

На правах рукописи

Агафонов Михаил Олегович

Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

МОСКВА - 2021

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

Синеокий Сергей Павлович – доктор биологических наук, профессор, Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» -ГосНИИГенетика), директор.

Каменский Петр Андреевич – доктор биологических наук, кафедра молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", профессор.

Люкманова Екатерина Назымовна – доктор биологических наук, лаборатория биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов, ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующий.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __ ч. на заседании Совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А. Ф. Орловский

Список сокращений

EndoH – эндогликозидаза H; SDS – додецилсульфат натрия; uPA – активатор плазминогена урокиназного типа (urokinase-type plasminogen activator); ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЭГТА– этиленгликоль-бис (β-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетраацетат; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Действующим веществом большого количества фармакологических препаратов, являются белки человека и, как правило, это секретируемые белки. Их получение путем экспрессии в рекомбинантных микроорганизмах – очень важная задача. Однако использование для этих целей дрожжей в качестве организмов-хозяев встречает существенные трудности именно из-за эволюционных отличий от клеток высших эукариот в устройстве секреторного аппарата. Действительно, многие белки, секретируемые клетками млекопитающих, оказываются неспособными принять правильную конформацию в секреторном пути дрожжей, особенно если требуется сборка молекулы из разных полипептидных цепей. Отличия в протеолитическом процессинге и гликозилировании белков также являются существенной преградой для использования дрожжей при получении рекомбинантных секретируемых продуктов. Современные методы редактирования генома позволяют не только инактивировать «нежелательные» гены организма хозяина, но и вводить «нужные» чужеродные или синтетические гены для создания систем ферментов, обеспечивающих правильную модификацию целевого продукта. Однако для этого требуется понимание того, какие гены организма-хозяина «нежелательные», как их инактивация скажется на физиологии клетки, и каковы могут быть последствия введения новых ферментных систем. Поэтому изучение секреторного аппарата дрожжей, использующихся для получения рекомбинантных белков, может не только расширить представления об устройстве эукариотической клетки, но и открыть новые возможности для индустрии.

Хотя *S. cerevisiae* является наиболее изученным и удобным для молекулярно-генетических манипуляций видом дрожжей, со временем стало понятно, что ряд других дрожжей в

большинстве случаев оказывается существенно эффективнее для получения рекомбинантных белков. Особое место в этом ряду занимают метилотрофные дрожжи, которые исходно классифицировались как виды *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*. После ре-классификации изоляты *H. polymorpha* CBS47327 и NCYC495 стали видом *Ogataea polymorpha*, а изолят DL-1 (ATCC26012) стал называться аспорогенной формой *O. parapolymorpha*. Оба этих вида *Ogataea* активно используются для промышленного получения рекомбинантных белков.

Есть ряд причин, почему метилотрофные дрожжи оказались предпочтительнее *S. cerevisiae* в качестве организма-хозяина для продукции рекомбинантных белков. Это, в частности, наличие сильных регулируемых промоторов, индукция которых не требует дорогих соединений, а также простота получения культур высокой плотности.

Однако, по-видимому, лишь небольшая часть фармакологически важных белков может быть просто получена путем продукции в не модифицированных клетках дрожжей. Об этом говорит ограниченное количество примеров успешного использования дрожжей для получения секретируемых белков человека, а безуспешные попытки, как правило, не публикуются. При этом усилия многих исследователей направлены на поиск способов модификации секреторного аппарата дрожжей для более эффективной секреции "трудных" белков млекопитающих. В большинстве случаев эти способы основаны на теоретических представлениях о том, что для улучшения укладки белков в дрожжевом секреторном пути требуется увеличение продукции каких-то шаперонов или шапероноподобных белков. Однако число примеров удачного применения такого подхода весьма ограничено. Для систематического выявления "узких" мест секреции рекомбинантных белков требуется удобная модельная система, позволяющая проводить систематический поиск механизмов, обуславливающих возникновение таких мест, а возможность эффективно влиять на эти механизмы, в существенной степени, зависит от понимания физиологических последствий их нарушения.

Цели и задачи

Целью данной работы было выявление факторов, влияющих на секрецию чужеродных плохо секретируемых белков клетками *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, а также

определение физиологической роли этих факторов. Для этого были поставлены следующие задачи.

1. Разработать модель для изучения факторов, влияющих на эффективность секреции рекомбинантных белков дрожжами *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*.
2. Найти гены *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, влияющие на эффективность секреции рекомбинантных белков, на гликозилирование белков и на гомеостаз кальция.
3. Изучить физиологические последствия нарушения гомеостаза кальция в секреторных органеллах *O. polymorpha*.
4. Изучить физиологические последствия нарушений гликозилирования в секреторном пути *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*.

Научная новизна исследования

Впервые было продемонстрировано, что активатор плазминогена урокиназного типа (urokinase-type plasminogen activator, uPA) человека с низкой эффективностью принимает правильную конформацию в секреторном пути дрожжей рода *Ogataea* и при высоких уровнях продукции накапливается в клетках в форме высокомолекулярных агрегатов. Впервые идентифицированы и охарактеризованы мутации *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, способные увеличивать эффективность секреции рекомбинантных белков за счет улучшения условий для их укладки. Показано, что нарушения гликозилирования белков в секреторном пути дрожжей рода *Ogataea* могут влиять на условия для укладки белков в эндоплазматическом ретикулуме. Впервые продемонстрировано, что с использованием модельной системы, основанной на анализе секреции uPA клетками дрожжей, можно выявлять мутации, нарушающие транспорт белков в вакуоль. Показано, что такие нарушения усиливают протеолитический процессинг секретируемых белков. Впервые было продемонстрировано участие компонента окаймляющего комплекса COP1 в поддержании гомеостаза Ca^{2+} в секреторных органеллах за счет его доставки из независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи источника. Этот путь не был описан ранее.

Теоретическая и практическая значимость

Были разработаны подходы для оптимизации продукции секретируемых белков в клетках дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Эти подходы могут быть использованы при конструировании промышленных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков. Данные о физиологических проявлениях мутаций, увеличивающих эффективность секреции рекомбинантного белка, позволяют определить, насколько оправдано использование таких мутаций при конструировании промышленных штаммов-продуцентов. В работе было продемонстрировано влияние гомеостаза Ca^{2+} на регуляцию клеточного цикла у дрожжей рода *Ogataea*. Были получены данные, свидетельствующие о наличии пути доставки Ca^{2+} в ранние компартменты секреторного пути из источника, независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. Показано, что таким источником может быть вакуоль, и что в транспорте Ca^{2+} принимают участие компоненты окаймляющего комплекса COP1. Была разработана модельная система на основе белка uPA, использование которой позволяет изучать факторы, влияющие на укладку белков в секреторном пути, а также идентифицировать мутации, нарушающие транспорт белков в вакуоль у дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*.

Личный вклад

Результаты экспериментов, описанных в работе, были получены либо лично автором, либо под его руководством. В проведение тетрадных анализов *O. polymorpha* ключевой вклад внес чл.-корр. РАН М.Д. Тер-Аванесян. Данные электронной микроскопии клеток мутанта *ori24* были получены д.б.н. Т.С. Калебиной, и это указано в соответствующем разделе диссертации. Клонирование и изучение генов *OPU24* и *RET1* *O. polymorpha* автор проводил вместе с А.Н. Пакайзер и М.Б. Чеченовой, и ряд результатов по этим направлениям вошел в их диссертационные работы на соискание степени кандидата биологических наук. Анализ внутриклеточной агрегации вариантов uPA был проведен совместно с Н.В. Романовой, и эти результаты вошли в ее кандидатскую диссертацию. В функциональном анализе гена *PMR1* принимала участие Т. А. Сабирзянова (Аверина), выполняя свою дипломную работу. Функциональный анализ гена *PMT1* проводился при участии С. С. Соколова. Изучение генетических взаимодействий мутаций, влияющих на гомеостаз кальция в клетке, выполнено вместе с А.В. Фокиной, и этот материал составил

ее кандидатскую диссертацию. Данные о влиянии мутаций *ret1-27*, *vps10-Δ* и *vps35-Δ* на гликозилирование были получены вместе с А.В. Каргиновым.

Апробация работы

Материалы работы были представлены в виде докладов и стендовых сообщений на ряде международных конференций.

Публикации

По материалам работы опубликовано 21 статья в международных рецензируемых изданиях, 3 статьи в российских журналах, а также глава в книге.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих основных разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы и список цитируемой литературы, включающий 492 ссылки. Диссертация изложена на 244 страницах и содержит 10 таблиц и 69 рисунков.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработана модель для изучения факторов, влияющих на эффективность секреции рекомбинантных белков дрожжами *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Эта модель позволяет выявлять условия, улучшающие укладку чужеродных белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) на примере человеческого активатора плазминогена урокиназного типа (uPA).
2. Эффективность укладки uPA в ЭР дрожжей рода *Ogataea* возрастает при нарушении синтеза ГДФ-маннозы, при делеции С-концевого домена α -субъединицы окаймляющего комплекса COPI, при дефекте О-гликозилирования растворимых белков в ЭР и при инактивации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи.
3. При нарушениях компонентов, обеспечивающих транспорт белков из аппарата Гольджи в вакуоль, усиливается протеолитическая активация секретируемого uPA без увеличения эффективности секреции этого белка.

4. Идентифицирован ген *ABV1* *O. polymorpha*, который кодирует фермент, катализирующий фосфоманнозилрование гликозидных цепей белков в секреторном пути и обеспечивающий высокую резистентность *O. polymorpha* к ортованадату.
5. Нарушение гомеостаза Ca^{2+} , вызванное инактивацией вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы, стимулирует остановку перехода клеточного цикла от фазы G_2 к митозу. Одним из проявлений этого эффекта является увеличение чувствительности клеток к присутствию в среде додецилсульфата натрия.
6. У дрожжей *O. polymorpha* снижение жизнеспособности клеток при одновременной инактивации вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи связано с недостатком Ca^{2+} в ранних компартментах секреторного пути.
7. В клетках дрожжей существует путь доставки Ca^{2+} в секреторные органеллы из источника, независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. В этом пути задействован везикулярный транспорт, осуществляемый при участии компонентов окаймляющего комплекса COPI.

Материалы и методы

Штаммы дрожжей, использованных в работе, были получены на основе штамма *O. parapolyomorpha* DL-1 с мутацией *leu2*, штамма *O. polymorpha* 8V (*leu2*) и штамма *O. polymorpha* 1B (*leu2 ade2*). Для конструирования плазмид в большинстве случаев были использованы стандартные методы генетической инженерии.

Для выращивания дрожжей использовали полную среду YPD (2% пептон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза), синтетическую среду SD (0,67% смеси солей и витаминов "Yeast Nitrogen Base" (Difco) и 2% глюкозы), а также синтетическую среду SD*, также содержащую глюкозу в качестве источника углерода, но смесь солей и витаминов была составлена из отдельных компонентов, чтобы исключить добавления солей Ca^{2+} . Для оценки эффективности секреции uPA колониями дрожжей использовали среду, содержащую фибрин. Сравнение активности uPA в разных препаратах проводили в сериях разведений по способности лизировать фибриновый гель. Выявление специфических полос белков после электрофореза осуществляли либо методом иммуноблоттинга, либо зимографией.

Результаты

Характеристики продукции белка uPA в клетках *O. parapolymorpha*

Для поиска генов, влияющих на секрецию рекомбинантных белков, нужно было выбрать модельный секретируемый белок. Если белок в норме плохо секретируется клетками дрожжей, существует потенциал для улучшения секреции в результате каких-то изменений в геноме хозяйских клеток. Было известно, что белок uPA человека с низкой эффективностью секретируется клетками дрожжей *S. cerevisiae*. Этот фермент, активируя плазминоген, инициирует лизис фибриновых сгустков, поэтому вокруг колоний дрожжей, секретирующих uPA, на среде, содержащей фибрин, образуются видимые зоны лизиса. Это позволяет быстро оценивать эффективность секреции у большого количества клонов и отбирать клоны с увеличенной продуктивностью.

Для решения поставленных в работе задач требовалось понимание того, что является лимитирующим фактором для секреции uPA клетками *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Для этого сначала нужно было определить, какой уровень экспрессии гена дает максимальный уровень секреции, и что происходит при его превышении. Чтобы ответить на эти вопросы, был получен набор штаммов с разной копийностью экспрессионной кассеты uPA под контролем промотора *MOX*, интегрированной в различные локусы генома. Анализ продукции uPA в этих штаммах выявил, что максимальная продукция секретируемого белка достигается в случае одной копии экспрессионной кассеты, интегрированной в локус гена *MOX* или *LEU2*. Как превышение уровня экспрессии, достигаемого в этих штаммах, так и снижение приводило к снижению секреции. Снижение секреции при превышении оптимального уровня экспрессии сопровождалось сильным увеличением количества агрегированного неактивного uPA внутри клеток. Агрегация, очевидно, происходила в ЭР, поскольку гликозиды агрегированного белка имели меньший размер, чем у белка, получившего модификации в аппарате Гольджи. При сопоставлении агрегации с эффективностью секреции у разных штаммов можно было утверждать, что сама по себе агрегация не является причиной плохой секреции. Плохая секреция связана с дефектом укладки белка в дрожжевом секреторном пути, а задержка и накопление несвернутых молекул в ЭР приводит к их агрегации.

Мутации, увеличивающие эффективность секреции α РА у дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*

Чтобы понять, какие процессы в клетке влияют на эффективность укладки модельного белка α РА в ЭР дрожжей *O. polymorpha*, был проведен поиск мутаций, усиливающих его секрецию. Для этого в штамм *O. polymorpha* был введен автономно реплицирующийся центромероподобный экспрессионный вектор, содержащий ген, кодирующий α РА, под контролем регулируемого промотора *МОХ*. Трансформант, содержащий этот вектор, был подвергнут химическому мутагенезу с использованием этилметансульфоната. Около 3000 полученных после мутагенеза клонов были проверены на способность образовывать зоны лизиса на среде, содержащей фибрин, для выявления клонов с увеличенной продуктивностью α РА. Было отобрано 34 клон, вокруг которых образовывались увеличенные зоны лизиса. У двух из них, 27-8V и 24-8V, были обнаружены дополнительные фенотипы, позволяющие проводить селекцию для клонирования генов, комплементирующих эти мутации.

Мутация в гене, кодирующем маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазу

Мутант 24-8V обладал сильно сниженной скоростью роста. В частности, время удвоения его клеток в экспоненциальной фазе роста было 2,3 часа, по сравнению с 1,2 часа у исходного штамма. Кроме того, клетки мутанта образовывали комки, что можно было наблюдать не только с помощью микроскопа, но и по увеличению скорости седиментации клеток в жидкой культуре. Изучение наследования мутантных фенотипов при мейозе показало, что с очень высокой вероятностью все они вызваны одной мутацией, которую мы обозначили *ori24* (*overproduction of α РА*). Поэтому для клонирования гена дикого типа из банка генов использовали селекцию на увеличение скорости роста. В результате была выделена плаزمид, содержащая вставку геномной ДНК *O. polymorpha* с геном, кодирующим маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазу. Изучение способности фрагментов этой вставки комплементировать мутацию *ori24* показало, что клонированный ген является аллелью дикого типа гена, в котором произошла мутация *ori24*. Поэтому этот ген был назван *OPU24*.

Гомологом этого гена у *S. cerevisiae* является ген *PSA1*, мутации в котором часто приводят к зависимости роста от осмотической стабилизации среды. Мутант *ori24* был способен

расти на обычной среде без осмотического стабилизатора, однако он был гиперчувствителен к присутствию детергента в среде, т.е., в отличие от штамма дикого типа не рос на среде с 0,004 % SDS. Эту чувствительность можно было существенно снизить добавлением осмостабилизатора, например 1М сорбитола, 0,5М NaCl или 10% ПЭГ 1000. Часто осмозависимая чувствительность к детергентам бывает связана с нарушениями клеточной стенки. Действительно, электронная микроскопия выявила существенные изменения в морфологии этой структуры у мутанта *ori24*.

Фермент маннозо-1-фосфат гуанилтрансфераза, кодируемый геном *OPU24*, отвечает за синтез ГДФ-маннозы, являющейся предшественником для синтеза всех типов гликозидных цепей, присоединяемых к белкам в секреторном пути. Можно было ожидать, что мутация *ori24* повлияет на характер гликозилирования секретируемых белков. Для оценки влияния мутации на N-гликозилирование в качестве модельного гликопротеида использовали инвертазу *S. cerevisiae*. Инвертаза из клеточного лизата мутанта *ori24* мигрировала при электрофорезе размытым пятном, как и в случае штамма дикого типа, однако у мутанта в высокомолекулярной области белка было меньше. Инвертаза из культуральной среды мигрировала гораздо более компактным пятном на уровне более низкомолекулярных форм, обнаруживаемых в клеточных лизатах. При этом в этой фракции у мутанта белка было существенно больше (рисунок 1). Это, очевидно, объяснялось тем, что через клеточную стенку могли проходить только молекулы с небольшим размером гликозидных цепей, а сильно гликозилированные задерживались. Существенно большее количество белка в культуральной среде у мутанта могло объясняться не только бóльшим количеством слабо гликозилированных форм, способных преодолеть клеточную стенку, но и более высокой проницаемостью самой клеточной стенки.

Для анализа О-гликозилирования в использовали эндогенную хитиназу. Этот белок не имеет сайтов N-гликозилирования, но модифицируется в секреторном пути присоединением большого числа О-гликозидных цепей. У мутанта *ori24* этот белок мигрировал при электрофорезе быстрее и более размытым пятном (данные не приведены), чем у штамма дикого типа, что указывало на нарушение О-гликозилирования.

Поскольку мутант *ori24* имел нарушенную клеточную стенку, можно было предполагать, что увеличение секреции uPA связано только с большей проницаемостью клеточной

стенки. Действительно, изменение соотношения количества активного белка в культуральной среде и в клеточных лизатах в результате мутации *ori24* подтверждало идею о большей проницаемости клеточной стенки. Однако у мутанта количество активного иРА в лизатах было существенно выше. Это показывало, что пористость клеточной стенки не основная причина увеличенной продукции иРА.

Также можно было предполагать, что увеличение секреции связано с влиянием *ori24* на гликозилирование самого иРА. Однако эта мутация существенно увеличивала продукцию и не гликозилированного мутантного варианта этого белка, иРА-Q³⁰².

Гликозилирование играет существенную роль в процессе укладки белков в ЭР. Поэтому мы предполагали, что мутация *ori24* может оказывать влияние на накопление несвернутых белков в этом компартменте и вызывать увеличение чувствительности к агентам, нарушающих укладку белков. Действительно, мутация *ori24* приводила к существенному увеличению чувствительности к дитиотеитолу, мешающему образованию S-S связей, и туникамицину, ингибирующему присоединение N-гликозидов к вновь синтезируемым белкам.

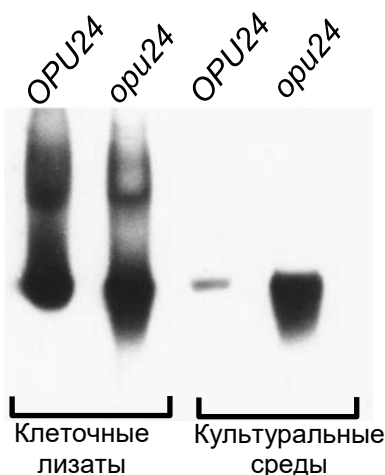


Рисунок 1. Зимография инвертазы. Сравнение электрофоретической подвижности инвертазы, продуцированной клетками дикого типа (*OPU24*) и мутанта *ori24* (*ori24*) *O. polymorpha*.

Мутация в гене, кодирующем α -субъединицу окаймляющего комплекса *CORI*

Другой мутант с увеличенной продуктивностью иРА, 27-8V, был чувствителен к недостатку кальция в среде. При изучении мейотического наследования мутантных фенотипов (увеличенная секреция иРА и чувствительность к недостатку кальция в среде) мы убедились, что они с очень высокой вероятностью являются следствием одной мутации.

Аллель гена дикого типа была клонирована из библиотеки геномных последовательностей *O. polymorpha* по комплементации чувствительности к недостатку кальция в среде. Из генома был выделен фрагмент гена, содержащий мутацию, и подтверждено соответствие фенотипов идентифицированной мутации. Определена последовательность аллели дикого типа и фрагмента мутантной аллели, в котором была картирована мутация. Ген кодировал α -субъединицу окаймляющего комплекса COPI. У *S. cerevisiae* этот белок кодируется геном *RET1*, и мы использовали такое же обозначение для идентифицированного нами гена, а полученную в нем мутацию обозначили *ret1-27*. В результате этой мутации в области гена, кодирующей С-концевой домен белка, возник нонсенс-кодон. У *S. cerevisiae* делеция этого домена летальна, но белок, лишенный этого домена, все же может поддерживать жизнеспособность клеток при сверхпродукции. Чтобы исключить возможность синтеза полноразмерного белка в результате сквозного прочтения нонсенс кодона в мутантной аллели, был сконструирован штамм с делецией участка, кодирующего С-концевой домен. Этот штамм был жизнеспособен, а его фенотипы были идентичны таковым у штамма с мутацией *ret1-27*. Это говорило о том, что, в отличие от *S. cerevisiae*, у *O. polymorpha* делеция С-концевого домена α -субъединицы комплекса COPI не летальна.

Для того чтобы проверить, является ли ген *RET1* жизненно важным у *O. polymorpha*, был сконструирован штамм, в котором этот ген находился под контролем промотора гена *MOX*. Этот промотор полностью репрессируется при росте на среде с глюкозой и индуцируется при росте на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода. Трансформанты, несущие репрессируемую аллель *RET1*, получали на среде с метанолом. Такие трансформанты были не способны расти на среде с глюкозой. Однако введение в них плазмиды с геном *RET1* дикого типа восстанавливало способность расти на среде с глюкозой. Полученные данные показали, что, так же как и у *S. cerevisiae*, у дрожжей рода *Ogataea* *RET1* необходим для жизни.

Как было описано выше, низкая продукция uPA в клетках дрожжей обусловлена неподходящими условиями для укладки молекулы этого белка в ЭР. Неправильно уложенный белок задерживается в ЭР, где он может агрегировать. Фракционирование клеточных лизатов выявило, что мутация *ret1-27* существенно снижает степень агрегации uPA (рисунок 2 а).

Анализ электрофоретической подвижности в неденатурирующих условиях показал, что свойства uPA, секретированного мутантом *ret1-27* и штаммом дикого типа, существенно отличаются. Перед электрофорезом образцы обрабатывали EndoH, чтобы удалить N-гликозидные цепи, которые могли оказать существенное влияние на электрофоретическую подвижность белка. uPA, секретированный клетками дикого типа, мигрировал двумя полосами, вокруг которых инициировался лизис фибрина. Полоса с меньшей подвижностью соответствовала полноразмерным формам «50 кДа», включающим одноцепочечный или двуцепочечный белок. Полоса с большей подвижностью возникла в результате протеолитического отщепления N-концевых доменов, которые не нужны для фибринолитической активности белка. В отличие от штамма дикого типа, мутант *ret1-27* секретировал дополнительные формы uPA, которые мигрировали медленнее формы "50 кДа" и инициировали лизис фибрина на всем расстоянии фактически от начала геля до зоны лизиса, инициированной формой "50 кДа" (рисунок 2 б). Важно отметить, что активность формы, мигрирующей как полоса на уровне 50 кДа, выглядела примерно одинаковой у штамма дикого типа и мутанта. При этом оценка общей активности uPA и его количества методом иммуноблоттинга после электрофореза в денатурирующих условиях (данные не приведены) показывала, что суммарно мутант секретирует в несколько раз больше этого белка. Это означало, что увеличение продуктивности uPA у мутанта обеспечивается в основном за счет появления этих aberrantных форм.

Фенотипические проявления мутации *ret1-27* (увеличенная секреция uPA и чувствительность к недостатку кальция в среде) схожи с проявлениями нарушения гена *PMR1 S. cerevisiae*. Поэтому можно было предположить, что эти фенотипы *ret1-27* обусловлены нарушением функции Pmr1. Действительно, у мутанта было выявлено заметное снижение количества белка Pmr1, однако восстановление его количества за счет введения нескольких копий плазмиды с его геном заметно не сказалось на чувствительности к недостатку кальция и лишь несколько снизило секрецию uPA (рисунок 3). Последний эффект мог быть неспецифическим по отношению к мутации *ret1-27*, поскольку мультিকопийная плазида с геном *PMR1* несколько снижала секрецию и у штамма дикого типа (данные не приведены).

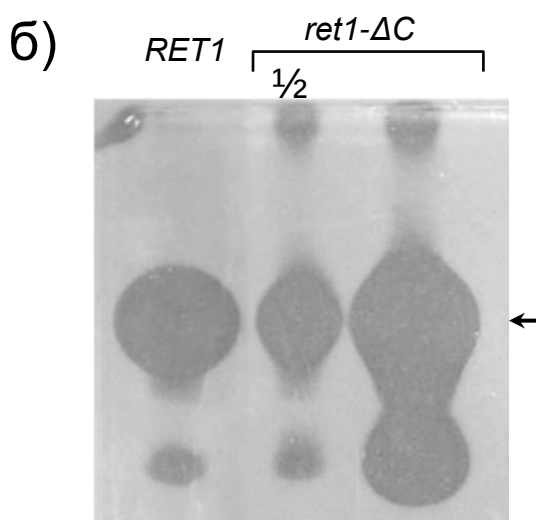
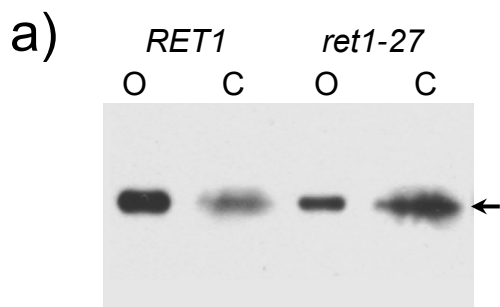


Рисунок 2. Электрофоретический анализ белка uPA, продуцированного мутантами *ret1*. Стрелкой указано положение формы uPA "50 кДа".

а) Анализ внутриклеточной агрегации uPA в клетках мутанта *ret1-27* *O. polymorpha*. Осветленные лизаты клеток фракционировали центрифугированием, как описано в разделе "Материалы и методы". Осадочную (O) и растворимую (C-супернатант) фракцию анализировали методом иммуноблоттинга с антителами к uPA. "*ret1-27*"- штамм *O. polymorpha*, несущий мутацию *ret1-27*; "*RET1*" – такой же штамм, но несущий плазмиду с геном *RET1* дикого типа.

б) Зимография uPA, секретируемого клетками штамма *O. parapolyomorpha* с геном *RET1* дикого типа (*RET1*) и штамма, несущего мутацию *ret1-ΔC*. На дорожку, обозначенную $\frac{1}{2}$, был нанесен образец, разведенный в два раза.

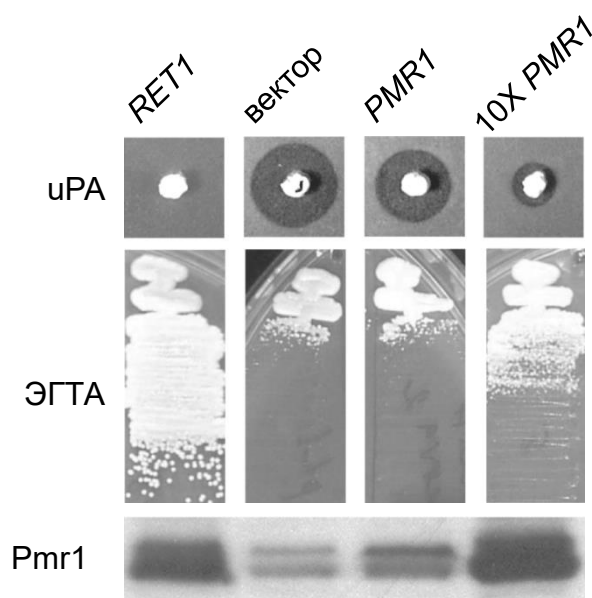


Рисунок 3. Эффекты введения генов *RET1* и *PMR1* в мутант *ret1-27*. "*RET1*" – трансформант с геном *RET1* дикого типа; "вектор" – трансформант с "пустым" вектором; "*PMR1*" трансформант с одной копией плазмиды, содержащей ген *PMR1*; "*10X PMR1*" трансформант с множественной (до 10 копий) интеграцией плазмиды, содержащей ген *PMR1*. Панель "uPA" – зоны лизиса на среде, содержащей фибрин; панель "ЭГТА" – рост на среде со сниженным количеством кальция и добавлением ЭГТА; "Pmr1" – иммуноблоттинг с антителами к белку Pmr1.

Нарушение О-маннозилтрансферазы ЭР Pmt1 улучшает укладку uPA в секреторном пути *O. parapolymorpha*

По нашим неопубликованным данным, в отличие от *O. polymorpha*, у *O. parapolymorpha* 2 мкм ДНК *S. cerevisiae* не имеет центромероподобной функции. Поэтому автономно реплицирующиеся векторы с этой последовательностью, имеющие высокую стабильность и низкую копийность за счет равномерного распределения при клеточном делении у *O. polymorpha*, были нестабильны и имели нерегулярную копийность у *O. parapolymorpha*. Это существенно затрудняло использование автономного вектора для введения в геном *O. parapolymorpha* вектора экспрессии модельного белка для дальнейшего получения мутаций, увеличивающих его продукцию. Однако ранее нами был разработан метод направленной интеграции экспрессионных кассет с заменой кодирующей части гена *МОХ*. Эта же стратегия могла быть использована для замены интегрированного гена снова на ген *МОХ* или на другую экспрессионную кассету, что важно для дальнейшего изучения и использования полученных мутантов. Используя этот подход, в геном *O. parapolymorpha* была введена экспрессионная кассета uPA-Q³⁰². Негликозилированный вариант uPA был использован в качестве репортерного белка, поскольку он еще менее эффективно секретировался клетками дрожжей, чем белок дикого типа, что облегчало детекцию мутантов с увеличенной секрецией.

После химического мутагенеза было отобрано около 20 клонов, образующих увеличенные зоны лизиса на среде, содержащей фибрин. Один из них, имеющий самую высокую продуктивность uPA-Q³⁰², был чувствителен к повышенной температуре инкубации (T_{S45}). Плазмиды, выделенные из библиотеки геномных последовательностей *O. parapolymorpha* по комплементации этого фенотипа, содержали ген, кодирующий гомолог О-маннозилтрансферазы ЭР Pmt1 *S. cerevisiae*. На основании гомологии и функционального анализа, описанного далее, этот ген также был обозначен *PMT1*, а полученная мутация – *pmt1-1*.

Pmt1 *O. parapolymorpha* является ортологом Pmt1 *S. cerevisiae*

Направленная инактивация гена *PMT1* *O. parapolymorpha* приводила к появлению таких же фенотипов, как и у штамма с мутацией *pmt1-1*, включая увеличение продукции uPA и чувствительность к повышенной температуре (45°C). Чувствительность к высокой

температуре снижалась при осмостабилизации среды 1М сорбитолом. Это указывало на то, что этот фенотип связан с дефектом клеточной стенки. Было известно, что у *S. cerevisiae* инактивация только одного из генов семейства *PMT* не приводит к заметному снижению жизнеспособности. Только комбинации нарушений разных генов этого семейства приводят к дефекту роста, а в некоторых случаях летальны. Очевидно, что отсутствие гена *PMT1* у *O. parapolymorpha* компенсируется наличием других генов этого семейства, однако температуро-чувствительный фенотип у мутанта *pmt1* говорит о более существенной роли этого гена у этого вида дрожжей по сравнению с *S. cerevisiae*. Чтобы проверить, может ли *Pmt1* *O. parapolymorpha* функционально заменить *Pmt1* *S. cerevisiae*, этот ген был поставлен под контроль промотора, который обеспечивает его экспрессию в *S. cerevisiae*. Введение такого гена в штамм *S. cerevisiae* с нарушенными генами *PMT1* и *PMT2* компенсировало его чувствительность к повышенной температуре.

Поскольку белки семейства *Pmt* катализируют первый этап О-гликозилирования (присоединение первого остатка маннозы к остаткам серина и треонина), можно было ожидать, что, как и у *S. cerevisiae*, нарушение *PMT1* у *O. parapolymorpha* должно снижать степень О-глокозилиования белков в секреторном пути. Чтобы это проверить, была изучена подвижность хитиназы, поскольку этот белок содержит только О-связанные гликозидные цепи. Анализ электрофоретической подвижности хитиназы в присутствии SDS показал, что нарушение гена *PMT1* увеличивает подвижность и снижает количество этого белка, сорбированного на хитин (рисунок 4 а). Первый эффект свидетельствовал о снижении О-гликозилирования этого белка, а второй был следствием либо снижения его количества в культуральной среде, либо падения аффинности к хитину. Электрофоретическая подвижность uPA с удаленным сайтом N-гликозилирования при нарушении *PMT1* не изменилась (рисунок 4 б). Суммируя данные, приведенные в этом разделе, можно сказать, что идентифицированный ген *O. parapolymorpha* не только гомологичен гену *PMT1* *S. cerevisiae*, но и имеет ту же функцию, поскольку его нарушение приводит к таким же проявлениям, как и у *S. cerevisiae*, или даже более выраженным.

Инактивация *PMT1* *O. parapolymorpha* снижает агрегацию uPA в ЭР

Чтобы проверить, влияет ли нарушение гена *PMT1* на агрегацию uPA в ЭР, в геном мутанта и штамма с геном *PMT1* дикого типа были введены экспрессионные кассеты uPA

и варианта этого белка с сигналом задержки в ЭР KDEL. Количество растворимой формы этих белков у мутантного штамма было выше (рисунок 5), как и количество uPA, секретируемого в культуральную среду (рисунок 4 б).

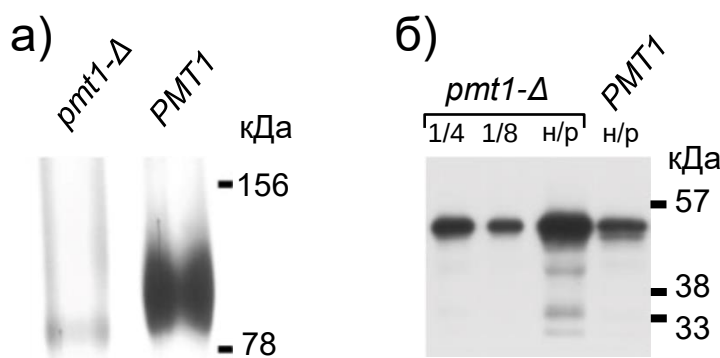


Рисунок 4. Сравнение электрофоретической подвижности белков, секретируемых мутантом *pmt1-Δ* и штаммом с аллелью *PMT1* дикого типа. а) Электрофоретический анализ хитиназы, выделенной из культуральной среды с помощью сорбции на хитин. б) Иммуноблоттинг uPA в культуральных средах штаммов.

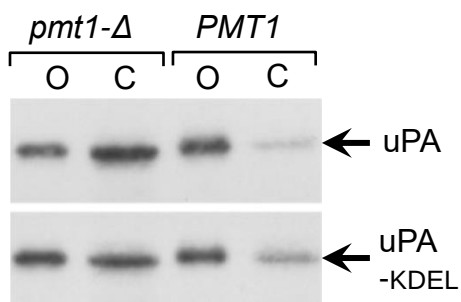


Рисунок 5. Анализ внутриклеточной агрегации uPA и uPA-KDEL в штамме с мутацией *pmt1-Δ* и штамме с геном *PMT1* дикого типа. Клеточные лизаты фракционировали центрифугированием. Осадочную (О) и растворимую (С-супернатант) фракцию анализировали методом иммуноблоттинга с антителами против uPA.

Дефекты транспортировки белков в вакуоль усиливают протеолитический процессинг uPA

В предыдущих экспериментах для получения мутантов с увеличенной секрецией uPA был использован химический мутагенез, а гены, в которых произошли эти мутации, идентифицировали путем клонирования аллели дикого типа по комплементации селективируемых проявлений (сниженная скорость роста, чувствительность к повышенной температуре или к определенным условиям выращивания и т.п.). Это ограничивало спектр изучаемых мутаций, поскольку те из них, которые не имели таких проявлений, выпадали из рассмотрения. Чтобы иметь возможность просто определять мутантный локус даже в отсутствие таких селективируемых проявлений, нами был использован метод получения мутантов путем случайной интеграции трансформирующей ДНК. Для этого штамм дрожжей *O. polymorpha* был трансформирован линейаризованными плазмидами, которые могли интегрировать в случайные локусы генома в результате негомологичной рекомбинации. Полученные трансформанты были перенесены на среду с фибрином для детекции uPA. В результате отобрано 23 клон, образующих увеличенные зоны лизиса фибрина. У этих клонов было исследовано наличие вакуолярного белка CPY в среде. У 9 из них было обнаружено увеличение секреции этого белка, что свидетельствовало о нарушении сортировки белков в вакуоль в поздних компартментах аппарата Гольджи. У 6 таких мутантов удалось идентифицировать локус интеграции. В двух случаях был нарушен ген *VPS10*, а в остальных были нарушены гены *PEP3*, *VPS8*, *VPS17* и *VPS35*. Все эти гены кодируют белки, которые участвуют в транспортировке белков и липидов между аппаратом Гольджи и вакуолью.

На основании этих данных, можно было предполагать, что низкая эффективность секреции uPA связана с его транспортировкой в вакуоль на деградацию. Однако это предположение не подтвердилось в дальнейших экспериментах. Для отбора мутантов был использован штамм с геном uPA под контролем относительно слабого промотора гена *PDI*, что не позволяло выявлять этот белок методом иммуноблоттинга. Поэтому для дальнейшего анализа был использован штамм *O. parapolyomorpha* DLQ, содержащий экспрессионную кассету uPA-Q³⁰² с сильным промотором гена *MOX*.

Среди идентифицированных генов, продукты которых участвуют в транспорте белков между аппаратом Гольджи и вакуолью, был ген *VPS10*, кодирующий рецептор

вакуолярного сортирования поздних компартментов аппарата Гольджи. Чтобы выяснить, транспортируется ли uPA в вакуоль, этот ген был инактивирован в штамме DLQ. Полученный штамм *vps10-Δ* образовывал увеличенные зоны лизиса на среде с фибрином. Однако это не сопровождалось увеличением количества белка в культуральной среде, выявляемого иммунологически. При этом усиливался протеолитический процессинг зимогена uPA, приводящий к образованию активной формы белка.

То есть увеличение зон лизиса фибрина у мутантов с нарушениями сортировки белков в вакуоль было связано не с увеличением секреции белка uPA, а с его протеолитическим процессингом.

Секреция активированного uPA при нарушении транспорта белков в вакуоль, очевидно, характерна не только для дрожжей рода *Ogataea*, но и для *S. cerevisiae*, поскольку такие мутанты с экспрессионной кассетой uPA также образовывали увеличенные зоны лизиса на среде, содержащей фибрин.

Функциональный анализ гена *PMR1* *O. polymorpha*

Было известно, что у *S. cerevisiae* инактивация гена *PMR1*, кодирующего $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазу аппарата Гольджи, увеличивает секрецию uPA человека. Можно было предполагать, что у дрожжей рода *Ogataea* такая мутация будет иметь сходный эффект. Ряд попыток инактивировать ген *PMR1* у *O. parapolymorpha* оказался безуспешным. У этого вида *Ogataea* интеграция трансформирующей ДНК в результате гомологичной рекомбинации происходит существенно чаще, чем у *O. polymorpha*. Поэтому отсутствие трансформантов с инактивированным геном *PMR1* указывало на то, что они не способны прорасти на селективной среде. Чтобы решить эту проблему, было решено использовать диплоидный штамм *O. polymorpha*. Среди трансформантов этого штамма, полученных при помощи кассеты для инактивации гена *PMR1*, удалось отобрать клоны, у которых произошло замещение гена *PMR1* на селективный маркер *LEU2*. Из одного из этих клонов были получены гаплоидные сегреганты, содержащие делецию гена *PMR1*, один из которых был обозначен 1MA77/12 и использован для дальнейшего изучения.

Чтобы получить пару изогенных штаммов, которые отличались только статусом гена *PMR1*, штамм 1MA77/12 (*ade2 leu2 mox-Δ::P_{МОХ}:uPA-Q³⁰² pmr1::LEU2*) был трансформирован либо плазмидой, содержащей ген *PMR1* дикого типа, либо "пустым"

вектором. Трансформанты, несущие ген *PMR1* дикого типа, росли гораздо быстрее, чем трансформанты с "пустым" вектором, особенно на синтетической среде. Эта разница определялась, по крайней мере частично, сниженной жизнеспособностью клеток мутанта. Действительно, в ночной культуре, выращенной в среде YPD, количество мертвых клеток, окрашивающихся метиленовым синим, у мутанта было в 4-5 раз выше, чем у контрольного штамма (около 30% по сравнению с 6-7%). Из одинаковых объемов суспензии клеток мутанта, выращенных на среде YPD, на синтетической среде выросло примерно втрое меньше колоний, чем на среде YPD. Плотность стационарной культуры, выращенной в среде YPD, у мутанта была примерно втрое ниже, чем у контрольного штамма. Кроме того, было обнаружено, что мутантные клетки быстро гибнут в процессе хранения при 5°C, а также при наличии в среде аммоний-фосфатного буфера.

Поскольку для работы маннозилтрансфераз аппарата Гольджи требуются катионы Mn^{2+} , у *S. cerevisiae* инактивация Ca^{2+}/Mn^{2+} -АТФазы аппарата Гольджи *Pmr1* блокирует модификации гликозидных цепей белков в этом компартменте. Как и у *S. cerevisiae*, у *O. polymorpha* нарушение гена *PMR1* приводило к дефекту модификаций гликозидных цепей белков в аппарате Гольджи, что выявлялось по изменению подвижности модельных гликопротеидов.

У дрожжей *S. cerevisiae* ряд резидентных белков вакуоли, включая CPY, направляются в этот компартмент за счет Ca^{2+} -зависимого связывания с рецептором Vps10 в поздних компартментах аппарата Гольджи. Мы показали, что нарушение гена *PMR1* у *O. polymorpha* также приводит к секреции CPY в культуральную среду. Это означало, что и у этого вида дрожжей *Pmr1* обеспечивает поддержание высокой концентрации кальция в аппарате Гольджи.

Эффекты мутации *pmr1-Δ* на секрецию uPA были изучены в штамме, продуцирующем мутантный негликозилированный вариант этого белка, uPA-Q³⁰². Это исключало наличие эффектов, связанных с нарушением гликозилирования самого модельного белка. Мутант *pmr1-Δ*, продуцирующий uPA-Q³⁰², образовывал зоны лизиса на среде, содержащей фибрин, существенно большего размера, чем контрольный штамм (рисунок 6 а). Инактивация *PMR1* приводила к существенному увеличению количества uPA-Q³⁰² в культуральной среде (рисунок 6 б) и его снижению внутри клеток (рисунок 6 в). При этом белок мигрировал на уровне 45 кДа, что означало отсутствие протеолитического

процессинга в участке активации. Полученные результаты показывали, что инактивация Pmr1 не увеличивает, а снижает протеолитическую активацию uPA, несмотря на дефект вакуолярного сортинга.

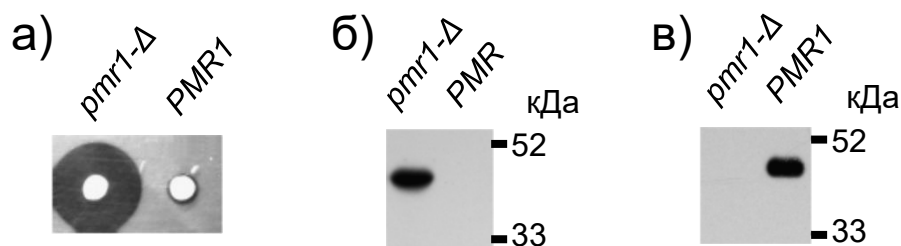


Рисунок 6. Анализ продукции uPA-Q³⁰² в трансформантах штамма 1MA77/12, содержащих либо плазмиду pCAT1 с геном *PMR1* дикого типа (*PMR1*), либо "пустой" вектор p2CNA6 (*pmr1-Δ*). а) Зоны лизиса на среде, содержащей фибрин. б) Иммуноблоттинг uPA в культуральных супернатантах. в) Иммуноблоттинг uPA в клеточных лизатах.

Изучение механизмов проявления гиперчувствительности к SDS при нарушении вакуолярной Ca²⁺-АТФазы Pmc1

Нарушения гликозилирования белков в секреторном пути дрожжей часто приводят к увеличению чувствительности клеток к детергентам. Это обычно связывают с ослаблением клеточной стенки. Действительно, описанные выше мутанты *ori24* и *pmt1* были более чувствительны к SDS, чем штамм дикого типа, и у них были выявлены дефекты клеточной стенки. Однако при поиске гиперчувствительных к SDS клонов среди трансформантов *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, полученных трансформацией линейными фрагментами ДНК, были выявлены мутанты с нарушением гена *PMC1*. Идентифицированный ген кодирует вакуолярную кальциевую АТФазу, ответственную за поддержание концентрации кальция в цитозоле, транспортируя эти катионы в вакуоль. Связь чувствительности к SDS с функцией этого белка была подтверждена при направленной инактивации гена *PMC1*.

Чтобы выяснить механизмы увеличения чувствительности мутанта *pmc1-Δ* к SDS, был проведен поиск мутаций, супрессирующих это проявление. Мутации получали методом случайной интеграции трансформирующей ДНК в геном. Было идентифицировано три

мутации, супрессирующие это проявление. В одном из мутантов был нарушен ген *CCH1*, кодирующий каталитическую субъединицу кальциевого канала плазмалеммы. В другом – ген *HOG1*, кодирующий MAP киназу, обеспечивающую ответ клетки на гиперосмотический шок. В третьем мутанте интеграция трансформирующей ДНК сопровождалась какой-то хромосомной перестройкой, в результате которой был инактивирован ген *WEE1*, кодирующий протеинкиназу, которая ингибирует переход клеточного цикла от фазы G_2 к М. В отличие от первых двух генов, при направленной инактивации *WEE1* мы не наблюдали супрессии чувствительности к SDS, вызываемой нарушением *PMC1*. Однако в мутанте, получившемся в результате случайной интеграции трансформирующей ДНК и хромосомной перестройки, супрессия была связана с нарушением *WEE1*, поскольку введение в геном этого мутанта плазмиды с геном *WEE1* дикого типа снимало супрессию чувствительности к SDS. Инактивация *WEE1* сама по себе приводила к увеличению чувствительности к SDS. То есть для супрессии этого проявления мутации *pmc1-Δ* требовалась не только инактивация гена *WEE1*, но и какие-то другие последствия случившейся хромосомной перестройки.

Было обнаружено, что продукция в клетках мутанта химерного белка, состоящего из N-концевых доменов белка Wee1 и β -галактозидазы *E. coli*, вызывает изменение морфологии клеток, характерное для задержки перехода клеточного цикла от G_2 к М (рисунок 7).

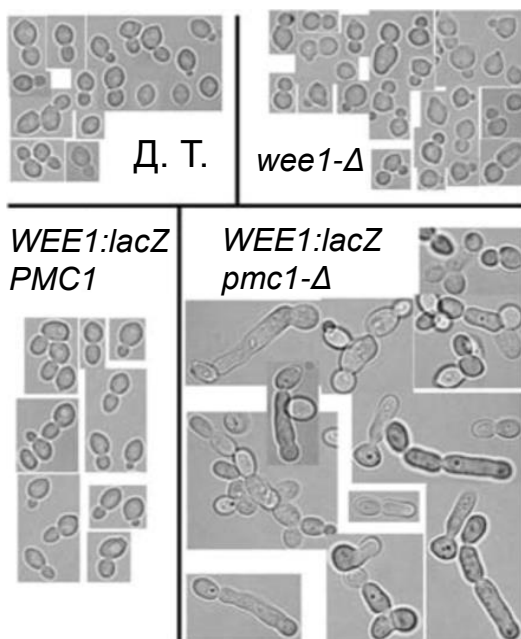


Рисунок 7. Влияние аллелей *WEE1* на морфология клеток *O. parapolymorpha*. "Д. Т." – Штамм DL1-L дикого типа, трансформированный пустым вектором; "*wee1-Δ*" – штамм DL1-L с инактивированным геном *WEE1*; "*WEE1:lacZ PMC1*" – штамм DL1-L с аллелью *PMC1* дикого типа, содержащий химерный ген *WEE1:lacZ*; "*WEE1:lacZ pmc1-Δ*" – штамм DL1-L с делецией гена *PMC1*, содержащий химерный ген *WEE1:lacZ*.

Изучение генетического взаимодействия мутаций *ret1-27*, *pmr1-Δ* и *pmc1-Δ*

Мутантная аллель *ret1-27* кодирует α -COP, лишенный более 300 С-концевых аминокислотных остатков. Фенотипические проявления этой мутации, увеличенная секреция uPA и неспособность расти при недостатке Ca^{2+} в среде, схожи с проявлениями инактивации гена *PMR1*, кодирующего $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазу аппарата Гольджи. Можно было предполагать, что такие проявления мутации *ret1-27* связаны со снижением функции белка Pmr1. Чтобы это проверить было проведено исследование взаимодействия мутаций *ret1-27* и *pmr1-Δ*. Для этого был сконструирован штамм, обозначенный MC39, который нес обе эти мутации и содержал плазмиду с геном *PMR1* дикого типа. На стандартных средах клетки этого штамма могли терять плазмиду с геном *PMR1* только после введения другой плазмиды с геном *RET1* дикого типа. Это означало, что комбинация мутаций *ret1-27* и *pmr1-Δ* – летальна (синтетическая летальность). Однако, если в среду добавляли 10мМ CaCl_2 , штамм MC39 был способен терять плазмиду с геном *PMR1* и в отсутствие плазмиды с геном *RET1*. Это указывало на то, что синтетическая летальность этих мутаций обусловлена недостатком Ca^{2+} в секреторных органеллах. Перенос клеток штамма *ret1-27 pmr1-Δ* со среды с повышенным содержанием кальция на стандартную среду YPD приводил к быстрой гибели клеток. Таким образом, мутация *ret1-27* усиливает зависимость мутанта *pmr1-Δ* от доступности кальция во внешней среде.

Ранее с использованием дрожжей *S. cerevisiae* было показано, что Mn^{2+} имеет двоякий эффект на жизнеспособность клеток. Его накопление в цитозоле токсично, однако эти катионы могут функционально замещать Ca^{2+} в каком-то жизненно важном процессе или процессах и поддерживать жизнь клеток в условиях недостатка Ca^{2+} . Мы показали, что дрожжи *O. polymorpha* чувствительны к повышенной концентрации Mn^{2+} в среде, что, очевидно, также было связано с токсичностью этих катионов в цитозоле. Важно отметить, что чувствительность к Mn^{2+} в существенной степени зависела от состава среды. Наибольшая чувствительность наблюдалась на среде SD* (синтетическая среда с низким содержанием Ca^{2+}), на которой особенно выражено проявлялся дефект роста мутанта *pmr1-Δ*. В отличие от штамма дикого типа, мутант *pmr1-Δ* практически не рос на среде SD* с 3мМ MnCl_2 , однако при более низких концентрациях (0,5 и 1 мМ) MnCl_2 его рост на этой среде заметно улучшался (рисунок 8). Это согласуется с ролью Pmr1 в транспорте

Mn^{2+} из цитозоля в аппарат Гольджи: небольшое повышение концентрации Mn^{2+} в среде позволяет компенсировать недостаток этих катионов в секреторных органеллах мутанта, а при дальнейшем повышении концентрации начинает проявляться токсичность из-за отсутствия Pmr1, откачивающего Mn^{2+} из цитозоля. Мутация *ret1-27* сама по себе увеличивала чувствительность клеток к Mn^{2+} (рисунок 8), но в то же время усиливала потребность мутанта *pmr1-Δ* в Mn^{2+} в культуральной среде, поскольку рост двойного мутанта *ret1-27 pmr1-Δ* на среде YPD (но не на SD) восстанавливался не только в присутствии избытка Ca^{2+} , но и при добавлении в среду 1мМ $MnCl_2$ (рисунок 9).

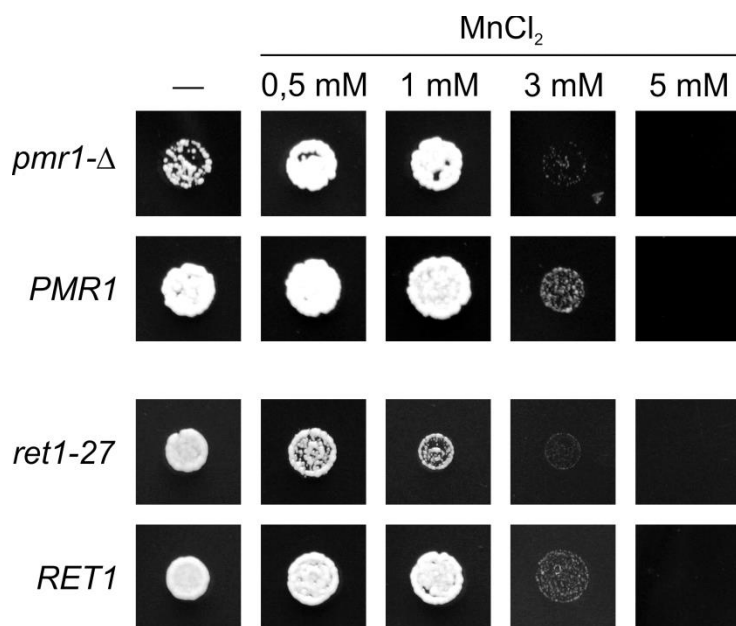


Рисунок 8. Рост мутантов *pmr1-Δ* и *ret1-27* на среде SD* с добавлением разных концентраций $MnCl_2$. "*pmr1-Δ*" и "*PMR1*" – штаммы, отличающиеся друг от друга только аллелью гена *PMR1*. субклон штамма 1MA77/12/GP1 без плазмиды с геном *PMR1*; – штамм 1MA77/12/GP1, содержащий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа; "*ret1-27*" и "*RET1*" – штаммы, отличающиеся друг от друга только аллелью гена *RET1*.

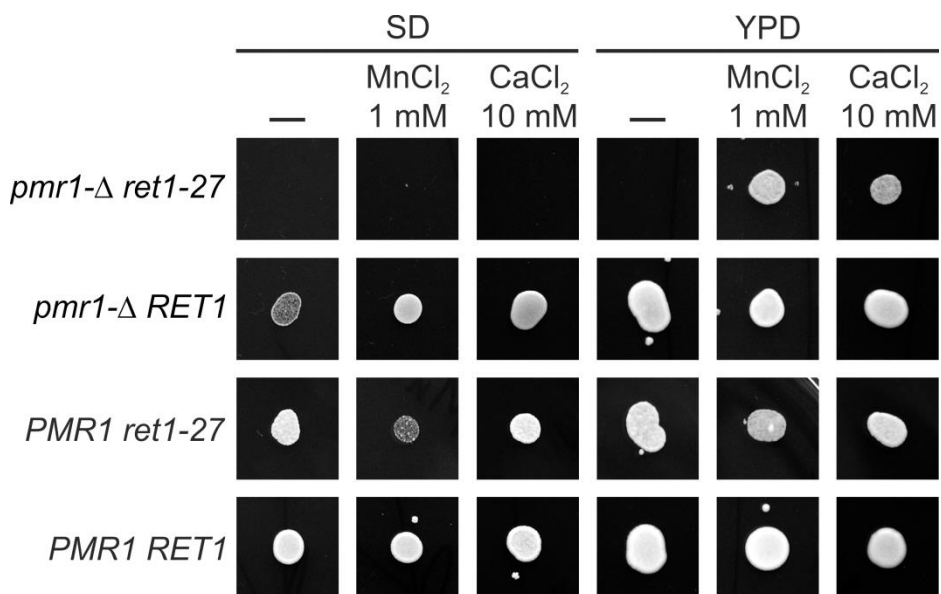


Рисунок 9. Восстановление роста двойного мутанта *pmr1-Δ ret1-27* при добавлении в среду CaCl₂ и MnCl₂. "*pmr1-Δ ret1-27*", "*pmr1-Δ RET1*", "*PMR1 ret1-27*", "*PMR1 RET1*" – отличающиеся наличием плазмид с генами *RET1* и *PMR1* производные штамма, который несет мутации *pmr1-Δ* и *ret1-27*. Примерно одинаковое количество клеток из субклонов с плазмидой и без в виде суспензии в стерильной воде было нанесено на поверхность твердых сред, указанных на рисунке.

Обобщая описанные данные, можно подчеркнуть, что мутация *ret1-27* увеличивает потребность в Ca²⁺ и Mn²⁺ на фоне мутации *pmr1-Δ*. Это означает, что для проявления Ca²⁺-зависимого фенотипа мутации *ret1-27* не требуется наличия белка Pmr1, и этот фенотип не определяется снижением функции Pmr1.

Было известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* инактивация вакуолярной кальциевой АТФазы Pmc1 нарушает контроль концентрации Ca²⁺ в цитозоле и таким образом приводит к неспособности клеток расти при высокой концентрации Ca²⁺ в среде. Ионная помпа Pmr1 также вовлечена в поддержание на низком уровне концентрации Ca²⁺ в цитозоле. Инактивация одновременно двух этих ионных помп у *S. cerevisiae* летально из-за повышения концентрации кальция в цитозоле. Хотя проявления мутаций *pmr1-Δ* и *pmc1-Δ* у *O. polymorpha* очень схожи с таковыми у *S. cerevisiae*, роль Pmr1 в контроле концентрации кальция в цитозоле и роль Pmc1 в контроле концентрации кальция в секреторных органеллах у *O. polymorpha* оставались невыясненными. Чтобы это выяснить, мы провели исследование взаимодействия мутаций *pmr1-Δ* и *pmc1-Δ* друг с

другом. Для этого ген *PMCI* был инактивирован в штамме с мутацией *pmr1-Δ*, который содержал плазмиду с геном *PMR1* дикого типа. Неожиданно для нас полученный штамм *pmr1-Δ pmc1-Δ* был способен терять плазмиду с геном *PMR1* при росте на полной среде YPD, однако потерявшие плазмиду клоны не росли на синтетической среде SD (рисунок 10). Эффект увеличения концентрации Mn^{2+} в среде на рост двойного мутанта *pmr1-Δ pmc1-Δ* был сходен с таковым у мутанта *ret1-27 pmr1-Δ*. В частности, добавление 1-3 мМ $MnCl_2$ в среду SD обеспечивало рост клеток. Интересно, что такой же эффект был и у добавления в среду SD 5 мМ $CaCl_2$ (рисунок 10). Это означало, что неспособность штамма расти на среде SD связана не с повышенной концентрацией кальция в цитозоле, а с недостатком Ca^{2+} и Mn^{2+} в секреторных органеллах. Т.е. ионная помпа аппарата Гольджи Pmr1 в существенной степени не вовлечена в контроль концентрации Ca^{2+} в цитозоле, а вакуолярная помпа Pmc1 оказывает влияние на концентрацию Ca^{2+} в секреторных органеллах. Это позволяло предполагать, что из вакуоли Ca^{2+} может попадать в секреторные органеллы.

Целый ряд белков попадает в вакуоль из поздних компартментов секреторного пути через серию промежуточных компартментов, сообщающихся посредством везикулярного транспорта. В экспериментах, описанных выше, нами были выявлены гены белков, которые отвечают за это сообщение. Среди них был ген *VPS35*, кодирующий компонент окаймляющего комплекса, который отвечает за ретроградный транспорт из превакуолярного компартмента в аппарат Гольджи. Сходно с мутацией *ret1-27*, инактивация этого гена приводила к чувствительности к недостатку Ca^{2+} в культуральной среде и усиливала зависимость мутанта *pmr1-Δ* от Ca^{2+} (рисунок 11). В частности, в отличие от штамма с геном *VPS35* дикого типа, мутант *vps35-Δ* не рос на среде SD* при добавлении в нее 20 мМ ЭГТА, двойной мутант *pmr1-Δ vps35-Δ* не рос на среде SD* даже в отсутствие ЭГТА. Однако эффект *vps35-Δ* на зависимость мутанта *pmr1-Δ* от кальция был менее выраженным, чем эффект мутации *ret1-27*, поскольку двойной мутант *pmr1-Δ vps35-Δ* был способен расти на среде SD и YPD. Усиление зависимости мутанта *pmr1-Δ* от кальция при инактивации гена *VPS35* указывало на вовлеченность превакуолярных компартментов в независимый от Pmr1 путь доставки кальция в секреторные органеллы. В то же время, мутация *vps35-Δ* вызывала гиперчувствительность к Mn^{2+} , которая маскировала способность этих катионов супрессировать дефект роста, вызываемый

мутацией *pmr1-Δ* (рисунок 11). Можно предположить, что Vps35 вовлечен в деградацию переносчика Mn^{2+} , и, таким образом, отсутствие Vps35 приводит к увеличению поступления в клетку Mn^{2+} .

В экспериментах, описанных выше, нами было показано, что мутация *ret1-27* заметно снижает количество белка Pmr1. Это могло указывать на то, что некоторые проявления мутации *ret1-27* связаны с недостатком Pmr1-зависимого снабжения секреторных органелл ионами Ca^{2+} . Поскольку мутация *pmc1-Δ* усиливала зависимость мутанта *pmr1-Δ* от внешнего Ca^{2+} и Mn^{2+} , что, в частности, выражалось и в неспособности расти на синтетической среде SD, можно было ожидать, что мутация *pmc1-Δ* также будет ингибировать рост на синтетической среде мутанта *ret1-27* и увеличит его зависимость от Ca^{2+} . Однако это предположение не подтвердилось. В частности, у мутанта *ret1-27* ген *PMC1* оказалось легко инактивировать, несмотря на то, что трансформанты селектировали на синтетической среде. К тому же чувствительность мутанта *pmc1-Δ ret1-27* к недостатку кальция в среде не отличалась от таковой у штамма, несущего только *ret1-27*, а чувствительность двойного мутанта к высокой концентрации кальция в среде была примерно такой же, как и у одинарного мутанта *pmc1-Δ* (рисунок 12). Это показывает, что зависимость от Ca^{2+} мутанта *ret1-27* не связана с недостаточной функцией Pmr1, поскольку в противном случае эта зависимость усиливалась бы при инактивации *PMC1*. Поскольку инактивация Pmc1 должна приводить к увеличению Ca^{2+} в цитозоле, можно было предполагать, что это, в свою очередь, приведет к увеличению экспрессии генов, ответственных за поддержание концентрации кальция в цитозоле на низком уровне. У *S. cerevisiae* к таким генам относится и *PMR1*. В нашем случае увеличение экспрессии гена *PMR1* могло скомпенсировать негативный эффект мутации *ret1-27* на уровень белка Pmr1 и таким образом скрыть усиление зависимости от Ca^{2+} при инактивации *PMC1*. Однако это предположение было опровергнуто, поскольку мы не обнаружили увеличения количества белка Pmr1 в клетке в ответ на делецию гена *PMC1* у мутанта *ret1-27* (данные не приведены). Напротив, количество Pmr1 падало в этом случае, но даже это заметно не усиливало зависимость от кальция, связанную с мутацией *ret1-27*.

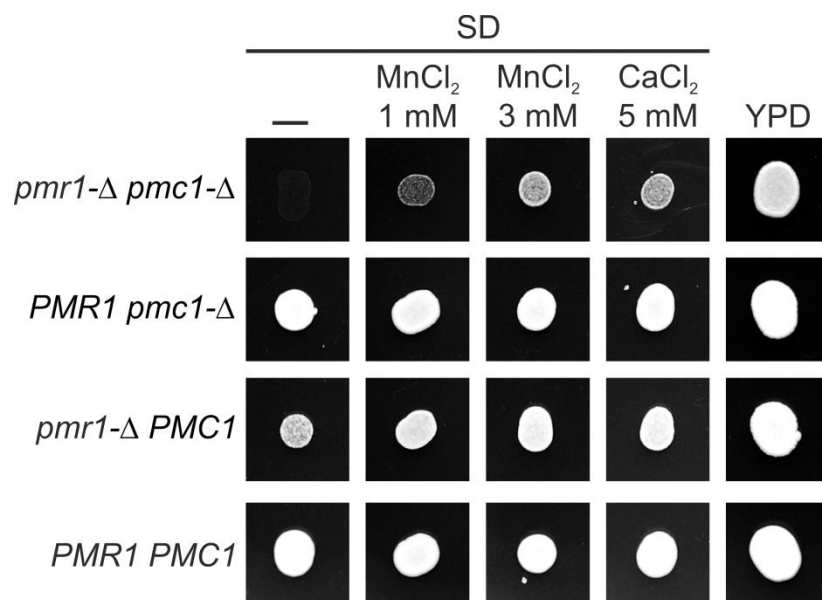


Рисунок 10. Восстановление роста двойного мутанта *pmr1-Δ pmc1-Δ* при добавлении в среду CaCl₂ и MnCl₂. "*PMR1 pmc1-Δ*", "*pmr1-Δ pmc1-Δ*", "*pmr1-Δ PMC1*" и "*PMR1 PMC1*" – отличающиеся наличием плазмид с генами *PMC1* и *PMR1* производные штамма, который несет мутации *pmr1-Δ* и *ret1-27*.

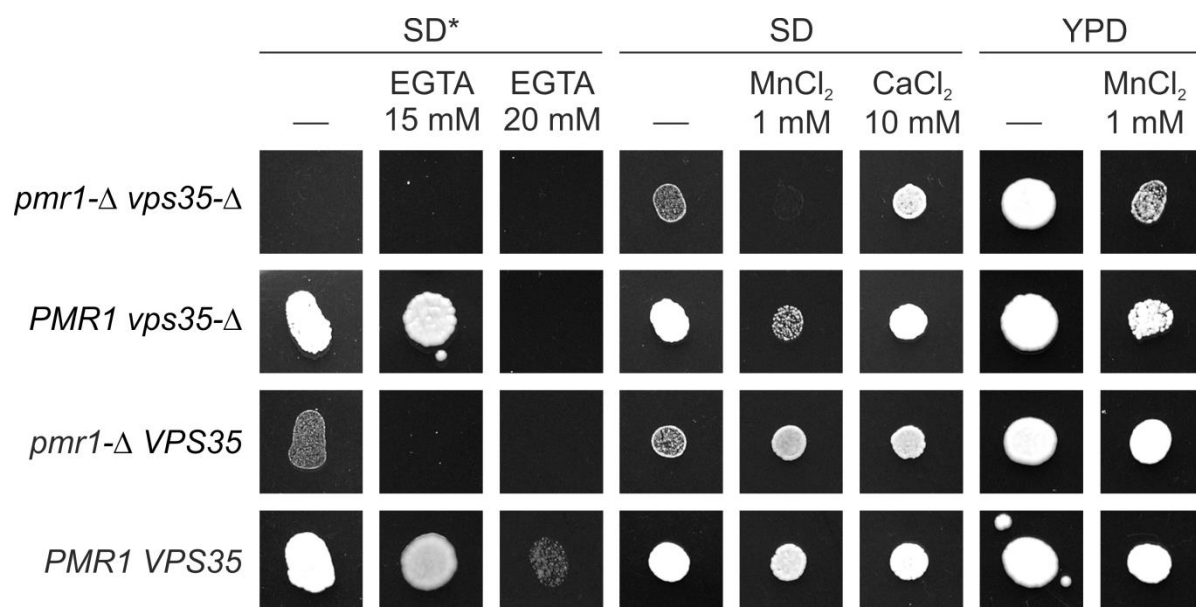


Рисунок 11. Влияние мутации *vps35-Δ* на рост штаммов, отличающихся наличием гена *PMR1* дикого типа.

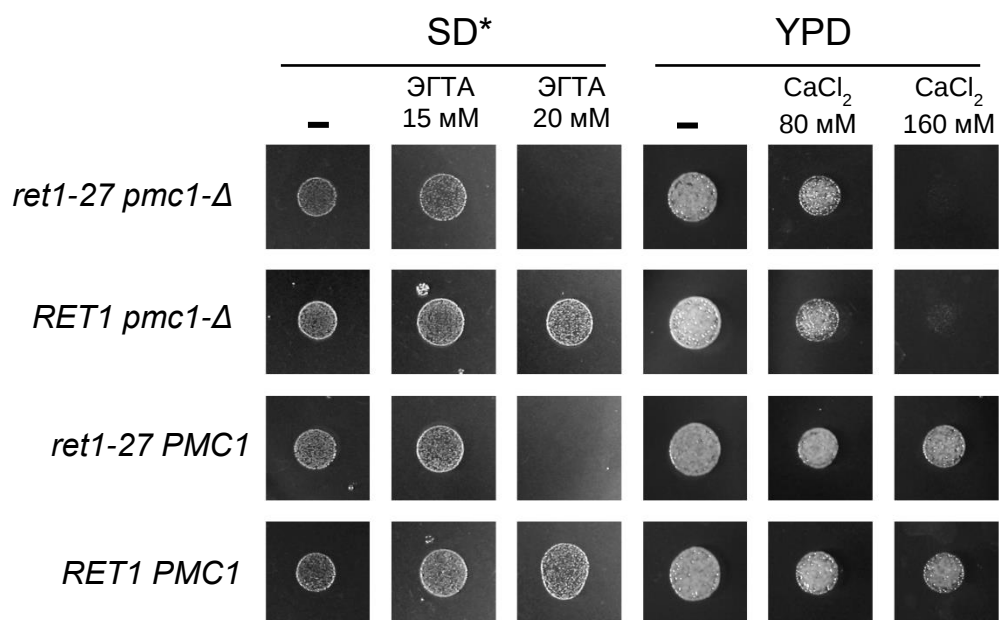


Рисунок 12. Чувствительность двойного мутанта *ret1-27 pmc1-Δ* к недостатку и избытку кальция в среде. В качестве контроля использовали мутант *ret1-27* с ненарушенным геном *PMC1* с "пустым" вектором ("*ret1-27 PMC1*") или с плазмидой, несущей ген *RET1* дикого типа ("*RET1 PMC1*"), а также двойной мутант с такой плазмидой ("*RET1 pmc1-Δ*").

Было известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* некоторые мутации компонентов субкомплекса В *COP1* влияют на транспорт между аппаратом Гольджи и вакуолью. Мы предположили, что мутация *ret1-27* также может повлиять на этот путь и привести к секреции вакуолярных белков, например, *CPY*. Однако мы не обнаружили заметного увеличения количества этого белка в культуральной среде мутанта *ret1-27*, в отличие от мутантов *vps10-Δ* и *vps35-Δ*, использованных в качестве положительного контроля (рисунок 13 а). У этих мутантов увеличение количества *CPY* в среде сопровождалось сильным снижением количества этого белка в клетках (рисунок 13 б).

Паттерн гликозилирования внеклеточного белка *CPY* зависел от мутаций *vps35-Δ*, *vps10-Δ* и *ret1-27*. В частности, при наличии аллели *RET1* дикого типа, мутант *vps10-Δ* секретирует более экстенсивно гликозилированный белок *CPY*, чем мутант *vps35-Δ*. В то же время, имея только мутантную аллель *ret1-27*, уже мутант *vps35-Δ* секретирует более экстенсивно гликозилированный белок (рисунок 13 а). В случае внутриклеточного белка размер гликозидных цепей более легкой процессированной формы, которую мы обозначили *m2CPY*, у мутанта *ret1-27* был меньше, чем у штамма дикого типа. При нарушении генов *VPS10* и *VPS35* сильно падало количество *CPY* внутри клеток, и при

этом появлялась форма m1CPY в количестве, сопоставимом с формой m2CPY. В изменении гликозилирования этих форм CPY у исследуемых мутантов наблюдались такие же тенденции, как и в случае внеклеточного белка. В чем-то сходный эффект мутаций на гликозилирование был выявлен в случае белка Gas1, локализующегося на поверхности клеток. В частности, у штаммов с одиночными мутациями *ret1-27* и *vps35-Δ* кроме форм со зрелыми гликозидными цепями, как у штамма дикого типа, присутствовали формы с более короткими гликозидами. Однако, когда штамм содержал обе эти мутации одновременно, паттерн гликозилирования не отличался от такового у штамма дикого типа. При этом мутация *vps10-Δ* заметно не влияла на гликозилирование Gas1. В отличие от CPY, только часть белка Gas1 в штаммах с одиночными мутациями *ret1-27* и *vps35-Δ* была представлена формами с незрелыми гликозидными цепями.

У мутанта *vps10-Δ*, по-видимому, изменялся только протеолитический процессинг и транспортировка в вакуоль, но не гликозилирование CPY. Мутация *ret1-27* влияла на гликозилирование CPY в штамме с мутацией *vps10-Δ* фактически так же, как и в штамме с ненарушенным вакуолярным сортированием, то есть эффекты мутаций выглядели независимыми. В случае же мутации *vps35-Δ* наблюдалось взаимодействие с мутацией *ret1-27*, поскольку, присутствуя по отдельности, они сходно снижали гликозилирование, а в двойном мутанте *vps35-Δ ret1-27* гликозилирование формы m2CPY и белка Gas1 становилось примерно таким же, как и у мутанта *vps10* и штамма дикого типа.

Как было продемонстрировано в экспериментах, описанных выше, протеолитический процессинг белка uPA значительно усиливается при нарушениях сортировки белков в вакуоль. В случае мутантов *vps10-Δ* и *vps35-Δ* в культуральной среде обнаруживалась только процессированная форма uPA 30 кДа, а у штамма дикого типа – только полноразмерная форма 48 кДа. У мутанта *ret1-27* обнаруживалось заметное количество формы 30 кДа, однако существенная часть белка все же соответствовала полноразмерной форме и, кроме того, обнаруживались две дополнительные процессированные формы, мигрирующие выше формы 30 кДа (рисунок 14).

Также нами был выявлен эффект мутации *ret1-27* на морфологию вакуоли на фоне мутации *vps35-Δ*. У *S. cerevisiae* мутация *vps35* относится к классу А нарушений транспорта в вакуоль, характеризующихся тем, что они не влияют на морфологию этой органеллы. У *O. polymorpha* это нарушение также не приводило к изменению морфологии

вакуоли (рисунок 15). Основываясь на том, что мутация *ret1-27* увеличивает протеолитический процессинг uPA, мы ожидали, что мутация влияет на транспорт между секреторными органеллами и вакуолью. Это могло сказываться на морфологии вакуоли. Сама по себе эта мутация не повлияла на морфологию вакуоли. Однако клетки двойного мутанта *ret1-27 vps35-Δ* в дополнение к вакуоли с обычной морфологией содержали компартменты меньшего размера, которые также окрашивались специфичным для вакуоли красителем (рисунок 15).

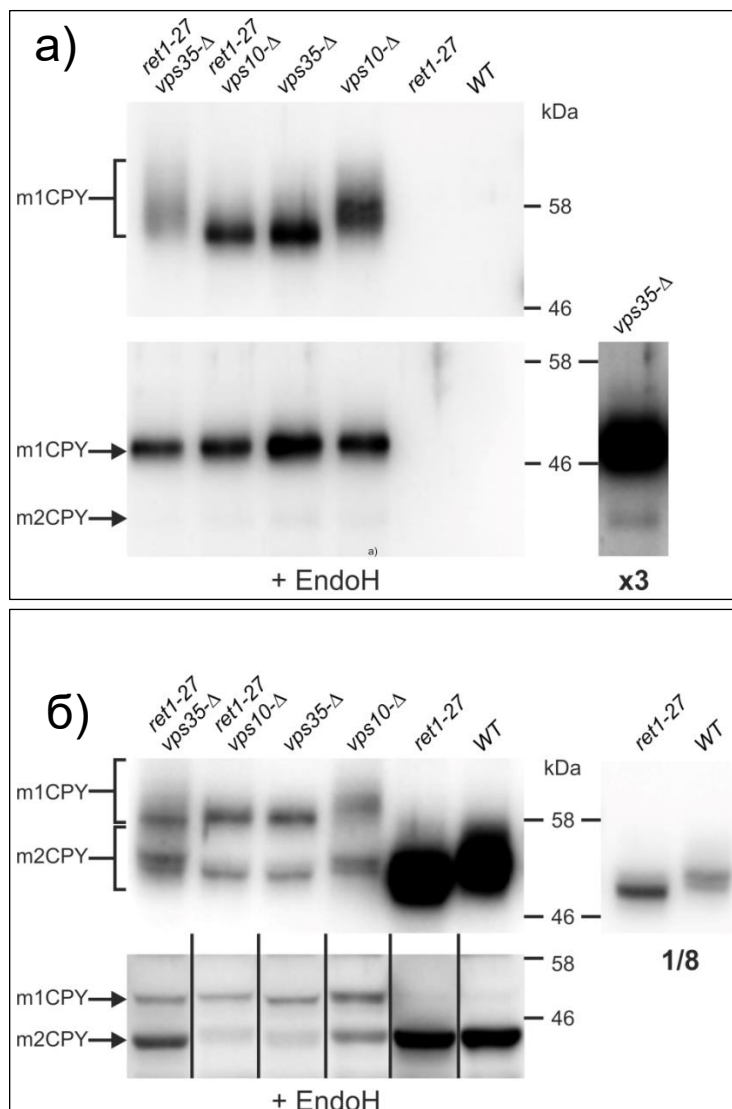


Рисунок 13. Иммуноблоттинг CPY в культуральных средах (а) и клеточных лизатах (б) штаммов, несущих мутации *ret1-27 vps35-Δ* *vps10-Δ* (в комбинации и по отдельности). "WT" – штамм с аллелями этих геном дикого типа. "+EndoH" – образцы, обработанные EndoH; "X3" – результат трехкратной экспозиции; "1/8" – в восемь раз меньшая экспозиция.

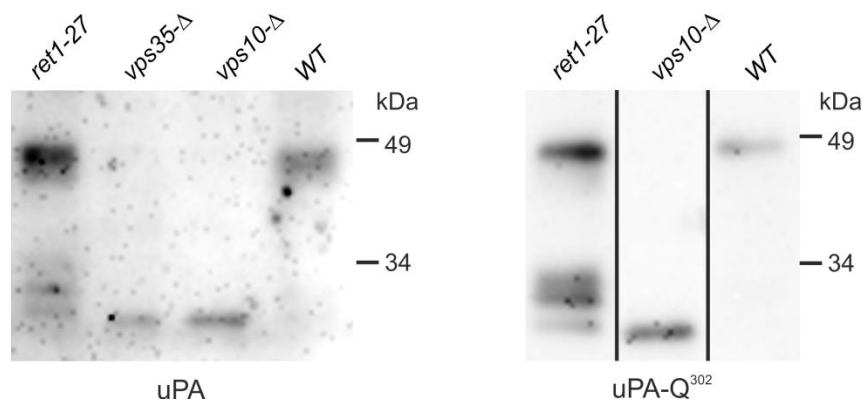


Рисунок 14. Иммуно-блоттинг белка uPA из культуральных супернатантов штаммов с мутациями *ret1-27*, *vps10-Δ*, *vps35-Δ* и штамма без этих мутаций (WT), продуцирующих uPA дикого типа и негликозилированный вариант этого белка, uPA-Q³⁰².

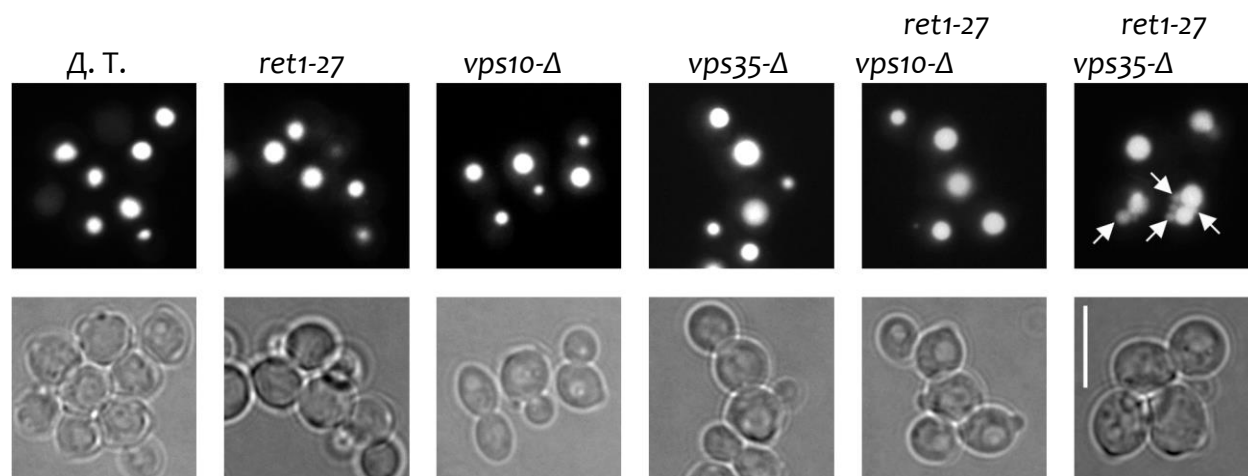


Рисунок 15. Окрашивание вакуолей красителем Cell Tracker Blue у штаммов, несущих мутации *ret1-27*, *vps35-Δ* и *vps10-Δ* по отдельности, и двойных мутантов *ret1-27 vps10-Δ* и *ret1-27 vps35-Δ*. "Д. Т." – штамм с аллелями этих генов дикого типа. Стрелки указывают на окрашивающиеся компартменты, появляющиеся в дополнение к вакуолям с обычной морфологией. Вертикальная белая полоса на нижней крайней справа панели соответствует 5 мкм.

Мутации, влияющие на устойчивость *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* к ортованадату

Известно, что *O. polymorpha* обладает аномально высокой устойчивостью к ортованадату. Чтобы определить, связано ли это свойство с гликозилированием белков в секреторном пути, мы провели поиск мутантов со сниженной устойчивостью к ванадату. Одним из мутантов с наиболее выраженным снижением устойчивости был штамм с нарушением гомолога гена *MNN4* *S. cerevisiae*. Этот ген кодирует фермент, ответственный за

присоединение маннозилфосфата к гликозидным цепям белков, что придает отрицательный заряд клеточной стенке за счет содержащихся в ней маннопротеинов. Наличие отрицательного заряда клеточной стенки выявляется по способности связывать краситель альциановый синий. Инактивация выявленного нами гена также приводила к неспособности клеток эффективно связывать этот краситель. В геноме *O. polymorpha* есть еще один гомолог *MNN4 S. cerevisiae*, обладающий даже несколько большим сходством, который уже был аннотирован в базе данных GenBank как *MNN4*. Поэтому было решено обозначить выявленный нами ген *ABV1* в соответствии с фенотипическими проявлениями (Alcian Blue staining, Vanadate resistance).

В отличие от вида *O. polymorpha*, его ближайший родственник *O. parapolyomorpha* оказался примерно таким же чувствительным к ванадату, как и *S. cerevisiae*. Чтобы определить, какие механизмы задействованы в устойчивости к ванадату, мы провели поиск генов, нарушения которых эту устойчивость увеличивают.

Чтобы иметь возможность эффективно идентифицировать мутации, увеличивающие устойчивость к ванадату и не имеющие других селектируемых проявлений, был применен другой подход, включающий использование метода случайной интеграции трансформирующей ДНК. В результате был отобран только один клон. Определение локуса интеграции показало, что был нарушен ген, кодирующий гомолог низкоаффинного переносчика фосфата плазмалеммы. Связь нарушения этого гена с устойчивостью к ванадату была подтверждена путем направленной его инактивации.

Обсуждение

Возможные механизмы увеличения эффективности секреции uPA у мутантов *ret1-27*, *opu24*, *pmt1-Δ* и *pmr1-Δ*

Поскольку наши данные показывали, что основной проблемой секреции uPA клетками дрожжей является неэффективная укладка молекул этого белка в ЭР, можно было предполагать, что мутации, увеличивающие эффективность секреции этого белка, улучшают его укладку. Действительно, у всех исследованных в работе мутантов с увеличенной продуктивностью uPA (*pmt1-Δ*, *pmr1-Δ*, *opu24* и *ret1-27*) была снижена внутриклеточная агрегация этого белка. Поскольку мутации затрагивают разные

процессы, механизмы их влияния на укладку чужеродного белка могут существенно отличаться.

Мутация *ori24*

Ген *OPU24*, в котором произошла эта мутация, кодирует маннозо-1-фосфат-гуанилтрансферазу. Этот фермент отвечает за синтез ГДФ-маннозы, являющейся донором маннозы либо непосредственно для синтеза гликозидов, присоединяемых к белкам в секреторном пути, либо для синтеза другого донора маннозы для гликозидов, долихолфосфатманнозы. Таким образом, ГДФ-манноза прямо или опосредовано используется клеткой для синтеза всех типов гликозидных цепей секреторных белков и отсутствие этого соединения летально. Поскольку у дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* есть только один ген, кодирующий этот фермент, его инактивация должна быть несовместима с жизнью так же, как и у дрожжей *S. cerevisiae*. Очевидно, что мутация *ori24* не полностью инактивирует кодируемый белок, а снижает его активность. Это приводит к подавлению синтеза ГДФ-маннозы, в результате чего возникают дефекты синтеза гликозидных цепей белков в секреторном пути. В частности, мы наблюдали снижение как N- так и O-гликозилирования модельных белков, а также плотности маннопротеинового слоя клеточной стенки. Это не позволяло связать «сверхсекреторный» фенотип с конкретным типом гликозилирования. Более того, ГДФ-манноза необходима для синтеза не только N- и O-связанных гликозидных цепей, но и GPI-якорей, нарушение которых также может приводить к «сверхсекреции» uPA. Это было продемонстрировано ранее у дрожжей *S. cerevisiae*, когда такой фенотип был обнаружен у штамма с мутацией в гене *SSU21/MSD4*.

Мутация *pmt1-1*

В отличие от *ori24*, мутация *pmt1-1* непосредственно должна влиять исключительно на O-гликозилирование. Ген *PMT1* кодирует O-маннозилтрансферазу ЭР, участвующую в присоединении первого остатка маннозы к определенным остаткам серина и треонина полипептидных цепей белков, которые транслоцируются в просвет ЭР. Этот процесс является жизненно важным для клеток дрожжей, однако ген *PMT1* можно делетировать,

поскольку другие маннозилтрансферазы ЭР, несмотря на отличающуюся специфичность, могут частично компенсировать отсутствие Pmt1.

Гипотезы о механизме действия мутации *pmt1-Δ* на эффективность секреции uPA могут исходить либо из предположения, что это действие обусловлено изменением гликозилирования самого белка uPA, либо из того, что нарушение гликозилирования других белков создает более подходящие условия для укладки uPA. Первое предположение плохо согласуется с тем, что мы не выявили отличий в электрофоретической подвижности uPA, секретированного мутантом и штаммом дикого типа. Кроме того, гликозилирование белков, как правило, способствует их секреции, а не наоборот. Второе предположение, в свою очередь, также имеет дихотомию. С одной стороны, можно рассматривать механизмы, связанные с реакцией клетки на накопление недогликозилированных белков, которые распознаются как неправильно уложенные. Это может приводить к индукции компонентов, участвующих в укладке белков в ЭР, и таким образом способствовать укладке uPA. С другой стороны, компоненты, участвующие в укладке секретлируемых белков или/и в удалении несвернутых молекул, также могут модифицироваться при участии Pmt1, а отсутствие такой модификации может сказываться на их свойствах и таким образом помогать укладке uPA.

Мутация *pmr1-Δ*

В отличие от трех других описанных в данной работе «сверхсекреторных» мутаций, которые были выявлены в результате случайного поиска, мутация *pmr1-Δ* была получена целенаправленно, поскольку были известны проявления этой мутации у *S. cerevisiae*. Помимо «сверхсекреции» чужеродных белков к этим проявлениям относится дефект гликозилирования белков в аппарате Гольджи, дефект транспорта белков из аппарата Гольджи в вакуоль и гиперчувствительность к недостатку кальция в среде. Все эти проявления мы обнаружили и у мутанта *pmr1-Δ O. polymorpha*. Увеличенная эффективность секреции чужеродных белков и отсутствие модификаций гликозидных цепей в аппарате Гольджи могли бы обусловить использование такого мутанта в прикладных целях, однако нами было обнаружено, что инактивация гена *PMR1* сильно снижает жизнеспособность клеток *O. polymorpha*. Поэтому использование такого мутанта для промышленной продукции рекомбинантных белков, скорее всего, не имеет

перспектив. С другой стороны, изучение причин увеличенной эффективности секреции рекомбинантных белков у этого мутанта может дать ключ к пониманию того, как можно модифицировать секреторную машинерию дрожжевой клетки, чтобы она обеспечивала правильную укладку таких «трудных» белков млекопитающих, как uPA.

У дрожжей АТФаза Pmr1 является основным источником Ca^{2+} и Mn^{2+} не только для аппарата Гольджи, но и для люмена ЭР. Поэтому отсутствие этой ионной помпы может сказываться на функциях как ранних, так и поздних компартментов секреторного пути. Недостаток Ca^{2+} в аппарате Гольджи сказывается на сортировке белков в вакуоль, поскольку нарушается их связывание с рецептором Vps10. Недостаток Mn^{2+} приводит к дефектам гликозилирования, поскольку эти катионы необходимы для работы маннозилтрансфераз этого компартмента. В люмене ЭР Ca^{2+} участвует в связывании шаперонов и шапероноподобных белков с молекулами транслоцирующихся белков для обеспечения их укладки или направления на деградацию. Катионы Mn^{2+} , по-видимому, также принимают участие в каких-то жизненно важных процессах в ЭР, которые связаны с секрецией. Полученные данные пока не позволяют однозначно выявить, с каким из этих процессов связано влияние нарушения Pmr1 на укладку рекомбинантного белка.

Мутация *ret1-27*

Мутация *ret1-27* нарушает С-концевой домен α -субъединицы комплекса COPI (α -COP), окаймляющего везикулы, которые обеспечивают транспорт белков и липидов из поздних компартментов секреторного пути в ранние.

Два фенотипических проявления *ret1-27*, увеличенная эффективность секреции uPA и повышенная чувствительность к недостатку Ca^{2+} в среде, были сходны с проявлениями мутации и *pmr-1*. При этом количество белка Pmr1 в клетках мутанта *ret1-27* было заметно снижено. Это позволяло предполагать, что и «сверхсекреция», и чувствительность к недостатку кальция у мутанта *ret1-27* определяются недостаточной функцией Pmr1. Однако эксперименты по изучению взаимодействия *ret1-27* и *pmr1-1* с нарушением вакуолярной кальциевой ионной помпой Pmc1 показали, что снижение количества Pmr1 у мутанта *ret1-27* несущественно сказывается на гомеостазе кальция в секреторных органеллах, а чувствительность мутанта к недостатку кальция в среде, по-видимому, обусловлена дефектом альтернативного пути доставки кальция в секреторные

органеллы. Поэтому и «сверхсекреторный» фенотип в данном случае вряд ли связан с недостаточной функцией Pmr1 и, возможно, не обусловлен нарушением кальциевого гомеостаза.

Мы обнаружили, что существенная часть uPA, секретированного мутантом *ret1-27*, представлена абберрантными формами, что свидетельствовало о дефекте задержки неправильно уложенных белков в ЭР. Это позволяет предположить, что в данном случае «сверхсекреторный» фенотип определяется, с одной стороны, прибавкой в виде этих абберрантных форм, которые в норме элиминируются, а с другой – улучшением условий укладки в ЭР за счет того, что неправильно свернутые молекулы в меньшей степени скапливаются в ЭР и не мешают укладке вновь синтезируемым.

На начальном этапе «сверхсекреторный» фенотип этого, как и других мутантов, выявляли по увеличенной зоне лизиса на твердой среде, содержащей фибрин. Нами было обнаружено, что штаммы с нарушениями вакуолярного сортирования белков в секреторном пути также образуют увеличенные зоны лизиса на среде с фибрином, но не из-за увеличения секреции uPA, а из-за усиления протеолитической активации этого белка. У мутанта *ret1-27* мы также выявили некоторое увеличение количества процессированной формы uPA. Поэтому очевидно, что увеличение зоны лизиса на среде с фибрином было обусловлено не только увеличением секреции, но и увеличением протеолитической активации uPA.

Роль гомеостаза кальция в чувствительности клеток к SDS

Известно, что многие нелетальные нарушения гликозилирования белков в секреторном пути дрожжей приводят к увеличению чувствительности к детергентам. Этот фенотип обычно объясняют в терминах ослабления клеточной стенки или увеличения ее пористости. Среди мутантов *O. parapolymorpha*, отселектированных по устойчивости к ванадату, мы также выявили штаммы со сниженной устойчивостью к детергенту и нарушением гликозилирования (данные не приведены). Однако, когда мы сразу провели поиск мутантов по увеличению чувствительности к SDS, среди штаммов с наиболее выраженным фенотипом были мутанты с нарушенным геном *PMC1*.

Вакуолярная кальциевая ионная помпа Pmc1 вовлечена в концентрировании клеточного кальция в вакуоли. Нарушение этого процесса у *S. cerevisiae* в результате инактивации

гена *PMC1* приводит к чувствительности к повышенной концентрации кальция в культуральной среде. Такой же фенотип мы обнаружили у мутанта *pmc1-Δ* *O. polymorpha*. Однако, в отличие от *S. cerevisiae*, инактивация *PMC1* у *O. polymorpha* приводила к гиперчувствительности к SDS – мутантный штамм не мог расти уже при концентрации SDS в среде 0,004%, в то время как штамму дикого типа для остановки роста требовалось более 0,008%. При этом у мутанта не выявлялись изменения ни морфологии, ни биохимических свойств клеточной стенки. Более того, концентрации SDS в среде, используемые для определения чувствительности, были в десятки раз ниже критической концентрации мицеллообразования этого детергента, что тоже противоречило идее об индукции лизиса клеток, как механизме токсичности.

Чтобы найти ключ к пониманию механизма токсичности SDS для мутанта *pmc1-Δ*, мы провели поиск мутаций, супрессирующих это проявление. В результате было выявлено три гена, *CCH1*, *WEE1* и *HOG1*, инактивация которых снижала чувствительность мутанта *pmc1-Δ* к SDS. Ген *CCH1* кодирует субъединицу высокоаффинного кальциевого канала плазмалеммы, вовлеченного в поглощение клеткой кальция из внешней среды. Поэтому можно предполагать, что супрессия чувствительности к SDS мутанта *pmc1-Δ* при нарушении *CCH1* определяется снижением проникновения кальция в клетку, а сама эта чувствительность связана с повышенной концентрацией кальция в цитозоле.

Ген *HOG1* кодирует MAP киназу Hog1, являющуюся ключевым компонентом сигнального пути HOG, который важен для выживания клетки при попадании в гиперосмотические условия. Важным обстоятельством для понимания механизма супрессии чувствительности к SDS является то, что протеинкиназа Hog1 вовлечена в регуляцию клеточного цикла, что осуществляется при участии протеинкиназы Wee1, ингибирующей Cdc28. Комплекс белков Hsl1 и Hsl7 способствует деградации Wee1, что приводит к активации комплекса Cdc28/Clb, запускающего переход клеточного цикла от фазы G₂ к М. Фосфорилирование Hsl1 протеинкиназой Hog1 защищает Wee1 от деградации, что приводит к накоплению этого белка и ингибированию перехода G₂-М (Clotet et al., 2006). Это заставляет предположить, что у *O. polymorpha* чувствительность мутанта *pmc1-Δ* к SDS связана с задержкой клеточного цикла в фазе G₂ по причине накопления Wee1. Действительно, инактивация *PMC1* в клетках, экспрессирующих химерный ген *WEE1-lacZ*, приводила к изменению морфологии клеток подобно тому, как это происходит у *S. cerevisiae* при

аресте клеточного цикла в фазе G₂. В частности, такой эффект наблюдался ранее, когда Swe1 (Wee1) был сверхпродуцирован в клетках *S. cerevisiae* под контролем промотора *GAL1*. Важно отметить, что химерный ген *WEE1-lacZ* кодировал белок содержащий только N-концевые регуляторные домены Wee1, слитые с β -галактозидазой *E. coli*. То есть белок не содержал C-концевого каталитического домена Wee1 и не мог сам по себе ингибировать Cdc28. Мы предполагаем, что этот химерный белок конкурирует с белком Wee1 дикого типа за дестабилизирующее взаимодействие с комплексом Hsl1-Hsl7, что приводит к стабилизации Wee1 и ингибированию перехода клеточного цикла от G₂ к M. В соответствии с этой моделью, увеличение концентрации кальция в цитозоле в результате инактивации гена *PMC1* индуцирует фосфорилирование Hsl1 протеинкиназой Hog1, что, в свою очередь, приводит к стабилизации Wee1, усиливающейся в присутствии химерного белка Wee1-lacZ. Хотя продукция химерного белка обеспечивалась относительно слабым промотором гена *WEE1*, эффект химерного гена был очень выраженным. Чтобы это объяснить, можно предположить, что концентрация химерного белка в месте взаимодействия с комплексом Hsl1-Hsl7 может быть выше, чем концентрация белка дикого типа, поскольку последний транспортируется в ядро, а также подвержен деградации, в то время как химерный белок может этого избегать.

Интересно, что инактивация *WEE1* сама по себе вызывала увеличение чувствительности к SDS и немного усиливала чувствительность к SDS у мутанта *pmc1-Δ*. Супрессия этого фенотипа при отсутствии аллели *WEE1* дикого типа наблюдалась только в штамме, полученном в результате интеграции фрагмента трансформирующей ДНК в структурную часть этого гена. Эта интеграция сопровождалась хромосомной перестройкой, которая повлияла на экспрессию каких-то генов, участвующих в проявлении негативного эффекта инактивации *WEE1* на устойчивость к SDS. Для иллюстрации этого мы предложили гипотезу, в соответствии с которой процесс, приводящий к увеличению чувствительности к SDS при повышении концентрации кальция в цитозоле, может стимулироваться как протеинкиназой Wee1, так и гипотетическим компонентом X, который негативно регулируется Wee1. Инактивация либо Wee1, либо X по отдельности не может ослабить чувствительность к SDS. Мы наблюдали, что делеция *WEE1* усиливала чувствительность к SDS и у мутанта *pmc1-Δ*, и в штамме с геном *PMC1* дикого типа. В соответствии с предложенной моделью это может быть результатом активации компонента X.

Инактивация Hog1 может ослаблять прямой эффект Wee1 при сохранении ингибирования компонента X, что в некоторой степени имитирует отсутствие и Wee1, и X. Возможно, поиск мутаций, супрессирующих чувствительность к SDS у двойного мутанта *pmc1-Δ wee1-Δ O. polymorpha*, позволил бы проверить выдвинутую гипотезу и выявить этот гипотетический компонент.

Роль вакуоли в доставке кальция в ЭР

И Ca^{2+} , и Mn^{2+} требуются для ряда процессов, происходящих в секреторном пути. Хотя доставка этих катионов в секреторные органеллы осуществляется одной и той же ионной помпой, АТФазой средних компартментов аппарата Гольджи Pmr1, в большинстве случаев их функции не перекрываются. Например, от ионов Ca^{2+} зависит процесс укладки белков в ЭР и связывание белков с рецептором вакуолярного сортирования Vps10 в аппарате Гольджи, а функционирование маннозилтрансфераз аппарата Гольджи зависит от Mn^{2+} . В то же время есть работа, в которой было показано, что Mn^{2+} может функционально заменять Ca^{2+} и поддерживать жизнь клетки при недостатке последнего, хотя жизненно важный процесс, нарушающийся при недостатке и Ca^{2+} и Mn^{2+} , остается невыясненным. Увеличение концентрации Mn^{2+} в цитозоле токсично для клеток *S. cerevisiae*. На основании полученных нами данных то же самое можно утверждать и в случае *O. polymorpha*, поскольку мутант *pmr1-Δ* гиперчувствителен к увеличению концентрации Mn^{2+} в культуральной среде. Несмотря на это, добавление в среду соли Mn^{2+} в субтоксической концентрации даже улучшало рост мутанта *pmr1-Δ* так же, как и при добавлении соли Ca^{2+} . Это указывает на то, что процесс, в котором Ca^{2+} и Mn^{2+} взаимозаменяемы, локализуется в секреторном пути. Действительно, инактивация помпы Pmr1, снабжающей секреторные органеллы Ca^{2+} и Mn^{2+} , сильно снижает жизнеспособность клеток, а увеличение в среде концентрации любого из этих катионов одинаково компенсирует отсутствие Pmr1.

Мутация *ret1-27* приводит к удалению С-концевого домена белка $\alpha\text{-COP}$, который является жизненно важным компонентом комплекса COP_I, обеспечивающего транспорт белков и липидов между секреторными органеллами. Некоторые проявления этой мутации сходны с проявлениями мутации *pmr1-Δ*. В частности, и та, и другая мутация вызывает чувствительность к недостатку кальция в среде и приводит к увеличению

эффективности секреции uPA. При этом у мутанта *ret1-27* было снижено количество белка Pmr1. Однако нами было обнаружено, что эти две мутации синтетически летальны. Эта летальность, очевидно, связана с недостатком Ca^{2+} и Mn^{2+} в секреторных органеллах, поскольку компенсируется увеличением концентрации этих катионов в среде. То есть мутация *ret1-27* усиливает зависимость мутанта *pmr1-Δ* от Ca^{2+} и Mn^{2+} . Этого не могло бы быть, если бы зависимость от Ca^{2+} , вызываемая мутацией *ret1-27*, определялась бы исключительно снижением Pmr1. Это также подтверждается тем, что при инактивации гена *PMC1* у мутанта *ret1-27* дополнительно снижается количество Pmr1, а чувствительность к недостатку Ca^{2+} не меняется. То есть снижение количества Pmr1 у мутанта *ret1-27* не является существенным с точки зрения обеспечения секреторных органелл Ca^{2+} . Это означает, что мутация *ret1-27* затрагивает Pmr1-независимый путь снабжения секреторных органелл ионами Ca^{2+} . Нарушение и того, и другого пути приводит к синтетической летальности.

У *S. cerevisiae* одновременное нарушение кальциевых АТФаз вакуоли и аппарата Гольджи летально по причине увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Однако оказалось, что двойной мутант *pmc1-Δ pmr1-Δ O. polymorpha* способен расти на среде YPD, а его способность расти на синтетической среде SC можно восстановить, увеличив концентрацию Ca^{2+} или Mn^{2+} в среде. Это значит, что нарушение Pmc1 усиливает проявления нарушения Pmr1, а не наоборот, как у *S. cerevisiae*. Этот эффект мутации *pmc1-Δ* на проявления мутации *pmr1-Δ* указывает на роль вакуоли в снабжении секреторных органелл Ca^{2+} и согласуется с идеей о том, что чувствительность мутанта *ret1-27* к недостатку кальция определяется нарушением независимого от Pmr1 пути доставки Ca^{2+} в секреторные органеллы. Отсутствие эффекта инактивации *PMC1* на проявления мутации *ret1-27* поддерживает это заключение, поскольку мутация *ret1-27* должна блокировать этот путь уже после этапа, на котором действует Pmc1, т. е. на этапах транспорта от вакуоли к секреторным органеллам. На возможную вовлеченность COP1-зависимого транспорта в доставку Ca^{2+} из вакуоли в секреторные органеллы указывают и имеющиеся в литературе данные об участии субкомплекса В COP1 в транспорте белков между вакуолью и секреторными органеллами у дрожжей *S. cerevisiae*. Мутации в субъединицах α , β' и ϵ этого комплекса вызывали дефекты вакуолярного сортирования и изменения морфологии вакуоли. В случае α -субъединицы только мутации, вызывающие

нарушения N-концевого домена этого белка, приводили к такому эффекту. Однако изученная нами мутация *ret1-27 O. polymorpha* приводит к потере C-концевого домена α -COP. Несмотря на это, мы выявили эффекты этой мутации на (I) процессинг uPA, сходный с обнаруженным у мутантов с нарушенным вакуолярным сортированием, (II) гликозилирование вакуолярного белка CPY и (III) морфологию вакуоли на фоне мутации *vps35-Δ*.

Существуют экспериментальные данные, полученные на *S. cerevisiae*, показывающие, что компоненты комплекса COP I, включая α -COP, вовлечены в транспорт из эндосом. Мы предполагаем, что с этим связан эффект мутации *ret1-27* на гомеостаз Ca^{2+} . Катионы Ca^{2+} могут попадать в эндосомы из окружающей среды или из вакуоли, а затем транспортироваться в секреторные органеллы при участии субкомплекса В COP I.

Заключение

Для изучения механизмов, влияющих на секрецию рекомбинантных белков, в качестве модельного организма мы использовали два близкородственных вида метилотрофных дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha*. Первый из них позволял использовать в работе методы классической генетики, в частности, изучение наследования получаемых мутаций и объединение мутаций в одном штамме путем скрещивания. У второго вида, *O. parapolyomorpha*, частота интеграции трансформирующей ДНК в результате гомологичной рекомбинации в несколько раз выше, чем у *O. polymorpha*, что существенно облегчало функциональный анализ исследуемых генов. Однако штамм *O. parapolyomorpha* DL-1, использованный в работе, неспособен скрещиваться. Поэтому использование этих двух видов дрожжей одновременно существенно облегчило решение ряда задач, поставленных в работе.

Одной из причин, по которым эти виды были выбраны в качестве модельных организмов, было то, что они активно используются для промышленного получения рекомбинантных белков. В настоящей работе были получены и охарактеризованы мутации, увеличивающие секрецию белка за счет улучшения его укладки в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Результаты анализа проявлений этих мутаций позволили оценить их потенциал для получения рекомбинантных белков. Нарушение C-концевого домена α -COP и инактивация $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи *Pmr1* вряд ли подойдут для

применения в промышленных штаммах, поскольку первая мутация приводит к секреции неправильно уложенных молекул белка и к нежелательному протеолизу продукта, а вторая сильно снижает жизнеспособность штамма. Но две другие мутации, охарактеризованные в данной работе, имеют существенный потенциал для прикладного использования, поскольку не оказывают критического влияния на жизнеспособность клеток и не оказывают негативного влияния на качество целевого белка. В частности, нарушение О-маннозилтрансферазы ЭР Pmt1, катализирующей присоединение к растворимым белкам первого маннозного остатка О-гликозидных цепей, не только увеличивает эффективность секреции модельного белка, но и снижает интенсивность О-маннозилирования секретируемых белков, что может в некоторых случаях предотвратить нежелательное гликозилирование целевого белка. Другая полученная нами мутация, которая может быть применена для создания промышленных штаммов-продуцентов, это дефект маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазы. Этот фермент катализирует образование донора маннозы, который в клетках дрожжей прямо или опосредовано используется для синтеза всех гликозидных цепей, присоединяемых к белкам в секреторном пути и на этапе ЭР, и на этапе аппарата Гольджи. Поэтому мутант со сниженной функцией этого фермента не только лучше секретирует неэффективно сворачивающийся белок, но и позволяет получать целевой продукт с меньшим размером гликозидных цепей. Таким образом, предлагаемая модельная система дает возможность находить пути для направленной генетической модификации штаммов дрожжей с целью улучшения продукции рекомбинантных секретируемых белков.

Ряд важнейших процессов, происходящих в секреторном пути эукариот, зависит от катионов кальция. У дрожжей эти катионы накапливаются в аппарате Гольджи за счет $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы Pmg1 и в вакуоли за счет вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы Pmc1. Было известно, что ЭР дрожжей получает эти катионы из аппарата Гольджи. Изучение мутаций, влияющих на гомеостаз кальция у дрожжей *O. polymorpha*, позволило нам выявить наличие пути доставки Ca^{2+} в секреторные органеллы из источника, независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. Доставка Ca^{2+} по этому пути осуществляется везикулярным транспортом при участии компонентов комплекса COP1, включая α -COP. Таким образом, мы постулируем существование ранее не описанного пути доставки Ca^{2+} в ЭР из источника, независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи.

Выводы

1. Низкая эффективность секреции активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) человека клетками дрожжей *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha* связана с дефектом укладки этого белка в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР).
2. К увеличению эффективности укладки uPA приводят следующие мутации: нарушение синтеза ГДФ-маннозы, делеция С-концевого домена α -субъединицы окаймляющего комплекса COPI, дефект О-гликозилирования растворимых белков в ЭР и инактивация $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи.
3. Мутации в гене, кодирующем О-маннозилтрансферазу ЭР Pmt1, и в гене, кодирующем маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазу, могут быть использованы при создании промышленных продуцентов секретируемых рекомбинантных белков.
4. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле при инактивации вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы стимулирует зависимую от протеинкиназ Hog1 и Wee1 остановку перехода клеточного цикла от фазы G_2 к митозу.
5. Фосфоманнозилирование гликозидных цепей белков в секреторном пути обеспечивает высокую резистентность *O. polymorpha* к ортованадату. Идентифицирован ген *ABV1*, кодирующий фермент, который катализирует фосфоманнозилирование гликозидных цепей.
6. Снижение жизнеспособности клеток *O. polymorpha* при одновременной инактивации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи и вакуолярной Ca^{2+} -АТФазы связано с недостатком Ca^{2+} и Mn^{2+} в секреторных органеллах. Это означает, что вакуоль является одним из источников Ca^{2+} для секреторных органелл.
7. В клетках дрожжей существует путь доставки Ca^{2+} в секреторные органеллы из источника, независимого от $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. В этом пути задействован везикулярный транспорт, осуществляемый при участии компонентов окаймляющего комплекса COPI. Нарушение С-концевого домена α -субъединицы COPI блокирует этот путь.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в Web of Science или Scopus

1. **Agaphonov MO**, Trushkina PM, Sohn JH, Choi ES, Rhee SK, Ter-Avanesyan MD. 1999. Vectors for rapid selection of integrants with different plasmid copy numbers in the yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *Yeast* **15**:541-51.
2. Sohn JH, Choi ES, Kang HA, Rhee JS, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan MD, Rhee SK. 1999. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**:800-807.
3. Богданова А.И., **Агафонов М.О.**, Тер-Аванесян М.Д. 2000. Нестабильность плазмид у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*: захваты фрагментов хромосомной ДНК интегративными плазмидами. *Молекулярная Биология* **34**:28-35
4. Богданова А.И., **Агафонов М.О.**, Тер-Аванесян М.Д. 2000. Нестабильность плазмид у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*: захваты фрагментов хромосомной ДНК репликативными плазмидами. *Молекулярная Биология* **34**:36-40
5. **Agaphonov MO**, Packeiser AN, Chechenova MB, Choi ES, Ter-Avanesyan MD. 2001. Mutation of the homologue of GDP-mannose pyrophosphorylase alters cell wall structure, protein glycosylation and secretion in *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* **18**:391-402.
6. Kim MW, **Agaphonov MO**, Kim JY, Rhee SK, Kang HA. 2002. Sequencing and functional analysis of the *Hansenula polymorpha* genomic fragment containing the YPT1 and PMI40 genes. *Yeast* **19**:863-871.
7. **Agaphonov MO**, Romanova NV, Trushkina PM, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. 2002. Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. *BMC Mol Biol.* **3**:15.
8. **Агафонов М.О.**, Деев А.В., Kim S.-Y., Sohn J.-H., Choi E.-S., Тер-Аванесян М.Д. 2003. Новый подход к клонированию и функциональному анализу геномной ДНК метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. *Молекулярная Биология* **37**:81-87

9. Kim SY, Sohn JH, Bae JH, Pyun YR, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan MD, Choi ES. 2003. Efficient library construction by in vivo recombination with a telomere-originated autonomously replicating sequence of *Hansenula polymorpha*. *Appl Environ Microbiol.* **69**:4448-4454.
10. Chechenova MB, Romanova NV, Deev AV, Packeiser AN, Smirnov VN, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan MD. 2004. C-terminal truncation of alpha-COP affects functioning of secretory organelles and calcium homeostasis in *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot Cell* 3:52-60.
11. **Agaphonov M**, Romanova N, Sokolov S, Iline A, Kalebina T, Gellissen G, Ter-Avanesyan M. 2005. Defect of vacuolar protein sorting stimulates proteolytic processing of human urokinase-type plasminogen activator in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* 5:1029-1035. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.07.003.
12. **Agaphonov MO**, Sokolov SS, Romanova NV, Sohn JH, Kim SY, Kalebina TS, Choi ES, Ter-Avanesyan MD. 2005. Mutation of the protein-O-mannosyltransferase enhances secretion of the human urokinase-type plasminogen activator in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **22**:1037-1047.
13. **Agaphonov MO**, Plotnikova TA, Fokina AV, Romanova NV, Packeiser AN, Kang HA, Ter-Avanesyan MD. 2007. Inactivation of the *Hansenula polymorpha* *PMR1* gene affects cell viability and functioning of the secretory pathway. *FEMS Yeast Res.* **7**:1145-52.
14. **Agaphonov M**, Romanova N, Choi ES, Ter-Avanesyan M. 2010. A novel kanamycin/G418 resistance marker for direct selection of transformants in *Escherichia coli* and different yeast species. *Yeast* **27**:189-95.
15. Fokina AV, Sokolov SS, Kang HA, Kalebina TS, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2012. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G₂ cell cycle delay in *Hansenula polymorpha*. *Cell Cycle.* 11:778-784.
16. Kim H, Moon HY, Lee DJ, Cheon SA, Yoo SJ, Park JN, **Agaphonov MO**, Oh DB, Kwon O, Kang HA. 2013. Functional and molecular characterization of novel *Hansenula polymorpha* genes, HpPMT5 and HpPMT6, encoding protein O-mannosyltransferases. *Fungal Genet Biol.* **58-59**:10-24.
17. **Agaphonov M**, Alexandrov A. 2014. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene. *FEMS Yeast Res.* 14:1048-1054.

18. Kim H, Thak EJ, Lee DJ, **Agaphonov MO**, Kang HA. 2015. Hansenula polymorpha Pmt4p Plays Critical Roles in O-Mannosylation of Surface Membrane Proteins and Participates in Heteromeric Complex Formation. *PLoS One*. **10**:e0129914.
19. Moon HY, Cheon SA, Kim H, **Agaphonov MO**, Kwon O, Oh DB, Kim JY, Kang HA. 2015. *Hansenula polymorpha* Hac1p Is Critical to Protein N-Glycosylation Activity Modulation, as Revealed by Functional and Transcriptomic Analyses. *Appl Environ Microbiol*. **81**:6982-6993.
20. Fokina AV, Chechenova MB, Karginov AV, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2015. Genetic Evidence for the Role of the Vacuole in Supplying Secretory Organelles with Ca²⁺ in *Hansenula polymorpha*. *PLoS One*. 10:e0145915.
21. Karginov A, **Agaphonov M**. 2016 A simple enrichment procedure improves detection of membrane proteins by immunoblotting. *Biotechniques*. 61:260-261.
22. **Agaphonov MO**. 2017 Improvement of a yeast self-excising integrative vector by prevention of expression leakage of the intronated Cre recombinase gene during plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 364(22):10.1093/femsle/fnx222.
23. Karginov AV, Fokina AV, Kang HA, Kalebina TS, Sabirzyanova TA, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2018. Dissection of differential vanadate sensitivity in two *Ogataea* species links protein glycosylation and phosphate transport regulation. *Sci Rep*. **8**:16428.
24. Alexandrov AI, Grosfeld EV, Dergalev AA, Kushnirov VV, Chuprov-Netochin RN, Tyurin-Kuzmin PN, Kireev II, Ter-Avanesyan MD, Leonov SV, **Agaphonov MO**. 2019. Analysis of novel hyperosmotic shock response suggests 'beads in liquid' cytosol structure. *Biol Open*. 8:bio044529.

Глава в книге.

Kang HA, Sohn JH, **Agaphonov MO**, Choi ES, Ter-Avanesyan MD, Ree SK. Development expression system for the production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* DL-1. In: Gellissen G. (ed.) *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.

Избранные тезисы докладов на научных конференциях.

1. III съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". 6-12 июня 2004, Москва. Чеченова МБ, Романова НВ, **Агафонов МО**. Механизмы, обуславливающие "сверхсекреторный" фенотип у мутантов дрожжей. Сборник тезисов, т.1., стр. 346
2. 2nd *Hansenula polymorpha* worldwide network conference. 26-29 September , 2002, University La Laguna, Tenerife, Canary Islands. **Agaphonov MO**, Romanova NV, Chechenova MB, Ter-Avanesyan MD. Heterologous protein secretion as a model for study of eukaryotic secretory pathway. Abstract book. p. 17.
3. III съезд Российского Биохимического общества. 26 июня -1 июля 2002, Санкт-Петербург, Россия. Чеченова МБ, Романова Н.В., **Агафонов МО**. Урокиназа человека как модель для изучения механизмов секреции у дрожжей. Тезисы докладов, стр 124.
4. 21st International specialized symposium on yeasts: "Biochemistry, genetics, biotechnology and ecology of non-conventional yeasts". 21-25 August, 2001, Lviv, Ukraine. **Agaphonov MO.**, Romanova NV, Chechenova MB and Ter-Avanesyan MD. Secretion of the human urokinase by yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula polymorpha*. Book of Abstracts, p. 109.
5. Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и V Съезда ВОГиС. 21-28 июня 2009. **Агафонов М.О.**, Ильина А.В., Фокина А.В. Контроль укладки белков в секреторном пути *Hansenula polymorpha*. Тезисы. с. 59.
6. 12th International Congress on Yeasts. August 11-15 2008. **Agaphonov M.**, Fokina A., Chechenova M., Ter-Avanesyan M. Interrelationship between functioning of secretory organelles and Ca²⁺ homeostasis in *Hansenula polymorpha*. Abstract Book.
7. 4th *Hansenula polymorpha* worldwide network conference. 3-5 September 2006. **Agaphonov M.O.**, Chechenova M.B., Plotnikova T.A., Fokina A.V. Ter-Avanesyan M.D. Genetic analysis of Ca²⁺ trafficking in the secretory pathway of *Hansenula polymorpha*. Abstract Book.
8. 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB). August 27 – September 1, 2017. Agaphonov M, Karginov A, Fokina A, Ter-Avanesyan M. Resistance of *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* to Orthovanadate: the Roles of the Phosphate Transport Control and of Mannoprotein Phosphomannosylation. Abstract book.

9. International conference "Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application". May 15-18, 2018. Karginov A, Ter-Avanesyan M, **Agaphonov M.** Role of protein glycosylation in the regulation of phosphate uptake in *Ogataea polymorpha* and *O. parapolymorpha*. Program and abstract book.