

บทคัดย่อ

โปรตีนขนส่งกลูโคสและโซเดียม SGLT1 สามารถพบได้บนผิวเซลล์ในบริเวณลำไส้เล็กและไตในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด และมีหน้าที่สำคัญมากในการดูดซึมน้ำตาลแบบจำเพาะเจาะจงเพื่อรักษาความสมดุลให้กับร่างกาย และจากความสำคัญดังกล่าวจึงนำมาซึ่งการศึกษาโปรตีนชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายเพื่อทั้งประโยชน์ทางการแพทย์และทางการศึกษา แต่กระนั้นก็ตามการศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการนำพาน้ำตาลและการคัดเลือกชนิดน้ำตาลเข้าสู่เซลล์นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ยิ่งไปกว่านั้นโครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้โดยเฉพาะในบริเวณที่น้ำตาลและตัวยับยั้งการนำพาเข้าจับกับโปรตีนนั้นยังคงเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในปัจจุบัน ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีทางชีวฟิสิกส์สมัยใหม่คือเทคนิคทางด้านโมเลกุลเชิงเดี่ยวโดยใช้เครื่องวัดแรงอันตรกิริยา (atomic force microscopy, AFM) และวิธีทางชีวเคมีมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้าง หน้าที่ และความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนขนส่งนี้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้น้ำตาลกลูโคส (1-thio-D-glucose) เชื่อมต่อกับปลายเข็มแคนทิลเวอร์ (cantilever) ด้วยปฏิกิริยาจำเพาะทางเคมี และนำไปใช้ศึกษาความจำเพาะระหว่างกลูโคสและโปรตีน SGLT1 ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ นอกจากนั้นยังได้ทำการทดลองทางชีวเคมีโดยศึกษาผลกระทบในการนำพาน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆนั้นด้วย และจากผลการทดลองทั้งสองวิธีได้นำมาซึ่งประโยชน์ในการอธิบายลำดับความจำเพาะเจาะจงของการนำพาน้ำตาลชนิดต่างๆได้ นอกจากนั้นยังเสนอแนะได้ว่า ภายในโครงสร้างโปรตีนขนส่งนี้มีอย่างน้อยสองบริเวณที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือกชนิดน้ำตาลอีกด้วย ส่วนการทดลองการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้ได้ใช้แอนติบอดีจำเพาะสามชนิดที่มีความจำเพาะต่อสายกรดอะมิโนในบริเวณที่เชื่อมระหว่างเมมเบรนโปรตีนที่ 6-7 8-9 และ 13-14 โดยนำแต่ละชนิดไปเชื่อมต่อกับปลายเข็มแคนทิลเวอร์และนำไปศึกษาความสามารถในการเข้าจับของแอนติบอดีชนิดนั้นๆต่อโปรตีนขนส่งบนผิวเซลล์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับธรรมชาติ และจากผลการทดลองพบว่า แอนติบอดีจำเพาะทั้งสามชนิดสามารถเข้าจับกับโปรตีนขนส่งได้ และสามารถยืนยันได้ว่าทั้งสามบริเวณนั้นเป็นโครงสร้างของโปรตีนที่มีการจัดเรียงตัวอยู่บริเวณด้านนอกของเซลล์ นอกจากนั้น ผลการทดลองทางชีวเคมีสามารถแนะนำได้ว่า มีการเชื่อมต่อด้วยพันธะไดซัลไฟด์ของกรดอะมิโนในบริเวณระหว่างเมมเบรนโปรตีนที่ 6-7 และ 13-14 ซึ่งในขณะเดียวกันน่าจะมีผลทำให้บริเวณระหว่างเมมเบรนโปรตีนที่ 8-9 เข้ามาใกล้กับบริเวณเมมเบรนโปรตีนที่ 6-7 และ 13-14 โดยคาดว่าทั้งสามบริเวณนี้น่าจะเป็นบริเวณที่เป็นทางเข้าของน้ำตาลก่อนผ่านเข้าสู่ภายในและเกิดการนำพาน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ตามลำดับ โดยรวมการศึกษาวิจัยโดยใช้วิธีทางชีวฟิสิกส์ ร่วมกับอนุชีววิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี สามารถทำให้เข้าใจขบวนการและลำดับการนำพาสารอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาองค์ความรู้และการคิดค้นที่จะนำมาซึ่งประโยชน์ต่อไปในภายภาคหน้า

Abstract

In the apical membrane of epithelial cells from the small intestine and the kidney, the high-affinity Na^+ /D-glucose cotransporter SGLT1 plays a crucial role in selective sugar absorption and reabsorption, respectively. How sugars are selected at the molecular level and the topology of SGLT1 in the membrane are, however, poorly understood. Here atomic force microscopy (AFM) was employed to investigate the stereospecificity of D-glucose binding to the surface of living *rabbitSGLT1*-transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells on the single molecule level. In addition, competitive-uptake assays by using isotope-labeled sugars were performed to study the stereospecificity of the transport. Topology, arrangement, and function of the large surface subdomains of SGLT1 were also examined. These investigations were performed by using AFM tips carrying either 1-thio-D-glucose or specific-antibodies coupled to biheterofunctional-PEG linkers. The results suggest that the stereospecificity of transport is determined by at least two different selectivity filters; one located at the surface of the transporter, the other close to or within the translocation pathway. In addition, for the topology of SGLT1 we could observe that the loop 6-7 and loop 13-14 are connected by a disulfide bridge. This bridge brings also loop 8-9 into close vicinity of the former subdomains to create a vestibule for sugar binding. Altogether, the use of biophysical, molecular biological, physiological, and biochemical approaches could provide an important step in understanding the chain of dynamic events comprising transmembrane translocation of organic compounds in general.