

W komórkach organizmów eukariotycznych aminokwasy są cegiełkami budującymi białka jak też dostarczają substratów do produkcji energii przez mitochondria oraz wielu innych szlaków metabolicznych. Metabolizm komórki w ograniczonym stopniu może zaspokoić zapotrzebowanie na aminokwasy dlatego ich transport poprzez błonę komórkową z otoczenia jest nieodzowny w celu zapewnienia homeostazy. Pobór aminokwasów zapewnia skomplikowana sieć transporterów zlokalizowanych w błonie komórkowej. Białka te cechuje specyfika względem substratów jak też różne wymagania względem obecności jonów niezbędnych do ich poprawnego funkcjonowania. Niektóre transportery są zdolne do koncentracji aminokwasów wewnątrz komórki, podczas gdy pozostałe działają na zasadzie wymienników: pobraniu aminokwasu towarzyszy wyrzucenie poza komórkę aminokwasu innego typu. Pierwsza grupa zapewnia wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia aminokwasów, kiedy druga bilansuje wewnątrzkomórkową pulę względem specyficznego zapotrzebowania. Przykładem najlepiej ilustrującym taką wymianę jest pobór aminokwasów leucyny i izoleucyny poprzez wymianę na występującą w wysokim stężeniu w komórce glutaminę. Transportery cechuje obecność wielu hydrofobowych domen transmembranowych i jako białka z docelową lokalizacją w błonie komórkowej podlegają one biosyntezie na błonie kompartmentu retikulum endoplazmatycznego z kotranslacyjną transmembranową integracją. W tym punkcie, drogi wielu transporterów się rozchodzą, jedne których aktywność jest niezależna od postranslacyjnej N-glikozylacji mogą bezpośrednio trafić na błonę komórkową, inne muszą przejść proces dołączenia struktury cukrowej w retikulum endoplazmatycznym i po modyfikacji są gotowe do dostarczenia na błonę komórkową. Ostatnia grupa wymaga dalszych etapów modyfikacji struktury glikanu w kompartmentie aparatu Golgiego. Celem niniejszych badań jest określenie które transportery aminokwasów podlegają modyfikacji w aparacie Golgiego, zdefiniowanie jakie funkcjonalne znaczenie ma modyfikacja w kompartmentie *trans*-Golgi polegająca na dodaniu reszt N-acetylglukozaminy, galaktozy i kwasu sialowego. Celem projektu jest także zidentyfikowanie enzymów i innych białek które regulują proces modyfikacji postranslacyjnej transporterów w kompartmentie *trans*-Golgi, jak również warunkujące ich dostarczenie na błonę komórkową. Dodatkowe pytanie jakie jest zadane to, jak różnorodne typy odpowiedzi stresowej modyfikują proces modyfikacji transporterów aminokwasowych w kompartmentie *trans*-Golgi.

W zakresie proponowanego projektu, planowane jest wykorzystanie narzędzi genetycznych w celu inaktywacji białek odpowiedzialnych za dostarczenie nukleotydów cukrowych będących donorami w trakcie syntezy glikanów do modyfikacji transporterów aminokwasów. W tak zmodyfikowanych komórkach mysich fibroblastów lub miocytów, zbadamy aktywność wybranych transporterów, opiszemy defekty w ich modyfikacji oraz określimy zmiany w ich lokalizacji w komórce. Jako że, wyrażanie wielu transporterów jest ograniczone do innych rodzajów komórek niż fibroblasty i miocyty dokonamy ekspresji tych białek w komórkach z zaburzoną funkcją kompartmentu *trans*-Golgi i w ten sposób zbadamy czy dla poprawnej funkcji wymagają one modyfikacji. W celu identyfikacji białek zaangażowanych w modyfikację transporterów wykorzystamy technologię BioID; w tym celu dokonamy ekspresji białka będącego fuzją transportera z ligazą biotyny. Pozwoli to na wyznaczenie biotyną białek oddziałujących z transporterem w trakcie modyfikacji. Biotynylowane białka zostaną wyizolowane z wykorzystaniem chromatografii i poddane identyfikacji z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Postranslacyjna modyfikacja transporterów aminokwasów posiada duży wpływ na ich funkcjonowanie w utrzymaniu aminokwasowej homeostazy, a perturbacje w ich aktywności wiodą do wiele patologicznych procesów. Proponowany projekt badawczy pozwoli na zrozumienie jak funkcja kompartmentu *trans*-Golgi wpływa na aktywność transporterów w komórkach nowotworowych, których jedną z unikalnych cech jest nadekspresja transporterów aminokwasowych w celu zapewnienia ciągłego nielimitowanego wzrostu. Dodatkowo projekt pozwoli rzucić więcej światła na problem czy w zmiany w aktywności glikozylacji w kompartmentie *trans*-Golgi wpływają poprzez spadek aktywności transporterów aminokwasów na zanik masy mięśni w przebiegu chorób wątroby, związanych ze wzrostem stężenia jonów amonowych w krwioobiegu.