

Projekt dotyczy badań jednego z procesów modyfikacji białek i lipidów, zwanego glikozylacją, czyli przyłączaniem cząsteczek cukrów do wyżej wymienionych makrocząsteczek. Glikozylacja jest jedną z najważniejszych modyfikacji post-translacyjnych zachodzących w komórce eukariotycznej. Modyfikacja ta odgrywa kluczową rolę w rozwoju oraz wzroście komórek. Zwiększa ona rozpuszczalność białek, jak również stabilizuje ich strukturę trzeciorzędową oraz chroni je przed proteolizą. Dzięki glikozylacji możliwe jest odróżnienie przez organizm komórek obcych od własnych. Warto zauważyć, że glikozylacja jest bardzo powszechna – w niektórych typach komórek większość białek to glikoproteiny. Do glikoprotein należy wiele klas białek, z najbardziej znanych to np.: przeciwciała lub białka lizosomalne. Proces glikozylacji rozpoczyna się w świetle retikulum endoplazmatycznego, a następnie kontynuowany jest wewnątrz aparatu Golgiego. Substratami w tym procesie są aktywowane formy monosacharydów – nukleotydo-cukry. Ich biosynteza zachodzi w cytozolu lub jądrze komórkowym. Zakłada się, że błony retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego same w sobie nie są przepuszczalne dla tych związków, ale zawierają wyspecjalizowane białka, które pełnią rolę transporterów nukleotydo-cukrów i to dzięki ich obecności możliwe jest dostarczenie aktywowanych form monosacharydów do wnętrza tych organelli. W retikulum endoplazmatycznym/aparacie Golgiego cukier zostaje oddzielony od nukleotydu i przekazany odpowiedniej glikozylotransferazie, która bezpośrednio odpowiada za dołączenie danej reszty cukrowej do glikozylowanej makrocząsteczki.

Transportery nukleotydocukrów to multitransmembranowe białka, które charakteryzują się parzystą ilością domen śródbłonowych, a ich N- oraz C-koniec znajdują się po cytozolowej stronie błony retikulum endoplazmatycznego/aparatu Golgiego. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej zostały one podzielone na sześć podrodzin, nazwanych kolejno SLC35A-SLC35F.

Nasze ostatnie badania, będące rezultatem niedawno zakończonego projektu, dotyczyły między innymi badań transportera SLC35A3, uznawanego dotąd jako główny transporter N-acetyloglucozamininy (UDP-GlcNAc). Ten monocukier jest podstawowym budulcem niemal wszystkich klas glikanów białkowych (N- i O-), wielu proteoglikanów oraz glikolipidów. Ku naszemu zaskoczeniu okazało się, że brak SLC35A3 w liniach komórkowych nie prowadzi do znacznego zaburzenia syntezy dojrzałych glikanów, a transport UDP-GlcNAc jest wprawdzie zwykle obniżony ale w niektórych liniach badanych linii komórkowych bywa nawet nieco większy - jednak zawsze jest znaczący. To pozwoliło nam wnioskować, że musi istnieć inny, alternatywny szlak transportu UDP-GlcNAc do wnętrza aparatu Golgiego. Celem prezentowanego projektu jest próba wykrycia tego szlaku jak też pokazanie roli SLC35A3 w tym procesie.

Aby tego dokonać, planujemy analizę mutantów pozbawionych transportera SLC35A3 w celu wytypowania innych „kandydatów” do transportu błonowego, spośród rodziny SLC35 a także inne badania przesiewowe, służące temu samemu celowi. Sprawdzimy ew. możliwość indukcji biosyntezy takiego „zastępczego” transportera w zmutowanych komórkach czy też potencjalne interakcje hipotetycznych transporterów z transferazami, wykorzystującymi UDP-GlcNAc jako substrat. Analiza białek kodujących potencjalne, nowe transportery przenoszące UDP-GlcNAc będzie polegać na testowaniu linii komórkowych pozbawionych funkcjonalnych białek (razem z SLC35A3 lub niezależnie), pod kątem transportu błonowego pęcherzyków aparatu Golgiego oraz efektów fenotypowych w zmutowanych komórkach (zmiany w glikozylacji).

Mamy nadzieję, że nasza strategia pozwoli na identyfikację głównego transportera UDP-GlcNAc albo da przynajmniej więcej informacji dla zrozumienia mechanizmów takiego transportu w komórce eukariotycznej, ponieważ, naszym zdaniem, transporter SLC35A3 nie jest głównie odpowiedzialny za dostarczanie UDP-GlcNAc dla glikozylacji komórkowej.