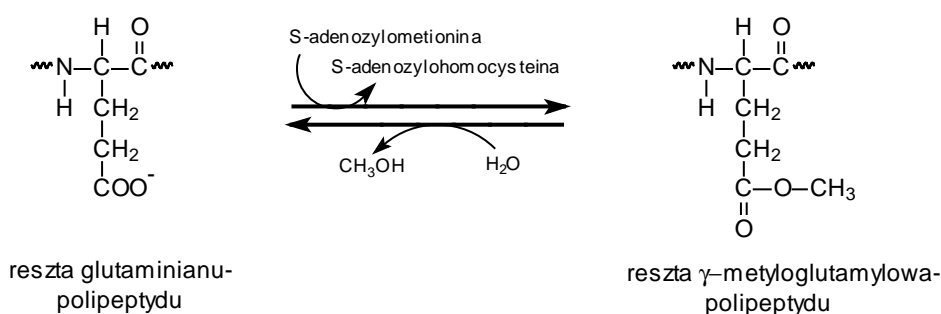


Usunięcie reszty octanu z białka odbywa się przy udziale deacetylazy.

W nieodwracalnej acetylacji białek modyfikowana jest grupa α -aminowa N-końcowego aminokwasu polipeptydu, sprawia to, że tak zmodyfikowane białko ma zmniejszoną podatność na proteolizę.

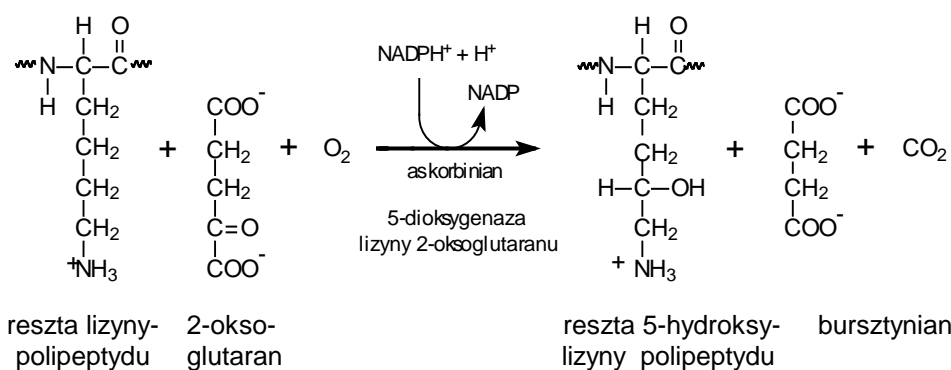
METYLACJA

Reakcję metylacji katalizują metylotransferazy, które przenoszą grupę metylową z aktywnego donora (S-adenozylometioniny lub betainy) na akceptor metylu. Akceptorami grupy metylowej mogą być atomy azotu grupy aminowej w aminokwasach zasadowych i glutaminie oraz atom tlenu w asparaginie.



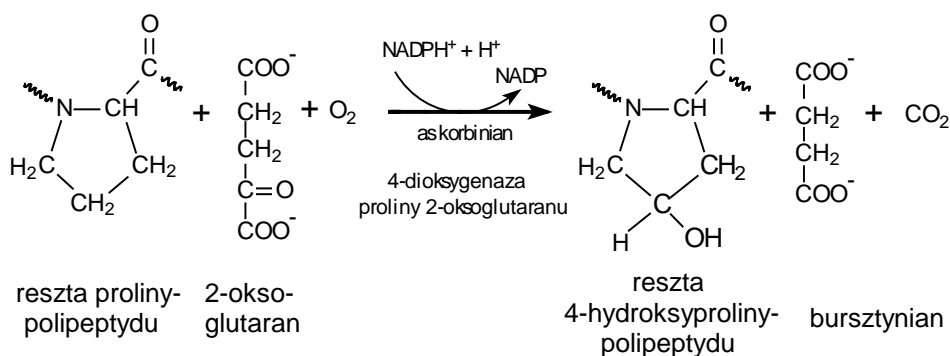
HYDROKSYLACJA

Reakcji hydroksylacji ulegają dwa aminokwasy, mianowicie lizyna i prolina, które w wyniku tej reakcji są przekształcane do 5-hydroksylizyny oraz 4-hydroksyproliny, a nieco rzadziej do 3-hydroksyproliny. Proces hydroksylacji jest katalizowany przez dioksygenazy, inaczej zwane hydroksylazami lub oksygenazami hydroksylującymi.



Dioksygenazy wbudowują jeden atom zaktywowanego tlenu cząsteczkowego w substrat (lizynę lub prolinę) z wytworzeniem w nim grupy $-OH$. Podczas

przebiegu reakcji potrzebny jest czynnik redukujący ($\text{NADPH} + \text{H}^+$), który powoduje redukcję drugiego atomu tlenu do wody.

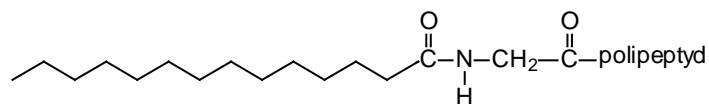


Hydroksylacja proliny i lizyny przebiega w obecności 2-oksoglutaranu, który przekształcany jest w oksydacyjnej dekarboksylacji do bursztynianu. Proces hydroksylacji do hydroksylizyny i hydroksyproliny wymaga obecności witaminy C (askorbinianu) jako czynnika redukującego. Askorbinian utrzymuje w niezmiennym stanie jon żelazawy, znajdujący się w centrum aktywnym oksygenaz hydroksylujących.

ACYLACJA

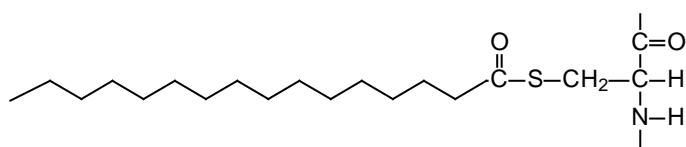
Acylacja jest chemiczną modyfikacją białek, w wyniku której rozpuszczalne białko cytoplazmatyczne uzyskuje hydrofobową kotwicę (acyl), która umożliwia zaczepienie białka w błonie. Przykładami acylacji mogą być reakcje mirystylacji i palmitylacji.

Mirystylacja polega na przeniesieniu reszty kwasu mirystynowego (C_{14}) (lub innej grupy acylowej) na N-końcową resztę glicyny polipeptydu. W wyniku tej reakcji powstaje na N-końcu polipeptydu N-mirystoiloglicyna, w której obecne jest wiązanie peptydowe wytworzone z grupy $-\text{COOH}$ kwasu mirystynowego i grupy NH_2 -aminokwasu. Aktywnym donorem reszty acylowej jest mirystoilo-CoA. Reakcję katalizuje enzym transferaza N-mirystoilu. Mirystylacja umożliwia zmodyfikowanemu białku interakcję z receptorem błonowym lub z dwuwarstwą lipidową.



N-mirystoiloglicyna-N-końca polipeptydu

Palmitylacja polega na przeniesieniu reszty kwasu palmitynowego z palmitoilo-CoA na grupę hydrosulfidową reszt cysteiny. W wyniku reakcji powstają pochodne S-palmitoilowe białka. Do białka rodopsyny przyłączone są dwie grupy S-palmitoilowe, które służą do zakotwiczenia rodopsyny w błonie.

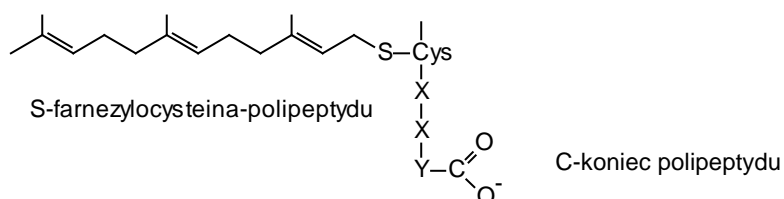


S-palmitoilocysteina-polipeptydu

PRENYLACJA

Prenylacja polega na przyłączaniu do białek pochodnych izoprenowych, takich jak jednostka farnezyłowa (C₁₅) lub geranylogeranyłowa (C₂₀).

Farnezyłacja jest reakcją przyłączania wiązaniem tioeterowym grup farnezyłowych do reszt cysteiny, znajdujących się przy C-końcu polipeptydu.

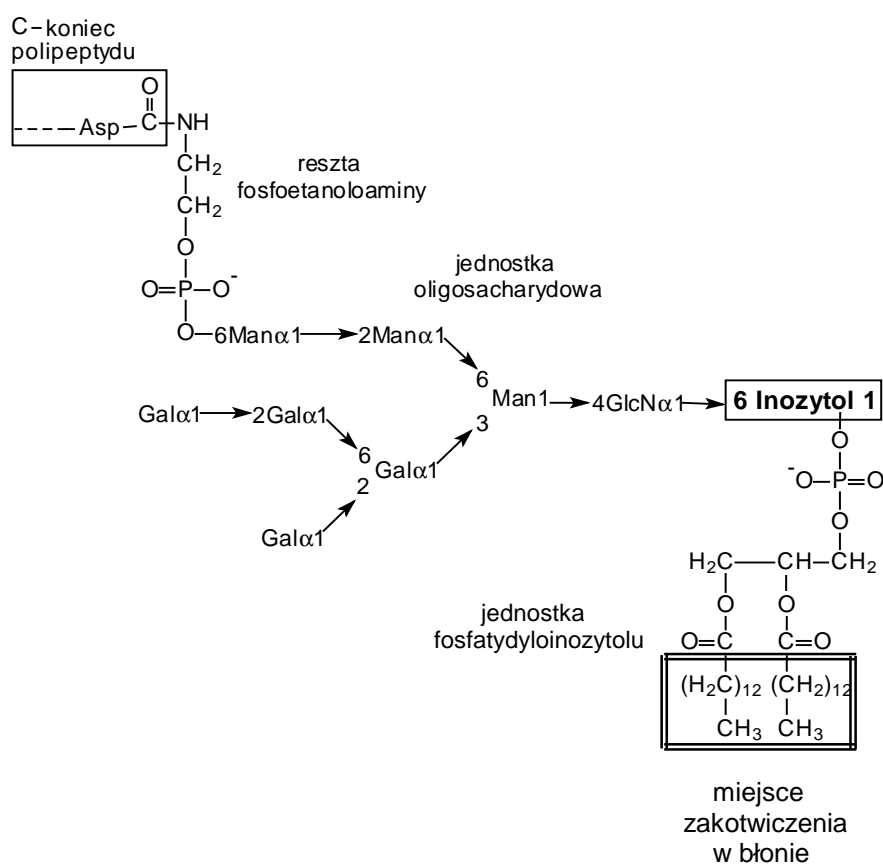


Reszty cysteinowe, ulegające farnezyłacji, znajdują się w specyficznej sekwencji aminokwasowej CXXY (C – cysteina; X – reszty alifatyczne; Y – reszta z grupą karboksylową). Po przyłączeniu farnezyłu do cysteiny, reszty XXY są proteolitycznie usuwane, a nowa końcowa grupa karboksylowa ulega metylacji. Farnezyłacji ulega wiele białek, szczególnie te, które uczestniczą w przekazywaniu sygnałów lub w docelowym kierowaniu białek. Przykładowo, białko *ras*, dopóki nie ulegnie farnezyłacji nie jest zdolne przekazać sygnałów wzrostowych, gdyż nie zostało włączone do błony komórkowej. Zamiast farnezyłacji zachodzi **geranylo-geranyłacja** wówczas, gdy w rejonie C-końca polipeptydu występuje jedna ze specyficznych sekwencji aminokwasowych: CC, CYC lub CCYY (C – cysteina; Y – to reszta aminokwasowa z grupą karboksylową). Jednostka geranylogeranyłu

przyłączana jest do jednej lub obu reszt cystein. Modyfikacja ta zachodzi w małych białkach wiążących GTP z rodziny *rab*, które biorą udział w kierowaniu białek do błon siateczki śródplazmatycznej. Przyłączenie tej wysoce hydrofobowej kotwicy jest niezbędne do związania białka z błoną.

GLIKOZYLOFOSFATYDYLOINOZYTOŁOWE-POCHODNE

Niektóre białka występujące na powierzchni komórki są zakotwiczone w błonie poprzez jednostki glikozylofosfatydyloinozytolowe (GPI), znajdujące się na C-końcu polipeptydu.



W błonie zwykle zakotwiczone są tylko długie łańcuchy acylowe kwasów tłuszczowych z jednostki fosfatydyloinozytolu GPI. Obecność glikozylofosfatydyloinozytolowej kotwicy sprawia, że połączenie białka z błoną jest elastyczne. Takie połączenie ułatwia białkom błonowym oddziaływanie z cząsteczkami znajdującymi się poza komórką, tym bardziej, że całe białko jest umiejscowione poza komórką.

ką, z wyjątkiem acyli glikolipidowej kotwicy. Wiele enzymów hydrolitycznych i adhezyn łączy się z powierzchnią komórki poprzez jednostkę GPI.

RACEMIZACJA

Reakcja racemizacji L-asparagianu w D-asparagian jest chemiczną modyfikacją białek, związaną z wiekiem. Białkiem podatnym na tę modyfikację jest np. α -kryształina prawidłowej soczewki. Reakcja racemizacji nasiloną jest w zaćmie.

ADP-RYBOZYLACJA

Proces ADP-rybozylacji może regulować funkcję wielu białek, w tym enzymatycznych, przypuszczalnie zaangażowany jest też w tak ważne zjawiska biologiczne, jak pamięć i uczenie.

Mono-ADP-rybozylacja polega na przeniesieniu pojedynczej reszty adenylozodifosforu (ADP-rybozy) na białko akceptorowe w reakcji katalizowanej przez mono-ADP-rybozylotransferazę. Donorem grup ADP-rybozy jest dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD^+). W procesie tym mogą być modyfikowane białka pozajądrowe komórki, mianowicie czynnik elongacyjny EF2 procesu translacji lub białko G przez niektóre toksyny.

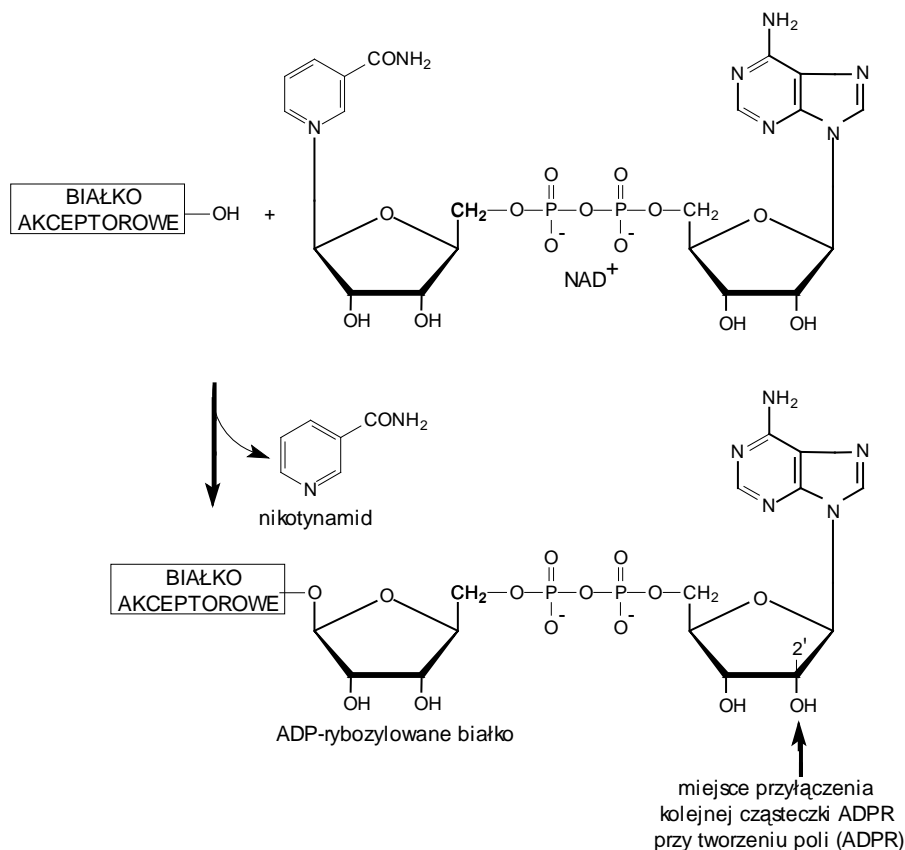
Szkodliwe działanie **toksyny błonicy** z *Corynebacterium diphtheriae* (gen tej toksyny pochodzi z lizogennego faga żyjącego w tych bakteriach), wynika z faktu, że fragment A jej polipeptydu wykazuje aktywność katalityczną ADP-rybozylotransferazy i modyfikuje czynnik elongacyjny EF-2 translacji. ADP-rybozylowany czynnik EF-2 nie jest zdolny do przeprowadzania translacji „rosnącego” polipeptydu, blokując proces translacji. Obecny w cytoplazmie nawet pojedynczy fragment A tej toksyny może zabić komórkę.

Toksyna cholery wykazuje również aktywność ADP-rybozylotransferazy i katalizuje ADP-rybozylację reszty argininy w podjednostce- α białek $G_{s\alpha}$. Modyfikacja ta w wysokim stopniu hamuje zdolność białka $G_{s\alpha}$ do hydrolizowania GTP do GDP, tym samym utrzymuje przedłużoną jego aktywność stymulowania cyklicznej adenylanowej i w ten sposób doprowadza do znacznego wzrostu stężenia cAMP.

Proces poli-ADP-rybozylacji modyfikuje białka jądrowe, takie jak histony H_1 , endonukleazy. Reakcję poli-ADP-rybozylacji katalizuje ADP-rybozylotransferaza polimeryzująca, inaczej zwana syntazą poli(ADPR), która sprawia, że w modyfikowanym białku znajdują się polimery adenylozodifosforu, czyli poli(ADPR).

Polimeryzacja grup ADP-rybozy następuje poprzez wytwarzanie wiązań glikozydowych pomiędzy atomem C1 rybozy jednego monomeru ADP-rybozy (który powstał z NAD po usunięciu amidu kwasu nikotynowego), a atomem C-2 rybozy

innego monomeru ADP-rybozy. Wytwarzanie wiązań glikozydowych między poszczególnymi monomerami doprowadza do wytworzenia oligomeru lub polimeru, czyli poli(ADPR).



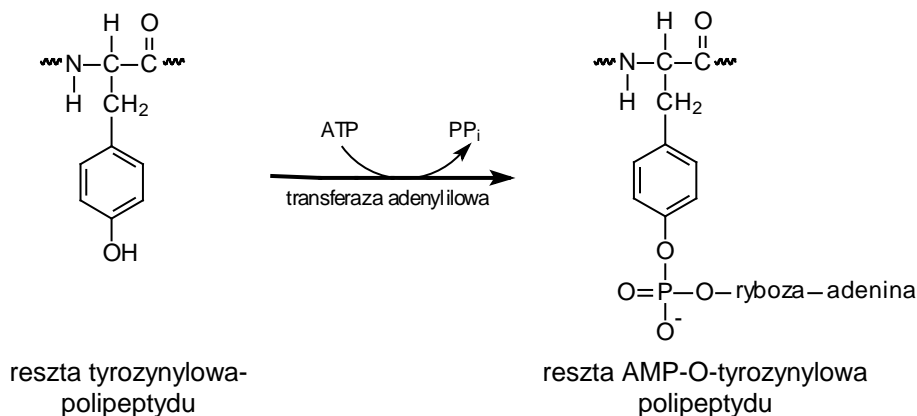
Łańcuch poli-ADP-rybozy zwykle połączony jest z atomem tlenu grupy γ -karboksylowej kwasu glutaminowego lub O^{β} -fosfoseryny modyfikowanego białka. Modyfikacja ta jest odwracalna, ponieważ może nastąpić hydrolityczne rozrywanie kolejnych wiązań glikozydowych między resztami rybozy-rybozy kolejnych monomerów i usunięcie tych cząsteczek.

ADENYLACJA

Adenylacja polega na kowalencyjnym przyłączeniu adenozymonofosforanu (AMP) wiązaniem fosfodiesterowym do grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu w białku. Reakcja katalizowana jest przez transferazę adenylilową.

Przykładem białka ulegającego adenylacji może być syntetaza glutaminianowa. W tym białku enzymatycznym akceptorem AMP jest grupa hydroksylowa

specyficznej reszty tyrozynowej, znajdująca się w każdej podjednostce enzymu. Adenyliowany enzym jest bardziej wrażliwy na inhibicję stymulowaną zgodnie z zasadą sprzężenia zwrotnego niż forma enzymu niezmodyfikowanego.



Przyłączona wiązaniem fosfodiesterowym reszta AMP, w reakcji odwrotnej, może być usunięta z białka w wyniku fosforolizy, katalizowanej przez ten sam enzym, który przeprowadził adenylicację syntetazy glutaminianowej.

UBIKWITYNACJA

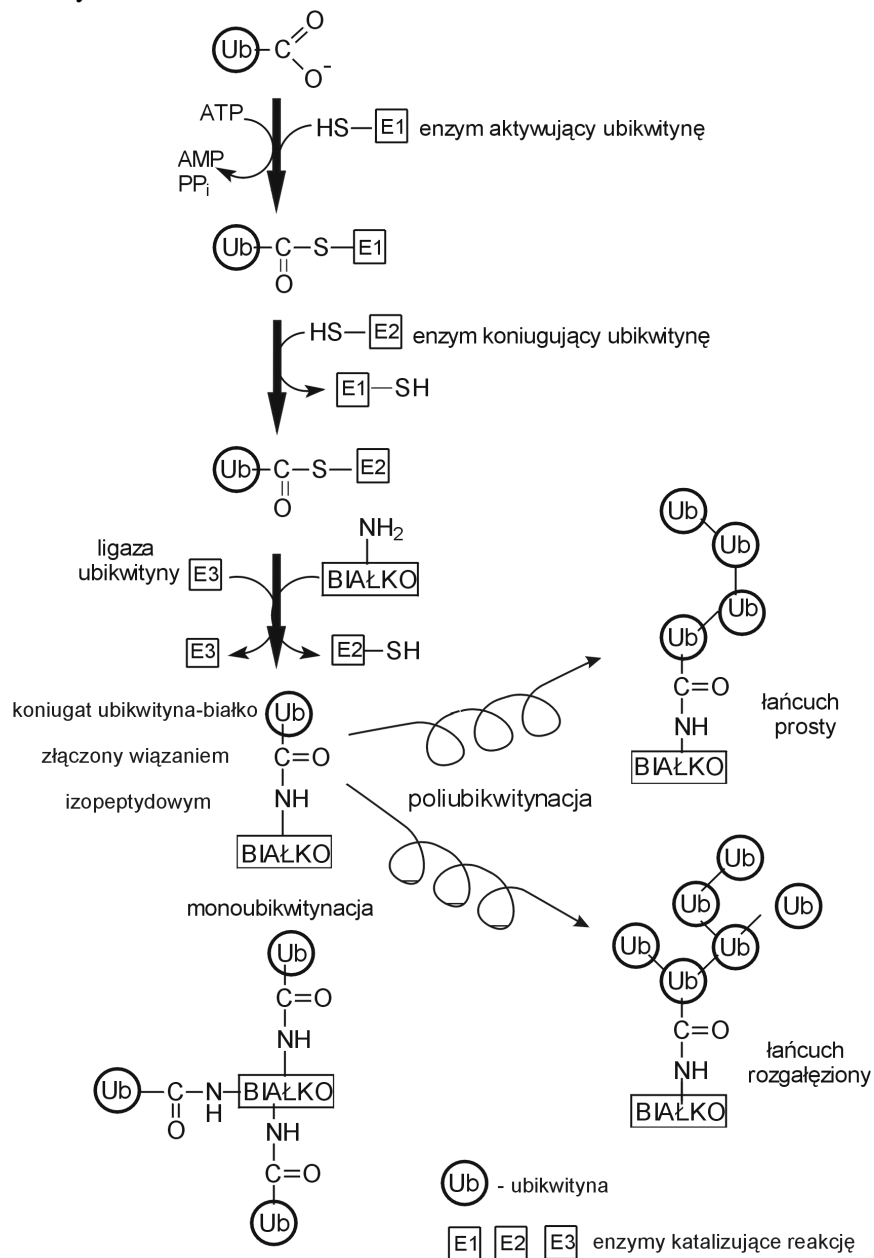
Ubikwitynacja jest posttranslacyjną modyfikacją białka, która polega na połączeniu wiązaniem izopeptydowym ubikwityny poprzez jej C-końcową resztę glicyny z grupą ϵ -aminową lizyny białka podlegającego tej modyfikacji. W wyniku reakcji powstaje zmodyfikowane białko zawierające monoubikwitynę. Wiązanie izopeptydowe występuje, gdy uczestniczy w nim inna grupa aminowa niż α -aminowa, przykładowo ϵ -aminowa aminokwasu.

Ubikwityna jest polipeptydem (75 reszt aminokwasowych), często określanym jako niskocząsteczkowe białko (masa cząsteczkowa rzędu 8500 D), które jest wysoce termostabilne, czyli ma niezwykłą wytrzymałość na wysoką temperaturę, szeroki zakres zmian pH i polarności środowiska.

Monoubikwitynacja oznacza, że białko zostało zmodyfikowane pojedynczymi resztami ubikwityny. Multiubikwitynacja oznacza, że do białka dołączone są liczne reszty ubikwityny, które tworzą łańcuchy poliubikwitynowe proste lub rozgałęzione. Proces ubikwitynacji katalizują trzy enzymy (E1, E2, E3), energia (ATP) wymagana jest tylko na początkowym etapie aktywacji ubikwityny.

Po monoubikwitynacji z reguły ma miejsce wiązanie się cząsteczek ubikwityny między sobą poprzez ich C-końcową grupę karboksylową glicyny a miejscem akceptorowym innej cząsteczki ubikwityny, którym jest grupa ϵ -aminowa reszt

lizyny, znajdujących się w pozycji 48 lub 63 polipeptydu ubikwityny. Prowadzi to do powstania prostych lub rozgałęzionych łańcuchów poliubikwitynowych w modyfikowanym białku.



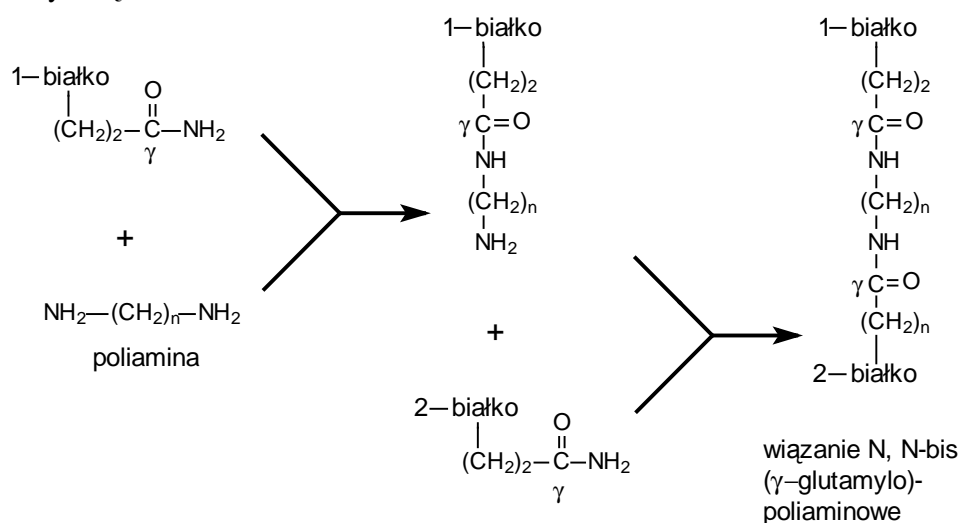
Ryc. 1. Proces ubikwitynacji białek.

Proces ubikwitynacji jest uniwersalnym systemem u eukariota „oznakowywania” białek, przeznaczonych do zniszczenia. „Oznakowanie” białka ubikwityną, szczególnie w formie łańcuchów poliubikwitynowych, ukierunkowuje białko na drogę proteolizy. Ubikwitynowane białka szybko ulegają degradacji przez proteazy pozalizosomalne w strukturach zwanych proteasomami, dzięki czemu białka są eliminowane z puli białek podobnych, ale niezmodyfikowanych. W ten sposób degradowane są w cytoplazmie białka nieprawidłowo zsintetyzowane, źle rozmieszczone w strukturach subkomórkowych lub starzejące się.

SIECIOWANIE BIAŁEK POLIAMINAMI

Nieodwracalna, posttranslacyjna modyfikacja białek, polegająca na wbudowaniu poliamin i specyficznym związaniu (sieciovaniu) łańcuchów polipeptydowych modyfikuje właściwości i funkcje białek. Białka sieciowane poliaminami występują w sieci fibrynowej krzepnącej krwi, w przestrzeni międzykomórkowej oraz w rogowaciejącej warstwie skóry i jej wytworach. Wewnątrz komórki sieciowanie poliaminami białek może stabilizować cytoszkielet.

Reakcje sieciowania katalizują transglutaminazy, które tworzą wiązanie γ -glutaminyloaminowe między I-rzędową grupą aminową poliaminy, a resztą γ -glutamylową białek.

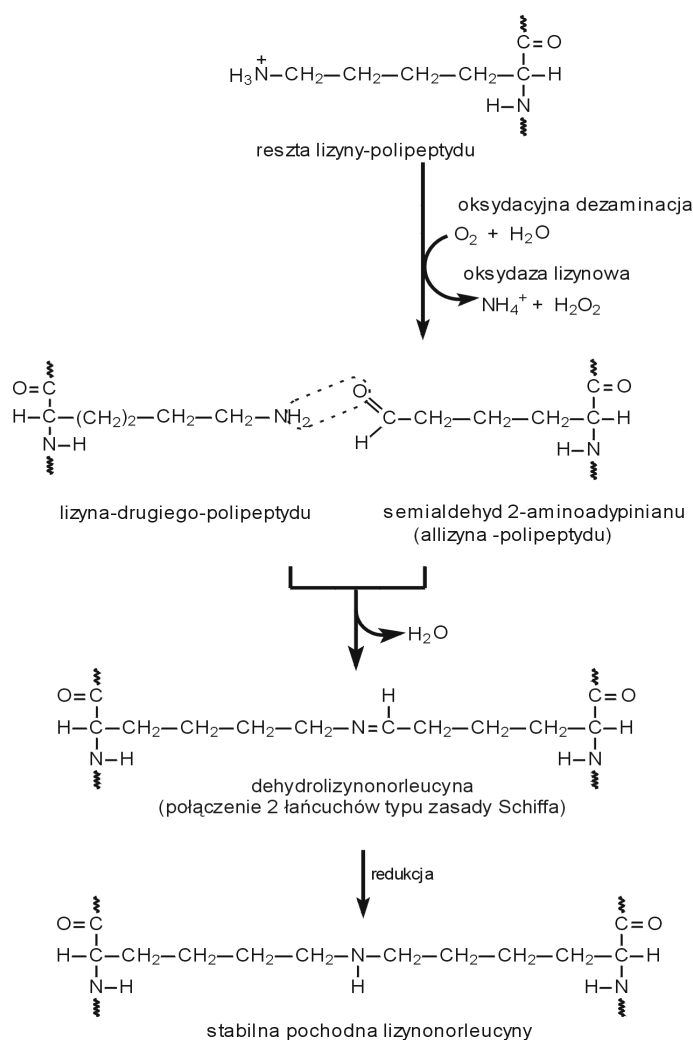


Połączenie białek wiązaniami N,N-bis(γ -glutamyl)poliaminowymi sprawia, że białka (tak zmodyfikowane) stają się stabilnymi polimerami, niewrażliwymi na proteolizę, czyli degradację enzymatyczną, chemiczną i fizyczną. Białka tak zmodyfikowane mogą zwiększać odporność struktur subkomórkowych i tkanek. Przykładem mogą być keratocyty w stanie chorobowym zwanym łuszczyca, które mają

wysoki poziom poliamin i liczba wiązań N,N-bis(γ -glutamilo)spermidynowych wzrasta kilkakrotnie. Podobne zjawisko ma miejsce podczas apoptozy.

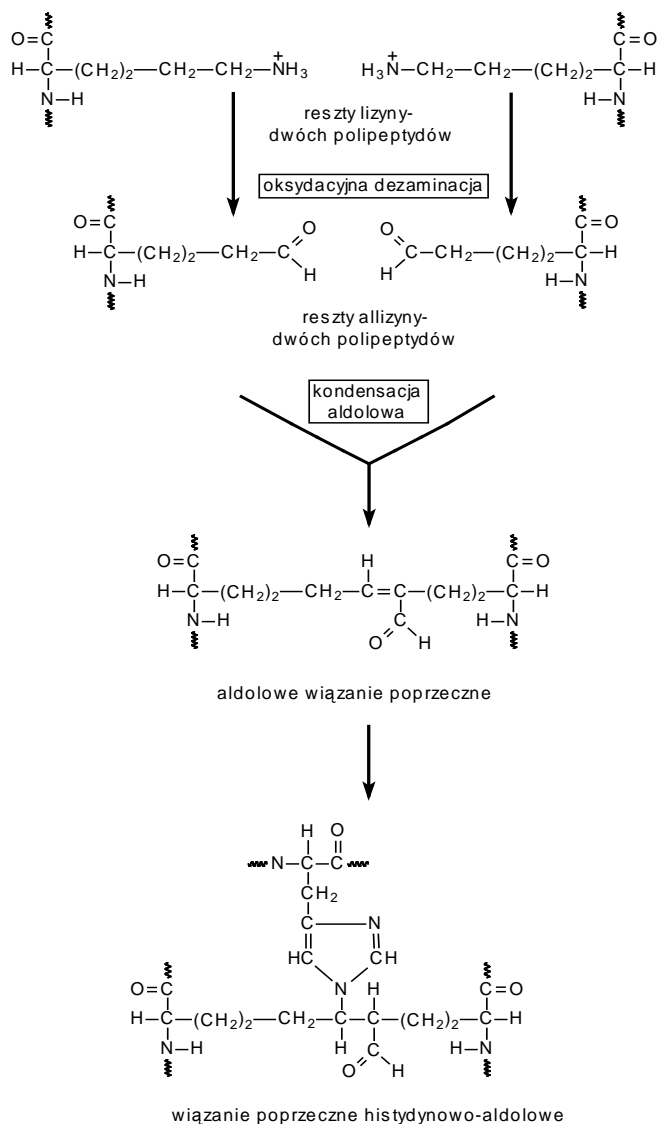
TWORZENIE WIĄZAŃ POPRZECZNYCH

Tworzenie wiązań poprzecznych (krzyżowych) między łańcuchami polipeptydowymi ma szczególne znaczenie podczas „dojrzwania” dwóch głównych białek tkanki łącznej, mianowicie kolagenu i elastyny. Podczas tworzenia wiązań poprzecznych modyfikacja chemiczna dotyczy głównie aminokwasu białkowego – lizyny, choć inne też mogą uczestniczyć.



Ryc. 2. Przebieg powstawania wiązań krzyżowych lizynonorleucynowych.

Proces inicjuje reakcja oksydacyjnej dezaminacji reszt lizyny w polipeptydach tropokolagenu lub elastyny, której produktem jest aldehydowa pochodna lizyny, semialdehyd 2-aminoadypinianu, zwany **allizyną**. Reakcję katalizuje oksydaza lizynowa, (miedzioproteina). W dalszych, złożonych etapach tworzenia wiązań poprzecznych, mogą być zaangażowane dwie, trzy lub cztery reszty aminokwasowe, przy czym ostateczny typ wiązania poprzecznego zależy od tego, czy na wstępie oddziałują ze sobą reszty lizyny i allizyny (ryc. 2), czy dwie allizyny (ryc. 3).

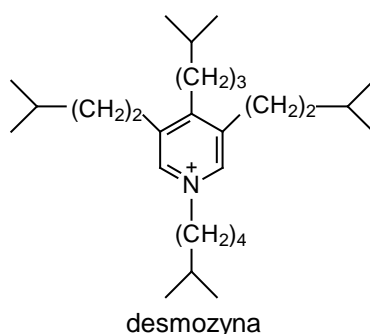


Ryc. 3. Przebieg powstawania aldolowych wiązań krzyżowych.

Produktem reakcji między resztą lizyny jednego polipeptydu a allizyną drugiego polipeptydu jest najpierw połączenie typu zasady Schiffa w postaci dehydrolizynonorleucyny, które ulega redukcji do stabilnej pochodnej lizynonorleucyny, stanowiącej wiązanie poprzeczne w kolagenie i elastynie (ryc. 2).

W wyniku kondensacji aldolowej dwóch allizyn pochodzących z różnych łańcuchów tropokolagenu powstaje między nimi aldolowe wiązanie poprzeczne, czyli z wolną grupą aldehydową. Aldolowe wiązanie poprzeczne między dwoma polipeptydami może być wykorzystane do przyłączenia trzeciego łańcucha tropokolagenu poprzez jego pierścień imidazolowy reszty histydyny. Ostatecznie uformowane wiązanie tego typu nazywa się poprzecznym wiązaniem histydynowo-aldolowym (ryc. 3).

Innego typu wiązanie krzyżowe powstaje w elastynie, które łączy cztery łańcuchy polipeptydowe poprzez poliaminokwas desmozynę lub jej izomeryczną postać – izodesmozynę. Oba poliaminokwasy zawierają jednakowy pierścień pirydynowy, lecz różnią się położeniem reszt lizynowych, w desmozynie znajdują się w pozycjach 3, 4, 5, a w izodesmozynie 2, 3, 5.



W procesie tworzenia tego typu wiązania krzyżowego uczestniczą trzy cząsteczki allizyn pochodzące z różnych polipeptydów oraz jedna cząsteczka lizyny z czwartego polipeptydu elastyny. Produktem kondensacji tych czterech reszt jest heterocykliczny pierścień pirymidynowy desmozyny lub izodesmozyny.

GLIKOZYLACJA

Glikozylacja białek polega na przyłączeniu wiązaniem glikozydowym cukrowców do określonych reszt aminokwasowych polipeptydu. Wynikiem tych reakcji jest „dobudowanie” składnika węglowodanowego do białka i przekształcenie go w glikoproteinę. Wszystkie białka sekrecyjne ulegają glikozylacji, zatem są glikoproteinami, przynajmniej na etapie transportu z retikulum endoplazmatycznego, poprzez aparat Golgiego do błony plazmatycznej. Reakcje glikozylacji polipeptydów odpowiedzialne są za nadanie polipeptydom specyficznego cukrowego pięć-

na, które pełni rolę drogowskazu, kierującego białko do właściwego mu miejsca przeznaczenia na terenie komórki lub poza komórkę.

Proces glikozylacji jest wieloetapowy i zachodzi kotranslacyjnie oraz post-translacyjnie. Glikozylacja katalizowana jest enzymatycznie przez specyficzne glikozylotransferazy. Enzymy te są grupowane w rodziny na podstawie rodzaju przenoszonego cukru, np. galaktozylotransferazy, mannozylotransferazy, sialilotransferazy i in. Każdy typ wiązania glikozydowego występujący w oligosacharydach glikoprotein tworzy odrębna glikozylotransferaza. Glikozylotransferazy przenoszą cukrowce z określonego aktywnego donora na swoistą grupę akceptora.

Bezpośrednimi donorami określonych reszt monocukrowych w tkankach ssaków mogą być zarówno nukleozydodifosfomonocukry, jak i dolichylofosfomonocukry. Donorem prekursorowego oligosacharydu jest dolichylodifosfooligosacharyd $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$.

Bezpośrednimi akceptorami w procesie glikozylacji mogą być:

- ⇒ grupa aminowa przy β -karboksylowej grupie asparaginy tripeptydowej sekwencji –Asn-X-Ser/Thr-polipeptydu, gdzie X nie może być resztą proliny;
- ⇒ grupy hydroksylowe aminokwasów seryny lub treoniny oraz hydroksylizyny polipeptydu;
- ⇒ grupy hydroksylowe określonych reszt cukrowych łańcucha oligosacharydowego glikopeptydów, glikoprotein lub prekursorów dolicholowych.

Glikozylacja, czyli dobudowywanie składnika cukrowego do polipeptydu, ma odmienny przebieg podczas tworzenia O-glikanów i N-glikanów.

Tworzenie wszystkich O-glikanów glikoprotein następuje drogą **glikozylacji sekwencyjnej**, tj. kolejno następującego po sobie przyłączania reszt monocukrowych do białka. Wydłużanie O-oligosacharydu charakteryzuje się tym, że produkt działania jednej glikozylotransferazy staje się akceptorem-substratem dla następnej glikozylotransferazy. Właściwy typ i liczba dodanych monosacharydów zależą od substratu białkowego oraz typów glikozylotransferaz, które są produkowane w danej komórce (czyli od profilu glikozylacyjnego komórki).

Tworzenie wszystkich N-glikanów glikoprotein następuje drogą N-glikozylacji z udziałem difosfodolichylowego przenośnika prekursorowego oligosacharydu (ryc. 4). Podczas inicjowania N-glikozylacji ma miejsce kotranslacyjne przeniesienie *en block*, czyli w całości prekursorowego oligosacharydu ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -) na grupę aminową reszty asparaginy polipeptydu. Biosynteza N-glikanów glikoprotein może obejmować cztery oddzielne złożone etapy:

- ⇒ syntezę difosfodolichylowego prekursorowego oligosacharydu;
- ⇒ inicjację N-glikozylacji polipeptydu;
- ⇒ obróbkę (ang. *processing*) – inaczej modyfikację – prekursorowego oligosacharydu związanego z białkiem;

⇒ elongację łańcuchów zewnętrznych jednostek złożonych drogą glikozylacji sekwencyjnej.

Synteza difosfodolichylowego prekursorowego oligosacharydu zachodzi w cyklu fosfodolicholowym (D-P), w którym synteza prekursorowego oligosacharydu odbywa się na fosfodolicholowej kotwicy błonowej (lipidowy nośnik) drogą glikozylacji sekwencyjnej. Lipidowe kotwice fosfodolicholowe osadzone są w błonie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER) i mają zdolność do zmiany orientacji (ruch „flip”). Synteza prekursorowego oligosacharydu rozpoczyna się od cytozolowej strony błony RER przeniesieniem reszty GlcNAc-P na fosfodolichol (*ryc. 4*). Oligosacharyd wydłużany jest w wyniku kolejno następującego po sobie przyłączania dalszych 6 reszt monocukrowych (GlcNAc i 5Man) przenoszonych z nukleotydujących aktywnych donorów. Po stronie cytozolowej powstaje tylko intermediat heptasacharydowy [-GlcNAcGlcNAc(Man)₅]. Dzięki odwróceniu orientacji difosfodolichylowego intermediatu heptasacharydowego następne monosacharydy (4Man i 3Glc) są dobudowywane od strony światła RER (*ryc. 4*).

W przestrzeni luminalnej RER dawcami reszt Man i Glc mogą być tylko aktywne fosfodolichyłowe pochodne tych monocukrów, dzięki mającej miejsce zmianie ich orientacji w błonie, ponieważ powstają po cytoplazmatycznej stronie błony RER. Błony RER nie są przepuszczalne dla nukleotydujących pochodnych cukrowych.

Wytworzony prekursorowy oligosacharyd Glc₃Man₉GlcNAc₂ związany jest z dolicholem przez wiązanie pirofosforanowe o wysokiej energii. Energia ta wykorzystywana jest do przeniesienia oligosacharydu na białko w reakcji katalizowanej przez oligosacharydylotransferazę polipeptydylową: Dol-P – zależną, enzym związany z błoną wewnętrzną RER. Ma to miejsce podczas etapu inicjacji N-glikozylacji, zachodzącej kotranslacyjnie (*ryc. 4*).

W czasie gdy N-glikozylowane białko jest jeszcze w przestrzeni luminalnej RER, może zacząć się następny etap syntezy, mianowicie obróbka, czyli enzymatyczna modyfikacja prekursorowego oligosacharydu związanego z białkiem. Usuwane są trzy reszty glukozy (przez specyficzne glukozydazy) i jedna reszta mannozy (przez specyficzną mannozydazę), wówczas dopiero glikozylowane białko może przemieścić się do aparatu Golgiego, gdzie jego oligosacharydy mogą być dalej modyfikowane.

W aparacie Golgiego następuje „przebudowa” N-oligosacharydów z wielomannozowych na hybrydowe po czym w złożone. Polega to na dalszym „przycinaniu” oligosacharydu (czyli usunięciu maksymalnie pięciu reszt mannozy) oraz na dobudowaniu innych monocukrów, m.in. GlcNAc, Gal (*ryc. 4*) i ich elongacji, już na zasadzie glikozylacji sekwencyjnej.

Glikozylacja terminalna odpowiedzialna jest za dobudowanie końcowych monocukrów, czyli znajdujących się na nieredukującym końcu dojrzałego N-glikanu. W kwaśnych jednostkach reszty kwasu sjałowego zwykle są tymi monocukrami.

GLIKACJA NIEENZYMATYCZNA

Nieenzymatyczna glikacja jest bezpośrednią reakcją chemiczną między redukującym cukrem, najczęściej glukozą, a pierwszorzędową wolną grupą aminową białka, w której nie powstaje glikozyd. Reakcje tego typu mogą mieć miejsce w organizmie żywym.

Początkowy produkt jest labilną zasadą Schiffa (aldoiminą), która ulega powolnemu przegrupowaniu Amadori do stabilnej ketoaminowej pochodnej białka. Produkty przegrupowania Amadori mogą przybierać konformację cykliczną piranozy lub furanozy (ryc. 5).

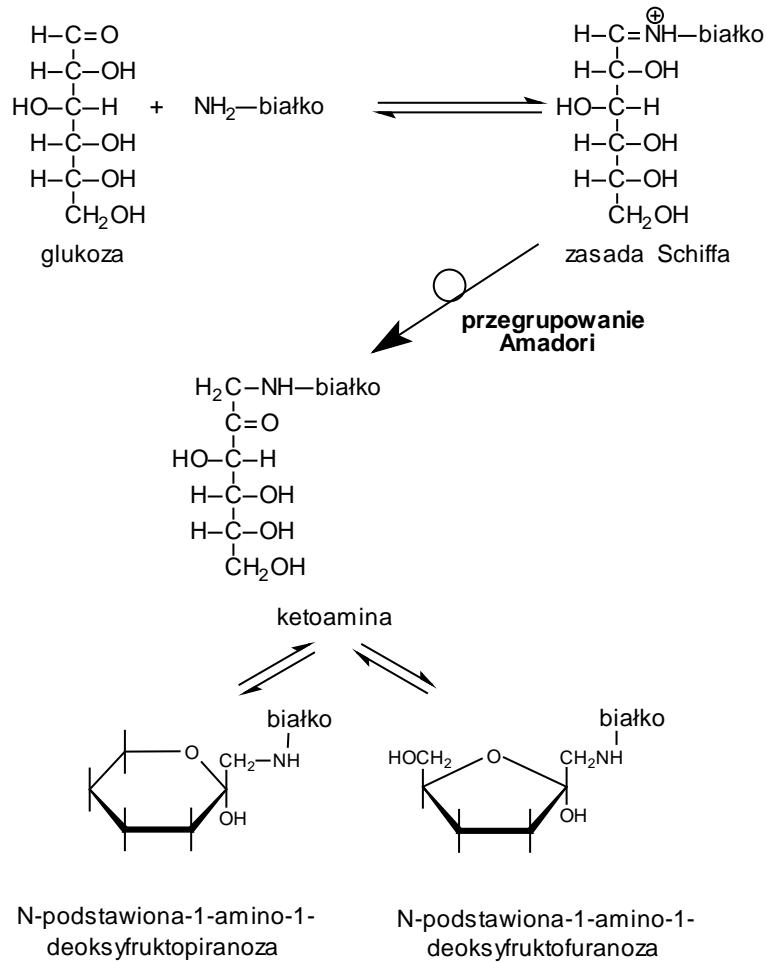
Ostatecznym produktem nieenzymatycznej glikacji białka jest N-(1-amino-1-deoksyfrukto)-białko, które nie jest glikozydem, dlatego reakcji tej nie można nazywać reakcją glikozylacji.

W organizmie żywym nieenzymatyczne przyłączenie cukrowca należy rozpatrywać jako strukturalną i funkcjonalną modyfikację białek, mającą znaczenie w mechanizmie starzenia, która ma szczególnie wyraźny wpływ na białka o długim okresie półtrwania w organizmie. Reakcja ma miejsce w ciągu naturalnego procesu starzenia się białek i uwydatniana jest w stanach patologicznych.

Tej chemicznej modyfikacji sprzyja podwyższony poziom monocukrów redukujących, tak jak to ma miejsce w cukrzycy. Efektywność glikacji nieenzymatycznej jest wprost proporcjonalna do czasu trwania reakcji i do stopnia hiperglikemii.

Wiele różnych białek może zawierać cukier włączony w procesie glikacji nieenzymatycznej. Wśród nich znajduje się hemoglobina, albumina i inne białka surowicy, krystalina, białka błon plazmatycznych, podstawnych, osłonek mieliny, ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, białka macierzy łącznotkankowej, np. kolagen.

Analityczne oznaczanie glikowanych białek (szczególnie albuminy i hemoglobiny) jest wykorzystywane w diagnostyce hiperglikemii do monitorowania postępów leczenia cukrzycy, gdyż może dostarczać informacji na temat wyrównania metabolizmu cukrów. Ze względu na krótszy okres półtrwania albuminy (17 dni) w porównaniu z hemoglobiną (120 dni), pomiar glikowanej albuminy może dostarczyć informacji w znacznie krótszym czasie niż pomiar glikowanej hemoglobiny, która jest raczej długotrwałym wskaźnikiem wyrównania metabolizmu w cukrzycy.



Ryc. 5. Proces nieenzymatycznej glikacji.

Glikowane białka błon plazmatycznych i podstawnych oraz glikowany kolagen ścian naczyń mogą zaburzać molekularną lub elektryczną integralność kapilarnej bariery filtracyjnej, co może prowadzić do zwiększonej przepuszczalności mikronaczyniowej, np. w nerkach.

Glikacja krystaliny soczewki oka powoduje zmiany konformacyjne, ułatwiające tworzenie wiązań krzyżowych w tym białku i przyczynia się do powstawania wielkocząsteczkowych agregatów krystaliny, które charakteryzują się zwiększonym pochłanianiem światła. Powyższy mechanizm sprzyja wytworzeniu katarakty u osób chorych na cukrzycę.

Glikacja apolipoproteiny B-100 na tyle modyfikuje to białko, że lipoproteiny LDL nie są rozpoznawane przez receptor wysokiego powinowactwa i stężenie

LDL wzrasta w krążeniu. Wzrost stężenia LDL sprzyja rozwojowi zmian miażdżycowych.

Glikacja nieenzymatyczna uważana jest również za pierwszy etap wielu reakcji, którym ulegają białka poza organizmem (*in vitro*), w obecności redukujących cukrów, np. podczas dłuższego przechowywania mleka i jego przetworów lub w czasie pieczenia chleba.

W 1992 roku Polskie Słownictwo Biochemiczne zaleciło stosowanie terminu glikacja na określenie wszystkich reakcji polegających na przyłączeniu cukru do białka, niezależnie od tego, czy tworzone jest wiązanie glikozydowe, czy nie. Produktem glikacji ma być zarówno glikozyd, którym jest glikoproteina, jak i produkt reakcji nieenzymatycznej, nie będący glikozydem, tak jak np. glikohemoglobina. Tymczasem termin glikacja stosowany jest praktycznie do określania reakcji nieenzymatycznego przyłączania cukrów do białek, w celu odróżnienia tego procesu od glikozylacji enzymatycznej. Reakcje enzymatycznego przyłączania cukrów do białek wiązaniami glikozydowymi nadal określa się powszechnym terminem glikozylacja.