

## Funkcjonalna analiza potencjalnych transporterów UDP-N-acetyloglukozoaminy

UDP-N-acetyloglukozoamina (UDP-GlcNAc) jest jednym z najważniejszych substratów wykorzystywanych w procesie glikozylacji. Do tej pory, za jeden z głównych transporterów tego nukleotydo-cukru było uważane białko SLC35A3 (A3). Badania charakteryzujące A3 były głównie oparte na heterologicznych systemach drożdżowych produkujących znacząco odmienne typy glikanów niż komórki ssacze. Dodatkowo, badania nad białkiem A3 wykazały, że prawie całkowite wyciszenie genu *SLC35A3* nie wpływa znacząco na poziom N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) w strukturach N-glikanów w komórkach ssaczy. Ze względu na nieścisłości związane z transportem UDP-GlcNAc, a także doniesieniami literaturowymi o innych białkach z rodziny SLC35A, mogących pełnić rolę transportera tego nukleotydo-cukru, celem niniejszej pracy była charakterystyka wybranych transporterów potencjalnie dostarczających UDP-GlcNAc do syntezy N- oraz O-glikanów. Pierwszym etapem pracy była inaktywacja genu *SLC35A3* (A3KO, KO - ang. *knock-out*) w linii CHO, z wykorzystaniem systemu CRISPR-Cas9. Ponieważ białko A3 oddziałuje z transporterem UDP-galaktozy (SLC35A2, A2) oraz białka te znajdują się w bliskości z tymi samymi glikozylotransferazami Mgat inaktywowano gen *SLC35A3* w komórkach pozbawionych funkcjonalnego białka A2 (A2KO, Lec8), uzyskując zmodyfikowane linie pozbawione jednocześnie obu transporterów (A2/A3KO) w trzech liniach komórkowych: HepG2, HEK293T oraz CHO. W ramach pracy doktorskiej scharakteryzowano N-glikany z lizatów komórkowych oraz z białka reporterowego SEAP (ang. *Secreted Alkaline Phosphatase*), a także O-glikany, produkowane przez trzy linie komórkowe: HepG2, HEK293T oraz CHO z inaktywowanymi genami *SLC35A3*, *SLC35A2* lub jednocześnie *SLC35A2* oraz *SLC35A3*. Uzyskane wyniki wykazały, że inaktywacja genu *SLC35A3* nie powoduje zahamowania inkorporacji GlcNAc do N- oraz O-glikanów. Zaobserwowano komórkowo specyficzne zmiany w tworzeniu rozgałęzionych N-glikanów. Wykazano prawie całkowite zahamowanie tworzenia się rozgałęzionych N-glikanów w liniach HEK293T A2/A3KO oraz Lec8 A3KO, co świadczy o wspólnej roli białek A2 oraz A3 w syntezie się N-glikanów. Ze względu na zaobserwowane zmiany w rozgałęzieniach N-glikanów, sprawdzono jaki wpływ inaktywacja genów *SLC35A2* oraz *SLC35A3* ma na ilość oraz sekrecję glikozylotransferaz Mgat1, Mgat2 oraz Mgat5. Enzymy te odpowiedzialne są za katalizowanie reakcji dołączania GlcNAc do N-glikanów zapoczątkowując rozgałęzienia, a także tworzą kompleksy z białkami A2 oraz A3. Wykazano, że brak funkcjonalnych białek A2 oraz A3 ma wpływ zarówno na

ilość, jak i wydzielanie badanych glikozylotransferaz, jednak również jest to efekt komórkowo specyficzny. Stwierdzono, że różnice w wydzielaniu transferaz mogą być spowodowane zmianami w składzie kompleksów wielobiałkowych, w których brakuje badanych transporterów. W ramach pracy doktorskiej wygenerowano również linie komórkowe pozbawione funkcjonalnych białek SLC35B4 (B4), (HepG2 B4KO) oraz SLC35D1 (D1), (HepG2 D1KO, HEK293T D1KO), które także uważane są za transportery UDP-GlcNAc. Nie wykazano, aby wprowadzone modyfikacje genetyczne miały wpływ na inkorporację GlcNAc do N- oraz O-glikanów. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej wykazują konieczność poszukiwania głównego/dodatkowego transportera UDP-GlcNAc do syntezy N- oraz O-glikanów lub istnienia innego mechanizmu dostarczania tego nukleotydo-cukru do wnętrza Golgiego.