

## Streszczenie

Utrzymanie homeostazy aminokwasowej w komórce wymaga skutecznych mechanizmów regulacyjnych, obejmujących szlaki sygnałowe wykorzystujące takie kinazy jak: mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) oraz GCN2 (ang. *general control non-derepressible 2*), których aktywność skoordynowana jest z pracą wyspecjalizowanych białek błonowych, tworzących skomplikowaną i wzajemnie zależną sieć transportową. Ilość i aktywność transporterów aminokwasowych w błonie komórkowej jest ściśle sprzężona z zapotrzebowaniem komórki na aminokwasy. Wiele błonowych transporterów to glikoproteiny, ulegające procesowi N-glikozylacji w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego, który warunkuje ich dojrzewanie, lokalizację oraz aktywność transportową.

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie znaczenia procesu N-glikozylacji w aparacie Golgiego w funkcjonowaniu błonowego transportera aminokwasowego SNAT2 (ang. *sodium-coupled neutral amino acid transporter*), który stanowi istotny element w adaptacji do warunków stresu hiperosmotycznego. Ponadto, za cel postawiono poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów adaptacyjnych uruchamianych w komórce w odpowiedzi na podwyższoną osmolarność zewnątrzkomórkową. Trzecim celem było zbadanie znaczenia osmoadaptacyjnej akumulacji aminokwasów w regulacji szlaku sygnałowego kinazy ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), indukowanego w odpowiedzi na stres hiperosmotyczny.

W ramach zrealizowanych prac wskazano, że adaptacja do warunków podwyższonej osmolarności jest całkowicie niezależna od szlaku sygnałowego ISR (ang. *integrated stress response*). Unikalny mechanizm osmoadaptacji angażuje indukcję syntezy białek GADD34 (ang. *growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34*) i SNAT2. Dojrzała forma białka SNAT2, N-glikozylowana w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego lokalizuje się w błonie plazmatycznej i umożliwia wychwyt aminokwasów. Wskazano, że współdziałanie SNAT2 i zależnych od niego antyporterów LAT1 (ang. *large amino acid transporter 1*) i ASCT1 (ang. *alanine, serine, cysteine transporter 1*) zapewnia przywrócenie homeostazy w komórkach i determinuje reaktywację mTORC1, co zapewnia wydajną translację, która pierwotnie uległa zahamowaniu w odpowiedzi na stres osmotyczny. Zgromadzone dane pozwalają wnioskować, że indukcja transportera SNAT2 jest kluczową

częścią programu transkrypcyjnego białka wiążącego wzmacniacz reagujący na toniczność – TonEBP (ang. *tonicity enhancer binding protein*), chroniącego komórki przed apoptozą.

W drugiej części badań określono wpływ zaburzenia procesu końcowej N-glikozytacji w cysternach *trans*-Golgi na dojrzewanie, lokalizację i aktywność SNAT2 oraz adaptację do warunków stresu hiperosmotycznego. Deficyt UDP-galaktozy w cysternach *trans*-Golgi wywołany inaktywacją genu kodującego transporter SLC35A2 wskazuje, że modyfikacje struktury N-glikanu SNAT2 w tym kompartmentcie komórkowym są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tej glikoproteiny. Zaburzenie funkcji *trans*-Golgi uniemożliwia dostarczenie SNAT2 do błony plazmatycznej i pełnienie funkcji transportowej, co niesie istotne perturbacje w wewnątrzkomórkowych poziomach aminokwasów, uniemożliwiając adaptację komórki do warunków stresu hiperosmotycznego. Obserwacje te potwierdzono poprzez analizy z wykorzystaniem inhibitora polimeryzacji tubuliny – nokodazolu, prowadzącego do fragmentacji aparatu Golgiego. Zaburzenie integralności organelum wywarło negatywny wpływ na dojrzewanie oraz utrzymanie funkcji transportowej SNAT2. Wskazuje to na ważną rolę aparatu Golgiego w adaptacji do warunków stresu hiperosmotycznego i kontroli poziomu aminokwasów w komórce.

Ostatni krok stanowiło określenie znaczenia osmoadaptacyjnej akumulacji aminokwasów w regulacji szlaku sygnałowego kinazy ERK1/2, aktywowanego w warunkach stresu hiperosmotycznego, niezależnie od czynników wzrostu. Przedstawiono dwufazowy mechanizm zakładający, że stłoczenie makromolekularne w komórkach narażonych na warunki podwyższonej osmolarności zewnątrzkomórkowej i towarzyszący temu spadek poziomu poliamin prowadzi do separacji faz LLPS (ang. *liquid-liquid phase separation*) fosfatazy SHP2 (ang. *SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2*), co promuje hiperaktywację kinazy ERK1/2. Zaproponowano, że akumulacja aminokwasów za pośrednictwem SNAT2 i zależnych od niego wymiennicy może prowadzić do rozproszenia uformowanych kondensatów biomolekularnych SHP2, skutkując dezaktywacją kinazy w fazie osmoadaptacji. Obserwacje te pozwalają wnioskować, że związki aminowe (poliaminy oraz aminokwasy) odgrywają istotną rolę w formowaniu/rozpraszaniu się kondensatów biomolekularnych i regulacji aktywności kinazy ERK1/2.

Podsumowując, modyfikacje N-glikanu transportera SNAT2 w aparacie Golgiego stanowią nieodłączny element adaptacji do warunków stresu hiperosmotycznego. Akumulacja aminokwasów za pośrednictwem złożonej sieci transporterów aminokwasowych w komórkach narażonych na stres, nie tylko pozwala na przywrócenie homeostazy, ale także służy jako

modulator aktywności kinazy ERK1/2. Zatem dokładne poznanie funkcji aparatu Golgiego otwiera drogę do lepszego zrozumienia metabolizmu komórki, a przede wszystkim zjawiska adaptacji do warunków stresowych.

**Słowa kluczowe:** Aparat Golgiego, N-glikozylacja, SNAT2, stres hiperosmotyczny, ERK1/2

*Nioleta Banaszek*