

Funkcjonalna charakterystyka błonowych białek z podrodziny SLC35A

Streszczenie

SLC35A4 (A4) dotychczas uważano za potencjalny transporter nukleotydocukrów. Białko to zostało sklasyfikowane w obrębie podrodziny SLC35A na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy A4 i innymi transporterami należącymi do tej grupy. W skład tej podrodziny wchodziły transportery kwasu CMP-sialowego (SLC35A1), UDP-galaktozy (SLC35A2) oraz UDP-N-acetyloglukozoaminy (SLC35A3). Celem pracy doktorskiej była charakterystyka białka A4, ponieważ w literaturze brak doniesień na temat roli tego potencjalnego transportera w glikozylacji. Na początku pracy określono subkomórkową lokalizację SLC35A4 za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego. Zaobserwowano, że białko to znajduje się głównie w aparacie Golgiego. Następnie wykonano analizę *in silico* topologii A4, która wskazała, że białko to ma nieparzystą ilość domen transmembranowych, a jeden z jego końców jest skierowany do wnętrza aparatu Golgiego. Przeprowadzone badania zaprzeczyły tym przewidywaniom, ponieważ wykazały, że N- oraz C-końiec SLC35A4 lokalizują się po cytozolowej stronie błony tego organellum. Wykonana w ramach pracy doktorskiej nadprodukcja A4 w zmutowanych komórkach, pozbawionych funkcjonalnego transportera UDP-galaktozy zasugerowała, że białko to może uczestniczyć w procesie galaktozylacji. W N-glikanach wyizolowanych z wygenerowanych transfektantów wykazano obecność galaktozy. Następnie, aby sprawdzić czy SLC35A4 tworzy kompleksy z innymi transporterami z podrodziny SLC35A oraz z transferazami N-acetyloglukozoaminy (Mgat1, Mgat2, Mgat4B i Mgat5) wykorzystano techniki FLIM-FRET, FRET, BiFC oraz *in situ* PLA. Zaobserwowano, że A4 tworzy homodimery oraz oddziałuje z transporterami SLC35A2, SLC35A3, białkiem SLC35A5 (o dotychczas niepoznanej funkcji) i ze wszystkimi badanymi enzymami. Ponieważ dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że transferazy Mgat oddziałują z transporterami SLC35A2 oraz SLC35A3, postanowiono sprawdzić, czy istnieją trójskładnikowe kompleksy, w skład których wchodziłyby wszystkie te białka (w tym A4). Do tego celu przystosowano nowatorską metodę, łączącą BiFC oraz FRET. Wykazano istnienie sześciu kompleksów składających się z A4 oraz badanych transporterów i glikozylotransferaz. Aby określić funkcję białka A4 zainaktywowano gen *SLC35A4* za pomocą metody CRISPR-Cas9. Nie wykazano, aby wprowadzona modyfikacja miała wpływ na glikozylację. Zaobserwowano jednak, że kompleksy tworzone pomiędzy transporterem SLC35A2 oraz SLC35A3 ulegają delokalizacji w zmutowanych komórkach. Sugeruje to, że białko A4 pełni rolę w wewnątrzkomórkowej dystrybucji kompleksów SLC35A2/SLC35A3.