

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

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

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

МОСКВА 2021

Оглавление

Список сокращений и генетическая номенклатура.....	8
1. Введение	12
1.1. Актуальность исследования	12
1.2. Цели и задачи	17
1.3. Научная новизна исследования	17
1.4. Теоретическая и практическая значимость	18
1.5. Личный вклад.....	18
1.6. Аprobация работы.....	19
1.7. Публикации	19
1.8. Основные положения, выносимые на защиту	19
1.9. Структура и объем диссертации	20
2. Обзор литературы.....	21
2.1. Движение белков и липидов в секреторном пути	21
2.1.1. Транслокация белков в просвет эндоплазматического ретикулума	21
2.1.1.1. Структура канала транслокации.....	22
2.1.1.2. Ко- и посттрансляционная транслокация.....	22
2.1.2. Везикулярный транспорт между компартментами секреторного пути..	24
2.1.2.1. Комплекс COPII	25
2.1.2.2. Комплекс COPI	26
2.1.2.3. Клатриновые везикулы	28
2.1.2.4. Слияние везикул	28
2.1.3. Динамическая организация аппарата Гольджи	29
2.1.3.1. Модель стабильных компартментов	29
2.1.3.2. Модель продвижения/созревания цистерн.....	30

2.1.3.3.	Модель продвижения/созревания цистерн, гетеротипически соединенных трубочками.....	31
2.1.3.4.	Модель быстрого разделения в двухфазной мембранной системе.....	31
2.1.3.5.	Модели соединяющихся стабильных компартментов.	32
2.1.3.6.	Насколько разные модели противоречат друг другу?	32
2.2.	Гликозилирование белков в секреторном пути	39
2.2.1.	N-гликозилирование.	39
2.2.1.1.	Модификация N-гликозидных цепей в аппарате Гольджи высших эукариот. 40	
2.2.1.2.	Модификация N-гликозидных цепей в аппарате Гольджи дрожжей.....	41
2.2.2.	O-гликозилирование.	48
2.2.3.	Гликоинженерия дрожжей.	52
2.2.3.1.	Получение комплексного типа N-гликозилирования у дрожжей.	52
2.2.3.2.	Получение у дрожжей N-гликозилирования с меткой маннозо-6-фосфата. 55	
2.2.3.3.	Инженерия O-гликозилирования у дрожжей.	56
2.3.	Укладка белков в ЭР	57
2.3.1.	Роль N-связанных гликозидных цепей в контроле укладки белков в ЭР. 58	
2.3.2.	Роль O-гликозилирования в контроле укладки белков в ЭР.	64
2.3.3.	Элиминация несвернутых белков в ЭР.	65
2.3.4.	Ответ клетки на накопление несвернутых белков в ЭР.	67
2.4.	Сортировка белков в поздних компартментах аппарата Гольджи	70
2.4.1.	Адаптерные белки.....	70
2.4.2.	Рецепторы белков карго в TGN.	72
2.4.2.1.	Рецепторы MPR	73
2.4.2.2.	Рецепторы семейства Vps10.....	74

2.4.2.3.	Рецептор LIMP-2	75
2.4.2.4.	Белок Wntless.....	75
2.4.3.	Кальций- и цитоскелет-зависимая сортировка белков в TGN.	76
2.4.4.	Роль фосфолипидов в связывании адаптерных белков.....	76
2.4.5.	Мембранные емкости-переносчики, транспортирующие белки из TGN. 77	
2.5.	Экзоцитоз.....	79
2.6.	Неканоническая секреция белков.....	80
2.6.1.	Тип I. Самообеспечивающаяся транслокация посредством индуцированной липидами олигомеризации и внедрением в мембрану.	80
2.6.2.	Тип II. Секреция, осуществляемая транспортером ABC.	80
2.6.3.	Тип III. Секреция через аутофагосомо-подобные органеллы.	81
2.6.4.	Тип IV. Транспорт белков, имеющих сигнал транслокации в ЭР или трансмембранные домены, из ЭР к плазматической мембране, минуя аппарат Гольджи.	81
2.7.	Гомеостаз ионов кальция и марганца.	82
2.7.1.	Активный транспорт Ca^{2+} у эукариот.	82
2.7.2.	Пассивный транспорт Ca^{2+} у эукариот.	85
2.7.3.	Транскрипционная регуляция гомеостаза Ca^{2+} у дрожжей.	86
2.7.4.	Транспорт Mn^{2+} у дрожжей.....	87
3.	Материалы и методы.....	89
3.1.	Среды для выращивания микроорганизмов.	89
3.2.	Трансформация дрожжей.	90
3.3.	Штаммы дрожжей.	91
3.4.	Штаммы <i>E. coli</i>	91
3.5.	Плазмиды и генно-инженерные методы.....	96
3.6.	Выделение плазмидной ДНК из <i>E. coli</i>	100

3.7.	Выделение геномной ДНК из дрожжей.....	101
3.8.	Множественная тандемная интеграция плазмид и определение копийности тандемных повторов.....	102
3.9.	Электрофорез белков, иммуноблоттинг и зимография.....	103
3.10.	Детекция активности uPA.	104
3.11.	Приготовление препаратов белков, ассоциированных с клетками дрожжей.	105
3.12.	Антитела.	106
3.13.	Приготовление препаратов секретируемых белков для электрофоретического анализа.	107
4.	Результаты	108
4.1.	Характеристики продукции вариантов белка uPA в клетках <i>O. parapolymorpha</i>	108
4.1.1.	Сверхпродукция белка uPA нарушает его секрецию	108
4.1.2.	N-гликозилирование и N-концевой домен uPA существенно влияют на эффективность секреции этого белка	112
4.1.3.	Агрегация uPA связана с накоплением этого белка в ЭР.....	113
4.2.	Мутации, увеличивающие эффективность секреции uPA у дрожжей <i>O. polymorpha</i>	115
4.2.1.	Мутация в гене, кодирующем маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазу. ...	115
4.2.2.	Мутация в гене, кодирующем α -субъединицу окаймляющего комплекса COP1	126
4.3.	Нарушение O-маннозилтрансферазы ЭР, Pmt1, улучшает укладку uPA в секреторном пути <i>O. parapolymorpha</i>	136
4.3.1.	Поиск мутантов <i>O. parapolymorpha</i> с увеличенной продукцией uPA-Q ³⁰² и клонирование гена <i>PMT1</i> по комплементации одной из полученных мутаций....	136
4.3.2.	Pmt1 <i>O. parapolymorpha</i> содержит C-концевой сигнал KDEL для задержки в ЭР.	139

4.3.3.	Pmt1 <i>O. parapolymorpha</i> является ортологом Pmt1 <i>S. cerevisiae</i>	140
4.3.4.	Инактивация PMT1 <i>O. parapolymorpha</i> снижает агрегацию uPA в ЭР.	143
4.4.	Дефекты транспортировки белков в вакуоль усиливают протеолитический процессинг uPA	144
4.4.1.	Использование uPA в качестве репортерного белка позволяет идентифицировать мутации, нарушающие сортировку белков в вакуоль.	144
4.4.2.	Нарушение рецептора вакуолярного сортирования Vps10 увеличивает протеолитический процессинг uPA.	147
4.5.	Функциональный анализ гена PMR1 <i>O. polymorpha</i>	150
4.5.1.	Инактивация гена PMR1 <i>O. polymorpha</i>	150
4.5.2.	Выживаемость мутанта <i>pmr1-Δ</i> при разных физиологических условиях.	151
4.5.3.	Мутация <i>pmr1-Δ</i> влияет на гликозилирование белков.	153
4.5.4.	Мутация <i>pmr1-Δ</i> нарушает сортировку вакуолярного белка CPY у <i>O. polymorpha</i>	156
4.5.5.	Мутация <i>pmr1-Δ</i> увеличивает эффективность секреции uPA-Q ³⁰² клетками <i>O. polymorpha</i>	157
4.6.	Изучение механизмов проявления гиперчувствительности к SDS при нарушении вакуолярной Ca ²⁺ -АТФазы Pmc1.	158
4.6.1.	Мутация <i>pmc1-Δ</i> увеличивает чувствительность <i>O. polymorpha</i> и <i>O. parapolymorpha</i> к SDS.	158
4.6.2.	Мутации в генах <i>HOG1</i> и <i>CCH1</i> супрессируют проявления <i>pmc1-Δ</i>	159
4.6.3.	Супрессия мутации <i>pmc1-Δ</i> при инактивации гена <i>WEE1</i> зависит от генотипического фона.	160
4.6.4.	Продукция химерного белка, содержащего N-концевую часть Wee1, в штамме <i>pmc1-Δ</i> приводит к нарушению морфологии клеток.	163
4.7.	Изучение генетического взаимодействия мутаций <i>ret1-27</i> , <i>pmr1-Δ</i> и <i>pmc1-Δ</i>	165

4.7.1.	Дефект COP1-зависимого везикулярного транспорта усиливает потребность мутанта <i>pmr1-Δ O. polymorpha</i> в Ca^{2+} и Mn^{2+}	165
4.7.2.	Нарушения генов <i>PMC1</i> и <i>VPS35</i> усиливают потребность мутанта <i>pmr1-Δ O. polymorpha</i> в Ca^{2+}	171
4.7.3.	Дефект снабжения секреторных органелл Ca^{2+} , вызываемый мутацией <i>ret1-27</i> , не опосредован снижением функции <i>Pmr1</i>	173
4.7.4.	Проявления мутации <i>ret1-27</i> , указывающие на нарушения транспорта белков между аппаратом Гольджи и вакуолью.	176
4.8.	Мутации, влияющие на устойчивость <i>O. polymorpha</i> и <i>O. parapolymorpha</i> к ортованадату.....	183
4.8.1.	Инактивация гомолога гена <i>MNN4 S. cerevisiae</i> снижает устойчивость <i>O. polymorpha</i> к ванадату.....	183
4.8.2.	Поиск мутаций, увеличивающих резистентность к ванадату у <i>O. parapolymorpha</i>	184
5.	Обсуждение	186
5.1.	Свойства модельного белка, использованного в работе для изучения секреции.	186
5.2.	Возможные механизмы увеличения эффективности секреции иРА у мутантов <i>ret1-27</i> , <i>oru24</i> , <i>pmt1-Δ</i> и <i>pmr1-Δ</i>	187
5.3.	Роль гомеостаза кальция в чувствительности клеток к SDS.....	192
5.4.	Роль вакуоли в доставке кальция в ЭР.....	195
6.	Заключение	200
7.	Выводы	202
8.	Список литературы.	203

Список сокращений и генетическая номенклатура

EndoH – эндогликозидаза H

ERAD – деградация белков, связанная с ЭР (endoplasmic reticulum associated degradation)

ERGIC – Промежуточный компартмент между ЭР и аппаратом Гольджи (the ER-Golgi intermediate compartment)

ERQC – контроль качества укладки белков в ЭР (endoplasmic reticulum quality control)

М6Р - маннозо-6-фосфат

SDS – додецилсульфат натрия

TGN – транс-сеть аппарата Гольджи (trans-Golgi network)

UGGT – УДФ-глюкоза:гликопротеин глюкозилтрансфераза (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase)

uPA – активатор плазминогена урокиназного типа (urokinase-type plasminogen activator)

UPR – ответ на накопление несвернутых белков в ЭР (unfolded protein response)

АДФ – Аденозиндифосфат

АТФ – Аденозинтрифосфат

ГДФ – Гуанозиндифосфат

ГТФ – Гуанозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

п.н. – пары нуклеотидов.

ППИ - Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза

РНК – рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов.

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан

ТХУ – трихлоруксусная кислота

УДФ - Уридиндифосфат

ЭГТА, EGTA – этиленгликоль-бис (β-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетраацетат

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭР – эндоплазматический ретикулум

Обозначения углеводных остатков в составе гликозидов

Glc – глюкоза

Man – манноза

GlcNAc – N-ацетилглюкозамин

Генетическая номенклатура.

Для дрожжей рода *Ogataea* нет специально оговоренной генетической номенклатуры, поэтому в литературе, как правило, используют номенклатуру, принятую для *Saccharomyces cerevisiae*. В частности, названия генов записываются курсивом и состоят из трех букв и номера. Доминантная аллель гена (обычно дикого типа) записывается прописными буквами, а рецессивная – строчными. Название белка, кодируемого геном, записывается теми же буквами и номером, но без курсива и только первая буква прописная. В конце названия белка может опционально добавляться буква p (protein).

Например:

PMT1 – ген дикого типа;

pmt1-1 – мутантная аллель;

pmt1::LEU2 – инактивация гена *PMT1* в результате инсерции гена *LEU2*.

pmt1-Δ::LEU2 – вариант аллели *pmt1::LEU2*, полученный в результате замещения гена *PMT1* или его части на последовательность, содержащую ген *LEU2*.

pmt1-Δ – делеционная аллель в общем виде.

Pmt1 или *Pmt1p* – белок, кодируемый геном *PMT1*.

В данной диссертации в тех случаях, когда это было существенно, для обозначения из какого вида дрожжей происходит ген в рекомбинантной конструкции или кодируемый им белок, перед названием гена или белка поставлены символы *Sc* (*S. cerevisiae*), *Opo* (*O. polymorpha*) или *Opa* (*O. parapolymorpha*).

Кроме дрожжевых последовательностей ДНК в работе использованы рекомбинантные гены, происходящие из других организмов. В частности, маркеры устойчивости к антибиотикам, зеоцину и G418, обозначенные Zeo^R и G418^R , соответственно. Кодированная область этих маркеров имеет бактериальное происхождение.

Кроме того, в геном штаммов вводили экспрессионные кассеты модельных рекомбинантных белков:

$P_{\text{MOX}}:\text{uPA}$, $P_{\text{MOX}}:\text{uPA-C}$, $P_{\text{MOX}}:\text{uPA-Q}^{302}$, $P_{\text{MOX}}:\text{uPA-CQ}^{302}$ – экспрессионные кассеты разных вариантов uPA с сигналом секреции киллерного токсина *Kluyveromyces lactis* под контролем промотора MOX *O. polymorpha*.

$5'\text{-PDI1}:\text{uPA}$ – последовательность, кодирующая uPA, соединенная с 5'-областью гена PDI1 *O. parapolymorpha*, включающей промотор и сигнал секреции.

$P_{\text{MOX}}:\text{GOX}$ – контролируемая промотором MOX экспрессионная кассета глюкозооксидазы *Aspergillus niger* с пре-про-лидером α -фактора *S. cerevisiae* (в случае замещения структурной части гена MOX) или с сигналом α -амилазы в плазмиде pDLMOX-GOD(H) (Kim et al., 2004).

Правила генетической номенклатуры *S. cerevisiae* не оговаривают способы обозначения некоторых генетических модификаций, которые нужно было описать в данной работе. В частности, в соответствии со стандартной номенклатурой плазмидные гены указываются в генотипе в квадратных скобках, как нехромосомно-наследуемые детерминанты. В диссертации в ряде случаев для удобства после скобок приводится название плазмиды (например, $[\text{PMR1 ADE2}]_{\text{pCAT1}}$).

В ряде случаев в работе были использованы трансформанты с плазмидами, интегрированными в неидентифицированный локус, или в какой-то локус интегрировали целую плазмиду с несколькими функциональными элементами. Для обозначения плазмидных генов в таких ситуациях использовали фигурные скобки, например:

$\text{tel}:\{\text{LEU2 } P_{\text{MOX}}:\text{uPA}\}_{\text{pAM219}} \text{ x2:tel}$ – интеграция двух копий плазмиды pAM219 в результате рекомбинации с одной из теломер.

$LEU2:\{P_{MOX}:uPA\}_{pAM226}:leu2-1-\Delta 5'$ – интеграция плазмиды pAM226 в мутантный локус *leu2-1* привела к образованию аллели *LEU2* дикого типа и укороченной с 5'-конца мутантной аллели *leu2-1*.

$ret1-\Delta C:\{ScLEU2\}_{pCOP1BE}:ret1-\Delta 5'$ – интеграция плазмиды pCOP1BE в локус *RET1* привела к возникновению аллели этого гена, кодирующей укороченный с C-конца белок, и нефункциональной аллели без 5'-концевой области.

$\{LEU2\}_{pCHLX}$ – интеграция плазмиды pCHLX в неидентифицированный локус.

1. Введение

1.1. Актуальность исследования

Миллиарды лет эволюции создали огромное разнообразие форм живой природы, даже самая примитивная из которых является сложнейшей системой. Для того чтобы понять, как функционирует каждая такая система на молекулярном уровне, требуются совместные усилия большого количества исследователей. Поэтому лишь отдельные виды живых организмов используют для молекулярно-биологических и биохимических исследований. Такие организмы называют «модельными», подразумевая, что обнаруженные с их использованием молекулярные механизмы, в той или иной степени, универсальны для всех или большой группы живых существ. Выбор модельных организмов часто определялся не столько тем, что исследователи были уверены в их «типичности», сколько их удобством, доступностью и безопасностью. Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, очевидно, были выбраны в качестве модельного объекта именно благодаря этим качествам и на протяжении десятилетий используются для получения знаний о функционировании эукариотической клетки с применением широкого арсенала методов молекулярной генетики.

Можно ли аппроксимировать представления об устройстве биологических систем, полученные при изучении традиционных модельных организмов, на большинство других представителей живой природы? Чтобы как-то ответить на этот вопрос, необходимо, с одной стороны, понимать, насколько тот или иной биологический механизм консервативен, а с другой – насколько конкретный модельный организм является «типичным» с точки зрения устройства этого механизма. Ни то, ни другое невозможно сказать, не проводя исследования на других, в той или иной степени, эволюционно удаленных организмах. Например, большое количество белков, обеспечивающих работу секреторных органелл, сначала было идентифицировано и охарактеризовано у дрожжей *S. cerevisiae*, а потом их ортологи были выявлены в клетках высших эукариот. Можно ли утверждать, что функционирование секреторного аппарата устроено одинаково у *S. cerevisiae* и у млекопитающих? Очевидно, что это утверждение некорректно, поскольку его можно считать верным

или неверным в зависимости от уровня обобщения. Например, в клетках всех эукариот секретируемые белки транслоцируются в просвет эндоплазматического ретикулума, где они сворачиваются и получают гликозидные цепи, после чего они проходят через компартменты аппарата Гольджи и везикулярным транспортом направляются к плазматической мембране, чтобы секретироваться. В этом смысле все одинаково. Однако если рассмотреть детали, то оказывается, что процессы контроля укладки белков в ЭР различны, а модификации гликозидных цепей белков в аппарате Гольджи млекопитающих и дрожжей фактически не имеют ничего общего. Более того, данные полногеномного секвенирования, появившиеся за последнее время для целого ряда различных видов дрожжей, указывают на то, что процесс контроля укладки белков в ЭР у *S. cerevisiae* является не самым обычным даже среди аскомицетов.

Развитие методов генетической инженерии позволило направленно менять геномы живых организмов, удаляя из них какие-то гены или вводя новые. Это не только дало эффективный арсенал для фундаментальных исследований, но и обеспечило прорыв в развитии биотехнологий. Появилась возможность конструировать организмы с нужными свойствами для промышленности и сельского хозяйства. Например, стало возможным получать штаммы микроорганизмов, синтезирующих чужеродные белки, которые трудно получить из природного хозяина. Среди эукариот первым микроорганизмом, использованным для этой цели, конечно же, оказался традиционный модельный объект – дрожжи *S. cerevisiae*.

Белки, являющиеся действующим веществом большого количества фармакологических препаратов, - это белки человека и, как правило, секретируемые белки. Их получение путем экспрессии в рекомбинантных микроорганизмах – очень важная задача. Однако использование для их получения 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 секретлируемых продуктов (Damasceno et al., 2007; Delic et al., 2014; Idiris et al., 2010). Конечно же, на это можно было бы возразить, что 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 нужного продукта. Однако для этого требуется понимание того, какие гены «нежелательны», 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* (Zhu et al., 2019) и *Hansenula polymorpha* (Manfrão-Netto et al., 2019). Некоторые независимые изоляты, относившиеся к этим видам, были реклассифицированы как отдельные виды. Так изоляты *P. pastoris* стали видами *Komagataella phaffii*, *K. pastoris*, и *K. pseudopastoris* (Kurtzman, 2005). Изоляты *H. polymorpha* CBS47327 и NCYC495 стали видом *Ogataea polymorpha*, а изолят DL-1 (ATCC26012) стал называться аспорогенной формой *O. parapolyomorpha* (Kurtzman, 2011; Suh and Zhou, 2010). 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. Способность утилизировать метанол определяется наличием метаболического пути, несколько ферментов которого продуцируются на очень высоком уровне при росте клеток на метаноле в качестве единственного источника углерода, и их продукция полностью подавляется в присутствии, например, глюкозы или этанола. В частности,

алкогольоксидаза (или метанолоксидаза), в условиях индукции может составлять существенную долю общего клеточного белка. У дрожжей, ранее относимых к виду *P. pastoris*, есть два гена, кодирующих этот фермент, AOX1 и AOX2, и только первый является высокоэкспрессируемым. У *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* есть только один ген для этого фермента, который называется MOX. Промоторы генов AOX1 и MOX обеспечивают высокий уровень продукции рекомбинантного белка и полную репрессию экспрессии при росте клеток на глюкозе. Это позволяет проводить ферментацию в два этапа: сначала выращивается биомасса в условиях репрессии, чтобы продукция чужеродного белка не мешала росту клеток, и не было селекции на клетки без экспрессионной кассеты, после чего проводят индукцию метанолом, во время которой клетки почти не делятся. *S. cerevisiae* также имеет сильный регулируемый промотор GAL1, однако для его индукции требуется галактоза достаточно высокой степени очистки, что достаточно дорого. Для достижения высокого уровня продукции у *S. cerevisiae*, как правило, используют автономно-реплицирующиеся мультикопийные векторы на основе эндогенной плазмиды, называемой 2 мкм ДНК. Чтобы обеспечить стабильность экспрессионного вектора в процессе роста культуры приходится использовать синтетическую среду, что негативно сказывается и на плотности культуры, и на уровне продукции чужеродного белка. Наличие сильных регулируемых промоторов у метилотрофных дрожжей позволяет использовать для продукции рекомбинантных белков штаммы с интегрированной в геном экспрессионной кассетой, что обеспечивает возможность использования богатых сред. Для гиперэкспрессии генов в дрожжах *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* разработаны подходы для множественной интеграции плазмиды в геном. Кроме того, у метилотрофных дрожжей гораздо проще получать культуры высокой плотности, чем у *S. cerevisiae*.

В отличие от большинства видов дрожжей, *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* являются термотолерантными, то есть могут расти при температурах до 49°C. Это расширяет возможности их использования для прикладных целей и делает эти дрожжи перспективным модельным объектом для изучения механизмов устойчивости клеток к повышенной температуре.

Особенно успешным оказалось использование *O. polymorpha* для продукции вирусоподобных частиц поверхностного антигена гепатита Б человека (Janowicz et al., 1991). В этом случае белок продуцируется внутриклеточно и в результате самосборки образует сферические частицы, обладающие высокой иммуногенностью, что позволяет использовать их в качестве вакцины. Для ряда других белков, в том числе и секретируемых, также удалось достичь высокого уровня продукции (см. обзор Manfrão-Netto et al., 2019). Например, продукция сывороточного альбумина человека (HAS) оценивалась в более чем 5 грамм на литр культуральной среды (Youn et al., 2010). Преимущество этого белка с точки зрения продукции в клетках дрожжей не только в том, что он хорошо секретируется, но и в том, что у него нет участков для N-гликозилирования и поэтому не требуется специальных усилий для удаления иммуногенных для человека дрожжевых гликозидов.

Однако, по-видимому, лишь небольшая часть фармакологически важных белков может быть просто получена, как HSA, – путем продукции в 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 шапероно-подобных белков (Damasceno et al., 2007; Delic et al., 2014; Idiris et al., 2010). Однако число примеров удачного применения такого подхода весьма ограничено, а неудачные, за редким исключением (Van Der Heide et al., 2002), не публикуются. 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.

1.2. 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*.

1.3. 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 ретикулуле. 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.

1.4. 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*.

1.5. Личный вклад

Результаты экспериментов, приведенные в работе, если не указано другое, были получены либо лично автором, либо под его руководством. В проведение тетрадных анализов 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.

1.6. Апробация работы

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

1.7. Публикации

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

1.8. 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 фосфоманнозилирование 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.

1.9. 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.

2. Обзор литературы

ОСОБЕННОСТИ УСТРОЙСТВА СЕКРЕТОРНОГО АППАРАТА У РАЗНЫХ ГРУПП ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ОРГАНИЗМОВ

2.1. Движение белков и липидов в секреторном пути

В обзоре будет часто встречаться термин "белки карго", который, возможно, требует пояснения. В общем значении это белки, перемещающиеся по секреторному пути к месту локализации (секретируемые белки, белки плазматической мембраны, резидентные белки эндосом и лизосом и т. д.). При использовании термина карго такие белки терминологически противопоставляются резидентным белкам секреторного пути. Однако и резидентные белки секреторного пути в определенных случаях можно называть "карго". Например, белки, обеспечивающие транспорт белков карго из одной точки в другую, могут возвращаться в исходную точку при участии других белков, и тогда они сами становятся карго. Трансмембранный рецептор связывается с белком карго для его транспорта к месту назначения, но этот транспорт осуществляется белковым комплексом, окаймляющем везикулы, и сам рецептор можно рассматривать как карго для везикул или окаймляющего комплекса.

2.1.1. Транслокация белков в просвет эндоплазматического ретикулума

За исключением небольшого числа митохондриальных компонентов, синтез полипептидных цепей белков клетки происходит в цитозоле, независимо от их финальной локализации, которая определяется свойствами этих цепей. В частности, полипептидные цепи секретируемых белков на N-конце содержат отрезаемый сигнальный пептид, который обеспечивает ко- или посттрансляционную транслокацию белка в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР). Сигнальные пептиды разных организмов имеют схожую организацию. Большую часть сигнального пептида составляет гидрофобный участок (обычно 8-12 остатков), на N-конце которого, как правило, находится положительно заряженный остаток, а со

стороны С-конца находятся более полярные остатки и участок узнавания сигнальной пептидазой. Сигнальная пептидаза отрезает сигнальный пептид после последовательности А-Х-В, где А и В – это остатки с небольшими алифатическими радикалами, а Х – любой остаток, кроме пролина (Perlman and Halvorson, 1983; Rapoport and Blobel, 1986; von Heijne, 1985).

2.1.1.1. Структура канала транслокации

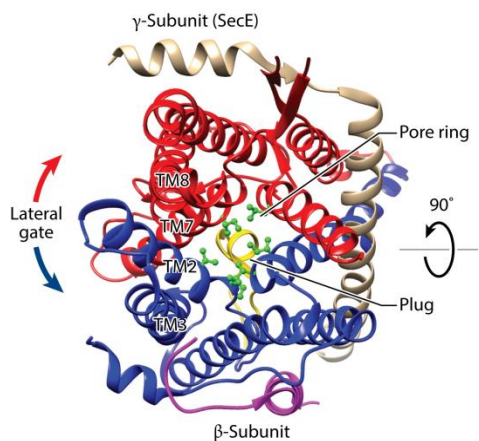
Канал транслокации образован консервативным гетеротримерным комплексом мембранных белков, называемым комплекс Sec61 у эукариот или комплекс SecY у бактерий и архей (Berg et al., 2004; Gemmer and Förster, 2020; Osborne et al., 2005). Субъединицы α и γ в существенной степени консервативны и необходимы для функционирования канала транслокации, а как результат – и для жизнеспособности клетки. Субъединицы не существенны для жизнеспособности. Субъединицы β эукариот и архей имеют сходство между собой, но не с аналогами из бактерий (Osborne et al., 2005). Была определена кристаллическая структура комплекса SecY архей (Berg et al., 2004). Он выглядит как две соединенные узкими отверстиями воронки, одна из которых широким отверстием смотрит в цитозоль, а другая наружу. Узкое отверстие с внешней стороны закрыто спиральной структурой (Рисунок 1).

2.1.1.2. Ко- и посттрансляционная транслокация

Канал сам по себе – это пассивная пора, которой требуется взаимодействие с белками-партнерами для обеспечения транслокации полипептидной цепи. И эти партнеры разные при ко- и посттрансляционной транслокации.

При котрансляционной транслокации основным партнером является рибосома. Этот вариант транслокации есть во всех клетках и используется для транслокации как секреторных белков, так и для интеграции в мембрану большинства мембранных белков. Котрансляционная транслокация начинается с направляющей

а)



б)

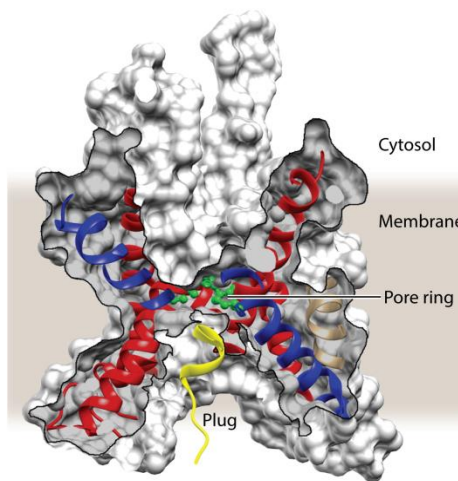


Рисунок 1. Структура свободного канала SecY *Methanocaldococcus jannaschii* (код PDB 1RH5). а) Вид со стороны цитозоля. N- и C-концевые половины α -субъединицы показаны синим и красным, соответственно, β -субъединица – фиолетовым, а γ -субъединица – бежевым. Желтым показана спиральная структура, закрывающая канал. Метками "TM" обозначены трансмембранные домены, формирующие свод входа в канал. б) Модель вида сбоку в разрезе. Приводится по (Rapoport et al., 2017).

фазы. Сигральная или трансмембранная последовательность растущей полипептидной цепи распознается белком SRP (signal recognition particle). После этого комплекс, включающий рибосому, растущий полипептид и SRP, прикрепляется к мембране сначала за счет взаимодействия между SRP его мембранным рецептором, а потом за счет взаимодействия между рибосомой и каналом транслокации (Halic & Beckmann, 2005; Lührink, 2004). Далее, полипептид, синтезирующийся на рибосоме, попадает непосредственно в канал транслокации. При этом для транслокации не требуется дополнительной энергии, кроме той, которая используется для синтеза белка на рибосоме (Connolly and Gilmore, 1986). В случае мембранных белков определенные участки полипептидной цепи не транслоцируются, а выпетливаются в цитозоль через стык между рибосомой и каналом, формируя цитозольный домен (Mothes et al., 1997).

Некоторые белки транслоцируются уже после завершения их синтеза, то есть посттрансляционно. Среди белков, транслоцирующихся по этому типу, в основном встречаются растворимые белки, которые имеют не сильно гидрофобный сигнал транслокации, не обеспечивающий эффективного распознавания белком SRP в процессе их синтеза (Damon Huber et al., 2005; Ng et al., 1996). Этим полипептидам требуется, в той или иной степени, оставаться развернутыми после высвобождения из рибосомы (D. Huber et al., 2005).

У дрожжей и, видимо, у других эукариот в посттрансляционной транслокации через канал Sec61 принимают участие комплекс Sec62/Sec63 и представитель АТФаз семейства Hsp70 шаперон BiP (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995). У *S. cerevisiae* в комплекс Sec62/Sec63 входят два жизненно важных белка Sec62 и Sec63, а также два не жизненно важных белка Sec71 и Sec72. В клетках млекопитающих есть только Sec62 и Sec63 (Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000). Транслокация начинается со связывания сигнальной последовательности с каналом транслокации, и во время этого этапа полипептидная цепь освобождается от цитозольных шаперонов (Plath and Rapoport, 2000). Структура самого канала позволяет полипептиду двигаться и в прямом, и в обратном направлении в результате теплового движения, однако после выпетливания цепи в просвет ЭР происходит связывание с шапероном BiP, не дающее полипептиду вернуться назад, а после следующего продвижения вперед присоединяется новая молекула BiP и так далее, пока весь полипептид не окажется в просвете ЭР (Matlack et al., 1999).

2.1.2. Везикулярный транспорт между компартментами секреторного пути

В ходе транслокации в просвет ЭР полипептидная цепь может быть модифицирована присоединением О и/или N-гликозидных цепей, и в том же компартменте происходит ее укладка. Белки, транслоцированные в просвет ЭР, за исключением резидентных белков этого компартмента, попадают в аппарат Гольджи, где их гликозидные цепи подвергаются модификациям, а далее направляются либо к плазматической мембране, либо в вакуоль (например, у грибов) или лизосому (в

клетках животных). Формирование секреторных органелл и транспорт карго-белков (нерезидентные белки, находящиеся в процессе доставки по секреторному пути к плазматической мембране или к лизосоме/вакуоли) происходит при участии ряда белковых комплексов, обеспечивающих образование и слияние мембранных везикул.

2.1.2.1. Комплекс COPII

Для того, чтобы попасть из ЭР в аппарат Гольджи, карго-белки упаковываются в везикулы, формирующиеся цитозольным окаймляющим комплексом COPII. Он включает пять белков: малую ГТФазу Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 и Sec31 (Barlowe, 1994). Образование везикулы инициируется ГТФ-связанной формой белка Sar1, N-концевая α -спираль которого погружается в мембрану (Antonny et al., 1997). Sar1-ГТФ рекрутирует гетеродимер Sec23/Sec24, образующий внутреннюю оболочку, непосредственно связывающую трансмембранные карго-молекулы (Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003). В завершение, комплекс Sar1-Sec23/Sec24 рекрутирует гетеротетрамер Sec13/Sec31-Sec13/Sec31, затравляя его полимеризацию с образованием «клетки» (решетки) внешней оболочки (Barlowe, 1994; Stagg et al., 2006).

ЭР – это не гомогенная структура, и формирование транспортных везикул COPII происходит на ограниченных его участках, которые часто называют участками выхода (endoplasmic reticulum exit sites, ERES) (Kuge et al., 1994; Orci et al., 1991; Pagano et al., 1999). В клетках млекопитающих в результате гомотипического слияния везикул COPII образуется везикулярно-тубулярный кластер, который также называют ERGIC (the ER-Golgi intermediate compartment) (см. обзор Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

Основная масса белков карго специфически концентрируются в отпочковывающиеся везикулы COPII для экспорта из ЭР (Balch et al., 1994; Malkus et al., 2002). Большинство трансмембранных карго связывается непосредственно с окаймлением COPII (Aridor et al., 1998; Kuehn et al., 1998; Votsmeier and Gallwitz, 2001), но растворимые белки и некоторые мембранные связываются с окаймлением

опосредовано: через трансмембранные рецепторы экспорта (Appenzeller et al., 1999; Muñiz et al., 2000; Powers and Barlowe, 2002). Рецепторы экспорта покидают ЭР вместе со своими лигандами, «разгружаются» в акцепторном компартменте и возвращаются обратно в ЭР.

В цитозольных доменах трансмембранных белков карго обнаружены разнообразные сигналы сортировки, распознаваемые окаймлением COPII (Barlowe, 2003). Некоторые из этих сигналов включают два отрицательно заряженных остатка, составляющие консенсусную последовательность [DE]X[DE], где X – любая аминокислота (Nishimura and Balch, 1997; Votsmeier and Gallwitz, 2001). Другие сигналы представляют собой короткие комбинации гидрофобных остатков такие, как FF, YYM, FY, LL или IL (Kappeler et al., 1997; Nakamura et al., 1998). Для гликозилтрансфераз аппарата Гольджи было продемонстрировано наличие сигнала выхода из ЭР, состоящего из двух положительно-заряженных остатков - [RK]X[RK] (Giraud and Maccioni, 2003). Кроме того, встречаются комбинации этих коротких сигналов; в этом качестве могут распознаваться и более протяженные последовательности, а также какие-то конформационные детерминанты. Большинство сигналов экспорта обеспечивает связывание с Sec24 (Miller et al., 2002, 2003; Mossessova et al., 2003). G-белок Sar1 также может участвовать в распознавании этих сигналов, как за счет непосредственного связывания, так и за счет аллостерической модуляции Sec24 (Aridor et al., 1998; Giraud and Maccioni, 2003; Springer and Schekman, 1998).

2.1.2.2. Комплекс COPI

Резидентные белки ЭР, попадающие в ERGIC, а также белки, циркулирующие между ERGIC и ЭР, возвращаются в ЭР в везикулах, окаймленных комплексом COPI. Этот же комплекс обеспечивает транспорт белков и липидов между компартментами аппарата Гольджи. Образование везикулы в этом случае инициируется прикреплением к мембране ГТФазы, Arf1 в ГТФ-связанной форме (Paris et al., 1997). Arf1-ГТФ рекрутирует пре-собраный окаймляющий комплекс, состоящий из семи субъединиц, которые организованы в два подкомплекса, В-COPI (субъединицы α , β' и

ε) и F-COP1 (субъединицы β, γ, δ и ζ) (Fiedler et al., 1996; Lee and Goldberg, 2010; Serafini et al., 1991; Waters et al., 1991). Субъединицы обычно сокращенно называют α-, β', β-, γ-, δ-, ζ- и ε-COP (без символа I). N-концевые домены α- и β'-субъединицы, содержащие WD40 повторы и образующие структуру β-пропеллера, способны независимо связывать белки карго (Eugster et al., 2004). С использованием разных взаимодополняющих подходов, включая криоэлектронную томографию, была получена подробная модель собранного комплекса COP1 (Bykov et al., 2017; Dodonova et al., 2017, 2015).

Распознавание белков карго окаймлением COP1 в основном происходит за счет сигналов сортировки на цитоплазматических доменах трансмембранных белков. Среди таких сигналов в наибольшей степени охарактеризованы дилизиновые мотивы KKXX и KKKXX, находящиеся непосредственно на С-конце многих резидентных белков ЭР. Эти мотивы связываются с β-пропеллерным доменом α- или β'-РЭП (Eugster et al., 2004; Jackson et al., 2012; Ma and Goldberg, 2013; Schroder-Kohne et al., 1998). У гетеромультимерных белков, таких, как каналы и рецепторы, обнаруживается другой класс сигналов, основанный на аргининовых остатках и имеющий консенсусную последовательность φRXXR, где φ - любая гидрофобная аминокислота (Zerangue et al., 2001, 1999). Такие сигналы могут маскироваться в правильно собранных и модифицированных комплексах и экспонироваться при неправильной сборке, что позволяет окаймлению COP1 задерживать молекулы, которые не готовы для доставки к месту функционирования (Arakel and Schwappach, 2018).

Множество люменальных растворимых резидентных белков ЭР имеют на С-конце сигнал задержки KDEL или HDEL. Их возвращение в ЭР обеспечивается трансмембранным белком, рецептором KDEL, который выступает в роли адаптера между окаймлением COP1 и белком карго (Munro and Pelham, 1987; Semenza et al., 1990). Наряду с рецептором KDEL такие компоненты, как Rer1, Vps74 и комплекс Erv41-46, могут служить адаптерами для сортировки белков карго в везикулы COP1 (Eckert et al., 2014; Sato et al., 2001; Shibuya et al., 2015; Tu et al., 2012, 2008).

2.1.2.3. Клатриновые везикулы

Белки карго, получившие необходимые модификации, при достижении поздних компартментов аппарата Гольджи упаковываются в везикулы, окаймленные клатрином. Важно отметить, что клатриновое окаймление участвует в формировании везикул и на других мембранах, в частности, на плазмолемме при эндоцитозе и мембранах эндосом. Основой этого окаймления, как следует из названия, является клатрин, состоящий из тяжелой и легкой цепи. В растворе из трех молекул клатрина, соединяющихся С-концевыми доменами, образуются «треноги» с перегибом (коленом) в опорах. Из этих треног может образовываться окаймление, по организации напоминающее молекулу фуллерена или футбольный мяч, сшитый из шестиугольников и пятиугольников. Считается, что легкие цепи стабилизируют соединение С-концевых доменов тяжелой цепи в вершине треноги. N-концевой домен тяжелой цепи взаимодействует с другим компонентом окаймления – белковыми комплексами AP (adaptor protein), обеспечивающими селективное взаимодействие с белками карго (см. обзор (Robinson, 2015)). Вовлечение разных вариантов комплексов AP во взаимодействие с мембраной может быть как Arf-зависимым, так и независимым. Arf-независимое вовлечение обеспечивается взаимодействием с фосфатидилинозитол-4-фосфатом (Donaldson and Jackson, 2000; Wang et al., 2003).

2.1.2.4. Слияние везикул

Отпочковывание везикулы заканчивается гидролизом ГТФ, находящегося в комплексе с G-белком-инициатором сборки окаймления. В результате везикула теряет окаймление, после чего должна «найти» мембрану нужного акцепторного компартмента, чтобы слиться с ней и прекратить свое существование, доставив содержимое к месту назначения. Это обеспечивается множеством белков, называемых SNARE. В исходной модели, предложенной для объяснения роли этих белков, они были разделены на два класса согласно их функции: v-SNARE, маркирующие везикулы, и t-SNARE, маркирующие целевую (target) мембрану (Rothman, 1994). Однако использование такого принципа оказывается

невозможным, например, в случае гомотипического слияния. Впоследствии была предложена деление на Q-SNARE и R-SNARE в соответствии со структурными особенностями этих белков (Fasshauer et al., 1998). Большинство SNARE – это трансмембранные белки, заякоренные в мембране С-концевой областью, а N-конец направлен в цитозоль и обеспечивает взаимодействие с белками-партнерами (см. обзор Malsam and Sollner, 2011).

2.1.3. Динамическая организация аппарата Гольджи

У аппарата Гольджи есть два типа функций, которые часто взаимосвязаны. С одной стороны, это своего рода распределительная станция, обеспечивающая доставку белков, экспортированных из ЭР, к месту назначения в клетке – плазматической мембране, эндосомам и лизосоме/вакуоли. С другой стороны, это химический реактор, в котором последовательно происходят реакции по формированию требуемой структуры гликозидных цепей белков, а также протеолитический процессинг ряда белков. Аппарат Гольджи представляет собой совокупность мембранных компартментов-цистерн, через которые в направлении от цис- к транс-цистернам перемещаются белки карго, экспортированные из ЭР. Функции компартментов определяются составом резидентных белков (Dunphy and Rothman, 1985). Представления о том, как перемещаются белки карго между цистернами и как в цистернах поддерживается определенный состав резидентных белков, довольно сильно эволюционировали, однако все еще нельзя сказать, что какая-то модель функционирования аппарата Гольджи стала общепризнанной.

2.1.3.1. Модель стабильных компартментов

Эта модель была общепринятой с начала 1980-х до конца 1990-х годов. Она предполагает, что цистерны аппарата Гольджи являются стабильными и долгоживущими, а белки карго, доставленные к цис-цистерне в везикулах COPII, перемещаются от одной цистерны к следующей в везикулах COPI (Rothman and Wieland, 1996). Резидентные белки остаются в своем компартменте, поскольку исключаются из везикул COPI (Рисунок 2). Обновленная версия этой модели

предполагала, что везикулы COPI обеспечивают транспорт в двух направлениях: в прямом перемещают белки карго, а в обратном – компоненты, участвующие в транспорте (L. Orci et al., 2000; Pelham and Rothman, 2000). Однако ряд экспериментальных данных плохо совмещался с этой моделью. В частности в ряде исследований показано, что везикулы COPI обеднены, а не обогащены, по белкам карго (Dahan et al., 1994; Gilchrist et al., 2006; Martínez-Menárguez et al., 2001). Морфологический анализ, проведенный на клетках растений показывал, что один тип везикул COPI обеспечивает ретроградный транспорт из аппарата Гольджи в ЭР, а другой – транспорт между цистернами аппарата Гольджи для рециклирования резидентных белков (Staehelin and Kang, 2008). Эта модель плохо объясняла и ряд других фактов и наблюдений (Becker et al., 1995; Bonfanti et al., 1998).

2.1.3.2. Модель продвижения/созревания цистерн

Модель созревания цистерн (Bannykh and Balch, 1997; Glick et al., 1997) вытекала из существенно более ранней концепции, выдвинутой на основе изучения морфологии аппарата Гольджи (см. обзор (Glick and Luini, 2011) и ссылки в нем). В рамках этой модели цистерны постоянно возникают, созревают и исчезают. Гомотипическое слияние везикул COPII или других структур с белками карго, происходящих из ЭР (Bannykh and Balch, 1997; Mironov et al., 2003), приводит к образованию новой цис-цистерны. Транс-сеть аппарата Гольджи постоянно разбирается с образованием секреторных, а также других типов везикул, и формируется из более ранней цистерны. В этой модели роль везикул COPI в работе аппарата Гольджи заключается в том, чтобы переносить резидентные белки из более поздних цистерн в более ранние. Таким образом белки карго перемещаются от цис-области к транс- внутри цистерн, ферментный состав которых меняется по мере продвижения (Рисунок 3). Эта модель выглядит очень привлекательно в своей наглядности и отсутствии избыточных сущностей. Множество экспериментальных фактов хорошо объясняется с этих позиций. Однако есть данные, плохо согласующиеся с этой моделью. В частности, в некоторых исследованиях с использованием иммуно-электронной микроскопии не было выявлено обогащения везикул COPI ферментами гликозилирования (Cosson et al., 2002; Kweon et al., 2004; Lelio Orci et al., 2000).

2.1.3.3. Модель продвижения/созревания цистерн, гетеротипически соединенных трубочками.

Модель созревания цистерн может быть расширена за счет включения в нее транспорта между поздними и ранними цистернами через трубчатые соединения (Mironov et al., 1997). Наличие таких соединений было продемонстрировано с использованием электронной томографии (Marsh et al., 2004; Trucco et al., 2004). В ряде исследований была продемонстрирована связь ферментов метаболизма фосфолипидов с образованием мембранных трубочек в аппарате Гольджи, и получены указания, что эти трубочки важны для прямого и обратного транспорта между секреторными компартментами (Brown et al., 2003; Pietro et al., 2009; Schmidt and Brown, 2009; Weigert et al., 1999). Наличие трубчатых гетеротипических соединений между цистернами должно позволять белкам карго быстрее перемещаться в прямом направлении, а резидентным белкам аппарата Гольджи – в обратном (Рисунок 4) (Pietro et al., 2009).

2.1.3.4. Модель быстрого разделения в двухфазной мембранной системе.

Эта модель (Lippincott-Schwartz and Phair, 2010; Patterson et al., 2008) также предполагает, что цистерны аппарата Гольджи соединены между собой и имеют двухфазную организацию, то есть содержат область экспорта и область процессинга. Белки карго, выходящие из ЭР, если имеют небольшой размер, распределяются сразу по всем цистернам аппарата Гольджи, получают модификации в областях процессинга и направляются к плазматической мембране через области экспорта разных цистерн (Рисунок 5). Эта модель была выдвинута на основании наблюдения, что разнообразные белки карго проходят через аппарат Гольджи с экспоненциальной кинетикой (Patterson et al., 2008). Однако она никак не объясняет целый ряд фактов, например, зачем нужны последовательные цистерны с отличающимся набором ферментов, и как обеспечивается последовательность модификаций гликозидных цепей белков карго.

2.1.3.5. Модели соединяющихся стабильных компартментов.

Кроме предыдущей, были предложены и другие модели, не использующие идеи прохождения белков карго через аппарат Гольджи в созревающих цистернах. Одна из них (Griffiths, 2000) исходит из того, что цистерны аппарата Гольджи последовательно соединены между собой, и белки карго перемещаются из одной в другую как по кишечнику. В этой модели, на пути от ЭР к транс-сети Гольджи, отсутствие постоянного соединения предполагается только между ERGIC и аппаратом Гольджи, а также между аппаратом Гольджи и транс-сетью Гольджи, которая рассматривается как отдельный компартмент. В отсутствии постоянного соединения транспорт в этих участках происходит как за счет везикул, так и за счет временных контактов (Рисунок 6). Другая модель исходит из того, что содержимое из более ранней цистерны может перемещаться в более позднюю за счет временного слияния (Pfeffer, 2010). Причем такое слияние рассматривается как гомотипическое, поскольку предполагается, что цистерны имеют домены, маркированные разными ГТФазами Rab (Stenmark, 2009), чтобы обеспечить возможность слияния и с более ранней цистерной, и с более поздней. Кроме того, в этой модели рассматривается возможность отделения от цистерны домена, маркированного определенной ГТФазой Rab, в виде «мегавезикулы» для последующего слияния со следующей цистерной. Интересно, что перемещение больших карго в таких «мегавезикулах», транзитно присоединяющихся к разным цистернами аппарата Гольджи от ранних к поздним для обеспечения нужных модификаций, рассматривалось и в рамках другой модели (Mironov et al., 2005).

2.1.3.6. Насколько разные модели противоречат друг другу?

Классическая модель постоянных цистерн, по-видимому, уже имеет только историческое значение. Пришедшая ей на смену модель продвижения/созревания цистерн в чистом виде, похоже, перестала устраивать и ее авторов (Glick and Luini, 2011). Её обновленная версия, рассматривающая наличие трубчатых соединений, начинает пересекаться с моделями сообщающихся стабильных компартментов. По сути, разница заключается в скорости прогрессии цистерн и размере соединений между ними. В случае модели созревания цистерн в чистом виде эта скорость равна

скорости продвижения белков карго по аппарату Гольджи, а в случае соединяющихся стабильных компартментов эта скорость равна нулю. В обновленной версии модели созревания цистерн скорость их продвижения ниже, чем скорость продвижения небольших карго. Если все же принять тот факт, что хотя бы с небольшой скоростью новые цистерны возникают на цис-стороне, а поздние цистерны разбираются, то модели сообщающихся постоянных компартментов начинают отличаться от обновленной версии модели созревания цистерн уже не качественно, а количественно. Скорее всего, в зависимости от того, как эволюционировал организм, для описания динамической организации аппарата Гольджи его клеток может больше подходить одна или другая модель.

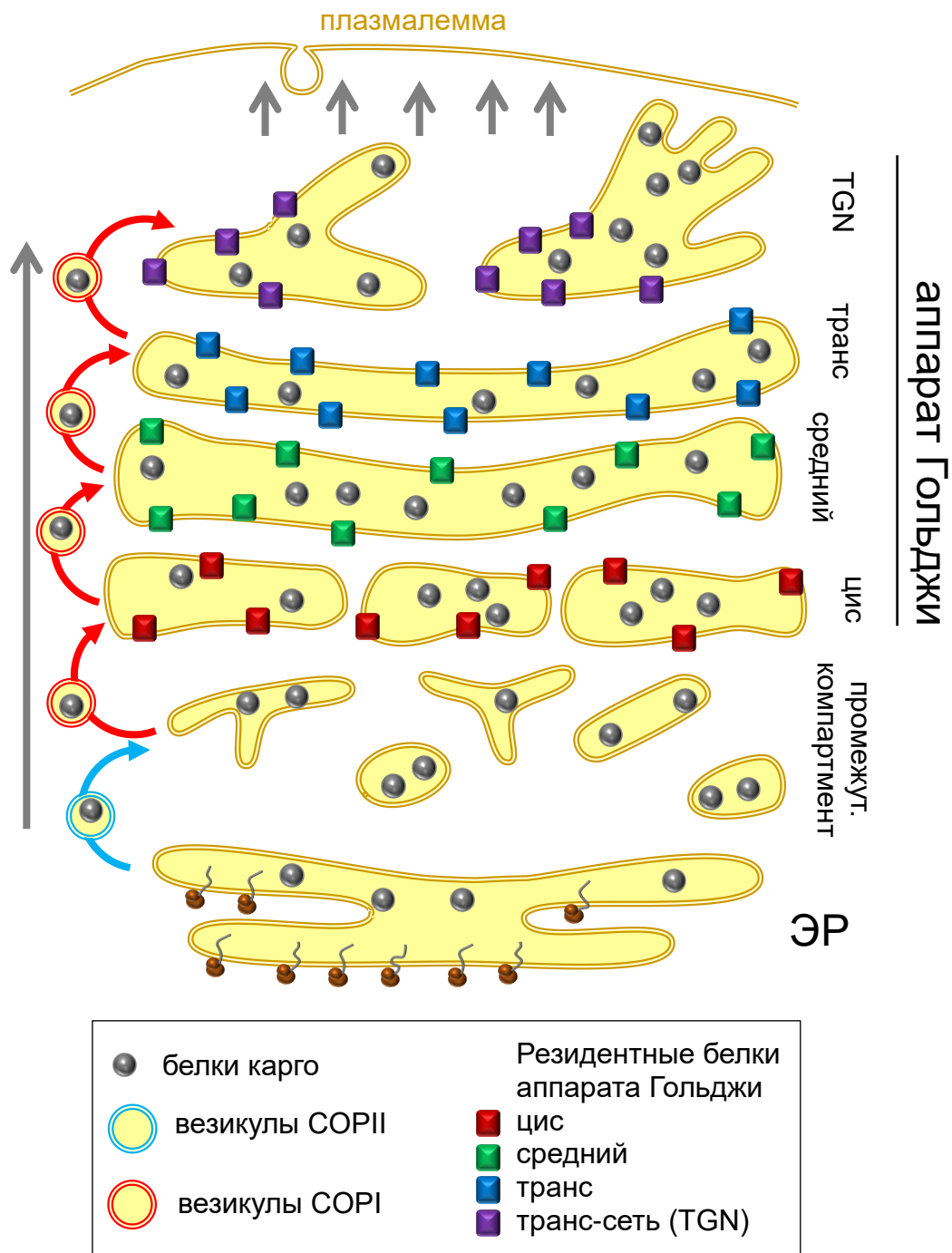


Рисунок 2. Модель постоянных цистерн аппарата Гольджи. Объяснения приведены в тексте. Частично использован дизайн схемы из обзора (Glick and Luini, 2011).

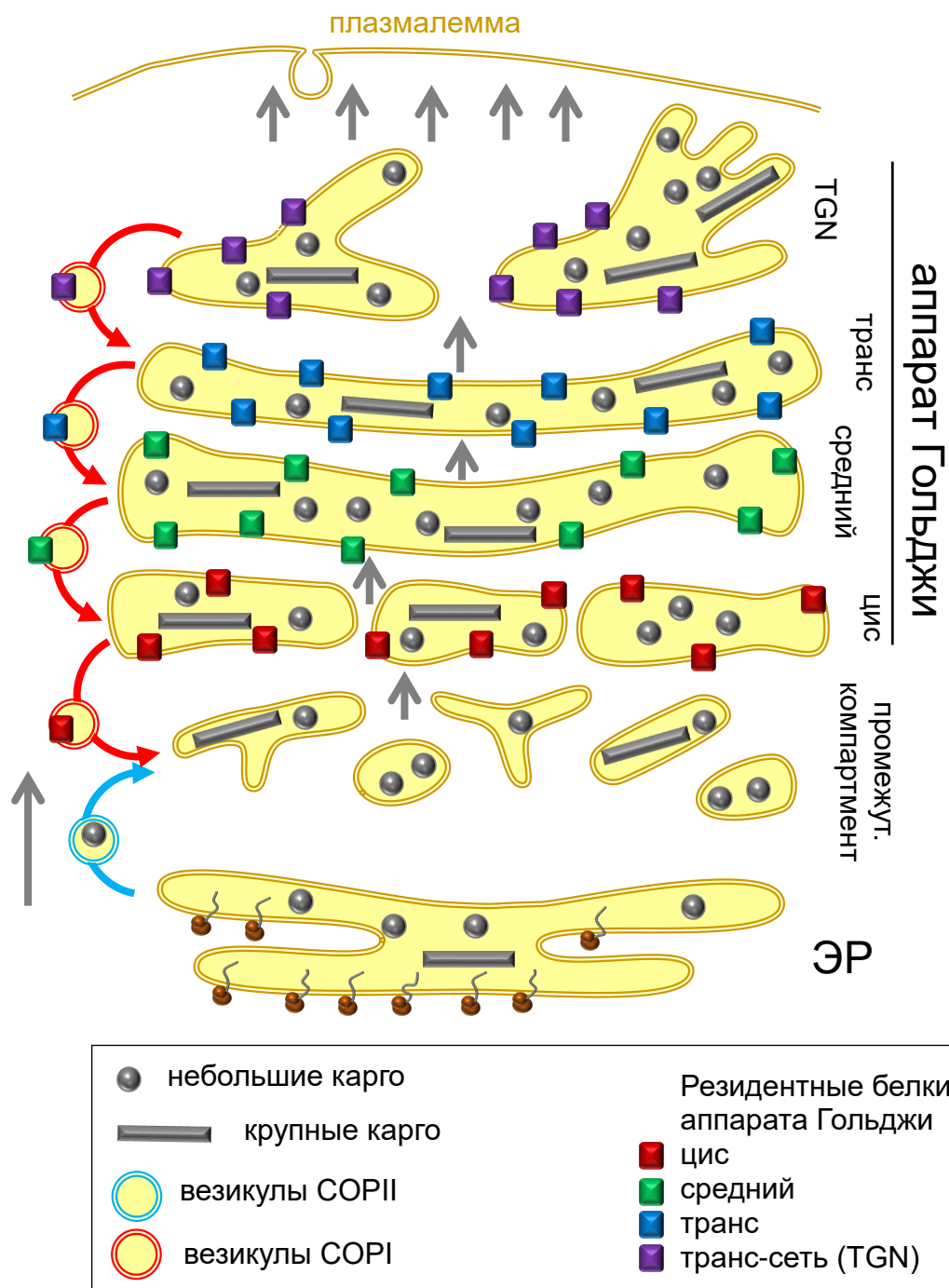


Рисунок 3. Модель продвижения/созревания цистерн аппарата Гольджи. Объяснения приведены в тексте. Частично использован дизайн схемы из обзора (Glick and Luini, 2011).

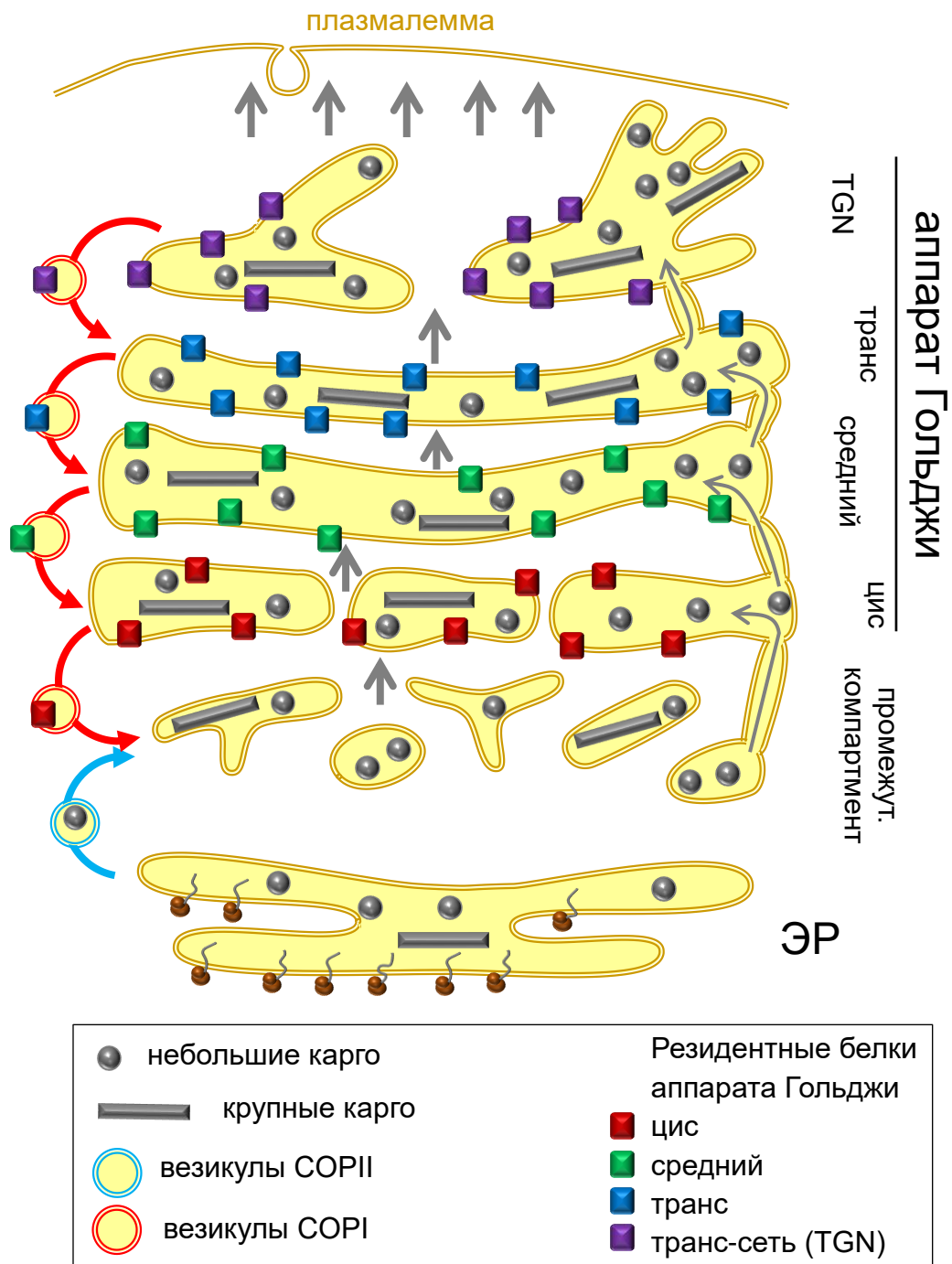


Рисунок 4. Модель продвижения/созревания цистерн аппарата Гольджи, гетеротипически соединенных трубочками. Объяснения приведены в тексте. Частично использован дизайн схемы из обзора (Glick and Luini, 2011).

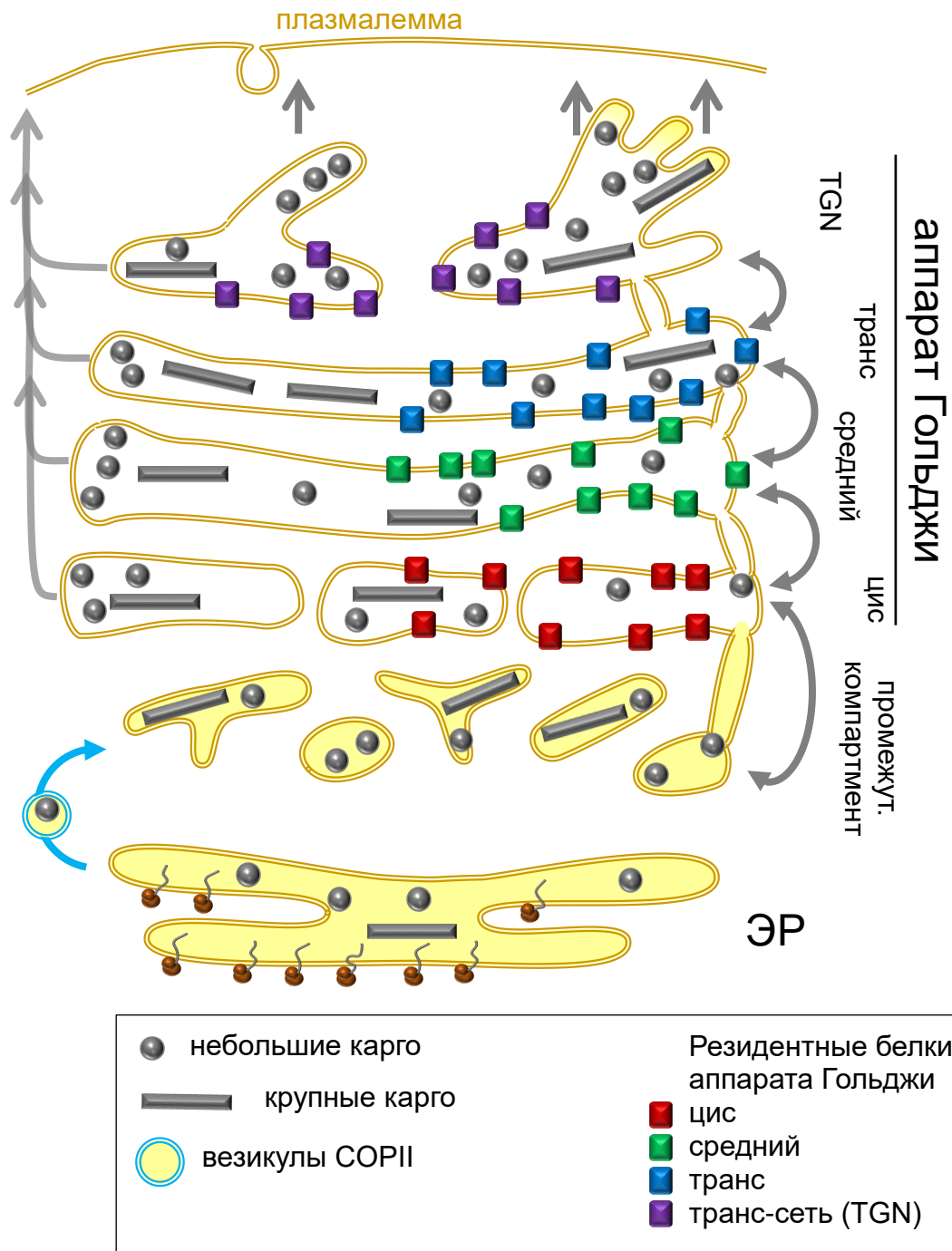


Рисунок 5. Модель аппарата Гольджи с быстрым разделением в двухфазной мембранной системе. Объяснения приведены в тексте. Частично использован дизайн схемы из обзора (Glick and Luini, 2011).

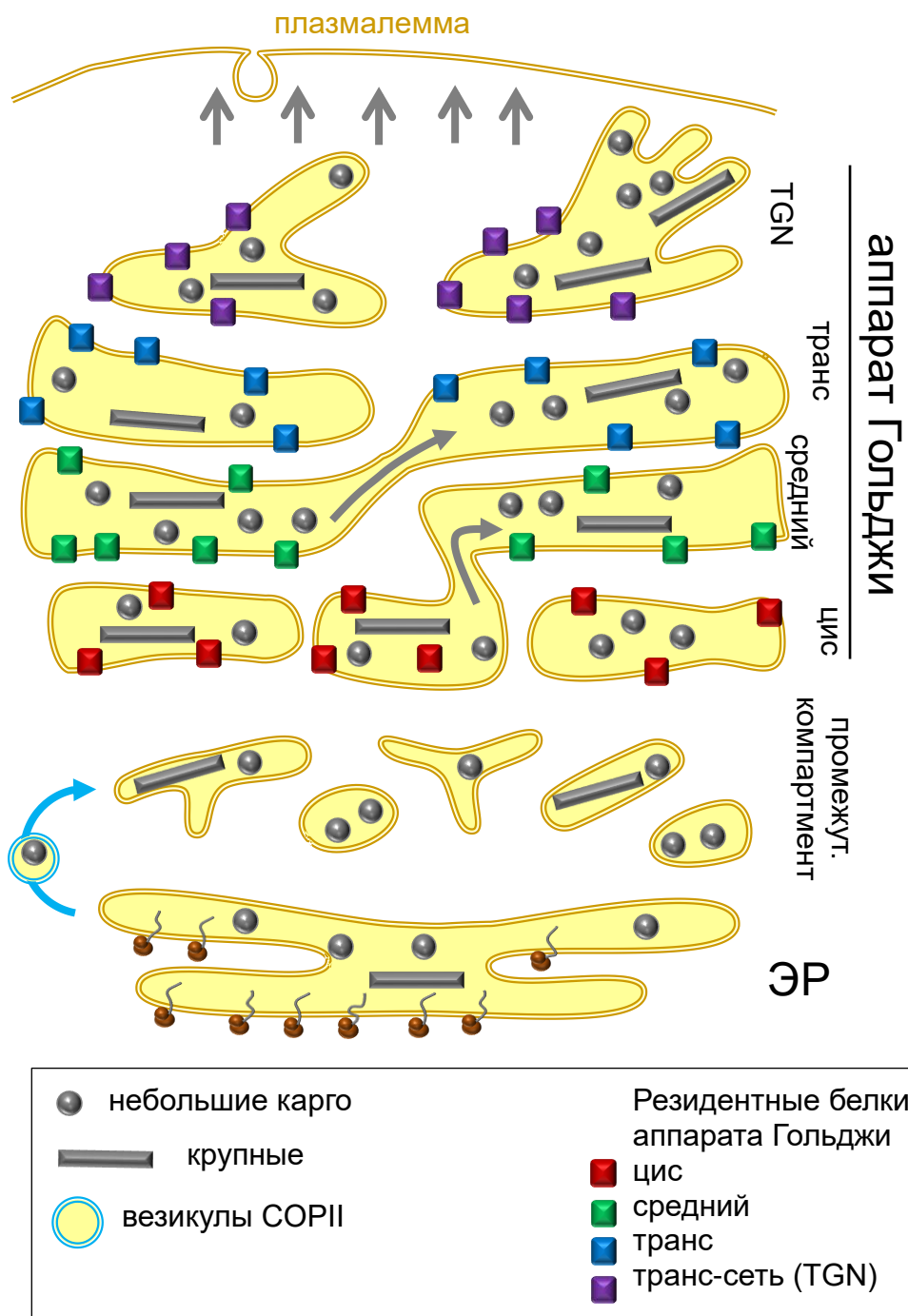


Рисунок 6. Вариант модели соединяющихся постоянных цистерн аппарата Гольджи. Объяснения приведены в тексте. Частично использован дизайн схемы из обзора (Glick and Luini, 2011).

2.2. Гликозилирование белков в секреторном пути

В ходе или после транслокации в ЭР белки могут модифицироваться присоединением углеводных остатков, то есть, гликозилируются. Гликозидные цепи могут претерпевать существенные изменения по мере прохождения белка по секреторному пути. Модификация остатков аспарагина называется N-гликозилированием, а остатков треонина и серина – O-гликозилированием. Кроме того, у некоторых белков, имеющих С-концевой трансмембранный домен, этот домен в некоторых случаях может заменяться на углевод-содержащую липидную структуру, гликозилфосфатидилинозитол (glycosylphosphatidylinositol, GPI), являющуюся мембранным якорем (Рисунок 7).

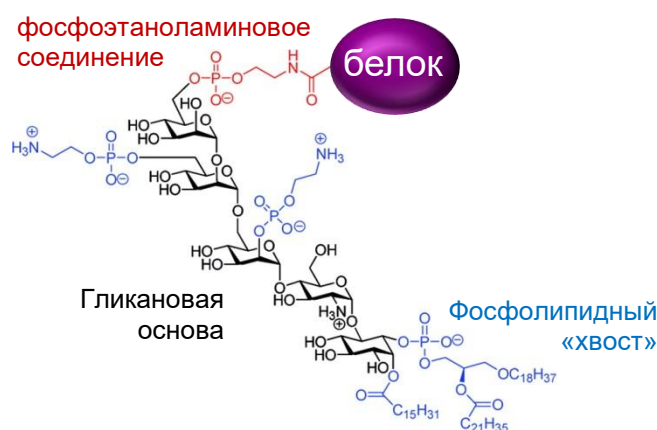


Рисунок 7. Структура гликозилфосфатидилинозитольного якоря ацетилхолинэстеразы эритроцитов. Части, выделенные синим цветом, могут варьироваться. Схема приводится по (Paulick and Bertozzi, 2008).

2.2.1. N-гликозилирование.

Если остаток аспарагина транслоцирующейся полипептидной цепи находится в контексте –N-X-S/T-, где X – это любая аминокислота кроме пролина, то к нему может быть присоединена гликозидная цепь консервативного для разных групп эукариот состава $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Рисунок 8). Эта реакция катализируется олигосахарил-трансферазным комплексом OST (Kelleher and Gilmore, 2006). Донором гликозидной

цепи является связанный с мембраной предшественник, который синтезируется в результате последовательного присоединения остатков моносахаридов к долихолфосфату (Рисунок 8). В ЭР происходит процессинг трех остатков глюкозы и одного остатка маннозы N-гликозида (см. раздел 2.3.1.), после чего белок с N-гликозидом состава $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ экспортируется в аппарат Гольджи.

2.2.1.1. Модификация N-гликозидных цепей в аппарате Гольджи высших эукариот.

Характер модификации N-гликозидных цепей в аппарате Гольджи сильно дивергировал у разных таксономических групп в ходе эволюции и может отличаться не только у разных организмов, но и в клетках разных тканей и даже у разных белков в одной клетке. Однако есть консервативное ядро, включающее два остатка N-ацетилглюкозамина и три остатка маннозы (обведено пунктирной линией на рисунке 8) и которое всегда остается в составе гликозида после всех модификаций в аппарате Гольджи. У млекопитающих, в зависимости от того, как модифицируются N-гликозидные цепи в аппарате Гольджи, характер гликозилирования подразделяют на три типа. Если к консервативному ядру присоединяются только маннозные остатки, гликозид относится к олигоманнозному типу. Если к крайним остаткам маннозы в консервативном ядре присоединяется N-ацетилглюкозамин (один или два остатка на каждый из двух остатков маннозы), инициирующий образование «антенны» гликозида, то такой гликозид относят к комплексному типу. Если «ветка» α -1,6-маннозы удлиняется за счет маннозных остатков, а «ветка» α -1,3-маннозы – за счет иницированных N-ацетилглюкозамина антенн (1 или 2), то это – гибридный тип (Рисунок 9).

Процессинг по комплексному или гибридному типу предваряется отщеплением от структуры $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ трех маннозных остатков α 1,2-маннозидазами IA и IB (Рисунок 10). Далее к α -маннозным остаткам через 2-й атом углерода присоединяется N-ацетилглюкозамин, инициирующий формирование «антенны». Дополнительно к тем же остаткам маннозы может присоединяться еще по одному остатку N-ацетилглюкозамина: через 4 атом углерода α 1,3-маннозы и через 6 атом α 1,6-маннозы. На этих остатках N-ацетилглюкозамина формируются антенны за счет

добавления остатков галактозы или N-ацетилгалактозамина, к которым, в свою очередь, могут присоединяться остатки N-ацетилглюкозамина или сиаловой кислоты (Рисунок 10, Рисунок 11). К β -маннозе консервативного ядра также может присоединяться N-ацетилглюкозамин, к которому, правда, больше не присоединяются углеводные остатки. У растений и некоторых беспозвоночных к этому остатку маннозы может присоединяться ксилоза. Проксимальный N-ацетилглюкозамин ядра часто модифицируется присоединением фукозы (Dell and Morris, 2001; Varki et al., 2017).

Модификация N-гликозидов резидентных белков лизосом животных идет по другому пути (Рисунок 10). В этом случае к 6 атому остатка маннозы, присоединенного к консервативному ядру α 1,6-связью, присоединяется N-ацетилглюкозамин-1-фосфат через фосфодиэфирную связь. Далее такой же модификации может подвергаться остаток маннозы, присоединенный к другой ветке консервативного ядра α 1,3-связью. Это препятствует отщеплению этих остатков маннозы и, соответственно, замене их на N-ацетилглюкозамин. В поздних компартментах аппарата Гольджи происходит отщепление остатков N-ацетилглюкозамина, в результате чего экспонируются фосфатные группы, связанные с маннозой. Это обеспечивает связывание с рецепторами, направляющими белок в эндосомы (Guo et al., 2014; Varki et al., 2017).

2.2.1.2. Модификация N-гликозидных цепей в аппарате Гольджи дрожжей.

У дрожжей в аппарате Гольджи остатки маннозы не отщепляются от гликозида $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, а наоборот, присоединяются. Наиболее изучен процесс модификации гликозидных цепей у дрожжей *S. cerevisiae* (Dean, 1999; Munro, 2001). Он может проходить двумя способами. Белки периплазмы и ряд белков клеточной стенки получают большую «маннановую» структуру, включающую каркас (внешнюю цепь) из примерно 50 манноз с короткими боковыми ответвлениями (Рисунок 12). Такой тип гликозилирования часто называют «удлинением внешней цепи» (outer chain elongation). У некоторых белков, например, вакуолярного белка CPY, или белка клеточной стенки Bgl2, основа (core) гликозида $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, формирующаяся в ЭР, в аппарате Гольджи модифицируется присоединением всего нескольких остатков

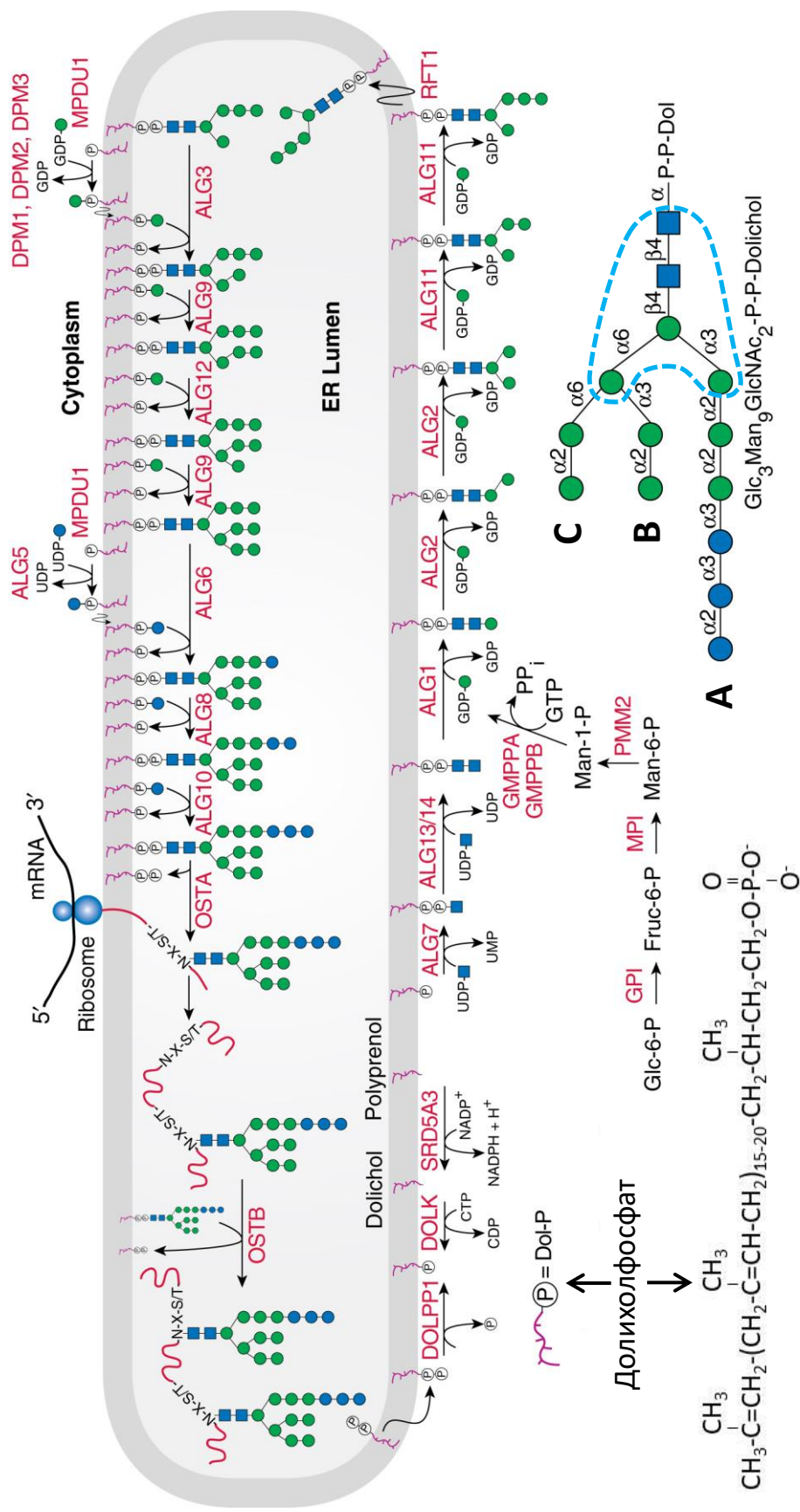


Рисунок 8. Синтез донора N-гликозидной цепи белков у эукариот. На долихолфосфат (Dol-P), фосфатная группа которого направлена на цитоплазматическую сторону мембраны ЭР, фермент Alg7 переносит N-ацетилглюкозамин-1-фосфат (GlcNAc-1-P) с донорного соединения УДФ-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc) с образованием Dol-P-P-GlcNAc, который удлиняется еще на один остаток GlcNAc ферментным комплексом Alg13/14 с использованием того же донорного соединения. В результате ряда реакций происходит последовательное присоединение 5 остатков маннозы с использованием донорного соединения ГДФ-манноза, после чего предшественник переворачивается гликозидной частью на люменальную сторону мембраны ЭР, где происходит присоединение остальных остатков маннозы с использованием в качестве донора долихолфосфат-маннозы и трех остатков глюкозы (донор – долихолфосфат-глюкоза). Полученная гликозидная цепь переносится с предшественника на остаток аспарагина белка олигосахарилтрансферазным комплексом (OSTA и OSTB в клетках млекопитающих). Названия ферментов на схеме даны в соответствии с номенклатурой белков человека HGNC (Human Genome Nomenclature Committee). Для обозначения моносахаридов использованы символы SNFG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>). Схема приводится по (Varki et al., 2017) с незначительными изменениями.

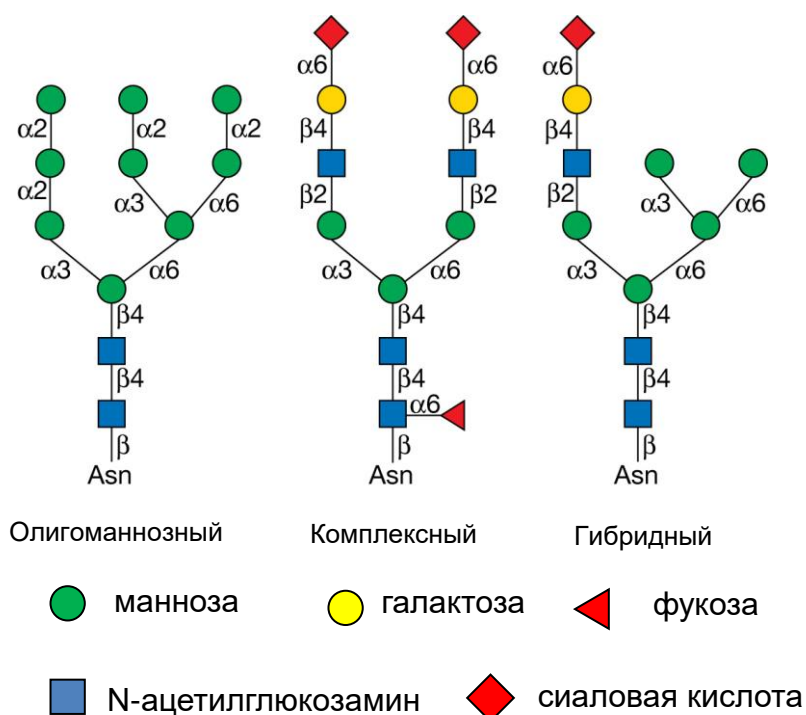


Рисунок 9. Примеры разных типов N-гликозидных цепей белков эукариот. Для обозначения моносахаридов использованы символы SNFG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>). Схема приводится по (Varki et al., 2017).

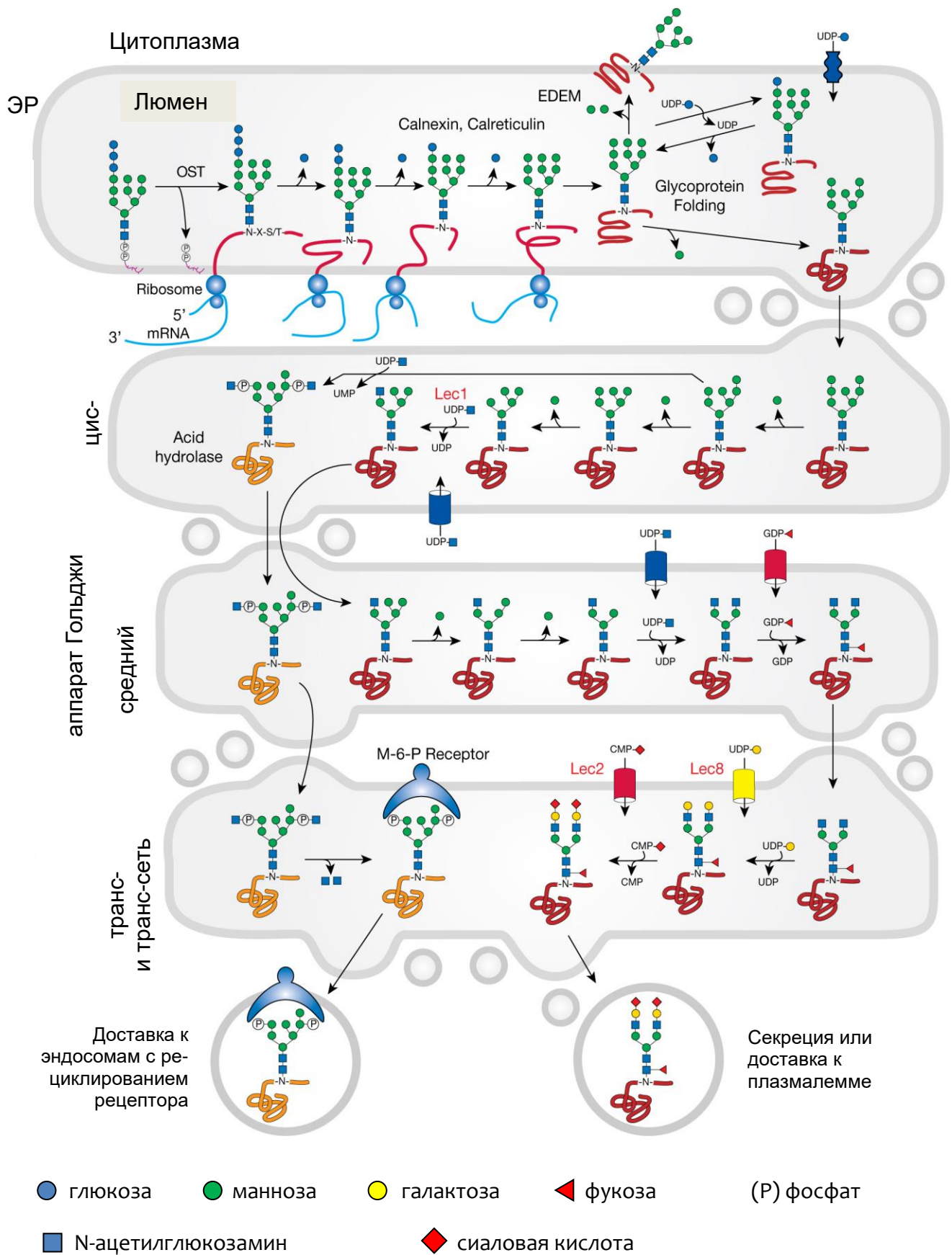


Рисунок 10. Процессинг и созревание N-гликозидов в секреторном пути млекопитающих. Присоединяющийся к белкам в ЭР гликозид $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ перед тем, как белок экспортируется в аппарат Гольджи, процессируется до структуры $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. У большинства белков, попадающих в аппарат Гольджи, эта структура подвергается отщеплению еще трех остатков маннозы, и к ней присоединяется остаток N-ацетилглюкозамина. Далее отщепляется еще два остатка маннозы, и присоединяется еще один остаток N-ацетилглюкозамина. Получающийся «двуантенный» гликан далее модифицируется присоединением фукозы, галактозы и сиаловой кислоты с образованием комплексного N-гликана. Комплексные гликаны могут иметь и существенно более сложную структуру, чем показано на схеме. Модификация гликозидов лизосомных белков происходит по другому пути. В этом случае к маннозным остаткам в 6-ом положении прикрепляются через фосфатную группу остатки N-ацетилглюкозамина. В транс-Гольджи происходит отщепление N-ацетилглюкозамина, в результате чего экспонируются фосфатные группы. Это обеспечивает связывание с рецептором маннозо-6-фосфата, направляющего белки в пре-лизосомные компартменты. Для обозначения моносахаридов использованы символы SNFG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>). Схема приводится по (Varki et al., 2017) с незначительными изменениями.

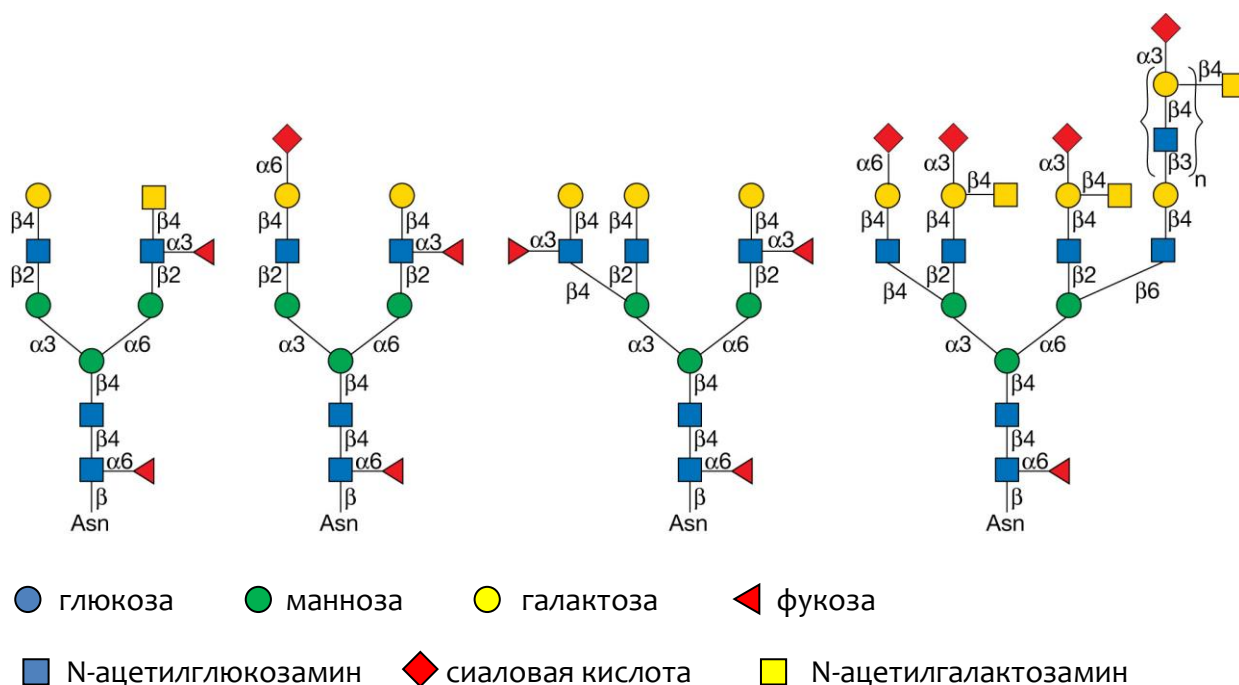


Рисунок 11. Примеры комплексного гликозилирования белков в клетках млекопитающих. Для обозначения моносахаридов использованы символы SNFG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>). Схема приводится по (Varki et al., 2017).

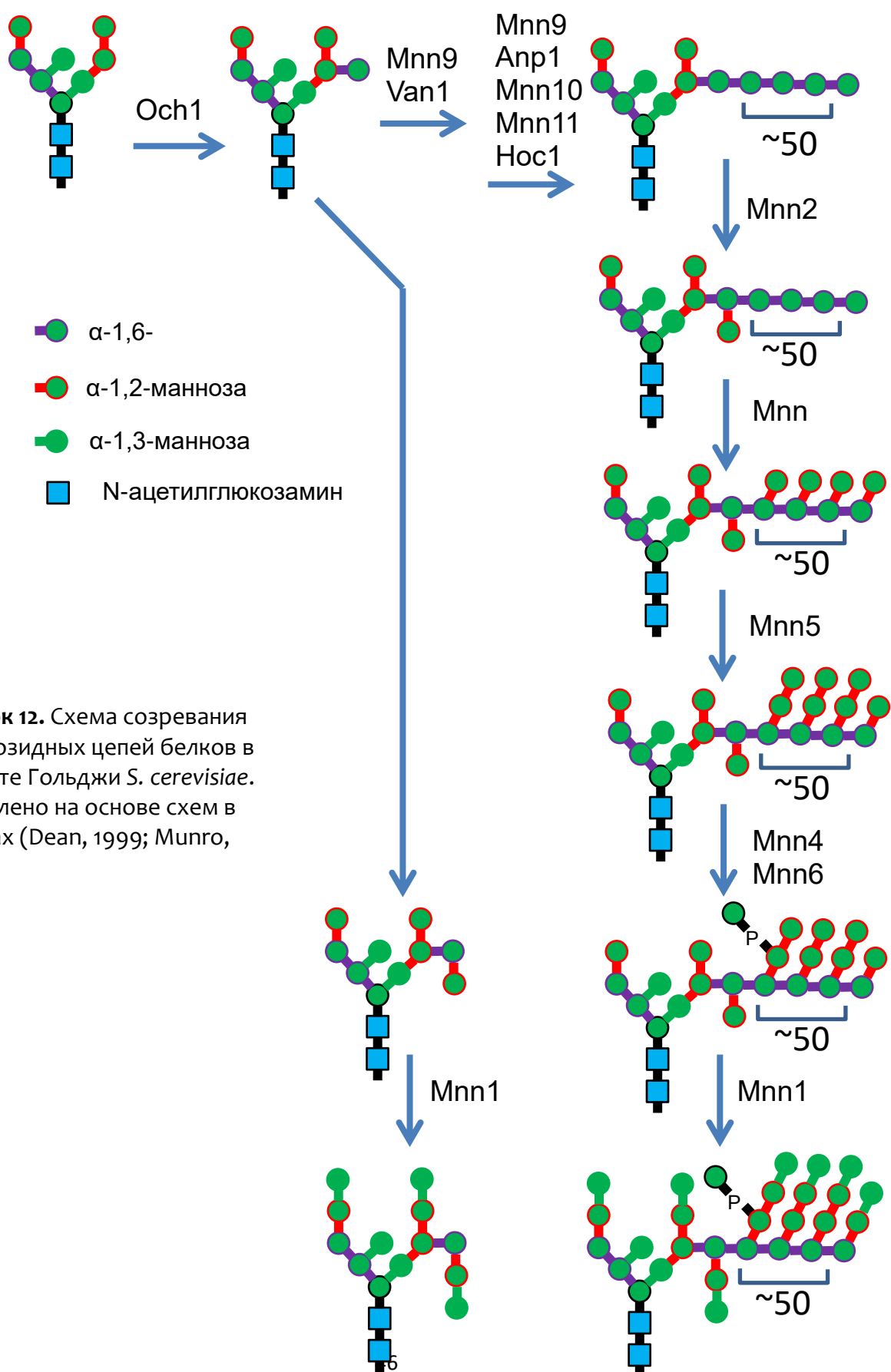


Рисунок 12. Схема созревания N-гликозидных цепей белков в аппарате Гольджи *S. cerevisiae*. Составлено на основе схем в обзорах (Dean, 1999; Munro, 2001).

маннозы (Рисунок 12). Такой тип гликозилирования называют созреванием основы или кора (core maturation). Существенная часть ферментов, вовлеченных в синтез маннановой структуры, была выявлена с использованием мутантов *mnp* (нарушения маннана), которые были получены в работах Ballou и соавторов (Ballou et al., 1973; Raschke et al., 1973). Это позволило выявить селективируемые фенотипы, характерные для нарушений гликозилирования, и получить новые мутанты (*ktr*, *ldb*, *och*, *vrg*) с дефектами гликозилирования (Jungmann and Munro, 1998; Neiman et al., 1997; Rayner and Munro, 1998; Yip et al., 1994). Сопоставление данных об активности ферментов *in vitro* со структурами гликозидов в клетках, лишенных этих ферментов, позволило составить модель пути синтеза маннановой структуры (Рисунок 12) (Dean, 1999).

При попадании белка в аппарат Гольджи независимо от предполагаемого типа дальнейших модификаций трансфераза Och1 присоединяет к гликозидной цепи один α 1,6-маннозный остаток. Элонгация внешней цепи на этом остатке происходит за счет последовательного присоединения большого количества маннозных остатков такой же связью при участии маннан-полимеразных комплексов M-Pol I и M-Pol II. Боковые ответвления внешней цепи образуются при последовательном действии маннозилтрансфераз Mnp2, Mnp5 и Mnp1. Некоторые ответвления модифицируются присоединением фосфоманнозы при участии белков Mnp4 и Mnp6 (Odani et al., 1996; Wang et al., 1997). При «созревании кора» к α 1,6-маннозному остатку, присоединенному трансферазой Och1, добавляется один маннозный остаток (фермент не установлен) α 1,2-связью, а к нему, в свою очередь, еще один, но уже α 1,3-связью при участии трансферазы Mnp1.

У других видов дрожжей созревание N-гликозидов в аппарате Гольджи может существенно отличаться от описанной схемы. Например, у метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* (по новой классификации этот вид разделен на три *Komagataella phaffii*, *K. pastoris* и *K. pseudopastoris*) и *Hansenula polymorpha* (*Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha* по новой классификации) не происходит удлинения внешней цепи и нет α 1,3-связанных маннозных остатков (Kim et al., 2004; Trimble et al., 1991). У *P. pastoris* N-гликозидные цепи, по-видимому, в среднем немного короче, чем у *H. polymorpha*. У *Sch. pombe* очень низкая активность α -маннозидазы ЭР, и белки, экспортирующиеся в аппарат Гольджи, преимущественно имеют N-гликозиды со структурой Man₉GlcNAc₂ (Movsichoff et al., 2005; Ziegler et al., 1994). Такой гликозид

может модифицироваться присоединением остатков галактозы и протяженной неразветвленной внешней цепи, состоящей из α 1,6-маннозы (Ballou et al., 1994; Ballou and Ballou, 1995; Ziegler et al., 1999). У некоторых дрожжей выявлено присоединение и других углеводов к N-гликозидам. Например, у *Kluyveromyces lactis* могут присоединяться остатки N-ацетилглюкозамина (см. обзор Gemmill and Trimble, 1999).

2.2.2. О-гликозилирование.

В отличие от N-гликозилирования, начальные этапы которого консервативны у всех эукариот, к О-гликозилированию, происходящему в секреторном пути, относят довольно разные модификации. В частности, О-гликозилирование у растений заключается в присоединении одного остатка галактозы к определенным остаткам серина и линейных цепочек арабинозы к остаткам гидроксипролина (см. обзор Schoberer and Strasser, 2018). Есть О-гликозилирование, характерное только для животных (Рисунок 13). Например, О-гликозилирование муцинового типа, часто встречающееся у белков позвоночных, инициируется в аппарате Гольджи присоединением остатка N-ацетилгалактозамина, к которому присоединяются другие углеводные остатки (Varki et al., 2017). У дрожжей есть только один тип О-гликозилирования – маннозилирование остатков серина и треонина, при этом он может осуществляться и в клетках животных (Lommel and Strahl, 2009; Neubert and Strahl, 2016). Поскольку этот тип гликозилирования имеет прямое отношение к данному труду, здесь он будет рассмотрен с большей детализацией, чем другие.

О-маннозилирование начинается в ЭР с присоединения первого остатка маннозы к остаткам серина и треонина. Донором маннозы в этой реакции является долихолфосфат-манноза (Orlean, 1990). Эта реакция катализируется белками семейства протеин-О-маннозилтрансфераз (PMT у дрожжей и POMT у млекопитающих). У *S. cerevisiae* есть семь генов *PMT1-7*, кодирующих белки этого семейства. Для шести из них (*PMT1-6*) показано наличие соответствующей функции. На основании филогенетического анализа выделяют три подсемейства этих белков: *PMT1*, *PMT2* и *PMT4*. У *S. cerevisiae* к подсемейству *PMT1* относятся белки *Pmt1* и *Pmt5*, к подсемейству *PMT2* – *Pmt2*, *Pmt3* и *Pmt6*, а к подсемейству *PMT4*, соответственно, только сам *Pmt4*. В отличие от грибов, у животных выявлены по одному

представителю подсемейств PMT2 (белок POMT2) и PMT4 (белок POMT1), но не обнаружено гомолога PMT1 (Goto, 2007).

Члены подсемейства PMT1 образуют гетеродимерный комплекс с членами подсемейства PMT2. В клетках *S. cerevisiae* дикого типа комплекс Pmt1-Pmt2 дает существенно большую часть активности, чем комплекс Pmt3-Pmt5. В отличие от этих двух подсемейств, представители подсемейства PMT4 функционируют как гомодимер (Girrbach and Strahl, 2003). Из белков семейства PMT наиболее детально был проанализирован Pmt1 *S. cerevisiae* и предложена его топологическая модель (Strahl-Bolsinger et al., 1993; Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999). Это интегральный мембранный белок с несколькими транс-мембранными доменами. Две люменальные петли существенны для каталитической активности. Другие белки семейства имеют очень схожие с Pmt1 профили гидрофобности, и, скорее всего, их топология не отличается.

К настоящему моменту пока нет четкого представления, почему одни остатки серина или треонина маннозилируются, а другие нет. При этом для комплексов Pmt1-Pmt2 и Pmt4 выявлены отличия в субстратной специфичности: некоторые белки гликозилируются исключительно одним комплексом, другие – другим, а третьи – и тем и другим (Ecker et al., 2003; Gentzsch and Tanner, 1996; Proszynski et al., 2004). Было показано, что Pmt4 гликозилирует только мембранные белки, а комплекс Pmt1-Pmt2 – и мембранные, и растворимые (Hutzler et al., 2007).

Добавление следующих углеводных остатков к первому остатку маннозы, присоединенному серину или треонину О-маннозилтрансферазой в ЭР, происходит в аппарате Гольджи. У *S. cerevisiae* добавляются только остатки маннозы, образующие линейную цепочку. Сначала присоединяется от 0 до 2 остатков α 1,2-связью маннозилтрансферазами семейства KTR (Lussier et al., 1999), а потом от 0 до 2 остатков α 1,3-связью маннозилтрансферазами семейства MNN1 (Рисунок 14) (Graham and Emr, 1991; Lussier et al., 1999; Romero et al., 1999).

У млекопитающих в аппарате Гольджи к остатку маннозы через 2-й или через 2-й и 6-й атомы углерода могут присоединяться один или два остатка N-ацетилглюкозамина, к которым, в свою очередь, могут присоединяться другие углеводные остатки (Рисунок 14) (Chai et al., 1999; Chiba et al., 1997; Sasaki et al., 1998; Smalheiser et al., 1998).

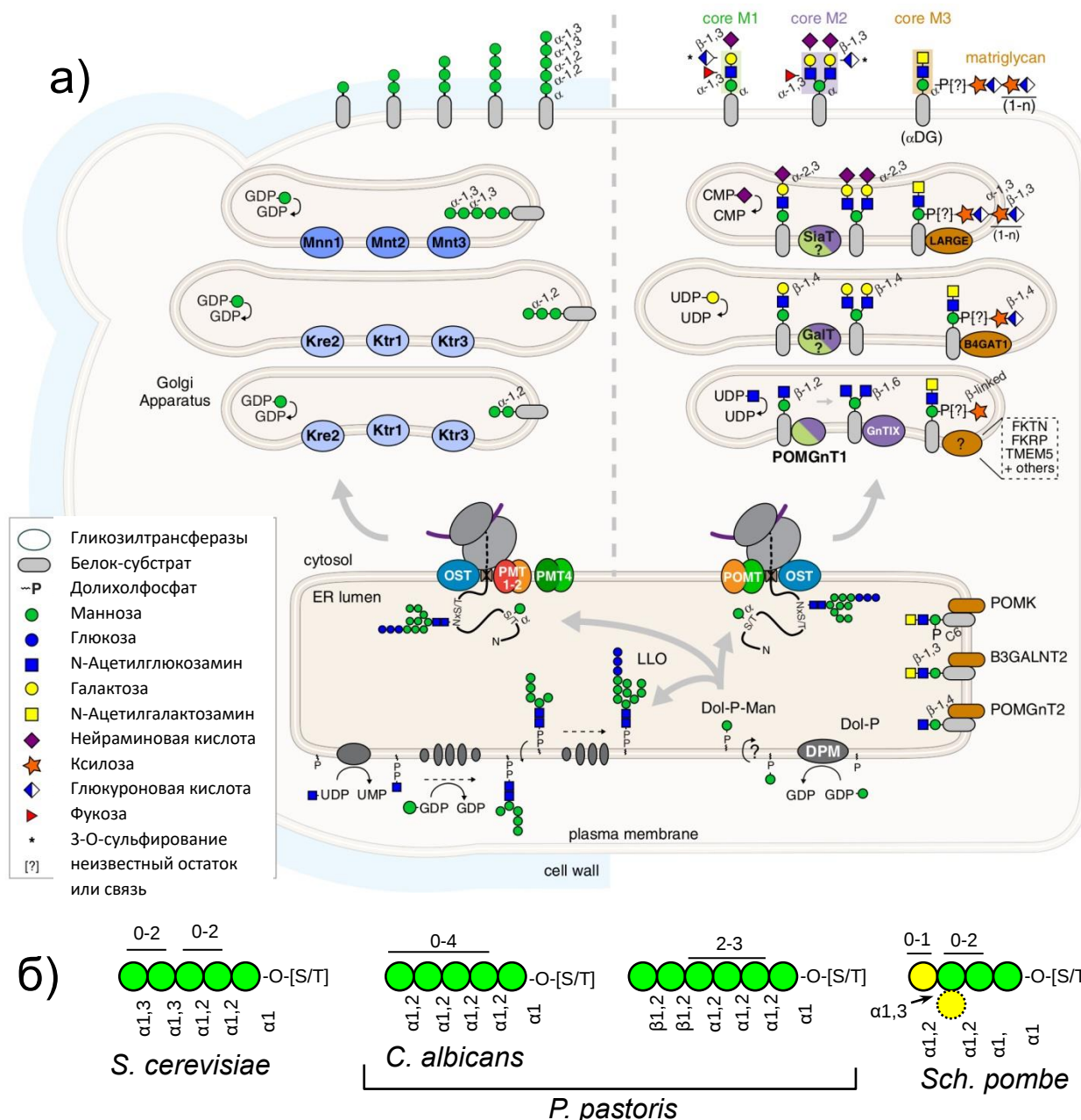


Рисунок 14. О-маннозилирование у дрожжей и млекопитающих.

а) Пути биосинтеза гликанов, образующихся в результате О-маннозилирования у *S. cerevisiae* и млекопитающих. В ЭР с долихол-фосфат-маннозы остаток маннозы переносится на определенные остатки серина и треонина белка-субстрата. В аппарате Гольджи у большинства видов дрожжей к этому остатку маннозы присоединяются линейные цепочки, состоящие только из маннозы. В клетках млекопитающих этот остаток может модифицироваться присоединением одного или двух остатков N-ацетилглюкозамина, к которым присоединяются остатки галактозы, которые затем сиилируются, или остатки N-ацетилгалактозамина. Гликозилтрансферазы, формирующие разные типы гликозидов, обозначены разными цветами. Использована схема из обзора (Neubert and Strahl, 2016).

б) Варианты О-маннозилирования у разных видов дрожжей.

2.2.3. Гликоинженерия дрожжей.

Задачи гликоинженерии в существенной степени связаны с получением рекомбинантных гликопротеидов. Многие белки, используемые в качестве фармакологических препаратов или имеющие потенциал для такого использования, содержат гликозидные цепи. Получение таких белков за счет продукции в чужеродных клетках сопряжено с различными проблемами, связанными с гликозилированием. Продукция в клетках млекопитающих должна обеспечивать гликозилирование, подходящее для человека. Однако характер гликозилирования в клетках разных тканей часто существенно отличается, и даже конкретная клетка может производить большой спектр вариантов гликозидов, что может выводить рекомбинантный белок за рамки требований по гомогенности. К тому же продукция рекомбинантных белков в клетках млекопитающих – процесс весьма затратный, что стимулирует использование для этих целей клеток дрожжей. Однако модификации N-гликозидов в аппарате Гольджи и процесс O-гликозилирования сильно различаются у дрожжей и млекопитающих, поэтому гликопротеиды, производимые клетками дрожжей, сильно иммуногенны для человека. Методы гликоинженерии могут быть применены как для клеток млекопитающих с целью увеличения гомогенности гликозидов и блокирования нежелательных для конкретного белка модификаций, так и для клеток дрожжей для получения гликозилирования, характерного для млекопитающих (см. обзоры Dicker and Strasser, 2015; Laukens et al., 2015).

2.2.3.1. Получение комплексного типа N-гликозилирования у дрожжей.

Субстратом для гликозилтрансфераз аппарата Гольджи млекопитающих является структура $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Для получения такой структуры в клетках дрожжей либо вводят маннозидазы, формирующие такую структуру из "корового" гликозида $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, либо нарушают определенные этапы синтеза липид-связанного предшественника N-гликозида.

Начальным этапом инженерии N-гликозилирования у дрожжей является предотвращение гиперманнозилирования, начинающегося с присоединения α 1,6 маннозного остатка маннозилтрансферазой Och1. Инактивация гена этого фермента делает гликозилирование более гомогенным, но есть и другие маннозилтрансферазы, способные модифицировать "коровый" гликозид. Поэтому у *S. cerevisiae* для этого этапа требуется использование тройного мутанта *och1Δ mnn1Δ mnn4Δ*, у которого существенно снижена скорость роста (Chiba et al., 1998). Этот недостаток был впоследствии преодолен за счет случайного мутагенеза и селекции быстрорастущих клонов (Abe et al., 2008). У дрожжей *Pichia pastoris* также не удается достичь полной гомогенности по структуре N-гликозида $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, инактивировав только *OCH1*, и требуется дополнительно deletировать гены *PNO1* и *MNN4B*, ответственные за присоединение фосфоманнозы, а также *BMT2*, ответственный за β -маннозилирование. Эти модификации заметно не ухудшили ни рост, ни продуктивность штамма (Hamilton et al., 2006).

Следующий шаг – это превращение гликозида $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ в структуру $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, являющуюся ключевым интермедиатом в получении гибридных или комплексных N-гликанов. В клетках млекопитающих это происходит в результате действия α 1,2-маннозидаз I. При высоком уровне продукции α 1,2-маннозидазы *Trichoderma reesei*, снабженной сигналом задержки в ЭР, в штамме $\Delta och1$ *P. pastoris* удалось получить достаточно гомогенный гликозид структуры $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ без инактивации в штамме каких либо дополнительных генов (Vervecken et al., 2004). Очевидно, это обусловлено тем, что эта маннозидаза удаляет все α 1,2-маннозные остатки, которые могли бы модифицироваться природными ферментами дрожжей. Помимо этого подхода введение в штамм $\Delta och1$ гибридного белка состоящего из N-концевой части *Mns1* или *Mnn10* *S. cerevisiae* и каталитического домена α 1,2-маннозидазы *Caenorhabditis elegans* позволило получить структуру $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Такой гибридный белок был отобран из комбинаторной библиотеки, где последовательности, кодирующие N-концевые (лидерные) последовательности трансмембранных белков II-го типа, локализованных в аппарате Гольджи или ЭР *S. cerevisiae* или *P. pastoris*, соединялись с последовательностями, кодирующими α 1,2-маннозидазы различного происхождения. И лидерные, и каталитические последовательности имели разные

варианты длины в месте соединения. Из 608 проверенных вариантов было отобрано два самых эффективных (Choi et al., 2003). Подход с использованием α 1,2-маннозидазы грибов, снабженной сигналом задержки в ЭР, был также опубликован для *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* (*O. parapolymorpha*) и *Y. lipolytica* (De Pourcq et al., 2012; Kim et al., 2004; Moo et al., 2006).

В клетках млекопитающих структура $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ модифицируется N-ацетилглюкозаминилтрансферазой-I (GnT-I) с образованием структуры $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. В работе Vervecken и соавторов (Vervecken et al., 2004) для получения такой структуры было достаточно продуцировать человеческий фермент GnT-I, слитый с лидерной областью белка Kre2 *S. cerevisiae*. Однако другому коллективу авторов кроме такого гибридного белка для полной конверсии $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ в $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ требовалось продуцировать еще и транспортер UDP-GlcNAc аппарата Гольджи из *Kluyveromyces lactis* (Choi et al., 2003; Hamilton et al., 2003).

Чтобы из структуры $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ получить двуантенный гликозид комплексного типа, требуется удаление крайних α 1,3- и α 1,6-маннозных остатков маннозидазой II. Затем должен быть присоединен β 1,2-связью GlcNAc в реакции, катализируемой N-ацетилглюкозаминилтрансферазой-II (GnT-II). Для того чтобы воспроизвести этот процесс в *P. pastoris*, также был использован подход с комбинаторными библиотеками, и были отобраны гибридные белки с лидерной частью от Mnn2 *S. cerevisiae* и каталитической частью маннозидазы II *Drosophila melanogaster* или GnT-II *Rattus norvegicus*. Комбинация этих двух гибридных белков давала высокую гомогенность гликозидов по структуре $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Hamilton et al., 2003). Интересно, что продукция маннозидазы II без GnT-II давала высокую гетерогенность гликозидов и ухудшала рост, что снималось при введении GnT-II.

Присоединение остатков галактозы к остаткам GlcNAc, формирующим антенны гликозида, катализируется β 1,4-галактозилтрансферазой (GalT), использующей в качестве донора галактозы УДФ-галактозу. Несмотря на то, что *P. pastoris* не метаболизирует галактозу, в геноме этих дрожжей был выявлен гомолог переносчиков УДФ-галактозы аппарата Гольджи, а также гомолог цитозольного

фермента УДФ-галактозо-4-эпимеразы, конвертирующего УДФ-глюкозу (De Schutter et al., 2009). Это объясняет то, что введение в клетки *P. pastoris* GalT без дополнительного транспортера и УДФ-галактозо-4-эпимеразы приводило к появлению галактозилированных N-гликозидов (Vervecken et al., 2004). Чтобы увеличить эффективность галактозилирования, потребовалось либо ввести дополнительный цитозольный фермент УДФ-галактозо-4-эпимеразу и переносчик УДФ-галактозы аппарата Гольджи, либо воспользоваться пулом УДФ-глюкозы аппарата Гольджи, обеспечив локализацию УДФ-галактозо-4-эпимеразы в люмене этого компартмента (Bobrowicz et al., 2004; Jacobs et al., 2009).

Сиалирование гликозидов существенно улучшает стабильность белка при введении его в организм, что очень важно для рекомбинантных фармакологических препаратов. Для этой модификации требуется донорное соединение ЦМФ-N-ацетилнейраминавая кислота. Исследователям компании GlycoFi удалось разместить гены пяти этапов биосинтеза этого соединения в одном векторе. Это позволило получить рекомбинантный эритропоэтин, существенная часть которого содержала двуантенные сиалированные гликозиды (Bobrowicz et al., 2011; Li et al., 2006; Nett et al., 2012).

2.2.3.2. Получение у дрожжей N-гликозилирования с меткой маннозо-6-фосфата.

Получение белков с меткой маннозо-6-фосфата на гликозидных цепях актуально для разработки препаратов для заместительной терапии при нарушении лизосомных ферментов. Белки с такой меткой могут узнаваться рецептором маннозо-6-фосфата, интернализироваться и направляться в лизосому. У дрожжей происходит присоединение к маннозным остаткам гликозидных цепей фосфоманнозы, и сверхпродукция белка, катализирующего эту реакцию, может существенно увеличить эффективность этого процесса. Но при этом нужно решить по меньшей мере две задачи. Первая - это предотвратить присоединение α 1,6-маннозы, инициирующей образование характерной для дрожжей внешней цепи на гликозиде Man₈GlcNAc₂. Задача решается делецией гена *OSN1*. Другая задача – это удаление концевого остатка маннозы для экспонирования фосфата. Из почвы была выделена

бактерия, секретирующая белок с нужной активностью (Chiba et al., 2002). Позже подходящий фермент, названный CcGH92_5, был выявлен у *Cellulosimicrobium cellulans* (*Arthrobacter luteus*), идентифицирован его ген и использован для "де-кепирования" фосфата в дрожжевом гликозиде (Tiels et al., 2012). После получения "де-кепированного" гликозида выяснилось, что для эффективного эндоцитоза за счет рецептора маннозо-6-фосфата требуется удаление концевых α -маннозных остатков. Этого удалось достичь с использованием другого фермента *C. cellulans*, названного CcGH92_4, или с помощью α -маннозидазы из канавалии мечевидной.

2.2.3.3. Инженерия О-гликозилирования у дрожжей.

Углеводные цепи, присоединяемые к S/T-связанному маннозному остатку в аппарате Гольджи *P. pastoris*, состоят из α 1,2-маннозных остатков, поэтому для их удаления *in vivo* достаточно продуцировать секретируемую α 1,2-маннозидазу *T. reesei*. Однако удалять S/T-связанный остаток маннозы приходится с помощью обработки α -маннозидазой из канавалии мечевидной *in vitro* (Gomathinayagam and Hamilton, 2014). К сожалению, такой способ удаления гликозидов сложен и дорог в производстве, поэтому может подойти только для особо ценных фармакологических препаратов (Laukens et al., 2015). С другой стороны, одиночный маннозный остаток можно использовать для дальнейшей инженерии, присоединяя к нему углеводные остатки, характерные для О-гликозидов человека (Hamilton et al., 2013).

Чтобы получить О-фукозилирование домена EGF человеческого активатора плазминогена урокиназного типа при продукции в клетках *S. cerevisiae*, в этот организм-хозяин был введен метаболический путь, обеспечивающий эту модификацию (Chigira et al., 2008; Nakayama et al., 2003). О-гликозилирование муцинового типа также было воспроизведено у *S. cerevisiae* (Amano et al., 2008).

Несмотря на все эти достижения, полного избавления от характерного для дрожжей О-гликозилирования пока достичь не удалось (Laukens et al., 2015).

2.3. Укладка белков в ЭР

Белки транслоцируются в просвет ЭР практически как развернутая полипептидная цепь, хотя некоторые элементы вторичной структуры могут формироваться еще на рибосоме и проходить через канал Sec61 (Woolhead et al., 2004). В ЭР транслоцированные полипептиды должны свернуться в функциональный белок или предшественник, а компоненты мультисубъединичных белков должны образовать полностью собранные комплексы. Если этого не происходит, белок не экспортируется из ЭР в аппарат Гольджи (Hammond and Helenius, 1994). В укладке и сборке транслоцирующихся белков в ЭР участвует большое количество компонентов, набор которых и роль каждого из них может заметно отличаться у разных таксономических групп эукариот. В геноме млекопитающих около трети открытых рамок считывания кодирует белки, транслоцирующиеся в ЭР (Braakman and Bulleid, 2011). Такое разнообразие секретируемых белков, многих из которых имеют мультидоменную структуру и/или являются мультисубъединичными, по-видимому, определяет разнообразие белковых компонентов ЭР, принимающих участие в их укладке (Таблица 1). Из информации, приведенной в таблице, можно заключить, что некоторые белки принимают участие в нескольких процессах, а для некоторых функций может быть предназначено несколько белков. Например, шаперон BiP вовлечен в транслокацию (Haigh and Johnson, 2002), в регуляцию ответа клетки на накопление несвернутых белков в ЭР (Unfolded Protein Response, UPR) (Bertolotti et al., 2000), в направление белков на деградацию (Skowronek et al., 1998), а также непосредственно в контроль укладки белков за счет взаимодействия с гидрофобными участками в процессе их сворачивания (Fourie et al., 1994; Pobre et al., 2019). Также белок PDI не только катализирует изомеризацию дисульфидных связей, но и может в какие-то моменты работать как полипептид-связывающий белок для стабилизации интермедиатов при сборке мультисубъединичных комплексов (Wilson et al., 1998), является субъединицей пролингидроксилазы (Koivu et al., 1987) и содействует направлению белков на деградацию (Wahlman et al., 2007). «Избыточность» по количеству белков для одной активности может быть проиллюстрирована на примерах белков семейств протеиндисульфидизомераз (Protein Disulfid Isomerase, PDI) и пептидил-пролил-цис-транс-изомераз (Peptidyl

Prolyl cis/trans Isomerase, PPI) (Таблица 1). Большинство белков семейства PPI в основном остаются плохо охарактеризованными по субстратной специфичности, но можно предполагать, что при таком их количестве у некоторых из них она может перекрываться. У белков семейства PDI выявлена ограниченная специфичность (Jessop et al., 2009, 2007), но отсутствие одного из них может компенсироваться другими представителями семейства (Soldà et al., 2006).

Работу машинерии ЭР по укладке и сборке белков можно проиллюстрировать на примере синтеза иммуноглобулинов G (IgG) (см. обзор Feige et al., 2010). Молекула IgG собирается из двух тяжелых и двух легких цепей. В тяжелых цепях выделяют четыре структурных домена, в легких – два (Рисунок 15) (Huber et al., 1976). Неуложенные тяжелые цепи через домен C_{H1} связываются с BiP, что обеспечивает их задержку в ЭР (Bole et al., 1986; Hendershot et al., 1987). В отличие от других доменов, домен C_{H1} в изолированном виде в растворе ведет себя как неструктурированный домен. Формирование правильной конформации этого домена происходит в результате взаимодействия с уложенным доменом C_L, после формирования внутренних S-S связей катализируемого ферментом семейства PDI P5 (Jessop et al., 2009), изомеризации пролина ферментом семейства PPI циклофилином B, а также при участии шаперона BiP (Feige et al., 2009). Связывание BiP с белками-клиентами происходит в результате его взаимодействия с ко-факторами семейства ERdj (Cheetham and Caplan, 1998; Pobre et al., 2019). Факторами обмена нуклеотида для BiP является белок Grp170, также относящийся к семейству Hsp70, несмотря на большую молекулярную массу (Andréasson et al., 2010), и белок BAP, по-видимому, являющийся ортологом дрожжевого белка Sil1 (Chung et al., 2002). Ортологами BiP и Grp170 у дрожжей являются белки Kar2 и Lhs1, соответственно (Craven et al., 1996; Rose et al., 1989; Steel et al., 2004).

2.3.1. Роль N-связанных гликозидных цепей в контроле укладки белков в ЭР.

Множество белков, транслоцирующихся с ЭР, модифицируются присоединением гликозидных цепей к остаткам аспарагина, находящимся в определенном контексте, (N-гликозилирование), а также серина и треонина (О-гликозилирование). Эти модификации существенно влияют на укладку белка, не только увеличивая

полярность полипептидной цепи, но и участвуя во взаимодействии с лектинами ЭР. Участие N-гликозидных цепей в активном контроле укладки белка подробно охарактеризовано и у млекопитающих, и у эволюционно удаленных друг от друга видов дрожжей *S. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* (см. обзор Parodi, 1999).

Таблица 1. Компоненты машинерии укладки белков в ЭР млекопитающих (см обзор (Braakman and Bulleid, 2011) и ссылки в нем).

Семейство	Компонент	Функция
Шапероны		
Hsp90	Grp94	Необходим для секреции и ERAD определенных белков
Hsp70	BiP	Транслокация белков в ЭР, UPR, укладка и сборка белков
Ко-шапероны		
Hsp110	GRP170	Фактор обмена нуклеотида для BiP
	BAP/SIL1	Фактор обмена нуклеотида для BiP
Hsp40	ERDJ1	Ко-шаперон BiP
	ERDJ2/SEC63	Ко-шаперон BiP; транслокация в ЭР
	ERDJ3	Ко-шаперон BiP; укладка белков и ERAD
	ERDJ4	Ко-шаперон BiP; ERAD
	ERDJ5	Ко-шаперон BiP
	ERDJ6	Ко-шаперон BiP; защита от стресса в ЭР
Пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы (ППИ)		
Cyp	Циклофилин Б	ППИ
FKBP	FKBP2	ППИ
	FKBP7	ППИ
	FKBP9	ППИ
	FKBP10	ППИ
	FKBP11	ППИ
	FKBP14	ППИ
Оксиредуктазы		
PDI	PDI	Образование и изомеризация дисульфидных связей; возможно является шапероном; участвует в ERAD
	ERp57	Оксиредуктаза, ассоциированная с кальнексином и кальретикулином
	ERp72	предположительно оксиредуктаза
	P5	ассоциирована с BiP для укладки определенных клиентов
	PDip	панкреатическая PDI
	PDIR	предположительно оксиредуктаза
	ERp46	Требуется для защиты от стресса в ЭР
	ERp18	предположительно оксиредуктаза

	ERp29	Предотвращает несвоевременную олигомеризацию
	ERp27	Связывается с пептидами
	ERp44	Тиол-зависимая задержка в ЭР, регуляция рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата
	PDILT	Тканеспецифичная PDI, образующая комплекс с кальмегином
	TMX1	Защита от стресса; предположительно участвует в ERQC
	TMX2	предположительно оксиредуктаза
	TMX3	
	TMX4	предположительно оксиредуктаза
	AGR2	предположительно оксиредуктаза
	pERp1	оксидативная укладка белков
Сульфгидрил-оксидазы	Ero1 α	Регуляция редокс условий в ЭР
	Ero1 β	Индукцируется UPR
PDI-Erv	QSOX1	Тиол-оксидаза
	QSOX2	Предположительно тиол-оксидаза
Перокси-редоксин	PrxIV	Тиол-оксидаза, участвующая в метаболизме H ₂ O ₂
Лектины		
Кальнексин	Кальнексин	Связывается с моно-глюкозилированными N-гликозидами
	Кальретикулин	Связывается с моно-глюкозилированными N-гликозидами для задержки белков в ЭР
	Кальмегин	Тканеспецифичный гомолог кальнексина
UGGT	UGGT	Реглюкозилирование несвернутых белков
Ost3	IAP	Компонент олигосахарил-трансферазного комплекса
	N33	Компонент олигосахарил-трансферазного комплекса
Клиент-специфичные факторы укладки		
	P4H	Шаперон для негидроксилированных трех-спиральных доменов.
	Hsp47	Предотвращает преждевременную ассоциацию мономеров проколлагена в ЭР
	RAP	Способствует укладке представителей семейства LDL рецепторов
	Mesd	Помогает секреции представителей семейства LDL рецепторов
	MTP	Помогает сборке и секреции апоВ-содержащих липопротеидов.
	Тапасин	Вовлечен в связывание МНС класса I с пептидами
	Ii (CD74)	Предотвращает агрегацию α и β цепей МНС класса II.
	Cosmc	Предотвращает агрегацию и деградацию

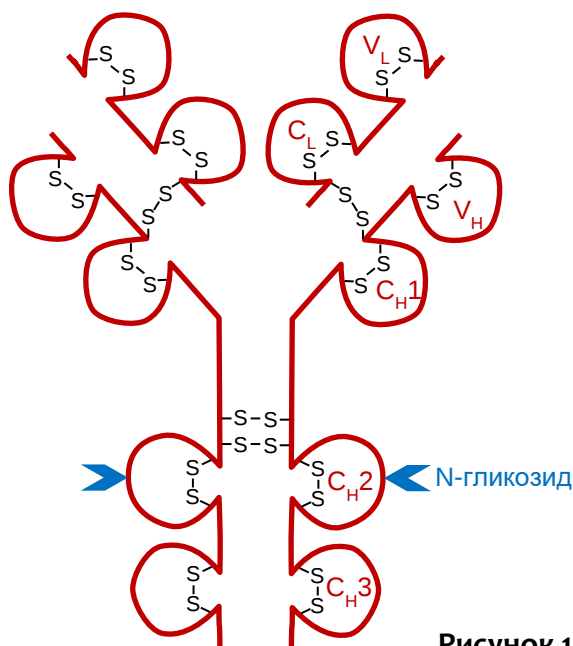


Рисунок 15. Схема молекулы иммуноглобулина G.

N-связанный гликозид переносится на транслоцирующую полипептидную цепь с предшественника целым блоком. У большинства таксономических групп эукариот этот блок имеет структуру $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (см. список сокращений, Рисунок 8 и (Varki et al., 2017)). Практически сразу после присоединения блока терминальный остаток глюкозы, присоединенный α -1,2 связью, отщепляется глюкозидазой I (Рисунок 8 Рисунок 16). После этого другой фермент, глюкозидаза II, отщепляет следующий α -1,3-связанный остаток глюкозы с образованием моно-глюкозилированного интермедиата $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Этот гликан распознается лектинами ЭР, кальретикулином, который является растворимым белком, и его паралогом кальнексином, мембранным белком первого типа (Hammond et al., 1994; Jackson et al., 1994; Ou et al., 1993). Кальретикулин вместе с ко-факторами, такими как ППИ циклофилин В и оксиредуктаза ERp57, способствует укладке транслоцированного белка с образованием S-S связей (Molinari and Helenius, 1999; Schrag et al., 2001). Связывание гликозида с кальретикулином и кальнексином не является прочным, что позволяет глюкозидазе II отщепить последний остаток глюкозы, предотвращая дальнейшее связывание с кальретикулином. Если какие-то

домены белка остались неужоженными, он связывается с ферментом UGGT (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase), узнающим несвернутые белки. Этот фермент присоединяет остаток глюкозы на то же место, что позволяет белку снова пройти цикл связывания с кальнексином/кальретикулином и дегликозилирования (Ganan et al., 1991; Soldà et al., 2007; Tessier et al., 2000; Trombetta and Helenius, 2000). Кальнексин и кальретикулин могут связываться с белком в процессе его транслокации, таким образом конкурируя за связывание с BiP. Выбор связывания в пользу первых может определяться наличием N-гликозида вблизи от N-конца белка (Molinari and Helenius, 2000). Крайние маннозные остатки, присоединенные α -1,2 связью, также могут отщепляться в ЭР (Benyair et al., 2015; Clerc et al., 2009; Quan et al., 2008). Отщепление крайнего остатка ветви В (Рисунок 8; Рисунок 16) маннозидазой I ЭР (белок Mns1 у *S. cerevisiae* или EDEM2 у млекопитающих) существенно ухудшает связывание с UGGT (Sousa et al., 1992), что снижает вероятность реглюкозилирования, необходимого для связывания с кальнексином/кальретикулином. Снижение связывания белка с UGGT при удалении этого остатка маннозы должно быть особенно выражено, если белок уже принял правильную конформацию. Получающаяся в результате этого структура гликозида Man₈GlcNAc₂ подходит для экспорта белка из ЭР (Dancourt and Barlowe, 2010). Последующее отщепление других α -1,2 связанных остатков маннозы увеличивает сродство к лектинам, направляющим белок на деградацию (Aebi et al., 2010).

В клетках грибов есть ортолог кальнексина, но отсутствует его растворимый паралог кальретикулин. У некоторых видов дрожжей, включая *S. cerevisiae*, отсутствует белок UGGT, поэтому белки не реглюкозилируются в процессе укладки, а процессинг глюкозных остатков N-гликозидных цепей, по-видимому, выполняет роль таймера, выделяющего промежуток времени для укладки белка (Parodi, 1999). У многих других видов дрожжей, включая *Sch. pombe*, *O. polymorpha* и *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), есть ген, кодирующий этот белок (Delic et al., 2013). Однако экспериментальные данные о функции UGGT получены только для *Sch. pombe*, и они показывают существенное сходство цикла дегликозилирования/ре-глюкозилирования у этого вида дрожжей и у клеток животных (Parodi, 1999).

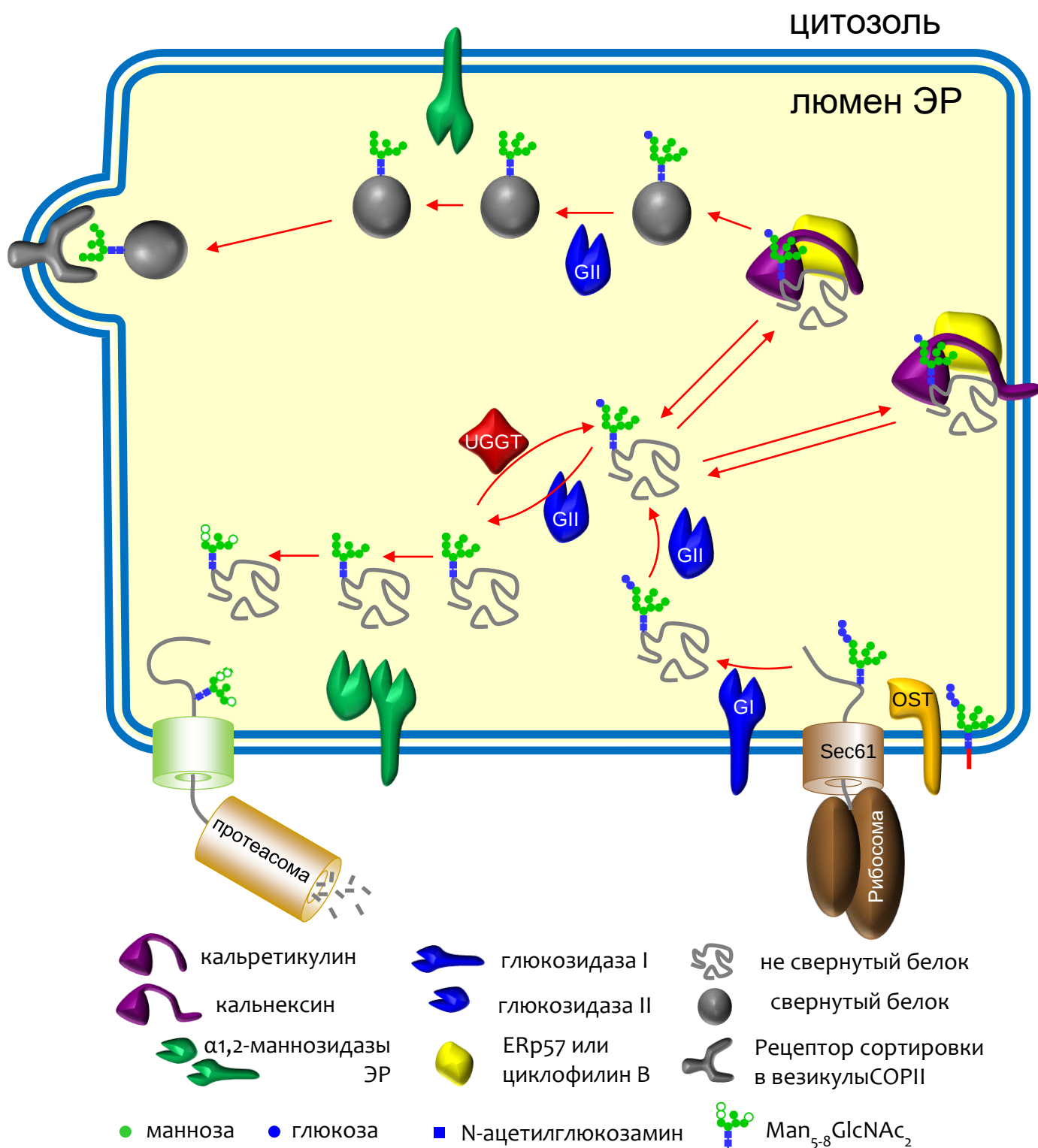


Рисунок 16. Схема контроля укладки белка в ЭР в ходе циклов деглюкозилирования-реглюкозилирования N-связанных гликозидных цепей (объяснения в тексте).

Важно отметить, что процесс укладки белка сложно отделить от процесса контроля того, завершилась ли она и способна ли завершиться. В контроле качества укладки белков в ЭР (endoplasmic reticulum quality control, ERQC) принимают участие те же компоненты, что и в самом процессе укладки, и определить момент, когда заканчивается один процесс и начинается другой, можно только условно. Однако, по-видимому, процессы синтеза, укладки и контроля ее качества могут по-разному распределяться в ЭР. В частности, было выявлено, что кальретикулин, глюкозидаза II и UGGT распределены неравномерно в шероховатом ЭР, что указывало на наличие зон для укладки белков. Более того, существенная часть этих белков локализовалась не в шероховатом ЭР, а в пост-ЭР кластере, а некоторое количество и в гладком ЭР (Zuber et al., 2001). Локализация маннозидазы I в специальных везикулах, образовавшихся из ЭР, возможно, позволяет этому ферменту более эффективно отщеплять α -1,2-связанные маннозные остатки от гликозидов дефектных белков, чтобы направить эти белки на деградацию (Benyair et al., 2015).

2.3.2. Роль О-гликозилирования в контроле укладки белков в ЭР.

Имеющаяся информация о роли О-гликозилирования в укладке белков в ЭР существенно более скудная. Ряд белков имеют в своем составе участки, богатые серином и треонином, которые модифицируются присоединением маннозных цепей. В частности, у дрожжей в ферменте хитиназа такой участок отделяет каталитический домен от связывающего, а в мембранных рецепторах семейства Wsc – лиганд-связывающий домен от мембранного. Множество гликозидов, с одной стороны, делает полипептидную цепь более полярной, а с другой – менее подвижной.

О-гликозилирование может конкурировать с N-гликозилированием. В частности, у белка Csw5 *S. cerevisiae* есть участок, который потенциально может модифицироваться присоединением N-гликозида. Однако в норме модификация остатка треонина в этом участке за счет присоединения остатка маннозы предотвращает N-гликозилирование, а ингибирование О-гликозилирования позволяет присоединиться N-гликозиду (Ecker et al., 2003). Было обнаружено, что

при транслокации в ЭР белок GFP О-гликозилируется, что мешает ему приобрести правильную конформацию.

У дрожжей О-маннозилированию могут специфически подвергаться неуложенные белки, которые должны быть направлены на деградацию (Goder and Melero, 2011; Harty et al., 2001; Hirayama et al., 2007; Li et al., 2012; Nakatsukasa et al., 2004; Rubenstein et al., 2012; Vashist et al., 2001). О-маннозилирование неуложенных белков может предотвращать их непродуктивное связывание с шапероном Kar2 (BiP) (Xu et al., 2013). Кроме того, такая модификация делает полипептидную цепь более полярной, что снижает вероятность образования агрегатов до того, как белок будет направлен на деградацию (Xu and Ng, 2015).

2.3.3. Элиминация несвернутых белков в ЭР.

Заметная доля молекул белков, транслоцирующихся в ЭР, оказывается неспособной приобрести правильную конформацию и отбраковывается системой контроля качества ERQC. При этом в люмене ЭР нет протеаз, которые могли бы обеспечить утилизацию этих молекул. Для этого белок должен быть транслоцирован в цитоплазму (см. обзор Sun and Brodsky, 2019). Поскольку сама деградация белка происходит не в ЭР, ее называют ассоциированной с ЭР (endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD). У дрожжей выделяют три типа ERAD в зависимости от того, как локализована поврежденная область белка: люменальные белки утилизируются по пути ERAD-L, трансмембранные белки при нарушении мембранных доменов – по пути ERAD-M, при нарушении цитозольных доменов – по пути ERAD-C (Рисунок 17) (Hampton et al., 1996; Hiller et al., 1996; Jensen et al., 1995; McCracken and Brodsky, 1996; Sommer and Jentsch, 1993; Ward et al., 1995; Werner et al., 1996). Ключевым компонентом систем ERAD-L и ERAD-M является убиквитин-лигаза Hrd1, а ERAD-C – убиквитин-лигаза Doa10. Лектин Yos9 связывает несвернутые белки с подходящей структурой N-гликозида (см. выше) и доставляет их к белку Hrd3, являющемуся компонентом комплекса Hrd1 (Рисунок 171; (Carvalho et al., 2006; Denic et al., 2006; Plemper et al., 1999; Xie et al., 2009)). Домен белка Hrd1, отвечающий за убиквитин-лигазную активность, находится на цитозольной стороне мембраны (Schoebel et al., 2017), и, чтобы быть убиквитинилированным, белку-клиенту ERAD-L

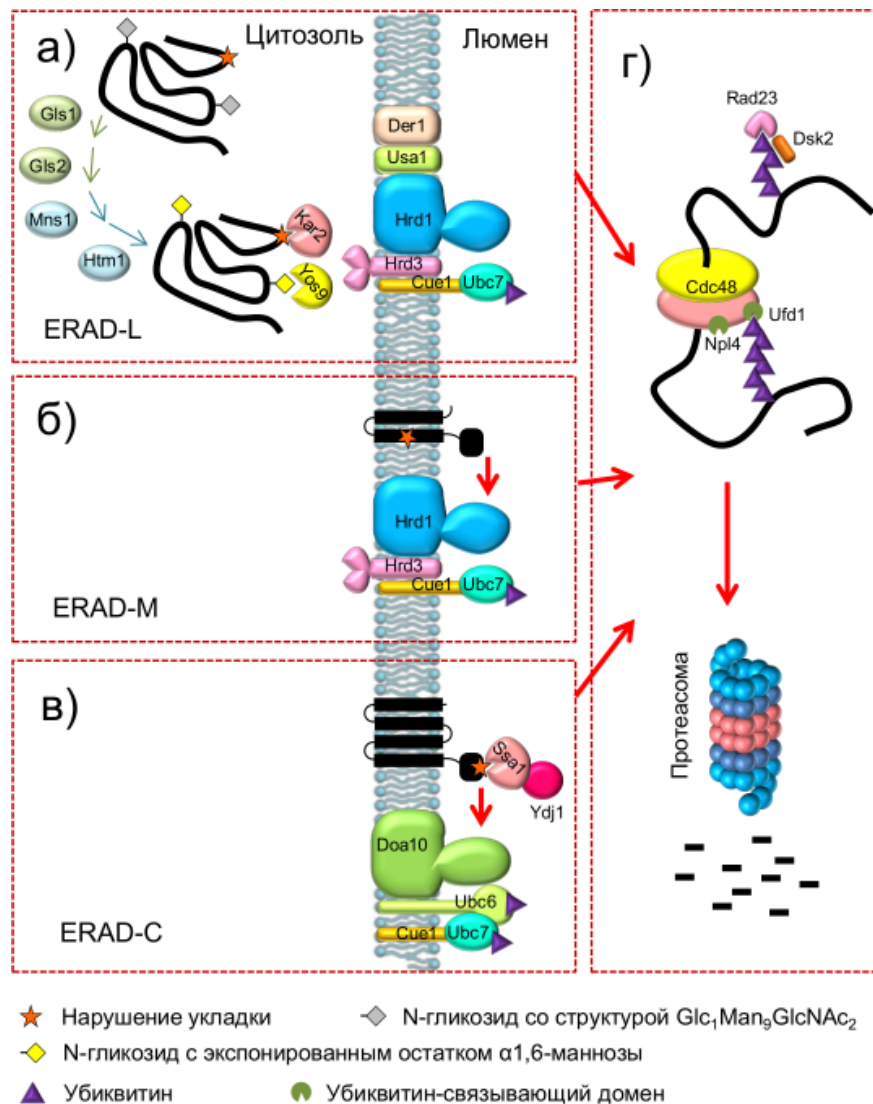


Рисунок 17. Три ветви пути ERAD у дрожжей. а) Процессинг N-связанных гликозидов (серые ромбы), присоединяемых к белку в ходе транслокации в люмен ЭР, при нарушении укладки (красная звездочка) люменальных участков белка приводит к образованию углеводных цепей (желтые ромбы), обеспечивающих распознавание белка, как субстрата ERAD-L. Шапероны (например, Kar2) и лектины (например, Yos9) захватывают субстрат, чтобы доставить его к комплексу Hrd1 для ретротранслокации, сопряженной с убиквитинилированием. б) Белки, имеющие нарушения участков, погруженных в мембрану, становятся субстратами ERAD-M. Они распознаются и убиквитинилируются комплексом Hrd1. в) Субстратами ERAD-C становятся мембранные белки с нарушениями укладки в их цитозольных доменах. Эти нарушения распознаются цитозольными шаперонами (например, Ydj1 и Ssa1), которые обеспечивают их взаимодействие с убиквитин-лигазой Doa10. Эти три ветви ERAD соединяются на этапе участия в ретротранслокации комплекса Cdc48 (белки Cdc48, Ufd1 и Npl4), взаимодействующего с убиквитином в составе субстратов и направляющего субстраты в 26S протеасому для деградации при участии факторов Rad23 и Dsk2. Схема взята из обзора (Sun and Brodsky, 2019) с небольшими изменениями.

нужно транслоцироваться через мембрану. Считалось, что каналом ретро-транслокации является тот же белок Sec61, через который белки попадают в люмен ЭР; были также предположения, что это белок Der1 (см. обзор Sun and Brodsky, 2019), однако более поздние работы указывают на то, что этим каналом является Hrd1 (Baldridge and Rapoport, 2016; Schoebel et al., 2017). В случае субстратов ERAD-C остается неясным, извлекаются ли они из мембраны без канала транслокации, или в этом качестве работает убиквитин-лигаза Doa10 (Kreft et al., 2006; Ravid et al., 2006). Убиквитинилированный субстрат направляется на деградацию в 26S протеасому посредством комплекса Cdc48 (Braun et al., 2002; Jarosch et al., 2002). Комплекс Cdc48 обеспечивает «протягивание» субстрата через мембрану за счет энергии АТФ (Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001).

Чтобы быть направленным на деградацию посредством ERAD-L, белку не обязательно содержать N-гликозидную цепь. Не гликозилированные белки в клетках млекопитающих направляются на деградацию при участии тех же лектинов OS-9 и ХТР3-В, а также маннозидазо-подобного белка EDEM1, что и гликозилированные субстраты. Взаимодействие не гликозилированных субстратов с этими компонентами ERAD может быть опосредованным, например, связыванием с шапероном BiP и взаимодействующими с ним белками (Shenkman et al., 2013).

Деградации через ERAD могут подвергаться не только неспособные принять правильную конформацию вновь синтезированные белки, но и некоторые белки, оказавшиеся в определенных условиях избыточными. Эта система также может использоваться некоторыми вирусами для «взлома» защиты организма-хозяина (см. обзор (Sun and Brodsky, 2019).

При накоплении аберрантных белков, с которыми не справляется ERAD, а также при ряде стрессов, части ЭР могут подвергаться аутофагии (Grumati et al., 2018).

2.3.4. Ответ клетки на накопление несвернутых белков в ЭР.

Если емкости машинерии ЭР, участвующей в укладке белков, не хватает для того, чтобы справиться с большим потоком транслоцирующихся полипептидов, то клетка

может увеличить синтез компонентов этой машинерии. Сигналом к этому является накопление несвернутых белков в этом компартменте.

В отличие от высших эукариот, у дрожжей выявлена только одна регуляторная цепь, обеспечивающая ответ клетки на накопление несвернутых белков в ЭР (unfolded protein response, UPR). В конце этой цепи находится транскрипционный фактор *Has1* (Mori et al., 1996; Xia, 2019). Его ген содержит неканонический (несплайсосомный) интрон, отделяющий первый экзон, который составляет большую часть гена, от второго, включающего последние 18 значащих кодонов. Несплайсированная мРНК *HAS1* может выходить из ядра в цитозоль и транслироваться, но в результате получается белок, у которого последние 18 аминокислотных остатков заменены на 10-членный пептид, кодируемый фрагментом интрона, и такой белок неэффективен как транскрипционный фактор. Кроме того, несплайсированная мРНК *HAS1* очень неэффективно транслируется. Сплайсинг мРНК этого гена происходит при участии протеинкиназы/эндонуклеазы *Ire1*, которая разрезает мРНК по границам интрона, а тРНК-лигаза *Trl1* соединяет экзоны. В результате этого получается мРНК, кодирующая полнофункциональный транскрипционный фактор, который регулирует множество генов (Travers et al., 2000; Xia, 2019).

Ire1 является трансмембранным белком ЭР первого типа, каталитические домены которого находятся с внешней стороны мембраны, а с люменальной стороны находится часть, участвующая в детекции накопления несвернутых белков. В качестве реакции на накопление несвернутых белков в ЭР происходит олигомеризация *Ire1*, что индуцирует аутофосфорилирование этого белка и активацию эднуклеазной части (Korennykh et al., 2009; van Anken et al., 2014).

У млекопитающих есть аналогичный путь ответа на накопление несвернутых белков в ЭР. Белок *Ire1* также вырезает интрон из мРНК транскрипционного фактора, который в данном случае называется *XBP1*. Две изоформы *Ire1*, *Ire1α* и *Ire1β*, кодируются двумя генами-паралогами. Ген, кодирующий изоформу α , выше экспрессируется (Huang et al., 2019). Было показано, что люменальная часть *Ire1* связывается с *BiP* (GRP-78), что предотвращает активацию *Ire1*. Если *BiP* оказывается связанным с несвернутыми белками при их избытке, *Ire1* олигомеризуется и активируется в результате аутофосфорилирования. Кроме мРНК *XBP1* эднуклеаза

Ire1 может разрезать другие мРНК, в зависимости от их последовательности и нахождения вблизи ЭР (Hollien and Weissman, 2006), что позволяет быстро снизить нагрузку на ЭР. Кроме того, изоформа β может разрезать 28S рибосомную РНК, что позволяет снизить трансляцию на матрицах вблизи ЭР в условиях стресса (Iwawaki et al., 2001).

Помимо пути Ire1-XBP1 у млекопитающих есть еще два сигнальных пути для ответа на стресс в ЭР (см. обзор (Lai et al., 2007)). В пути, связанном с модуляцией активности фактора инициации трансляции eIF2 α , задействован белок PERK (Harding et al., 1999). Так же как и Ire1, этот белок локализуется на мембране ЭР и имеет протеинкиназный домен (но не эндонуклеазный) с внешней стороны мембраны. Его N-концевая люменальная часть вовлечена во взаимодействие с BiP/GRP78, которое предотвращает аутофосфорилирование и димеризацию PERK. Активированная протеинкиназа фосфорилирует серин-51 eIF2 α , что снижает эффективность инициации трансляции, при этом фосфорилированный фактор предпочтительнее иницирует трансляцию на мРНК транскрипционного фактора ATF4. ATF4 активирует транскрипцию генов, существенных для адаптации к этому стрессу (Lai et al., 2007). Среди генов, активируемых ATF4, есть ген GADD34, кодирующий регуляторную субъединицу протеинфосфатазы 1с, которая дефосфорилирует серин-51 eIF2 α , в результате чего восстанавливается трансляция (Novoa et al., 2001).

Ключевым элементом третьего пути является белок ATF6. В норме это трансмембранный белок ЭР, и его люменальная часть может связываться с BiP (GRP78). Высвобождение из этого взаимодействия приводит к релокализации белка в аппарат Гольджи, где происходит процессинг протеазами S1P и S2P, последовательно гидролизующими полипептидную цепь сначала с люменальной, а потом с цитозольной стороны трансмембранного участка. В результате освобождается цитозольный домен белка, являющийся транскрипционным фактором, который направляется в ядро и связывается с различными последовательностями в промоторах генов, регулируемых в ответ на стресс в ЭР (Lai et al., 2007).

2.4. Сортировка белков в поздних компартментах аппарата Гольджи

Пройдя через аппарат Гольджи белки карго попадают в компартмент, организованный как сеть из сливающихся и ветвящихся трубчатых мембран и называемый транс-Гольджи сеть (trans-Golgi network, TGN) (Griffiths and Simons, 1986; Klumperman, 2011). В этом компартменте оказываются белки карго с различной конечной локализацией. Это и секретируемые белки, и резидентные белки лизосом (растворимые и мембранные), и белки плазматической мембраны. Некоторые белки должны накапливаться в секреторных гранулах, чтобы секретироваться только в определенный момент. Например, эпителиальные клетки имеют ярко выраженную полярность, и набор белков, направляемый к базолатеральной области плазмалеммы, принципиально отличается от того, который направляется к апикальной области. Кроме того, некоторые белки должны быть возвращены в более ранние компартменты секреторного пути. И все это многообразие белков подвергается сортировке в TGN и направляется к месту назначения. Задача по сортировке и направлению белков карго к местам их конечной локализации решается за счет наличия набора разных адаптеров, которые взаимодействуют с цитозольными доменами трансмембранных белков карго (см. обзор Guo et al., 2014). В возвращении белков, например, рецепторов сортировки, из эндосом в TGN принимает участие цитозольный белковый комплекс ретромер (Burd and Cullen, 2014), который не будет рассмотрен в этом обзоре.

2.4.1. Адаптерные белки.

Из адаптерных белков наиболее полно охарактеризованы гетеротетрамерные комплексы AP (adaptor protein). Они распознают сигналы YXXΦ (Φ – остаток с большим гидрофобным радикалом) и [DE]XXXL[L/I] на цитозольных доменах трансмембранных белков карго. Эти комплексы состоят из двух тяжелых (ок. 100-160 кДа), одной средней (ок. 50 кДа) и одной легкой (ок. 20 кДа) субъединицы (Рисунок 18). Субъединицы комплексов называют адаптинами. У комплексов AP с 1 по 5 одна из тяжелых субъединиц обозначается β с номером с 1 по 5, вторая, в зависимости от

номера комплекса, γ , α , δ , ϵ и ζ , средняя – μ (с 1 по 5), а легкая – σ , тоже с 1 по 5, соответственно. У средних субъединиц комплекса AP1 есть две изоформы, $\mu 1A$ и $\mu 1B$, которые входят в комплексы AP-1A и AP-1B, соответственно. У субъединицы $\beta 3$ и $\mu 3$ также есть две изоформы, входящие в комплексы AP-3A и AP-1B. N-концевые домены тяжелых субъединиц вместе со средней и легкой субъединицей формируют «тело» комплекса, а N-концевая их часть образует т.н. «ушко», отделенное от «тела» шарнирным участком. «Тело» связывается с белками ARF, карго и фосфолипидами, а «ушко» - с вспомогательными белками (Owen et al., 2004; Ren et al., 2013; Tan and Gleeson, 2019).

У высших эукариот выявлено пять адаптерных комплексов AP, и три из них (AP-1, AP-3 и AP-4) вовлечены в сортировку белков в TGN. Шарнирные участки комплекса AP-1 содержат мотив, рекрутирующий клатрин. Аналогичный мотив выявлен в «ушке» субъединицы β , однако неясно, рекрутирует ли он клатрин в клетке. AP-4 не ассоциирован с клатрином (Newell-Litwa et al., 2007). Основные пути трафика мембранных белков из TGN, по-видимому, обеспечиваются комплексами AP-1 и AP-3, а AP-4 может участвовать в транспорте по особому пути небольшого набора белков (Hirst et al., 2013).

Другой класс ассоциированных с клатрином адаптеров, которые регулируют сортировку белков из TGN в эндосомы, – это белки GGA (Golgi-localized, γ -ear-containing, Arf-binding proteins). У млекопитающих есть три гена (GGA1, GGA2 и GGA3), кодирующих эти белки, у *S. cerevisiae* – два (GGA1 и GGA2), а у дрозофилы – один (Guo et al., 2014). Нарушение любого из генов *S. cerevisiae* по отдельности не приводит к заметным фенотипическим проявлениям, а двух сразу – вызывает дефекты транспорта из TGN в вакуоль (Zhdankina et al., 2001).

Белки GGA представляют собой мономер, состоящий из N-концевого домена VHS, среднего домена GAT и C-концевого домена GAE, гомологичного «ушку» адаптинов и также соединенного с остальной частью молекулы через гибкий участок (Рисунок 18). Домен VHS связывает мотив DXXLL в цитозольных «хвостах» трансмембранных карго, перемещающихся между TGN и эндосомами (Owen et al., 2004). У дрожжей, по-видимому, мотив связывания с доменом VHS белков Gga отличается от DXXLL (De et al., 2013; Misra et al., 2002). Домен GAT может взаимодействовать с убиквитином,

фосфатидилинозитол-4-фосфатом (PI4P) и рабаптином-5 (Bonifacino, 2004; Wang et al., 2007a). Домен GAE может связывать вспомогательные белки, такие как γ -синергин, p56, эпсин-R и рабаптин-5, длинный гибкий соединительный участок содержит вариант клатрин-связывающего мотива (Bonifacino, 2004).

Кроме белков GGA, к мономерным адаптерам TGN относятся белки, по аминокислотной последовательности схожие с эпсинами (epsin-related proteins). У *S. cerevisiae* есть два таких белка Ent3 и Ent5, а у млекопитающих один, эпсин-R (epsinR). У *S. cerevisiae* отсутствие двух белков одновременно приводит к дефектам трафика между TGN и эндосомами, а также к нарушению сортировки белков в компартмент MVB (Duncan et al., 2003; Friant et al., 2003). Эпсины состоят из N-концевого домена ENTH, за которым следует длинный неупорядоченный домен (Рисунок 18). Домены ENTH эпсина-R и Ent3 непосредственно связываются с доменами Habc различных белков SNARE, регулирующих трафик между TGN, эндосомами и лизосомами (Chidambaram et al., 2008, 2004; Hirst et al., 2004). Кроме того, домен ENTH эпсина-R связывается с фосфатидилинозитол-4-фосфатом в TGN, и это связывание может индуцировать внедрение N-концевого домена в мембрану, вызывая ее деформацию (Ford et al., 2002).

У дрожжей выявлен еще один адаптерный комплекс, экзомер (exomer), который обеспечивает перенос белков непосредственно к плазматической мембране (Рисунок 18). Он состоит из 5 субъединиц, включая Chs5 и четыре белка семейства ChAPs (Chs5-Arf1-binding proteins): Chs6, Bud7, Bch1 и Bch2. Chs5 связывается с малой ГТФазой Arf1, а белки ChAPs отвечают за связывание с карго и за сортировку (Barfield et al., 2009; Paczkowski et al., 2012; Starr et al., 2012).

2.4.2. Рецепторы белков карго в TGN.

Ряд мембранных белков своей люменальной частью могут распознавать белки карго, в то время как их цитозольные домены часто взаимодействуют с адаптерными белками, описанными выше.

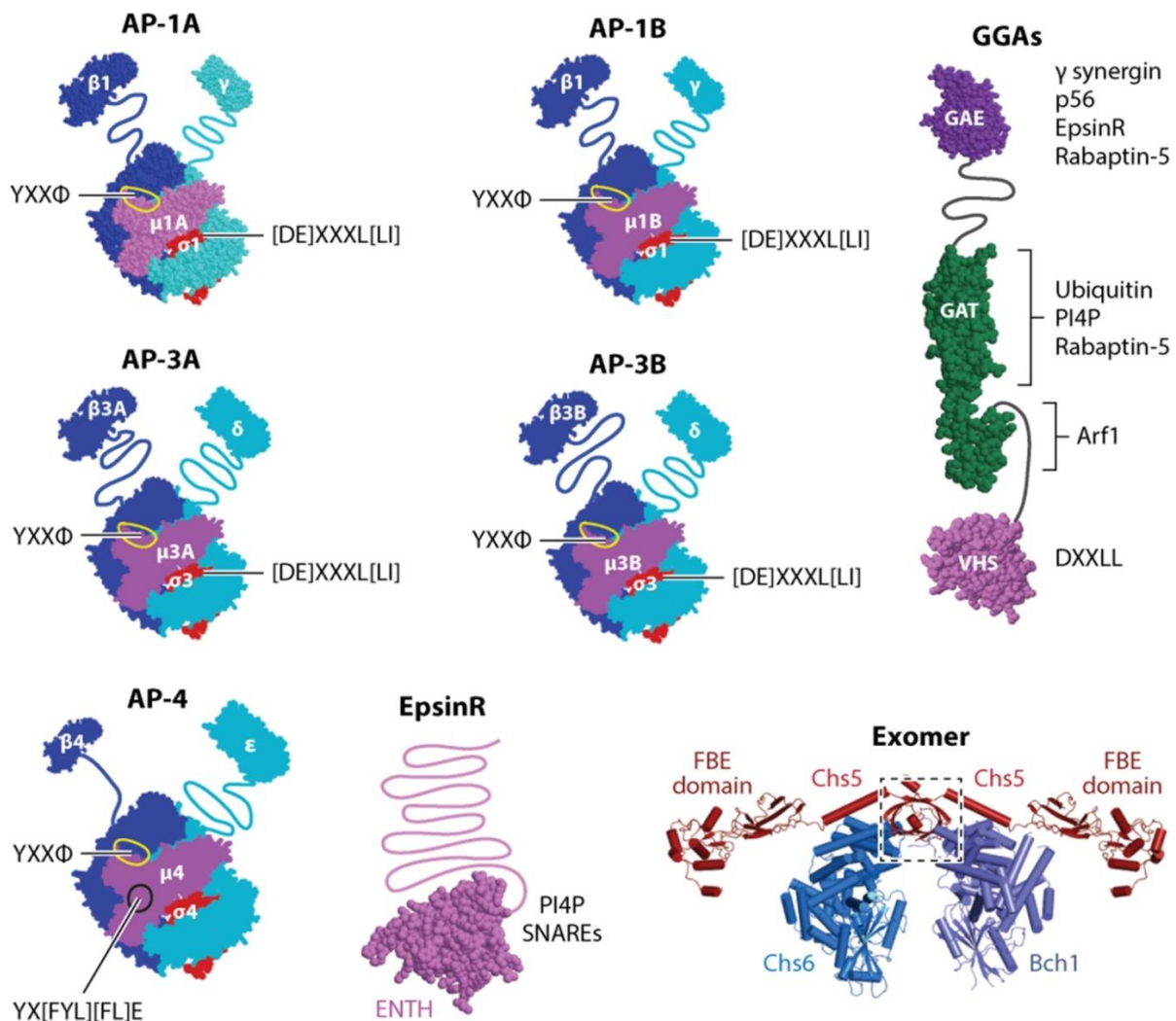


Рисунок 18. Адаптерные белки. Схема организации комплексов AP с выделением областей связывания сигнальных мотивов белков карго. Четыре субъединицы обозначены разными цветами. Пунктирным квадратом выделен димеризационный домен Chs5. Использованы фрагменты рисунка из обзора (Guo et al., 2014).

2.4.2.1. Рецепторы MPR

В клетках животных N-гликозидные цепи многих резидентных лизосомных ферментов модифицируются присоединением маннозо-6-фосфата (mannose-6-phosphate, M6P) (см. раздел 2.2.1.1.). Эта модификация распознается с рецепторами MPR (M6P receptor), которые транспортируют белки из TGN в эндосомы. Из-за низкого уровня pH в эндосомах транспортируемые белки отделяются от рецептора,

который рециклирует обратно из эндосомы в TGN при участии ретромера, ГТФазы Rab9 и ее эффектора TIP47 (Braulke and Bonifacino, 2009; Carroll, 2001). Есть два белка с функцией MPR: катион-зависимый рецептор, CD-MPR, размером 46кДа, и катион независимый, CI-MPR, размером около 300 кДа (В Hoflack and Kornfeld, 1985; В. Hoflack and Kornfeld, 1985). Зависимость первого от катионов, возможно, преувеличена, и к этим обозначениям можно относиться как к традиции (Jungmans et al., 1988). Оба MPR являются интегральными мембранными белками первого типа, цитозольный С-концевой домен которых содержит мотив DXXLL, который распознается адапторами AP-1 и GGA. У CI-MPR N-концевая люменальная часть состоит из 15 гомологичных доменов размером около 150 аминокислотных остатков (Guo et al., 2014). Два из них, 3 и 9, связывают М6Р с высокой аффинностью, а домен 5 преимущественно связывает маннозо-6-фосфат-N-ацетилглюкозамин, что позволяет, пусть и с низкой эффективностью, осуществлять сортировку лизосомных белков даже при нарушении удаления остатка N-ацетилглюкозамина (см. раздел 2.2.1.1.) (Bohnsack et al., 2009; Boonen et al., 2009; Chavez et al., 2007; Olson et al., 2010). Люменальная часть CD-MPR включает только один М6Р-связывающий домен, который гомологичен связывающим доменам CI-MPR.

2.4.2.2. Рецепторы семейства Vps10

Белки семейства VPS10 представляют собой интегральные мембранные белки первого типа, люменальный домен которых называют VPS10. Название семейства и домена происходит от названия рецептора вакуолярного сортирования дрожжей Vps10 (Cooper and Stevens, 1996; Marcusson et al., 1994). У дрожжей не используется метка М6Р, и нет соответствующего рецептора сортирования. Рецептор Vps10 обеспечивает основной путь сортировки вакуолярных белков из поздних компартментов аппарата Гольджи. Цитозольный С-концевой домен белка Vps10 содержит мотив YSSL для связывания с AP, позволяющий белку циркулировать между поздними компартментами аппарата Гольджи и превакуолярными компартментами (Cooper and Stevens, 1996). N-концевая люменальная часть белка содержит два гомологичных домена. Необходимым для функции связывания с белками карго является второй домен (Jørgensen et al., 1999).

В отличие от самого Vps10, рецептор этого семейства у животных, сортилин, имеет только один домен Vps10. В С-концевой части сортилина также выявлены мотивы YXXФ и DXXLL для связывания с адаптерами (Petersen et al., 1997). Этот рецептор осуществляет независимую от метки М6Р доставку белков в лизосомы.

Еще один представитель этого семейства, SorLA, также как и сортилин, имеет один домен VPS10, находящийся на N-конце белка после процессинга про-области. В отличие от сортилина, у SorLA в люменальной части после домена VPS10 есть последовательность, образующая β -пропеллер, и две области с разными повторяющимися последовательностями (см. обзор (Guo et al., 2014)). SorLA синтезируется преимущественно в нервной ткани. Этот рецептор вовлечен в контроль белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями (Willnow and Andersen, 2013).

2.4.2.3. Рецептор LIMP-2

Рецептор LIMP-2 обеспечивает транспорт белка β -глюкоцереброзидазы в лизосомы по MPR-независимому пути. LIMP-2 имеет два трансмембранных домена, между которыми находится большой люменальный домен, связывающий карго, а С- и N-концевые "хвосты" находятся на цитозольной стороне. С-концевой участок содержит мотив для взаимодействия с AP-3 (Höning et al., 1998; Ogata and Fukuda, 1994; Reczek et al., 2007).

2.4.2.4. Белок Wntless

Этот белок был так назван в соответствии с проявлениями его нарушения у дрозофилы. В частности, его дефект нарушает регуляцию секреции сигнальных белков Wnt (Wg), которые связаны с контролем эмбрионального развития (Bänziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006; Goodman et al., 2006). Это консервативный белок, обнаруживаемый и у нематод, и у человека, имеет несколько трансмембранных доменов. Одна из цитозольных петель содержит мотив YXXФ, нарушение которого приводит к накоплению белка на плазматической мембране (Gasnereau et al., 2011).

2.4.3. Кальций- и цитоскелет-зависимая сортировка белков в TGN.

В клетках млекопитающих было выявлено, что сортировка некоторых секреторных и лизосомных карго зависит от кофилина и ADF (белки, участвующие в разборке актиновых филаментов) и от гомеостаза кальция в TGN. Подавление продукции кофилина и ADF приводила к секреции кальций-связывающего белка Cab45, в норме локализованного в TGN. Было предположено, что этот белок участвует в кальций-зависимой сортировке белков карго, в то время как разборка актиновых филаментов требуется для того, чтобы кальциевая АТФаза секреторного пути эффективно снабжала люмен TGN кальцием (Pakdel and von Blume, 2018; von Blume et al., 2011, 2009). У дрожжей было обнаружено, что у мутанта *cof1-8* с нарушением кофилина нарушается транспорт белка клеточной стенки Bgl2 и сортировка вакуолярного белка CPY. Сверхэкспрессия гена *PMR1*, кодирующего Ca^{2+} и Mn^{2+} ионную помпу аппарата Гольджи, восстанавливала транспорт Bgl2 (Curwin et al., 2012). Однако есть ли у дрожжей аналог Cab45, непонятно.

2.4.4. Роль фосфолипидов в связывании адаптерных белков.

Различные адаптеры карго связываются со специфическими фосфолипидами, которыми обогащены мембраны определенных органелл. Два фосфолипида и фосфатидилсерин играют существенную роль в рекрутировании адапторных белков на мембраны TGN (см. обзор Guo et al., 2014). Мембраны TGN обогащены фосфатидилинозитол-4-фосфатом, который опосредует связывание с адаптерами, включая AP-1, белки GGA и эпсин-R (Mills et al., 2003; Wang et al., 2007b, 2003). Фосфатидилсерин может стимулировать Arf1-зависимое рекрутирование AP-1 на мембраны (Zhu et al., 1999). У дрожжей было показано, что этот фосфолипид вовлечен в феррихром-зависимое направление белка Arp1 к плазматической мембране (Guo et al., 2010).

2.4.5. Мембранные емкости-переносчики, транспортирующие белки из TGN.

В литературе мембранные контейнеры, переносящие секреторные белки карго из аппарата Гольджи к плазматической мембране, иногда по традиции называют секреторными везикулами. Однако, по крайней мере, в клетках животных эти емкости-переносчики существенно больше по размеру, чем, например, клатрин-, COP1- или COP2-окаймленные везикулы и имеют сложную форму трубочек или мешочков (Polishchuk et al., 2000, 2003). Видимо поэтому в литературе часто используется термин "transport carriers", который подходит и для везикул, и для таких трубочек и мешочков, а также для неопределенных случаев. Эти емкости-переносчики, транспортирующих белки из TGN к плазматической мембране, формируются, отшнуровываясь от протрузий на мембране поздней цистерны аппарата Гольджи, вытягиваясь из нее за счет движения кинезина вдоль микротрубочек и при участии актина и миозина (см. обзор Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009).

При фракционировании центрифугированием в градиенте плотности было выявлено два типа емкостей-переносчиков. В эпителиальных клетках животных они доставляют разные наборы белков к апикальной и к базолатеральной части плазматической мембраны (Wandinger-Ness et al., 1990). У дрожжей один тип характеризовался наличием периплазматических белков инвертазы и кислой фосфатазы, а другой – клеточно-стеночного белка Bgl2 и белка плазмалеммы Pma1 (Harsay and Bretscher, 1995). Однако ряд последних исследований показывает существование заметно большего набора вариантов таких переносчиков (Stalder and Gershlick, 2020).

На данный момент нельзя сказать, что достигнуто полное понимание того, почему определенные белки сортируются в емкости-переносчики для отправки к плазматической мембране (см. обзор Stalder and Gershlick, 2020). Сигналами доставки к апикальной мембране могут служить нужным образом модифицированные гликозидные цепи белков, а у мембранных белков – характеристики трансмембранного домена (Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). Тот факт, что большинство белков с GPI якорем направляются преимущественно к апикальной мембране (Brown et al., 1989; Lisanti et al., 1989), привел к появлению

гипотезы, предполагающей, что GPI-заякоренные белки собираются на участках мембраны, обогащенных сфинголипидами и холестерином. Эти участки, называемые липидными островками (lipid rafts), сортируются в ёмкости-переносчики, направляющиеся к апикальной мембране (Simons and Ikonen, 1997). У дрожжей эти ёмкости-переносчики обогащены эргостеролом и сфинголипидами (Klemm et al., 2009), а дефект синтеза этих компонентов приводит к ряду нарушений, связанных с ёмкостями-переносчиками. В частности, было показано, что блокирование как синтеза эргостерола, так и синтеза сфинголипидов нарушает формирование липидных островков (Bagnat et al., 2000). Кроме того, при дефекте синтеза сфинголипидов нарушалась поляризация локализации компонентов комплекса экзоцист и белка Sec4 (см. следующий раздел), ассоциированного с секреторными везикулами, а также происходило внутриклеточное накопление клеточно-стеночного белка Bgl2 (Guo et al., 2020). Ассоциация белков с липидными островками, по-видимому, происходит уже на этапе ЭР (Bagnat et al., 2000). Существенным для апикальной, но не базолатеральной, сортировки GPI-заякоренных белков может быть их олигомеризация в составе липидных островков (Paladino et al., 2004; Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009).

Мембранные белки, направляемые к базолатеральной мембране, содержат сигнальные мотивы для связывания с адапторными белками, и в их сортировке принимает участие клатрин. Сигналы базолатеральной сортировки доминируют над сигналами апикальной сортировки (см. обзор Guo et al., 2014).

Ёмкости-переносчики, отпочковывающиеся от TGN, сливаются с ранними эндосомными компартментами, из которых образуются переносчики, доставляющие белки к плазматической мембране (Weisz and Rodriguez-Boulan, 2009). У дрожжей функция ранних эндосомных компартментов, по-видимому, объединена с TGN (Day et al., 2018).

2.5. Экзоцитоз.

Финальная стадия секреции – это слияние емкостей-переносчиков с плазматической мембраной и освобождение растворимых белков карго во внешнюю среду. Белки, отвечающие за этот этап, впервые были идентифицированы у дрожжей при анализе *sec*-мутантов с нарушением секреции (Bowser et al., 1992; Bowser and Novick, 1991; Novick et al., 1980; TerBush and Novick, 1995). Так были идентифицированы шесть белков, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10 и Sec15, которые образуют единый комплекс. Впоследствии были выявлены еще два компонента этого комплекса, Ecy70 и Ecy84 (Guo et al., 1999; Hsu et al., 1996; TerBush et al., 1996). Комплекс получил название экзоцист (exocyst). Аналогичные комплексы были выявлены и у других групп эукариот (Boehm and Field, 2019; Martin-Urdiroz et al., 2016). Комплекс состоит из двух стабильных субкомплексов, включающих по 4 субъединицы каждый (Heider et al., 2016).

При изучении динамики комплекса экзоцист у дрожжей было обнаружено, что все его субъединицы, кроме Sec3, перемещаются вместе с емкостью-переносчиком секреторных карго к месту слияния с мембраной, где находится Sec3 и часть Ecy70. Сборка полного комплекса происходит у места слияния переносчика с мембраной (Boyd et al., 2004). Специфическая способность Sec3 рекрутировать другие компоненты комплекса на мембрану была также продемонстрирована путем эктопической экспрессии (Luo et al., 2014). Динамика ассоциации-диссоциации комплекса с мембраной была изучена и в клетках млекопитающих. В частности, было выявлено, что субкомплексы прибывают к месту слияния в определенной степени независимо друг от друга, но вместе с переносчиками карго. Компонент Sec3 диссоциирует непосредственно перед слиянием переносчика с плазматической мембраной, а остальные компоненты – после (Ahmed et al., 2018). Слияние происходит при участии белков SNARE (Yu and Hughson, 2010). Было показано, что компонент экзоциста Sec6 взаимодействует с белком t-SNARE Sec9 (Sivaram et al., 2005).

У дрожжей к месту слияния с плазмалеммой емкости-переносчики карго перемещаются вдоль актиновых филаментов за счет миозина типа V, белка Myo2. Было показано взаимодействие Myo2 с ассоциированной с экзоцистом Rab-ГТФазой

Sec4, а также взаимодействие с компонентом экзоциста Sec15. В белках Myo2 и Sec15 выявлены участки, ответственные за это взаимодействие (Jin et al., 2011).

2.6. Неканоническая секреция белков.

Путь секреции, описанный в предыдущих разделах, проходят не все белки, оказывающиеся по ту сторону плазматической мембраны. В соответствии с механизмами можно выделить четыре типа неканонической секреции белков, хотя в разных источниках эта классификация может отличаться (Rabouille, 2017; Rabouille et al., 2012).

2.6.1. Тип I. Самообеспечивающаяся транслокация посредством индуцированной липидами олигомеризации и внедрением в мембрану.

Этот тип секреции происходит в результате транслокации из цитозоля через плазмалемму уже синтезированного белка без участия везикул. Наиболее изученным примером является фактор роста фибробластов 2 (FGF2) (Nickel, 2011). Процесс включает взаимодействие FGF2 с фосфатидилинозитол-4,5-бис-фосфатом на внутренней стороне липидного бислоя и с гепарансульфатом на внешней (Temmerman et al., 2008; Zehe et al., 2006). Секреция сильно стимулируется при фосфорилировании тирозина-82 протеинкиназой Tec (Ebert et al., 2010). Взаимодействие с фосфатидилинозитол-4,5-бис-фосфатом индуцирует олигомеризацию FGF2, которая, по-видимому, определяет встраивание белка в мембрану в виде кольцевого олигомерного комплекса (Steringer et al., 2012).

Такой же механизм секреции может быть и у таких белков, как HIV-1 Tat, аннексин A2 и FGF1 (Rabouille, 2017).

2.6.2. Тип II. Секреция, осуществляемая транспортером ABC.

Примером этого типа секреции является половой феромон α -фактор дрожжей *S. cerevisiae*. Этот пептид фарнезилируется и выводится наружу транспортером ABC Ste6 (Michaelis, 1993). Такой же механизм секреции был выявлен и у m -фактора *Sch. pombe* (Christensen et al., 1997). Транспортер ABC Mdr49 *Drosophila melanogaster*,

являющийся гомологом Ste6 дрожжей, обеспечивает выход из клетки геранилированного аттрактанта зародышевых клеток (Ricardo and Lehmann, 2009).

К этому типу секреции можно отнести выход из клетки ряда других белков (см. обзор (Rabouille et al., 2012)).

2.6.3. Тип III. Секреция через аутофагосоμο-подобные органеллы.

Дрожжевой белок Acb1 не имеет N-концевого сигнала транслокации в ЭР, но способен секретироваться при голодании, как и его ортолог у *Dictyostelium discoideum*. У *D. discoideum* этот белок процессируется при выходе из клеток, и продукт его процессинга запускает завершение созревания спорных клеток. Несмотря на отсутствие сигнала транслокации в ЭР, выход этого белка зависит от белка GRASP, связанного с функционированием аппарата Гольджи. Было показано, что у дрожжей для секреции этого белка не требуется транспорт от ЭР к аппарату Гольджи и от аппарата Гольджи к плазматической мембране, но требуются гены, ответственные за аутофагию, и t-SNARE плазматической мембраны, Sso1 (Duran et al., 2010; Kinseth et al., 2007; Manjithaya et al., 2010).

Для секреции клетками млекопитающих интерлейкина-1 β также используется путь секреции, связанный с аутофагосоμο-подобными органеллами. Кроме того, быстрое высвобождение этого белка из клеток при воспалении может происходить и в результате образования пор в плазматической мембране. Это тоже можно рассматривать как неканоническую секрецию, но скорее первого типа (Rabouille, 2017).

Инсулин-деградирующий фермент также секретируется по аутофагосомо-зависимому пути (Son et al., 2016).

2.6.4. Тип IV. Транспорт белков, имеющих сигнал транслокации в ЭР или трансмембранные домены, из ЭР к плазматической мембране, минуя аппарат Гольджи.

Этот путь только условно можно назвать секрецией, поскольку касается в основном мембранных белков. Чаще всего речь идет о мутантных белках, которые должны задерживаться в ЭР, но при стрессовых условиях экспортируются к плазматической мембране, минуя аппарат Гольджи. Есть по меньшей мере два механизма для такого экспорта – один, зависящий от фосфорилирования белка аппарата Гольджи GRASP55, и другой, зависящий от шаперона семейства Hsp70 и его ко-шаперона DNAJC14, но оба пути не зависят от везикул COPII (см. обзор Rabouille, 2017). Хотя есть и другие примеры. В частности, было обнаружено, что транспорт белка Peripherin/rds к ресничкам на поверхности клетки не зависит от функционирования аппарата Гольджи, не требует белка GRASP55, но при этом зависит от везикул COPII (Tian et al., 2014).

2.7. Гомеостаз ионов кальция и марганца.

Ряд процессов, связанных с секрецией, зависит от Ca^{2+} и Mn^{2+} . Эти катионы поступают в секреторные органеллы из цитозоля, куда они попадают из внешней среды или из внутриклеточных депо. Роль Ca^{2+} в клетке не ограничивается его функциями в работе секреторного аппарата – эти катионы участвуют в функционировании митохондрий (Duchen, 2000) и обеспечивают реакцию клетки на внешние воздействия (Clarham, 2007). Для этих функций Ca^{2+} должен накапливаться в определенных органеллах, а его концентрация в цитозоле в норме должна поддерживаться на низком уровне, чтобы клетка могла реагировать на внешние воздействия кратковременным повышением этого уровня. Это обеспечивается работой ряда ионных помп и каналов.

2.7.1. Активный транспорт Ca^{2+} у эукариот.

Ионные помпы, обеспечивающие активный транспорт Ca^{2+} через мембрану, являются высокоаффинными АТФазами Р-типа (Brini et al., 2012; Brini and Carafoli, 2009). У животных есть три типа Ca^{2+} -АТФаз: Ca^{2+} -АТФаза сарко-/эндоплазматического ретикула SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) (Vandecaetsbeek et al., 2011), $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФаза секреторного пути SPCA (secretory pathway Ca^{2+} ATPase)

(He and Hu, 2012) и Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны PMCA (plasma membrane Ca^{2+} ATPase) (Brini et al., 2013). У растений был выявлен аналог SPCA (Mills et al., 2008), и есть большое разнообразие Ca^{2+} -АТФаз двух других типов (Axelsen and Palmgren, 2001; García Bossi et al., 2020).

Помпы PMCA имеют цитозольный С-концевой домен для аутоингибирования, которое ослабляется при связывании этого домена с Ca^{2+} /кальмодулином. Таким способом активность помпы регулируется в зависимости от концентрации кальция в цитозоле. У млекопитающих есть четыре основные изоформы PMCA, кодируемые каждая своим геном и дифференциально экспрессирующиеся в разных тканях. Количество изоформ расширяется за счет альтернативного сплайсинга (Brini et al., 2013). Изоформы могут отличаться по активности и ее регуляции за счет связывания кальмодулина (Elwess et al., 1997).

У грибов и растений основным депо кальция являются органеллы с кислой средой, вакуоли, а помпы, аналогичные PMCA, локализуются преимущественно на мембране этих органелл (Tisi et al., 2016). Единственным аналогом PMCA у дрожжей *S. cerevisiae* является вакуолярная помпа Pmc1, у которой отсутствует аутоингибиторный домен (Pittman, 2011). Регуляция активности этой помпы осуществляется на транскрипционном уровне (Matheos et al., 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997). Помпы типа PMCA и Pmc1, NCA-2 и NCA-3 гриба *Neurospora crassa*, локализовались не только в вакуоли, но и на определенных участках плазматической мембраны (Bowman et al., 2009). Вакуолярные Ca^{2+} -АТФазы *N. crassa* (Benito et al., 2000) и *Arabidopsis thaliana* (Sze et al., 2000), а также Ca^{2+} -АТФаза плазмалеммы *A. thaliana* (Luoni et al., 2004) имеют аутоингибиторный кальмодулин-связывающий домен.

Кроме Ca^{2+} -АТФаз типа Pmc1 *S. cerevisiae* в активном транспорте кальция из цитозоля в вакуоль принимают участие $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменники, работа которых обеспечивается протонным градиентом. На создание градиента pH также расходуется АТФ в результате действия протонной помпы. У дрожжей *S. cerevisiae* обменник кодируется геном VCX1 (Cunningham and Fink, 1996), а протонная помпа – геном VMA1 (Hirata et al., 1990).

Помпы семейства SERCA, осуществляющие транспорт Ca^{2+} из цитозоля в люмен ЭР, выявлены у многих эукариот, включая животных, растений и некоторых грибов.

Однако у модельного объекта молекулярной биологии, дрожжей *S. cerevisiae*, а также у родственных аскомицетных дрожжей, эта ионная помпа отсутствует (Tisi et al., 2016), видимо потому, что у них ЭР не является основным депо кальция. У позвоночных есть три гена, кодирующих разные варианты SERCA, а альтернативный сплайсинг существенно увеличивает количество изоформ (Brini and Carafoli, 2009). Наиболее представленными являются изоформы SERCA2a и SERCA2b, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК одного гена. Первая экспрессируется специфически в мышцах, а вторая – в разных тканях. У беспозвоночных есть только один ген для этой помпы (Vandecaetsbeek et al., 2011).

Впервые кальциевая помпа подсемейства SPCA была идентифицирована у дрожжей *S. cerevisiae* и обозначена Pmr1 (Plasma membrane ATPase-related) (Rudolph et al., 1989). Независимо мутация в этом гене была получена при поиске мутантов *S. cerevisiae*, с увеличенным уровнем секреции чужеродного белка (Smith et al., 1985). Эта помпа отвечает за перенос из цитозоля в люмен аппарата Гольджи не только ионов Ca^{2+} , но и Mn^{2+} . Отчасти с этим связано и разнообразие проявлений нарушений гена *PMR1* у *S. cerevisiae*. В частности, инактивация этого гена приводит, с одной стороны, к нарушению Vps10-зависимой сортировки белков в вакуоль, поскольку связывание белков с этим рецептором зависит от Ca^{2+} , а с другой стороны – к отсутствию у секретируемых белков модификаций гликозидных цепей, получаемых в аппарате Гольджи, поскольку работа маннозилтрансфераз этой органеллы зависит от Mn^{2+} (Dürr et al., 1998). Кроме того, эта мутация приводит к дефекту деградации белков в ЭР (Dürr et al., 1998), что может быть связано с недостатком кальция в этом компартменте. Действительно, у *S. cerevisiae* нет специализированной Ca^{2+} помпы ЭР типа SERCA, и основным источником Ca^{2+} в люмене ЭР является Pmr1 (Strayle et al., 1999). Кроме обеспечения секреторных органелл Ca^{2+} и Mn^{2+} у *S. cerevisiae* Pmr1 вносит заметный вклад в поддержании цитозольной концентрации кальция на низком уровне, "помогая" АТФазе Pmc1 (Vashist et al., 2002).

У человека мутации в гене *ATP2C1*, кодирующем SPCA, вызывают болезнь Хейли-Хейли (Hu et al., 2000; Sudbrak et al., 2000). У млекопитающих был идентифицирован паралог этого гена, *ATP2C2*, экспрессирующийся в мозгу (Vanoevelen et al., 2005; Xiang et al., 2005).

Также есть данные, указывающие на то, что аппарат Гольджи может содержать $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменник (Colinet et al., 2016; Snyder et al., 2017).

2.7.2. Пассивный транспорт Ca^{2+} у эукариот.

К пассивному транспорту можно отнести движение Ca^{2+} через специфические каналы по градиенту концентрации без дополнительных затрат энергии. К этому относится выход Ca^{2+} в цитозоль из внутриклеточных депо и вход кальция в цитозоль из внешней среды. У сложно организованных животных эти процессы задействованы во множестве физиологических процессов, включая мышечное сокращение и функционирование нервной системы. Это требует большого количества различных каналов, функционирующих в разных условиях и дифференциально представленных в клетках разных тканей (см. обзоры Putney et al., 2017; Yamakage and Namiki, 2002). Пассивный транспорт Ca^{2+} у грибов включает существенно меньше компонентов, однако организован по тем же принципам (Cui et al., 2009).

У дрожжей *S. cerevisiae* в пассивном транспорте кальция задействовано несколько компонентов. К системе высокоаффинного транспорта в клетку относятся белки Cch1 и Mid1, которые являются канал-формирующей и регуляторной субъединицами кальциевого канала плазмалеммы, соответственно (Fischer et al., 1997; Iida et al., 1994, 2017; Paidhungat and Garrett, 1997; Peiter et al., 2005). Еще одна регуляторная субъединица этого канала, Ecm7, была идентифицирована в результате поиска штаммов с измененным поглощением кальция в полногеномной коллекции делеционных мутантов (Martin et al., 2011). Этот канал активируется в ответ на различные стрессовые воздействия, истощение внутренних депо кальция и действие полового феромона (Courchesne et al., 2011; Locke et al., 2000; Matsumoto et al., 2002; Peiter et al., 2005).

Были опубликованы данные, указывающие на существование у *S. cerevisiae* еще двух систем высокоаффинного пассивного транспорта Ca^{2+} из внешней среды. Одна из них зависит от доступности глюкозы (Groppi et al., 2011), а другая активируется при гипотоническом шоке (Rigamonti et al., 2015). Компоненты этих систем не были идентифицированы.

Экспериментальные данные показывали также наличие у *S. cerevisiae* низкоаффинного пассивного транспорта кальция из внешней среды, и был идентифицирован возможный компонент этой системы, белок Fig1 (Muller et al., 2003; Müller et al., 2001). Гомологи этого белка были выявлены у других грибов, и в ряде случаев проведен функциональный анализ его гена. Однако в последовательности Fig1 не выявлены мотивы, характерные для известных кальциевых каналов, поэтому можно предполагать, что его роль в транспорте кальция опосредована другими белками (Tisi et al., 2016).

На вакуолярной мембране находится канал Yvc1, который имеет сходство с каналами TRP (Transient receptor potential) высших эукариот (Palmer et al., 2001). Этот канал также вовлечен в ответ на внешние воздействия и на изменение доступности глюкозы (Bouillet et al., 2012; Denis and Cyert, 2002).

2.7.3. Транскрипционная регуляция гомеостаза Ca^{2+} у дрожжей.

Увеличение концентрации кальция в цитозоле активирует кальций-связывающий регуляторный белок кальмодулин, который имеет множество мишеней в клетке. Одна из этих мишеней – протеинфосфатаза кальциневрин, которая, в свою очередь, тоже имеет множество мишеней, что делает ответ клетки на вход кальция в цитозоль комплексным и зависящим от множества факторов. Одной из мишеней кальциневрина является транскрипционный фактор Crz1 (Cyert, 2003; Stathopoulos and Cyert, 1997). Когда он фосфорилирован, он находится преимущественно в цитоплазме. Активация кальциневрина при входе кальция в цитозоль приводит к дефосфорилированию Crz1 и его релокализации в ядро (Stathopoulos-Gerontides et al., 1999), где он активирует транскрипцию множества генов (Yoshimoto et al., 2002). Среди этих генов есть и ген *PMC1*, кодирующий вакуолярную кальциевую помпу (Cunningham and Fink, 1996; Yoshimoto et al., 2002). Таким образом формируется система с отрицательной обратной связью на уровне транскрипции.

2.7.4. Транспорт Mn^{2+} у дрожжей.

У *S. cerevisiae* катионы Mn^{2+} , по-видимому, попадают в клетку через переносчики семейства NRAMP (Cellier et al., 1995). У *S. cerevisiae* два гена этого семейства, *SMF1* и *SMF2* были идентифицированы как мультикопийные супрессоры мутации, нарушающей процессинг белков в митохондриях. Позже была выявлена роль *Smf1* в поглощении Mn^{2+} , и показано, что этот белок находится на плазмалемме (Supek et al., 1996). После опубликования последовательности генома *S. cerevisiae* был обнаружен третий ген, относящийся к этому семейству, *SMF2*, и с использованием генетических подходов изучена возможная роль всех трех генов в транспорте разных катионов (Cohen et al., 2000; Portnoy et al., 2000). Как и другие представители семейства NRAMP, эти переносчики осуществляют транспорт разных двухвалентных катионов, а *Smf3* не участвует в переносе Mn^{2+} . Локализация *Smf1* на плазмалемме, по-видимому, зависит от условий, и в ряде случаев этот белок находился преимущественно во внутриклеточных везикулах (см. обзор Reddi et al., 2009). Впоследствии ключевая роль *Smf1* в транспорте Mn^{2+} в клетку подверглась сомнению и была приписана *Smf2* (Luk and Culotta, 2001). *Smf2* локализуется преимущественно во внутриклеточных везикулах, очевидно, являющихся эндосомами (Luk and Culotta, 2001; Portnoy et al., 2000). Есть еще по меньшей мере один NRAMP-независимый путь входа Mn^{2+} в клетку, поскольку высокоаффинный протон-фосфатный симпортер плазмалеммы *Pho84* может иметь активность Mn^{2+} /фосфатного симпортера (Jensen et al., 2003), однако этот путь скорее связан с токсичностью Mn^{2+} , чем с его доставкой к Mn^{2+} -зависимым ферментам (см. обзор Reddi et al., 2009).

Белок *Css1*, видимо, осуществляет транспорт Fe^{2+} и Mn^{2+} из цитозоля в вакуоль для детоксификации (Li et al., 2001). Кроме того, на вакуолярной мембране есть белок *Yrk9*, гомологичный АТФазам Р-типа, который участвует в детоксификации цитозольного Mn^{2+} (Chesi et al., 2012). Обозначение этого белка (*Yeast PARK9*) происходит от названия белка человека, кодируемого геном *ATP13A2/PARK9*, который ассоциирован с ранним наступлением болезни Паркинсона (Gitler et al., 2009).

Ключевую роль в снабжении секреторных органелл Mn^{2+} играет Ca^{2+}/Mn^{2+} -АТФаза аппарата Гольджи *Pmr1*. Отсутствие этого белка фактически полностью блокирует

активность маннозилтрансфераз аппарата Гольджи (Dürr et al., 1998). В аппарате Гольджи локализован белок Gdt1, который может работать как переносчик Ca^{2+} и Mn^{2+} из цитозоля (Thines et al., 2018).

На мембране ЭР локализована АТФаза Р-типа Spf1, которая может участвовать в транспорте Ca^{2+} и Mn^{2+} из цитозоля в люмен ЭР (Cohen et al., 2013).

3. Материалы и методы

3.1. Среды для выращивания микроорганизмов.

Полная среда с глюкозой в качестве источника углерода (YPD) содержала 2% пептона 1% дрожжевого экстракта и 2% глюкозы. При необходимости в качестве источника углерода добавляли 2% глицерина (YP-Glyc), метанол (YPM) или сахарозу (YPS). Синтетическая среда с глюкозой (SD) содержала 0,67% смеси солей и витаминов "Yeast Nitrogen Base" (Difco) и 2% глюкозы. В ряде экспериментов использовали синтетическую среду с глюкозой SD*, содержащую самостоятельно составленную смесь солей и витаминов с низким содержанием Ca^{2+} . Смесь составляли из пяти независимо приготовленных растворов **A** (сульфат аммония 500 г/л), **B** (биотин 2 мг/л, фолиевая кислота 2 мг/л, инозитол 2 г/л, ниацин 0,4 г/л, пиридоксин гидрохлорид 0,4 г/л, рибофлавин 0,2 г/л, тиамин гидрохлорид 0,4 г/л, пантотенат кальция 0,4 г/л, аминокислота 0,2 г/л), **C** (KH_2PO_4 20 г/л, MgSO_4 10 г/л, NaCl 2 г/л), **D** (борная кислота 5 г/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 г/л, KI 0,5 г/л, FeCl_3 2 г/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4 г/л, ZnSO_4 4 г/л), **D'** ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 г/л). Чтобы получить 10-кратный концентрат, смешивали компоненты A, B, C, D, D' и деионизованную в соотношении 10:10:50:0.01:0.01:30. Для большего снижения концентрации свободного Ca^{2+} в среду добавляли ЭГТА.

Для индукции экспрессии рекомбинантных генов под контролем промотора MOX в случае штаммов *O. polyompha* использовали среду Y3PMG (1% Дрожжевой экстракт, 3% пептон, 1% метанол, 0,5% глицерин), а в случае *O. parapolymorpha* – Y3PM (1% Дрожжевой экстракт, 3% пептон, 2% метанол). Для снижения протеолитического процессинга uPA в среду добавляли 0,1 М NaCl, 25 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ и 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. При выращивании в стеклянных пробирках протеолитический процессинг uPA был заметно менее выраженным, чем в полипропиленовых пробирках.

Для выращивания *E. coli* использовали среды 2YT (1,6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl), SOB (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ MgSO_4), SOC (среда SOC с добавлением 20мМ глюкозы) и LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl).

В твердые среды добавляли 2-2,5% агара.

Приготовление сред, содержащих фибриновый гель, описано в разделе "Детекция активности uPA".

3.2. Трансформация дрожжей.

Для трансформации *S. cerevisiae* применяли стандартный метод с использованием ацетата лития, ПЭГ 4000 и денатурированной балластной ДНК (ДНК-носитель) (Gietz and Woods, 2001). Для трансформации *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* использовали аналогичный метод трансформации. Исходно использовали измененный (Bogdanova et al., 1995) протокол, ранее разработанный для *S. cerevisiae* (Schiestl and Gietz, 1989). Впоследствии была адаптирована более поздняя версия метода трансформации *S. cerevisiae* (Gietz and Woods, 2001). Адаптированный для *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* протокол был следующим. Клетки выращивали в 0,5 мл среды YPD до плотности OD₆₀₀ около 0,6-1,0, осаждали центрифугированием, промывали стерильной деионизованной водой, суспендировали в 42 мкл стерильной деионизованной воды и добавляли 2,4 мкл ДНК-носителя (раствор 10 мг/мл фрагментированной и денатурированной ДНК из рыбьих молок). Полученную суспензию делили на 6 точек трансформации по 7,4 мкл. К этому объему суспензии добавляли одну каплю (около 14 мкл) 70% стерильного раствора ПЭГ 4000, размешивали, добавляли 1,5 мкл 1 М ацетата лития и 1 мкл трансформирующей ДНК. Смесь инкубировали при 30°C 30 минут, а затем при 45°C 30 минут. Клетки промывали стерильной водой или средой для выращивания и высевали на чашки с селективной средой. При трансформации с селекцией на устойчивость к G418 или зеоцину перед высевом на селективную среду клетки суспендировали в 0,5-1 мл среды YPD, переносили в пробирку объемом 10-50 мл и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37°C в течение часа. Для селекции на устойчивость к этим антибиотикам использовали полную среду "1/2YPD" со сниженной вдвое концентрацией компонентов, за исключением агара. Это существенно снижало рабочую концентрацию антибиотика.

3.3. Штаммы дрожжей.

Список штаммов дрожжей рода *Ogataea*, использованных в работе, приведен в таблицах 2 и 3. Штамм DL1-L *O. parapolymorpha*, а также штаммы 1В и 8V *O. polymorpha*, были предоставлены М. Ю. Бебуровым. Остальные штаммы этих двух видов дрожжей были получены в ходе экспериментов, описанных в диссертации.

Замещение локуса *МОХ* на экспрессионные кассеты глюкозооксидазы и различных вариантов *uPA* производили аналогично тому, как это было описано нами ранее (Agarhonov et al., 1995), основываясь на расположении гена *TRP3* непосредственно после гена *МОХ*. Замещение проводили в два этапа. Сначала инактивировали ген *TRP3* интеграцией селективного маркера, гена *LEU2*, а затем полученный штамм трансформировали экспрессионной кассетой, с одной стороны фланкированной промоторной областью гена *МОХ*, а с другой – терминаторной, включая неполную открытую рамку гена *TRP3*. При рекомбинации такой конструкции с геномным локусом происходило замещение гена *МОХ* на экспрессионную кассету с восстановлением гена *TRP3*, что позволяло проводить селекцию трансформантов на среде без триптофана. При этом удалялся ген *LEU2*, интегрированный на первом этапе, что позволяло впоследствии трансформировать такие штаммы плазмидами с этим селективным маркером. Таким же образом был получен и штамм DLΔM, только вместо экспрессионной кассеты ген *МОХ*, включая существенную часть промотора, был замещен на нефункциональный фрагмент гена *uPA*.

В работе также были использованы штаммы *S. cerevisiae*. Штамм с мутациями *pmt1*-Δ *pmt2*-Δ, полученный на основе штамма L3262a (Kang et al., 1998), был предоставлен Др. Eui-Sung Choi (KRIBB, Республика Корея). Штаммы с делециями генов *VPS8*, *VPS10* и *VPS17*, а также соответствующий штамм дикого типа BY4741, были получены из коллекции Euroscarf.

3.4. Штаммы *E. coli*.

Для стандартных генно-инженерных манипуляций использовали штамм DH5α (F^- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ8odlacZΔM15 Δ(lacZYA-*

argF)U169, *hsdR17*($r_K^-m_K^+$), λ^-) (Grant et al., 1990). Для продукции рекомбинантных белков использовали штамм BL21DE3 ($F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^-m_B^-)$ λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB^+*]_{K-12}(λ^S)) или его мутант C41DE3 (Miroux and Walker, 1996)

Таблица 2. Штаммы *O. polymorpha*.

Штамм	Генотип (описание)
8V	<i>leu2 pol1^{Ts}</i>
24-8V	<i>leu2 opu24 pol1^{Ts}</i>
27-8V	<i>leu2 ret1-27 pol1^{Ts}</i>
24/UR2	<i>leu2 opu24 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pol1^{Ts}</i>
1B	<i>leu2 ade2</i>
1B/SM/L	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {LEU2}_{pCHLX}</i>
1B/SM/A	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {ADE2}_{pCHAD3}</i>
1BΔpmc1	<i>leu2 ade2 pmc1::Zeo^R</i>
1BΔpmc1Δwee1	<i>leu2 ade2 pmc1::Zeo^R wee1::LEU2</i>
1B-27	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2</i>
M14	<i>leu2 ade2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i>
u23M25	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i>
S67	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 pmc1::URA3 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i> (получен в результате случайной интеграции фрагмента ДНК, содержащего URA3, в локус PMC1 штамма u23M25)
S67Δcch1	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 pmc1::URA3 cch1::LEU2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i>
S67Δhog1	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 pmc1::URA3 hog1::LEU2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i>
SDS61	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 pmc1::URA3 cch1::LEU2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i> (получен в результате случайной интеграции плазмиды с геном LEU2 в локус

	CCH1 штамма S67)
SDS63	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 pmc1::URA3 hog1::LEU2 {MOX} {5'-PDI1:uPA P_{GAP1}:MF1α-KDEL}</i> (получен в результате случайной интеграции плазмиды с геном <i>LEU2</i> в локус <i>HOG1</i> штамма S67)
SDS116	(получен штамма S67 в результате случайной интеграции плазмиды с геном <i>LEU2</i> , сопровождавшейся хромосомной перестройкой и нарушением гена <i>WEE1</i>)
3aMA60	<i>leu2 ade2 opu24 mox-Δ::P_{MOX}:uPA</i>
2dMA56	<i>leu2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA</i>
1MA77/12	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::LEU2</i>
1MA77/12/pCAT1	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::LEU2 [ADE2 PMR1]_{pCAT1}</i>
1MA77/12/p2CHA6	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::LEU2 [ADE2]_{p2CHA6}</i>
1MA77/12/GP1	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::G418^R [ADE2 PMR1]_{pCAT1}</i>
1MA77/12/GP1-Δvps35	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::G418^R vps35::LEU2 [ADE2 PMR1]_{pCAT1}</i>
1MA77/12/GAP2	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::G418^R [URA3 PMR1]_{pAF18}</i>
1MA77/12/GAP2-Δpmc1	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmc1::loxP pmr1::G418^R [URA3 PMR1]_{pAF18}</i>
1MA77/12G-GOX	<i>leu2 ade2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmr1::G418^R {LEU2 P_{MOX}:GOX}_{pDLMOX-GOD}</i>
64MA70Q	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰²</i>
64MA70QAL	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² {LEU2}_{pCHLX} {ADE2}_{pCHAD3}</i>
64MA70QA-Δpmc1	<i>leu2 ade2 ret1-27 pmc1::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² {ADE2}_{pCHAD3}</i>
64MA70QL-RET1	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² {LEU2}_{pCHLX} {ADE2 RET1}_{p2CHA6-27OPU}</i>

64MA70Q-RET1-Δpmc1	<i>leu2 ade2 ret1-27 pmc1::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² {ADE2 RET1}</i> _{p2CHA6-27OPU}
64MA70Q-RET1-Δvps10	<i>leu2 ade2 ret1-27 vps10::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² {ADE2 RET1}</i> _{p2CHA6-27OPU}
64MA70U	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA</i>
64MA70UAL	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {LEU2}</i> _{pCHLX} <i>{ADE2}</i> _{pCHAD3}
64MA70UA-Δvps10	<i>leu2 ade2 ret1-27 vps10::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {ADE2}</i> _{pCHAD3}
64MA70UA-Δvps35	<i>leu2 ade2 ret1-27 vps35::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {ADE2}</i> _{pCHAD3}
64MA70UL-RET1	<i>leu2 ade2 ret1-27 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {LEU2}</i> _{pCHLX} <i>{ADE2 RET1}</i> _{p2CHA6-27OPU}
64MA70U-RET1-Δvps10	<i>leu2 ade2 ret1-27 vps10::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {ADE2 RET1}</i> _{p2CHA6-27OPU}
64MA70U-RET1-Δvps35	<i>leu2 ade2 ret1-27 vps35::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA {ADE2 RET1}</i> _{p2CHA6-27OPU}
MC39	<i>leu2 ade2 ret1-27 pmr1::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² [ADE2 PMR1]</i> _{pCAT1}
MC39-MOX	<i>leu2 ade2 ret1-27 pmr1::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² [ADE2 PMR1]</i> _{pCAT1} <i>[MOX]</i> _{pMOX-H36}
MC39-RET1-MOX	<i>leu2 ade2 ret1-27 pmr1::LEU2 mox-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² [ADE2 PMR1]</i> _{pCAT1} <i>[RET1 MOX]</i> _{pRET1-MOX}
u15	описан в разделе 4.4.
u25	описан в разделе 4.4.
u96	описан в разделе 4.4.
u118	описан в разделе 4.4.
u170	описан в разделе 4.4.
v17	описан в разделе 4.4.
1B27-UL	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 {URA3}</i> _{pCCUR1} <i>{LEU2}</i> _{pCHLX}
1B27-Δabv1-UL	<i>leu2 ade2 ura3::ADE2 abv1::loxP {URA3}</i> _{pCCUR1} <i>{LEU2}</i> _{pCHLX}

Таблица 3. Штаммы *O. parapolymorpha*.

Штамм	Генотип (описание)
DL1-L	<i>leu2</i>
DL1ΔM	<i>leu2 moh-Δ</i>
DLU	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA</i>
DLQ	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰²</i>
DLC	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA-C</i>
DLCQ	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA-CQ³⁰²</i>
DLU/L	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA {LEU2}_{pCHLX}</i>
DLΔM/pAM226	<i>moh-Δ LEU2-{P_{MOX}:uPA}_{pAM226}-leu2-Δ5'</i> (получен в результате интеграции плазмиды pAM225, содержащей лишенный промоторной области <i>LEU2</i> , в мутантный локус <i>leu2</i> штамма DL1ΔM с образованием аллели <i>LEU2</i> дикого типа и беспромоторной мутантной аллели этого гена.)
DLΔM/pAM219/1	<i>leu2 moh-Δ tel:{LEU2 P_{MOX}:uPA}_{pAM219} :tel</i>
DLΔM/pAM219/2	<i>leu2 moh-Δ tel:{LEU2 P_{MOX}:uPA}_{pAM219} x2:tel</i>
DLU/pAM219	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA tel:{LEU2 P_{MOX}:uPA}:tel</i>
DLU/pAM226	<i>moh-Δ::P_{MOX}:uPA LEU2:{P_{MOX}:uPA}_{pAM226} :leu2-Δ5'</i> (получен в результате интеграции плазмиды pAM225, содержащей лишенный промоторной области <i>LEU2</i> , в мутантный локус <i>leu2</i> штамма DL1U с образованием аллели <i>LEU2</i> дикого типа и беспромоторной мутантной аллели этого гена.)
DLΔM/pAM281/1	<i>leu2 moh-Δ tel:{ScLEU2 P_{MOX}:uPA}x~8:tel</i>
DLΔM/pAM281/2	<i>leu2 moh-Δ tel:{ScLEU2 P_{MOX}:uPA}x~8:tel</i>
DL1-ret1ΔC	<i>leu2 ret1-ΔC:{ScLEU2}_{pCOP1BE}:ret1-Δ5'</i>
DLQ-20	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmt1-1</i> (мутант <i>pmt1-1</i> , полученный в результате химического мутагенеза из штамма DLQ)
DLM-20	<i>leu2 MOX pmt1-1</i>

	(получен из штамма DLQ-20 путем замены экспрессионной кассеты uPA-Q ³⁰² на ген MOX дикого типа)
DLPU-20	<i>leu2 moh-Δ:: 5'-PDI1:uPA pmt1-1</i> (получен из штамма DLQ-20 путем замены экспрессионной кассеты uPA-Q ³⁰² на экспрессионную кассету uPA под контролем промотора гена <i>PDI1</i>)
DLPU	<i>leu2 moh-Δ:: 5'-PDI1:uPA</i>
DLPUΔpmt1	<i>leu2 moh-Δ:: 5'-PDI1:uPA pmt1::LEU2</i>
DLQΔpmt1	<i>leu2 moh-Δ::P_{MOX}:uPA-Q³⁰² pmt1::LEU2</i>
DLΔpmt1G	<i>leu2 pmt1::G418^R</i>
DL1-Δpmt1	<i>leu2 pmt1::LEU2</i>

3.5. Плазмиды и генно-инженерные методы.

Список использованных плазмид приведен в таблице 4. Манипуляции с ДНК *in vitro* проводили с использованием стандартных генно-инженерных методов (Green and Sambrook, 2012). Обработку ДНК ферментами рестрикции проводили в соответствии с рекомендациями производителей этих ферментов. В зависимости от задач, полимеразную цепную реакцию проводили либо с использованием стандартной полимеразы Taq (Evrogen), либо полимеразы с повышенной точностью Pwo (Roche). Трансформацию *E. coli* плазмидами проводили по методу (Inoue et al., 1990).

Таблица 4. Плазмиды, использованные в работе.

Название	Назначение и/или функциональные элементы	Автор
AMIpL1	Челночный вектор с автономно реплицирующейся последовательностью	М. О. Агафонов

	из теломерной области <i>O. parapolymorpha</i> и геном <i>OroLEU2</i> в качестве селективного маркера.	
AMIpLD1	Плазмида, аналогичная AMIpL1, но с укороченным в промоторной части геном <i>OroLEU2</i> , который способен комплементировать мутации <i>leu2</i> в штаммах DL1-L, 1B и их производных либо при высокой копийности, либо при рекомбинации с мутантной аллелью <i>leu2</i> .	М. О. Агафонов
AMIpSL1	Плазмида, аналогичная AMIpL1, но с геном <i>ScLEU2</i> в качестве селективного маркера. Для полной комплементации мутации <i>leu2</i> в штаммах DL1-L, 1B и их производных требуется 5-10 копий плазмиды.	М. О. Агафонов
p24MH	Получена в результате вставки <i>MluI</i> - <i>HindIII</i> фрагмента плазмиды p24OPU, несущего ген <i>OPU24</i> , в челночный вектор AMIpL1.	М. О. Агафонов
p24OPU	Плазмида, выделенная из библиотеки геномных последовательностей <i>O. polymorpha</i> . Содержит ген <i>OPU24</i> дикого типа.	М. Б. Чеченова
p2CHA6	Вектор, способный стабильно поддерживаться эпизомно в клетках <i>O. polymorpha</i> . Содержит <i>OraADE2</i> в качестве селективного маркера, фрагмент 2 мкм ДНК и HARS6.	М. О. Агафонов
p2CHA6-27OPU	Плазмида, способная реплицироваться автономно. Содержит фрагмент 2μ ДНК,	М. О. Агафонов

	ген <i>ADE2</i> в качестве селективного маркера и ген <i>RET1</i> .	
pAF14	Содержит кассету для инактивации гена <i>PMR1</i> с геном устойчивости к G418 в качестве селективного маркера.	А. В. Фокина
pAF18	Плазмида, способная реплицироваться автономно. Содержит фрагмент 2μ ДНК, ген <i>ScURA3</i> в качестве селективного маркера и ген <i>PMR1</i> .	А. В. Фокина
pAHAD1	Содержит ген <i>OpaADE2</i>	М. О. Агафонов
pAM219	Экспрессионная кассета <i>P_{МОХ}-uPA</i> в векторе AMIpL1	М. О. Агафонов
pAM226	Экспрессионная кассета <i>P_{МОХ}-uPA</i> в векторе AMIpLD1	М. О. Агафонов
pAM281	Экспрессионная кассета <i>P_{МОХ}-uPA</i> в векторе AMIpSL1	М. О. Агафонов
pAM418	Результат делеции фрагмента <i>MluI-NcoI</i> , содержащего часть гена <i>OPU24</i> , в плазмиде p24MH.	М. О. Агафонов
pAM419	Результат делеции фрагмента <i>NcoI-HindIII</i> , содержащего часть гена <i>OPU24</i> , в плазмиде p24MH.	М. О. Агафонов
pAM410	Экспрессионная кассета <i>P_{МОХ}-uPA-C</i> в векторе AMIpLD1.	М. О. Агафонов
pAM655	Плазмида для инактивации <i>PMC1</i> , с возможностью самоэксцизии векторной части за счет <i>Cre-loxP</i> рекомбинации.	М. О. Агафонов
pCAF11	Содержит кассету для инактивации гена <i>VPS35</i> с геном <i>OroLEU2</i> в качестве селективного маркера.	А. В. Фокина
pCAT1	Плазмида, способная реплицироваться	Т. А. Аверина

	автономно. Содержит фрагмент 2μ ДНК, ген <i>OpaADE2</i> в качестве селективного маркера и ген <i>OpaPMR1</i> .	
pCCUR1	Содержит ген <i>URA3</i>	М. О. Агафонов
pCHAD3	Содержит ген <i>OpaADE2</i>	М. О. Агафонов
pCHLX	Содержит ген <i>LEU2</i>	М. О. Агафонов
pCLHXdHS	Содержит ген <i>LEU2</i> . В отличие от pCLHX не содержит сайта <i>HincII</i> .	М. О. Агафонов
pCOP1BE	Содержит <i>BglII-Ecl136II</i> фрагмент гена <i>RET1 O. polymorpha</i> и <i>ScLEU2</i> в качестве селективного маркера.	М. Б. Чеченова
pDLMOX-GOD(H)	Содержит экспрессионную кассету глюкозооксидазы <i>A. niger</i> под контролем промотора <i>MOX O. parapolymorpha</i> и селективный маркер <i>LEU2</i> .	(Kim et al., 2004)
pESS1	Содержит экспрессионную кассету <i>uPA</i> под контролем промотора <i>MOX</i> , <i>ScLEU2</i> в качестве селективного маркера и автономно реплицирующейся последовательности, фрагмент 2 μ <i>S. cerevisiae</i> , имеющий центромероподобную функцию в клетках <i>O. polymorpha</i> .	М. О. Агафонов
pKAF2	Содержит кассету для инактивации гена <i>PMC1</i> с модифицированным геном <i>ScLEU2</i> в качестве селективного маркера.	А. В. Фокина
pKAF48	Содержит ген <i>OroWEE1</i> и селективный маркер устойчивости к G418.	А. В. Фокина
pKAM555	Вектор с селективным маркером, который обеспечивает устойчивость к канамицину в клетках <i>E. coli</i> и	М. О. Агафонов

	устойчивость к G418 в клетках <i>S. cerevisiae</i> , <i>O. polymorpha</i> и <i>O. parapolymorpha</i> .	
pMOX-H36	содержит ген MOX в качестве селективного маркера и автономно-реплицирующуюся последовательность <i>O. parapolymorpha</i>	М. Б. Чеченова
pNR4	Экспрессионная кассета P_{MOX} -uPA-KDEL в векторе AMIpLD1.	Н. В. Романова
pNR5	Экспрессионная кассета P_{MOX} -uPA-C-KDEL в векторе AMIpLD1.	Н. В. Романова
pRET1-MOX	отличается от pMOX-H36 наличием гена <i>RET1</i> .	М. Б. Чеченова
pU15	Кассета для инактивации <i>VPS10</i> с геном <i>LEU2</i> в качестве селективного маркера	М. О. Агафонов

3.6. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Birnboim and Doly, 1979) с изменениями. Клетки, выращенные в течение ночи в 10 мл среды LB с антибиотиком, охлаждали на льду и осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 15 минут. Осадок суспендировали в 250 мкл TE (10 mM трис-HCl pH 8,0, 1 mM ЭДТА), на льду добавляли 500 мкл щелочного раствора (0,2 M NaOH, 1% SDS), плавно перемешивали до полного лизиса клеток, добавляли нейтрализующий раствор (3M ацетат калия, 2 M уксусная кислота) и снова плавно перемешивали до образования белых хлопьев. Осадок отделяли центрифугированием, а к супернатанту добавляли 0,7 объема изопропанола для осаждения ДНК. Осадку давали сформироваться, инкубируя образцы при +4°C в течение 15 минут. Образцы центрифугировали 3 минуты в настольной микроцентрифуге при 10000-12000 об/мин. Супернатант удаляли, а осадок растворяли в 500 мкл деионизованной воды. После полного растворения

добавляли 230 мкл 9М ацетата аммония и инкубировали при -20°C 20 минут, затем центрифугировали 3 минуты в настольной микроцентрифуге при 10000-12000 об/мин, переносили супернатант в новые пробирки и осаждали ДНК добавлением 0,7 объема изопропанола, как и на первом этапе. Образцы центрифугировали при тех же условиях, супернатант тщательно удаляли, а осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 100 мкл деионизованной воды.

3.7. Выделение геномной ДНК из дрожжей.

Для выделения ДНК из клеток дрожжей применяли либо стандартный метод, включающий обработку клеток зимолизазой или литиказой (Piper, 1996), либо разработанный нами упрощенный метод без ферментатического удаления клеточной стенки. В соответствии с этим методом, клетки из 1 мл ночной культуры YPD промывали 5 М раствором мочевины, суспендировали в 100 мкл буфера TE (10 мМ трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и добавляли 0,7 мл буфера TESM (10 мМ трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 2,5% SDS, 0,3М β-меркаптоэтанол). Смесь инкубировали при 56°C в течение 30 минут при регулярном плавном перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры и добавляли 0,4 мл 9М раствора ацетата аммония, плавно перемешивали и инкубировали при -20°C в течение 20 минут. Затем добавляли 0,1 мл насыщенной буфером TE смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивали встряхиванием несколько минут. Осадок и фракцию хлороформа отделяли центрифугированием при 12000-14000 об./мин в течение 5 минут в настольной микроцентрифуге. К супернатанту добавляли 0,6-0,7 объема изопропанола, перемешивали, инкубировали на столе 10-15 минут и центрифугировали 3 минуты при 10000 об./мин в настольной микроцентрифуге. Осадок, содержащий ДНК, промывали несколько раз 70% этанолом, высушивали и растворяли в 50 мкл деионизованной воды.

3.8. Множественная тандемная интеграция плазмид и определение копийности тандемных повторов.

В работе использовали плазмиды, основанные на векторах AMIpL1, AMIpLD1 и AMIpSL1, содержащих последовательность HARS24 (синоним HARS36), происходящую из теломерной области одной из хромосом *O. parapolymorpha*. Эта охарактеризованная нами ранее последовательность (Sohn et al., 1996) с одной стороны позволяет плазмидам автономно реплицироваться, а с другой – с высокой частотой из автономного состояния переходить в интегративное за счет рекомбинации с теломерами. Такая интеграция часто происходит в виде тандемных повторов плазмиды "голова-хвост". При селекции на высокую копийность селективного маркера (то есть, если маркер не достаточно высоко экспрессируется, и для обеспечения хорошего роста клеток на селективной среде требуется много его копий) можно получить клоны с большим количеством копий интегрированной плазмиды. Для этого трансформанты, содержащие автономно реплицирующуюся плазмиду, рассеивали на селективной среде и отбирали быстро растущие субклоны, которые снова рассеивали, чтобы опять отобрать субклоны с еще большей скоростью роста. Через несколько пересевов достигалась гомогенность по скорости роста колоний на расसेве истощающим штрихом, что свидетельствовало об интеграции плазмиды в геном. Другим фенотипическим проявлением интеграции была высокая митотическая стабильность плазмиды. Копийность интеграции определяли с помощью гибридизации по Саузерну рестрикционных фрагментов хромосомной ДНК после их электрофоретического разделения в агарозном геле. Для этого ДНК трансформантов гидролизировали рестриктазой, сайт которой присутствует в последовательности плазмиды, но вне ее участка, гибридизующегося с зондом. В результате при множественной тандемной интеграции получалось две полосы гибридизации – одна, соответствующая внутренней части повторов, а другая – крайнему повтору (Рисунок 19). Соотношение количества внутреннего фрагмента и фрагмента, соответствующего крайнему повтору, зависит от копийности плазмиды. При двух копиях интенсивность полос гибридизации одинаковая, при трех – у внутреннего фрагмента вдвое больше, при четырех – втрое и т. д. При разнице в

сигнале между этими полосами (копийность более 2) интенсивности сравнивали в серии разведений.

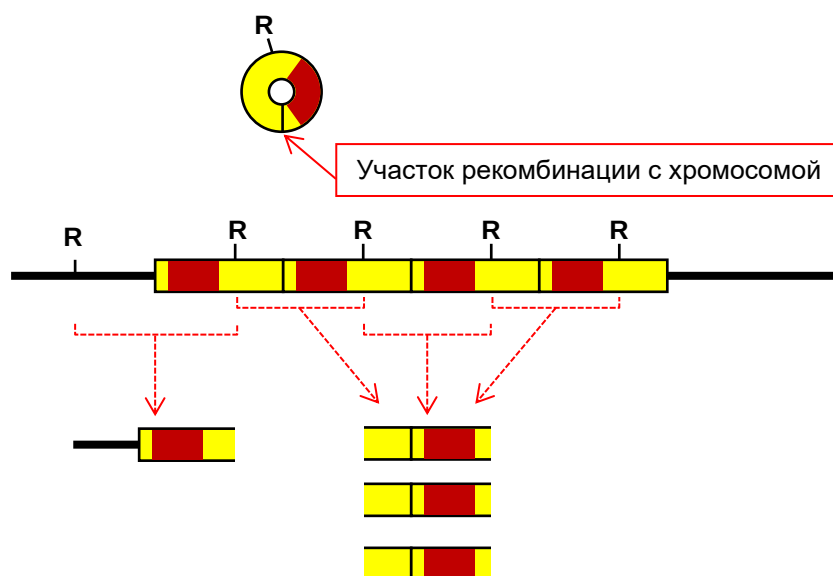


Рисунок 19. Схема анализа копийности тандемной интеграции кольцевой плазмиды в геном. Черной полосой обозначена хромосома реципиента; цветные прямоугольники – интегрированная плазмида; темно-красным цветом выделена область, гибридизующаяся с зондом; "R" – участок гидролиза рестриктазой перед электрофоретическим анализом. Объяснения приведены в тексте.

3.9. Электрофорез белков, иммуноблоттинг и зимография.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях в присутствии SDS, перенос белков из геля на мембрану и инкубацию мембраны с антителами проводили в соответствии со стандартными методами (Laemmli, 1970; Rosenberg, 2006; Towbin et al., 1979). Визуализацию полос белков, связавших меченные пероксидазой антитела, проводили с помощью набора ECL (Amersham).

Для зимографии uPA, проводили электрофорез в таких же условиях, но без добавления β-меркаптоэтанола и без кипячения образцов. После электрофореза гель отмывали от SDS 0,5% раствором тритон-X100 в буфере PBS* (20 mM натрий-фосфатный буфер pH 7,4, 100 mM NaCl) и помещали на поверхность фибринового геля (см. раздел "Детекция активности uPA). Гель инкубировали при 37°C до появления зон лизиса фибрина.

Зимографию инвертазы проводили согласно методике (Ballou, 1990).

3.10. Детекция активности uPA.

Белок uPA (urokinase-type plasminogen activator) синтезируется в виде одноцепочечного предшественника scuPA (single chain uPA) с кажущейся молекулярной массой около 50 кДа и состоящий из трех доменов (Рисунок 20). С-концевой домен является сериновой протеазой, которая активируется в результате гидролиза полипептидной цепи между остатками K158 и I159, катализируемого плазмином или калликреином. За счет наличия S-S связи, в результате этого гидролиза образуется двуцепочечная форма tscuPA (two chain uPA) с той же кажущейся молекулярной массой. Плазмин может гидролизовать uPA в участке и по другую сторону от этой S-S связи, в результате чего отщепляются N-концевые домены, и образуется форма "30 кДа" (см. обзор (Lijnen and Collen, 1991)). Основной функцией плазмина в плазме крови является лизис фибриновых сгустков. Плазмин образуется из плазминогена в результате протеолитического процессинга, катализируемого uPA. Коммерческие препараты бычьего или свиного фибриногена, как правило, в качестве примеси содержат плазминоген. Поэтому приготовленный из таких препаратов фибриновый гель может лизироваться при попадании на него uPA.

Для детекции фибринолитической активности uPA (Astrup and Mullertz, 1952), секретированного клетками дрожжей, использовали два подхода. Для быстрого сравнения разных клонов по эффективности секреции использовали твердую среду, содержащую фибрин и обеспечивающую индукцию промотора в экспрессионной кассете uPA. При росте клеток на такой среде вокруг колоний образовывались зоны лизиса фибрина, по разнице в размере которых можно было судить о различии в эффективности секреции uPA. Другой подход позволял сделать оценку различий в количестве секретированного uPA. Для этого проводили индукцию продукции этого белка в жидкой среде и на фибриновый гель наносили культуральные среды в серии разведений. Разницу в активности между образцами определяли по разведениям, в которых эти образцы образовывали одинаковые зоны лизиса фибрина.

Для приготовления фибринового геля готовили 0,2% раствор бычьего фибриногена (SIGMA) в 20 мМ натрий-фосфатный буфере pH 7,4, содержащем 100 мМ NaCl, и расплав 1,2 % агарозы в том же буфере. Раствор фибриногена подогревали до 37°C, а расплав агарозы быстро охлаждали примерно до той же температуры, после чего растворы смешивали в равных пропорциях, добавляли тромбин до концентрации 0,08 ед/мл, осторожно перемешивали и заливали слоем толщиной около 3 мм в квадратные пластиковые чашки Петри. В течение некоторого времени происходило застывание агарозного геля и формирование фибринового геля в результате действия тромбина.

Среды, содержащие фибрин, готовили таким же способом, только раствор фибриногена стерилизовали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,2-0,4 мкм, а расплав агарозы автоклавировали и добавляли к нему компоненты среды (обычно 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон). Источник углерода, как правило, добавляли в момент смешивания фибриногена и агарозы, поскольку в большинстве случаев в этом качестве выступал метанол. Для таких сред обычно использовали стандартные чашки Петри 90 мм.

3.11. Приготовление препаратов белков, ассоциированных с клетками дрожжей.

Клетки дрожжей разрушали стеклянными бусами в буфере, содержащем трис-HCl pH 7,5, 2% тритон-X100, 2 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз "Complete" (Roche) в рекомендованной производителем концентрации. Разрушение проводили при +4°C и охлаждали образцы на льду. При анализе активности uPA в лизатах ингибиторы протеаз не добавляли.

При анализе внутриклеточной агрегации uPA после разрушения обломки клеток осаждали центрифугированием при 300 g в течение 10 минут. Часть супернатанта оставляли для определения общего количества белка в соответствии с методом (Herbert et al., 1971). Супернатант центрифугировали при 10000-15000 g в течение 10 минут. Полученные фракции осадка и супернатанта смешивали с буфером для образцов (для электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии SDS) и

прогревали 5 минут на кипящей водяной бане. Образцы разводили 1-кратным буфером для образцов пропорционально общему количеству белка, выявленному в супернатанте после отделения клеточных обломков (см. выше).

При электрофоретическом анализе внутриклеточных белков для приготовления образцов использовали метод В.В. Кушнирова (Kushnirov, 2000).

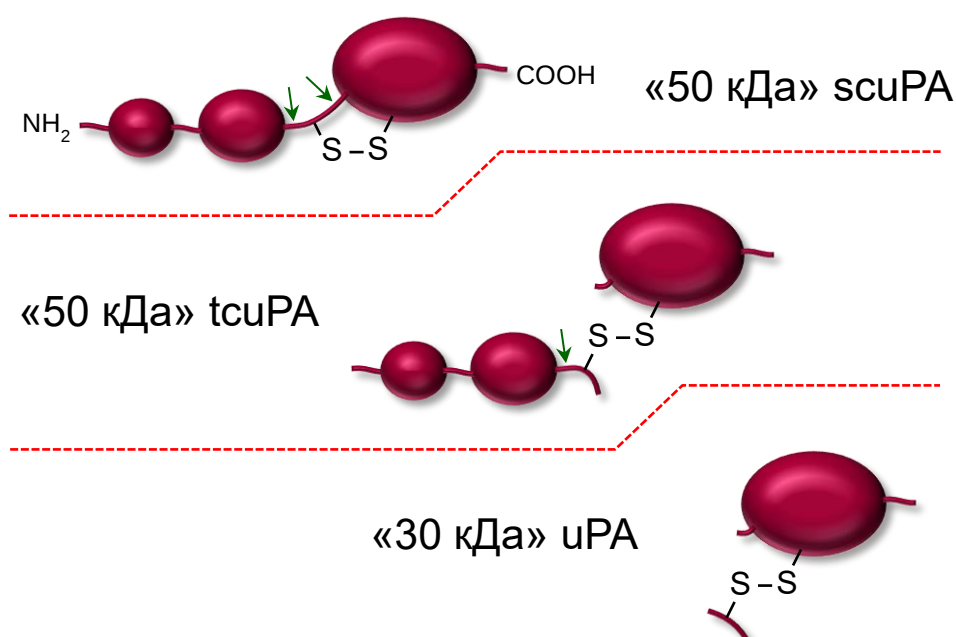


Рисунок 20. Схема протеолитического процессинга uPA. Стрелками указаны участки протеолиза плазмином. Объяснения приведены в тексте.

3.12. Антитела.

Для иммунологического выявления uPA были использованы мышинные моноклональные антитела UIG-1 (ИМТЕК), связывающиеся с каталитическим доменом этого белка. GOX выявляли с помощью коммерческих поликлональных кроличьих антител, любезно предоставленных проф. Н.-А. Kang (Республика Корея).

Для иммуноблоттинга белков Pmr1, CPY и Gas1 антисыворотки были получены путем иммунизации кроликов фрагментами этих белков, продуцированными в *E. coli* и выделенными с использованием металл-хелатной хроматографии.

3.13. Приготовление препаратов секретируемых белков для электрофоретического анализа.

Хитиназу выделяли из культуральных супернатантов путем сорбции на хитин как описано (Kuranda and Robbins, 1991). Для этого 15 мл культурального супернатанта инкубировали с 40 мг размолотого хитина при постоянном перемешивании в течение 3 часов. Хитин собирали центрифугированием и трижды промывали буфером PBS. Для элюции хитиназы к промытому хитину добавляли 100 мкл 4-х кратного электрофоретического буфера для образцов с SDS и инкубировали на кипящей водяной бане 5 минут. Образцы центрифугировали и супернатанты наносили на гель для проведения электрофореза. Концентрация хитиназы в образцах была достаточной для выявления полосы при окрашивании геля нитратом серебра.

Из-за низкой концентрации uPA в среде чувствительности метода иммуноблоттинга не хватало для детекции этого белка в образцах, приготовленных непосредственно из культуральных сред без концентрирования. Аналогичная проблема возникала при анализе CPY в культуральных средах штаммов с ненарушенным транспортом этого белка в вакуоль. Поэтому для электрофоретического анализа эти белки из культуральных сред осаждали ТХУ следующим образом. К 1 мл культуральной среды добавляли 33 мкл 0,5% дезоксихолата натрия, перемешивали и инкубировали на столе 5 минут. Добавляли 72 мкл 100% (вес/объем) ТХУ и инкубировали 1 час на столе. Осаждали центрифугированием в настольной микроцентрифуге при 10000-15000 g в течение 10 минут. Осадок дважды промывали ацетоном и оставляли под ацетоном на ночь. После этого еще раз промывали ацетоном, высушивали и растворяли в однократном электрофоретическом буфере для образцов.

4. Результаты

4.1. Характеристики продукции вариантов белка uPA в клетках *O. parapolymorpha*.

4.1.1. Сверхпродукция белка uPA нарушает его секрецию

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 эффективность секреции активатора плазминогена урокиназного типа человека (urokinase-type plasminogen activator, uPA) клетками дрожжей *S. cerevisiae* может быть существенно увеличена, если инактивировать ген кальциевой АТФазы аппарата Гольджи *PMR1* (Rudolph et al., 1989). Фермент uPA, активируя плазминоген, инициирует лизис фибриновых сгустков, поэтому, если твердая среда для дрожжей содержит фибриновый гель, вокруг колоний, секретирующих этот фермент, образуются более прозрачные зоны (зоны лизиса фибрина). Это позволяет быстро оценивать эффективность секреции у большого количества клонов и отбирать клоны с увеличенной продуктивностью (см. раздел Материалы и Методы).

Для решения поставленных в работе задач требовалось понимание того, что является лимитирующим фактором для секреции uPA клетками *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. В связи с этим возникал вопрос, до какой степени можно поднять продуктивность, если увеличивать уровень синтеза этого белка. Чтобы ответить на этот вопрос, был получен набор штаммов *O. parapolymorpha*, содержащих разное число копий экспрессионной кассеты uPA, интегрированной в разные локусы генома. Кассета содержала промотор гена *MOX*, обеспечивающий высокий уровень экспрессии при росте клеток на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода. Используя разные методы селекции, эту кассету интегрировали в локус гена *LEU2*, в локус гена *MOX* или в теломерные области. Поскольку при интеграции в локус гена *MOX* происходило замещение его кодирующей области на экспрессионную кассету, для корректности сравнения во всех других случаях

использовали штамм с делецией этого гена. Продукцию uPA оценивали по активности и по интенсивности полосы на иммуноблоттинге. Увеличение копийности экспрессионной кассеты приводило к существенному увеличению количества uPA внутри клеток, выявляемого по иммуноблоттингу, и снижению активности как в культуральной среде, так и внутри клеток (Таблица 5). Это означало, что uPA накапливался внутри клеток в неактивной форме.

Дальнейший анализ показал, что накопление uPA внутри клеток происходило в виде высокомолекулярных агрегатов, поскольку этот белок мог быть осажден центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. в присутствии детергента для предотвращения связывания белка с мембранной фракцией (Рисунок 21). Белок uPA из культуральной среды трансформантов с одной копией экспрессионной кассеты мигрировал при электрофорезе в присутствии SDS как размытое пятно, если не обрабатывать препарат EndoN для удаления N-гликозидных цепей, или как четкая полоса с кажущейся молекулярной массой около 30 kDa, если такую обработку провести (Рисунок 22). Такое изменение подвижности в результате обработки EndoN означало, что uPA имеет N-гликозидную цепь нерегулярного размера, что обусловлено ее модификациями в аппарате Гольджи. Белок uPA синтезируется как зимоген, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 48 kDa, состоящий из двух N-концевых доменов, которые не нужны для каталитической активности, и C-концевого домена, являющегося сериновой протеазой. Активация зимогена происходит в результате протеолитического процессинга между K¹⁵⁸ и I¹⁵⁹. Точность этого процессинга необходима для активности, поскольку гидролиз связи R¹⁵⁶-F¹⁵⁷ тромбином приводит к полной инактивации фермента (Lijnen and Collen, 1991). Обработанный EndoN белок мигрировал при электрофорезе немного быстрее, чем рекомбинантный uPA лишенный N-концевых доменов (Рисунок 22, дорожки 3, 4, 5). При этом белок в культуральной среде обладал фибринолитической активностью (данные не приведены). Это указывало на то, что форма 30 kDa образовалась в результате протеолиза в участке активации (K¹⁵⁸-I¹⁵⁹), поскольку гидролиз в других участках либо давал бы фрагменты большего размера, либо приводил бы к инактивации фермента.

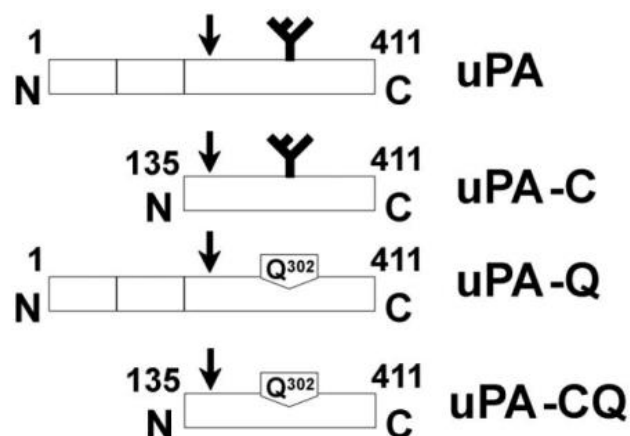
В отличие от белка, секретированного в культуральную среду, uPA, содержащийся в агрегированном состоянии внутри клеток, мигрировал при электрофорезе в присутствии SDS четкой полосой, подвижность которой лишь незначительно менялась после обработки EndoH (Рисунок 22 дорожки 1 и 2). Это означало, что N-гликозидная цепь белка не была модифицирована в аппарате Гольджи, а значит, агрегаты этого белка сформировались в ЭР. Этот вывод был подтвержден в экспериментах, приведенных ниже.

Таблица 5. Зависимость продукции uPA от копияности и локуса интеграции экспрессионной кассеты (результаты типичного эксперимента).

Штамм	Количество копий в локусе			uPA (% от значения для DLU/L)		
	<i>trp</i>	<i>leu2</i>	теломера	активность в культуральной среде	активность в клеточном гомогенате	количество в клеточном гомогенате *
DLU/L	1			100	100	100
DLΔM/pAM226		1		96	119	98
DLΔM/pAM219/1			1	68	59	21
DLΔM/pAM219/2			2	50	49	170
DLU/pAM219	1		1	29	71	560
DLU/pAM226	1	1		17	45	620
DLΔM/pAM281/1			~8	10	7	1400
DLΔM/pAM281/2			~8	20	7	1100

* Оценено по интенсивности полосы ~50kDa на иммуноблоттинге при сравнении серии последовательных разведений препаратов.

а)



б)

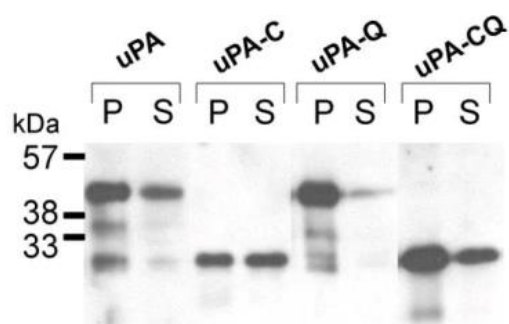


Рисунок 21. Схема использованных в работе вариантов белка uPA (а) и анализ uPA методом иммуноблоттинга в осадочной (P) и растворимой (S) фракции клеточных лизатов, полученных из трансформантов, продуцирующих эти варианты uPA (б).

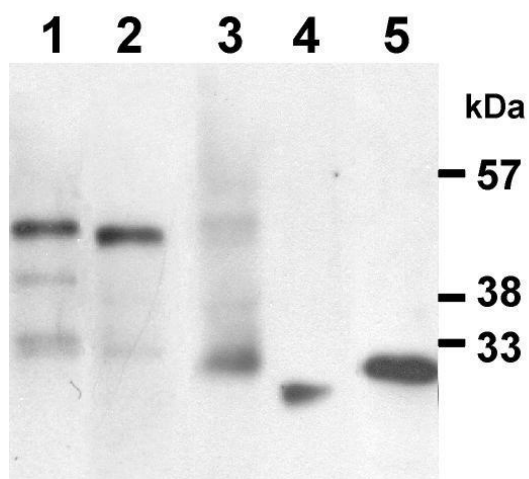


Рисунок 22. Анализ uPA методом иммуноблоттинга в культуральной среде и внутриклеточных агрегатах. Дорожки 1 и 2 – обработанная и необработанная EndoH, соответственно, осадочная фракция клеточного лизата штамма DLU, продуцирующего полноразмерный uPA. Дорожки 3 и 4 – обработанная и

необработанная EndoH, соответственно, культуральная среда того же штамма. Дорожка 5 – осадочная фракция штамма DLCQ, продуцирующего uPA без N-концевых доменов и с нарушением участка N-гликозилирования.

4.1.2. N-гликозилирование и N-концевой домен uPA существенно влияют на эффективность секреции этого белка

В секреторном пути белок uPA модифицируется присоединением гликозидной цепи к остатку N³⁰². Замена этого остатка на другой предотвращает эту модификацию. Нами были получены штаммы *O. parapolymorpha*, продуцирующие варианты uPA, отличающиеся по положению 302 (N или Q) и по наличию N-концевых доменов (Рисунок 21 а). У этих штаммов было сравнено количество uPA, секретированного в культуральную среду, по фибринолитической активности и по интенсивности полосы на иммуноблоттинге (Таблица 6). В результате было выяснено, что и присутствие в составе молекулы N-концевых доменов, и нарушение участка N-гликозилирования снижало эффективность секреции uPA.

Такая же закономерность в секреции разных вариантов uPA наблюдалась и в случае дрожжей *S. cerevisiae* (Рисунок 23). Это указывало на то, что причины низкой эффективности секреции uPA схожи у разных видов дрожжей.

Таблица 6. Сравнение эффективности секреции различных вариантов uPA (% от значения для uPA дикого типа в типичном эксперименте).

вариант uPA	Оценка относительного количества uPA в культуральной среде	
	активность*	иммуноблоттинг**
uPA	100	100
uPA-C	1850	1500
uPA-Q	30	14
uPA-CQ	770	330

* Вычислено в результате сравнения размеров зон лизиса фибринового геля, образованных образцами в серии разведений.

** Вычислено в результате сравнения интенсивности полосы 30kDa, выявляемой при иммуноблоттинге препаратов культуральных сред в серии последовательных разведений. Для удаления N-гликозидных цепей препараты были обработаны EndoH.

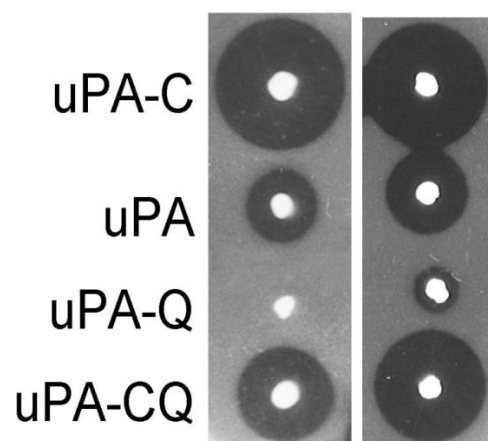


Рисунок 23. Зоны лизиса на среде, содержащей фибрин, образованные дрожжами, продуцирующими разные варианты uPA. Левая панель – трансформанты *S. cerevisiae*; правая панель – *O. parapolymorpha*. Приблизительно одинаковое количество клеточной массы, взятой со свежего штриха микробиологической петлей, наносили на поверхность среды в виде круглых пятен диаметром около 2 мм и инкубировали 20 часов при 37°C в случае *O. parapolymorpha* или 40 часов при 30°C в случае *S. cerevisiae*.

4.1.3. Агрегация uPA связана с накоплением этого белка в ЭР.

Распределение различных вариантов uPA между осадочной и растворимой фракцией клеточных гомогенатов зависело от эффективности секреции конкретного варианта (Рисунок 21). Наибольшее соотношение uPA в растворимой фракции по отношению к осадочной наблюдалось в случае варианта uPA-C, обладающего лучшей эффективностью секреции, а наименьшее – у наименее эффективно секретируемого варианта uPA-Q. Поскольку основная полоса на иммуноблоттинге растворимой фракции у вариантов uPA и uPA-C соответствовала белку с «коровым» гликозилированием, можно было заключить, что в этой фракции находятся молекулы, находящиеся в процессе укладки, с еще неопределенной судьбой и правильно свернутые молекулы в ожидании транспортировки из ЭР в аппарат Гольджи или молекулы, уже попавшие в аппарат Гольджи, но еще не получившие

модификации гликозидной цепи, заметно влияющие на электрофоретическую подвижность.

Таким образом, количество белка в растворимой фракции должно зависеть от скоростей его синтеза, укладки и выхода из ЭР. Чтобы сократить число параметров, влияющих на содержание uPA в растворимой фракции, с трех до двух, было решено предотвратить выход этого белка из ЭР. Для этого он был снабжен С-концевым сигналом задержки в ЭР (последовательность KDEL). Это должно было обеспечить накопление растворимой формы в ЭР. Эта модификация блокировала секрецию белка и увеличивала его количество внутри клеток. Этот эффект был особенно выражен в случае варианта uPA-C. Однако накопление белка внутри клеток происходило не за счет растворимой фракции, а за счет нерастворимых агрегатов (Рисунок 24).

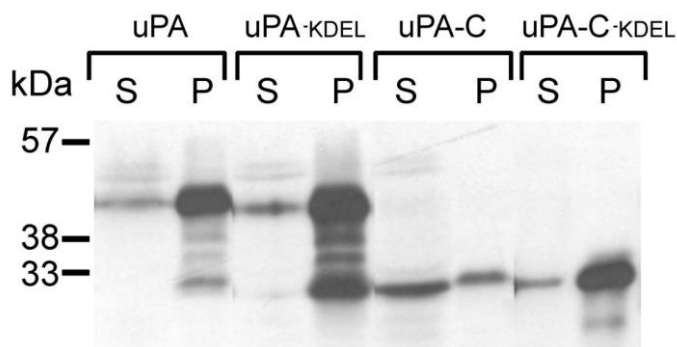


Рисунок 24. Анализ методом иммуноблоттинга распределения uPA между растворимой (S) и осадочной (P) фракцией клеточных лизатов. "uPA", "uPA-KDEL", "uPA-C" и "uPA-C-KDEL" – трансформанты штамма DL1-L, полученные в результате интеграции одной копии плазмиды pAM226, pAM410, pNR4 или pNR5, соответственно.

4.2. Мутации, увеличивающие эффективность секреции uPA у дрожжей *O. polymorpha*.

Чтобы понять, какие процессы в клетке влияют на эффективность укладки модельного белка uPA в ЭР дрожжей *O. polymorpha*, был проведен поиск мутаций, усиливающих его секрецию. Для этого в штамм 8V была введен автономно реплицирующийся экспрессионный вектор pESS1, содержащий ген, кодирующий uPA, под контролем регулируемого промотора MOX. В качестве селективного маркера был использован ген *LEU2 S. cerevisiae*, который вдобавок обеспечивал автономную репликацию вектора в клетках штамма-хозяина. Высокая стабильность и низкая копияность вектора обеспечивалась присутствием в нем фрагмента 2мкм ДНК *S. cerevisiae*, который имеет центромероподобные свойства в клетках *O. polymorpha* (Bogdanova et al., 1998). Трансформант, содержащий этот вектор, был подвергнут химическому мутагенезу с использованием этилметансульфоната. Мутагенизированные клетки были высеяны на твердую среду, чтобы получить отдельные колонии, которые потом переносили на среду, содержащую фибрин, для оценки эффективности секреции uPA. При росте на такой среде вокруг колоний, секретирующих uPA, образовывались зоны лизиса фибрина, размер которых свидетельствовал об увеличении секреции активной формы этого белка. Таким способом было проанализировано около 3000 клонов, из которых отобрано 34, 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.

4.2.1. 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.

4.2.1.1. Наследование мутантного фенотипа.

Чтобы определить, являются ли обнаруженные фенотипы следствием одной мутации, из мутанта 24-8V был «потерян» экспрессионный вектор pESS1, имеющий селективный маркер *LEU2*, чтобы штамм стал ауксотрофным по лейцину, и этот штамм был скрещен со штаммом 1B/SM/L (*leu2 ade2 mox-Δ::P_{МОХ}:uPA {LEU2}*), который был ауксотрофным по аденину и метанолу. Такое сочетание ауксотрофных мутаций позволяло селективировать гибриды на среде без аденина и лейцина. Поскольку штамм 1B/SM/L содержал экспрессионную кассету uPA, интегрированную в локус *МОХ* с замещением кодирующей области этого гена, половина мейотических сегрегантов полученных диплоидов должна была ее содержать. Это давало возможность определять эффективность секреции этого белка. Такие сегреганты можно было отбирать по неспособности расти на среде с метанолом. Анализ мейотических сегрегантов показал, что все сегреганты с фенотипом комкования клеток были неспособны расти при повышенной температуре (45°C), а среди «некомкующихся» сегрегантов только часть была температурочувствительными (Ts45). Важно отметить, что штамм 8V, на котором получались мутанты, также был Ts45, а штамм 1B и полученный из него использованный для скрещивания 1B/SM/L были способны расти при температурах до 49°C, как штамм *O. polymorpha* дикого типа. Это означало, что мутация, вызывающая эффект комкования, приводит к чувствительности к повышенной температуре. При этом штамм 24-8V имеет и другую Ts мутацию, не связанную с комкованием и полученную от исходного штамма 8V.

Среди полученных из скрещивания мейотических сегрегантов был отобран клон, обозначенный 1MA55, который был неспособен утилизировать метанол, продуцировал uPA, комковался и имел только одну Ts мутацию. Кроме того, он был ауксотрофным по аденину и прототрофным по лейцину. Отсутствие второй Ts мутации было подтверждено следующим образом. 1MA55 был скрещен с ауксотрофным по лейцину штаммом 1B/SM/A (*leu2 ade2 mox-Δ::P_{МОХ}:uPA {ADE2}*) и для полученного гибрида был проведен тетрадный анализ. Все мутантные фенотипы, а именно сниженная скорость роста, увеличенные зоны лизиса на среде с фибрином, чувствительность к повышенной температуре и комкование клеток, сегрегировали в тетрадах 2:2. При этом в 10 проанализированных тетрадах не было рекомбинации

этих фенотипов. Это показывало, что все они являются следствием одной мутации, которую мы обозначили *oru24* (*overproduction of uPA*).

4.2.1.2. Клонирование гена *OPU24*.

Ген *OPU24* дикого типа был клонирован из библиотеки геномных последовательностей *O. polymorpha*, полученной на основе автономно-реплицирующегося вектора с геном *LEU2* в качестве селективного маркера. Для клонирования гена использовали сегрегант из скрещивания, описанного в конце предыдущего раздела, *заМА60* (*oru24 leu2 ade2 тох-Δ::P_{МОХ}:uPA*). Этот штамм был трансформирован библиотекой, и, прежде чем посеять на чашки со твердой средой, трансформационную смесь инкубировали в течение 3 дней в жидкой среде без лейцина для обогащения культуры быстро делящимися клетками. Затем полученную культуру разводили и высевали на чашки со средой без лейцина, чтобы получить большое количество отдельных колоний. Среди выросших клонов было отобрано 6 быстрорастущих. Все они были способны расти при 45°C, потеряли способность к сверхпродукции *uPA* и их клетки не комковались. Из одного из этих клонов с помощью трансформации *E. coli* была выделена плазмида, обозначенная *p24OPU* и содержащая вставку геномной ДНК размером около 6 т.п.н. Эта плазмида была способна комплементировать все плеiotропные проявления мутации *oru24*. Путем делеционного анализа был выявлен фрагмент клонированной вставки между сайтами *MluI* и *HindIII* размером 1,6 т.п.н., ответственный за комплементацию *oru24* (рисунок 25). Далее была определена последовательность этого фрагмента. Он содержал единственную полную открытую рамку считывания, кодирующую белок, обозначенный *Ору24*, который показывал высокую степень гомологии с маннозо-1-фосфат гуанилтрансферазой *Psa1/Srb1/Vig1 S. cerevisiae* (77% совпадений, 85% сходства) и *Srb1 C. albicans* (79% совпадений, 87% сходства).

Чтобы доказать, что клонированный ген действительно является аллелью дикого типа гена, в котором локализована мутация *oru24*, были получены плазмиды *pAM418* и *pAM419*, содержащие 3'- или 5'-концевую половину этого гена (рисунок 25). Этими плазмидами был трансформирован штамм *заМА60* (*oru24 leu2 ade2 тох-Δ::P_{МОХ}:uPA*). Примерно 1% трансформантов, полученных с плазмидой *pAM418*, имели фенотип

дикого типа, а с плазмидой рАМ419 таких трансформантов не было обнаружено. Поскольку плазмиды содержали автономно реплицирующуюся последовательность, большинство трансформантов должны были содержать их в автономном виде, а фрагмента гена оказывалось недостаточно для комплементации мутации. Восстановление гена дикого типа могло происходить в результате рекомбинации плазмиды с мутантной аллелью в геноме. Трансформанты с фенотипом дикого типа могли появляться, если такая рекомбинация происходила

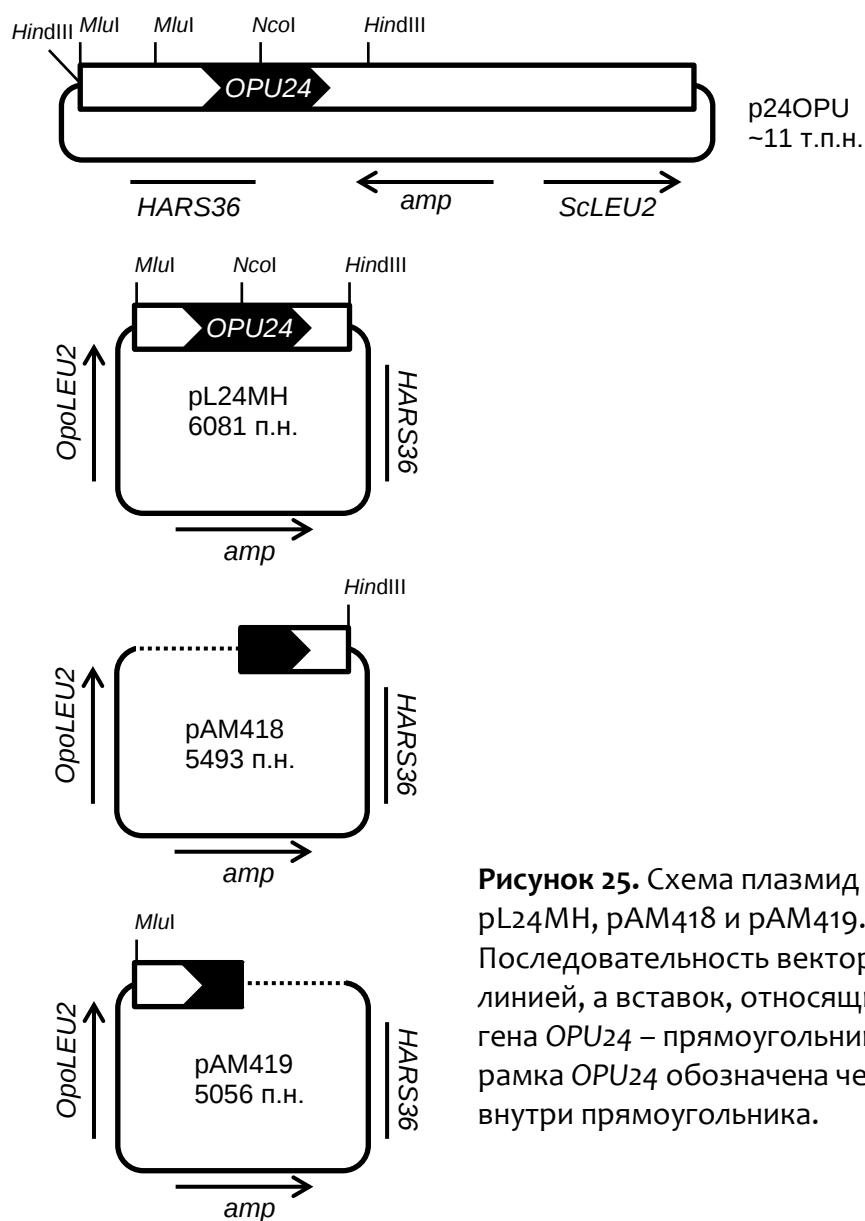


Рисунок 25. Схема плазмид p24OPU, pL24MH, pAM418 и pAM419. Последовательность вектора представлена линией, а вставок, относящихся к локусу гена *OPU24* – прямоугольником. Открытая рамка *OPU24* обозначена черной стрелкой внутри прямоугольника.

непосредственно после трансформации. Однако можно было предполагать, что с некоторой вероятностью рекомбинация плазмидной последовательности с геномным локусом может происходить и в процессе культивирования трансформанта. Чтобы это проверить, клетки трансформантов, имеющих мутантный фенотип, были суспендированы в воде и высеяны на среду YPD в количестве примерно 10^7 клеток на чашку. Чашки инкубировали при 45°C, чтобы могли вырасти только клоны дикого типа. Таким способом было проверено по 5 трансформантов с плазмидой pAM418 и с плазмидой pAM419. В случае плазмиды pAM418 трансформанты выщепляли клоны дикого типа с частотой $0,2-1,4 \times 10^{-5}$, а в случае плазмиды pAM419 таких клонов не было совсем. Это подтвердило наше предположение, что клоны дикого типа появляются в результате рекомбинации плазмидного фрагмента гена с мутантным локусом, и что клонированный ген является аллелью дикого типа, соответствующей мутации *ори24*, которая локализована в области гена, соответствующей его фрагменту в плазмиде pAM418.

4.2.1.3. Мутация *ори24* влияет на морфологию клеточной стенки и гликозилирование секретируемых белков.

Известно, что некоторые мутации в гене *PSA1 S. cerevisiae* приводят к зависимости роста от осмотической стабилизации среды (Blagoeva et al., 1991; Maerkisch et al., 1983; Warit et al., 1998). Мутант *ори24* 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, что можно было скомпенсировать добавлением осмостабилизатора, например 1М сорбитола, 0,5М NaCl (данные не приведены) или 10% ПЭГ 1000 (рисунок 26). Часто осмозависимая чувствительность к детергентам бывает связана с нарушениями клеточной стенки. Действительно, электронная микроскопия выявила существенные изменения в морфологии этой структуры у мутанта *ори24* (рисунок 27).

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 *ори24* повлияет на характер гликозилирования секретируемых

белков. У дрожжей *S. cerevisiae* в качестве модельного гликопротеида часто используется продукт гена *SUC2*, инвертаза. В зависимости от старта транскрипции и,

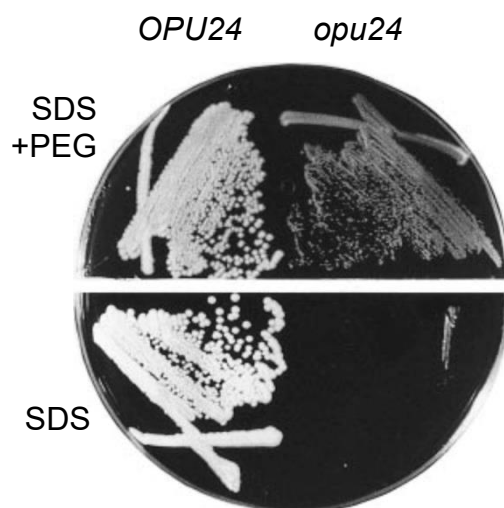


Рисунок 26. Осмозависимая гиперчувствительность мутанта *opu24* к SDS. Клетки мутанта 24-8V и исходного штамма 8V с геном *OPU24* дикого типа были посеяны истощающим штрихом на среде YPD, содержащей 0,004% SDS с добавлением ("SDS+PEG") или без ("SDS") ПЭГ1000.

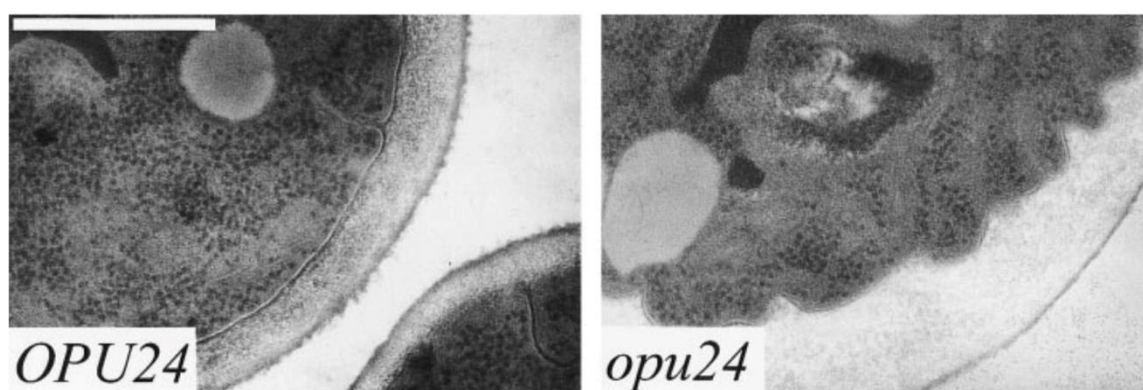


Рисунок 27. Электронная микрофотография клеток штамма 8V (*OPU24*) и мутанта 24-8V (*opu24*). Белый прямоугольник – 0,5 мкм.

Соответственно, при трансляции могут образовываться два продукта этого гена – периплазматическая инвертаза с сигналом секреции и внутриклеточная без сигнала секреции (Carlson and Botstein, 1982). При прохождении секреторного пути к белку присоединяются гликозидные цепи, сильно увеличивая размер белка, что мешает прохождению его через клеточную стенку и таким образом способствует его задержке в периплазме. У дрожжей *O. polymorpha* нет гена, кодирующего инвертазу, а гидролиз сахарозы происходит при участии продукта гена *MAL1*, кодирующего мальтазу (Viigand et al., 2018). Белок *Suc2* удобен не только тем, что содержит 4 сайта N-гликозилирования (Carlson and Botstein, 1982; Gascón et al., 1968), но и тем, что его можно детектировать в геле после электрофореза в неденатурирующих условиях методом зимографии. Чтобы использовать инвертазу в дрожжах *O. polymorpha* в качестве модельного гликопротеида, был сконструирован вектор *pLDIN1*, содержащий ген *SUC2* *S. cerevisiae*. В клетках *O. polymorpha*, содержащих этот вектор и выращенных на среде с глицерином в качестве единственного источника углерода, обнаруживалась только периплазматическая форма белка, о чем можно было судить по тому, что она мигрировала при электрофорезе размытым пятном и существенно медленнее, чем цитозольная форма инвертазы *S. cerevisiae* (рисунок 28 а). 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 28 б). 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 большим количеством слабо гликозилированных форм, способных преодолеть клеточную стенку, но и более высокой проницаемостью самой клеточной стенки.

Для анализа O-гликозилирования в дрожжах обычно используют хитиназу. Этот белок не имеет сайтов N-гликозилирования, но модифицируется в секреторном пути

присоединением большого числа О-гликозидных цепей. У мутанта *oru24* этот белок мигрировал при электрофорезе быстрее и более размытым пятном, чем у штамма дикого типа. Также было снижено его количество (рисунок 29). Это указывало на нарушение О-гликозилирования.

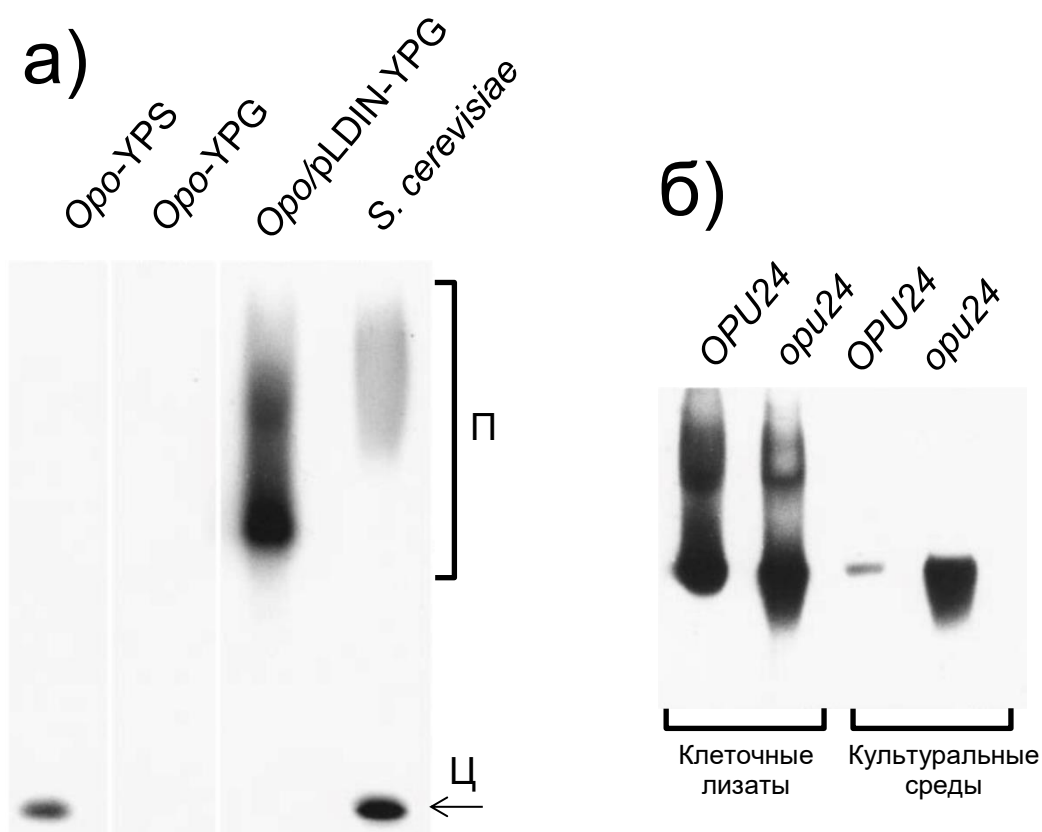


Рисунок 28. Зимография инвертазы.

а) Сравнение электрофоретической подвижности белков с инвертазной активностью в клеточных лизатах *O. polymorpha* и *S. cerevisiae*. Opo-YPS – штамм 8V *O. polymorpha* с "пустым" вектором AMIpLD1, инкубированный в среде с сахарозой в течение 4-х часов; Opo-YPG – такой же штамм, но инкубированный в среде с глицерином; Opo/pLDIN1-YPG – штамм 8V *O. polymorpha*, трансформированный плазмидой pLDIN1, содержащей ген *SUC2* *S. cerevisiae*, выращенный в среде с глицерином; *S. cerevisiae* – штамм *S. cerevisiae*, выращенный в среде YPD до стационарной фазы. П – периплазматические формы; Ц – цитозольная форма.

б) Сравнение электрофоретической подвижности инвертазы, продуцированной клетками дикого типа (OPU24) и мутанта *oru24* (*oru24*) *O. polymorpha*.

4.2.1.4. Мутация *ori24* увеличивает эффективность секреции иРА.

Поскольку мутант *ori24* имел нарушенную клеточную стенку, можно было предполагать, что увеличение секреции иРА 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 (таблица 7). 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 (рисунок 30).

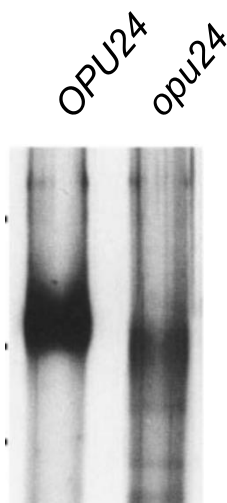


Рисунок 29. Анализ электрофоретической подвижности хитиназы, секретированной в культуральную среду штаммом дикого типа (*OPU24*) и мутантом *ori24* (*ori24*).

OPU24

ori24

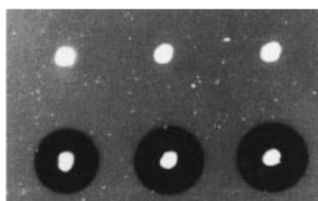


Рисунок 30. Влияние мутации *ori24* на секрецию негликозилированного варианта *uPA*, *uPA-Q³⁰²*. Штамм 24/UR2, содержащий мутацию *ori24* и интегрированную в геном экспрессионную кассету *uPA-Q³⁰²*, трансформировали либо плазмидой с геном *OPU24* дикого типа (*OPU24*), либо пустым вектором (*ori24*). Клетки нанесли на среду, содержащую фибрин, и инкубировали в течение 20 часов при 37°C. На фотографии представлено по три трансформанта для каждой плазмиды.

Таблица 7. Влияние мутации *ori24* и осмостабилизации на количество *uPA* в культуральной среде и клеточных лизатах.

Штамм 3аМА60 (*leu2 ade2 ori24 tox-Δ::P_{МОХ}:uPA*) был трансформирован либо плазмидой pL24МН, несущий ген *OPU24* дикого типа, либо «пустым» вектором AMIpL1. Трансформанты были выращены в жидкой среде с метанолом для индукции экспрессии *uPA*. В качестве осмотического стабилизатора использовали 10% ПЭГ 1000. Фибринолитическую активность в среде и клеточных лизатах нормализовали на общий клеточный белок. Активность выражена в процентах по отношению к активности в культуральной среде штамма с геном *OPU24* дикого типа, выращенного в среде без осмостабилизатора. Приведены результаты одного типичного эксперимента.

штамм	осмостабили- затор	активность <i>uPA</i>		
		%		соотношение среда/клетки
		культуральная среда	клеточный лизат	
<i>OPU24</i>	-	100	190	0,53
<i>OPU24</i>	+	64	129	0,5
<i>ori24</i>	-	4480	724	6.2
<i>ori24</i>	+	3450	621	5,6

4.2.1.5. Мутация *ори24* увеличивает чувствительность клеток к агентам, нарушающим укладку белка в ЭР.

Гликозилирование играет существенную роль в процессе укладки белков в ЭР. Поэтому мы предполагали, что мутация *ори24* может оказывать влияние на накопление несвернутых белков в этом компартменте и вызывать увеличение чувствительности к агентам, нарушающих укладку белков. Традиционно в качестве таких агентов используют ДТТ, мешающий образованию S-S связей, и туникамицин, ингибирующий присоединение N-гликозидов к вновь синтезирующимся белкам. Действительно, мутация *ори24* приводила к существенному увеличению чувствительности к этим агентам (рисунок 31).

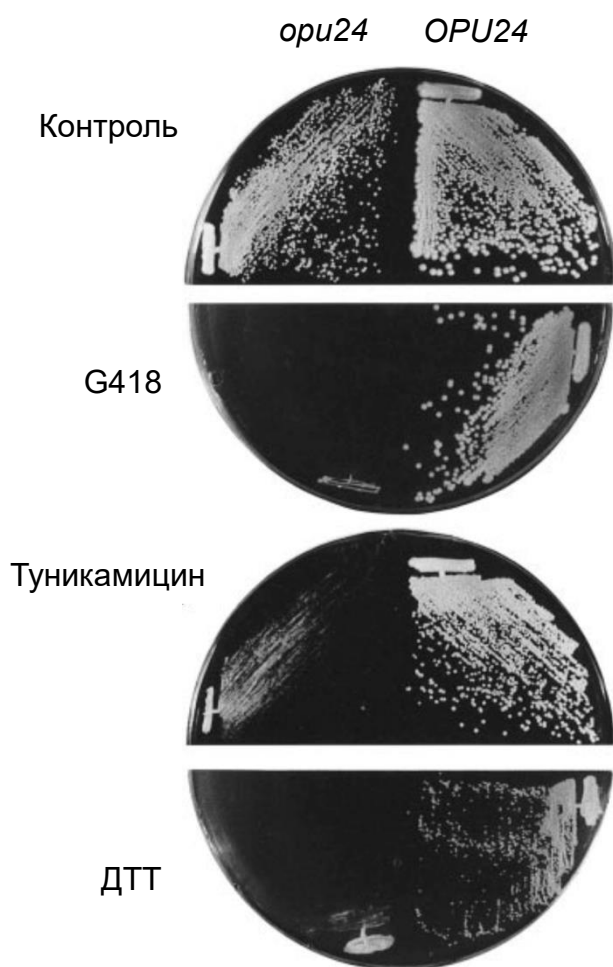


Рисунок 31. Чувствительность мутанта *ори24* к G418 (10 мкг/мл), туникамицину (1 мкг/мл) и дитиотреитолу (0,2%). *OPU24* – мутант *ори24* трансформированный плазмидой с геном *OPU24* дикого типа; *ори24* – такой же штамм, но трансформированный "пустым" вектором.

4.2.2. Мутация в гене, кодирующем α -субъединицу окисляющего комплекса COPI

4.2.2.1. Наследование фенотипических проявлений мутанта 27-8V.

Другой мутант с увеличенной продуктивностью uPA, 27-8V, был чувствителен к недостатку кальция в среде. Этот фенотип мог позволить по комплементации клонировать ген дикого типа, соответствующий мутации. Однако важно было убедиться, что и увеличение секреции uPA, и чувствительность к недостатку кальция определяются одной и той же мутацией. Чтобы это проверить, экспрессионный вектор pESS1, содержащий селективный маркер *LEU2*, был «потерян» из этого мутанта. В результате штамм стал ауксотрофным по лейцину, и его можно было скрестить с ауксотрофным по аденину штаммом 1B/SM/L (*leu2 ade2 tox-Δ::P_{МОХ}:uPA {LEU2}*), несущем экспрессионную кассету uPA вместо гена *МОХ*. После споруляции полученного диплоида был отобран *tox*-негативный *leu2* сегрегант, обозначенный 2dMA56, с увеличенной продуктивностью uPA и чувствительный к недостатку кальция в среде. Этот сегрегант снова был скрещен со штаммом 1B/SM/L (*leu2 ade2 tox-Δ::P_{МОХ}:uPA {LEU2}*). В результате получился диплоид, у которого локус *МОХ* с интегрированной экспрессионной кассетой uPA был гомозиготным. Тетрадный анализ мейотического потомства этого диплоида показал, что все мутантные фенотипы: увеличенная продукция uPA, чувствительность к недостатку кальция и сниженная скорость роста – сегрегировали 2:2. При этом среди девяти тетрад не было обнаружено рекомбинации этих фенотипов. Это означало, что все они являются следствием одной и той же мутации.

4.2.2.2. Клонирование гена *RET1 O. polymorpha*.

Ген, комплементирующий полученную мутацию, был клонирован из библиотеки геномных последовательностей *O. polymorpha* с использованием селекции на среде с низким содержанием кальция. При такой селекции было получено несколько трансформантов, только один из которых потерял способность к сверхпродукции uPA. Из этого трансформанта была выделена плаزمиды, и определена

последовательность вставки геномной ДНК. Вставка содержала только одну полную открытую рамку считывания. Эта рамка считывания в начале прерывалась коротким участком с нонсенс-кодонами, что позволяло предположить наличие интрона в этой области. Чтобы проверить это предположение, была проведена обратная транскрипция и ПЦР с праймерами, отжигающимися с двух сторон от предполагаемого интрона. Действительно, определение последовательности продукта ПЦР показало, что продукт, полученный после обратной транскрипции, был на 48 пар оснований короче, чем продукт, полученный на матрице геномной ДНК. Выявленный интрон имел такую же 5'-концевую последовательность для спласинга (GTAAGT) и консенсусную последовательность "точки ветвления", как и интроны гена *COF1* (последовательности гена и кДНК депонированы в базе данных GenBank под номерами ВН023930 и АF399639, соответственно) и интроны гена *ACT1* (Kang et al., 2001).

Сплайсированная мРНК кодировала белок размером 1206 аминокислотных остатков – высоко гомологичный α -субъединицы окаймляющего комплекса COPI различных организмов. В частности, сходство с α -COP *S. cerevisiae* выявлялось в 74% аминокислотных остатков последовательности, а 58% были идентичны (рисунок 32). Это был единственный гомолог α -COP среди белков, кодируемых геномом *O. polymorpha*. На этом основании и на основании результатов экспериментов, описанных ниже, для этого белка мы также использовали обозначение α -COP. У *S. cerevisiae* ген, кодирующий этот белок, обозначается *RET1*, поэтому мы использовали такое же обозначения для идентифицированного гена.

Так же как и α -субъединицы комплекса COPI других организмов, в последовательности α -COP *O. polymorpha* выявляются три домена. N-концевой домен (с 1 по 333 остаток) содержит три WD-повтора (рисунок 32). Этот и средний домен (334-780 остаток) имеют гомологию с соответствующими доменами β -субъединицы COPI (данные не приведены). С-концевой домен не имеет выраженной гомологии с другими белками данного организма.

4.2.2.3. Удаление С-концевой области α -COP *O. polymorpha* не летально.

Чтобы доказать, что клонированный ген аллелен гену, в котором произошла мутация, а не является ее супрессором, фрагмент клонированной вставки, содержащий этот ген, лишенный промоторной области и начала открытой рамки считывания, был перенесен в другой вектор. Разрезание полученной плазмиды р27KM внутри открытой рамки считывания гена *RET1* при трансформации мутантного штамма *O. polymorpha* направляло интеграцию плазмиды в этот геномный локус (рисунок 33). В результате были получены трансформанты с фенотипами дикого типа. Это доказывало, что полученная мутация находится в гене *RET1*, и она была обозначена *ret1-27*.

Фрагмент гена, содержащий мутацию *ret1-27*, был выделен в соответствии со схемой, приведенной на рисунке 33. Была определена последовательность этого фрагмента, в результате чего была выявлена мутация, приводящая к замене кодона TGC, кодирующего W⁸¹⁸, на нонсенс кодон TGA. Рекомбинация этого фрагмента с хромосомным геном штамма DLU привела к возникновению соответствующих мутантных фенотипов (увеличение эффективности секреции uPA и чувствительность к недостатку кальция в среде). Это доказывало, что выявленная мутация действительно вызывает появление этих фенотипов.

У *S. cerevisiae* ген *RET1* необходим для жизни клеток. Наиболее существенным для функции α -COP является средний домен, но и удаление 170 С-концевых аминокислотных остатков белка летально (Letourneur et al., 1994). Однако такая укороченная аллель может поддерживать жизнеспособность клеток в мультикопийном состоянии (Eugster et al., 2000). Мутация *ret1-27*, обнаруженная нами, приводит к потере последних 389 остатков и при этом не нарушает жизненно важную функцию α -COP. Однако можно было предполагать, что эта нонсенс-мутация не летальна из-за сквозного прочтения кодона TGA при участии природной tPHK. Такой феномен описан для ряда организмов, включая *S. cerevisiae* (Beier and Grimm, 2001). Чтобы отвести эту возможность, был сконструирован штамм с делецией 3'-концевой области гена *RET1* (*ret1-ΔC*). Для этого внутренний фрагмент гена *RET1* дикого типа (фрагмент BglII-Ecl136II; см. рисунок 33) был вставлен в интегративный вектор. Полученной плазмидой рCOP1BE, линейаризованной по сайту Eco47III внутри

вставки, трансформировали штамм *O. parapolymorpha* DLU. Интеграция плазмиды в результате рекомбинации с гомологичным локусом генома должна приводить к замене полного гена *RET1* на две неполные копии, у одной из которых отсутствует промоторная область и начало открытой рамки считывания, а другая – с функциональным началом, но без области, кодирующей С-концевую часть белка (вплоть до сайта *Ecl136II*; рисунок 33). Если бы отсутствие этой области было бы летальным, такие трансформанты не вырастали. Для этого эксперимента был выбран штамм *O. parapolymorpha*, поскольку по нашим данным у этого вида интеграция трансформирующей ДНК в геном в результате гомологичной рекомбинации (по сравнению с негомологичной) происходит в несколько раз чаще, чем у *O. polymorpha*. Действительно, большая часть полученных трансформантов образовались в результате интеграции плазмиды в локус *RET1*. Это доказывало, что отсутствие С-концевой области не летально. Один из таких трансформантов был назван DLU-retΔC и использован для дальнейшей работы. Так же как и мутант *ret1-27*, этот штамм был неспособен расти на среде с низким содержанием кальция и «сверхсекретировал» uPA.

4.2.2.4. У дрожжей рода *Ogataea* α-COP необходим для жизни.

Поскольку мы получили данные о том, что в отличие от *S. cerevisiae*, у *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* удаление С-концевой области α-COP не летально, возникал вопрос, является ли ген *RET1* этих двух видов рода *Ogataea* жизненно важным. Чтобы ответить на него был сконструирован штамм *O. parapolymorpha*, в котором этот ген был поставлен под промотор 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, также как и у *S. cerevisiae*, у дрожжей рода *Ogataea* *RET1* необходим для жизни.

Sc	KKMLTKFESK	STRAKGIAPH	PSRPWLVAL	FSSTIQLWDY	RMGTLLHREF	DHEGPFVRGLD	FHPTQPIFVS	AGDDYTIVKW	SLDTNKCLYT	LIGHLDYVRT	100
Ooo	KKMLTKFESK	SSRAKGVAFH	PKRPWLVSL	HSSTIQLWDY	RMGTLLDRFE	DHDGPFVRAVD	FHPTQPIFVS	GGDDYTIVKW	SLQTRKCMFT	LNGHLDYVRT	100
Sc	VFFHRELPMI	ISASDDQTIR	IWNWQNRKEI	ACLTGHNHFV	MCAQFHPTDD	LIVSASLDET	IRIWDISGLR	KRHSAP--GT	SSFEEQMSAQ	QNLDDGSLG-	197
Ooo	VFFHHDLPWI	ISCSDDQTIR	IWNWQNRQEI	ACLTGHNHFV	MSAQFHPSQD	LIVSASLDQT	VRVWDISGLR	KKHSAPQGGM	RSFEEQYARN	QVPQDDIFGN	200
Sc	-DCVVKFILE	GHTRGVNWAS	FHPTLPLIVS	GSDDRQVKLW	RMSATKAWEV	DTCRGHTNNV	DSVIFHPHQN	LIISVGEDKT	LRVWDLDKRT	PVKQFKREND	296
Ooo	TDVVVKYVLE	GHDKGVNWAS	FHPTLPLIVS	GGGHRVVKLW	RMSSTRAWEV	DSCRGHNTNV	PCVLFHPTED	LIISVGEDRT	IRTWDLNKRT	PVKQFKREND	300
Sc	RFWLIAAHFH	INLFGAAHDS	GIMVFKLDRE	RPCSFTHQNO	LFFVNAEKQI	QSFNFQKRVA	SLPYASLKGI	GQPWDAFRSI	SYNPSQHSVL	VNEA--NGK	393
Ooo	RFWLVAAHFT	MNLFATCHDS	GVMVFKLDRE	RPASTLTFQNT	LFFVNNESQV	QQYQFDKQQV	SLPMLS LNKI	SKSWTKIRNI	SYNPAERSLL	VQAGENENG	400
Sc	FALVILPKQP	VGAVEPTSVT	QDTGNFATFV	GRNRFVVYNK	NTESVEVRSL	ENKVTNRNIKV	ETVVRTIVAA	GPGSVLVIHP	REVILYDVQQ	GKKVSQLAVK	493
Ooo	YSYMDLPKEI	VGALEPSPRG	EGAVPAACFI	ARNRFVTFESK	VTHKLEVRDL	RNTVTKVIDI	DSAVKDILYA	GPGTILLMKP	NEVIHYDVQQ	KKELAKIQIS	500
Sc	NVKYVSWSLD	GQYVALMSKH	TITLATKKLE	LINSMHETIR	IKSAAWDETG	VLIYSTLNHI	RYSLNGDRG	IKTKLEKTLV	ITKVQGLVY	CLNREGIEI	593
Ooo	NAKYAVWSAD	TQYVALLSKH	TITLANKKLE	TLMSMHETIR	VKSAAWDDSG	VLIYSTLNHI	KYALLNGDNG	TIKTLENTLY	VIKVSGRQCF	CLNRKGEVEV	600
Sc	LTIDPTEYRF	KKALVNKNFP	EVLRLIKDSN	LVGQNIISYL	QKSGYPEIAL	QFVODPHIRF	DLALEYCNLD	VALDEAKKLN	DSSTWERLIQ	EALAQGNASL	693
Ooo	VTIDPTEYRF	KKALVNKNFN	EVLRIIKTSN	LVGQNIIGYL	QAKGYPEIAL	QFVEDSETRF	ELALECDNLD	IALDEAKKLD	NPVWEKLGK	EALIQGNVPI	700
Sc	AEMIYQTQHS	FDKLSFLYLV	TGDNVNLKSKM	QNTAQTRDF	GSMLLNTFYN	NSTKERSSIF	AEGGSLPLAY	AVAKANGDEA	AASAFLEQAE	VDEQDVTLPD	793
Ooo	VELVYQQLKK	LEKLSFLYLV	TGTEKLSKSM	EQIAEARGDY	SSLFONSLYL	NSVEKRINTF	IETGLLPLAY	ATAKTNGLDD	VAESILSEAG	LMEADIOMPS	800
Sc	QMDASNFVQR	PVISKPLEKW	PLKEAELSYF	EKAVLGQIDD	LTIDD--ETP	AVNTTQEQEE	PLGEENFND	EDIGEDEGAW	DLGDEDLVVG	EELPHEVEQG	890
Ooo	FGEPNVPE-	-VTSVITEPW	PLEKASLSYF	EQALLGNFEG	LSIEDQPQTE	ATATDRFAAS	VDDENLFEDA	EPIADDEG-W	DLGEEELLEV	EVDEDAVDDD	896
Sc	EITSPAQEEVE	TAIWIKNSKL	PAVLVAAGAF	DAAVQALSQ	VGUVKLEPLK	KYFTNIYEGC	RTYIPSTPCE	LPAQLGYVRA	YDDTVSEDDI	LPYPVGLDVV	990
Ooo	VEDVGALSCE	LGNWVRNSRC	AAGYLAAGAF	EPAAQMLNKQ	LGIANFEPLR	KRFLEIYQAN	KVFIPADID-G	LPSLKSIVRA	DPEENGSKA	LPYPVGFDKL	995
Sc	NEKMNIEGYN	FKLNKPDIAI	ECFREAIRI	TLLMVDDAED	EKLAHKILET	AREYILGLSI	ELERRSLKEG	NTVRMLELAA	YFTAKLSPI	HRTNALQVAM	1090
Ooo	EAGLHEGFKL	FKANKLEBAI	VVPRELIYIV	ATSVVYNADD	EKKCEEVLAV	CKEYILGLSI	ELARRALPQD	DVKRNLELAA	YFTRAQLQPS	HRVNALQVAM	1095
Sc	SQHFKHKNEL	QASYFAGEFL	KIISGSPRAE	QARKIKNKAD	SMASDAIPID	FDPYAKFDIC	AATYKPIYED	TPSVSDPLTG	SKYVITEKDK	IDRIAMISKI	1190
Ooo	TQSFYKKNYA	LASYFAGEFL	SIISGSPRAE	QANKIKAKSD	SISTDAVEID	FDPYADFDVC	AGTFPTIYKG	SPYVTEALTG	AKYHASEKGG	ICSTTKVTLV	1195
Sc	GAPASGLRIR	V									
Ooo	GAPASGLRIL	A									

Рисунок 32. Сравнение аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами *RET1* *S. cerevisiae* (Sc) и *O. polymorpha* (Ooo). Гомологичные области выделены серым затенением. Идентичные остатки выделены жирным шрифтом. Звездочкой указана позиция мутации *ret1-27*. Последовательности WD40 повторов подчеркнуты.

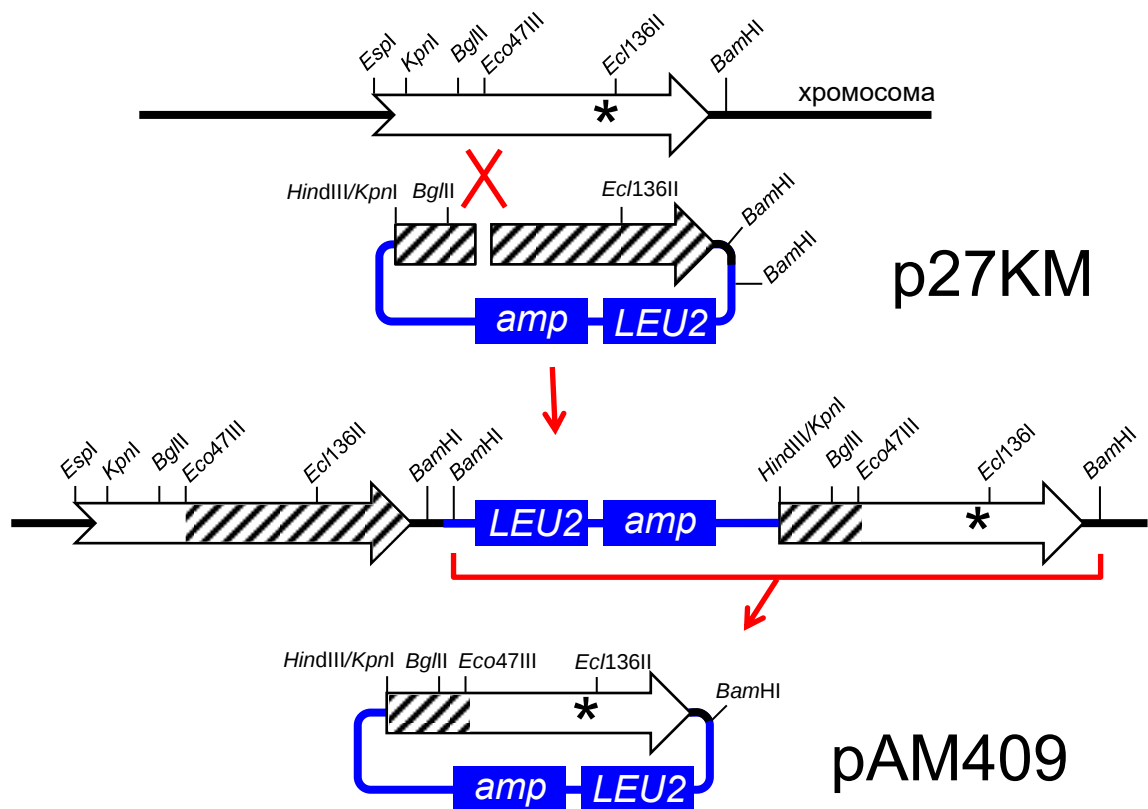


Рисунок 33. Стратегия клонирования фрагмента геномной ДНК, содержащего мутацию *ret1-27*. Штамм 2dMA56 (*leu2 ret1-27 mox-Δ::P_{МОХ}:uPA*) был трансформирован плазмидой p27KM, содержащей укороченный с 5'-конца ген *RET1* дикого типа. Перед трансформацией плазмида была разрезана рестриктазой *Eco47III* по участку внутри открытой рамки считывания гена *RET1*. У некоторых из выросших трансформантов произошла интеграция плазмиды в геном в результате гомологичной рекомбинации с локусом гена *RET1* и появление полноразмерной не мутантной аллели этого гена. Такие трансформанты можно было выявить по исчезновению мутантных фенотипов – сниженной скорости роста, чувствительности к недостатку кальция в среде и увеличенной секреции uPA. Это означало, что мутация находится после сайта *Eco47III* относительно направления открытой рамки считывания. Из одного такого трансформанта была выделена геномная ДНК и гидролизована рестриктазой *BamHI*, в результате чего образовался фрагмент, содержащий последовательности вектора и части мутантной аллели. Внутримолекулярное лигирование этого фрагмента приводило к образованию плазмиды, способной трансформировать *E. coli*. Эта плазмида была выделена и обозначена pAM409. Определение последовательности вставки этой плазмиды выявило, что мутация *ret1-27* приводит к замене кодона TGG для W⁸¹⁸ на нонсенс-кодон TGA. Последовательности вектора обозначены синим цветом; Черной линией и стрелками с черной окантовкой обозначены последовательности локуса *RET1*. Части открытой рамки считывания *RET1* из плазмиды p27KM выделены штриховкой. Незаштрихованная белая стрелка с черной окантовкой обозначает аллель *ret1-27*. Положение мутации обозначено звездочкой. "HindIII/KpnI" – место соединения вектора и 5'-области гена *RET1*.

4.2.2.5. Дефект α -COP приводит к секреции aberrантных форм uPA.

Как было показано в разделе 4.1., низкая продукция uPA в клетках дрожжей обусловлена неподходящими условиями для укладки молекулы этого белка в ЭР. Неправильно уложенный белок задерживается в ЭР, где он либо агрегирует, либо деградирует через ERAD. Фракционирование клеточных лизатов выявило, что мутация *ret1-27* существенно снижает степень агрегации uPA (рисунок 34).

Анализ электрофоретической подвижности в неденатурирующих условиях показал, что свойства uPA секретируемого 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, секретируемый клетками дикого типа, мигрировал двумя полосами. Полоса с меньшей подвижностью соответствовала полноразмерным формам «50 кДа», включающим одноцепочечный или двуцепочечный белок (см. раздел Материалы и методы и обзор Lijnen and Collen, 1991). 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* секретирует дополнительные формы uPA, выявляющиеся как медленно мигрирующее диффузное пятно (рисунок 34 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 aberrантных форм.

4.2.2.6. У дрожжей *O. polymorpha* α -COP вовлечен в транспорт белка Gas1, имеющего GPI-якорь.

Было известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* мутации, нарушающие функцию α -COP, могут блокировать транспортировку в аппарат Гольджи белков, имеющих GPI-якорь (Sütterlin et al., 1997). Чтобы проверить, влияет ли идентифицированная нами мутация на этот процесс, мы исследовали методом иммуноблоттинга белок Gas1 у мутанта и штамма дикого типа. Белок Gas1 имеет GPI-якорь и содержит множество N- и O-гликозидных цепей. В аппарате Гольджи к этим цепям присоединяются дополнительные остатки маннозы, что заметно увеличивает кажущуюся молекулярную массу белка со ~105 кДа у формы, имеющей присоединяемые в ЭР гликозиды, до ~125 кДа у зрелой формы (Herscovics and Orlean, 1993). У штамма дикого типа обнаруживалась только зрелая форма белка Gas1, а у мутанта были обе формы – и зрелая, и форма соответствующая этапу ЭР (рисунок 35).

4.2.2.7. Мутация *ret1-27* приводит к снижению количества белка *PMR1*.

Фенотипические проявления мутации *ret1-27* (увеличенная секреция uPA и чувствительность к недостатку кальция в среде) схожи с проявлениями нарушения гена *PMR1* *S. cerevisiae* (Melnick et al., 1990). 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 36). Последний эффект мог быть неспецифическим по отношению к мутации *ret1-27*, поскольку и у штамма дикого типа мультিকопийная плазида с геном *PMR1* несколько снижала секрецию (данные не приведены).

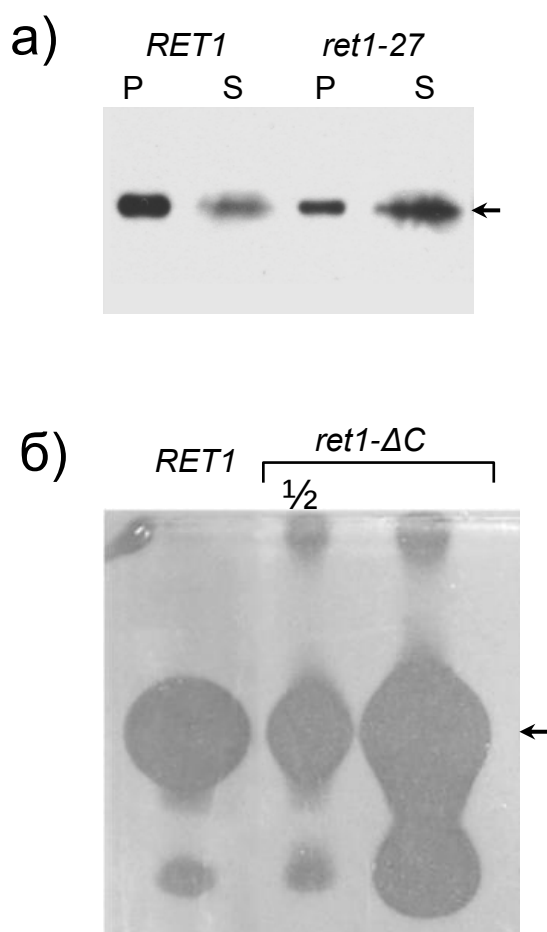


Рисунок 34. Электрофоретический анализ белка uPA, продуцированного мутантами *ret1*. Стрелкой указано положение формы uPA 50 кДа.

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 (P - pellet) и растворимую (S - supernatant) фракцию анализировали методом иммуноблоттинга с антителами к uPA. "*RET1*" – штамм 2dMA56 трансформированный плазмидой с геном *RET1* дикого типа; "*ret1-27*" - штамм 2dMA56, трансформированный пустым вектором.

б) Зимография uPA, секретированного клетками штамма дикого типа DLU/L (*RET1*) и штамма DLU-*retΔC*, несущего мутацию *ret1-ΔC*. На дорожку, обозначенную 1/2, был нанесен образец, разведенный в два раза.

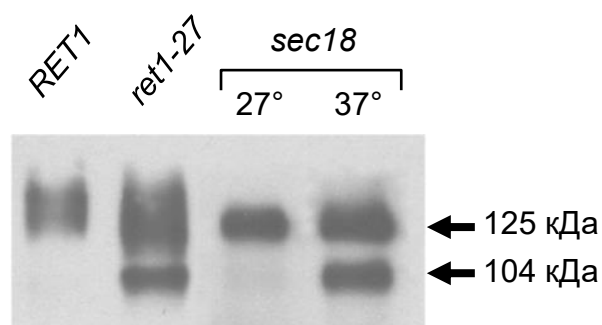


Рисунок 35. Иммуноблоттинг белка Gas1 в клеточных лизатах. "RET1" и "ret1-27" – штамм 2dMA56, трансформированный либо плазмидой с геном *RET1* дикого типа, либо пустым вектором, соответственно. "sec18" – штамм RSY372 *S. cerevisiae* с Ts мутацией *sec18-1*. Стрелками указано положение форм 125 кДа и 104 кДа белка Gas1 *S. cerevisiae*.

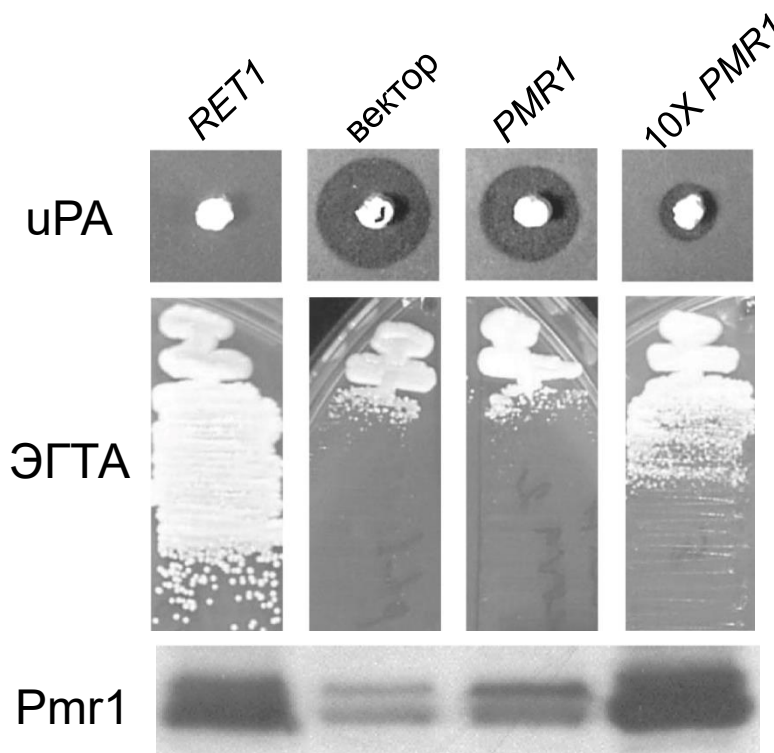


Рисунок 36. Эффекты введения генов *RET1* и *PMR1* в мутант *ret1-27* 2dMA56. "RET1" – интеграция плазмиды p27KM, гидролизованной рестриктазой *Eco47III*, в геном в результате гомологичной рекомбинации; "вектор" – трансформант с "пустым" вектором; "PMR1" трансформант с одной копией плазмиды, содержащей 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.

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

4.3.1. Поиск мутантов *O. parapolymorpha* с увеличенной продукцией uPA-Q³⁰² и клонирование гена *PMT1* по комплементации одной из полученных мутаций.

По нашим неопубликованным данным, в отличие от *O. polymorpha* (Bogdanova et al., 1998), 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 нами был разработан метод направленной интеграции экспрессионных кассет с заменой кодирующей части гена *МОХ* (Agarphonov et al., 1995). 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 (штамм DLQ). Негликозилированный вариант uPA был использован в качестве репортерного белка, поскольку он еще менее эффективно секретиrowался клетками дрожжей, чем белок дикого типа, что облегчало детекцию мутантов с увеличенной секрецией.

После обработки штамма DLQ химическим мутагеном, было проверено около 3000 клонов на способность образовывать зоны лизиса на среде, содержащей фибрин. У клонов, образующих увеличенные зоны лизиса, была оценена продукция uPA-Q³⁰² при росте в жидкой среде. В результате было отобрано около 20 клонов с увеличенной продуктивностью. Один из них, имеющий самую высокую продуктивность, был чувствителен к повышенной температуре инкубации ($T_{s45^{\circ}}$), а

его клетки были склонны образовывать комки. Этот штамм был трансформирован библиотекой геномных последовательностей *O. parapolymorpha*. Было получено несколько трансформантов, устойчивых к повышенной температуре и при этом потерявших "сверхсекреторный" фенотип и склонность к комкованию клеток. Это означало, что все эти фенотипы определяются одной мутацией. Плазмиды, выделенные из этих клонов, содержали ген, кодирующий гомолог O-маннозилтрансферазы эндоплазматического ретикулума Pmt1 *S. cerevisiae* (рисунок 37; таблица 8). На основании гомологии и функционального анализа, описанного далее, этот ген также был обозначен *PMT1*, а полученная мутация – *pmt1-1*. "Сверхсекреторный" фенотип не был специфичен по отношению только мутантной негликозилированной формы uPA, поскольку мутация увеличивала секрецию и uPA дикого типа (рисунок 38).

Таблица 8. Сходство последовательности, кодируемой геном *PMT1* *O. parapolymorpha*, с белками семейства PMT *S. cerevisiae*.

Белок	% Идентичных	% Сходства
<i>S. cerevisiae</i>	остатков	
Pmt1	47,2	59,9
Pmt2	29,3	41,9
Pmt3	28,9	43,0
Pmt4	28,0	41,4
Pmt5	40,9	57,3
Pmt6	27,0	40,3

Opa MAKKPVKLAPSTTDSTTELPLQGPVRRYLSTTLGPQTMANRRVSSGKEMGLVVLALFLAVIRLRSLDFFDSVVVFDEVHFGGFARKYILGR 92
Sc MSEEKTYKRVEQDDPVPELDIKQGPVRPFIVTDPSAELASLRTMVTLKEKLLVACLAVFTAVIRLHGLAWPDSVVVFDEVHFGGFASQYIRGT 92

Opa FFMDVHPPLAKLLFAAVGALGGFNGKFEFAEIGDKFPDDVPYVLMRQLSAFLSVGTVVLMYLTLRITGCKPLVSFLTSSLLVLESANATISR 184
Sc YFMDVHPPLAKMLYAGVASLGGFGDFDFENIGDSFPSTTPYVLMRFFSASLGALTVILMYMTLRYSGVRMWWALMSAICFAVENSYVTISR 184

Opa FVLLDSPLLFFIAAATYASSKLNIEPTFTLNWWKSLVLTGVGLGFASSSKWVGFFTVAVWGVCCAIKLWFAVGDLKLSAKNIASQTVTKFVV 276
Sc YILLDAPLMFFIAAAVYSFKKYEMYPPANSLNAYKSLLATGIALGMASSSKWVGLFTVTWVGLLCIWRLWFMIGDLTKSSKSIKFAVAFKLA 276

Opa LLGLPAIIYLASFAIHLSSLPYEGDGAAFLSSAFRTSFKDTPVPKTTLADVGIGSVVTLRHVNTNGGYLHSHNHLVEGGSGQQQITLYPHLD 368
Sc LLGVPFALYLVFFYIHFQSLTLDGDGASFFSPEFRSTLKNKIPQNVVADVIGIGSIISLRHLSTMGGYLHSHSHNYPAGSEQQQSTLYPHMD 368

Opa DNNKWLVELYNAT-EEPTAFEPLTDGTKIRLKHLLTHRLHSHDIRPSVSE-IDWQNEASCYGYEGFEGDPNDDFIVEIVKDESVPKQAE 458
Sc ANNDWLELYNAPGESLTTFQNLTDGTKVRLFHTVTRCRLHSHDHKFPVSESSDWQKEVSCYGYSGFDGDANDDWVVEIDKKNAPGVAQER 460

↓

Opa VKAIDTI FRLRHAMTGCYLFSHETKLPKWGFEEQVEVTCAGQGIKPLSYWYIEQNEHQFLDPATAEKVSYKELSFLQKMAELHSMWKINRGL 550
Sc VIALDTK FRLRHAMTGCYLFSHEVKLPWGFEEQVEVTCASSGRHDLTLWYVENNSNPLL-PEDTKRISYKPA SFISKFIESHKMWINKNL 551

Opa KAPHAFESRPESWPFLQRGISYWKQGDROVYLLGNPIVWLLSSSLFVFPFGLFVVYHVLRWQLGYPLPESSVVFNYSLNTLQFLLGWFIHYYP 642
Sc VEPHYVESQPTSWPFLRGISYWGNNRNRYLLGNAIVWVAFTAFIGIFGLIVITELFSWQLGKPIKDSKVNFHVQVIHYLLGFVHYAP 643

Opa SFLMDRQLFLHHYLPALYFGILTQGSFEVIYSAVLKNRKSVAIVLFLAVFAGAAHMFVKRSPIVFGSAWTKSACEAAKMLN-WDFDCKIYP 733
Sc SFLMQRMFLHHYLPAYYFGILALGHALDIIVSYVFRSKRQMGYAVVITFLAASVYFFKSFSPIT IYGTPTWQELCQKSQWLSGWDYNCNTYF 735

Opa DELPLTGGLKDEL----- 747
Sc SSLEEYKNQTLTKRESQAATSTVEEITIEGDGPSYEDLMNEDGKKIFKDTGNELDPEVVKMLLEEGANILKVEKRAVLE 817

Рисунок 37. Сравнение аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами *PMT1 S. cerevisiae* (*Sc*) и *O. parapolymorpha* (*Opa*). Гомологичные области выделены серым затенением. Идентичные остатки выделены жирным шрифтом. Последовательность белка *S. cerevisiae*, соответствующая ориентированной в люмен ЭР петле, необходимой для маннозилтрансферазной активности (Girrbach et al., 2000), выделена подчеркиванием. Стрелка указывает на D⁵¹⁸, с которого начинается С-концевая часть *OpaPmt1* в химерных белках с карбоксиметилцеллюлазой.

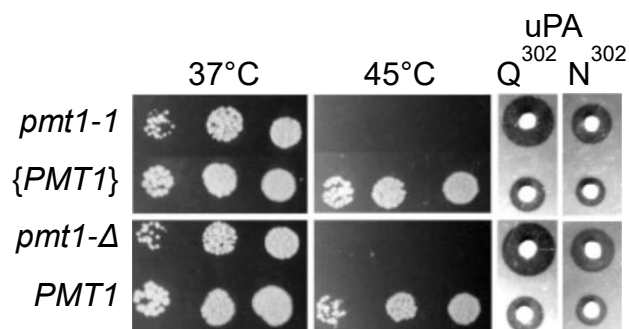


Рисунок 38. Фенотипы мутантов *pmt1-1* и *pmt1-Δ*. Для определения чувствительности к повышенной температуре разведения клеток (примерно 30, 150 и 750 клеток на пятно) наносили на поверхность среды YPD и инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C или 45°C. Способность штаммов секретировать uPA дикого типа (N^{302}) и негликозилированный вариант этого белка (Q^{302}) оценивали по размеру зон лизиса на среде, содержащей фибрин. "*pmt1-1*" – штаммы DLQ-20 (панели 37°C, 45°C и Q^{302}) и DLP-20 (панель N^{302}), трансформированные "пустым" вектором AMIpL1; "{*PMT1*}" – те же штаммы, но трансформированные плазмидой p90-203, содержащей ген *PMT1* дикого типа; "*pmt1-Δ*" – штаммы DLQΔ*pmt1* (панели 37°C, 45°C и Q^{302}) и DLPΔ*pmt1* (панель N^{302}); "*PMT1*" – штаммы DLQ (панели 37°C, 45°C и Q^{302}) и DLP (панель N^{302}), трансформированные вектором AMIpL1.

4.3.2. *Pmt1 O. parapolymorpha* содержит С-концевой сигнал KDEL для задержки в ЭР.

У *S. cerevisiae* *Pmt1* имеет ориентированную в просвет ЭР каталитическую петлю, которая фланкирована с двух сторон серией трансмембранных доменов (Girrbach et al., 2000). Профиль гидрофобности белка *Pmt1 O. parapolymorpha* был почти идентичен таковому у гомолога из *S. cerevisiae*. Исходя из этого, мы сделали вывод, что топология у них также идентична. В отличие от *Pmt1 S. cerevisiae*, его гомолог из *O. parapolymorpha* содержал на С-конце последовательность KDEL, которая, наряду с последовательностью HDEL, является сигналом задержки растворимых белков в ЭР. Большинство мембранных белков ЭР *S. cerevisiae* имеют другие сигналы задержки (см. раздел 2.1.2.2. и обзор Arakel and Schwappach, 2018). Исключением являются белки *Sec20* и *Sed4* (Hardwick et al., 1992; Sweet and Pelham, 1992). Чтобы проверить, является ли эта последовательность функциональной у *Pmt1 O. parapolymorpha*, была получена генетическая конструкция, кодирующая секретлируемый бактериальный белок карбоксиметилцеллюлазу, к С-концу которого через линкерный пептид была

присоединена начинающаяся с D⁵¹⁸ С-концевая последовательность Pmt1 *O. parapolymorpha*, содержащая трансмембранные домены (рисунки 37 и 39). Линкерный пептид содержал участок узнавания протеазы Kex2. Контрольная последовательность отличалась тем, что белок удлинялся с С-конца на несколько аминокислотных остатков, в результате чего последовательность KDEL оказалась "закрытой". Если такой гибридный белок покидает ЭР и попадает в компартмент аппарата Гольджи, содержащий протеазу Kex2, карбоксиметилцеллюлаза должна отделяться от трансмембранных доменов и секретироваться. Действительно, блокирование последовательности KDEL привело к увеличению внеклеточного количества фермента, в то время как количество гибридного белка внутри клеток упало (рисунок 39). Это доказывало, что последовательность KDEL функциональна в задержке Pmt1 в ЭР.

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

Для инактивации гена *PMT1* *O. parapolymorpha* была сконструирована кассета, рекомбинация которой с геномным локусом приводила к замене существенной части кодирующей области на селективный маркер. Этой кассетой трансформировали штамм DLQ. Примерно 10% трансформантов имели увеличенную продуктивность иРА и были чувствительны к повышенной температуре (45°C). Чувствительность к высокой температуре снижалась при осмостабилизации среды 1М сорбитолом (данные не приведены). Это указывало на то, что Ts фенотип связан с дефектом клеточной стенки. Анализ по Саузерну показал, такие трансформанты получились в результате замены гена *PMT1* на делеционную аллель. У *S. cerevisiae* инактивация только одного из генов семейства *PMT* не приводит к заметному снижению жизнеспособности. Только комбинации дефектов разных генов этого семейства приводят к дефекту роста, а в некоторых случаях летальны (Gentzsch and Tanner, 1996). Очевидно, что отсутствие гена *PMT1* у *O. parapolymorpha* компенсируется наличием других генов этого семейства, однако температурно-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 *O. parapolymorpha* Pmt1 функционально заменить Pmt1 *S. cerevisiae*, этот ген был

поставлен под контроль гибридного промотора MOX-CYC1, который, по нашим неопубликованным данным, обеспечивает экспрессию в *S. cerevisiae* на среднем уровне. Введение такого гена в штамм *S. cerevisiae* с нарушенными генами *PMT1* и *PMT2* компенсировало его чувствительность к повышенной температуре (рисунок 40).

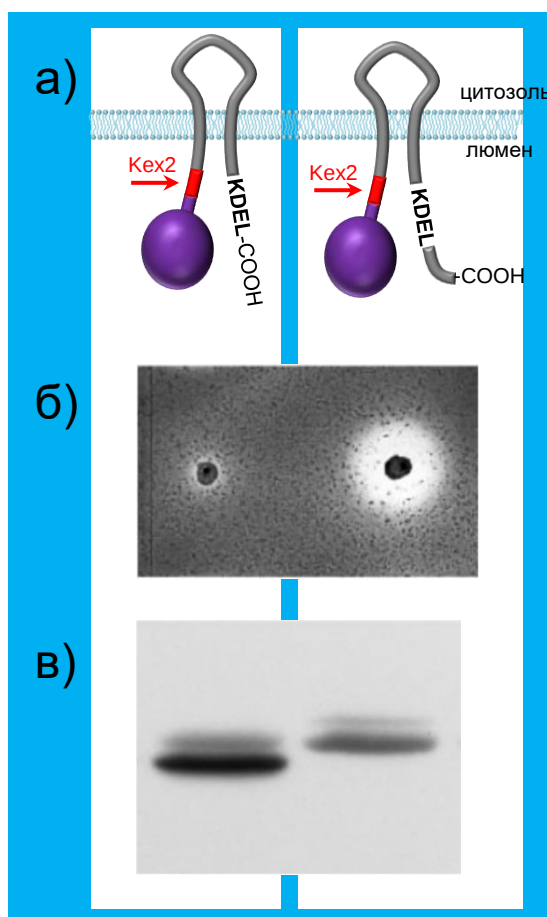


Рисунок 39. Продукция в клетках *O. parapolymorpha* химерных белков, включающих карбоксиметилцеллюлазу и С-концевую часть белка Pmt1 с интактной и "закрытой" последовательностью KDEL на С-конце.

а) Схема химерных белков. Фиолетовый шар – карбоксиметилцеллюлаза; Серая кривая – С-концевая часть Pmt1; красная стрелка указывает на участок (также выделен красным) разрезания протеазой Kex2.

б) Способность клеток продуцировать карбоксиметил целлюлазную активность (зоны лизиса на среде, содержащей карбоксиметилцеллюлозу).

в) Выявление химерных белков методом иммуноблоттинга с антителами против карбоксиметилцеллюлазы.

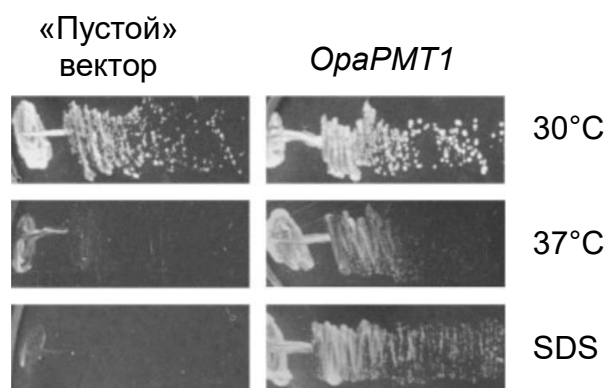


Рисунок 40. Комплементация неспособности двойного мутанта *pmt1-Δ pmt2-Δ S. cerevisiae* расти при повышенной температуре (37°C) и в присутствии SDS (0,005%) продукцией белка Pmt1 *O. parapolymorpha*. "Пустой вектор" – трансформант с плазмидой YEpSEC1; "OpaPMT1" – трансформант с плазмидой pSS22.

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* (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999), нарушение *PMT1* у *O. parapolymorpha* должно снижать степень О-гликозилирования белков в секреторном пути. Чтобы это проверить, была изучена подвижность хитиназы из культуральной среды. У *S. cerevisiae* этот белок содержит только О-связанные гликозидные цепи (Kuranda and Robbins, 1991). Его можно легко выделить из культуральной среды путем сорбции на хитин. Этот белок также выделяется из культуральной среды *O. parapolymorpha* и также не содержит N-связанных гликозидов, поскольку обработка эндогликозидазой Н не меняет его подвижность (данные не приведены). Анализ электрофоретической подвижности хитиназы в присутствии SDS показал, что нарушение гена *PMT1* увеличивает подвижность и снижает количество этого белка, сорбированного на хитин (рисунок 41 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 41 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.

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

Причина низкой эффективности секреции *uPA* связана с дефектом укладки белка в ЭР, что приводит к его задержке в этом компартменте, а при достаточно высоком уровне продукции к образованию высокомолекулярных агрегатов (см. раздел 4.1.). 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 42), как и количество *uPA*, секретированного в культуральную среду (рисунок 41 б).

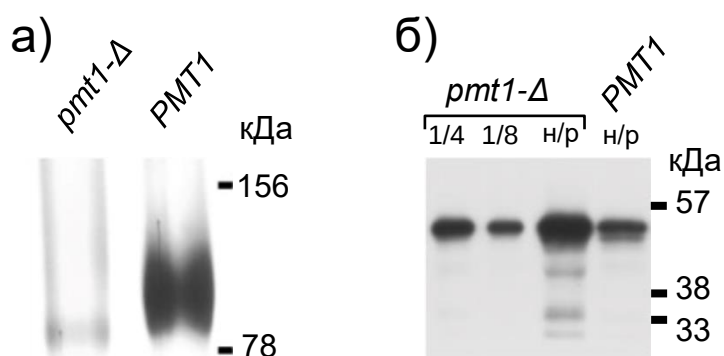


Рисунок 41. Сравнение электрофоретической подвижности белков, секретированных мутантом *pmt1-Δ* и штаммом с аллелью *PMT1* дикого типа.

а) Электрофоретический анализ хитиназы, выделенной из культуральной среды с помощью сорбции на хитин.

б) Иммуноблоттинг *uPA* в культуральных средах штаммов *DLΔpmt1G* (*pmt1-Δ*) и *DL1-L* (*PMT1*), содержащих одну копию плазмиды *pAM226*, интегрированную в локус *LEU2*. Перед нанесением на гель белки культуральных сред были осаждены ТХУ, растворены на кипящей бане в электрофоретическом буфере для образцов и обработаны *EndoH*. Объем буфера для образцов был пропорционален количеству общего клеточного белка в исходной культуре.

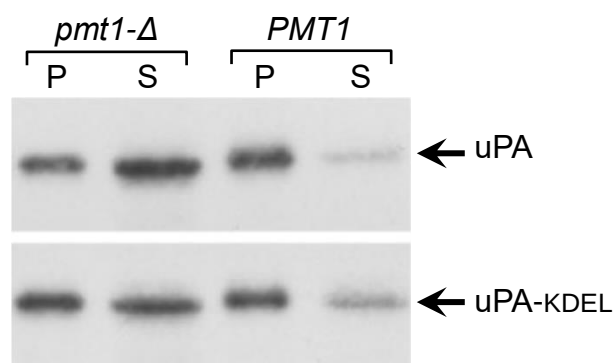


Рисунок 42. Анализ внутриклеточной агрегации uPA и uPA-KDEL. Клеточные лизаты трансформантов штаммов DLΔpmt1G (*pmt1-Δ*) и DL1-L (*PMT1*) фракционировали центрифугированием как описано в разделе "Материалы и методы". Осадочную (P – pellet) и растворимую (S – supernatant) фракции анализировали методом иммуноблоттинга с антителами против uPA. "uPA" – трансформанты с одной копией плазмиды pAM226, интегрированной в локус *LEU2*; "uPA-KDEL" – трансформанты с плазмидой pNR4, интегрированной в геном таким же способом.

4.4. Дефекты транспортировки белков в вакуоль усиливают протеолитический процессинг uPA

4.4.1. Использование uPA в качестве репортерного белка позволяет идентифицировать мутации, нарушающие сортировку белков в вакуоль.

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. Для дрожжей *O. polymorpha* был предложен подход для инсерционного мутагенеза, позволяющий просто определять мутантный локус (van Dijk et al., 2001). Он основывается на том, что у этого вида дрожжей интеграция линейных фрагментов ДНК при трансформации происходит в

случайные локусы генома с достаточно высокой частотой. Для идентификации локуса, нарушенного в результате такой интеграции, хромосомную ДНК гидролизуют рестриктазой, сайтов которой нет в интегрированном фрагменте, и обрабатывают ДНК-лигазой. В результате образуются кольцевые молекулы ДНК, состоящие из трансформирующего фрагмента и участков хромосомы, прилегающих к месту интеграции. Эти участки можно амплифицировать при помощи ПЦР с праймерами, отжигающимися на трансформирующем фрагменте. Если трансформирующий фрагмент содержит бактериальный вектор, то получающиеся кольцевые молекулы способны трансформировать *E. coli*, и их можно выделить как плазмиды. В результате, определив последовательность амплифицированного фрагмента или вставки "захваченных" участков хромосомы в плазмиде, можно выяснить точное место интеграции трансформирующей ДНК. Если использовать такой подход, то для идентификации мутантного локуса не требуется наличия селективируемых фенотипов.

Для получения мутантов штаммы M14 и u23m25 (см. Материалы и Методы), продуцирующие секретиремый белок uPA, были трансформированы линейаризованными плазмидами pCAD1, pKNR51 и pKNR56 (рисунок 43). Эти линейаризованные плазмиды имели разные последовательности на краях. Мы предполагали, что это должно увеличить разнообразие локусов случайной интеграции плазмиды в геном. У линейаризованной плазмиды pKNR56 на краю находился ген *LEU2*, у которого была почти полностью удалена промоторная область. Поскольку этот ген был использован в качестве селективного маркера, мы предполагали, что интеграция в промоторные области различных генов обеспечит экспрессию этого маркера. Это должно было увеличивать вероятность получения трансформантов с интеграцией в промоторные области генов, экспрессирующихся на достаточно высоком уровне.

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 (данные не приведены), что свидетельствовало о нарушении сортировки белков в вакуоль в

поздних компартментах аппарата Гольджи. У 6 таких мутантов удалось идентифицировать локус интеграции (таблица 9; рисунок 44 а и б). Действительно, во всех случаях интеграция плазмиды произошла в гены, кодирующие белки, которые участвуют в транспортировке белков и липидов между аппаратом Гольджи и вакуолью.

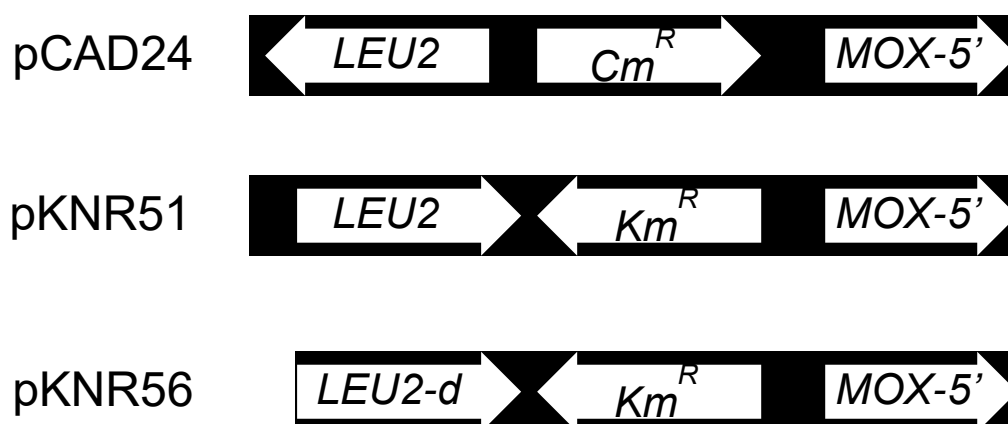


Рисунок 43. Схемы линейаризованных плазмид pCAD24, pKNR51 и pKNR56. "LEU2" и "LEU2-d" – полноразмерный ген *LEU1* *O. polymorpha* и его вариант, лишенный большей части промоторной области, соответственно; "Cm^R" и "Km^R" – бактериальные маркеры устойчивости к хлорамфениколу и канамицину, соответственно; "MOX-5'" – 5'-область гена *MOX* *O. polymorpha*, включающая промоторную область и первые семь кодонов кодирующей части.

Таблица 9. Мутантные локусы, выявленные у трансформантов с увеличенной активностью внеклеточного α РА.

Трансформант	Исходный штамм	Трансформирующая плазмида	Ген <i>S. cerevisiae</i> , гомологичный нарушенному
u15	M14	pCAD24	VPS10
u25	M14	pCAD24	VPS10
u96	u23m25	pKNR51	VPS17
u118	u23m25	pCAD24	VPS8
u170	u23m25	pKNR56	PEP3
v17	M14	pCAD24	VPS35

4.4.2. Нарушение рецептора вакуолярного сортирования Vps10 увеличивает протеолитический процессинг α РА.

Поскольку существенная часть полученных мутантов имела нарушения вакуолярного сортирования, можно было предполагать, что низкая эффективность секреции α РА связана с транспортировкой этого белка в вакуоль на деградацию. Однако это предположение не подтвердилось в дальнейших экспериментах. Отобранные мутанты не подходили для детального анализа секреции α РА, поскольку продукция этого белка обеспечивалась относительно слабым промотором гена *PDI1*. Низкий уровень продукции α РА облегчал сравнение клонов по образованию зон лизиса на фибриновых чашках при поиске мутантов, но не позволял выявлять белок в среде методом иммуноблоттинга даже после 100-кратного концентрирования (данные не приведены). Поэтому для дальнейшего анализа был использован штамм О.

parapolyomorpha DLQ, содержащий экспрессионную кассету *uPA-Q*³⁰² 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 сортировки 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 (рисунок 44 в). В предыдущих экспериментах нами было показано, что при секреции клетками дрожжей *uPA* может подвергаться протеолитическому процессингу в участке активации (см. раздел 4.1.), что приводит к образованию формы с кажущейся молекулярной массой около 30 кДа. В предварительных экспериментах нами было обнаружено, что этот протеолиз в существенной степени зависит от условий выращивания (см. раздел 3.1.). Белок *uPA*, продуцированный как штаммом *vps10-Δ*, так и изогенным штаммом с геном *VPS10* дикого типа, в условиях, стимулирующих процессинг, мигрировал при электрофорезе на уровне 30 кДа, а его количество у мутанта не было увеличенным (рисунок 45 а). При выращивании в ингибирующих протеолиз условиях *uPA*, секретированный штаммом *VPS10*, мигрировал как полноразмерная непроцессированная форма 48 кДа, а секретированный мутантом *vps10-Δ* – как процессированная форма 30 кДа. При этом количество белка у мутанта также не было увеличенным (рисунок 45 б). Для инициации лизиса фибрина требовалось существенно больше непроцессированного белка, секретированного штаммом дикого типа, чем белка из культуральной среды мутанта *vps10-Δ* (рисунок 46).

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 (рисунок 44 г).

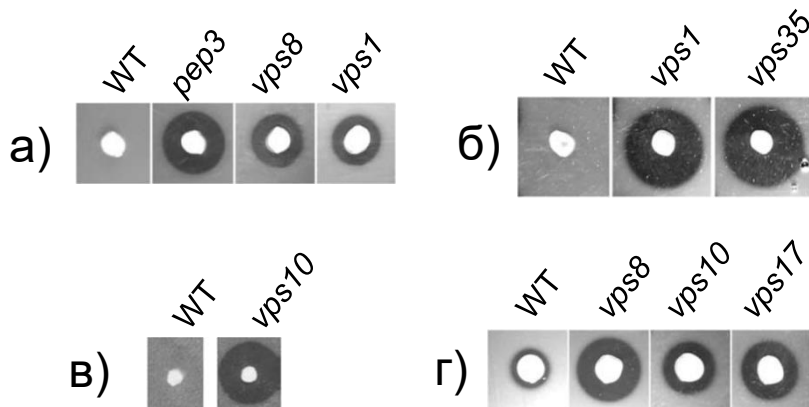


Рисунок 44. Зоны лизиса, образованные дрожжевыми трансформантами на среде, содержащей фибрин.

а) Штамм *O. polymorpha* u23m25 (WT) и его производные u170 (*per3*), u118 (*vps8*) и u96 (*vps17*).

б) Штамм *O. polymorpha* M14 (WT) и его производные u25 (*vps10*) и v17 (*vps35*).

в) Трансформанты *O. parapolymorpha* DL-1, DLQ (WT) и DLQ-VL (*vps10*).

г) Штамм *S. cerevisiae* BY4741 (WT) и его производные *vps8*-Δ (*vps8*), *vps10*-Δ (*vps10*) и *vps17*-Δ (*vps17*), трансформированные вектором экспрессии uPA pNR9.

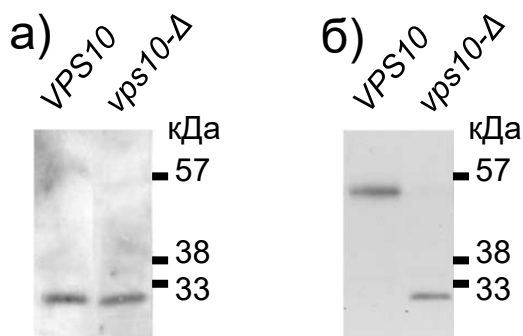
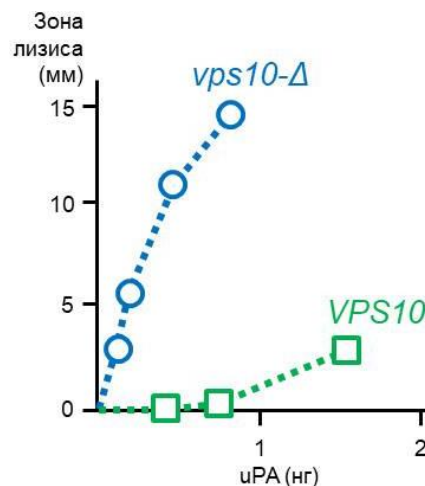


Рисунок 45. Иммуноблоттинг uPA, секретируемого клетками штаммов DLQ (WT) и DLQ-VL (*vps10*-Δ).

а) Выращивание в условиях, стимулирующих протеолиз.

б) Выращивание в условиях, ингибирующих протеолиз.

Рисунок 46. Зависимость способности лизировать фибрин от количества нанесенного uPA. Полученные после индукции синтеза uPA-Q³⁰² в условиях, ингибирующих протеолитический процессинг, культуральные среды наносили на фибриновый гель в разных разведениях. Количество uPA-Q³⁰² в среде определяли сравнивая интенсивность полосы на иммуноблоттинге с интенсивностью полос стандарта с известной концентрацией в серии разведений. "VPS10" – штамм DLQ; "vps10-Δ" – штамм DLQ-VL. Приведены результаты типичного эксперимента.



4.5. Функциональный анализ гена *PMR1* *O. polymorpha*.

4.5.1. Инактивация 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 (Melnick et al., 1990). 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. Поскольку имевшийся в нашем распоряжении штамм *O. parapolymorpha* DL-1 был не способен скрещиваться, для этой работы мы использовали диплоидный штамм *O. polymorpha* MA77 (*leu2/leu2 ade2/ADE2 mox-Δ::P_{МОХ}:uPA-Q³⁰²/mox-Δ::P_{МОХ}:GOX ret1-27/RET1*). Этот

штамм нес в гетерозиготе мутацию *ret1-27*, что позволяло в дальнейшем изучать ее взаимодействие с нарушением гена *PMR1*, а также был гетерозиготен по локусу гена *МОХ*, поскольку в одном случае структурная часть этого гена была заменена на последовательность, кодирующую *uPA-Q³⁰²*, а в другом – на последовательность, кодирующую глюкозооксидазу (*GOX*). Этот штамм трансформировали кассетой для инактивации гена *PMR1* с геном *LEU2* в качестве селективного маркера. Частота гомологичной интеграции трансформирующей ДНК у *O. polymorpha*, как правило, примерно на два порядка ниже, чем в случайные локусы генома, что сильно затрудняет поиск "правильных" трансформантов. Мы предположили, что снижение дозы гена *PMR1* в диплоиде будет в некоторой степени увеличивать уровень секреции *uPA*. Этим можно было воспользоваться для предварительного отбора трансформантов перед анализом целостности локуса *PMR1* с помощью ПЦР. Для этого полученные трансформанты были нанесены на твердую среду с метанолом в качестве единственного источника углерода (для индукции синтеза *uPA-Q³⁰²*) и содержащую фибрин (для детекции этого белка). Некоторые из полученных трансформантов образовывали зоны лизиса фибрина большего размера. Анализ при помощи ПЦР показал, что часть из этих клонов имеет нарушенную аллель гена *PMR1*. Один из таких клонов был обозначен MA77/12, и из него были получены гаплоидные сегреганты. Среди них обнаруживались *Leu⁺* клоны, т.е. содержащие маркер, использованный для инактивации *PMR1*. Действительно, анализ при помощи Саузерн-блоттинга подтвердил (данные не приведены), что в этих клонах ген *PMR1* нарушен и что он не является жизненно важным. Один из таких сегрегантов, который имел ауксотрофную мутацию *ade2* и содержал экспрессионную кассету *uPA*, был обозначен 1MA77/12 и использован для дальнейшего изучения.

4.5.2. Выживаемость мутанта *pmr1-Δ* при разных физиологических условиях.

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 плазмидой *pCAT1*, содержащей ген *PMR1* дикого типа, или плазмидой *p2CHA6* в качестве "пустого" вектора. Трансформанты, несущие ген *PMR1* дикого типа, росли гораздо быстрее, чем трансформанты с "пустым" вектором,

особенно на синтетической среде (данные не приведены). Эта разница определялась, по крайней мере частично, сниженной жизнеспособностью клеток мутанта. Действительно, в ночной культуре, выращенной в 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. Несмотря на это, количество клеток, окрашивающихся метиленовым синим, при выращивании в жидкой синтетической среде и среде YPD было примерно одинаковым (данные не приведены). Плотность стационарной культуры, выращенной в среде YPD у мутанта была примерно втрое ниже, чем у контрольного штамма. Мутантные клетки в стационарной культуре YPD быстро гибли при хранении при 5°C, а количество клеток контрольного штамма за это время заметно не менялось (таблица 10). При хранении такой же культуры мутантных клеток при комнатной температуре число жизнеспособных клеток тоже не сокращалось (данные не приведены).

Так же как и мутант *pmr1 S. cerevisiae* (Dürr et al., 1998), штамм *O. polymorpha pmr1-Δ* не рос при недостатке кальция в среде (рисунок 46). Однако, в отличие от *S. cerevisiae*, инактивация *PMR1* у *O. polymorpha* не приводила к увеличению чувствительности к агентам, нарушающим укладку белков в ЭР, ДТТ и туникамицину (данные не приведены).

Важной характеристикой мутации *pmr1-Δ* является эффект на секрецию рекомбинантного белка uPA. Поскольку в полученных штаммах экспрессия гена, кодирующего этот белок, обеспечивалась промотором гена *МОХ*, индукция синтеза uPA происходила на среде, содержащей метанол в качестве единственного источника углерода или смесь метанола и глицерина. Для снижения протеолитического процессинга в эту среду добавляли аммоний-фосфатный буфер (см. раздел 3.1.). Однако оказалось, что штамм с нарушенным uPA не способен расти на индукционной среде с фосфатным буфером. При высеве на чашку со средой YPD аликвоты культуры клеток, инкубированных в индукционной среде с фосфатным буфером в течение 48 часов, не выросло ни одной колонии. Из такой же аликвоты культуры клеток, инкубированных в среде без фосфатного буфера, было получено

более 1000 колоний. Это означало, что фосфатный буфер индуцирует массовую гибель клеток мутанта. При программируемой гибели клеток происходит фрагментация ДНК (Pozniakovsky et al., 2005; Wissing et al., 2004). В ходе электрофоретического анализа геномной ДНК было обнаружено, что в препарате мутантного штамма присутствует существенное количество более низкомолекулярных форм, мигрирующих размытым пятном, и их количество возрастает после инкубации в среде с фосфатным буфером (рисунок 48).

Таблица 10. Выживаемость (%) клеток штамма 11MA77/12 с плазмидой, содержащей ген *PMR1* дикого типа (*PMR1*), или с пустым вектором (*pmr1-Δ*) при температуре 5°C. Долю выживших клеток определяли по соотношению колониеобразующих единиц в культуре до и после инкубации.

	3 суток	6 суток
<i>PMR1</i>	97	110
<i>pmr1-Δ</i>	37	0,53

4.5.3. Мутация *pmr1-Δ* влияет на гликозилирование белков.

Чтобы изучить зависимость N-гликозилирования от *Pmr1*, в штамм с мутацией *pmr1-Δ* была введена экспрессионная кассета глюкозооксидазы *Aspergillus niger* (GOX). Чтобы получить контрольный штамм, в геном мутанта была интегрирована плаزمида pCAT1, содержащая ген *PMR1* дикого типа. Белок GOX, секретируемый штаммом с аллелью *PMR1* дикого типа, мигрировал при электрофорезе размытым пятном. Это, очевидно, было связано с нерегулярным размером N-связанных гликозидных цепей, поскольку после их удаления EndoH белок мигрировал четкой полосой на уровне 63 кДа (рисунок 49 а). Белок, секретируемый мутантом, мигрировал в виде довольно четкой полосы на уровне 80 кДа. После обработки EndoH белок из мутанта и белок из контрольного штамма мигрировали одинаково (рисунок 49 а). Этот результат показывал, что, в отличие от белка из контрольного штамма, белок,

секретированный мутантом, не получил модификаций в аппарате Гольджи, в результате которых N-гликозидные цепи приобретают нерегулярный размер.

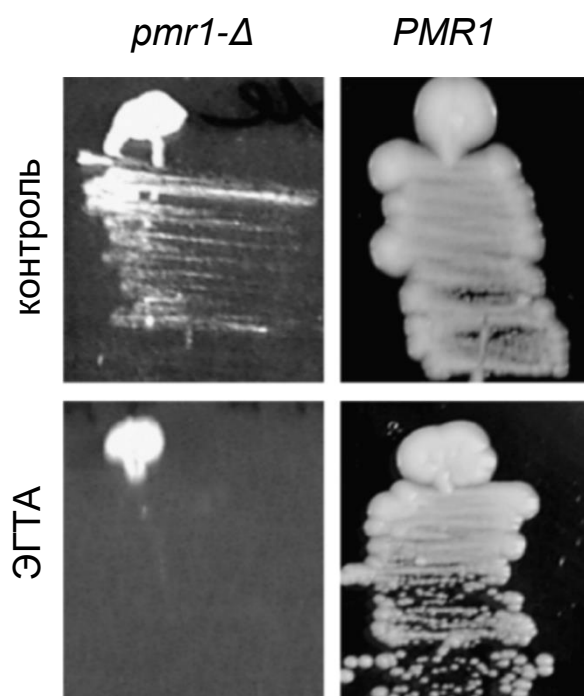


Рисунок 47. Рост клеток на среде с пониженной концентрацией кальция без добавления (контроль) и с добавлением 25 мМ ЭГТА (ЭГТА). "*pmr1-Δ*" – штамм 1MA77/12, трансформированный "пустым" вектором p2CHA6; "*PMR1*" – тот же штамм, но с плазмидой pCAT1, содержащей ген *PMR1* дикого типа.

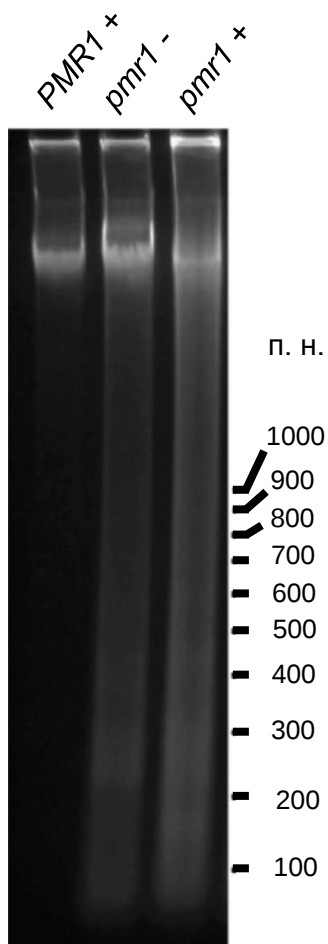


Рисунок 48. Электрофорез в агарозном геле ДНК, выделенной из трансформантов штамма 1MA77/12, несущих либо плазмиду pCAT1 с геном *PMR1* дикого типа (*PMR1*), либо "пустой" вектор p2CHA6 (*pmr1*-Δ). Трансформанты выращивали на индукционной среде с добавлением (+) или без (-) аммоний-фосфатного буфера.

Удобным репортерным белком для анализа О-гликозилирования является секретируемая хитиназа, поскольку несет множество О-связанных гликозидов и не содержит сайтов N-гликозилирования (см. разделы 4.2.1. и 4.3.). Хитиназа, секретируемая в культуральную среду штаммом дикого типа, мигрировала при электрофорезе в виде дисперсной полосы (или нескольких близко расположенных полос). Такая электрофоретическая подвижность связана с тем, что в аппарате Гольджи к остатку маннозы, на этапе ЭР присоединенному к сериновому или треониновому остатку в полипептидной цепи, может присоединяться разное количество дополнительных остатков маннозы. Белок, секретируемый мутантом, мигрировал четкой полосой немного быстрее основной полосы у штамма с геном *PMR1* дикого типа (рисунок 49 б). Это показывало, что модификации О-гликозидов в аппарате Гольджи также нарушены.

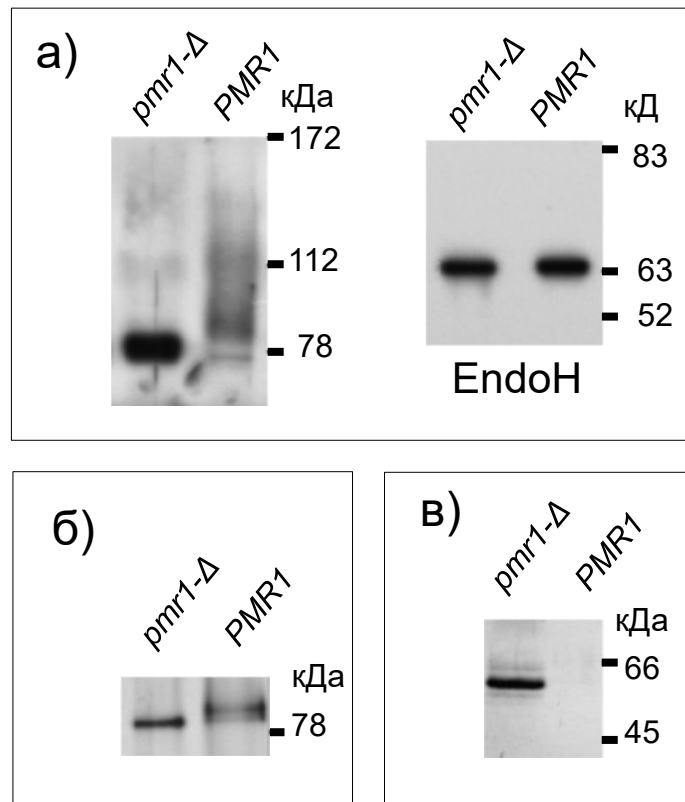


Рисунок 49. Электрофоретический анализ белков, секретированных трансформантами штаммов с мутацией *pmr1-Δ*, содержащих либо плазмиду pCAT1 с геном *PMR1* дикого типа, либо "пустой" вектор p2CHA6 (*pmr1-Δ*).

а) Иммуноблоттинг глюкозооксидазы *A. niger*, секретированной трансформантами штамма 1MA77/12G-GOX. На панели "EndoH" представлен анализ образцов, обработанных EndoH.

б) Электрофорез хитиназы, выделенной из культуральных сред трансформантов штамма 1MA77/12.

в) Иммуноблоттинг вакуолярного белка CPY из культуральных сред трансформантов штамма 1MA77/12.

4.5.4. Мутация *pmr1-Δ* нарушает сортировку вакуолярного белка CPY у *O. polymorpha*.

У *S. cerevisiae* CPY, как и ряд других вакуолярных белков, сортируется в вакуоль из поздних компартментов аппарата Гольджи при участии рецептора вакуолярного сортирования Vps10. Связывание с рецептором является кальций-зависимым. Инактивация этого рецептора (Marcusson et al., 1994) или снижение концентрации кальция в аппарате Гольджи (Dürr et al., 1998) приводит к секреции CPY в

культуральную среду. Нарушение гена *PMR1* у *O. polymorpha* также приводило к секреции CPY в культуральную среду (рисунок 49 в). Это означало, что и у этого вида дрожжей *Pmr1* обеспечивает поддержание высокой концентрации кальция в аппарате Гольджи.

4.5.5. Мутация *pmr1-Δ* увеличивает эффективность секреции *uPA-Q*³⁰² клетками *O. polymorpha*.

Для первичной оценки эффективности секреции *uPA* клетки выращивали на среде, содержащей фибрин. Чтобы иметь уверенность, что эффекты мутации *pmr1-Δ* на секрецию *uPA* не связаны с нарушением гликозилирования этого белка, был использован его мутантный негликозилированный вариант *uPA-Q*³⁰². Мутант *pmr1-Δ* образовывал зоны лизиса фибрина существенно большего размера, чем контрольный штамм с геном *PMR1* дикого типа (рисунок 50 а). Как было показано в экспериментах, описанных в предыдущих разделах, увеличение зоны лизиса могло быть следствием как увеличения эффективности секреции, так и протеолитического процессинга *uPA*, который активируется при нарушениях вакуолярного сортирования. Поэтому был проведен иммуноблоттинг *uPA-Q*³⁰² в культуральной среде и клеточных лизатах. Отсутствие функционального гена *PMR1* приводило к существенному увеличению количества *uPA-Q*³⁰² в культуральной среде (рисунок 50 б) и его снижению внутри клеток (рисунок 50 в). При этом белок мигрировал на уровне 45 кДа, что говорило об отсутствии протеолитического процессинга в участке активации. Это означало, что нарушение *PMR1* увеличивает эффективность секреции, но не протеолитической активации *uPA-Q*³⁰². Важно отметить, что, в отличие от приведенных в других разделах экспериментов по анализу секреции *uPA*, в данном случае для индукции экспрессии гена, кодирующего *uPA*, использовали среду без добавления аммоний-фосфатного буфера (см. Материалы и Методы). В других случаях этот буфер добавляли для снижения протеолитического процессинга *uPA*. Однако в случае мутанта *pmr1* его присутствие сильно подавляло рост клеток (см. выше). При этом и без него продукт протеолитического процессинга в участке активации *uPA* не выявлялся в случае мутантного штамма. Это говорило о том, что

инактивация Pmr1 не увеличивает, а снижает протеолитическую активацию uPA, несмотря на дефект вакуолярного сортирования.

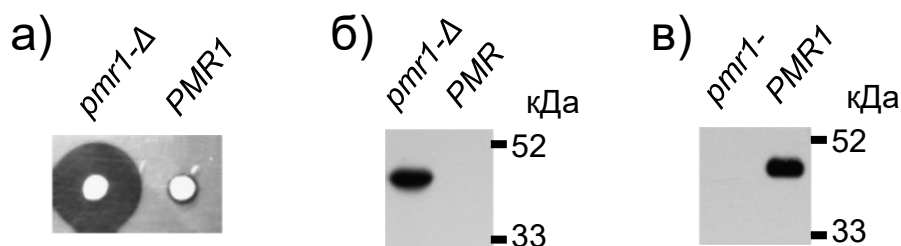


Рисунок 50. Анализ продукции uPA-Q³⁰² в трансформантах штамма 1MA77/12, содержащих либо плазмиду pCAT1 с геном *PMR1* дикого типа (*PMR1*), либо "пустой" вектор p2CHA6 (*pmr1-Δ*).

а) Зоны лизиса на среде, содержащей фибрин.

б) Иммуноблоттинг uPA в культуральных супернатантах.

в) Иммуноблоттинг uPA в клеточных лизатах.

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

4.6.1. Мутация *pmc1-Δ* увеличивает чувствительность *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* к SDS.

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*. Этот ген кодирует вакуолярную кальциевую АТФазу,

ответственную за поддержание концентрации кальция в цитозоле, транспортируя эти катионы в вакуоль. Для того, чтобы подтвердить связь чувствительности к SDS с функцией этого белка, ген *PMC1* был направленно инактивирован в штамме DL1-L *O. parapolymorpha*. Эта мутация привела к чувствительности к SDS и высокой концентрации кальция в среде (рисунок 51). При этом, по данным Т.С. Калебиной, мутация не вызывала заметных нарушений морфологии и белкового состава клеточной стенки. Осмостабилизация среды (0,5-1,2М сорбитола) не ослабляла чувствительность мутанта к SDS, при этом существенно снижала скорость роста даже в отсутствии детергента (данные не приведены).

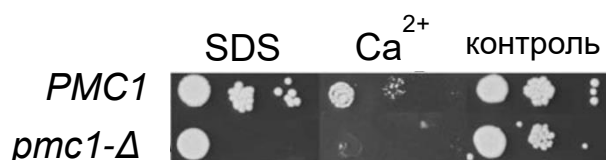


Рисунок 51. Чувствительность мутанта *PMC1* к повышенной концентрации Ca^{2+} и присутствию в среде SDS. Суспензии клеток штаммов DL1-L (*PMC1*) и DL1-Δ*pmc1* (*pmc1-Δ*) были нанесены в разведениях на среду YPD, содержащую 0,005% SDS (SDS), или 0,15 М CaCl_2 (Ca^{2+}), или без добавок (контроль). Чашки инкубировали 2 дня при 37°C.

4.6.2. Мутации в генах *HOG1* и *CCH1* супрессируют проявления *pmc1-Δ*.

Чтобы выяснить механизмы увеличения чувствительности мутанта *pmc1* к SDS, был проведен поиск мутаций, супрессирующих это проявление. Для этого мутант *pmc1-Δ* *O. polymorpha* S67 трансформировали линейаризованной плазмидой pCHLXdHS, что должно было привести к возникновению инсерционных мутаций в результате случайной интеграции плазмиды. Трансформанты селектировали на среде, содержащей SDS. В результате было получено несколько устойчивых к SDS клонов и у трех из них, SDS61, SDS63 и SDS116, удалось определить локус интеграции плазмиды (рисунок 52). В клоне SDS61 интеграция плазмиды произошла в ген *CCH1*,

кодирующий каталитическую субъединицу кальциевого канала плазмалеммы. В клоне SDS63 плазида интегрировала непосредственно перед открытой рамкой гена *HOG1*, кодирующего MAP-протеинкиназу, отвечающую за ответ клетки на увеличение осмотической концентрации среды. Супрессорный эффект этих мутаций был подтвержден после их направленной инактивации в штамме с мутацией *ptc1-Δ*. Инактивация этих генов в штамме дикого типа приводила к тем же проявлениям, что и инактивация их гомологов у *S. cerevisiae*. В частности, нарушение *HOG1* приводило к неспособности расти на среде с высокой концентрацией сорбитола или NaCl, а нарушение *CCH1* – к неспособности расти на среде с низкой концентрацией кальция (данные не приведены). Это подтверждало то, что у *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha* эти гены имеют ту же функцию, что и у *S. cerevisiae*.

4.6.3. Супрессия мутации *ptc1-Δ* при инактивации гена *WEE1* зависит от генотипического фона.

В отличие от мутантов SDS61 и SDS63, последовательности, которые фланкировали трансформирующий фрагмент, относились к удаленным геномным локусам (рисунок 52). С одной стороны интегрированной плазмиды находился неполный ген, кодирующий гомолог протеинкиназы *Wee1/Swe1*, расположенный на расстоянии примерно 20 т.п.н. от ближнего края контига BBNV01000010 последовательностей *O. polymorpha* в базе данных GenBank. С другого фланга рекомбинации плазмиды была последовательность без открытых рамок считывания, которая находится на контиге BBNV01000008 на расстоянии около 140 т.п.н. от ближнего края. Даже если предположить, что эти два контига представляют части одной хромосомы, расстояние между точками рекомбинации не может быть меньше 160 т.п.н. В геноме *O. parapolymorpha* DL-1 последовательности, гомологичные участкам рекомбинации с плазмидой у мутанта SDS116 *O. polymorpha*, хоть и находятся на одной хромосоме, но на расстоянии примерно 45 т.п.н. друг от друга. То есть, большая удаленность участков рекомбинации вряд ли связана с ошибками определения последовательности генома. Это означает, что интеграция плазмиды сопровождалась хромосомной перестройкой. Идентифицированный ген был обозначен *WEE1*, поскольку его инактивация, также как и инактивация его гомолога у *S. cerevisiae*,

приводила к чувствительности к реагентам, нарушающим укладку белков в ЭР (данные не приведены). Кроме того, эта мутация влияла на форму клеток (рисунок 53), что косвенно указывало на роль продукта этого гена в клеточном цикле.

Интеграция плазмиды с геном *WEE1* дикого типа в геном мутанта *SDS116* увеличивала его чувствительность к SDS до уровня исходного штамма (рисунок 54). Удивительным было то, что направленная инактивация *WEE1* не супрессировала чувствительность к SDS мутанта *ptc1-Δ* (рисунок 55). Инактивация *WEE1* в штамме с геном *PMC1* дикого типа сама по себе приводила к чувствительности к SDS, которая, однако, была менее выражена, чем у штаммов с нарушенным *PMC1* (данные не приведены).

Чтобы изучить роль мутации *wee1* в супрессии чувствительности к SDS мутанта *ptc1*, мы изучили наследование этого фенотипа в мейотическом потомстве диплоида, полученного скрещиванием мутанта *SDS116* и штамма 1B, несущего гены *PMC1* и *WEE1* дикого типа. Этот диплоид был гомозиготен по аллелям *leu2* и *ura3::ADE2*, но гетерозиготен по аллелям *wee1* и *ptc1*, полученным в результате интеграции фрагментов, несущих маркеры *LEU2* и *URA3*, соответственно. Это позволяло отслеживать сегрегацию аллелей *wee1* и *ptc1* по прототрофности по лейцину и урацилу. Каждый из 21 проверенных сегрегантов *ptc1 wee1* (*Leu⁺ Ura⁺*) был менее чувствителен к SDS, чем сегреганты *ptc1* (*Leu⁻ Ura⁺*). Это указывало на то, что супрессия *ptc1* зависит от аллели *wee1*. Однако направленная инактивация *WEE1* в трех сегрегантах *ptc1* (*Leu⁻ Ura⁺*) не только не снижала, но даже в некоторой степени повышала чувствительность к SDS. При этом клоны, полученные направленной инактивацией *PMC1* в сегрегантах *wee1* (*Leu⁺ Ura⁻*), были менее чувствительны к SDS, чем клоны с нарушенным *PMC1*, несущие *WEE1* дикого типа. Полученные данные позволяли предположить, что супрессия чувствительности к SDS у мутанта *ptc1* происходит в результате экспрессии укороченной аллели *wee1*, полученной в мутанте *SDS116*. Чтобы проверить это предположение, аллель дикого типа *WEE1* в мутанте *ptc1-Δ* была заменена на укороченную аллель *WEE1* из штамма *SDS116*. Однако это не привело к снижению чувствительности к SDS (данные не приведены). Полученные данные указывали на то, что супрессия чувствительности к SDS мутанта

pts1 при инактивации *WEE1* зависит от хромосомной перестройки, произошедшей в штамме SDS116.

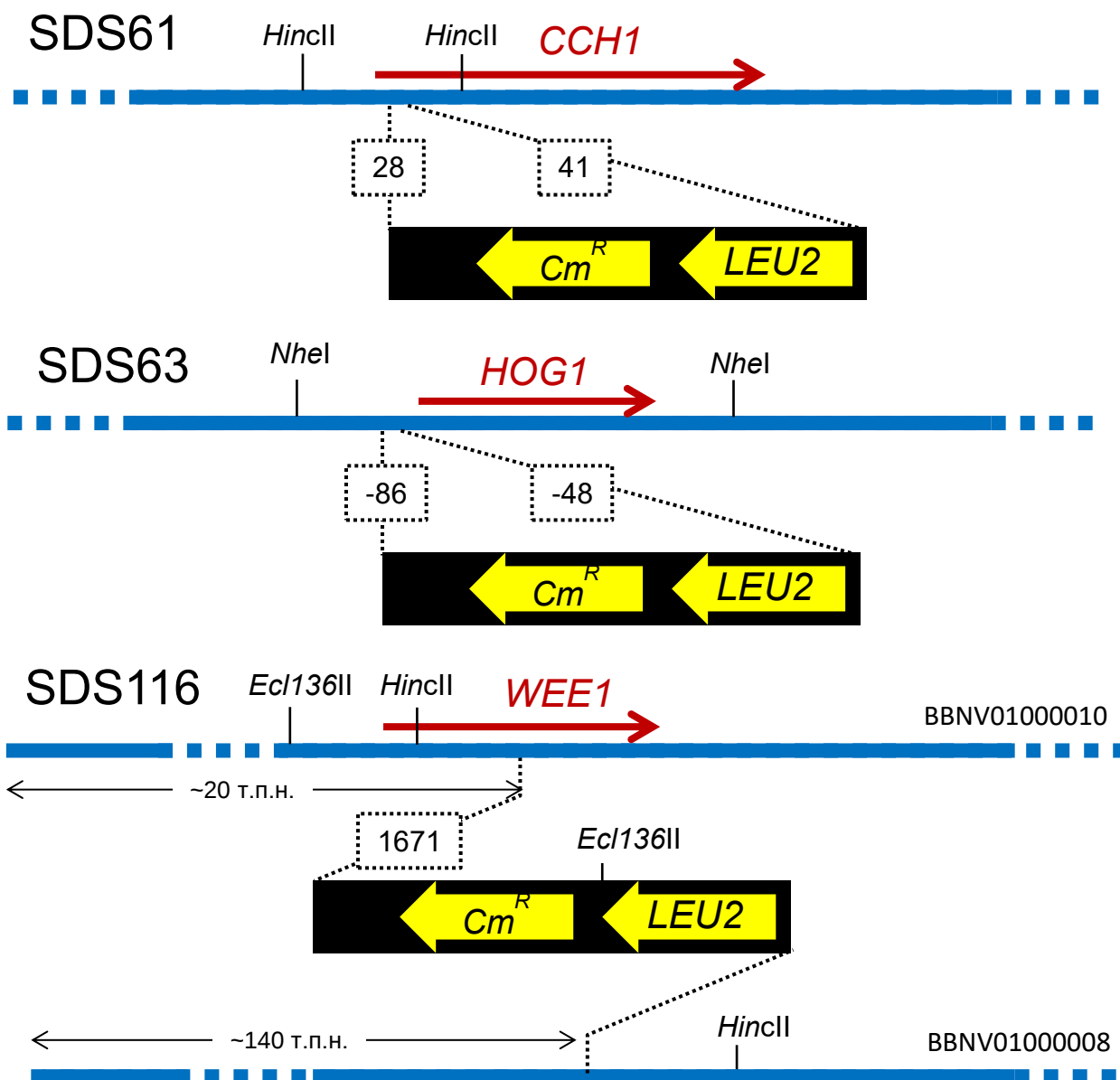


Рисунок 52. Схема интеграции плазмиды pCLHXdHS в мутантах SDS61, SDS63 и SDS116. Синими линиями обозначены участки хромосомы реципиента. Черные прямоугольники с желтыми стрелками внутри – последовательность линейаризованной плазмиды с указанием положения бактериального и дрожжевого селективного маркера. Красные стрелки обозначают положение открытых рамок считывания выявленных генов. Цифры в пунктирных рамках указывают положение точки интеграции относительно иницирующего кодона открытой рамки считывания.

4.6.4. Продукция химерного белка, содержащего N-концевую часть Wee1, в штамме *pmc1-Δ* приводит к нарушению морфологии клеток.

Было известно, что у *S. cerevisiae* экспрессия гена *SWE1/WEE1* позитивно регулируется Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеин фосфатазой PP2B (кальциневрин) (Mizunuma et al., 1998). Поэтому можно было предполагать, что у дрожжей рода *Ogataea* увеличение концентрации кальция в цитозоле также будет индуцировать экспрессию *WEE1*. Чтобы это проверить, часть гена *WEE1*, включающая его промотор и начало кодирующей области, была слита с кодирующей областью гена *lacZ* *E. coli*. Этот химерный ген был обозначен *WEE1:lacZ*. Важно отметить, что в белке Wee1 N-концевые домены, кодируемые вошедшим в химерный ген участком, являются регуляторными, а каталитический протеинкиназный домен находится в С-концевой части, и кодирующая его область гена не вошла в состав химерной конструкции. Эта конструкция была введена в клетки *O. parapolymorpha*. Инактивация гена *PMC1* привела к незначительному увеличению активности β -галактозидазы (с $13,3 \pm 0,7$ до $15,9 \pm 1,0$ ед. на мг общего клеточного белка), что не подтверждало выдвинутое предположение. При этом было сделано наблюдение, что инактивация *PMC1* в штамме, продуцирующем химерный белок, приводит к гораздо более существенному снижению скорости роста, чем в штамме без этой конструкции (данные не приведены). Кроме того, инактивация *PMC1* в штамме с конструкцией *WEE1:lacZ* привело к изменению морфологии к нарушениям морфологии клеток, таким как измененная форма клеток и удлинение почек (рисунок 53). В то же время морфология клеток ни у штамма с геном *PMC1* дикого типа и конструкцией *WEE1:lacZ*, ни у мутанта *pmc1-Δ* без этой конструкции, заметно не нарушалась (данные не приведены). Это показывало, что изменение морфологии происходит при комбинации этих факторов.

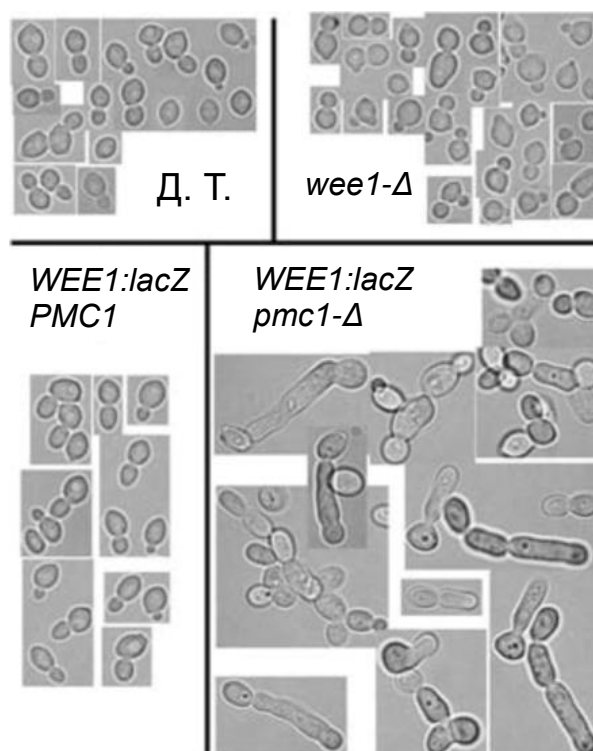


Рисунок 53. Влияние аллелей *WEE1* на морфологию клеток *O. parapolymorpha*. "Д. Т." – Штамм DL1-L дикого типа, трансформированный пустым вектором; "*wee1-Δ*" – штамм DL1-L с инактивированным геном *WEE1*; "*WEE1:lacZ PMC1*" – штамм DL1-L с аллелью *PMC1* дикого типа, содержащий химерный ген *WEE1:lacZ*; "*WEE1:lacZ pmc1-Δ*" – штамм DL1-L с делецией гена *PMC1*, содержащий химерный ген *WEE1:lacZ*.

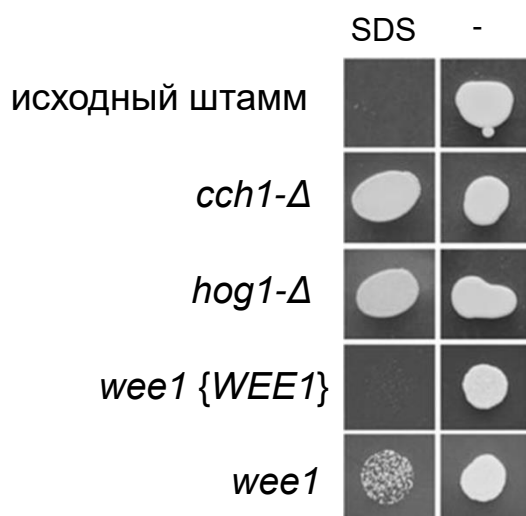


Рисунок 54. Супрессия чувствительности мутанта *pmc1-Δ* к SDS мутациями в генах *CCH1*, *HOG1* и *WEE1*. Суспензии клеток были нанесены на поверхность твердой среды YPD, содержащей (SDS) или не содержащей (-) 0,004% SDS. "Исходный штамм" – мутант *pmc1-Δ* S67, несущий; "*cch1-Δ*" – штамм S67 с инактивированным геном *CCH1* (штамм S67Δ*cch1*); "*hog1-Δ*" – штамм S67 с инактивированным геном *HOG1* (штамм S67Δ*hog1*); "*wee1 {WEE1}*" и "*wee1*" – мутант SDS116, содержащий и не содержащий плазмиду pKAF48 с геном *WEE1* дикого типа, соответственно.

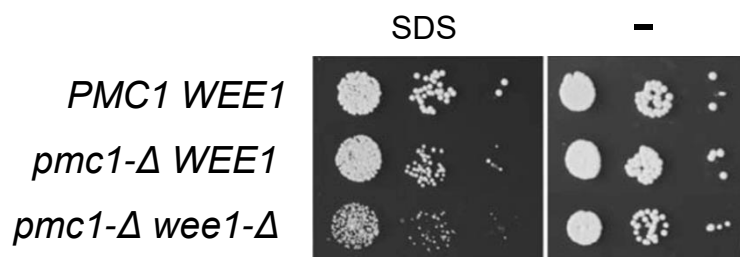


Рисунок 55. Влияние инактивации гена *WEE1* на чувствительность клеток к SDS. "*PMC1 WEE1*" – штамм 1В дикого типа; "*pmc1-Δ WEE1*" – штамм 1В с инактивированным геном *PMC1*; "*pmc1-Δ wee1-Δ*" – штамм 1В с инактивацией генов *PMC1* и *WEE1*; "SDS" и "-" – среда YPD с добавлением или без 0,004% SDS, соответственно.

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

4.7.1. Дефект СОР1-зависимого везикулярного транспорта усиливает потребность мутанта *pmr1-Δ O. polymorpha* в Ca^{2+} и Mn^{2+} .

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 кальциевую 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 МС39, 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 МС39 был способен терять плазмиду с геном *PMR1* и в отсутствии

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, сопровождающейся фрагментацией ДНК (рисунок 56), как это мы наблюдали в случае мутанта *pmr1-Δ* при инкубации в среде с фосфатным буфером и метанолом в качестве единственного источника углерода (см. раздел 4.5.2.). Таким образом мутация *ret1-27* усиливает этот эффект мутации *pmr1-Δ*, поскольку двойной мутант эффективно гибнет на стандартной среде с глюкозой в качестве источника углерода.

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+} (Loukin and Kung, 1995). Очевидно, увеличение концентрации Mn^{2+} токсично и для *O. polymorpha*, поскольку эти дрожжи чувствительны к повышенной концентрации Mn^{2+} в среде (рисунок 57). 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* (рисунок 58). В отличие от штамма дикого типа, мутант *pmr1-Δ* практически не рос на среде SD* с 3 мМ MnCl_2 , однако 0,5 и 1 мМ MnCl_2 заметно улучшал его рост на этой среде (рисунок 57). Это согласуется с ролью Pmr1 в транспорте Mn^{2+} из цитозоля в аппарат Гольджи (Dürr et al., 1998): 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 57), 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 1 мМ MnCl_2 (рисунок 59).

Обобщая описанные данные, можно подчеркнуть, что мутация *ret1-27* увеличивает потребность в Ca^{2+} и Mn^{2+} на фоне мутации *pmr1-Δ*. Это означает, что для проявления Ca^{2+} -зависимого фенотипа мутации *ret1-27* не требуется наличия белка Pmr1, и этот фенотип не определяется снижением функции Pmr1.

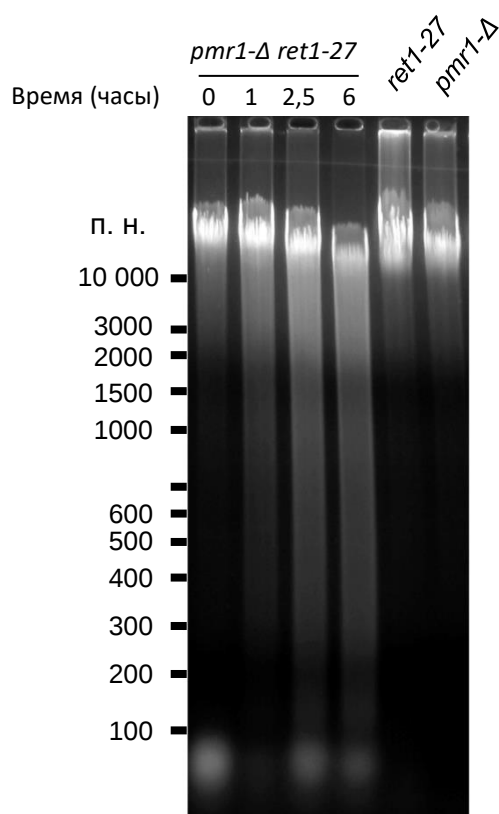


Рисунок 56. Электрофоретический анализ хромосомной ДНК из клеток штамма МС39 без плазмиды с геном *PMR1* (*pmr1-Δ ret1-27*). Клетки этого штамма были выращены в среде YPD с добавлением 10 мМ CaCl_2 , осаждены центрифугированием, ресуспендированы в стандартной YPD без добавления CaCl_2 и инкубированы при 37°C в течение промежутков времени, указанных на рисунке. Препараты хромосомной ДНК, выделенной из клеток штамма МС39, содержащих плазмиду с геном *PMR1* (*ret1-27*), и из клеток штамма 1МА77/12 (*pmr1-Δ*), были использованы в качестве контроля.

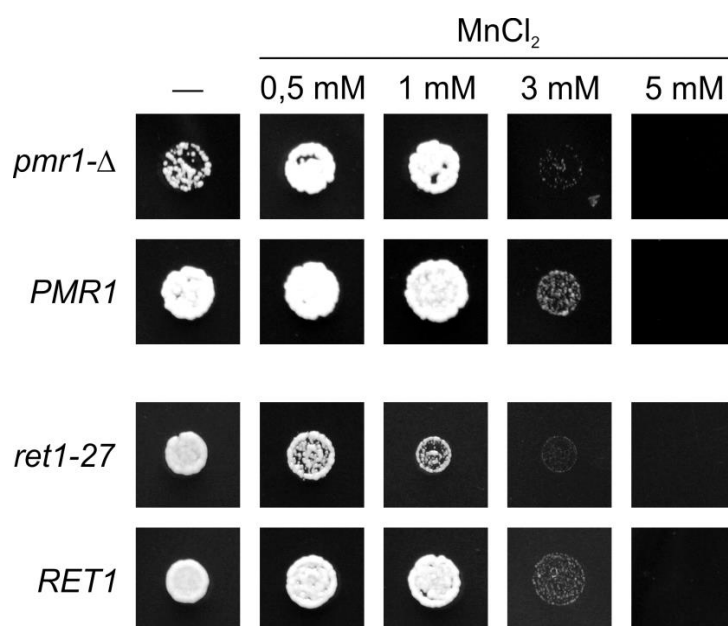


Рисунок 57. Рост мутантов *pmr1-Δ* и *ret1-27* на среде SD* с добавлением разных концентраций MnCl₂. Клеточные суспензии с одинаковой концентрацией наносили на поверхность твердой среды и инкубировали двое суток при температуре 37°C. "*pmr1-Δ*" – субклон штамма 1MA77/12/GP1 без плазмиды с геном *PMR1*; "*PMR1*" – штамм 1MA77/12/GP1, содержащий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа; "*ret1-27*" – штамм 64MA70QA, трансформированный "пустым" вектором; "*RET1*" – штамм 64MA70QA, трансформированный плазмидой с геном *RET1* дикого типа.

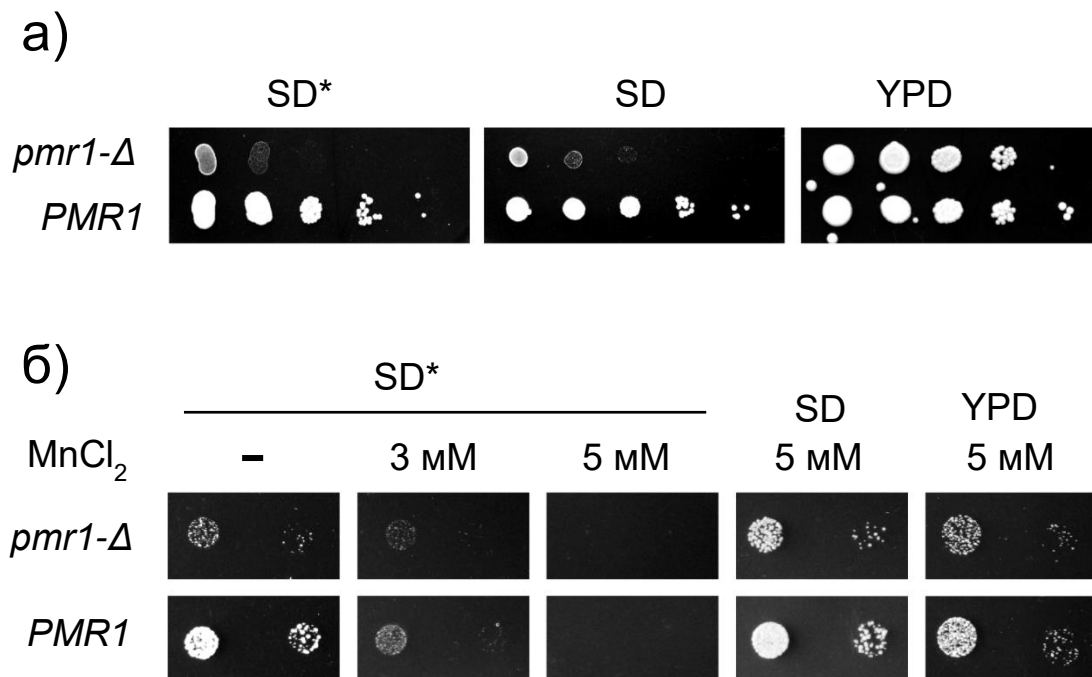


Рисунок 58. Эффект состава среды на рост мутанта *pmr1-Δ* (а) и на чувствительность к MnCl₂ (б). На поверхность твердой среды наносили суспензии клеток с одинаковой концентрацией в серии 10-кратных разведений. На панели б) приведено по два наиболее репрезентативных разведения. "*pmr1-Δ*" – субклон штамма 1MA77/12/GP1 без плазмиды с геном *PMR1*; "*PMR1*" – штамм 1MA77/12/GP1, содержащий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа.

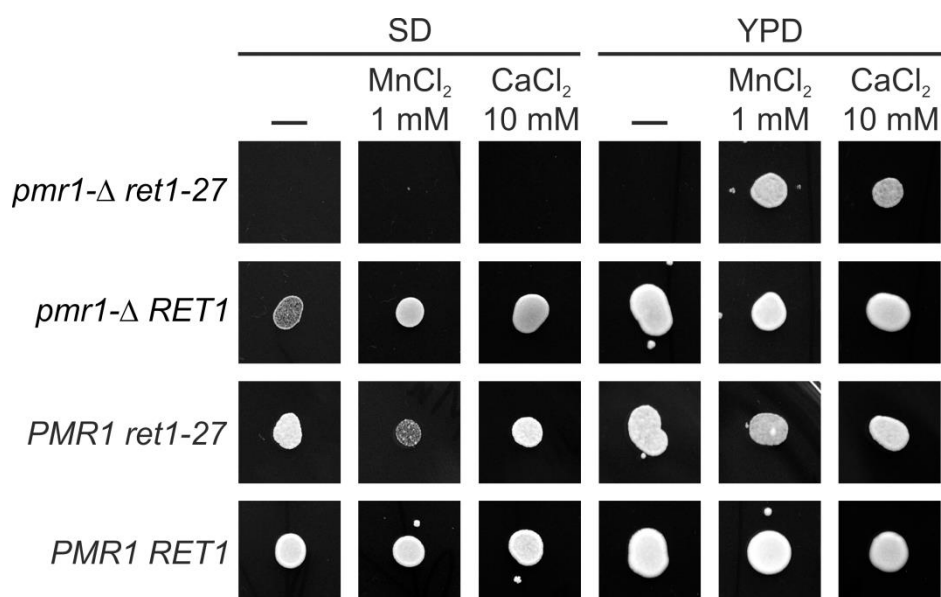


Рисунок 59. Восстановление роста двойного мутанта *pmr1-Δ ret1-27* при добавлении в среду CaCl₂ и MnCl₂. Приведенные на рисунке мутанты получены из штамма MC39-MOX, несущего мутации *pmr1-Δ ret1-27* и плазмиду с геном *PMR1* дикого типа, обеспечивающую способность расти на стандартных средах, и из его производного MC39-MOX-RET, несущего интегрированную плазмиду с геном *RET1* дикого типа. Поскольку двойной мутант *pmr1-Δ ret1-27* не способен расти на стандартных средах, штаммы MC39-MOX и MC39-MOX-RET были расштрихованы до отдельных колоний на среде YPD с добавлением 10мМ CaCl₂, что позволяло вырасти даже клонам, имеющих только мутантные аллели этих генов. 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. Проверено по четыре субклона каждого варианта, но на рисунке приведено по одному. "*pmr1-Δ ret1-27*" – субклон MC39-MOX без плазмиды; "*pmr1-Δ RET1*" – субклон MC39-MOX-RET без плазмиды; "*PMR1 ret1-27*" – субклон MC39-MOX с плазмидой; "*PMR1 RET1*" – субклон MC39-MOX-RET с плазмидой.

4.7.2. Нарушения генов *PMC1* и *VPS35* усиливают потребность мутанта *pmr1-Δ* *O. polymorpha* в Ca^{2+} .

У дрожжей *S. cerevisiae* инактивация вакуолярной кальциевой АТФазы *Pmc1* нарушает контроль концентрации Ca^{2+} в цитозоле и таким образом приводит к неспособности клеток расти при высокой концентрации Ca^{2+} в среде. Ионная помпа *Pmr1* также вовлечена в поддержание на низком уровне концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Инактивация одновременно двух этих ионных помп у *S. cerevisiae* летальна из-за повышения концентрации кальция в цитозоле (Cunningham and Fink, 1994). Хотя проявления мутаций *pmr1-Δ* и *pms1-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 не выяснены. Чтобы это выяснить, мы провели исследование взаимодействия мутаций *pmr1-Δ* и *pms1-Δ* друг с другом. Для этого ген *PMC1* был инактивирован в штамме с мутацией *pmr1-Δ*, который содержал плазмиду с геном *PMR1* дикого типа. Неожиданно для нас полученный штамм *pmr1-Δ pms1-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 60). Эффект увеличения концентрации Mn^{2+} в среде на рост двойного мутанта *pmr1-Δ pms1-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 60). 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 в разделе 4.4., нами были выявлены гены белков, которые отвечают за это сообщение. Среди них был ген

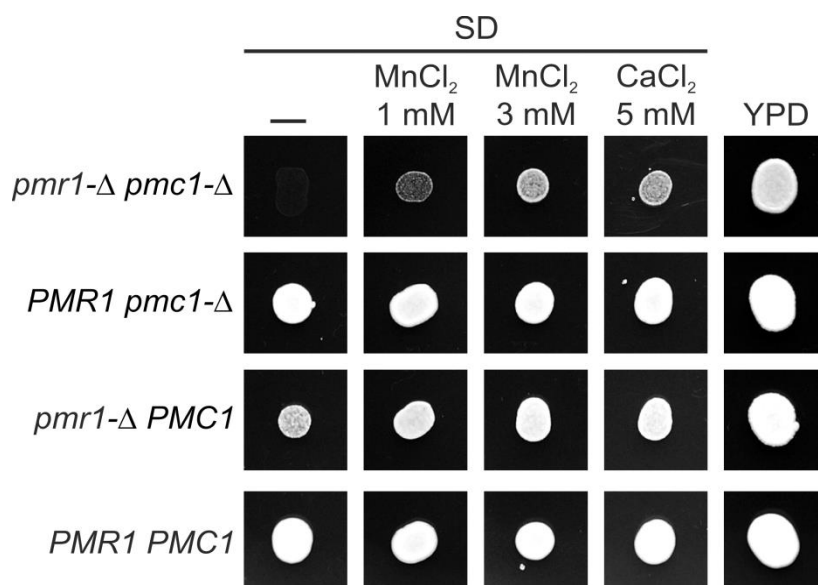


Рисунок 60. Восстановление роста двойного мутанта *pmr1-Δ pmc1-Δ* при добавлении в среду CaCl₂ и MnCl₂. На указанные среды были нанесены суспензии с одинаковой плотностью клеток и выращены при 37°C течение двух дней. Эксперимент проводился с серией разведений суспензий, но на рисунке представлено наиболее репрезентативное из них.

"*PMR1 pmc1-Δ*" и "*pmr1-Δ pmc1-Δ*" – штамм 1MA77/12/GAP2-Δ*pmc1*, несущий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа, и такой же штамм, но без плазмиды, соответственно; "*PMR1 PMC1*" и "*pmr1-Δ PMC1*" – штамм 1MA77/12/GAP2, несущий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа, и такой же штамм, но без плазмиды, соответственно.

VPS35, кодирующий компонент окаймляющего комплекса, который отвечает за ретроградный транспорт из превакуолярного компартмента в аппарат Гольджи. Сходно с мутацией *ret1-27* (раздел 4.2.2.), инаktivация этого гена приводила к чувствительности к недостатку Ca^{2+} в культуральной среде и усиливала зависимость мутанта *pmr1-Δ* от Ca^{2+} (рисунок 61). 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 отсутствии 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 инаktivации 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 61). Можно предположить, что Vps35 вовлечен в деградацию переносчика Mn^{2+} , и таким образом отсутствие Vps35 приводит к увеличению поступления в клетку Mn^{2+} .

4.7.3. Дефект снабжения секреторных органелл Ca^{2+} , вызываемый мутацией *ret1-27*, не опосредован снижением функции Pmr1.

В экспериментах, описанных в разделе 4.2.2.7., 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 инаktivировать, несмотря на

то, что трансформанты селектировали на синтетической среде. К тому же, чувствительность

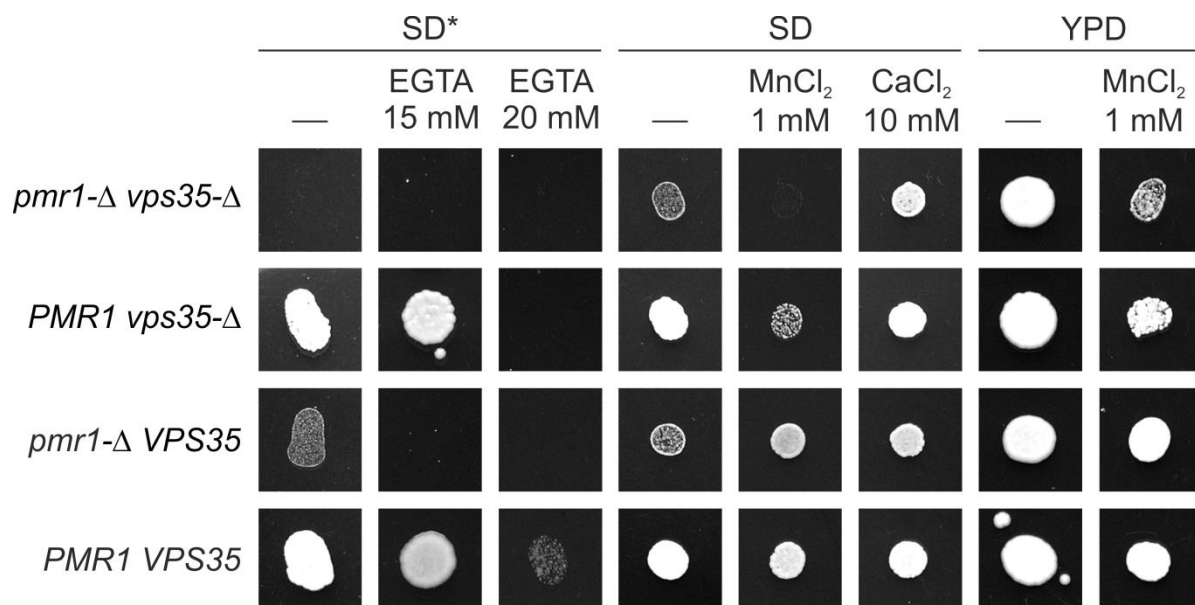


Рисунок 61. Влияние мутации *vps35-Δ* на рост штаммов, отличающихся наличием гена *PMR1* дикого типа. Клеточные суспензии одинаковой плотности были нанесены на указанные среды и выращены при 37°C течение двух дней. Эксперимент проводился с серией разведений суспензий, но на рисунке представлено наиболее репрезентативное из них.

"*PMR1 vps35-Δ*" и "*pmr1-Δ vps35-Δ*" – штамм 1MA77/12/GP1-Δ*vps35*, несущий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа, и такой же штамм, но без плазмиды, соответственно; "*PMR1 VPS35*" и "*pmr1-Δ VPS35*" – штамм 1MA77/12/GP1, несущий плазмиду с геном *PMR1* дикого типа, и такой же штамм, но без плазмиды, соответственно.

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 62). Это показывает, что зависимость от Ca²⁺ мутанта *ret1-27* не связана с недостаточной функцией *Pmc1*, поскольку в противном случае эта зависимость усиливалась бы при инактивации *PMC1*. Поскольку инактивация *Pmc1* должна приводить к увеличению Ca²⁺ 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* (Cunningham and Fink, 1994). В нашем случае увеличение экспрессии гена *PMR1* могло компенсировать 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*. Напротив, количество *Pmr1* падало в этом случае, но даже это не усиливало заметно зависимость от кальция, связанную с мутацией *ret1-27* (рисунок 63).

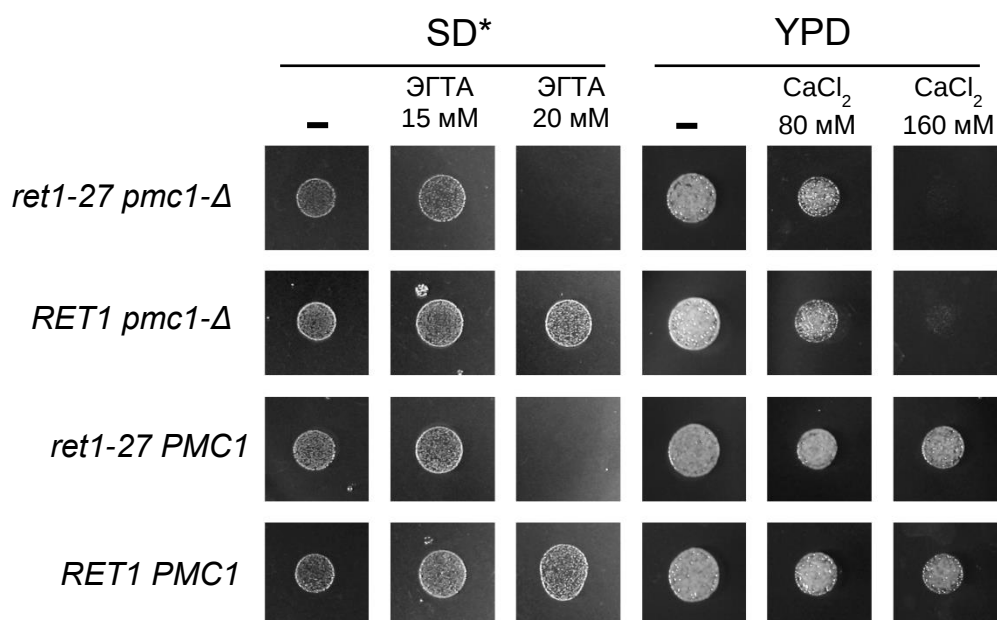


Рисунок 62. Чувствительность двойного мутанта *ret1-27 pmc1* к недостатку и избытку кальция в среде. Клеточные суспензии одинаковой плотности были нанесены на указанные среды и выращены при 37°C течение двух дней. Недостаток кальция достигался добавлением ЭГТА в среду SD*, а избыток – добавлением CaCl₂ в среду YPD. "*ret1-27 pmc1-Δ*" – штамм 64MA70QA-Δpmc1; "*RET1 pmc1-Δ*" – штамм 64MA70Q-RET1-Δpmc1; "*ret1-27 PMC1*" – штамм 64MA70QAL; "*RET1 PMC1*" – штамм 64MA70QL-RET1.

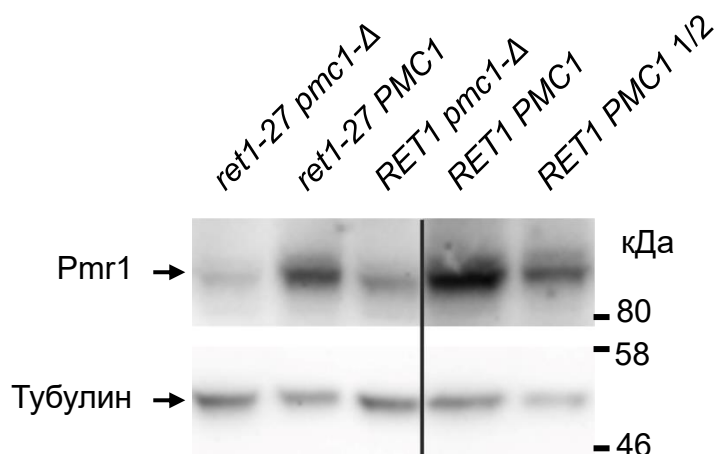


Рисунок 63. Влияние мутации *pms1-Δ* на количество белка Pmr1 в клетках мутанта *ret1-27* и штамма с аллелью *RET1* дикого типа. Белки были разделены электрофоретически и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану, которая была разделена на две части на уровне полосы маркера 80 кДа. Для верхней части был проведен иммуноблоттинг с антителами против Pmr1, а для нижней – с антителами против тубулина для сравнения количества нанесенного белка. Условные обозначения штаммов такие же, как и на предыдущем рисунке. "1/2" – образец, разведенный в 2 раза перед нанесением.

4.7.4. Проявления мутации *ret1-27*, указывающие на нарушения транспорта белков между аппаратом Гольджи и вакуолью.

У дрожжей *S. cerevisiae* некоторые мутации компонентов субкомплекса В COPI влияют на транспорт между аппаратом Гольджи и вакуолью (Gabriely et al., 2007). 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 этого белка в культуральной среде мутанта *ret1-27*, в отличие от мутантов *vps10-Δ* и *vps35-Δ*, использованных в качестве положительного контроля (рисунок 64 а). У этих мутантов увеличение количества CPY в среде сопровождалось сильным снижением количества этого белка в клетках (рисунок 64 б).

У *O. polymorpha* последовательность белка CPY содержит три потенциальных участка N-гликозилирования, один из которых находится в про-области. У мутантов *vps* наиболее представленная форма внеклеточного белка CPY мигрировала при

электрофорезе как диффузное пятно заметно выше полосы 46 кДа маркера молекулярной массы. Это было связано с гликозилированием, поскольку удаление N-гликозидных цепей при помощи обработки EndoH превращало это размытое пятно в четкую полосу, мигрирующую быстрее исходного белка, но не ниже полосы маркера 46 кДа. Кроме того, в культуральной среде в некотором количестве присутствовала форма CPY, которая после обработки EndoH мигрировала в промежутке между маркерами 30 и 46 кДа (рисунок 64 б). Эта форма была доминирующей в клеточных лизатах штаммов, не имеющих мутаций *vps*.

С помощью ионнообменной хроматографии была проведена частичная очистка CPY из культуральной среды штамма с мутацией *vps10-Δ*, после чего проведено электрофоретическое разделение белков по Лэммли, и полосы, соответствующие этим формам CPY, были исследованы с помощью MALDI-TOF спектрометрии. У более тяжелой формы, которую мы обозначили m1CPY, по сравнению полипептидом, кодируемым соответствующим геном, отсутствовала только предсказанная по гомологии с белком *S. cerevisiae* про-область, вплоть до остатка K¹²². Вычисленная молекулярная масса полипептидной цепи этой формы – 47 кДа. У более короткой формы наиболее близкий к N-концу пептид, выявляемый при масс-спектрометрическом анализе, начинался с остатка S²²⁷. Эта форма была обозначена m2CPY.

Важно отметить, что у *S. cerevisiae* CPY мигрирует при электрофорезе более компактной полосой, поскольку содержит N-гликозиды регулярной структуры типа "зрелый кор" (Ballou et al., 1990). Электрофоретический паттерн CPY *O. polymorpha* свидетельствует о том, что по меньшей мере одна из гликозидных цепей подвергается модификациям внешней цепи с присоединением нерегулярного количества маннозных остатков.

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* секретировал более экстенсивно гликозилированный белок CPY, чем мутант *vps35-Δ*, в то же время, на фоне мутации *ret1-27*, уже мутант *vps35-Δ* секретировал более экстенсивно гликозилированный белок (рисунок 64 а). Размер гликозидных цепей внутриклеточной формы m2CPY у мутанта *ret1-27* был меньше, чем у штамма дикого

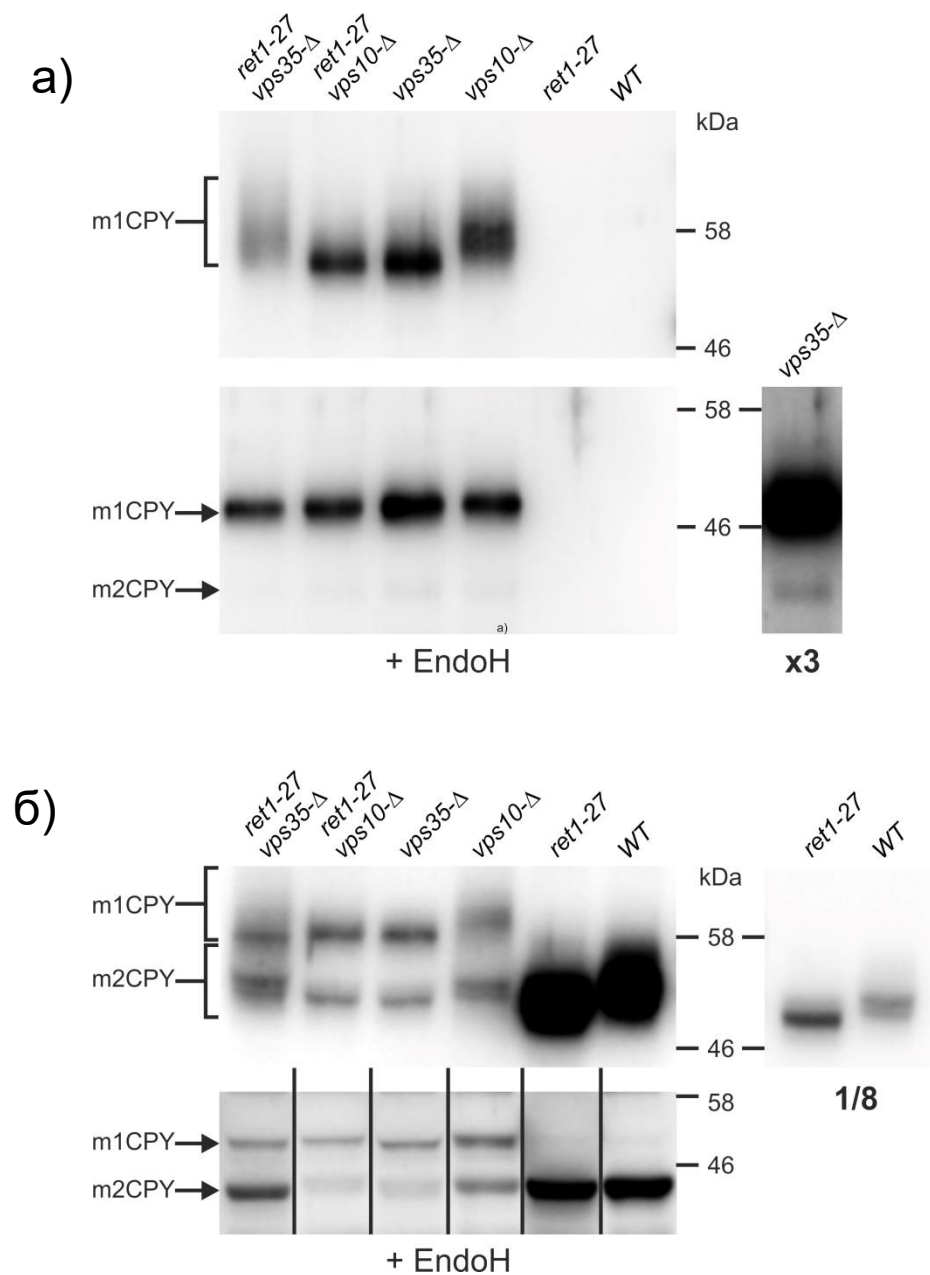


Рисунок 64. Иммуноблоттинг CPY в культуральных средах (а) и клеточных лизатах (б). "*ret1-27 vps35-Δ*" – штамм 64MA70UA-Δ*vps35*; "*ret1-27 vps10-Δ*" – штамм 64MA70UA-Δ*vps10*; "*vps35-Δ*" – штамм 64MA70U-RET1-Δ*vps35*; "*vps10-Δ*" – штамм 64MA70U-RET1-Δ*vps10*; "*ret1-27*" – штамм 64MA70UAL; "WT" – штамм 64MA70UA-RET1; "+EndoH" – образцы, обработанные EndoH; "X3" – результат трехкратной экспозиции; "1/8" – в восемь раз меньшая экспозиция.

типа. При нарушении генов *VPS10* и *VPS35* сильно падало количество СРУ внутри клеток, и при этом появлялась форма *m1CPY* в количестве, сопоставимом с формой *m2CPY*. В изменении гликозилирования этих форм СРУ 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* (рисунок 65). В отличие от СРУ, 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 СРУ. Мутация *ret1-27* влияла на гликозилирование СРУ в штамме с мутацией *vps10-Δ* фактически также, 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 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 в разделе 4.4., протеолитический процессинг белка *uPA* по связи K158-I159 значительно усиливается при нарушениях сортировки белков в вакуоль. Этот эффект особенно заметен в случае негликозилированного мутантного варианта этого белка *uPA-Q³⁰²*. 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 66).

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 не влияют на морфологию этой органеллы (Raymond et al., 1992). У *O. polymorpha* это нарушение также не приводило к изменению морфологии вакуоли (рисунок 67). 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 67).

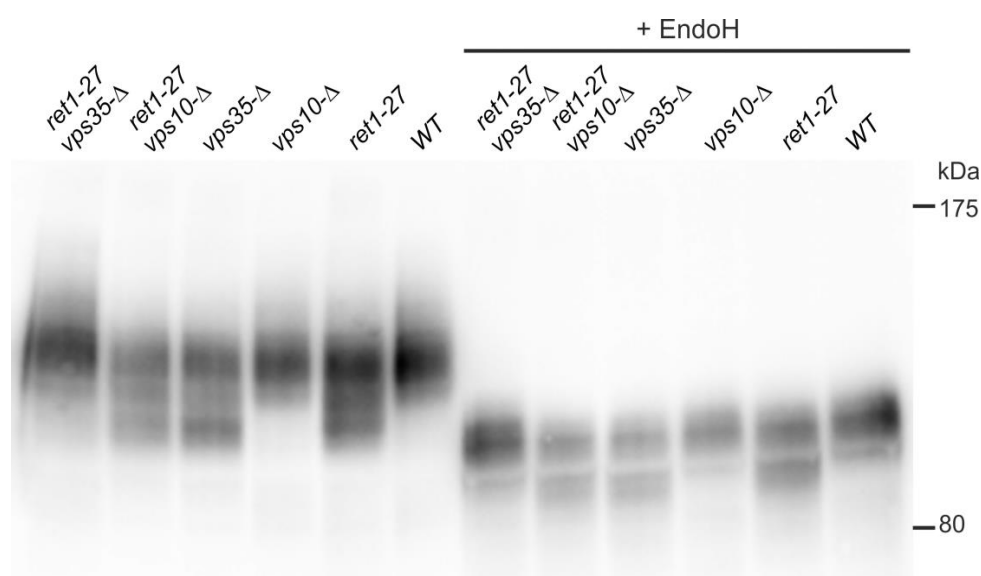


Рисунок 65. Иммуноблоттинг белка Gas1 в клеточных лизатах.

"*ret1-27 vps35-Δ*" – штамм 64MA70UA-Δ*vps35*; "*ret1-27 vps10-Δ*" – штамм 64MA70UA-Δ*vps10*; "*vps35-Δ*" – штамм 64MA70U-RET1-Δ*vps35*; "*vps10-Δ*" – штамм 64MA70U-RET1-Δ*vps10*; "*ret1-27*" – штамм 64MA70UAL; "*WT*" – штамм 64MA70UA-RET1; "+EndoH" – образцы, обработанные EndoH.

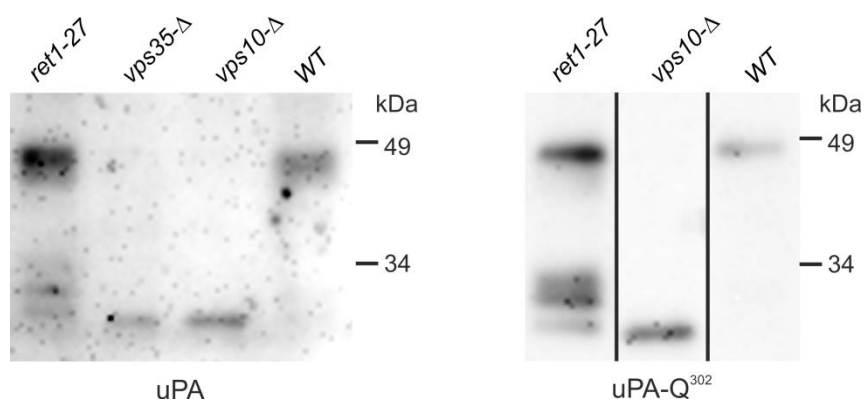


Рисунок 66. Иммуноблоттинг белка uPA из культуральных супернатантов штаммов, продуцирующих uPA дикого типа и не гликозилированный вариант этого белка, uPA-Q³⁰². Панель uPA: "ret1-27" – штамм 64MA70UAL; "vps35-Δ" – штамм 64MA70U-RET1-Δvps35; "vps10-Δ" – штамм 64MA70U-RET1-Δvps10; "WT" – штамм 64MA70UA-RET1. Образцы, анализ которых представлен на этой панели, были обработаны EndoH. Панель uPA-Q³⁰²: "ret1-27" – штамм 64MA70QAL; "vps10-Δ" – штамм 64MA70Q-RET1-Δvps10; "WT" – штамм 64MA70QA-RET1.

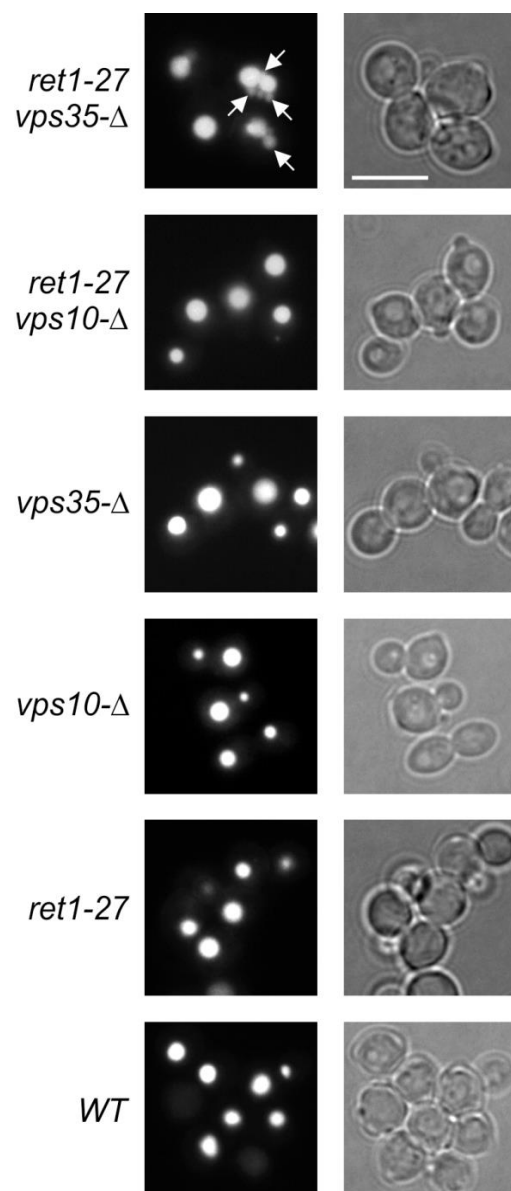


Рисунок 67. Окрашивание вакуолей красителем Cell Tracker Blue.

"ret1-27 vps35-Δ" – штамм 64MA70UA-Δvps35; "ret1-27 vps10-Δ" – штамм 64MA70UA-Δvps10; "vps35-Δ" – штамм 64MA70U-RET1-Δvps35; "vps10-Δ" – штамм 64MA70U-RET1-Δvps10; "ret1-27" – штамм 64MA70UAL; "WT" – штамм 64MA70UA-RET1. Стрелки указывают на окрашивающиеся компартменты, появляющиеся в дополнение к вакуолям с обычной морфологией. Белая полоса на верхней правой панели соответствует 5 мкм.

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

4.8.1. Инактивация гомолога гена *MNN4 S. cerevisiae* снижает устойчивость *O. polymorpha* к ванадату.

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. Для получения мутантов использовали метод случайной интеграции трансформирующей ДНК, принцип которого описан в разделе 4.4.1. 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 (рисунок 68). В геноме *O. polymorpha* есть два гомолога этого гена, и второй ген обладает несколько большим сходством, чем тот, в котором была получена мутация. Кроме того, другой гомолог 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).

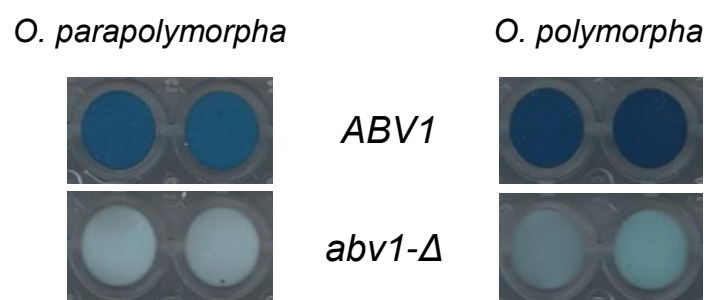


Рисунок 68. Окрашивание клеток красителем Альциановым синим.

O. parapolyomorpha ABV1 и *abv1-Δ* – штаммы DL1-L и DL1-Δ*abv1*, соответственно; *O. polymorpha* ABV1 и *abv1-Δ* – штаммы 1B27-UL и 1B27-Δ*abv1*-UL, соответственно. Для каждого штамма приведено по два независимо выращенных клона.

4.8.2. Поиск мутаций, увеличивающих резистентность к ванадату у *O. parapolyomorpha*.

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. Для этого использовали последовательно два подхода.

В рамках первого подхода была проведена селекция спонтанных мутаций, увеличивающих устойчивость. Существенная часть полученных мутантов не обладала фенотипическими проявлениями, такими как чувствительность к каким-либо веществам или повышенной температуре, позволяющими проводить положительную селекцию для клонирования аллели дикого типа по комплементации мутации. Однако среди полученных клонов встречались мутанты с повышенной чувствительностью к детергенту (дезоксихолату натрия), а также неспособные расти при температуре 45°C и выше. У одного из них, обозначенного DL42-15, в предварительных экспериментах было обнаружено изменение паттерна гликозилирования белка CPY (данные не приведены). Этот клон был

трансформирован библиотекой геномных последовательностей *O. parapolymorpha*. В результате селекции на среде с детергентом был получен клон, из которого была выделена плаزمида со вставкой геномной ДНК. Определение нуклеотидной последовательности вставки выявило, что она содержит две полные открытые рамки считывания, одна из которых кодирует гомолог маннозилфосфатизомеразу, а другая малую ГТФазу Ypt1, участвующую в везикулярном транспорте между секреторными органеллами. Делеционный анализ показал, что за подавление чувствительности к детергенту и повышенной температуре отвечает именно YPT1. Однако оказалось, что этот ген не комплементирует увеличенную устойчивость к ортованадату. Это свидетельствовало о том, что мутация произошла не в этом гене, который в действительности является супрессором чувствительности к детергенту и высокой температуре.

Чтобы идентифицировать мутации, увеличивающие устойчивость к ванадату без увеличения чувствительности к детергенту и повышенной температуре, был использован метод случайной интеграции трансформирующей ДНК. Для этого штамм *O. parapolymorpha* был трансформирован линейаризованной плазмидой pKAM555, содержащий ген устойчивости к генетицину в качестве селективного маркера. Трансформанты сначала селектировали на среде, содержащей непермиссивную концентрацию ванадата, а потом полученные клоны проверяли на наличие плазмидного маркера по устойчивости к генетицину. 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.

5. Обсуждение

5.1. Свойства модельного белка, использованного в работе для изучения секреции.

В нашей работе в качестве модельного белка для изучения влияния различных мутаций на секрецию был использован uPA. Этот белок неэффективно секретируется клетками дрожжей. Нами было показано, что увеличение синтеза uPA выше определенного уровня не приводит к увеличению его секреции, но вызывает накопление этого белка внутри клеток в виде высокомолекулярных агрегатов. Очевидно, что эти агрегаты образуются в эндоплазматическом ретикулуме, поскольку состоят из белка, не получившего модификаций в аппарате Гольджи. У дрожжей *O. parapolymorpha* одна копия экспрессионной кассеты uPA, имеющей сильный регулируемый промотор MOX, обеспечивает уровень продукции, который близок к оптимальному. Т. е., как небольшое его снижение, так и превышение приводят к снижению уровня секреции. Снижение секреции uPA при превышении оптимального уровня продукции сопровождается сильным увеличением агрегации этого белка в ЭР. Наши данные указывают на то, что этот белок неэффективно принимает правильную конформацию в секреторном пути дрожжей, что приводит к его задержке в ЭР. При достаточно высоком уровне продукции белка емкость систем контроля качества укладки и элиминации несвернутых белков ERQC и ERAD может быть исчерпана, и несвернутый белок будет накапливаться в этом компартменте, создавая помехи для укладки новых молекул. В рамках такой модели агрегация должна не мешать, а способствовать секреции, поскольку она снижает концентрацию несвернутых молекул. Это можно проиллюстрировать нашими наблюдениями. Интеграция одной копии экспрессионной кассеты в локус MOX или LEU2 обеспечивает несколько более высокую продукцию uPA, чем интеграция в теломерную область, что приводит к увеличению секреции на фоне существенного увеличения агрегации. Если бы агрегация мешала секреции, то и в этом случае мы наблюдали бы увеличение только агрегации.

То, что накопление белка в ЭР может мешать укладке новых молекул, выявляется в эксперименте с добавлением сигнала задержки к укороченному варианту uPA (uPA-

С). Этот вариант существенно лучше секретировается, чем uPA дикого типа, что коррелирует с меньшим уровнем внутриклеточной агрегации. При добавлении к этому варианту сигнала задержки в ЭР степень его агрегации сильно возрастает.

Низкий уровень секреции негликозилированного варианта uPA-Q³⁰² может объясняться важной ролью N-гликозидной цепи как в самом процессе укладки, так и в распознавании несвернутых молекул для их деградации системой ERAD. В частности, известно, что мутантный вариант карбоксипептидазы Y (CPY*), который имеет дефект укладки в ЭР, перестает деградировать и накапливается в ЭР, если не получает N-гликозидных цепей (Knop et al., 1996).

5.2. Возможные механизмы увеличения эффективности секреции uPA у мутантов *ret1-27*, *oru24*, *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*, *oru24* и *ret1-27*) была снижена внутриклеточная агрегация этого белка. Поскольку мутации затрагивают разные процессы, механизмы их влияния на укладку чужеродного белка могут существенно отличаться.

5.2.1. Мутация *oru24*.

Ген *ORU24*, в котором произошла эта мутация, кодирует маннозо-1-фосфатуанилтрансферазу. 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 (Varki et al., 2017). 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 несовместима с жизнью так же, как и у дрожжей *S. cerevisiae* (Yoda et al., 2000). Очевидно, что мутация *oru24* 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 у дрожжей *S. cerevisiae*, когда такой фенотип был обнаружен у штамма с мутацией в гене *SSU21/MSD4* (Packeiser et al., 1999).

5.2.2. Мутация *pmt1-Δ*.

В отличие от *oru24*, мутация *pmt1-Δ* непосредственно должна влиять исключительно на O-гликозилирование. Ген *PMT1* кодирует O-маннозилтрансферазу эндоплазматического ретикулума, 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 deletировать, поскольку другие маннозилтрансферазы ЭР, несмотря на отличающуюся специфичность, могут частично компенсировать отсутствие *Pmt1* (см. Обзор литературы).

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.

5.2.3. 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 (Dürr et al., 1998; Melnick et al., 1990). 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 (Strayle et al., 1999). 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 шапероно-подобных 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 (см. раздел 5.4.). Полученные данные пока не позволяют однозначно выявить, с каким из этих процессов связано влияние нарушения Pmr1 на укладку рекомбинантного белка.

5.2.4. 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. При этом у *S. cerevisiae* некоторые мутации α -COP приводят к дефекту прямого транспорта белков из ЭР. Это особенно характерно для мутаций в С-концевом домене этого белка (Duden et al., 1998; Eugster et al., 2000; Letourneur et al., 1994; Sütterlin et al., 1997). У *O. polymorpha* мы выявили дефект созревания GPI-заякоренного белка Gas1, что также свидетельствовало о нарушении прямого транспорта из ЭР.

Кроме увеличенной эффективности секреции uPA у мутаций *ret1-27* и *pmr-Δ* было еще одно сходное фенотипическое проявление – повышенная чувствительность к недостатку Ca^{2+} в среде. 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-Δ* 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 его чувствительность к недостатку кальция в среде, по-видимому, обусловлена дефектом альтернативного пути доставки кальция в секреторные органеллы (см. раздел 5.4.). 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*.

5.3. 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 (Kanik-Ennulat et al., 1995). 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 изолирование 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 (Cunningham and Fink, 1994). 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 по данным, полученным Т.С. Калебиной и С.С. Соколовым, 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 поглощения клеткой кальция из внешней среды (Locke et al., 2000). 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. Интересно, что у *S. cerevisiae* ген *WEE1* (*SWE1*) регулируется Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинфосфатазой, кальциневрином (Mizunuma et al., 1998). Можно было предполагать, что у *O. polymorpha* экспрессия *WEE1* также зависит от концентрации кальция в цитозоле. Однако мы выявили только незначительную активацию промотора этого гена в клетках *ptc1*-Δ. Такое слабое повышение экспрессии *WEE1* вряд ли само по себе могло привести к такой сильной чувствительности к SDS, как у мутанта *ptc1*-Δ.

Третий из перечисленных генов, нарушения которых супрессируют чувствительность мутанта *ptc1*-Δ к SDS, кодирует MAP киназу *Hog1*, являющуюся ключевым компонентом сигнального пути HOG, который важен для выживания клетки при попадании в гиперосмотические условия (см. обзор Hohmann et al., 2007). Ингибирование этого сигнального пути помогает клеткам двойного мутанта *snb1*-Δ *mpk1*-Δ *S. cerevisiae* поддерживать целостность клеточной стенки, что указывает на антагонистичность Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой регуляции и сигнального пути HOG (Shitamukai et al., 2004). Исходя из этого, можно было бы предполагать, что супрессия чувствительности к SDS мутанта *ptc1*-Δ *O. polymorpha* при инактивации *HOG1* связана со снятием негативного воздействия этого сигнального пути на целостность клеточной стенки. Однако сходство эффекта снижения проникновения кальция в клетку при инактивации *CCH1* с эффектом инактивации *HOG1* предполагало, что чувствительность к SDS мутанта *ptc1*-Δ опосредована механизмом, в котором Ca^{2+} -зависимая передача сигнала и сигнальный путь HOG не антагонистичны. Кроме того, клеточная стенка мутанта *ptc1*-Δ не была нарушена.

Важным обстоятельством для понимания механизма супрессии чувствительности к SDS является то, что протеинкиназа *Hog1* вовлечена в регуляцию клеточного цикла (см. обзор Clotet and Posas, 2007), 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 M. Фосфорилирование *Hsl1* протеинкиназой *Hog1* защищает *Wee1* от деградации, что приводит к накоплению этого белка и

ингибированию перехода G2-M (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, когда Swe1 (Wee1) был сверхпродуцирован в клетках *S. cerevisiae* под контролем промотора *GAL1* (Booher et al., 1993). 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 обеспечивается 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 (рисунок 69). Инактивация либо Wee1, либо X по отдельности не может ослабить чувствительность к SDS. Мы наблюдали обратный эффект, поскольку 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.

5.4. 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 (Dürr et al., 1998), а функционирование маннозилтрансфераз аппарата Гольджи зависит от Mn^{2+} (Haselbeck and Schekman, 1986; Nakajima and Ballou, 1975; Parodi, 1979; Sharma et al., 1974). В то же время было показано, что Mn^{2+} может функционально заменять Ca^{2+} и поддерживать жизнь клетки при недостатке последнего (Loukin and Kung, 1995), 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* (Jensen et al., 2009; Ramsay and Gadd, 1997; Yang et al., 2005). То же самое можно утверждать и в случае *O. polymorpha*, поскольку мутант *pmr1-Δ* гиперчувствителен к увеличению концентрации Mn^{2+} в культуральной среде.

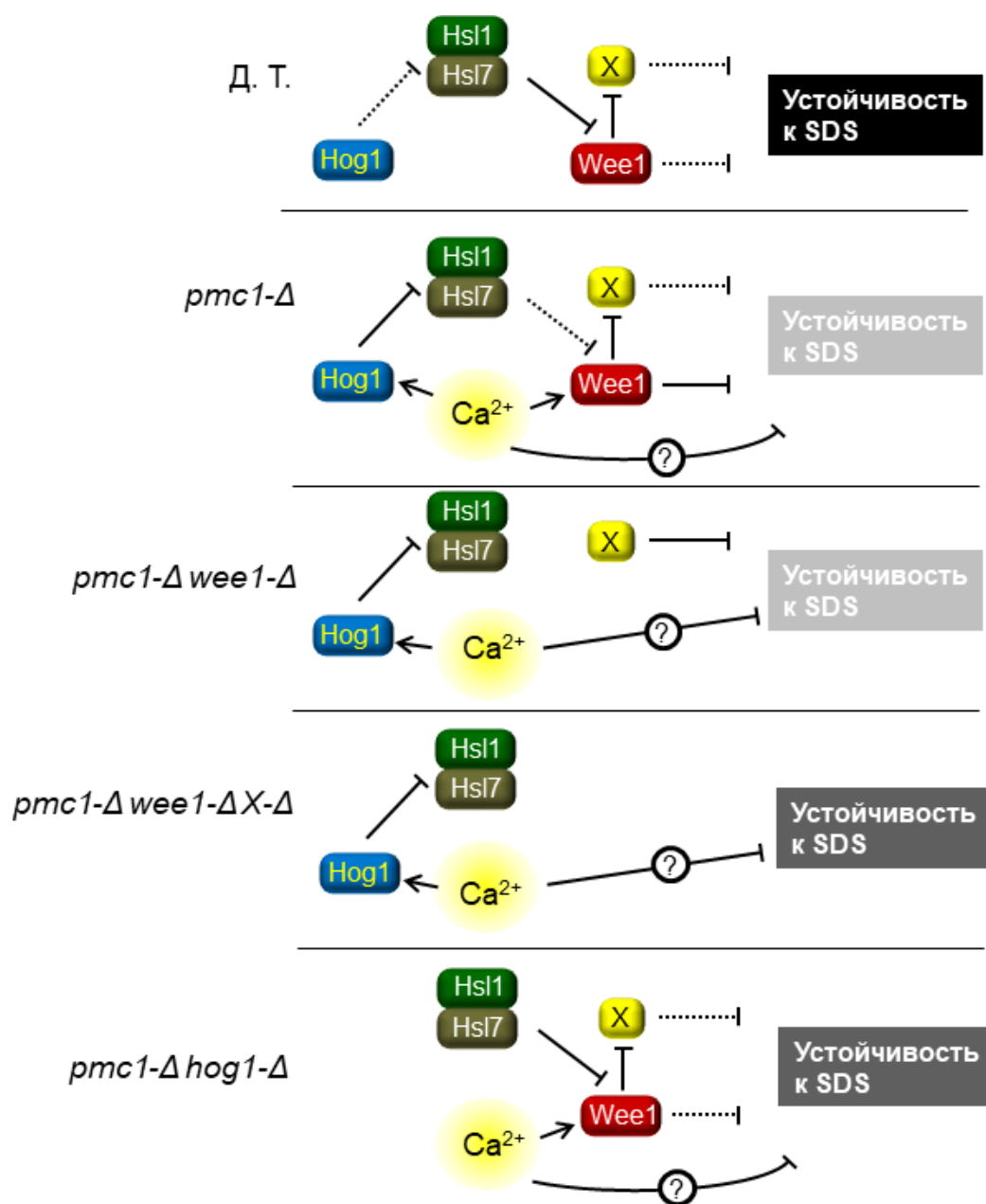


Рисунок 69. Гипотетическая схема событий, приводящих к чувствительности к SDS. Линии с окончанием в виде стрелки или перпендикулярной черты обозначают активирующее или ингибирующее воздействие, соответственно. Пунктирная линия обозначает снижение или блокировку воздействия.

В клетках дикого типа (Д. Т.) активность Wee1 подавляется комплексом Hsl1-Hsl7, однако это не предотвращает ингибирующего действия Wee1 на гипотетический компонент X, вовлеченный в модуляцию чувствительности клеток к SDS. Инактивация РМС1 (*pmc1-Δ*) приводит к активации протеинкиназы Hog1, которая высвобождает Wee1 из взаимодействия с Hsl1-Hsl7, а Wee1, в свою очередь, подавляет устойчивость к SDS. Инактивация протеинкиназы Wee1 (*pmc1-Δ wee1-Δ*)

предотвращает ее влияние на устойчивость к SDS, однако при этом снимается ингибирующее действие на компонент X, который сам начинает подавлять эту устойчивость. Поэтому супрессия чувствительности к SDS при инактивации Wee1 проявляется только при инактивации этого компонента (*pmc1-Δ wee1-Δ X-Δ*). Инактивация Hog1 (*pmc1-Δ hog1-Δ*) восстанавливает ингибирование активности Wee1 комплексом Hsl1-Hsl7, и при этом остаточной активности Wee1 достаточно, чтобы подавлять компонент X, что обеспечивает отсутствие негативного влияния и Wee1, и X на устойчивость к SDS. Неполная супрессия чувствительности к SDS инактивацией Hog1 может быть следствием существования и другого пути, отмеченного "?", который обуславливает влияние повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле на этот фенотип.

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 COPI, 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 Ca^{2+} -зависимость, 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 (Cunningham and Fink, 1994). Однако оказалось, что двойной мутант *pmc1-Δ pmr1-Δ O. polymorpha* способен расти на среде YPD, а его способность расти на синтетической среде SD 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, то есть, 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 сортировки и изменения морфологии вакуоли (Gabriely et al., 2007). 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 сортировкой, (II) гликозилирование вакуолярного белка CPY и (III) морфологию вакуоли на фоне мутации *vps35-Δ*.

Белок CPY отсортировывается от белков, направляющихся к плазматической мембране, посредством рецептора вакуолярного сортинга Vps10. Согласно исследованиям, проведенным на дрожжах *S. cerevisiae*, это происходит в наиболее поздних компартментах аппарата Гольджи. Исходя из наших данных, судить о влиянии мутации *vps1-Δ* на гликозилирование CPY можно в основном по косвенным признакам, поскольку в штамме дикого типа этот белок представлен внутриклеточной, наиболее процессированной формой, которую мы обозначили m2CPY, а у мутанта большая его часть секретируется в виде менее процессированной формы m1CPY. Сравнение паттерна подвижности этих форм у мутанта и штамма дикого типа указывает на то, что мутация *vps1-Δ* не оказывает существенного влияния на гликозилирование CPY. Интересно, что нарушение Vps35, который ответственен за возвращение Vps10 из эндосом, приводит к секреции менее гликозилированного CPY, чем нарушение самого Vps10, в то время как мутация *ret1-27* инвертирует эти эффекты на гликозилирование. Стоит отметить, что мутация *ret1-27*, в отсутствие нарушений вакуолярного сортинга, приводит к снижению гликозилирования внутриклеточного белка CPY. Эффекты мутаций *ret1-27* и *vps35-Δ* на гликозилирование вакуолярного белка CPY и белка поверхности клеток Gas1 выглядели сходно. Каждая из мутаций в отдельности снижала гликозилирование Gas1, а при их взаимодействии гликозилирование возвращалось к норме. Это указывало, что мутации *ret1-27* и *vps35-Δ* влияют на гликозилирование через разные, но взаимодействующие механизмы. Кроме того, взаимодействие этих мутаций было выявлено и по их синтетическому эффекту на морфологию вакуоли.

Вовлеченность компонентов комплекса COPI, включая α -COP, в транспорт из эндосом (Gabriely et al., 2007) может определять механизм эффекта 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 COPI. Классическая модель "созревания цистерн" аппарата Гольджи предполагает рециклирование ферментов этого компартмента путем их транспорта в везикулах COPI последовательно из более поздних компартментов в более ранние (см. Обзор литературы). В этом случае ионы Ca^{2+} , попавшие из эндосом в поздние компартменты аппарата Гольджи, при транспортировке в более ранние будут

последовательно разбавляться. Эта проблема не возникала бы, если катионы Ca^{2+} могли бы транспортироваться сразу в ранние компартменты секреторного пути. Поэтому полученные нами результаты могут указывать на участие компонентов окаймления COP1 в транспорте из эндосом непосредственно в ЭР.

Катионы Mn^{2+} не обязательно попадают в люмен ЭР по тому же пути, что и Ca^{2+} , поскольку они могут транспортироваться из цитозоля при участии белка Spf1, который возможно является Mn^{2+} -АТФазой ЭР (Cohen et al., 2013). Действительно, одновременная инактивация Spf1 и Pmr1 дает существенно более выраженные эффект на деградацию СРУ* (модельный белок с дефектом укладки в ЭР) и на укорочение N-гликозидных цепей синтезируемых в ЭР белков по сравнению с инактивациями этих ионных помп по отдельности (Vashist et al., 2002). Инактивация высокоаффинного переносчика Mn^{2+} плазматической мембраны Smf1 летальна в клетках, не имеющих помпы Pmr1 (Paidhungat and Garrett, 1998). Так же как проявления взаимодействия мутации *pmr1-Δ* с мутациями *ret1-27*, *pmc1-Δ* и *vps35-Δ* *O. polymorpha*, взаимодействие мутации *pmr1* с *spf1* и *smf1* *S. cerevisiae* можно объяснить с точки зрения участия Ca^{2+} и Mn^{2+} в жизненно важном процессе в секреторных органеллах, в котором эти катионы взаимозаменяемы.

6. Заключение

Для изучения механизмов, влияющих на секрецию рекомбинантных белков, в качестве модельного организма мы использовали два близкородственных вида метилотрофных дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. 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. parapolymorpha*, 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. parapolymorpha* 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 С-концевого домена α -COP и инактивация $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи Pmg1 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 позволяет 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.

7. 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 COP1, 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.

8. Список литературы.

1. Abe H, Takaoka Y, Chiba Y, Sato N, Ohgiya S, Itadani A, Hirashima M, Shimoda C, Jigami Y, Nakayama K -i. 2008. Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology* **19**:428–436. doi:10.1093/glycob/cwn157
2. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **35**:74–82. doi:10.1016/j.tibs.2009.10.001
3. Agaphonov MO, Beburow MYu, Ter-Avanesyan MD, Smirnov VN. 1995. A disruption-replacement approach for the targeted integration of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **11**:1241–1247. doi:10.1002/yea.320111304
4. Ahmed SM, Nishida-Fukuda H, Li Y, McDonald WH, Gradinaru CC, Macara IG. 2018. Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion. *Nat Commun* **9**:5140. doi:10.1038/s41467-018-07467-5
5. Amano K, Chiba Y, Kasahara Y, Kato Y, Kaneko MK, Kuno A, Ito H, Kobayashi K, Hirabayashi J, Jigami Y, Narimatsu H. 2008. Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci* **105**:3232–3237. doi:10.1073/pnas.0710412105
6. Andréasson C, Rampelt H, Fiaux J, Druffel-Augustin S, Bukau B. 2010. The endoplasmic reticulum Grp170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic Hsp110. *J Biol Chem* **285**:12445–12453.

doi:10.1074/jbc.M109.096735

7. Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M. 1997. N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange †. *Biochemistry* **36**:4675–4684. doi:10.1021/bi962252b
8. Appenzeller-Herzog C, Hauri HP. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): In search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**:2173–2183. doi:10.1242/jcs.03019
9. Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri H-P. 1999. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol* **1**:330–334. doi:10.1038/14020
10. Arakel EC, Schwappach B. 2018. Formation of COPI-coated vesicles at a glance. *J Cell Sci* **131**:jcs209890. doi:10.1242/jcs.209890
11. Aridor M, Weissman J, Bannykh S, Nuoffer C, Balch WE. 1998. Cargo Selection by the COPII Budding Machinery during Export from the ER. *J Cell Biol* **141**:61–70. doi:10.1083/jcb.141.1.61
12. Astrup T, Mullertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* **40**:346–51. doi:10.1016/0003-9861(52)90121-5
13. Axelsen KB, Palmgren MG. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**:696–706. doi:10.1104/pp.126.2.696
14. Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3254–9. doi:10.1073/pnas.060034697
15. Balch WE, McCaffery JM, Plutner H, Farquhar MG. 1994. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* **76**:841–852. doi:10.1016/0092-8674(94)90359-X
16. Baldridge RD, Rapoport TA. 2016. Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell* **166**:394–407. doi:10.1016/j.cell.2016.05.048
17. Ballou CE. 1990. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol* **185**:440–70.
18. Ballou CE, Ballou L, Ball G. 1994. *Schizosaccharomyces pombe* glycosylation mutant with altered cell surface properties. *Proc Natl Acad Sci* **91**:9327–9331. doi:10.1073/pnas.91.20.9327
19. Ballou CE, Kern KA, Raschke WC. 1973. Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants. *J Biol Chem* **248**:4667–4671.
20. Ballou L, Ballou C. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* mutants that are defective

- in glycoprotein galactosylation. *Proc Natl Acad Sci* **92**:2790–2794. doi:10.1073/pnas.92.7.2790
21. Ballou L, Hernandez LM, Alvarado E, Ballou CE. 1990. Revision of the oligosaccharide structures of yeast carboxypeptidase Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3368–3372. doi:10.1073/pnas.87.9.3368
 22. Bannykh SI, Balch WE. 1997. Membrane Dynamics at the Endoplasmic Reticulum–Golgi Interface. *J Cell Biol* **138**:1–4. doi:10.1083/jcb.138.1.1
 23. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. 2006. Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. *Cell* **125**:509–522. doi:10.1016/j.cell.2006.02.049
 24. Barfield RM, Fromme JC, Schekman R. 2009. The Exomer Coat Complex Transports Fus1p to the Plasma Membrane via a Novel Plasma Membrane Sorting Signal in Yeast. *Mol Biol Cell* **20**:4985–4996. doi:10.1091/mbc.e09-04-0324
 25. Barlowe C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**:295–300. doi:10.1016/S0962-8924(03)00082-5
 26. Barlowe C. 1994. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**:895–907. doi:10.1016/0092-8674(94)90138-4
 27. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M. 2006. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* **125**:523–33. doi:10.1016/j.cell.2006.04.009
 28. Becker B, Bölinger B, Melkonian M. 1995. Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles. *Trends Cell Biol* **5**:305–307. doi:10.1016/S0962-8924(00)89047-9
 29. Beier H, Grimm M. 2001. Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res* **29**:4767–82. doi:10.1093/nar/29.23.4767
 30. Benito B, Garciadeblás B, Rodríguez-Navarro A. 2000. Molecular cloning of the calcium and sodium ATPases in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **35**:1079–88. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01776.x
 31. Benyair R, Ogen-Shtern N, Mazkereth N, Shai B, Ehrlich M, Lederkremer GZ. 2015. Mammalian ER mannosidase I resides in quality control vesicles, where it encounters its glycoprotein substrates. *Mol Biol Cell* **26**:172–184. doi:10.1091/mbc.E14-06-1152
 32. Berg B van den, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**:36–44. doi:10.1038/nature02218
 33. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. 2000. Dynamic

interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**:326–332. doi:10.1038/35014014

34. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513–23. doi:10.1093/nar/7.6.1513
35. Blagoeva J, Stoev G, Venkov P. 1991. Glucan structure in a fragile mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**:455–461. doi:10.1002/yea.320070504
36. Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, Potgieter TI, Nett JH, Hamilton SR, Stadheim TA, Miele RG, Bobrowicz B, Mitchell T, Rausch S, Renfer E, Wildt S. 2004. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: Production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology* **14**:757–766. doi:10.1093/glycob/cwh104
37. Bobrowicz P, Gomathinayagam S, Hamilton S, Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Wildt S. 2011. Method for producing proteins in *Pichia pastoris* that lack detectable cross binding activity to antibodies against host cell antigens. WO2011046855A1.
38. Boehm C, Field MC. 2019. Evolution of late steps in exocytosis: conservation and specialization of the exocyst complex. *Wellcome open Res* **4**:112. doi:10.12688/wellcomeopenres.15142.2
39. Bogdanova AI, Agaphonov MO, Ter-Avanesyan MD. 1995. Plasmid reorganization during integrative transformation in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **11**:343–353. doi:10.1002/yea.320110407
40. Bogdanova AI, Kustikova OS, Agaphonov MO, Ter-Avanesyan MD. 1998. Sequences of *Saccharomyces cerevisiae* 2 μ m DNA improving plasmid partitioning in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **14**:1–9. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<1::AID-YEA195>3.0.CO;2-D
41. Bohnsack RN, Song X, Olson LJ, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Cummings RD, Smith DF, Dahms NM. 2009. Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J Biol Chem* **284**:35215–35226. doi:10.1074/jbc.M109.056184
42. Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. 1986. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol* **102**:1558–1566. doi:10.1083/jcb.102.5.1558
43. Bonfanti L, Mironov AA, Martínez-Menárguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A. 1998. Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae. *Cell* **95**:993–1003. doi:10.1016/S0092-8674(00)81723-7
44. Bonifacino JS. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:23–32. doi:10.1038/nrm1279
45. Booher RN, Deshaies RJ, Kirschner MW. 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34^{CDC28} in response to G1 and

G2 cyclins. *EMBO J* **12**:3417–26.

46. Boonen M, Vogel P, Platt KA, Dahms N, Kornfeld S. 2009. Mice Lacking Mannose 6-Phosphate Uncovering Enzyme Activity Have a Milder Phenotype than Mice Deficient for N -Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Activity. *Mol Biol Cell* **20**:4381–4389. doi:10.1091/mbc.e09-05-0398
47. Bouillet LEM, Cardoso AS, Perovano E, Pereira RR, Ribeiro EMC, Trópia MJM, Fietto LG, Tisi R, Martegani E, Castro IM, Brandão RL. 2012. The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cell Calcium* **51**:72–81. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.008
48. Bowman BJ, Draskovic M, Freitag M, Bowman EJ. 2009. Structure and distribution of organelles and cellular location of calcium transporters in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **8**:1845–55. doi:10.1128/EC.00174-09
49. Bowser R, Müller H, Govindan B, Novick P. 1992. Sec8p and Sec15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis. *J Cell Biol* **118**:1041–56. doi:10.1083/jcb.118.5.1041
50. Bowser R, Novick P. 1991. Sec15 protein, an essential component of the exocytotic apparatus, is associated with the plasma membrane and with a soluble 19.5S particle. *J Cell Biol* **112**:1117–31. doi:10.1083/jcb.112.6.1117
51. Boyd C, Hughes T, Pypaert M, Novick P. 2004. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol* **167**:889–901. doi:10.1083/jcb.200408124
52. Braakman I, Buleid NJ. 2011. Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Biochem* **80**:71–99. doi:10.1146/annurev-biochem-062209-093836
53. Braulke T, Bonifacino JS. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1793**:605–614. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016
54. Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S. 2002. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4)chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J* **21**:615–21. doi:10.1093/emboj/21.4.615
55. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. 2013. The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J* **280**:5385–97. doi:10.1111/febs.12193
56. Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. 2012. Calcium pumps: why so many? *Compr Physiol* **2**:1045–60. doi:10.1002/cphy.c110034
57. Brini M, Carafoli E. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* **89**:1341–1378. doi:10.1152/physrev.00032.2008
58. Brown DA, Crise B, Rose JK. 1989. Mechanism of membrane anchoring affects

- polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* **245**:1499–501. doi:10.1126/science.2571189
59. Brown WJ, Chambers K, Doody A. 2003. Phospholipase A 2 (PLA 2) Enzymes in Membrane Trafficking: Mediators of Membrane Shape and Function. *Traffic* **4**:214–221. doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00078.x
 60. Burd C, Cullen PJ. 2014. Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**:a016774–a016774. doi:10.1101/cshperspect.a016774
 61. Bykov YS, Schaffer M, Dodonova SO, Albert S, Plitzko JM, Baumeister W, Engel BD, Briggs JA. 2017. The structure of the COPI coat determined within the cell. *Elife* **6**:1–18. doi:10.7554/eLife.32493
 62. Carlson M, Botstein D. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**:145–154. doi:10.1016/0092-8674(82)90384-1
 63. Carroll KS. 2001. Role of Rab9 GTPase in Facilitating Receptor Recruitment by TIP47. *Science (80-)* **292**:1373–1376. doi:10.1126/science.1056791
 64. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. 2006. Distinct Ubiquitin-Ligase Complexes Define Convergent Pathways for the Degradation of ER Proteins. *Cell* **126**:361–373. doi:10.1016/j.cell.2006.05.043
 65. Cellier M, Privé G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10089–93. doi:10.1073/pnas.92.22.10089
 66. Chai W, Yuen C-T, Kogelberg H, Carruthers RA, Margolis RU, Feizi T, Lawson AM. 1999. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted Manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur J Biochem* **263**:879–888. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00572.x
 67. Chavez CA, Bohnsack RN, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Dahms NM. 2007. Domain 5 of the Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor Preferentially Binds Phosphodiester (Mannose 6-Phosphate N - Acetylglucosamine Ester) †. *Biochemistry* **46**:12604–12617. doi:10.1021/bi7011806
 68. Cheetham ME, Caplan AJ. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**:28. doi:10.1379/1466-1268(1998)003<0028:SFAEOD>2.3.CO;2
 69. Chesi A, Kilaru A, Fang X, Cooper AA, Gitler AD. 2012. The role of the Parkinson's disease gene PARK9 in essential cellular pathways and the manganese homeostasis network in yeast. *PLoS One* **7**:e34178. doi:10.1371/journal.pone.0034178
 70. Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T. 1997. Structures of Sialylated O -Linked Oligosaccharides of

Bovine Peripheral Nerve α -Dystroglycan. *J Biol Chem* **272**:2156–2162.
doi:10.1074/jbc.272.4.2156

71. Chiba Y, Sakuraba H, Kotani M, Kase R, Kobayashi K, Takeuchi M, Ogasawara S, Maruyama Y, Nakajima T, Takaoka Y, Jigami Y. 2002. Production in yeast of -galactosidase A, a lysosomal enzyme applicable to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Glycobiology* **12**:821–828. doi:10.1093/glycob/cwf096
72. Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, Jigami Y, Ichishima E. 1998. Production of Human Compatible High Mannose-type (Man 5 GlcNAc 2) Sugar Chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**:26298–26304. doi:10.1074/jbc.273.41.26298
73. Chidambaram S, Müllers N, Wiederhold K, Haucke V, von Mollard GF. 2004. Specific Interaction between SNAREs and Epsin N-terminal Homology (ENTH) Domains of Epsin-related Proteins in trans -Golgi Network to Endosome Transport. *J Biol Chem* **279**:4175–4179. doi:10.1074/jbc.M308667200
74. Chidambaram S, Zimmermann J, von Mollard GF. 2008. ENTH domain proteins are cargo adaptors for multiple SNARE proteins at the TGN endosome. *J Cell Sci* **121**:329–338. doi:10.1242/jcs.012708
75. Chigira Y, Oka T, Okajima T, Jigami Y. 2008. Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology* **18**:303–314. doi:10.1093/glycob/cwn008
76. Choi B-K, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, Miele RG, Nett JH, Wildt S, Gerngross TU. 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci* **100**:5022–5027. doi:10.1073/pnas.0931263100
77. Christensen PU, Davey J, Nielsen O. 1997. The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet* **255**:226–36. doi:10.1007/s004380050493
78. Chung KT, Shen Y, Hendershot LM. 2002. BAP, a Mammalian BiP-associated Protein, Is a Nucleotide Exchange Factor That Regulates the ATPase Activity of BiP. *J Biol Chem* **277**:47557–47563. doi:10.1074/jbc.M208377200
79. Clapham DE. 2007. Calcium signaling. *Cell* **131**:1047–58. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
80. Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T, Aepli M. 2009. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **184**:159–172. doi:10.1083/jcb.200809198
81. Clotet J, Escoté X, Adrover MA, Yaakov G, Garí E, Aldea M, de Nadal E, Posas F. 2006. Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J* **25**:2338–2346. doi:10.1038/sj.emboj.7601095
82. Clotet J, Posas F. 2007. Control of cell cycle in response to osmostress: lessons

- from yeast. *Methods Enzymol* **428**:63–76. doi:10.1016/S0076-6879(07)28004-8
83. Cohen A, Nelson H, Nelson N. 2000. The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* **275**:33388–33394. doi:10.1074/jbc.M004611200
 84. Cohen Y, Megyeri M, Chen OCW, Condomitti G, Riezman I, Loizides-Mangold U, Abdul-Sada A, Rimón N, Riezman H, Platt FM, Futerman AH, Schuldiner M. 2013. The yeast p5 type ATPase, spf1, regulates manganese transport into the endoplasmic reticulum. *PLoS One* **8**:e85519. doi:10.1371/journal.pone.0085519
 85. Colinet AS, Sengottaiyan P, Deschamps A, Colasoul ML, Thines L, Demaegd D, Duchêne MC, Foulquier F, Hols P, Morsomme P. 2016. Yeast Gdt1 is a Golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation. *Sci Rep* **6**:1–11. doi:10.1038/srep24282
 86. Connolly T, Gilmore R. 1986. Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J Cell Biol* **103**:2253–2261. doi:10.1083/jcb.103.6.2253
 87. Cooper AA, Stevens TH. 1996. Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J Cell Biol* **133**:529–541. doi:10.1083/jcb.133.3.529
 88. Cosson P, Amherdt M, Rothman JE, Orci L. 2002. A resident Golgi protein is excluded from peri-Golgi vesicles in NRK cells. *Proc Natl Acad Sci* **99**:12831–12834. doi:10.1073/pnas.192460999
 89. Courchesne WE, Vlasek C, Klukovich R, Coffee S. 2011. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **193**:323–334. doi:10.1007/s00203-010-0673-6
 90. Craven RA, Egerton M, Stirling CJ. 1996. A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* **15**:2640–2650. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00624.x
 91. Cui J, Kaandorp JA, Sloot PMA, Lloyd CM, Filatov M V. 2009. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* **9**:1137–1147. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00552.x
 92. Cunningham KW, Fink GR. 1996. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**:2226–2237. doi:10.1128/mcb.16.5.2226
 93. Cunningham KW, Fink GR. 1994. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J Cell Biol* **124**:351–363. doi:10.1083/jcb.124.3.351
 94. Curwin AJ, von Blume J, Malhotra V. 2012. Cofilin-mediated sorting and export of specific cargo from the Golgi apparatus in yeast. *Mol Biol Cell* **23**:2327–38. doi:10.1091/mbc.E11-09-0826

95. Cyert MS. 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: How yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* **311**:1143–1150. doi:10.1016/S0006-291X(03)01552-3
96. Dahan S, Ahluwalia JP, Wong L, Posner BI, Bergeron JJ. 1994. Concentration of intracellular hepatic apolipoprotein E in Golgi apparatus saccular distensions and endosomes. *J Cell Biol* **127**:1859–1869. doi:10.1083/jcb.127.6.1859
97. Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. 2007. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:381–389. doi:10.1007/s00253-006-0652-7
98. Dancourt J, Barlowe C. 2010. Protein Sorting Receptors in the Early Secretory Pathway. *Annu Rev Biochem* **79**:777–802. doi:10.1146/annurev-biochem-061608-091319
99. Day KJ, Casler JC, Glick BS. 2018. Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System. *Dev Cell* **44**:56-72.e4. doi:10.1016/j.devcel.2017.12.014
100. De M, Abazeed ME, Fuller RS. 2013. Direct binding of the Kex2p cytosolic tail to the VHS domain of yeast Gga2p facilitates TGN to prevacuolar compartment transport and is regulated by phosphorylation. *Mol Biol Cell* **24**:495–509. doi:10.1091/mbc.E12-11-0843
101. De Pourcq K, Vervecken W, Dewerte I, Valevska A, Van Hecke A, Callewaert N. 2012. Engineering the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of therapeutic proteins homogeneously glycosylated with Man8GlcNAc2 and Man5GlcNAc2. *Microb Cell Fact* **11**:53. doi:10.1186/1475-2859-11-53
102. De Schutter K, Lin Y-C, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **27**:561–566. doi:10.1038/nbt.1544
103. Dean N. 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1426**:309–322. doi:10.1016/S0304-4165(98)00132-9
104. Delic M, Göngrich R, Mattanovich D, Gasser B. 2014. Engineering of Protein Folding and Secretion—Strategies to Overcome Bottlenecks for Efficient Production of Recombinant Proteins. *Antioxid Redox Signal* **21**:414–437. doi:10.1089/ars.2014.5844
105. Delic M, Valli M, Graf AB, Pfeffer M, Mattanovich D, Gasser B. 2013. The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev* **37**:872–914. doi:10.1111/1574-6976.12020
106. Dell A, Morris HR. 2001. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science (80-)* **291**:2351–2356. doi:10.1126/science.1058890
107. Denic V, Quan EM, Weissman JS. 2006. A Luminal Surveillance Complex

- that Selects Misfolded Glycoproteins for ER-Associated Degradation. *Cell* **126**:349–359. doi:10.1016/j.cell.2006.05.045
108. Denis V, Cyert MS. 2002. Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* **156**:29–34. doi:10.1083/jcb.200111004
 109. Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R. 1991. Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**:806–808. doi:10.1038/349806a0
 110. Dicker M, Strasser R. 2015. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opin Biol Ther* **15**:1501–1516. doi:10.1517/14712598.2015.1069271
 111. Dodonova SO, Aderhold P, Kopp J, Ganeva I, Röhling S, Hagen WJH, Sinning I, Wieland F, Briggs JAG. 2017. 9 Å structure of the COPI coat reveals that the Arf1 GTPase occupies two contrasting molecular environments. *Elife* **6**:1–29. doi:10.7554/eLife.26691
 112. Dodonova SO, Diestelkoetter-Bachert P, Von Appen A, Hagen WJH, Beck R, Beck M, Wieland F, Briggs JAG. 2015. A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly. *Science (80-)* **349**:195–198. doi:10.1126/science.aab1121
 113. Donaldson JG, Jackson CL. 2000. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**:475–482. doi:10.1016/S0955-0674(00)00119-8
 114. Duchen MR. 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* **529 Pt 1**:57–68. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x
 115. Duden R, Kajikawa L, Wuestehube L, Schekman R. 1998. epsilon-COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize alpha-COP. *EMBO J* **17**:985–995. doi:10.1093/emboj/17.4.985
 116. Duncan MC, Costaguta G, Payne GS. 2003. Yeast epsin-related proteins required for Golgi–endosome traffic define a γ-adaptin ear-binding motif. *Nat Cell Biol* **5**:77–81. doi:10.1038/ncb901
 117. Dunphy W, Rothman J. 1985. Compartmental organization of the golgi stack. *Cell* **42**:13–21. doi:10.1016/S0092-8674(85)80097-0
 118. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* **188**:527–536. doi:10.1083/jcb.200911154
 119. Dürr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK. 1998. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* **9**:1149–62. doi:10.1091/mbc.9.5.1149

120. Ebert AD, Laussmann M, Wegehangel S, Kaderali L, Erfle H, Reichert J, Lechner J, Beer H-D, Pepperkok R, Nickel W. 2010. Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic* **11**:813–26. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01059.x
121. Ecker M, Mrsa V, Hagen I, Deutzmann R, Strahl S, Tanner W. 2003. O - Mannosylation precedes and potentially controls the N -glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep* **4**:628–632. doi:10.1038/sj.embor.embor864
122. Eckert ESP, Reckmann I, Hellwig A, Röhling S, El-Battari A, Wieland FT, Popoff V. 2014. Golgi Phosphoprotein 3 Triggers Signal-mediated Incorporation of Glycosyltransferases into Coatomer-coated (COPI) Vesicles. *J Biol Chem* **289**:31319–31329. doi:10.1074/jbc.M114.608182
123. Elwess NL, Filoteo AG, Enyedi A, Penniston JT. 1997. Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺. *J Biol Chem* **272**:17981–6. doi:10.1074/jbc.272.29.17981
124. Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R. 2004. The α - and β' -COP WD40 Domains Mediate Cargo-selective Interactions with Distinct Di-lysine Motifs. *Mol Biol Cell* **15**:1011–1023. doi:10.1091/mbc.e03-10-0724
125. Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R. 2000. COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* **19**:3905–3917. doi:10.1093/emboj/19.15.3905
126. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. 1998. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci* **95**:15781–15786. doi:10.1073/pnas.95.26.15781
127. Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H, Hendershot LM, Buchner J. 2009. An Unfolded CH1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies. *Mol Cell* **34**:569–579. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.028
128. Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. 2010. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci* **35**:189–198. doi:10.1016/j.tibs.2009.11.005
129. Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE. 1996. Bimodal Interaction of Coatomer with the p24 Family of Putative Cargo Receptors. *Science* (80-) **273**:1396–1399. doi:10.1126/science.273.5280.1396
130. Fischer M, Schnell N, Chattaway J, Davies P, Dixon G, Sanders D. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett* **419**:259–262. doi:10.1016/S0014-5793(97)01466-X
131. Ford MGJ, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJK, Evans PR, McMahon HT. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**:361–366. doi:10.1038/nature01020
132. Fourie AM, Sambrook JF, Gething MJ. 1994. Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem*

269:30470–30478.

133. Friant S, Pécheur E-I, Eugster A, Michel F, Lefkir Y, Nourrisson D, Letourneur F. 2003. Ent3p Is a PtdIns(3,5)P₂ Effector Required for Protein Sorting to the Multivesicular Body. *Dev Cell* **5**:499–511. doi:10.1016/S1534-5807(03)00238-7
134. Gabriely G, Kama R, Gerst JE. 2007. Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol Cell Biol* **27**:526–540. doi:10.1128/MCB.00577-06
135. Ganan S, Cazzulo JJ, Parodi AJ. 1991. A major proportion of N-glycoproteins are transiently glucosylated in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**:3098–3104. doi:10.1021/bi00226a017
136. García Bossi J, Kumar K, Barberini ML, Domínguez GD, Rondón Guerrero YDC, Marino-Buslje C, Obertello M, Muschietti JP, Estevez JM. 2020. The role of P-type IIA and P-type IIB Ca²⁺-ATPases in plant development and growth. *J Exp Bot* **71**:1239–1248. doi:10.1093/jxb/erz521
137. Gascón S, Neumann NP, Lampen JO. 1968. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J Biol Chem* **243**:1573–7.
138. Gasnereau I, Herr P, Chia PZC, Basler K, Gleeson PA. 2011. Identification of an endocytosis motif in an intracellular loop of Wntless protein, essential for its recycling and the control of Wnt protein signaling. *J Biol Chem* **286**:43324–33. doi:10.1074/jbc.M111.307231
139. Gemmer M, Förster F. 2020. A clearer picture of the ER translocon complex. *J Cell Sci* **133**:jcs231340. doi:10.1242/jcs.231340
140. Gemmill TR, Trimble RB. 1999. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**:227–237. doi:10.1016/S0304-4165(98)00126-3
141. Gentzsch M, Tanner W. 1996. The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J* **15**:5752–5759. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00961.x
142. Gietz RD, Woods RA. 2001. Genetic Transformation of Yeast. *Biotechniques* **30**:816–831. doi:10.2144/01304rv02
143. Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJC, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJM. 2006. Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway. *Cell* **127**:1265–1281. doi:10.1016/j.cell.2006.10.036
144. Giraudo CG, Maccioni HJF. 2003. Endoplasmic Reticulum Export of Glycosyltransferases Depends on Interaction of a Cytoplasmic Dibasic Motif with Sar1. *Mol Biol Cell* **14**:3753–3766. doi:10.1091/mbc.e03-02-0101

145. Girrbach V, Strahl S. 2003. Members of the Evolutionarily Conserved PMT Family of Protein O-Mannosyltransferases Form Distinct Protein Complexes among Themselves. *J Biol Chem* **278**:12554–12562. doi:10.1074/jbc.M212582200
146. Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S. 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**:19288–19296. doi:10.1074/jbc.M001771200
147. Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Cooper AA, Rochet J-C, Lindquist S. 2009. Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* **41**:308–315. doi:10.1038/ng.300
148. Glick BS, Elston T, Oster G. 1997. A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. *FEBS Lett* **414**:177–181. doi:10.1016/S0014-5793(97)00984-8
149. Glick BS, Luini A. 2011. Models for Golgi traffic: A critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:1–16. doi:10.1101/cshperspect.a005215
150. Goder V, Melero A. 2011. Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *J Cell Sci* **124**:144–153. doi:10.1242/jcs.072181
151. Gomathinayagam S, Hamilton SR. 2014. In vitro enzymatic treatment to remove O-linked mannose from intact glycoproteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:2545–2554. doi:10.1007/s00253-013-5478-5
152. Goodman RM, Thombre S, Firtina Z, Gray D, Betts D, Roebuck J, Spana EP, Selva EM. 2006. Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling. *Development* **133**:4901–11. doi:10.1242/dev.02674
153. Goto M. 2007. Protein O-glycosylation in fungi: Diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:1415–1427. doi:10.1271/bbb.70080
154. Graham TR, Emr SD. 1991. Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant. *J Cell Biol* **114**:207–218. doi:10.1083/jcb.114.2.207
155. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4645–9. doi:10.1073/pnas.87.12.4645
156. Green MR, Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
157. Griffiths G. 2000. Gut Thoughts on the Golgi Complex. *Traffic* **1**:738–745. doi:10.1034/j.1600-0854.2000.010906.x
158. Griffiths G, Simons K. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science (80-)* **234**:438–443. doi:10.1126/science.2945253

159. Groppi S, Belotti F, Brandão RL, Martegani E, Tisi R. 2011. Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. *Cell Calcium* **49**:376–386. doi:10.1016/j.ceca.2011.03.006
160. Grumati P, Dikic I, Stolz A. 2018. ER-phagy at a glance. *J Cell Sci* **131**:1–6. doi:10.1242/jcs.217364
161. Guo Q, Zhang T, Meng N, Duan Y, Meng Y, Sun D, Liu Y, Luo G. 2020. Sphingolipids are required for exocyst polarity and exocytic secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biosci* **10**:1–11. doi:10.1186/s13578-020-00406-2
162. Guo W, Grant A, Novick P. 1999. Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *J Biol Chem* **274**:23558–64. doi:10.1074/jbc.274.33.23558
163. Guo Y, Au W-C, Shakoury-Elizeh M, Protchenko O, Basrai M, Prinz WA, Philpott CC. 2010. Phosphatidylserine is involved in the ferrichrome-induced plasma membrane trafficking of Arn1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**:39564–73. doi:10.1074/jbc.M110.177055
164. Guo Y, Sirkis DW, Schekman R. 2014. Protein Sorting at the trans -Golgi Network . *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**:169–206. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013012
165. Haigh NG, Johnson AE. 2002. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol* **156**:261–270. doi:10.1083/jcb.200110074
166. Halic M, Beckmann R. 2005. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* **15**:116–125. doi:10.1016/j.sbi.2005.01.013
167. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischnewski H, Wildt S, Gerngross TU. 2003. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* **301**:1244–1246. doi:10.1126/science.1088166
168. Hamilton SR, Cook WJ, Gomathinayagam S, Burnina I, Bukowski J, Hopkins D, Schwartz S, Du M, Sharkey NJ, Bobrowicz P, Wildt S, Li H, Stadheim TA, Nett JH. 2013. Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology* **23**:1192–1203. doi:10.1093/glycob/cwt056
169. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, Bobrowicz P, Stadheim TA, Li H, Choi B-K, Hopkins D, Wischnewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S, Gerngross TU. 2006. Humanization of Yeast to Produce Complex Terminally Sialylated Glycoproteins. *Science (80-)* **313**:1441–1443. doi:10.1126/science.1130256
170. Hammond C, Braakman I, Helenius A. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci* **91**:913–917. doi:10.1073/pnas.91.3.913

171. Hammond C, Helenius A. 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**:41–52. doi:10.1083/jcb.126.1.41
172. Hampton RY, Gardner RG, Rine J. 1996. Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* **7**:2029–2044. doi:10.1091/mbc.7.12.2029
173. Harding HP, Zhang Y, Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**:271–274. doi:10.1038/16729
174. Hardwick KG, Boothroyd JC, Rudner AD, Pelham HR. 1992. Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J* **11**:4187–4195.
175. Harsay E, Bretscher A. 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**:297–310. doi:10.1083/jcb.131.2.297
176. Harty C, Strahl S, Römisch K. 2001. O -Mannosylation Protects Mutant Alpha-Factor Precursor from Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *Mol Biol Cell* **12**:1093–1101. doi:10.1091/mbc.12.4.1093
177. Haselbeck A, Schekman R. 1986. Interorganelle transfer and glycosylation of yeast invertase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2017–2021. doi:10.1073/pnas.83.7.2017
178. He W, Hu Z. 2012. The role of the Golgi-resident SPCA $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump in ionic homeostasis and neural function. *Neurochem Res* **37**:455–68. doi:10.1007/s11064-011-0644-6
179. Heider MR, Gu M, Duffy CM, Mirza AM, Marcotte LL, Walls AC, Farrall N, Hakhverdyan Z, Field MC, Rout MP, Frost A, Munson M. 2016. Subunit connectivity, assembly determinants and architecture of the yeast exocyst complex. *Nat Struct Mol Biol* **23**:59–66. doi:10.1038/nsmb.3146
180. Hendershot L, Bole D, Köhler G, Kearney JF. 1987. Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol* **104**:761–767. doi:10.1083/jcb.104.3.761
181. Herbert D, Phipps PJ, Strange RE. 1971. Chapter III Chemical Analysis of Microbial Cells. pp. 209–344. doi:10.1016/S0580-9517(08)70641-X
182. Herscovics A, Orlean P. 1993. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* **7**:540–550. doi:10.1096/fasebj.7.6.8472892
183. Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH. 1996. ER Degradation of a Misfolded Luminal Protein by the Cytosolic Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Science (80-)* **273**:1725–1728. doi:10.1126/science.273.5282.1725

184. Hirata R, Ohsumk Y, Nakano A, Kawasaki H, Suzuki K, Anraku Y. 1990. Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**:6726–6733.
185. Hirayama H, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y. 2007. O-Mannosylation is Required for Degradation of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Substrate Gas1*_p via the Ubiquitin/Proteasome Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **143**:555–567. doi:10.1093/jb/mvm249
186. Hirst J, Irving C, Borner GHH. 2013. Adaptor Protein Complexes AP-4 and AP-5: New Players in Endosomal Trafficking and Progressive Spastic Paraplegia. *Traffic* **14**:153–164. doi:10.1111/tra.12028
187. Hirst J, Miller SE, Taylor MJ, von Mollard GF, Robinson MS. 2004. EpsinR Is an Adaptor for the SNARE Protein Vti1b. *Mol Biol Cell* **15**:5593–5602. doi:10.1091/mbc.e04-06-0468
188. Hoflack B, Kornfeld S. 1985. Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem* **260**:12008–14.
189. Hoflack B., Kornfeld S. 1985. Lysosomal enzyme binding to mouse P388D1 macrophage membranes lacking the 215-kDa mannose 6-phosphate receptor: evidence for the existence of a second mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci* **82**:4428–4432. doi:10.1073/pnas.82.13.4428
190. Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. 2007. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**:29–45. doi:10.1016/S0076-6879(07)28002-4
191. Hollien J, Weissman JS. 2006. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science (80-)* **313**:104–107. doi:10.1126/science.1129631
192. Höning S, Sandoval I V, von Figura K. 1998. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* **17**:1304–14. doi:10.1093/emboj/17.5.1304
193. Hsu SC, Ting AE, Hazuka CD, Davanger S, Kenny JW, Kee Y, Scheller RH. 1996. The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* **17**:1209–19. doi:10.1016/s0896-6273(00)80251-2
194. Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH. 2000. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* **24**:61–5. doi:10.1038/71701
195. Huang S, Xing Y, Liu Y. 2019. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 in metabolic regulation and disease. *J Biol Chem* **294**:18726–18741. doi:10.1074/jbc.REV119.007036
196. Huber Damon, Boyd D, Xia Y, Olma MH, Gerstein M, Beckwith J. 2005. Use

of Thioredoxin as a Reporter To Identify a Subset of Escherichia coli Signal Sequences That Promote Signal Recognition Particle-Dependent Translocation. *J Bacteriol* **187**:2983–2991. doi:10.1128/JB.187.9.2983-2991.2005

197. Huber D., Cha M.-i., Debarbieux L, Planson A-G, Cruz N, Lopez G, Tasayco ML, Chaffotte A, Beckwith J. 2005. A selection for mutants that interfere with folding of Escherichia coli thioredoxin-1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci* **102**:18872–18877. doi:10.1073/pnas.0509583102
198. Huber R, Deisenhofer J, Colman PM, Matsushima M, Palm W. 1976. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* **264**:415–420. doi:10.1038/264415a0
199. Hutzler J, Schmid M, Bernard T, Henrissat B, Strahl S. 2007. Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci* **104**:7827–7832. doi:10.1073/pnas.0700374104
200. Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:403–17. doi:10.1007/s00253-010-2447-0
201. Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura MS, Anraku Y. 1994. MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. *Mol Cell Biol* **14**:8259–8271. doi:10.1128/mcb.14.12.8259
202. Iida K, Teng J, Cho T, Yoshikawa-Kimura S, Iida H. 2017. Post-translational processing and membrane translocation of the yeast regulatory Mid1 subunit of the Cch1/VGCC/NALCN cation channel family. *J Biol Chem* **292**:20570–20582. doi:10.1074/jbc.M117.810283
203. Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23–8.
204. Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* **3**:158–164. doi:10.1038/35055065
205. Jackson LP, Lewis M, Kent HM, Edeling MA, Evans PR, Duden R, Owen DJ. 2012. Molecular Basis for Recognition of Dilysine Trafficking Motifs by COPI. *Dev Cell* **23**:1255–1262. doi:10.1016/j.devcel.2012.10.017
206. Jackson M, Cohen-Doyle M, Peterson P, Williams D. 1994. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* (80-) **263**:384–387. doi:10.1126/science.8278813
207. Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N. 2009. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc* **4**:58–70. doi:10.1038/nprot.2008.213

208. Janowicz ZA, Melber K, Merckelbach A, Jacobs E, Harford N, Comberbach M, Hollenberg CP. 1991. Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **7**:431–443. doi:10.1002/yea.320070502
209. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T. 2002. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* **4**:134–139. doi:10.1038/ncb746
210. Jensen LT, Ajua-Alemanji M, Culotta VC. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem* **278**:42036–42040. doi:10.1074/jbc.M307413200
211. Jensen LT, Carroll MC, Hall MD, Harvey CJ, Beese SE, Culotta VC. 2009. Down-regulation of a manganese transporter in the face of metal toxicity. *Mol Biol Cell* **20**:2810–2819. doi:10.1091/mbc.e08-10-1084
212. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. 1995. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**:129–135. doi:10.1016/0092-8674(95)90241-4
213. Jessop CE, Chakravarthi S, Garbi N, Hämmerling GJ, Lovell S, Bulleid NJ. 2007. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J* **26**:28–40. doi:10.1038/sj.emboj.7601505
214. Jessop CE, Watkins RH, Simmons JJ, Tasab M, Bulleid NJ. 2009. Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J Cell Sci* **122**:4287–4295. doi:10.1242/jcs.059154
215. Jin Y, Sultana A, Gandhi P, Franklin E, Hamamoto S, Khan AR, Munson M, Schekman R, Weisman LS. 2011. Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev Cell* **21**:1156–70. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.009
216. Jørgensen MU, Emr SD, Winther JR. 1999. Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **260**:461–469. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00176.x
217. Joshi HJ, Narimatsu Y, Schjoldager KT, Tytgat HLP, Aebi M, Clausen H, Halim A. 2018. SnapShot: O-Glycosylation Pathways across Kingdoms. *Cell* **172**:632–632.e2. doi:10.1016/j.cell.2018.01.016
218. Junghans U, Waheed A, von Figura K. 1988. The ‘cation-dependent’ mannose 6-phosphate receptor binds ligands in the absence of divalent cations. *FEBS Lett* **237**:81–84. doi:10.1016/0014-5793(88)80176-5
219. Jungmann J, Munro S. 1998. Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha -1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J* **17**:423–434. doi:10.1093/emboj/17.2.423

220. Kang HA, Hong WK, Sohn JH, Choi ES, Rhee SK. 2001. Molecular characterization of the actin-encoding gene and the use of its promoter for a dominant selection system in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:734–741. doi:10.1007/s002530100605
221. Kang HA, Sohn J-H, Choi E-S, Chung BH, Yu M-H, Rhee S-K. 1998. Glycosylation of human α 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. *Yeast* **14**:371–381. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<371::AID-YEA231>3.0.CO;2-1
222. Kanik-Ennulat C, Montalvo E, Neff N. 1995. Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance. *Genetics* **140**:933–43.
223. Kappeler F, Klopfenstein DRC, Foguet M, Paccaud J-P, Hauri H-P. 1997. The Recycling of ERGIC-53 in the Early Secretory Pathway. *J Biol Chem* **272**:31801–31808. doi:10.1074/jbc.272.50.31801
224. Kelleher DJ, Gilmore R. 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* **16**:47–62. doi:10.1093/glycob/cwj066
225. Kim MW, Rhee SK, Kim JY, Shimma YI, Chiba Y, Jigami Y, Kang HA. 2004. Characterization of N-linked oligosaccharides assembled on secretory recombinant glucose oxidase and cell wall mannoproteins from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Glycobiology* **14**:243–251. doi:10.1093/glycob/cwh030
226. Kineth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF. 2007. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development 524–534. doi:10.1016/j.cell.2007.06.029
227. Klemm RW, Ejsing CS, Surma MA, Kaiser HJ, Gerl MJ, Sampaio JL, De Robillard Q, Ferguson C, Proszynski TJ, Shevchenko A, Simons K. 2009. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **185**:601–612. doi:10.1083/jcb.200901145
228. Klumperman J. 2011. Architecture of the Mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a005181–a005181. doi:10.1101/cshperspect.a005181
229. Knop M, Hauser N, Wolf DH. 1996. N-glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. *Yeast* **12**:1229–1238. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19960930)12:12<1229::AID-YEA15>3.0.CO;2-H
230. Koivu J, Myllylä R, Helaakoski T, Pihlajaniemi T, Tasanen K, Kivirikko KI. 1987. A single polypeptide acts both as the beta subunit of prolyl 4-hydroxylase and as a protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem* **262**:6447–6449.
231. Korennykh A V., Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, Stroud RM, Walter P. 2009. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* **457**:687–693. doi:10.1038/nature07661

232. Kreft SG, Wang L, Hochstrasser M. 2006. Membrane Topology of the Yeast Endoplasmic Reticulum-localized Ubiquitin Ligase Doa10 and Comparison with Its Human Ortholog TEB4 (MARCH-VI). *J Biol Chem* **281**:4646–4653. doi:10.1074/jbc.M512215200
233. Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R. 1998. COPII–cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**:187–190. doi:10.1038/34438
234. Kuge O, Dascher C, Orci L, Rowe T, Amherdt M, Plutner H, Ravazzola M, Tanigawa G, Rothman JE, Balch WE. 1994. Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol* **125**:51–65. doi:10.1083/jcb.125.1.51
235. Kuranda MJ, Robbins PW. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**:19758–67.
236. Kurtzman CP. 2011. A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolyomorpha*, the ascosporic state of *Candida parapolyomorpha*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**:455–62. doi:10.1007/s10482-011-9603-0
237. Kurtzman CP. 2005. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:973–976. doi:10.1099/ijls.0.63491-0
238. Kushnirov V V. 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**:857–60. doi:10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B
239. Kweon H-S, Beznoussenko G V., Micaroni M, Polishchuk RS, Trucco A, Martella O, Di Giandomenico D, Marra P, Fusella A, Di Pentima A, Berger EG, Geerts WJC, Koster AJ, Burger KNJ, Luini A, Mironov AA. 2004. Golgi Enzymes Are Enriched in Perforated Zones of Golgi Cisternae but Are Depleted in COPI Vesicles. *Mol Biol Cell* **15**:4710–4724. doi:10.1091/mbc.e03-12-0881
240. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–5.
241. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. 2007. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology* **22**:193–201. doi:10.1152/physiol.00050.2006
242. Laukens B, De Visscher C, Callewaert N. 2015. Engineering yeast for producing human glycoproteins: Where are we now? *Future Microbiol* **10**:21–34. doi:10.2217/fmb.14.104
243. Lee C, Goldberg J. 2010. Structure of Coatamer Cage Proteins and the Relationship among COPI, COPII, and Clathrin Vesicle Coats. *Cell* **142**:123–132. doi:10.1016/j.cell.2010.05.030
244. Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Démollière C, Duden R, Emr SD,

- Riezman H, Cosson P. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**:1199–1207. doi:10.1016/0092-8674(94)90011-6
245. Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B, Ballew N, Bobrowicz P, Choi B-K, Cook WJ, Cukan M, Houston-Cummings NR, Davidson R, Gong B, Hamilton SR, Hoopes JP, Jiang Y, Kim N, Mansfield R, Nett JH, Rios S, Strawbridge R, Wildt S, Gerngross TU. 2006. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* **24**:210–215. doi:10.1038/nbt1178
 246. Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. 2001. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* **276**:29515–9. doi:10.1074/jbc.M103944200
 247. Li S, Spooner RA, Hampton RY, Lord JM, Roberts LM. 2012. Cytosolic Entry of Shiga-Like Toxin A Chain from the Yeast Endoplasmic Reticulum Requires Catalytically Active Hrd1p. *PLoS One* **7**:e41119. doi:10.1371/journal.pone.0041119
 248. Lijnen HR, Collen D. 1991. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Haemost* **66**:88–110.
 249. Lippincott-Schwartz J, Phair RD. 2010. Lipids and Cholesterol as Regulators of Traffic in the Endomembrane System. *Annu Rev Biophys* **39**:559–578. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131357
 250. Lisanti MP, Caras IW, Davitz MA, Rodriguez-Boulán E. 1989. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **109**:2145–56. doi:10.1083/jcb.109.5.2145
 251. Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y, Cunningham KW. 2000. A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol Cell Biol* **20**:6686–6694. doi:10.1128/mcb.20.18.6686-6694.2000
 252. Lommel M, Strahl S. 2009. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**:816–828. doi:10.1093/glycob/cwp066
 253. Loukin S, Kung C. 1995. Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. *J Cell Biol* **131**:1025–1037. doi:10.1083/jcb.131.4.1025
 254. LUIRINK J. 2004. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.03.013
 255. Luk EE, Culotta VC. 2001. Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p. *J Biol Chem* **276**:47556–47562. doi:10.1074/jbc.M108923200
 256. Luo G, Zhang J, Guo W. 2014. The role of Sec3p in secretory vesicle targeting and exocyst complex assembly. *Mol Biol Cell* **25**:3813–22. doi:10.1091/mbc.E14-04-0907

257. Luoni L, Meneghelli S, Bonza MC, DeMichelis MI. 2004. Auto-inhibition of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane Ca^{2+} -ATPase involves an interaction of the N-terminus with the small cytoplasmic loop. *FEBS Lett* **574**:20–24. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.003
258. Lussier M, Sdicu A-M, Bussey H. 1999. The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1426**:323–334. doi:10.1016/S0304-4165(98)00133-0
259. Ma W, Goldberg J. 2013. Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatomer. *EMBO J* **32**:926–937. doi:10.1038/emboj.2013.41
260. Maerkisch U, Reuter G, Stateva L, Venkov P. 1983. Mannan structure analysis of the fragile *Saccharomyces cerevisiae* mutant VY1160. *Int J Biochem* **15**:1373–1377. doi:10.1016/0020-711X(83)90029-0
261. Malkus P, Jiang F, Schekman R. 2002. Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol* **159**:915–921. doi:10.1083/jcb.200208074
262. Malsam J, Sollner TH. 2011. Organization of SNAREs within the Golgi Stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a005249–a005249. doi:10.1101/cshperspect.a005249
263. Manfrão-Netto JHC, Gomes AMV, Parachin NS. 2019. Advances in Using *Hansenula polymorpha* as Chassis for Recombinant Protein Production. *Front Bioeng Biotechnol* **7**. doi:10.3389/fbioe.2019.00094
264. Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF, Subramani S. 2010. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol* **188**:537–546. doi:10.1083/jcb.200911149
265. Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD. 1994. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**:579–586. doi:10.1016/0092-8674(94)90219-4
266. Marsh BJ, Volkmann N, McIntosh JR, Howell KE. 2004. Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci* **101**:5565–5570. doi:10.1073/pnas.0401242101
267. Martin-Urdiroz M, Deeks MJ, Horton CG, Dawe HR, Jourdain I. 2016. The Exocyst Complex in Health and Disease. *Front cell Dev Biol* **4**:24. doi:10.3389/fcell.2016.00024
268. Martin DC, Kim H, Mackin NA, Maldonado-Báez L, Evangelista CC, Beaudry VG, Dudgeon DD, Naiman DQ, Erdman SE, Cunningham KW. 2011. New regulators of a high affinity Ca^{2+} influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. *J Biol Chem* **286**:10744–10754. doi:10.1074/jbc.M110.177451

269. Martínez-Menárguez JA, Prekeris R, Oorschot VMJ, Scheller R, Slot JW, Geuze HJ, Klumperman J. 2001. Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J Cell Biol* **155**:1213–1224. doi:10.1083/jcb.200108029
270. Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**:3445–58. doi:10.1101/gad.11.24.3445
271. Matlack KE, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA. 1999. BiP Acts as a Molecular Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro- α Factor across the ER Membrane. *Cell* **97**:553–564. doi:10.1016/S0092-8674(00)80767-9
272. Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM. 2002. An Osmotically Induced Cytosolic Ca²⁺ Transient Activates Calcineurin Signaling to Mediate Ion Homeostasis and Salt Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**:33075–33080. doi:10.1074/jbc.M205037200
273. McCracken AA, Brodsky JL. 1996. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* **132**:291–298. doi:10.1083/jcb.132.3.291
274. Melnick LM, Turner BG, Puma P, Price-Tillotson B, Salvato KA, Dumais DR, Moir DT, Broeze RJ, Avgerinos GC. 1990. Characterization of a nonglycosylated single chain urinary plasminogen activator secreted from yeast. *J Biol Chem* **265**:801–807.
275. Meyer H-A, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, Kalies K-U, Hartmann E. 2000. Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**:14550–14557. doi:10.1074/jbc.275.19.14550
276. Michaelis S. 1993. STE6, the yeast α -factor transporter. *Semin Cell Biol* **4**:17–27. doi:10.1006/scel.1993.1003
277. Miller E, Antonny B, Hamamoto S, Schekman R. 2002. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* **21**:6105–6113. doi:10.1093/emboj/cdf605
278. Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. 2003. Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell* **114**:497–509. doi:10.1016/S0092-8674(03)00609-3
279. Mills IG, Praefcke GJK, Vallis Y, Peter BJ, Olesen LE, Gallop JL, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT. 2003. EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* **160**:213–22. doi:10.1083/jcb.200208023
280. Mills RF, Doherty ML, López-Marqués RL, Weimar T, Dupree P, Palmgren MG, Pittman JK, Williams LE. 2008. ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays

a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146**:116–28. doi:10.1104/pp.107.110817

- 281. Mironov AA, Beznoussenko G V., Polishchuk RS, Trucco A. 2005. Intra-Golgi transport: A way to a new paradigm? *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1744**:340–350. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.03.005
- 282. Mironov AA, Mironov AA, Beznoussenko G V, Trucco A, Lupetti P, Smith JD, Geerts WJ., Koster AJ, Burger KN., Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Luini A. 2003. ER-to-Golgi Carriers Arise through Direct En Bloc Protrusion and Multistage Maturation of Specialized ER Exit Domains. *Dev Cell* **5**:583–594. doi:10.1016/S1534-5807(03)00294-6
- 283. Mironov AA, Weidman P, Luini A. 1997. Variations on the Intracellular Transport Theme: Maturing Cisternae and Trafficking Tubules. *J Cell Biol* **138**:481–484. doi:10.1083/jcb.138.3.481
- 284. Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**:289–98. doi:10.1006/jmbi.1996.0399
- 285. Misra S, Puertollano R, Kato Y, Bonifacino JS, Hurley JH. 2002. Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* **415**:933–937. doi:10.1038/415933a
- 286. Mizunuma M, Hirata D, Miyahara K, Tsuchiya E, Miyakawa T. 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* **392**:303–306. doi:10.1038/32695
- 287. Molinari M, Helenius A. 2000. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* **288**:331–333. doi:10.1126/science.288.5464.331
- 288. Molinari M, Helenius A. 1999. Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**:90–93. doi:10.1038/47062
- 289. Moo WK, Eun JK, Kim JY, Park JS, Oh DB, Shimma YI, Chiba Y, Jigami Y, Sang KR, Hyun AK. 2006. Functional characterization of the Hansenula polymorpha HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol Chem* **281**:6261–6272. doi:10.1074/jbc.M508507200
- 290. Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T. 1996. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells* **1**:803–817. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-274.x
- 291. Mossessova E, Bickford LC, Goldberg J. 2003. SNARE Selectivity of the COPII Coat. *Cell* **114**:483–495. doi:10.1016/S0092-8674(03)00608-1
- 292. Mothes W, Heinrich SU, Graf R, Nilsson I, von Heijne G, Brunner J, Rapoport

- TA. 1997. Molecular Mechanism of Membrane Protein Integration into the Endoplasmic Reticulum. *Cell* **89**:523–533. doi:10.1016/S0092-8674(00)80234-2
293. Movsichoff F, Castro OA, Parodi AJ. 2005. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* ER α -Mannosidase: A Reevaluation of the Role of the Enzyme on ER-associated Degradation. *Mol Biol Cell* **16**:4714–4724. doi:10.1091/mbc.e05-03-0246
 294. Müller EM, Locke EG, Cunningham KW. 2001. Differential regulation of two Ca^{2+} influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**:1527–1538.
 295. Muller EM, Mackin NA, Erdman SE, Cunningham KW. 2003. Fig1p facilitates Ca^{2+} influx and cell fusion during mating of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:38461–38469. doi:10.1074/jbc.M304089200
 296. Muñiz M, Nuoffer C, Hauri H-P, Riezman H. 2000. The Emp24 Complex Recruits a Specific Cargo Molecule into Endoplasmic Reticulum–Derived Vesicles. *J Cell Biol* **148**:925–930. doi:10.1083/jcb.148.5.925
 297. Munro S. 2001. What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett* **498**:223–227. doi:10.1016/S0014-5793(01)02488-7
 298. Munro S, Pelham HRB. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899–907. doi:10.1016/0092-8674(87)90086-9
 299. Nakajima T, Ballou CE. 1975. Yeast manno-protein biosynthesis: solubilization and selective assay of four mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:3912–3916. doi:10.1073/pnas.72.10.3912
 300. Nakamura N, Yamazaki S, Sato K, Nakano A, Sakaguchi M, Mihara K. 1998. Identification of Potential Regulatory Elements for the Transport of Emp24p. *Mol Biol Cell* **9**:3493–3503. doi:10.1091/mbc.9.12.3493
 301. Nakatsukasa K, Okada S, Umebayashi K, Fukuda R, Nishikawa S, Endo T. 2004. Roles of O -Mannosylation of Aberrant Proteins in Reduction of the Load for Endoplasmic Reticulum Chaperones in Yeast. *J Biol Chem* **279**:49762–49772. doi:10.1074/jbc.M403234200
 302. Nakayama K, Maeda Y, Jigami Y. 2003. Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4,6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *Glycobiology* **13**:673–680. doi:10.1093/glycob/cwg099
 303. Neiman AM, Mhaikar V, Manus V, Galibert F, Dean N. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* HOC1, a Suppressor of *pkc1*, Encodes a Putative Glycosyltransferase. *Genetics* **145**:637 LP – 645.
 304. Nett JH, Gomathinayagam S, Hamilton SR, Gong B, Davidson RC, Du M, Hopkins D, Mitchell T, Mallem MR, Nylen A, Shaikh SS, Sharkey N, Barnard GC,

- Copeland V, Liu L, Evers R, Li Y, Gray PM, Lingham RB, Visco D, Forrest G, DeMartino J, Linden T, Potgieter TI, Wildt S, Stadheim TA, d'Anjou M, Li H, Sethuraman N. 2012. Optimization of erythropoietin production with controlled glycosylation-PEGylated erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **157**:198–206. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.11.002
305. Neubert P, Strahl S. 2016. Protein O-mannosylation in the early secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **41**:100–108. doi:10.1016/j.ceb.2016.04.010
306. Newell-Litwa K, Seong E, Burmeister M, Faundez V. 2007. Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci* **120**:531–541. doi:10.1242/jcs.03365
307. Ng DTW, Brown JD, Walter P. 1996. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**:269–278. doi:10.1083/jcb.134.2.269
308. Nickel W. 2011. The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic* **12**:799–805. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01187.x
309. Nishimura N, Balch W. 1997. A Di-Acidic Signal Required for Selective Export from the Endoplasmic Reticulum. *Science (80-)* **277**:556–558. doi:10.1126/science.277.5325.556
310. Novick P, Field C, Schekman R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**:205–15. doi:10.1016/0092-8674(80)90128-2
311. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. 2001. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* **153**:1011–1022. doi:10.1083/jcb.153.5.1011
312. Odani T, Shimma Y, Tanaka A, Jigami Y. 1996. Cloning and analysis of the MNN4 gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**:805–10.
313. Ogata S, Fukuda M. 1994. Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **269**:5210–7.
314. Olson LJ, Peterson FC, Castonguay A, Bohnsack RN, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Volkman BF, Dahms NM. 2010. Structural basis for recognition of phosphodiester-containing lysosomal enzymes by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci* **107**:12493–12498. doi:10.1073/pnas.1004232107
315. Orci Lelio, Amherdt M, Ravazzola M, Perrelet A, Rothman JE. 2000. Exclusion of Golgi Residents from Transport Vesicles Budding from Golgi Cisternae in Intact Cells. *J Cell Biol* **150**:1263–1270. doi:10.1083/jcb.150.6.1263
316. Orci L, Ravazzola M, Meda P, Holcomb C, Moore HP, Hicke L, Schekman R.

1991. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci* **88**:8611–8615.
doi:10.1073/pnas.88.19.8611
317. Orci L., Ravazzola M, Volchuk A, Engel T, Gmachl M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE. 2000. Anterograde flow of cargo across the Golgi stack potentially mediated via bidirectional “percolating” COPI vesicles. *Proc Natl Acad Sci* **97**:10400–10405. doi:10.1073/pnas.190292497
318. Orlean P. 1990. Dolichol phosphate mannanose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, O mannosylation, and N glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**:5796–5805. doi:10.1128/MCB.10.11.5796
319. Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B. 2005. PROTEIN TRANSLOCATION BY THE SEC61/SECY CHANNEL. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:529–550. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133214
320. Ou W-J, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJM. 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**:771–776. doi:10.1038/364771a0
321. Owen DJ, Collins BM, Evans PR. 2004. ADAPTORS FOR CLATHRIN COATS: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:153–191. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.104543
322. Packeiser AN, Urakov VN, Polyakova YA, Shimanova NI, Shcherbukhin VD, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. 1999. A novel vacuolar protein encoded by SSU21 / MCD4 is involved in cell wall integrity in yeast. *Yeast* **15**:1485–1501. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1485::AID-YEA477>3.0.CO;2-4
323. Paczkowski JE, Richardson BC, Strassner AM, Fromme JC. 2012. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J* **31**:4191–4203. doi:10.1038/emboj.2012.268
324. Pagano A, Letourneur F, Garcia-Estefania D, Carpentier J-L, Orci L, Paccaud J-P. 1999. Sec24 Proteins and Sorting at the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **274**:7833–7840. doi:10.1074/jbc.274.12.7833
325. Paidhungat M, Garrett S. 1998. Cdc1 is required for growth and Mn²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**:1777–1786.
326. Paidhungat M, Garrett S. 1997. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the cdc1(Ts) growth defect. *Mol Cell Biol* **17**:6339–6347. doi:10.1128/mcb.17.11.6339
327. Pakdel M, von Blume J. 2018. Exploring new routes for secretory protein export from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* **29**:235–240. doi:10.1091/mbc.E17-02-0117

328. Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* **167**:699–709. doi:10.1083/jcb.200407094
329. Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y. 2001. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7801–5. doi:10.1073/pnas.141036198
330. Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA. 1995. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**:561–570. doi:10.1016/0092-8674(95)90077-2
331. Paris S, Béraud-Dufour S, Robineau S, Bigay J, Antonny B, Chabre M, Chardin P. 1997. Role of Protein-Phospholipid Interactions in the Activation of ARF1 by the Guanine Nucleotide Exchange Factor Arno. *J Biol Chem* **272**:22221–22226. doi:10.1074/jbc.272.35.22221
332. Parodi AJ. 1999. Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1426**:287–295. doi:10.1016/S0304-4165(98)00130-5
333. Parodi AJ. 1979. Biosynthesis of yeast mannoproteins. Synthesis of mannan outer chain and of dolichol derivatives. *J Biol Chem* **254**:8343–8352.
334. Patterson GH, Hirschberg K, Polishchuk RS, Gerlich D, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. 2008. Transport through the Golgi Apparatus by Rapid Partitioning within a Two-Phase Membrane System. *Cell* **133**:1055–1067. doi:10.1016/j.cell.2008.04.044
335. Paulick MG, Bertozzi CR. 2008. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins †. *Biochemistry* **47**:6991–7000. doi:10.1021/bi8006324
336. Peiter E, Fischer M, Sidaway K, Roberts SK, Sanders D. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett* **579**:5697–5703. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.058
337. Pelham HR., Rothman JE. 2000. The Debate about Transport in the Golgi—Two Sides of the Same Coin? *Cell* **102**:713–719. doi:10.1016/S0092-8674(00)00060-X
338. Perlman D, Halvorson HO. 1983. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol* **167**:391–409. doi:10.1016/S0022-2836(83)80341-6
339. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjær A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Røigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK. 1997. Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-associated Protein Affinity Chromatography. *J Biol Chem* **272**:3599–3605. doi:10.1074/jbc.272.6.3599

340. Pfeffer SR. 2010. How the Golgi works: A cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci* **107**:19614–19618. doi:10.1073/pnas.1011016107
341. Pietro ES, Capestrano M, Polishchuk E V., DiPentima A, Trucco A, Zizza P, Mariggio S, Pulvirenti T, Salles M, Tete S, Mironov AA, Leslie CC, Corda D, Luini A, Polishchuk RS. 2009. Group IV Phospholipase A2 α Controls the Formation of Inter-Cisternal Continuities Involved in Intra-Golgi Transport. *PLoS Biol* **7**:e1000194. doi:10.1371/journal.pbio.1000194
342. Piper P. 1996. Isolation of Yeast DNA In: Evans IH, editor. *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 103–107. doi:10.1385/0-89603-319-8:103
343. Pittman JK. 2011. Vacuolar Ca(2+) uptake. *Cell Calcium* **50**:139–46. doi:10.1016/j.ceca.2011.01.004
344. Plath K, Rapoport TA. 2000. Spontaneous Release of Cytosolic Proteins from Posttranslational Substrates before Their Transport into the Endoplasmic Reticulum. *J Cell Biol* **151**:167–178. doi:10.1083/jcb.151.1.167
345. Plemper RK, Bordallo J, Deak PM, Taxis C, Hitt R, Wolf DH. 1999. Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* **112** (Pt 2):4123–34.
346. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. 2019. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem* **294**:2098–2108. doi:10.1074/jbc.REV118.002804
347. Polishchuk RS, Polishchuk E V, Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, Mironov AA. 2000. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol* **148**:45–58. doi:10.1083/jcb.148.1.45
348. Polishchuk E V, Di Pentima A, Luini A, Polishchuk RS. 2003. Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol Biol Cell* **14**:4470–85. doi:10.1091/mbc.e03-01-0033
349. Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* **20**:7893–7902. doi:10.1128/mcb.20.21.7893-7902.2000
350. Powers J, Barlowe C. 2002. Erv14p Directs a Transmembrane Secretory Protein into COPII-coated Transport Vesicles. *Mol Biol Cell* **13**:880–891. doi:10.1091/mbc.01-10-0499
351. Pozniakovsky AI, Knorre DA, Markova O V, Hyman AA, Skulachev VP, Severin FF. 2005. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* **168**:257–269. doi:10.1083/jcb.200408145

352. Proszynski TJ, Simons K, Bagnat M. 2004. O -Glycosylation as a Sorting Determinant for Cell Surface Delivery in Yeast. *Mol Biol Cell* **15**:1533–1543. doi:10.1091/mbc.e03-07-0511
353. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D’Agostin DM, Wu S, Bird GS. 2017. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys acta Mol cell Res* **1864**:900–906. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.028
354. Quan EM, Kamiya Y, Kamiya D, Denic V, Weibezahn J, Kato K, Weissman JS. 2008. Defining the Glycan Destruction Signal for Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Mol Cell Biol* **32**:870–877. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.017
355. Rabinovich E, Kerem A, Fröhlich K-U, Diamant N, Bar-Nun S. 2002. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a Cytosolic Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. *Mol Cell Biol* **22**:626–634. doi:10.1128/MCB.22.2.626-634.2002
356. Rabouille C. 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol* **27**:230–240. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.007
357. Rabouille C, Malhotra V, Nickel W. 2012. Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci* **125**:5251–5255. doi:10.1242/jcs.103630
358. Ramsay LM, Gadd GM. 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett* **152**:293–298. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10442.x
359. Rapoport TA, Blobel Gün. 1986. Protein Translocation Across and Integration into Membrane. *Crit Rev Biochem* **20**:73–137. doi:10.3109/10409238609115901
360. Rapoport TA, Li L, Park E. 2017. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **33**:369–390. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060439
361. Raschke WC, Kern KA, Antalis C, Ballou CE. 1973. Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants. *J Biol Chem* **248**:4660–4666.
362. Ravid T, Kreft SG, Hochstrasser M. 2006. Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *EMBO J* **25**:533–543. doi:10.1038/sj.emboj.7600946
363. Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**:1389–1402. doi:10.1091/mbc.3.12.1389
364. Rayner JC, Munro S. 1998. Identification of the MNN2 and MNN5

Mannosyltransferases Required for Forming and Extending the Mannose Branches of the Outer Chain Mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**:26836–26843. doi:10.1074/jbc.273.41.26836

365. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. 2007. LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* **131**:770–783. doi:10.1016/j.cell.2007.10.018
366. Reddi AR, Jensen LT, Culotta VC. 2009. Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Rev* **109**:4722–4732. doi:10.1021/cr900031u
367. Ren X, Farías GG, Canagarajah BJ, Bonifacino JS, Hurley JH. 2013. Structural Basis for Recruitment and Activation of the AP-1 Clathrin Adaptor Complex by Arf1. *Cell* **152**:755–767. doi:10.1016/j.cell.2012.12.042
368. Ricardo S, Lehmann R. 2009. An ABC transporter controls export of a *Drosophila* germ cell attractant. *Science* **323**:943–6. doi:10.1126/science.1166239
369. Rigamonti M, Groppi S, Belotti F, Ambrosini R, Filippi G, Martegani E, Tisi R. 2015. Hypotonic stress-induced calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae* involves TRP-like transporters on the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Calcium* **57**:57–68. doi:10.1016/j.ceca.2014.12.003
370. Robinson MS. 2015. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* **16**:1210–1238. doi:10.1111/tra.12335
371. Romero PA, Lussier M, Veronneau S, Sdicu A-M, Herscovics A, Bussey H. 1999. Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of -1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* **9**:1045–1051. doi:10.1093/glycob/9.10.1045
372. Rose MD, Misra LM, Vogel JP. 1989. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**:1211–1221. doi:10.1016/0092-8674(89)90058-5
373. Rosenberg IM. 2006. Protein Analysis and Purification. Boston, MA: Birkhäuser Boston. doi:10.1007/b138330
374. Rothman JE. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**:55–63. doi:10.1038/372055a0
375. Rothman JE, Wieland FT. 1996. Protein Sorting by Transport Vesicles. *Science (80-)* **272**:227–234. doi:10.1126/science.272.5259.227
376. Rubenstein EM, Kreft SG, Greenblatt W, Swanson R, Hochstrasser M. 2012. Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* **197**:761–773. doi:10.1083/jcb.201203061
377. Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow

- LS, Mao JI, Moir DT. 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* **58**:133–45. doi:10.1016/0092-8674(89)90410-8
378. Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T. 1998. Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle α -dystroglycan. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1425**:599–606. doi:10.1016/S0304-4165(98)00114-7
379. Sato K, Sato M, Nakano A. 2001. Rer1p, a Retrieval Receptor for Endoplasmic Reticulum Membrane Proteins, Is Dynamically Localized to the Golgi Apparatus by Coatamer. *J Cell Biol* **152**:935–944. doi:10.1083/jcb.152.5.935
380. Schiestl RH, Gietz RD. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**:339–346. doi:10.1007/BF00340712
381. Schmidt JA, Brown WJ. 2009. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 regulates Golgi complex structure and function. *J Cell Biol* **186**:211–218. doi:10.1083/jcb.200904147
382. Schoberer J, Strasser R. 2018. Plant glyco-biotechnology. *Semin Cell Dev Biol* **80**:133–141. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.005
383. Schoebel S, Mi W, Stein A, Ovchinnikov S, Pavlovicz R, DiMaio F, Baker D, Chambers MG, Su H, Li D, Rapoport TA, Liao M. 2017. Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature* **548**:352–355. doi:10.1038/nature23314
384. Schrag JD, Bergeron JJM, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY, Cygler M. 2001. The Structure of Calnexin, an ER Chaperone Involved in Quality Control of Protein Folding. *Mol Cell* **8**:633–644. doi:10.1016/S1097-2765(01)00318-5
385. Schroder-Kohne S, Letourneur F, Riezman H. 1998. Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport. *J Cell Sci* **111**:3459 LP – 3470.
386. Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HRB. 1990. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**:1349–1357. doi:10.1016/0092-8674(90)90698-E
387. Serafini T, Orci L, Amherdt M, Brunner M, Kahn RA, Rothmant JE. 1991. ADP-Ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**:239–253. doi:10.1016/0092-8674(91)90176-Y
388. Sharma CB, Babczinski P, Lehle L, Tanner W. 1974. The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **46**:35–41. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03594.x
389. Shenkman M, Groisman B, Ron E, Avezov E, Hendershot LM, Lederkremer GZ. 2013. A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway

- involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins. *J Biol Chem* **288**:2167–2178. doi:10.1074/jbc.M112.438275
390. Shibuya A, Margulis N, Christiano R, Walther TC, Barlowe C. 2015. The Erv41–Erv46 complex serves as a retrograde receptor to retrieve escaped ER proteins. *J Cell Biol* **208**:197–209. doi:10.1083/jcb.201408024
 391. Shitamukai A, Hirata D, Sonobe S, Miyakawa T. 2004. Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:3651–3661. doi:10.1074/jbc.M306098200
 392. Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569–572. doi:10.1038/42408
 393. Sivaram MVS, Saporita JA, Furgason MLM, Boettcher AJ, Munson M. 2005. Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* **44**:6302–11. doi:10.1021/bio48008z
 394. Skowronek MH, Hendershot LM, Haas IG. 1998. The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1574–1578. doi:10.1073/pnas.95.4.1574
 395. Smalheiser NR, Haslam SM, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A. 1998. Structural Analysis of Sequences O-Linked to Mannose Reveals a Novel Lewis X Structure in Cranin (Dystroglycan) Purified from Sheep Brain. *J Biol Chem* **273**:23698–23703. doi:10.1074/jbc.273.37.23698
 396. Smith RA, Duncan MJ, Moir DT. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* **229**:1219–24. doi:10.1126/science.3939723
 397. Snyder NA, Stefan CP, Soroudi CT, Kim A, Evangelista C, Cunningham KW. 2017. H⁺ and Pi Byproducts of Glycosylation Affect Ca²⁺ Homeostasis and Are Retrieved from the Golgi Complex by Homologs of TMEM165 and XPR1. *G3 (Bethesda)* **7**:3913–3924. doi:10.1534/g3.117.300339
 398. Sohn JH, Choi ES, Kim CH, Agaphonov MO, Ter-Avanesyan MD, Rhee JS, Rhee SK. 1996. A novel autonomously replicating sequence (ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *J Bacteriol* **178**:4420–4428.
 399. Soldà T, Galli C, Kaufman RJ, Molinari M. 2007. Substrate-Specific Requirements for UGT1-Dependent Release from Calnexin. *Mol Cell* **27**:238–249. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.032
 400. Soldà T, Garbi N, Hämmerling GJ, Molinari M. 2006. Consequences of ERp57 Deletion on Oxidative Folding of Obligate and Facultative Clients of the Calnexin Cycle. *J Biol Chem* **281**:6219–6226. doi:10.1074/jbc.M513595200
 401. Sommer T, Jentsch S. 1993. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* **365**:176–179. doi:10.1038/365176a0

402. Son SM, Cha M-Y, Choi Heesun, Kang S, Choi Hyunjung, Lee M-S, Park SA, Mook-Jung I. 2016. Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy* **12**:784–800. doi:10.1080/15548627.2016.1159375
403. Sousa MC, Ferrero-Garcia MA, Parodi AJ. 1992. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* **31**:97–105. doi:10.1021/bi00116a015
404. Springer S, Schekman R. 1998. Nucleation of COPII Vesicular Coat Complex by Endoplasmic Reticulum to Golgi Vesicle SNAREs. *Science (80-)* **281**:698–700. doi:10.1126/science.281.5377.698
405. Staehelin LA, Kang B-H. 2008. Nanoscale Architecture of Endoplasmic Reticulum Export Sites and of Golgi Membranes as Determined by Electron Tomography. *Plant Physiol* **147**:1454–1468. doi:10.1104/pp.108.120618
406. Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE. 2006. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* **439**:234–238. doi:10.1038/nature04339
407. Stalder D, Gershlick DC. 2020. Direct trafficking pathways from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *Semin Cell Dev Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2020.04.001
408. Starr TL, Pagant S, Wang C-W, Schekman R. 2012. Sorting Signals That Mediate Traffic of Chitin Synthase III between the TGN/Endosomes and to the Plasma Membrane in Yeast. *PLoS One* **7**:e46386. doi:10.1371/journal.pone.0046386
409. Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* **13**:798–803. doi:10.1101/gad.13.7.798
410. Stathopoulos AM, Cyert MS. 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* **11**:3432–44. doi:10.1101/gad.11.24.3432
411. Steel GJ, Fullerton DM, Tyson JR, Stirling CJ. 2004. Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* **303**:98–101. doi:10.1126/science.1092287
412. Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:513–525. doi:10.1038/nrm2728
413. Steringer JP, Bleicken S, Andreas H, Zacherl S, Laussmann M, Temmerman K, Contreras FX, Bharat TAM, Lechner J, Müller H-M, Briggs JAG, García-Sáez AJ, Nickel W. 2012. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P₂)-dependent Oligomerization of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Triggers the Formation of a Lipidic Membrane Pore Implicated in Unconventional Secretion. *J Biol Chem* **287**:27659–27669. doi:10.1074/jbc.M112.381939

414. Strahl-Bolsinger S, Immervoll T, Deutzmann R, Tanner W. 1993. PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* **90**:8164–8168. doi:10.1073/pnas.90.17.8164
415. Strahl-Bolsinger S, Scheinost A. 1999. Transmembrane Topology of Pmt1p, a Member of an Evolutionarily Conserved Family of Protein O - Mannosyltransferases. *J Biol Chem* **274**:9068–9075. doi:10.1074/jbc.274.13.9068
416. Strayle J, Pozzan T, Rudolph HK. 1999. Steady-state free Ca(2+) in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *EMBO J* **18**:4733–4743. doi:10.1093/emboj/18.17.4733
417. Sudbrak R, Brown J, Dobson-Stone C, Carter S, Ramser J, White J, Healy E, Dissanayake M, Larrègue M, Perrussel M, Lehrach H, Munro CS, Strachan T, Burge S, Hovnanian A, Monaco AP. 2000. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum Mol Genet* **9**:1131–1140. doi:10.1093/hmg/9.7.1131
418. Suh S-O, Zhou JJ. 2010. Methylophilic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. *FEMS Yeast Res* no-no. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00634.x
419. Sun Z, Brodsky JL. 2019. Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol* **218**:3171–3187. doi:10.1083/jcb.201906047
420. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5105–10. doi:10.1073/pnas.93.10.5105
421. Sütterlin C, Doering TL, Schimmöller F, Schröder S, Riezman H. 1997. Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J Cell Sci* **110**:2703–2714.
422. Sweet DJ, Pelham HR. 1992. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J* **11**:423–432.
423. Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF. 2000. Diversity and regulation of plant Ca2+ pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:433–62. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.433
424. Tan JZA, Gleeson PA. 2019. Cargo Sorting at the trans-Golgi Network for Shunting into Specific Transport Routes: Role of Arf Small G Proteins and Adaptor Complexes. *Cells* **8**:531. doi:10.3390/cells8060531
425. Temmerman K, Ebert AD, Müller H-M, Sinning I, Tews I, Nickel W. 2008. A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic* **9**:1204–17. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00749.x

426. TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P. 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**:6483–94.
427. TerBush DR, Novick P. 1995. Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **130**:299–312. doi:10.1083/jcb.130.2.299
428. Tessier DC, Dignard D, Zapun A, Radominska-Pandya A, Parodi AJ, Bergeron JJM, Thomas DY. 2000. Cloning and characterization of mammalian UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme. *Glycobiology* **10**:403–412. doi:10.1093/glycob/10.4.403
429. Thines L, Deschamps A, Sengottaiyan P, Savel O, Stribny J, Morsomme P. 2018. The yeast protein Gdt1p transports Mn²⁺ ions and thereby regulates manganese homeostasis in the Golgi. *J Biol Chem* **293**:8048–8055. doi:10.1074/jbc.RA118.002324
430. Tian G, Ropelewski P, Nemet I, Lee R, Lodowski KH, Imanishi Y. 2014. An unconventional secretory pathway mediates the cilia targeting of peripherin/rds. *J Neurosci* **34**:992–1006. doi:10.1523/JNEUROSCI.3437-13.2014
431. Tiels P, Baranova E, Piens K, De Visscher C, Pynaert G, Nerinckx W, Stout J, Fudalej F, Hulpiau P, Tännler S, Geysens S, Van Hecke A, Valevska A, Vervecken W, Remaut H, Callewaert N. 2012. A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate modification and improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes. *Nat Biotechnol* **30**:1225–1231. doi:10.1038/nbt.2427
432. Tisi R, Rigamonti M, Groppi S, Belotti F. 2016. Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. *AIMS Mol Sci* **3**:505–549. doi:10.3934/molsci.2016.4.505
433. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350–4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
434. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. 2000. Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. *Cell* **101**:249–258. doi:10.1016/S0092-8674(00)80835-1
435. Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F. 1991. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* **266**:22807–22817.
436. Trombetta ES, Helenius A. 2000. Conformational Requirements for Glycoprotein Reglucosylation in the Endoplasmic Reticulum. *J Cell Biol* **148**:1123–1130. doi:10.1083/jcb.148.6.1123
437. Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Pentima A Di, Fusella A, Giandomenico

- D Di, Pietro ES, Beznoussenko G V., Polishchuk E V., Baldassarre M, Buccione R, Geerts WJC, Koster AJ, Burger KNJ, Mironov AA, Luini A. 2004. Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol* **6**:1071–1081. doi:10.1038/ncb1180
438. Tu L, Chen L, Banfield DK. 2012. A Conserved N-terminal Arginine-Motif in GOLPH3-Family Proteins Mediates Binding to Coatamer. *Traffic* **13**:1496–1507. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01403.x
439. Tu L, Tai WCS, Chen L, Banfield DK. 2008. Signal-Mediated Dynamic Retention of Glycosyltransferases in the Golgi. *Science (80-)* **321**:404–407. doi:10.1126/science.1159411
440. Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volkmer J, Zimmermann R. 2000. Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci* **97**:7214–7219. doi:10.1073/pnas.97.13.7214
441. van Anken E, Pincus D, Coyle S, Aragón T, Osman C, Lari F, Gómez Puerta S, Korennykh A V, Walter P. 2014. Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. *Elife* **3**. doi:10.7554/eLife.05031
442. Van Der Heide M, Hollenberg C, Van Der Klei I, Veenhuis M. 2002. Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**:487–494. doi:10.1007/s00253-001-0907-2
443. van Dijk R, Faber KN, Hammond AT, Glick BS, Veenhuis M, Kiel JA. 2001. Tagging *Hansenula polymorpha* genes by random integration of linear DNA fragments (RALF). *Mol Genet Genomics* **266**:646–56. doi:10.1007/s004380100584
444. Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J. 2011. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**. doi:10.1101/cshperspect.a004184
445. Vanoevelen J, Dode L, Van Baelen K, Fairclough RJ, Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F. 2005. The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *J Biol Chem* **280**:22800–22808. doi:10.1074/jbc.M501026200
446. Varki A, Cummings R, Esko J, Stanley P, Hart G, Aebi M, Darvill A, Kinoshita T, Packer N, Prestegard J, Schnaar R, Seeberger P, editors. 2017. *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
447. Vashist S, Frank CG, Jakob CA, Ng DTW. 2002. Two distinctly localized p-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Mol Biol Cell* **13**:3955–3966. doi:10.1091/mbc.02-06-0090

448. Vashist S, Kim W, Belden WJ, Spear ED, Barlowe C, Ng DTW. 2001. Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* **155**:355–368. doi:10.1083/jcb.200106123
449. Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R. 2004. In Vivo Synthesis of Mammalian-Like, Hybrid-Type N-Glycans in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **70**:2639–2646. doi:10.1128/AEM.70.5.2639-2646.2004
450. Viigand K, Põšnograjeva K, Visnapuu T, Alamäe T. 2018. Genome Mining of Non-Conventional Yeasts: Search and Analysis of MAL Clusters and Proteins. *Genes (Basel)* **9**. doi:10.3390/genes9070354
451. von Blume J, Alleaume A-M, Cantero-Recasens G, Curwin A, Carreras-Sureda A, Zimmermann T, van Galen J, Wakana Y, Valverde MA, Malhotra V. 2011. ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca²⁺ ATPase SPCA1. *Dev Cell* **20**:652–62. doi:10.1016/j.devcel.2011.03.014
452. von Blume J, Duran JM, Forlanelli E, Alleaume A-M, Egorov M, Polishchuk R, Molina H, Malhotra V. 2009. Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **187**:1055–69. doi:10.1083/jcb.200908040
453. von Heijne G. 1985. Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**:99–105. doi:10.1016/0022-2836(85)90046-4
454. Votsmeier C, Gallwitz D. 2001. An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J* **20**:6742–6750. doi:10.1093/emboj/20.23.6742
455. Wahlman J, DeMartino GN, Skach WR, Bulleid NJ, Brodsky JL, Johnson AE. 2007. Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* **129**:943–955. doi:10.1016/j.cell.2007.03.046
456. Wandinger-Ness A, Bennett MK, Antony C, Simons K. 1990. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol* **111**:987–1000. doi:10.1083/jcb.111.3.987
457. Wang J, Sun H-Q, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL. 2007a. PI4P Promotes the Recruitment of the GGA Adaptor Proteins to the Trans-Golgi Network and Regulates Their Recognition of the Ubiquitin Sorting Signal. *Mol Biol Cell* **18**:2646–2655. doi:10.1091/mbc.e06-10-0897
458. Wang J, Sun H-Q, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL. 2007b. PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* **18**:2646–55. doi:10.1091/mbc.e06-10-0897
459. Wang X-H, Nakayama K, Shimma Y, Tanaka A, Jigami Y. 1997. MNN6 , a

Member of the KRE2/MNT1 Family, Is the Gene for Mannosylphosphate Transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:18117–18124. doi:10.1074/jbc.272.29.18117

460. Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL. 2003. Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**:299–310. doi:10.1016/S0092-8674(03)00603-2
461. Ward CL, Omura S, Kopito RR. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**:121–127. doi:10.1016/0092-8674(95)90240-6
462. Warit S, Walmsley RM, Stateva LI. 1998. Cloning and sequencing of the *Candida albicans* homologue of SRB1/PSA1/VIG9, the essential gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144**:2417–2426. doi:10.1099/00221287-144-9-2417
463. Waters MG, Serafini T, Rothman JE. 1991. “Coatomer”: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**:248–251. doi:10.1038/349248a0
464. Weigert R, Silletta MG, Spanò S, Turacchio G, Cericola C, Colanzi A, Senatore S, Mancini R, Polishchuk E V., Salmona M, Facchiano F, Burger KNJ, Mironov A, Luini A, Corda D. 1999. CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* **402**:429–433. doi:10.1038/46587
465. Weisz OA, Rodriguez-Boulán E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* **122**:4253–66. doi:10.1242/jcs.032615
466. Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. 1996. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: An unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci* **93**:13797–13801. doi:10.1073/pnas.93.24.13797
467. Willnow TE, Andersen OM. 2013. Sorting receptor SORLA - a trafficking path to avoid Alzheimer disease. *J Cell Sci* **126**:2751–2760. doi:10.1242/jcs.125393
468. Wilson R, Lees JF, Bulleid NJ. 1998. Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J Biol Chem* **273**:9637–9643. doi:10.1074/jbc.273.16.9637
469. Wissing S, Ludovico P, Herker E, Büttner S, Engelhardt SM, Decker T, Link A, Proksch A, Rodrigues F, Corte-Real M, Fröhlich K-U, Manns J, Candé C, Sigrist SJ, Kroemer G, Madeo F. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**:969–974. doi:10.1083/jcb.200404138
470. Woolhead CA, McCormick PJ, Johnson AE. 2004. Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* **116**:725–736. doi:10.1016/S0092-8674(04)00169-2
471. Xia X. 2019. Translation control of HAC1 by regulation of splicing in *saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci* **20**:1–18. doi:10.3390/ijms20122860

472. Xiang M, Mohamalawari D, Rao R. 2005. A novel isoform of the secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain. *J Biol Chem* **280**:11608–11614. doi:10.1074/jbc.M413116200
473. Xie W, Kanehara K, Sayeed A, Ng DTW. 2009. Intrinsic Conformational Determinants Signal Protein Misfolding to the Hrd1/Htm1 Endoplasmic Reticulum-associated Degradation System. *Mol Biol Cell* **20**:3317–3329. doi:10.1091/mbc.e09-03-0231
474. Xu C, Ng DTW. 2015. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**:742–752. doi:10.1038/nrm4073
475. Xu C, Wang S, Thibault G, Ng DTW. 2013. Futile Protein Folding Cycles in the ER Are Terminated by the Unfolded Protein O-Mannosylation Pathway. *Science* (80-) **340**:978–981. doi:10.1126/science.1234055
476. Yamakage M, Namiki A. 2002. Calcium channels — basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels — a review. *Can J Anesth Can d'anesthésie* **49**:151–164. doi:10.1007/BF03020488
477. Yang M, Jensen LT, Gardner AJ, Culotta VC. 2005. Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ACDP (ancient conserved domain protein) family. *Biochem J* **386**:479–487. doi:10.1042/BJ20041582
478. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**:652–656. doi:10.1038/414652a
479. Yip CL, Welch SK, Klebl F, Gilbert T, Seidel P, Grant FJ, O'Hara PJ, MacKay VL. 1994. Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci* **91**:2723–2727. doi:10.1073/pnas.91.7.2723
480. Yoda K, Kawada T, Kaibara C, Fujie A, Abe M, Hitoshi, Hashimoto, Shimizu J, Tomishige N, Noda Y, Yamasaki M. 2000. Defect in cell wall integrity of the yeast *saccharomyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene VIG9. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:1937–1941. doi:10.1271/bbb.64.1937
481. Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**:31079–31088. doi:10.1074/jbc.M202718200
482. Youn JK, Shang L, Kim M II, Jeong CM, Chang HN, Hahm MS, Rhee SK, Kang HA. 2010. Enhanced production of human serum albumin by fed-batch culture of *hansenula polymorpha* with high-purity oxygen. *J Microbiol Biotechnol* **20**:1534–1538. doi:10.4014/jmb.0909.09046
483. Yu I-M, Hughson FM. 2010. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**:137–56.

doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113327

- 484. Zehe C, Engling A, Wegehangel S, Schäfer T, Nickel W. 2006. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15479–84. doi:10.1073/pnas.0605997103
- 485. Zerangue N, Malan MJ, Fried SR, Dazin PF, Jan YN, Jan LY, Schwappach B. 2001. Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* **98**:2431–2436. doi:10.1073/pnas.051630198
- 486. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. 1999. A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane KATP Channels. *Neuron* **22**:537–548. doi:10.1016/S0896-6273(00)80708-4
- 487. Zhdankina O, Strand NL, Redmond JM, Boman AL. 2001. Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast* **18**:1–18. doi:10.1002/1097-0061(200101)18:1<1::AID-YEA644>3.0.CO;2-5
- 488. Zhu T, Sun H, Wang M, Li Y. 2019. *Pichia pastoris* as a Versatile Cell Factory for the Production of Industrial Enzymes and Chemicals: Current Status and Future Perspectives. *Biotechnol J* **14**:1800694. doi:10.1002/biot.201800694
- 489. Zhu Y, Drake MT, Kornfeld S. 1999. ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5013–8. doi:10.1073/pnas.96.9.5013
- 490. Ziegler FD, Cavanagh J, Lubowski C, Trimble RB. 1999. Novel *Schizosaccharomyces pombe* N-linked GalMan9GlcNAc isomers: role of the Golgi GMA12 galactosyltransferase in core glycan galactosylation. *Glycobiology* **9**:497–505. doi:10.1093/glycob/9.5.497
- 491. Ziegler FD, Gemmill TR, Trimble RB. 1994. Glycoprotein synthesis in yeast. Early events in N-linked oligosaccharide processing in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **269**:12527–12535.
- 492. Zuber C, Fan JY, Guhl B, Parodi A, Fessler JH, Parker C, Roth J. 2001. Immunolocalization of UDP-glucose: Glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-Golgi intermediates in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10710–10715. doi:10.1073/pnas.191359198

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность чл.-корр. РАН М. Д. Тер-Аванесяну, в лаборатории которого была выполнена эта работа, за всемерную поддержку и помощь в работе. Я благодарен всем членам коллектива лаборатории молекулярной генетики и группы генной инженерии низших эукариот за замечательную дружескую атмосферу и моральную поддержку. Особенно хотелось бы поблагодарить А. В. Каргинова и А.И. Александрова за критическое прочтение диссертации. Автор глубоко признателен проф. А. С. Капрельянцу за поддержку и ценнейшие советы по улучшению текста диссертации.