

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Evaldas Čiplys

TYMŲ VIRUSO HEMAGLIUTININO BALTYMO
BRENDIMO PROCESŲ MIELIŲ LĄSTELIŲ
SEKRECINIAME KELYJE TYRIMAS IR MIELIŲ
HUMANIZAVIMAS

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2007-2011 metais Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje.

Moksliniai vadovas:

Dr. Rimantas Slibinskas (VU Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P);

Konsultantas:

Prof. Habil. Dr. Kęstutis Sasnauskas (VU Biotechnologijos institutas, biomedicininiai mokslai, biologija – 01 B).

Turinys

Turinys.....	3
Santrumpų sąrašas	5
Įvadas.....	7
1. Literatūros apžvalga.....	11
1.1 Mielių pritaikymas ir panaudojimas biotechnologijoje	11
1.2 Eukariotų baltymų sekrecijos kelias	17
1.3 Tymų viruso hemagliutinino baltymas	34
2. Tyrimų metodika	43
2.1. Medžiagos.....	43
2.1.1. Reagentai	43
2.1.2. Fermentai	43
2.1.3 Oligonukleotidai PGR amplifikacijos reakcijoms	43
2.1.4 Antikūnai	48
2.1.5 Mikroorganizmų kamienai ir plazmidės.....	50
2.1.6 Bakterijų ir mielių auginimo terpės ir sąlygos.....	50
2.2 Metodai	52
2.2.1 DNR elektroforezė agarozės gelyje	52
2.2.2 DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio.....	52
2.2.3 Rekombinantinių plazmidžių konstravimas bei analizė	52
2.2.4 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR).....	52
2.2.5 <i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas	53
2.2.6 <i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių transformacija	53
2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas iš <i>E. coli</i> ląstelių	53
2.2.7.1 Mažų plazmidės kiekių išskyrimas restrikcinei analizei	54
2.2.7.2 Didelių plazmidinės DNR kiekių išskyrimas	54
2.2.7.3 Plazmidinės DNR skyrimas nukleotidinės sekos nustatymui.....	54
2.2.8 <i>S. cerevisiae</i> mielių kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija	55
2.2.9 <i>S. cerevisiae</i> transformantų auginimas ir indukcija.....	55
2.2.10 <i>P. pastoris</i> transformacijos metodai ir transformantų atranka.....	56
2.2.11 <i>P. pastoris</i> transformantų indukcijos sąlygų optimizavimas.....	57
2.2.12 Mielių sekretuojamų baltymų analizė kultūros terpėje.....	58
2.2.13 Grubių mielių ląstelių lizatų paruošimas	58
2.2.14 Baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir frakcionavimas.....	59
2.2.15 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas.....	59
2.2.16 Baltymų imunoblotingas.....	60
2.2.17 Dvikryptė (2D) baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	61
2.2.18 Dvikryptės baltymų elektroforezės gelių analizė ir baltymų identifikavimas	62
2.2.19 Mielių ląstelių stebėjimas mikroskopu	63
2.2.20. Visos mielių ląstelės RNR išskyrimas.....	63
2.2.21 Mielių genomines DNR skyrimas	64
3. Rezultatai	65
3.1 Tymų viruso hemagliutinino sintezė mielėse <i>S. cerevisiae</i> ir <i>P. pastoris</i>	65
3.1.1 <i>S. cerevisiae</i> ir <i>P. pastoris</i> raiškos vektorių konstravimas ir mielių ląstelių transformacija	66
3.1.2 Tymų viruso rekombinantinio hemagliutinino, susintetinto mielėse <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ir <i>P. pastoris</i> , savybių analizė	69

3.1.3 Mielių ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, analizė	74
3.2 Mielių <i>S. cerevisiae</i> baltymų sekretinio kelio humanizavimas.....	81
3.2.1 Mielių <i>S. cerevisiae</i> SRP ir Sec61 kompleksų humanizavimas	83
3.2.2 Žmogaus ET šaperonų sintezė mielių ląstelėse ir jų įtakos TVH baltymui analizė	105
3.2.3 Mielių <i>S. cerevisiae</i> kamienų, su integruotais žmogaus šaperonų genais, kūrimas	120
4. Rezultatų aptarimas	133
Išvados	149
Mokslinių darbų sąrašas	150
Literatūros sąrašas	151

Santrumpų sąrašas

2µm – dvimikroninė mielių plazmidė

angl. – angliškai

A, C, G, T – adeninas, citozinas, guaninas, timinas

ar. – aminorūgštis

ASR – atviro skaitymo rėmelis

ATP – adenzintrifosfatas

bp – bazių pora

kDNR – DNR gauta atvirkštinės transkripcijos pagalba

Da – daltonas

DEPC – dietilpirokarbonatas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DNRazė – dezoksiribonukleazė

DTT – ditioneitolas

dNTP – deoksiribonukleozidtrifosfatai

EDTA – etilendiaminotetraacetato rūgštis

ET – endoplazminis tinklas

GA – Goldžio aparatas

GTP – guanozintrifosfatas

H – hemagliutinino baltymas

iRNR – informacinė ribonukleorūgštis

kb – kilobazė (1000 bp)

kDa – kilodaltonas

LB – Luria - Bertani mitybinė terpė

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė

nt – nukleotidas

ORI – replikacijos iniciacijos seka

PAA – poliakrilamidas

PEG – polietilenglikolis

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas
RE – restrikcijos endonukleazė
RNazė – ribonukleazė
RNR – ribonukleorūgštis
TEMED – N,N',N',N'-tetrametiletildiaminas
TMB – 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidinas
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
TV – tymų virusas
TVH – tymų viruso hemagliutinino baltymas
YNB – mikroelementų rinkinys minimaliai mielių terpei
UV – ultravioletas

Aminorūgštys:

A, Ala – alaninas	N, Asn – asparaginas
C, Cys – cisteinas	P, Pro – prolinas
D, Asp – aspargo rūgštis	Q, Gln – glutaminas
E, Glu – glutamo rūgštis	R, Arg – argininas
F, Phe – fenilalaninas	S, Ser – serinas
G, Gly – glicinas	T, Thr – treoninas
H, His – histidinas	V, Val – valinas
I, Ile – izoleucinas	W, Trp – triptofanas
K, Lys – lizinas	X – bet kokia aminorūgštis
L, Leu – leucinas	Y, Tyr – tirozinas
M, Met – metioninas	

Įvadas

Vienas pagrindinių biomedicininės paskirties baltymų gamybos iššūkių yra pigių ir saugių raiškos sistemų, tinkamų glikobaltymų sintezei, paieška bei esamų sistemų tobulinimas. Vaistai, sukurti baltymų pagrindu, sudaro apie ketvirtadalį naujai patvirtinamų vaistų rinkos, o apie 70% jų sudaryti iš glikoproteinų (Sethuraman ir Stadheim, 2006). Pastaruoju metu naujų biomedicininė vaistų, kurių naudojimas žmonėms yra patvirtinamas, mažėja. Per 2006-2010 metus patvirtinta tik 25 nauji baltymų pagrindu sukurti vaistai. Iš jų tik 5 yra susintetinti mielėse *S. cerevisiae* (4) ar *P. pastoris* (1). Tuo tarpu visi glikobaltymai (daugiausiai antikūnai, 13 iš 25), panaudoti vaistų kūrimui, sintetinami žinduolių ląstelių kultūrose (Walsh, 2010). Vis tik, dabar glikobaltymų sintezei naudojamos žinduolių ląstelių kultūros turi eilę trūkumų. Jose gaunamų rekombinantinių baltymų kaina yra didelė, ribotas tūrinis našumas, ląstelės lėtai dauginasi ir auga, būna užkrėstos retrovirusais, gaunamas heterogeniškas produktas ir užima daug laiko sukurti stabilią ląstelių liniją (Choi ir kt., 2003; Sethuraman ir Stadheim, 2006). Itin intensyviai vykstantis tinkamų raiškos sistemų kūrimas kol kas nedavė norimų rezultatų. Mielių, kaip ir augalų bei vabzdžių raiškos sistemos, dėl keleto priežasčių yra įvardijamos kaip vienos pagrindinių kandidatų užimti šią vietą. Visų pirma, mielės yra pripažintos kaip saugus organizmas, jų genetika, biochemija ir fiziologija yra gerai ištirta. Vis tik, tik keleto mielėse susintetintų baltymų (insulinas, hirudinas, somatropinas, hepatito B ir papilomos virusų paviršiaus baltymai) pagrindu yra sukurti vaistai bei vakcinos (Walsh, 2010). Todėl mielių raiškos sistemų pritaikymas sudėtingų žmogaus ar virusinių baltymų ir glikobaltymų, reikalingų medicinai, sintezei yra labai siektinas.

Dauguma medicinai reikšmingų rekombinantinių glikobaltymų turi įgyti natūralią formą, kad būtų veiklūs ir galėtų atlikti savo funkcijas. Mielėse sekretuojami rekombinantiniai glikobaltymai susiduria su keliomis jų sintezę stabdančiomis ar ribojančiomis problemomis: pernešimu į endoplazminę tinklą (Čiplies ir kt., 2011a), tinkamos konformacijos įgijimu, išėjimu iš

endoplazminio tinklo, patekimu į Goldžio aparatą bei hiperglikoziliniu (Schroder, 2007). Norint pašalinti rekombinantinių glikoproteinų sintezę mielių ląstelių sekretinio kelio etapuose ribojančius veiksnius, reikia modifikuoti mielių baltymų sintezės ir po-transliacinių modifikacijų kelius pritaikant žmogaus glikobaltymų sintezei. Sėkmingas pavyzdys šioje srityje – mielių N-glikozilavimo kelio humanizavimas, leidžiantis mielių raiškos sistemose gaminti glikobaltymus, kurių glikozilavimo pobūdis tiksliai atitinka vykstantį žmogaus ląstelėse (Hamilton ir Gerngross, 2007). Vis tik mielėse susintetintų glikobaltymų, tinkamų farmacijos pramonei, skaičius yra labai nedidelis, dažniausiai glikobaltymai nebūna tinkamai suvynioti ir modifikuoti (Sakamoto ir kt., 1999), o esminės priežastys, paaiškinančios mielių trūkumus sintetinant tokio tipo baltymus, nėra išaiškintos. Išsamaus ankstyvųjų mielių baltymų sekretinio kelio etapų – pernešimo į endoplazminį tinklą (ET) ir brendimo ET erdmėje – modifikavimo pritaikant žmogaus glikobaltymų sintezei nėra atlikta. Pavieniai bandymai padidinant atskirų mielių šaperonų sintezę teigiamų rezultatų nedavė, o eksperimentų, skirtų mielių ląstelėms suteikti savybes sintetinti baltymus, kurių natūraliai sintetinti nesugeba, iš viso nėra atlikta.

Remiantis išvardintomis problemomis, buvo išskelti pagrindiniai **darbo tikslai:**

1. Molekuliniame lygmenyje apibūdinti žmogaus virusų glikobaltymų brendimo procesus mielių sekretiniame kelyje, nustatant neefektyvios šių baltymų raiškos mielėse priežastis.

2. Sukurti mielių kamienus su integruotais žmogaus ląstelių sekretinio kelio genais, užtikrinti šių genų raišką mielėse ir ištirti jų įtaką glikobaltymų sintezei ir brendimui mielėse.

Siekiant užsibrėžtų darbo tikslų buvo suformuluoti šie **darbo uždaviniai:**

1. Mielėse *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* susintetinto tymų viruso hemaglutinino (TVH) glikobaltymo savybių tyrimas.

2. Mielių ląstelių, sintetinančių tymų viruso hemagliutininą, proteominė analizė.
3. Mielių baltymų, dalyvaujančių ląstelės atsake į TVH sintezę, identifikavimas.
4. Bioinformatinė duomenų analizė, rezultatų apibendrinimas ir priešasčių, nulemiančių tiriamo rekombinantinio glikoproteino brendimo sutrikimus mielių sekretinaime kelyje, apibūdinimas.
5. Žmogaus ląstelių sekretinio kelio genų klonavimas į mielių *S. cerevisiae* raiškos vektorius ir sintezė mielėse.
6. Žmogaus sekretinio kelio baltymų, susintetintų mielėse, savybių analizė.
7. Žmogaus ląstelių sekretinio kelio baltymų raiška kartu su tymų viruso hemagliutininu mielių ląstelėse ir įtakos virusinio glikobaltymo brendimui ir savybėms nustatymas.
8. Mielių sekretijos kelio komponentų trukdančių ar neužtikrinančių tinkamą tymų viruso hemagliutinino brendimą pašalinimas.
9. Žmogaus ląstelių sekretinio kelio baltymų kombinacijų, užtikrinančių teisingą žmogaus virusų paviršiaus glikobaltymų brendimą mielių ląstelėse, paieška.
10. Mielių kamieno su integruotais žmogaus genais ir pašalintais mielių genais, pritaikyto aktyvių biomedicinių glikobaltymų sintezei, kūrimas.

Darbo naujumas. Rekombinantinio tymų viruso hemagliutinino, kaip ir daugelio kitų virusų paviršiaus glikobaltymų, susintetintų mielėse, savybės nėra apibūdintos. Taip pat nėra nustatytos priežastys, kodėl mielių ląstelės nesugeba tinkamai apdoroti tokio tipo baltymus. Proteominė mielių ląstelių, sintetinančių tymų viruso paviršiaus glikobaltymą, analizė leidžia pažvelgti į procesus, vykstančius mielių ląstelėje sintezės metu, ir apibūdinti mokslui svarbias problemas. Šis darbas gali būti priskiriamas naujai biotechnologijos sričiai – sintetinei biologijai, kurios esmė – suteikti organizmams savybes, kurių paprastai jie neturi. Mielės šioje srityje yra ypatingai plačiai pritaikomos, o pirmieji rezultatai ne tik spausdinami prestižiškiausiuose žurnaluose, bet ir

gelbsti gyvybes (Ro ir kt., 2006). Šiame darbe mieles siekiama „išmokyti“ sintetinti sudėtingus virusinius glikobaltymus perkeliant į mielių ląsteles žmogaus ląstelių sekrecinio kelio komponentus. Tai novatoriškas darbas, nes siekiama sukurti visiškai naują mielių ląstelę su biotechnologijai ir biomedicinai reikalingomis savybėmis.

Darbo reikšmė. Šis darbas svarbus tiek teoriniu, tiek praktiniu požiūriu. Mielų ląstelėse virusinių glikobaltymų sintezę ribojančių veiksnių nustatymas leistų įvertinti evoliucinius skirtumus atsiradusius tarp mielių ir žinduolių ląstelių. Pavienių ir įvairiomis kombinacijomis žmogaus šaperonų įkėlimas ir įtakos tymų viruso hemagliutinino brendimui įvertinimas, leistų nustatyti kokius šaperonus tymų virusas įdarbino hemagliutinino brendimui evoliucionuodamas žmogaus ląstelėje. Sėkmingai sukūrus mielių ląstelę, galinčią sintetinti ir tinkamai apdoroti virusinius glikobaltymus, nauda būtų daugialypė. Dideli kiekiai saugių pigiai susintetintamų antigenišku virusinių paviršiaus baltymų yra reikalingi ne tik vakcinoms kurti, bet ir priešvirusiniams vaistams moduluoti. Tymų virusas atitinka daugelį kriterijų viruso, kurį galima pasaulyje išnaikinti. Siekiant šio tikslo pigios, saugios ir gausiai prieinamos vakcinos yra esminis komponentas (Moss, 2009).

1. Literatūros apžvalga

1.1 Mielių pritaikymas ir panaudojimas biotechnologijoje

Senovės Egipto 4000 metų senumo hieroglifai, iliustruojantys mielių panaudojimą fermentacijai ir kepinimui, yra seniausi žinomi rašytiniai šaltiniai apie mieles. Manoma, kad mieles savo reikmėms žmonės išmoko panaudoti dar prieš atsirandant žemdirbystei. Faktiškai visos istorijai žinomos žmonių bendruomenės vienaip ar kitaip sugebėjo mieles įdarbinti maisto ir gėrimų fermentacijai. Nepaisant to, šių vienaląsčių organizmų biologija apibūdinta tik XIX amž. L. Pastero ir kitų tyrinėtojų darbuose. Dėl didelio ląstelių dydžio ir ekonominės svarbos, mielės buvo pirmasis moksliskai apibūdintas mikroorganizmas (Barnett, 2003). Tolesniame mikrobiologijos ir biochemijos (žodis „fermentas“ kilęs iš graikiško žodžio „mielėse“) progresu mielės tapo svarbiausiu modeliniu organizmu (Martoglio ir Dobberstein, 1998; Roberts ir Oliver, 2011). Ne veltui mielės *S. cerevisiae* buvo pirmasis eukariotinis organizmas, kurio genomas buvo nustatytas (Goffeau ir kt., 1996). Tai leido sukaupti ypatingai daug informacijos apie šiuos organizmus, todėl mielės yra sėkmingai naudojamos biotechnologijoje bei suranda vis naujų praktinių pritaikymų.

Rekombinantinių baltymų raiškos tyrimai mielėse prasidėjo vos tik atsiradus rekombinantinės DNR technologijoms (Nasmyth, 1978) ir jau yra sėkmingai vykdomi daugiau nei 30 metų. Pradiniai rekombinantinių baltymų raiškos bandymai mielėse buvo atliekami „kepinimo mielėse“ *Saccharomyces cerevisiae*, kurios yra gerai ištirtas modelinis organizmas su didžiuliu kiekiu literatūros apie jo ląstelinę ir molekulinę biologiją. Su mielėmis dirbančiam biologui yra prieinama gausybė molekulinės biologijos įrankių, tarp jų genomo sekos, galimybė atlikti tiesioginę genų inaktyvaciją, geno pakeitimus ir genų įterpimą į norimą genomo vietą bei pakartotinai panaudojami genetiniai žymenys, įgalinantys pakartotinį naujų genetinių konstrukcijų įvedimą. Be to, išaiškinta daugelis stiprių konstitutyvių promotorių (pvz.: gliceraldehyd-3-fosfatdehidrogenazės (*GAPDH*) ir 3-fosfoglyceratkinazės (*PGK1*) promotoriai)

ir indukuojamų promotorių (tokių kaip *GAL1* ir *GAL7* promotoriai). Pastarąjį dešimtmetį dėl stipresnių indukuojamų promotorių poreikio ir noro sekretuoti rekombinantinį produktą į kultūros terpę buvo išplėtotos papildomos mielių raiškos sistemos. Šiame kontekste yra verti dėmesio trys mielių raiškos šeimininkai - *Kluyveromyces lactis* ir metilotrofinės mielės *Pichia pastoris* bei *Hansenula polymorpha*. Kiekviena iš šių sistemų naudojama komercinio masto rekombinantinių baltymų gamybai ir virusinių baltymų tyrimams. Yra daugybė literatūros, aprašančios šių mielių panaudojimą rekombinantinių baltymų raiškai (apžvelgiama Gellissen ir Melber, 1996; Gellissen ir Hollenberg, 1997; Cregg ir kt., 2000).

Mielių raiškos sistemos tobulinamos nuo pat jų atsiradimo. Pagrindinius tobulinimo metodus galima būtų labai apibendrintai suskirstyti į dvi pagrindines grupes: (1) genų inaktyvacija bei natyvių baltymų perprodukcija paremti metodai ir (2) kryptingu genų perkėlimu bei naujų funkcijų kūrimu mielių ląstelėse paremti metodai.

Tobulinant mielių raiškos sistemas didžiausią reikšmę turi pačių mielių ląstelių pritaikymas efektyvesnei rekombinantinių baltymų sintezei. Gana ilgą laiką daugiausiai buvo naudojami specifinių mielių genų inaktyvacijos metodai, gaunant mutantus, turinčius vienokių ar kitokių privalumų prieš įprastus mielių kamienus. Gana svarbus mielių raiškos sistemų patobulinimas buvo įvairių proteazių mutantų gavimas. Mielėse sintetinami heterologiniai baltymai dažnai yra jautrūs proteazėms. Tokių baltymų sekrecijai naudojami kamienai, neturintys įvairių proteazių, pavyzdžiui proteazės A (Pep4p), aspartilproteazių, serinproteazių ar cisteinproteazių (apžvalgai Idiris ir kt., 2006; Cho ir kt., 2010; Ganatra ir kt., 2011).

Padidinti heterologinių baltymų išėigą yra bandoma ir kuriant sekrecinius mielių mutantus. Juose genų raiška gali būti paveikta įvairiuose baltymo sintezės ir sekrecijos lygiuose. *S. cerevisiae* *PMR1* genas buvo pirmasis nustatytas genas, kurio inaktyvacija nulemia padidintos sekrecijos mielių fenotipą (Smith ir kt., 1985; Rudolph ir kt., 1989). Pmr1p baltymas formuoja Ca^{2+} ir Mn^{2+} jonų kanalą Godžio aparate, Mn^{2+} jonai svarbūs baltymų

glikozilinimui, o Ca^{2+} jonai reguliuoja baltymų nukreipimą į vakuolę. Todėl Pmr1p gali kontroliuoti sekrecijos procesą keliose stadijose. Nustatyta, kad Pmr1p reguliuoja baltymų sekreciją ir brendimą ir *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* bei *Kluyveromyces lactis* mielėse (Kang ir kt., 1998; Sohn ir kt., 1998; Uccelletti ir kt., 2004). Taip pat parodyta, kad *Vsp10* geno inaktyvacija mielėse *S. cerevisiae* turi teigiamą poveikį sekretuojamų heterologinių baltymų išėigai (Hong ir kt., 1996; Holkeri ir Makarow, 1998). *VSP10* genas koduoja vakuolės receptorių Vsp10p, kuris atsakingas už sekretuojamų baltymų transportą iš Goldžio aparato į vakuolę. Vsp10p receptoriaus pašalinimas neleidžia heterologiniams sekretuojamiems baltymams neteisingai būti nukreiptiems ir kauptis vakuolėje. Yra nustatyta eilė kitų mielių genų, kurių inaktyvacija padidina tikslių baltymų išėigas (apžvalgai Idiris ir kt., 2010). Šiame kontekste reikšmingas darbas atliktas ir Biotechnologijos institute, kur yra sukurta *K. lactis* ir *S. cerevisiae* mielių padidintos sekrecijos mutantų kolekcija ir svarbių heterologinę sekreciją mielėse ribojančių veiksnių išaiškinimas (Bartkevičiūtė ir Sasnauskas, 2003, 2004).

Padidinti rekombinantinių baltymų išėigas ir pagerinti jų savybes bandoma padidinant mielių sekrecijos kelio baltymų raišką. Heterologiniai baltymai gali būti modifikuojami ir subrandinami neteisingai, nes natūralus mielėse esančių modifikacijos baltymų ir fermentų kiekis yra per mažas arba specifinių modifikacijos fermentų gali visai nebūti šeimininko ląstelėje. Pagrindinis dėmesys šioje vietoje skiriamas mielių ET šaperonų ir jų ko-faktorių perprodukavimui, siekiant padidinti sekretuojamų heterologinių baltymų išėigas. Literatūroje galima aptikti begalę eksperimentų apibūdinančių padidintos pavienių mielių Kar2p, PDI šeimos, kalneksino baltymų bei įvairių jų kombinacijų tarpusavyje ir kartu su jų veikimui reikalingais ko-faktoriais raiškos įtaka rekombinantinių baltymų išėigai. Trumpai galima paminėti, kad tokia prieiga duoda labai skirtingus rezultatus. Aprašyta atveju, kai Kar2p raiškos sustiprinimas padidino sekretuojamo jaučio prochimozino kiekį 20 kartų (Harmsen ir kt., 1996), bet taip pat gausu atveju, kai mielių šaperonų

raiškos padidėjimas neturi jokios įtakos ar netgi neigiamai veikia heterologinio baltymo sintezę (išsamiai apžvalgai Schroder, 2007; Idiris ir kt., 2010).

Naujų technologijų ir metodų sukūrimas bei pritaikymas mielėse leido žymiai labiau išplėsti ir paspartinti mielių mutacijų, pagerinančių rekombinantinių baltymų sintezę, paieškas. Sukurta *S. cerevisiae* mielių kamienų su inaktyvuotais visais 4800 neesminiais mielių genais kolekcija (Winzeler ir kt., 1999; Giaever ir kt., 2002) leidžia nesunkiai atrinkti genus, kurių inaktyvacija turi teigiamos įtakos tikslinio baltymo sintezei (Kitagawa ir kt., 2011). Didelio našumo taip vadinamų „omics“ (*angl. Genomic, Proteomics, Metabolomics, Transcriptomics*) technologijų įvedimas leido lengviau ir išsamiau įvertinti ląstelėje vykstančius pokyčius ir mechanizmus bei lengviau numatyti ląstelės tobulinimo pritaikant geresnei rekombinantinių baltymų sintezei strategijas. Pritaikant šias technologijas buvo nustatytas mielių genas *BMS1*, kurio transkripcijos lygio optimizavimas žymiai padidino sekretuojamų baltymų išėigą (Bonander ir kt., 2009). Įdomu, kad *BMS1* geno koduojamas baltymas yra atsakingas už ribosomų biogenezę, o jo sintezės padidėjimas pakeitė ribosominių dalelių (40S ir 60S) santykį ir garantavo gausesnę tikslinio baltymo sintezę. Tokie sėkmingi bandymai rodo naujų technologijų galimybes ir neribotą pritaikymą.

Vis dėlto, žymiai gausėjant duomenų apie įvairių eukariotų genomus ir proteomas bei išaiškinant vis naujus ląstelėje vykstančių molekulinų procesų mechanizmus, pradėjo aiškėti, kad sukurti tobulas žemesniųjų eukariotų raiškos sistemas inaktyvuojant genus ar padidinant natūralių baltymų sintezę yra neįmanoma. Aukštesniųjų eukariotų ląstelių sekretiniame kelyje vyksta žymiai sudėtingesni procesai ir atliekamos įvairesnės funkcijos, nei mielių ląstelėse. Organizmams vystantis nuo vienląsčių iki sudėtingų daugialąsčių eukariotų, pagrindinės viduląstelinės gyvybinės funkcijos labai žymiai nesikeitė (jas vykdančių baltymų bei jų sričių struktūrų skaičius didėjo palyginti nestipriai), žymiausi evoliuciniai pasikeitimai vyko didėjant transmembraninių sekretinių baltymų skaičiui, atsirandant naujoms transmembraninėms ir ekstraląstelinėms baltymų struktūroms bei jų įvairovei daugialąsčiuose eukariotuose ir ypač

žmogaus linijoje (Lander ir kt., 2001). Todėl yra logiška, kad norint pagerinti sudėtingų žmogaus baltymų brendimą mielėse, reikia ne inaktyvuoti kokius nors mielių baltymus ar padidinti jų raišką, tačiau priešingai – perkelti į mieles papildomus aukštesnių organizmų baltymus ar jų kompleksus, atliekančius svarbias funkcijas sekretiniame kelyje. Todėl pastaruoju metu vis didesnės pastangos skiriamos kryptingam mielių sekretinio kelio pertvarkymui, perkeliant į mieles ištikus aukštesniųjų eukariotų biocheminius kelius. Kad tai įmanoma, aiškiai įrodo žinomiausias šios srities darbas – baltymų glikozilinimo kelio humanizavimas mielėse *P. pastoris*. Pirmi baltymų N-glikozilinimo etapai ET tiek mielėse, tiek žmogaus ląstelėse vyksta taip pat (Choi ir kt., 2003). Pagrindiniai glikozilinimo skirtumai atsiranda Goldžio aparate, mielėse vykstant daugiamanoziniam, o žmogaus ląstelėse – sudėtingam N-glikozilinimo tipui (išsamiau 1.2 skyriuje). Minėtame darbe po keturių mielių ląstelės genų inaktyvacijos, pašalinant mielėms būdingą N-glikozilinimo tipą, į mieles buvo perkelta 14 aukštesniųjų eukariotų ląstelių glikozilinimo kelio genų, kas įgalino nuosekliai *in vivo* atkartoti žmogaus ląstelių N-glikozilinimo reakcijas mielėse (Hamilton ir Gerngross, 2007). To paskekoje, mielių ląstelių Goldžio aparate gautas aukštesniųjų eukariotų tipo baltymų glikozilinimas, atitinkantis glikozilinimą žmogaus ląstelėse. Gauti mielių kamienai jau pradėdami naudoti biotechnologijoje, ypač antikūnų gamyboje (Li ir kt., 2006). Sėkmingi mielių glikoinžinerijos darbai leidžia manyti, kad netolimoje ateityje mielės sudarys rimtą konkurenciją dabar plačiausiai naudojamoms žinduolių ląstelių kultūromis paremtoms raiškos sistemoms.

Pastarasis darbas gali būti priskirtas naujai biotechnologijos sričiai – sintetinei biologijai. Tai visai neseniai pradėta plėtoti sritis, o jos pritaikymas atrodo yra neribotas. Sintetinė biologija suteikia alternatyvą tradiciniams metodams, kurių esmė yra reikalingų junginių išgavimas iš natūralių šaltinių ar cheminės sintezės būdu. Šiame metode norimų junginių biosintezės kelio genai yra perkelti į mikroorganizmus, dažniausiai mieles, ir produktas yra sintetinamas ne natūralioje aplinkoje. Tokia strategija suteikia daug pranašumų: galimybę sintetinti labai didelius kiekius, reikiamų junginių sintezei naudoti

paprastus, aplinkoje dažnai aptinkamus anglies šaltinius, be to, toks junginių sintezės būdas yra žymiai pigesnis (Chang ir Keasling, 2006). Mielės šioje srityje yra intensyviai išnaudojamos (Nevoigt, 2008). Sintetinė biologija iš esmės leidžia mielėse susintetinti bet kokį organinį junginį. Vis tik šio mokslo srities pradžioje didžiausias dėmesys sutelktas į galimybę mielėse susintetinti natūraliai augaluose aptinkamus izoprenoidus. Izoprenoidai yra struktūriškai ir funkciškai labai skirtinga junginių grupė, kurią sudaro apie 50 000 dabar žinomų junginių. Žymiausias šios srities darbas – artemisininės (*angl. artemisininic*) rūgšties, iš kurios nesunku pagaminti artemisininą, labai efektyvų vaistą prieš maliariją, sintezė mielėse *S. cerevisiae* (Ro ir kt., 2006). Darbo metu buvo modifikuotas mielių mevalonato metabolitinis kelias, užtikrinantis didesnę izopentenildifosfato kiekį ląstelėje bei įvesti trys fermentai: farnezildifosfato sintetazė, amorfadino sintetazė ir citochromo P450 monooksigenazė. Izopentenildifosfatas yra esminis mielių metabolitas, iš kurio įmanoma susintetinti beveik visus norimus izoprenoidus. Panašiu būdu mielėse buvo susintetinta visa eilė izoprenoidų (apžvalgai Chang ir Keasling, 2006; Krivoruchko ir kt., 2011). Be izoprenoidų mieles mokslininkai „išmokė“ gaminti ir kitus junginius – biomedicinės paskirties junginius (Neumann ir Neumann-Staubitz, 2010), dyzelino pakaitalą farneziną (Westfall ir Gardner, 2011), biokurą ir įvairius chemikalus (Jarboe ir kt., 2010), sočiasias riebalų rūgštis (Lu ir kt., 2010) ir kt. – bei biokuro gamybai naudoti neįprastus substratus (Galazka ir Cate, 2011). Panašu, kad sintetinės biologijos ir metabolinių kelių inžinerijos sukuriamas galimybes riboja tik fantazija.

Mielės nuo pat seniausių laikų iki dabar išlieka labai svarbus mikroorganizmas. Žmonės išmoko ne tik panaudoti natūralias mielių savybes, bet ir pritaikyti jas įvairiose srityse. Biotechnologijos pramonėje mielių indelį pervertinti sunku. Atrodo, kad ir šioje srityje mielių galimybės yra neišsemiamos.

1.2 Eukariotų baltymų sekrecijos kelias

Eukariotuose, kitaip nei prokariotuose, daugelis baltymų į užląstelinę erdvę patenka pirmiausiai pereidami per tam tikrus membranomis apribotus kompartmentus. Visuma procesų, kurių pagalba ląstelėje sintetinami baltymai yra transportuojami per membranas, yra vadinama sekrecijos keliu. Literatūroje baltymų sekrecijos keliai skirstomi į dvi grupes: klasikiniai ir alternatyvūs. Klasikiniu sekrecijos keliu pernešami baltymai visų pirma yra nukreipiami į endoplazminį tinklą (ET). Ten jie yra modifikuojami šaperonų ar fermentų, atsakingų už baltymo sulankstymą, disulfidinių tiltelių formavimąsi ir oligomerizaciją. Iš ET baltymai yra perkeltami į Goldžio aparatą (GA). Čia jie gali būti toliau modifikuojami ir išrūšiuojami į lizosomas ar transportines pūsleles. Šiomis pūslelėmis baltymai galiausiai yra nunešami prie plazminės membranos (Sakaguchi, 1997). Sekrecijos keliai, neatitinkantys klasikinių sekrecijos kelių mechanizmų, yra priskiriami prie alternatyviųjų ir šiame darbe aptarti nebus (apžvalgai Nickel, 2010).

Klasikiniai sekrecijos keliai gali būti dviejų tipų: ko-transliacinis, priklausomas nuo SRP (*angl. signal recognition particle*) ir po-transliacinis, nuo SRP nepriklausomas (2 ir 3 pav.). Sintetinamo baltymo N gale esanti signalinė seka lemia, kuriuo keliu bus nukreipiamas sintetinamas baltymas. Retais atvejais ši seka gali būti ir baltymo viduryje ar C gale. Signalinė seka susideda iš trijų regionų (1 pav.): N regiono, kuriame yra nuo 15 iki 50 aminorūgščių liekanų bendrai turinčių teigiamą krūvį, H regiono, susidedančio iš 6-15 hidrofobiškų ar. liekanų ir C regiono, kuriame dominuoja prolino ir glicino ar. ir apsprendžiama signalinės sekos nukirpimo vieta. H domenai yra esminis parametras nuo SRP priklausomo ar nepriklausomo kelio pasirinkimui (smulkiai apžvelgta Martoglio ir Dobberstein, 1998). Signalinių seku, lemiančių baltymo nukreipimą SRP priklausomu keliu, šie regionai yra žymiai hidrofobiškesni (Rapoport, 2008).



1 pav. Baltymų signalinių sekų struktūra. n – teigiamą krūvį turintis regionas, h – hidrofobinis regionas, c – prolino ir glicino ar. turtingas regionas (pagal Martoglio ir Dobberstein, 1998).

Ko-transliacinis ir po-transliacinis baltymų sekrecijos keliai yra randami visuose eukariotuose. Pirmuoju atveju SRP dalelės dėka polipeptidinė grandinė yra sintetinama prie membranos prisikabinusioje ribosomoje tiesiai į ET, antruoju – į ET yra pernešamas citoplazmoje susintetintas polipeptidas. Aukštesniuose eukariotuose dominuoja ko-transliacinis kelias, tuo tarpu žemesniuose šie būdai įvairuoja (Rapoport ir kt., 1996). Pavyzdžiui, mielėse *Saccharomyces cerevisiae*, kaip ir prokariotuose, dominuoja po-transliacinis baltymų pernešimo kelias, o mielėse *Yarrowia lypolitica* dauguma baltymų yra transportuojama ko-transliaciniu būdu (Casaregola ir kt., 2000; Willer ir kt., 2003).

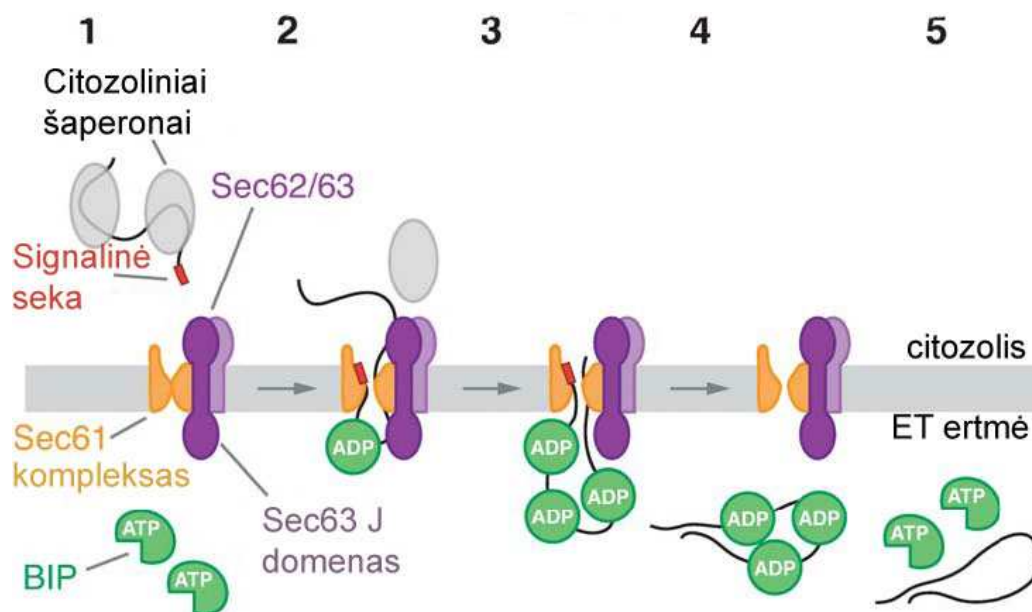
Baltymų pernešimas per ET membraną yra esminis daugelio baltymų biosintezės žingsnis. Šie baltymai gali būti skirstomi į dvi grupes: nemembraniniai, tokie, kurie galiausiai yra išskiriami iš ląstelės ar lokalizuojami ET ertmėje, ir membraniniai – esantys plazminėje membranoje ar kitose sekrecinio kelio organelėse. Nemembraniniai baltymai membranas kerta pilnai ir turi nukerpamą į ET nukreipiantį signalą, kai tuo tarpu membraniniai baltymai turi vieną ar kelis transmembraninius regionus, kurių kiekviename yra maždaug 20 hidrofobinių ar. liekanų ir kuriais baltymas įsitvirtina membranose. Abiejų tipų baltymai per membranas yra pernešami tų pačių translokacijos aparatų, translokonų, pagalba. ATP ir protonų gradiento energiją jie verčia į mechaninį darbą, baltymų pernešimą, taip pat saugo substratus nuo priešlaikinio susiklostymo (Osborne ir kt., 2005).

Pagrindinis translokacijos aparato komponentas, bendras tiek ko-transliaciniam, tiek po-transliaciniam baltymų sekrecijos keliams, yra Sec61 kompleksas. Tai heterotrimerinis membraninių baltymų kompleksas aptinkamas visuose organizmuose. Sec61 kompleksą sudaro trys skirtingų

funkcijų baltymai. Didžiausias heterotrimerinio Sec61 komplekso subvienetas – α subvienetas, vadinamas Sec61 α žinduoliuose ir Sec61p mielėse *Saccharomyces cerevisiae*. Šis subvienetas membraną kerta dešimt kartų, palikdamas savo N ir C galus citozolyje. β subvienetas žinduoliuose vadinamas Sec61 β , o mielėse Sbh1p. Ir trečiasis, γ subvienetas, žinduoliuose yra žinomas Sec61 γ , *S. cerevisiae* – Sss1p pavadinimu. Visi kartu heterotrimerio baltymai sudaro figūrą, geriausiai apibūdinama kaip „smėlio laikrodis“, ir formuoja kanalą, kuriuo gali pereiti baltymai (Rapoport, 2008). α ir γ subvientai yra gyvybiškai būtini ir, manoma, sudaro Sec61 komplekso šerdį, tuo tarpu β subvienetas dalyvauja tik ko-transliaciniame baltymų pernešime. Sec61 baltymų formuojamas kanalas yra labai dinamiška struktūra, nes turi sąveikauti ir pernešti labai įvairų spektrą baltymų į ir iš ET. Nors transmembraninis kanalas yra sudarytas iš vieno Sec61 komplekso, tačiau nustatyta, jog baltymų pernešime dalyvauja oligomeras, sudarytas iš kelių tokių kompleksų. Manoma, kad tokia oligomerizacija reikalinga tam, kad galėtų prisijungti kiti procese dalyvaujantys komponentai. Eukariotuose tokie komponentai yra signalinė peptidazė, nukerpanti signalinę seką nuo translokuojamų polipeptidų, oligosacharidinė transferazė, prikabinanti prie jų angliavandenilių grandines, ir TRAM1 (*angl. translocating chain-associating membrane protein*), daug kartų membraną kertantis baltymas, reikalingas ko-transliaciniame baltymų pernešime (Osborne ir kt., 2005). (Smulkiau Sec61 komplekso sandara ir kristalinė struktūra apžvelgta Clemons ir kt., 2004; Becker ir kt., 2009).

Po-transliacinio baltymų pernešimo metu jau pilnai susintetintas baltymo pirmtakas yra nukreipiamas į ET ir pernešamas per jo membraną (2 pav.). Apie šį kelią aukštesniuose eukariotuose žinoma nedaug, tačiau manoma, jog jo mechanizmas turėtų būti panašus į mielių *S. cerevisiae*. Mielėse vykstant translokacijai po-transliaciniu būdu, Sec61 komplekso formuojamas kanalas sąveikauja su dar vienu membraninių baltymų kompleksu, tetrameriniu Sec62/63 kompleksu, ir suformuoja iš septynių komponentų sudarytą Sec (*angl. Secretory*) kompleksą. Be būtinų baltymų Sec62p ir Sec63p, Sec komplekse taip pat yra nebūtinų komponentų Sec71p ir Sec72p. Žinduolių

ląstelėse taip pat randami Sec62 ir Sec63, tačiau nėra kitų dviejų komponentų. Sec63 kompleksas vidinėje ET pusėje sąveikauja su Hsp70 šeimai priklausančiu Kar2 (BiP) baltymu, kuris hidrolizuodamas ATP padeda pertempti pernešamą baltymą per ET. Žmogaus ląstelėse šio šaperono homologas yra baltymas GRP78 (BiP). Kar2 jungiasi su Sec63p baltymo J domenu (Rapoport, 2007).



2 pav. Potransliacinė baltymų translokacija eukariotuose. (1) citozolyje susintetintas, nesuklostytas polipeptidas susijungia su citozoliniais šaperonais. (2) Signalinės sekos dėka jis yra nukreipiamas į translokacijos kanalą, sudarytą iš Sec61 bei Sec62/63 kompleksų. Citozoliniai šaperonai atpalaiduojami. Sec63 J domenas skatina BiP vykdomą ATP hidrolizę. ADP prisijungęs BiP prisikabina prie polipeptidinės grandinės, įeinančios į ET ertmę. (3) Polipeptidui į ET pajudėjus pakankamą atstumą, prie jo prisikabina dar viena BiP molekulė. (4) Šis procesas yra kartojamas tol, kol per membraną yra perkeliamas visas polipeptidas. (5) ADP virsmas į ATP atpalaiduoja BiP ir atidaro peptidus surišančią kišenę (pagal Osborne ir kt., 2005).

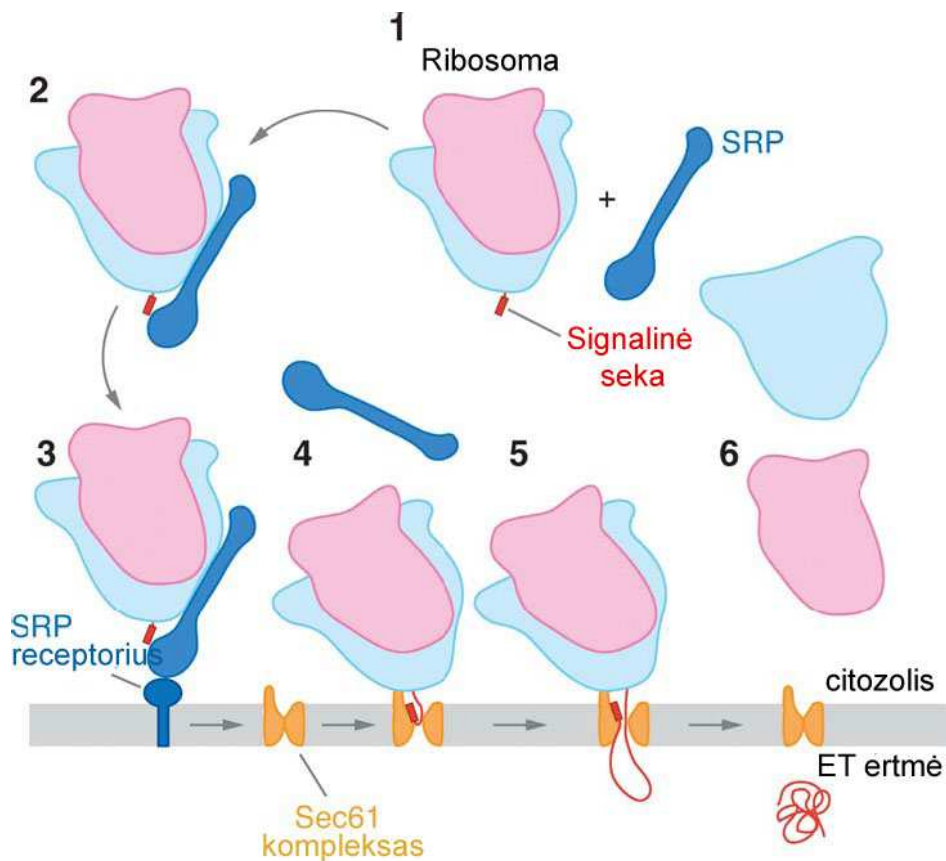
Potransliacinė penaša vyksta dviem etapais: pirmiausia substratas jungiasi su kanalu, o po to yra pernešamas per jį (2 pav.). Pirmajame etape Sec kompleksas atpažįsta signalinę seką. Šiam etapui Kar2 ir ATP nėra reikalingi. Pernešamam baltymui jungiantis su kanalu, signalinė seka įgauna spiralinę struktūrą, kuri įsistato tarp transmembraninių domenų, jų sąlyčio su membraniniais lipidais riboje. Kai kanalas yra uždaras ir nėra sekretuojamo baltymo, Sec61 komplekso subvienetas Sss1 veikia kaip surogatinė signalinė

seka. Sekretuojamo baltymo signalinė seka išstumia Sss1, prisijungia prie Sec61p ir atidaro kanalą. Tada vyksta antrasis pernašos etapas – baltymo pernešimas per translokono kanalą. Kar2 baltymas jungiasi prie į ET ertmę pernešamos polipeptido dalies ir neleidžia difunduoti atgal į citoplazmą. Kiekvieną kartą prie naujai pernešto per membraną baltymo segmento prisijungia nauja Kar2 molekulė. Kar2 ir pernešamo baltymo sąveika nėra specifiška, todėl gali būti pernešami įvairūs baltymai. Nors ši sąveika yra grįžtamas procesas, tačiau ji pakankamai ilga tam, kad nevyktų difuzija, ir netrukdo tolesnėms baltymo modifikacijoms. Kaip jau buvo minėta, Kar2 jungiasi su Sec63 baltymo J domenu, aktyvuojasi ir gali prisijungti prie pernešamo baltymo. Sąveikai reikalinga ATP energija. Taigi baltymo pernašą skatina Kar2 jungimosi bei atsipalaidavimo ciklai, susiję su ATP hidrolize (Osborne ir kt., 2005).

Ko-transliacinis baltymų pernašos kelias aptinkamas visuose eukariotuose. Aukštesniuose eukariotuose ląstelėse didžioji dalis polipeptidų, turėiančių kirsti ET membraną, yra transliuojami ir translokuojami tuo pat metu. Ko-transliaciniam baltymų pernešimui be Sec61 komplekso yra reikalinga SRP dalelė ir SRP receptorius. Signalą atpažįstanti dalelė (SRP) yra ribonukleoproteininė dalelė, būtina signalines sekas turinčių baltymų nukreipimui į eukariotų endoplazminį tinklą sekrecijai ar integracijai į membraną. Kotransliacinio baltymų pernešimo metu SRP atlieka tris pagrindines funkcijas: pirmiausia, ji prisijungia polipeptido, išeinančio iš ribosomos, signalinę seką, tada sustabdo elongaciją ir, galiausiai, prisijungia prie membraninių SRP receptorių, nukreipdamas ribosomos-peptido kompleksą į translokacijos kanalą (Halic ir Beckmann, 2005). Žinduolių SRP dalelė yra sudėtingas 7SL RNR ir 6 skirtingų baltymų (SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72) kompleksas. Mielėse *S. cerevisiae* visiškai nėra SRP9 baltymo, o vietoj SRP9/SRP14 heterodimero yra SRP14 homodimeras, todėl manoma, jog SRP9 išsivystė po geno duplikacijos (Mason ir kt., 2000). Eukariotuose esantys SRP receptoriai susideda iš dviejų subvienetų, kurie abu yra GTPazės. Už sąveiką su SRP atsakingas SR α subvienetas (*S. cerevisiae*

Srp101p), kuris laikosi prisitvirtinęs prie tipiško membraninio baltymo - SR β subvieneto (mielėse Srp102p). (SRP sandara ir kristalinė struktūra apžvelgta Wild ir kt., 2010; Ataide ir kt., 2011).

Ko-transliacinis, kaip ir po-transliacinis kelias, skirstomas į du etapus: signalinės sekos atpažinimą bei asociaciją su ET membrana (3 pav.).



3 pav. Kotransliacinė sekretuojamo baltymo transllokacija. (1 ir 2) Signalą atpažįstanti dalelė (SRP) prisijungia sintetinio polipeptido signalinę seką ir ribosomą. Šviesiai mėlyna spalva žymi ribosomos didįjį subvienetą, rausva – mažąjį. (3) Susidaręs kompleksas yra nukreipiamas į ET membraną SRP sąveikos su SRP receptoriu dėka. (4 ir 5) SRP atpalaiduojamas, o ribosoma prisikabina prie Sec61 komplekso, formuojančio transllokacijos kanalą. Polipeptidas įvedamas į kanalą kilpos pavidalu. Signalinė seka įstatoma į kanalo sienelę. (6) Polipeptidas iš ribosomos kanalo juda per transllokacijos kanalą į kitą membranos pusę (pagal Osborne ir kt., 2005).

Vykstant kotransliacinei pernašai pirmasis prie pernešamo baltymo signalinės sekos jungiasi SRP54 baltymas. SRP dalelė jungiasi su sintetinio baltymo signaline seka, kai polipeptido grandinės ilgis būna 51 – 64 aminorūgštys (Rapoport ir kt., 1996). SRP ir signalinės sekos sąveika padidina

SRP imlumą GTP. Susidaro SRP-ribosomos-polipeptido kompleksas. SRP9 ir SRP14 aukštesniuose eukariotuose sudaro heterodimerą (mielėse *S. cerevisiae* Srp9p homodimerą) stabdantį baltymo transliaciją ir padedantį pernešti ribosomą su sintetinamu baltymu į translokoną. SRP jungiasi prie SR α /SR β komplekso, esančio ET paviršiuje, o ribosoma – prie translokacijos vietos ET membranoje. SRP ir SR α sąveika sukelia GTP hidrolizę. To padarinyje SRP disocijuoja nuo ribosomos-polipeptido komplekso, grįžta į citozolį ir pradeda naują ciklą. Disocijavus SRP, transliacija atsinaujina. Tik dabar, ribosomai prisitvirtinus prie translokono, nauja seka yra nukreipiama į transmembraninį kanalą. Taip yra išvengiama neteisingai susivyniojusių baltymų agregatų susidarymo ir kaupimosi citoplazmoje, nes sintetinas baltymas iš karto keliauja per endoplazminį tinklą, neturėdamas sąlyčio su citoplazma (Osborne ir kt., 2005). Žinduoliuose ko-transliacinio baltymų pernešimo į ET metu yra reikalingas ir TRAM1 baltymas, neturintis homologo mielėse *S. cerevisiae*. TRAM1 perneša signalinę sintetinamo baltymo seką nuo SRP dalelės į ET membranos translokoną. Ar TRAM1 dalyvaus pernašoje, priklauso nuo pernešamo baltymo signalinės sekos (Voigt ir kt., 1996). Kar2 (Bip) šaperonas reikalingas pilnai substratų translokacijai į ET ertmę tiek šiai vykstant potransliaciniu, tiek kotransliaciniu keliu. Jis ne tik neleidžia polipeptidui judėti transmembraniniu kanalu atgal, bet ir yra atsakingas už translokono uždarymą pasibaigus pernešimui (Agarraberes ir Dice, 2001)

Sekretuojami baltymai endoplazminio tinklo membranose arba ertmėje gali būti modifikuojami penkiais principiniais būdais: (a) formuojantis disulfidiniams tilteliams; (b) tinkamai suvyniojant; (c) modifikuojant ar/ir pridėdant angliavandenius; (d) proteolitiškai skaldant; (e) baltymų monomerams asocijuojantis į multimerus. Baltymų glikozilinimas vyksta ir Goldžio aparate (GA). Tik teisingai susivynioję baltymai yra transportuojami į GA, o iš ten – į galutinį tikslą ląstelėje ar už jos ribų. ET veikia sudėtinga kontrolės sistema, atskirianti neteisingai subrandintus baltymus. Tokie baltymai per translokoną yra pernešami atgal į citoplazmą ir suskaidomi proteosomose (Kleizen ir Braakman, 2004).

Baltymai, patekę į endoplazminį tinklą, susiduria su aplinka labai skirtinga nei citoplazmoje ir skirta skatinti baltymų susivyniojimą. ET yra ne tik didesnė Ca^{2+} jonų koncentracija (1mM, citoplazmoje 100nM), bet ir labiau oksiduojanti aplinka (oksidacijos-redukcijos potencialas -230mV, citoplazmoje -150mV) (apžvalgai Fewell ir kt., 2001). Taip pat ET aptinkama ir didelė koncentracija pagalbinių baltymų, reikalingų sekretuojamų baltymų teisingam susilankstymui. Pagrindinis ET šaperonas yra Hsp70 šeimos baltymas GRP78/BiP (mielėse *S. cerevisiae* – Kar2p). BiP jungiasi prie visiškai nesusiklosčiusių polipeptidų, kai tuo tarpu kiti ET šaperonai jungiasi jau prie dalinai susilanksčiusių baltymų. BiP, kaip jau minėta, ne tik svarbus vykstant baltymų pernešimui į ET, bet ir atlieka daug kitų funkcijų: (a) skatina baltymų susilankstymą ir oligomerizaciją (Haas ir Wabl, 1983); (b) reguliuoja mutavusių polipeptidų agregaciją (Puig ir Gilbert, 1994); (c) palaiko Ca^{2+} jonų koncentraciją (Lievremont ir kt., 1997); (d) yra svarbus nukreipiant neteisingai susiklosčiusius baltymus nuo ET priklausomu degradacijos keliu (*angl. ERAD – Endoplasmic reticulum associated degradation*) (Cabral ir kt., 2002); (e) dalyvauja formuojant ląstelės atsaką į neteisingai susivyniojusių baltymų sukeltą stresą (Marciniak ir Ron, 2006). BiP apsaugo bręstančius polipeptidus nuo agregacijos jungdamasis prie hidrofobinių regionų. BiP pasižymi pakankamai mažu afiniškumu substratui, nors labiau jungiasi prie hidrofobinių ir aromatinių ar., kas rodo, kad jis gali jungtis prie labai plataus spektro baltymų. Kaip jau minėta, BiP yra ATPazė ir hidrolizuoja ATP prisijungdamas ir atsipalaiduodamas nuo bręstančių polipeptidų. ADP prisijungimas didina BiP afiniškumą, o ATP skatina prijungtų polipeptidų paleidimą. ATPaziniam BiP aktyvumui yra reikalingi įvairūs ko-faktoriai (Hsp40 baltymų šeima) ir nukleotidų pakeitimo faktoriai (Sli1 (Sli1p kepimo mielėse) ir GRP170 (Lhs1p mielėse *S. cerevisiae*)) (apžvalgai Hebert ir Molinari, 2007). Kitas svarbus ET šaperonas yra Hsp90 šeimos baltymas GRP94, kuris yra gausiausias glikobaltymas ET. BiP yra konservatyvus baltymas aptinkamas nuo mielių iki žinduolių, tuo tarpu GRP94 baltymas yra aptinkamas tik stuburiniuose (Lee, 2001). Nors aiški GRP94 funkcija nėra aiški, panašu, kad jis jungiasi prie

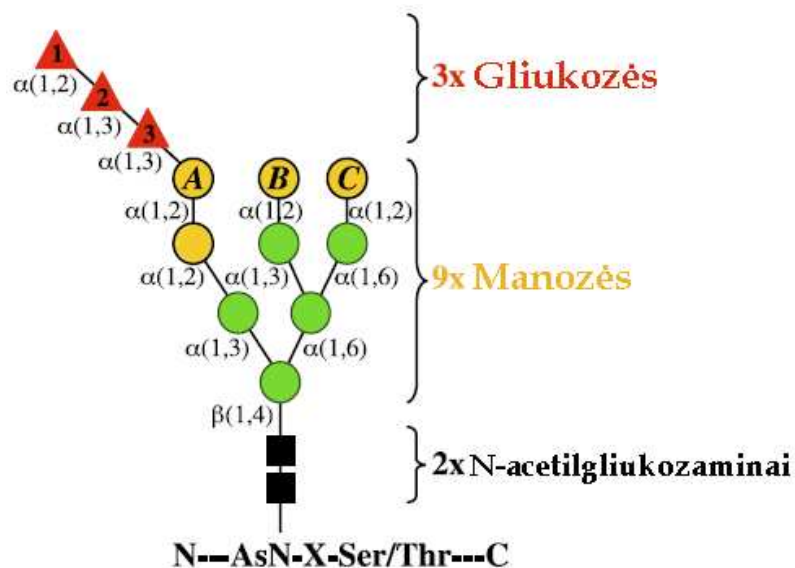
dalinai susilanksčiusių baltymų, kai šie yra paleidžiami BiP baltymo, ir skatina tolesnį jų brendimą. GRP94 veikimo mechanizmas taipgi nėra supastas. Panašu, kad GRP94 veikimui yra reikalinga ATP, bet pats baltymas nėra ATPazė. Taip pat skirtingai nei BiP, GRP94 veikimui nėra reikalingi ko-faktoriai (apžvalgai Hebert ir Molinari, 2007).

Teisingas disulfidinių tiltelių susidarymas yra esminis žingsnis daugelio sekretuojamų baltymų brendime. Disulfidinių tiltelių formavimasis vyksta labai greitai ir užtikrina teisingą baltymo tretinės struktūros susidarymą bei neleidžia sekretuojamam baltymui netvarkingai agreguotis. S-S tiltelių formavimąsi katalizuoja ET PDI (*angl. Protein Disulfide Isomerase*) šeimos oksireduktazės. Šie baltymai veikia kaip elektronų akceptorius oksidacijos reakcijose ar kaip elektronų donoriai redukcijos reakcijose. Taip pat PDI šeimos baltymai padeda panaikinti ne natyvias S-S jungtis ir sudaryti tinkamas (Wilkinson ir Gilbert, 2004). PDI šeimai priskiriami baltymai aktyviajame centre turintys CXXC domeną. Žinduolių PDI šeimą sudaro 19, o mielių *S. cerevisiae* 5 baltymai (Norgaard ir kt., 2001; Appenzeller-Herzog ir Ellgaard, 2008). Cisteino ar., esančios CXXC motyve, gali būti oksiduotoje ir redukuotoje būsenoje, priklausomai nuo to, kokioje reakcijoje dalyvauja. PDI šeimos baltymui katalizuojant disulfidinių tiltelių susidarymą bręstančiame polipeptide, cisteino ar. CXXC motyve būna susijungusios ir tarnauja kaip elektronų donoras, ko padarinyje S-S jungtis CXXC motyve yra redukuojama. Vykstant priešingai reakcijai, disulfidinių tiltelių panaikinimui, cisteino ar. CXXC veikia kaip elektronų donoriai ir suformuoja S-S jungtį. PDI šeimos baltymų aktyvumas, kuris priklauso nuo cisteino ar. būklės CXXC motyve, yra reguliuojamas aplinkos ir pagalbinių baltymų. Pagrindinis ir gyvybiškai svarbus toks baltymas yra Ero1 (kepimo mielėse Ero1p), kuris oksiduoja ir aktyvuoja PDI šeimos baltymus (Wilkinson ir Gilbert, 2004). PDI baltymai pasižymi labai plačiu substratų spektru ir nepasižymi afiniškumu kokiai nors sekai (Morjana ir Gilbert, 1991). Be to, parodyta, kad PDI šeimos baltymai turi šaperonams būdingą aktyvumą ir jungiasi prie neteisingai susivyniojusių baltymų bei apsaugo juos nuo agregacijos (Cai ir kt., 1994). Pagrindiniai

žinduolių ET PDI šeimos baltymai yra PDI (*S. cerevisiae* Pdi1p) ir Erp57. PDI yra vienas gausiausių ET baltymų ir pasižymi neįprastai dideliu stabilumu – pusamžis 7 dienas. PDI yra labiausiai oksiduotas baltymas ET ir yra pagrindinis S-S jungčių katalizatorius. PDI jungiasi prie daugumos į ET patekusių baltymų, tuo tarpu ERp57 tik prie glikozilintų polipeptidų. Tokį ERp57 substrato specifiškumą lemia teigiamai įkrautas regionas, kuris sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiais kalneksino ir kalretikulino P regionais (išsamiai apžvalgai Wilkinson ir Gilbert, 2004).

Sekretuojami baltymai, kurie nėra glikozilinami, po sąveikos su Hsp70, Hsp90 ir PDI šeimų baltymais ir įgiję tinkamą konformaciją yra nukreipiami tolesniu sekrecijos keliu į Goldžio aparatą. Tuo tarpu glikozilinami baltymai patenka į kalretikulino-kalneksino ciklą.

Dauguma baltymų, pereinančių sekrecijos kelią, patiria N-glikozilinimą. Glikozidinis ryšys yra sudaromas tarp keturiolika narių turinčios sacharidų grandinės ir asparagino ar. liekanos, esančios Asn-X-Ser/Thr sekoje (X – bet kokia aminorūgštis, išskyrus proliną). Cukrūs stipriai paveikia baltymo susiklostymą. Prie asparagino ar. liekanos prijungiamas polisacharidas yra sudarytas iš dviejų N-acetilgliukozaminų ir devynių manozių, išdėstytų trijose šakose (A, B ir C) ir trijų gliukozių, prisikabinusių prie A šakos manozės liekanos (4 pav.).

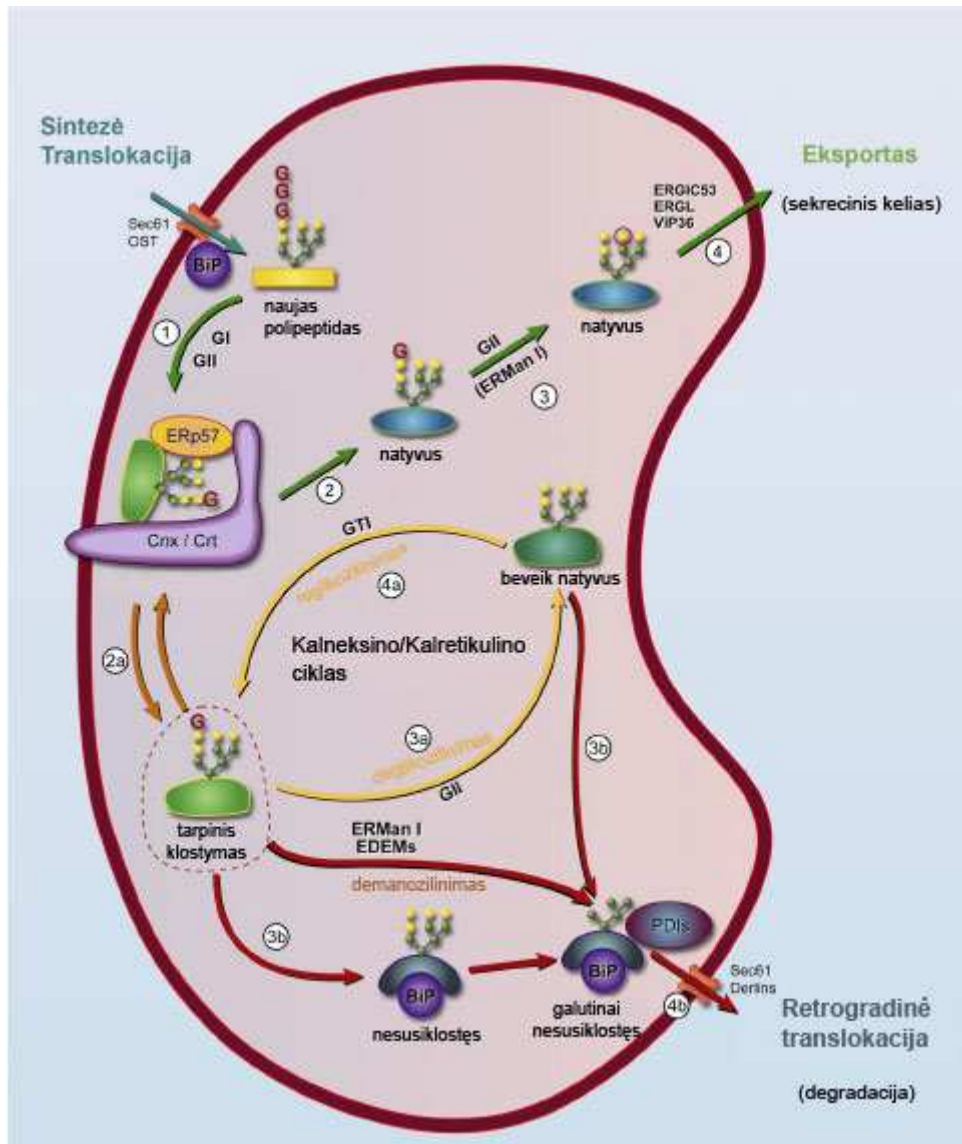


4 pav. Oligosacharido, ET prijungiamo prie asparagino ar. liekanos, schema. Juodi kubai – N-acetilgliukozaminai, žali ir geltoni rutuliukai – manozės, raudoni trikampiai – gliukozės. Šalia linijų – glikozidinės jungties tipas (pagal Hebert ir Molinari, 2007).

Polisacharidą nuo lipido dolicholio perneša oligosachariltransferazės kompleksas (OST), kuri yra susijungusi su Sec61 translokonu. OST gali turėti dvi skirtingas katalitinių subvienetų STT3 izoformas (Pearse ir Hebert, 2010). Neseniai nustatyta, kad žinduoliuose OST STT3A subvienetas vykdo ko-transliaciniu būdu į ET pernešamų polipeptidų glikozilinimą. STT3B izoforma taip pat reikalinga efektyviam ko-transliaciniu keliu pernešamų polipeptidų glikozilinimui, tačiau kitaip nei STT3A, ji dar tarpininkauja ir vykdant po-transliaciniu būdu į ET pernešamų substratų glikozilinimą (Ruiz-Canada ir kt., 2009). Mielės *S. cerevisiae* turi tik vieną STT3 šeimos baltymą – Stt3p. Po to, kai sacharidas OST yra pernešamas ant asparagino ar. liekanos, membranoje lokalizuota gliukozidazė I pašalina pirmąją gliukozę. Ši reakcija įvyksta labai staigiai ir padeda išvengti pakartotinės polipeptido asociacijos su OST bei leidžia pradėti baltymo lankstymą. Iš karto po to polisacharidas yra veikiamas tirpaus fermento gliukozidazės II, kuri pašalina antrąją gliukozę. Šie procesai inicijuoja glikozilinto polipeptido sąveiką su kalneksinu ir kalretikulinu. Oligosacharido modifikacijos veikia baltymo brendimo ET laikmačiu. Tai yra reikalinga norint išvengti neriboto neteisingai suklostytų baltymų buvimo

endoplazminiame tinkle, prisijungus prie kalneksino ir kalretikulino (Jakob ir kt., 1998). Šie šaperonai stabilizuoja klostymo procesus, užkerta kelią agregatų susidarymui bei palengvina disulfidinių tiltelių formavimąsi (Pearse ir Hebert, 2010). Kalneksinas (kepimo mielėse Cne1p) ir kalretikulinas yra homologiniai lektinai. Abu jie sąveikauja su glikozilintais baltymais, prieš gliukozidazei II pašalinant trečiąją gliukozę. Nors abiejų lektinų substratai iš dalies sutampa, tačiau jie nėra identiški: kalneksinas jungiasi prie daugumos glikobaltymų, o kalretikulino pasirinkimas kur kas siauresnis. Tais atvejais, kai abudu šaperonai jungiasi prie to paties glikobaltymo, jie arba jungiasi prie skirtingų oligosacharidų, arba daro tai skirtingose baltymo brendimo stadijose (Molinari ir kt., 2004). Lektinai, nekovalentiškai sąveikaudami su oksidoreduktaze ERp57, taip pat padeda formuotis disulfidiniams tilteliams.. Disulfidiniai tilteliai apriboja konformacinį baltymo lankstumą ir padidina struktūros stabilumą.

Klostymo procesas baigiasi kai lektinai atsiskiria nuo glikobaltymo ir gliukozidazė II pašalina trečiąją gliukozę. Glikozilinti polipeptidai, kurie nėra įgavę natyvios konformacijos, yra atpažįstami glikobaltymų kokybės kontrolės sensoriaus UGGT1 (UDP-gliukozės:glikoproteingliukoziltransferazės) ir iš naujo prijungia vieną gliukozę. Regliukozilintas substratas vėl jungiasi su lektiniais bei ERp57 ir iš naujo pereina kalretikulino-kalneksino ciklą (D'Alessio ir kt., 2010). Baltymai, taip ir neįgavę taisyklingos struktūros, yra gražinami į citozolį, ir degraduojami proteosomų. Teisingai susiklostę baltymai yra pernešami į kitus kompartmentus. Polipeptido klostymas ir kokybės kontrolės mechanizmas endoplazminiame tinkle parodyti paveiksle (5 pav.).



5 pav. Polipeptido klostymas ir kokybės kontrolės mechanizmas endoplazminiame tinkle. Naujai susintetinta polipeptidinė grandinė patenka į ET ertmę per Sec61 kompleksą. Jie yra glikozilinami oligosachariltransferazės (OST). Gliukozidazės I ir II (GI, GII) pašalina dvi galines gliukozės liekanas (1). Polipeptidas jungiasi su oksidoreduktaze ERp57 ir šaperonais kalneksinu ir/arba kalretikulinu. Dauguma glikopolipeptidų kalneksino/kalretikulino ciklą palieka įgavę natyvią konformaciją (2). Tokie glikobaltymai yra iš dalies demanozilinami, taip pat pašalinama paskutinė gliukozės liekana (3). Galiausiai jie supakuojami į transportines pūsleles ir palieka ET (4). Daliai naujai susintetintų glikoproteinų klostymas nesibaigia kalneksino/kalretikulino ciklu (2a). Tarpinį suklostymą įgavęs polipeptidas atsijungia nuo lektinų ir yra degliukozilinamas (3a), tačiau tolimesnį jo transportavimą inhibuoja UGGT1. UGGT1 vėl prijungia gliukozės liekaną (4a) tik prie tų polipeptidų, kurie yra įgavę artimą natyviai konformaciją. Šie vėl prisijungia prie kalneksino/kalretikulino ir yra klostomi iš naujo. Polipeptidai, turintys didelių klostymo defektų yra ignoruojami UGGT1 (3b), bet pritraukia BiP. Jie yra demanozilinami ir pašalinami iš ET degradacijai (4b) (pagal Hebert ir Molinari, 2007).

Eukariotinėse ląstelėse baltymus tarp sekretinio kelio organelių perneša transportinės pūslelės. Pernešami baltymai vadinami kroviniais (*angl. cargo*). Kroviniai yra koncentruojami besiformuojančioje pūslelėje, tada ši atsiskiria nuo donoro membranos, nukeliauja reikiamą atstumą ir galiausiai susilieja su akceptorine organele. Nustatyta, kad transportuojami baltymai iš ET į GA yra pernešami COPII pūslelėse, tuo tarpu COPI pūslelės dalyvauja ET baltymų gražinime iš GA. COPII apvalkalas yra sudarytas iš SAR1 GTPazės ir SEC23/24, SEC13/31 baltymų kompleksų (Springer ir Schekman, 1998). Sekretijos aparato baltymai yra labai konservatyvūs, tame tarpe ir COPII baltymai. Mielių ir žinduolių baltymų homologija yra 50-60% (Pagano ir kt., 1999). Taip pat buvo nustatyta, kad pūslelių formavimosi mechanizmas yra konservatyvus mielių ir žinduolių ląstelėse (Barlowe, 1998). Baltymus, esančius COPII pūslelėse, galima suskirstyti į tris grupes: pernešami baltymai (krovinys), krovinio receptoriai ir sekretijos aparato komponentai. Transportuojami baltymai gali būti tirpūs arba membraniniai.

Esant aktyviam transportuojamų baltymų sutelkimui sekretinėse pūslelėse, reikalingi receptoriai, kurie turėtų membraninį domeną ir ET ertmėje jungtusi su transportuojamu baltymu, o citoplazmine dalimi su pūslelės apvalkalo komponentais. Identifikuota grupė homologiškų baltymų, atitinkančių šiuos kriterijus, tai taip vadinami p24 baltymai. Mielių ląstelėse yra nustatyti aštuoni šios šeimos baltymai: EMP24, ERV25 ir ERP1-ERP6 (Muniz ir kt., 2000). Šiuo metu yra sudaryti trys modeliai, kurie paaiškina p24 šeimos baltymų funkciją, nukreipiant sekretuojamus baltymus į transportines pūsleles. Pagal vieną iš šių modelių p24 baltymai neįleidžia į pūsleles baltymų, kurie nėra sekretuojami. Kad transportuojamas baltymas patektų į pūslelę, jis turi išstumti p24 baltymą. Kita galimybė yra ta, kad p24 baltymai stabdo pūslelių formavimosi procesą. Todėl sekretuojami ir ET baltymai susiskirsto pagal jų giminingumą pūslelės baltymams. Galiausiai, biocheminiai tyrimai rodo, kad mielių ir žinduolių ląstelėse p24 baltymai sudaro sancaupas membranose. Citoplazminėje membranos pusėje p24 dalys gali veikti pūslelės apvalkalo baltymų agregacijos iniciatoriumi, o ET ertmėje gali sąlygoti sekretuojamų

baltymų kaupimąsi. Kitu potencialiu receptoriu gali būti manozei specifiškas lektinas ERGIC53/58. Šis baltymas taip pat cirkuliuoja tarp ET ir GA, nes baltymo citoplazminėje dalyje turi dviejų ar. motyvą, dalyvaujantį sąveikoje su COPI apvalkalu, ir yra susijęs su glikoproteinų transportu iš ET (Pagano ir kt., 1999).

COPII pūslelės formavimasis vyksta etapais. Pirmiausia SEC12 aktyvuoja SAR1 GTPazę. Tada SAR1 ir SEC23 kompleksas sudaro kompleksą ant ET membranos citoplazminio paviršiaus. Galiausiai prisijungia SEC13 kompleksas, sąlygodamas membranos įlinkimą, ir pūslelė atsiskiria nuo ET (Barlowe, 1998). Pasiekusios GA pūslelės turi netekti savo apvalkalo, kad galėtų susijungti su GA membrana. Šis procesas skatinamas SEC23 baltymui aktyvuojant SAR1 GTPazinį aktyvumą. Įvykus GTP hidrolizei, pūslelės apvalkalas disocijuoja (Wieland ir Harter, 1999).

COPII ir COPI pūslelėse aptinkami v-SNARE (*angl. vesicle soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors*) baltymai (Barlowe, 1998). Jie irgi dalyvauja membranų susiliejime.

Goldžio aparatas atlieka dvi sekreciniam keliui svarbias užduotis. Pirma, jis išskirsto krovinį į įvairias ląstelės vietas. Antra, didžioji dalis baltymų, pereidami GA yra modifikuojami. Viena svarbiausiu modifikacijų – sekretuojamų baltymų glikozilinimas (Ungar, 2009). Skiriamas dviejų tipų glikozilinimas: O-glikozilinimas ir N-glikozilinimas. O-glikozilinimas vyksta prijungiant angliavandenius prie serino ar treonino ar. liekanų hidroksilinių grupių. Apie šio tipo glikozilinimo mechanizmą bei jo biologinę rolę žinoma mažai. Tuo tarpu N-glikozilinimas yra būtinas baltymo funkcionavimui. Kaip jau minėta, N-glikozilinimas prasideda endoplazminiam tinkle (Wildt ir Gerngross, 2005). Iš ET atkeliavusi glikozilinta struktūra $Man_8GlcNAc_2$ yra toliau modifikuojama GA esančių glikozidazių ir glikoziltransferazių. Reakcijos, katalizuojamos įvairių šių fermentų kombinacijų, sukuria labai didelę oligosacharidinių struktūrų įvairovę. Šios struktūros gali būti skirstomos į tris kategorijas: (a) turinčius daug manozės, (b) kompleksinius ir (c) hibridinius oligosaharidus. Galutinė oligosacharido struktūra priklauso nuo

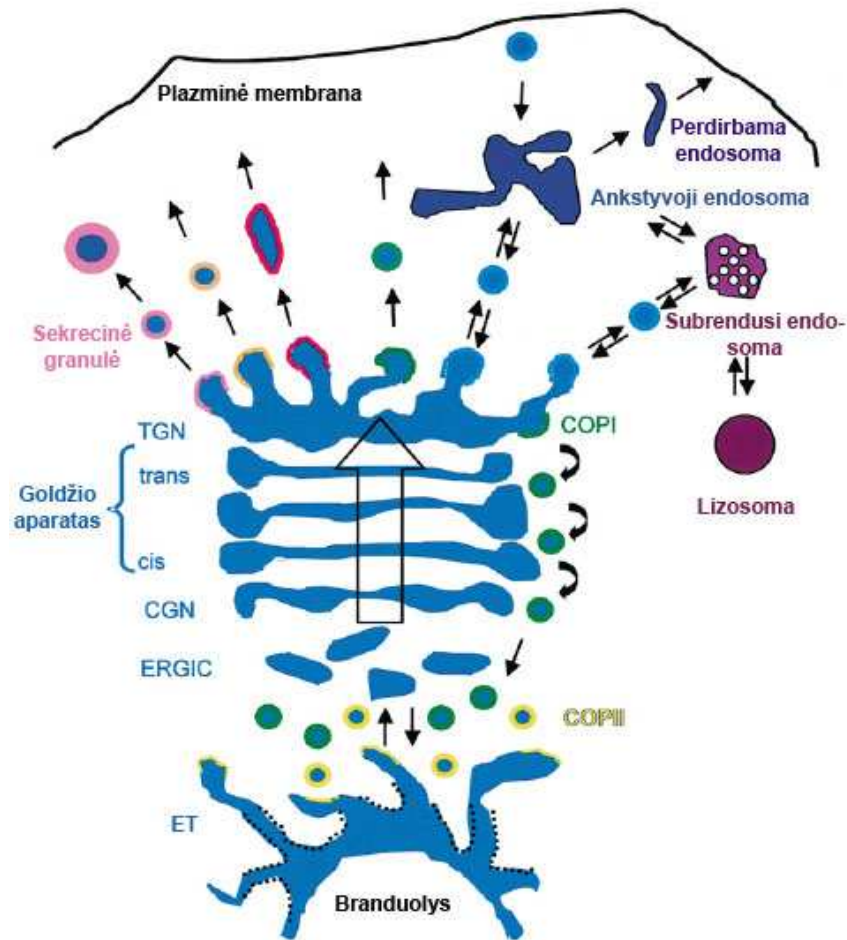
daugelio veiksnių, tokių kaip baltymo seka, organizmo, ląstelės tipas, įvairių fermentų lokacija ir aktyvumas, substratų prieinamumas. Jei $Man_8GlcNAc_2$ grandinė nėra apkarpoma manozidazės I, ar apkarpoma tik dalinai, gaunama daug manozės turinti struktūra. Tokios struktūros egzistuoja keliuose specifiniuose žinduolių baltymuose ir yra panašios į struktūras paplitusias žemesniuosiuose eukariotuose (Ungar, 2009). Manozinė struktūra gali patirti tolesnę modifikaciją, kai N-acetilgliukozaminiltransferazė (GlcNAc-TI) prie oligosacharido grandinės prijungia acetilgliukozaminą. Toks produktas gali tapti kompleksiniu arba hibridiniu oligosacharidu. Kompleksinė forma gaunama pašalinus dvi manozės liekanas ir GlcNAc-TII pridėjus dar vieną N-acetilgliukozaminą (van Vliet ir kt., 2003). Prie gauto junginio dar prijungus galaktozę, sialo rūgštį ir/ar fukozę, gaunama galutinė kompleksinio oligosacharido struktūra. Trečioji forma, hibridinis oligosacharidas, yra manozinio ir kompleksinio tipų mišinys. Jis gaunamas GlcNAc-TIII pridėjus trečią N-acetilgliukozaminą prie manozės liekanos (Ungar, 2009).

Oligosacharidai ne tik stabilizuoja baltymų, prie kurių yra prisijungę, struktūrą, padeda atlikti jų išrūšiuojimą bei kokybės kontrolę, bet ir turi keletą specifinių funkcijų. Net ir nedidelės oligosacharidų struktūros klaidos gyvūnų bei žmonių ląstelėse gali lemti įvairius sutrikimus bei ligas (Ungar, 2009). Mielėse vyraujantis daugiamanozinis glikozilinimo tipas skiriasi nuo žmonėse aptinkamo kompleksinio ar hibridinio glikozilinimo tipo, todėl mielių panaudojimo gaminant terapinius glikoproteinus žmogui galimybės yra ribotos (Wildt ir Gerngross, 2005).

Kaip vyksta baltymų transportas GA viduje, iki šiol tiksliai nežinoma. Yra sukurti keli modeliai, aiškinantys šį procesą (Mironov ir kt., 2005). Anterogradinis pūslelinis transporto modelis teigia, kad Goldžio cisternos yra statiškai kompartmentai, o krovinį iš vieno kompartmento į kitą perneša anterogradinės pūslelės. Pagal šį modelį, baltymus komplekso viduje perneša COPI pūslelės. Cisterninės progresijos/brendimo modelis siūlo teoriją, kad nešikliai, gabenantys krovinį iš ET į GA, prisijungia prie Goldžio komplekso ir išlaisvina turinį (krovinį ir membranas) į komplekso vidų. Tai sukelia jungčių

tarp gretimų cisternų formavimasi. Dėka šių jungčių persiskirsto tarpinių kompartmentų membranos. Dalis tarpinių kompartmentų membranų formuoja naujas cisternas, o kita dalis praplečia jau esančias cisternas. Krovinio progresija prasideda kai ima formuotis naujos cisternos GA cis-poliuje ir imamos naudoti subrendusios cisternos trans-poliuje. Krovinio progresija baigiasi, kai jis pasiekia trans-Goldžio tinklą (*angl. trans-Golgi network, TGN*), kur yra išstumiamas į nešiklius ir nugabenamas į plazminę membraną (Mironov ir kt., 2005). Kaip jau minėta anksčiau, nei vienas iš pateiktų modelių negali būti patvirtintas teisingu. Gali būti, kad tiek pūslelinis transportas, tiek cisterninio brendimo transportas vyksta paraleliai. Siūloma dar viena teorija, kad didelės molekulės ir baltymų agregatai yra per dideli, kad tilptų į pūsleles, todėl yra transportuojami bręstančioje cisterneje, o pūslelės greituoju būdu perneša per GA mažesnę krovinį. Panašu, kad skirtingi transporto keliai yra taikomi skirtingiems baltymams (van Vliet ir kt., 2003).

Tyrimai su mielėmis atskleidė, kad yra keli transporto iš GA keliai ir mažiausiai du tipai pūslelių, gabenančių baltymus į ląstelės paviršių. Vienas kelias yra tiesioginis, o kitas vyksta per endosomas. Ne gana to, baltymai į endosomas gali būti išrūšiuojami taip pat keliasi būdais (Bowers ir Stevens, 2005). Trans-Golžio tinkle (TGN) baltymai išskirstomi į daugybę ląstelės vietų: bazolateralinę ir epikalinę plazmines membranas, sekrecines granules, endosomas. Baltymai, ruošiami sekrecijai, TGN supakuojami į sekrecines granules. Subrendusios sekrecinės granulės kaupiamos citozolyje tol, kol ląstelė gauna signalą išlaisvinti šių turinį. Signalas iššaukia signalinių granulių transportą ir susiliejamą su plazmine membrana. Taip krovinys išskiriamas į ląstelės paviršių (van Vliet ir kt., 2003). 6 paveiksliuke pavaizduoti sekrecinis ir endocitinis keliai.



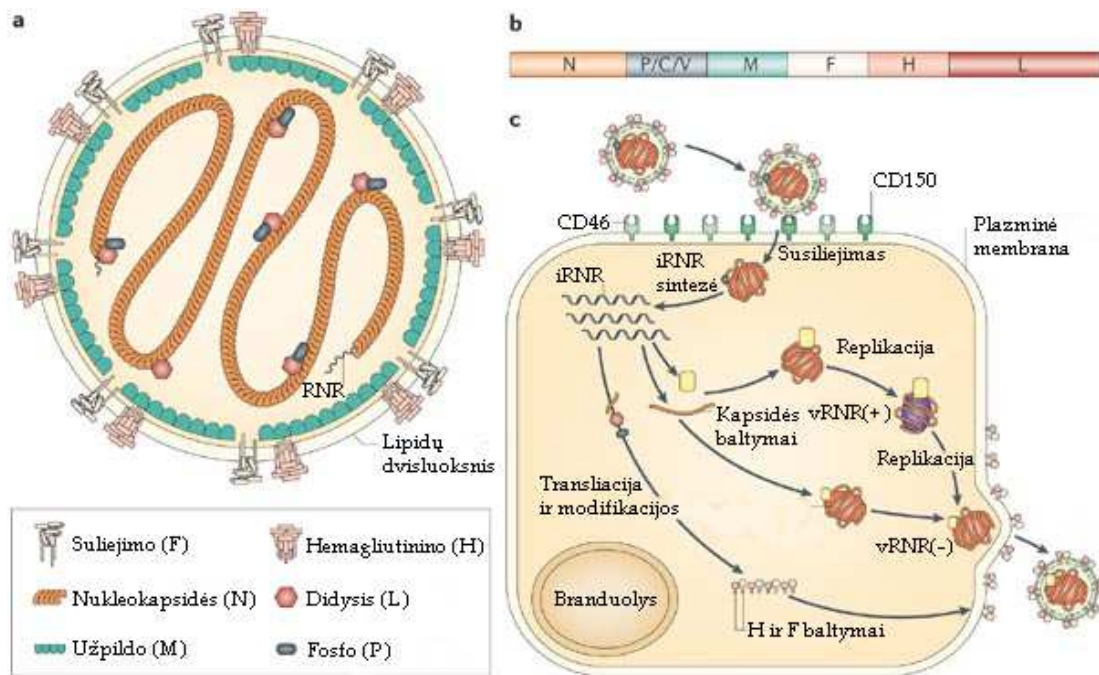
6 pav. Sekretinis ir endocitinis kelias. Sekretuojami baltymai ET yra supakuojami į COPII pūsleles. Jos susilieja ir tampa ET-Goldžio tarpiniu kompartmentu ERGIC (*angl. ER-Golgi intermediate compartment*). Susiliejus daugybei ERGIC susidaro cis-Goldžio tinklas (CGN). COPI pūslelės perneša baltymus iš GA į ET. Trans-Goldži tinkle (TGN) krovinys yra išrūšiuojamas ir pūslelių bei nešiklių transportuojamas į reikiamas vietas. Citoplazminėje membranoje baltymai endocituoja ir transportuojami į ankstyvąją endosomą. Ji perneša baltymus į ląstelės paviršių, o vėlyvoji endosoma – į lizosomą ar TGN (pagal van Vliet ir kt., 2003).

1.3 Tymų viruso hemagliutinino baltymas

Tymų virusas (TV) priskiriamas *Paramyxoviridae* virusų šeimai, *Paramyxovirinae* pošeimiui, *Morbilivirus* genčiai. *Paramyxoviridae* šeimai priklausantys virusai sukelia nemažai gerai žinomų ir paplitusių žmogaus ir gyvūnų ligų: tymus, kiaulytę, kvėpavimo takų ligas, galvijų marą. Tymai iki šiol yra viena pagrindinių vaikų mirtingumo nuo infekcinių ligų priežasčių

besivystančiose šalyse. Pasaulyje jaunesnių nei 5 metų vaikų mirtys nuo tymų viruso sudaro 5% visų mirčių. Pavojinga ne tik pati liga, pasireišianti karščiavimu, kosuliu, išbėrimu, bet ir jos komplikacijos: perėjimas į chronišką formą ir ypač – autoimuninės nervinės ligos. Tačiau persirgus, imunitetas prieš TV susidaro visam gyvenimui (Moss ir Griffin, 2011). Vienintelis natūralus tymų viruso šeimininkas yra žmogus.

TV, kaip ir kitų *Paramyxoviridae* šeimai priklausančių virusų, genetinę informaciją koduoja linijinė nesegmentuota viengrandė neinfekcinė 16 kb ilgio (-) vRNR. Ji tarnauja matrica informacinės RNR bei komplementarios genominei (+) vRNR grandinės, būtinos viruso replikacijai, sintezei (7 pav. C). Genetinė medžiaga supakuota kairiojo sukimo spiralinėje iš nukleokapsidės (N) baltymo sudarytoje nukleokapsidėje, prie kurios prisijungę replikacijai reikalingi viruso baltymai didysis (L) ir fosfobaltymas (P) bei nežinomos funkcijos C ir V baltymai. Nukleokapsidę dengia struktūriniai viruso baltymai – iš viruso užpildo (M) baltymo sudarytas apvalkalėlis bei dvigubas lipidinis sluoksnis, susiformuojantis iš šeimininko ląstelių plazminės membranos, ir į jį įsiterpę suliejimo (F) bei hemagliutinino (H) baltymai (7 pav. A) TV genų eiliškumas genome 3'→5' kryptimi yra toks: N, P/C/V (persiklojantys atviro skaitymo rėmeliai), M, F, H, L (7 pav.B) (Griffin, 2007).



7 pav. Schematinė tymų viruso sandara (A), genų transkripcijos eiliškumas (B) ir replikacijos schema (C). Virusus gaubia dvisluoksnis lipidinis apvalkalas, kuris sudarytas iš šeimininko ląstelės plazminės membranos ir joje įsiterpusių viruso glikoproteinų. Po lipidų dvisluoksniu yra vidinis virusinis apvalkalas, sudarytas iš viruso M baltymo. Viriono viduje yra vidinė nukleokapsidinė šerdis, kuri talpina apie 16 kb ilgio viengrandį (-) vRNR genomą. N baltymas su RNR sudaro šerdies struktūrą, prie kurios prisiriša P ir L baltymai (A). Tymų viruso genomine vRNR(-) tarnauja kaip matrica iRNR bei komplementarios genominei (+) vRNR grandinės, būtinos viruso replikacijai, sintezei. Prie (-)vRNR jungiasi N, L ir P baltymai ir suformuoja nukleokapsidę. Tolesnis viriono susidarymo etapas vyksta ląstelės paviršiuje, kur nukleoproteinas apsigaubia apvalkalu. Ląstelės plazminėje membranoje jau yra išitvirtinusios paviršinių virusinių glikoproteinų ir užpildo baltymo sancaupos, kurios patenka į viriono sudėtį (C) (pagal Moss ir Griffin, 2006).

Tymų virusas turi du integralinius membranos baltymus: hemaaglutinino baltymą (H) ir suliejimo baltymą (F). H ir F baltymai yra esminiai viruso patogenezei. *Morbilivirus* genties H baltymas gali sukelti primatų eritrocitų agliutinaciją, bet jis neturi žymaus neuraminidazės ar esterazės aktyvumo, todėl, skirtingai nei kitų *Paramyxoviridae* šeimos virusų, šioje gentyje jis vadinamas tik hemaaglutininu. Tymų virusas gali infekuoti tik nedaugelio tipų primatų ląsteles, nes, kitaip nei kitų *Paramyxoviridae* šeimos virusų, sialo rūgštis nėra jo receptorių. Jo prisirišimui prie infekuojamos ląstelės yra būtina baltymų sąveika, nes pereiti ląstelės membraną pasinaudodamas glikolipidais tymų virusas negali. Nustatyta, kad tymų virusas turi specifinius ląstelės

receptorius – glikobaltymus CD46 ir SLAM (CD150) (*angl. signaling lymphocytic activation molecule*) (Lamb ir Kolakofsky, 2007). Įdomu, kad laukiniai tymų viruso kamienai daugiausiai naudoja SLAM receptorių patekimui į ląstelę, tuo tarpu tymų viruso vakcinoms naudojami kamienai (Edmonston ar Halle) dėl hemagliutinino baltyme įvykusių kelių aminorugščių pakaitų dažniausiai naudoja CD46 receptorių (apžvalgai Dhiman ir kt., 2004). Po prisijungimo prie ląstelės tymų virusas sulieja savo apvalkalą su šeimininko plazmine membrana, o pagrindinis šiame procese dalyvaujantis baltymas yra suliejimo glikobaltymas F.

Tymų viruso hemagliutininas (TVH) yra 617 ar. ilgio II-o tipo integralinis membranos baltymas. Baltymo N gale esanti hidrofobinė sritis (1-148 ar.) veikia kaip signalinis ir kartu membranoje įtvirtinantis domenas, nukreipiantis sintetinamą ribosomoje baltymo grandinę į endoplazminio tinklo membraną bei stabiliai išlaikydamas sąsają su lipidų dvisluoksniu, vykstant baltymo pernešimui membranos paviršiumi (Lamb ir Kolakofsky, 2007). H susivynioja ir dimerizuojasi endoplazminiame tinkle. Imunoprecipitacijos eksperimentai parodė, kad žmogaus ląstelių ET, TVH baltymas sąveikauja su BiP/GRP78, kalneksino ir kalretikulino šaperonais (Bolt, 2001). TVH turi 13 cisteino ar. liekanas, lokalizuotas iš membranos kyšančioje išorinėje srityje. Mutagenezės tyrimais nustatyta, kad septynios iš jų yra svarbios oligomerizacijai bei susivyniojimui, turbūt sudaro tarp- ir vidu-molekulinius disulfidinius ryšius (Hu ir Norrby, 1994). H baltyme rasti penki potencialūs N-glikozilinimo taikiniai, iš kurių keturi yra glikozilinami, o penkto glikozilinimas būna nevienodas ir dėl to PAA geliuose dažnai yra stebimos dvi šio baltymo juostos. Glikozilinimas yra būtinas tiksliai konformacijai, antigeniškumui, dimerizacijai ir H pernešimui į Goldžio aparatą (Ogura ir kt., 1991). Kai monomeras įgauna išbaigtą konformaciją prasideda jo sąveika su kitu monomeru ir susidaro oligomeras. Už baltymo dimerizaciją atsakingas tarp molekulių susidarantis Cys154-Cys154 disulfidinis tiltelis. Tik teisingai susivynioję ir susijungę baltymai yra išgabenami iš endoplazminio tinklo. Goldžio aparate iš daugelio manozijų sudarytos angliavandenių grandinės

modifikuojamos į žinduoliams būdingo sudėtingo N-glikozilinimo tipo struktūras. Galiausiai glikoproteinai yra perkeltami į plazminę membraną (Hu ir kt., 1994b). Ląstelės ar viriono paviršiuje H glikobaltymai sudaro tetramerus, susidedančius iš disulfidiniais tilteliais susirišusių homodimerų (Griffin, 2007).

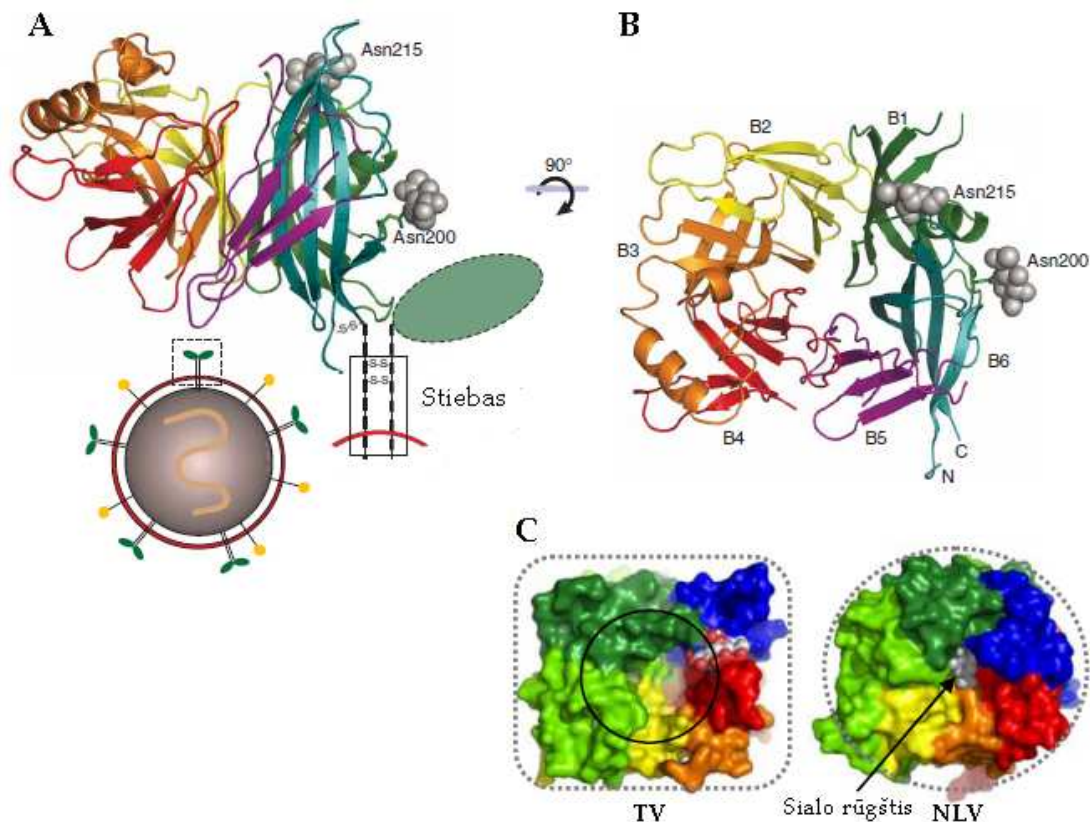
TVH yra pagrindinis tymų viruso antigeninis determinantas. Svarbiausi tymų virusą neutralizuojantys antikūnai susidaro prieš TVH baltymą. Antikūnų konkurencinio prisijungimo eksperimentai parodė, kad antikūnai atpažįsta 10 TVH baltymo epitopų, kurių dalis dalinai persidengia (11 pav. C). Parodyta, kad didžioji dalis neutralizuojančių antikūnų atpažįstamų TVH baltymo epitopų yra konformacinio pobūdžio (Bouche ir kt., 2002). Nustatyti 2 TVH baltymo domenai, kurie yra pagrindiniai neutralizuojančių antikūnų taikiniai. Prie TVH baltymo 380-400 ar. sudaromos kilpos jungiasi neutralizuojantys, hemagliutinacinį TVH poveikį slopinantys ir apsaugantys antikūnai. Tuo tarpu prie domeno, kurį sudaro 2 ir 3 β klosčių viršutinės kilpos jungiasi tik neutralizuojantys antikūnai. Manoma, kad tai su SLAM receptoriumi sąveikaujanti TVH baltymo dalis (Ertl ir kt., 2003). Tai buvo patvirtinta nustatčius tretinę TVH baltymo struktūrą (11 pav.) (Hashiguchi ir kt., 2007).

Kristalinė pilno TV hemagliutinino struktūra nėra nustatyta, tačiau trimatės struktūros modeliavimas leidžia teigti, kad baltymo N-galas sudaro stiebą, palaikantį ant jo susivyniojusią globulinę β -propelerio struktūrą (8 pav.). Ją sudaro 6 antilygiagrečios iš 4 vijų vienodai sulenktos β klostės, kurios formuoja cilindrą. β klostės tarpusavyje sujungtos konservatyviai: ketvirta kiekvienos klostės gija jungiasi su pirma kitos klostės gija. Klostės apie cilindro ašį išsidėsčiusios ratu, kaip mentės propeleryje (Langedijk ir kt., 1997).



8 pav. TVH baltymo struktūrų diagrama. Viršutinės dalys žymi β -propelerį, kuriame šeši lakštai pažymėti stačiakampiais. Stiebu pažymėtos sritys, jungiančios globulę su transmembranine sritimi (TM). Polipeptidų grandinių kryptis pažymėta rodyklėmis (pagal Langedijk ir kt., 1997).

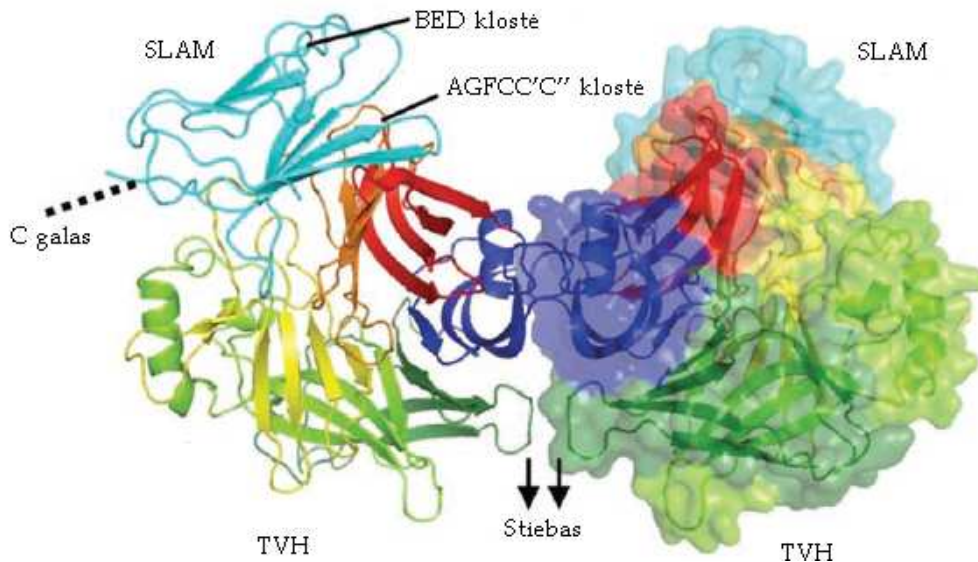
Kristalinė globulinės TVH baltymo dalies („galvos“) struktūra nustatyta 2007 metais (9 pav.) (Colf ir kt., 2007; Hashiguchi ir kt., 2007). Struktūra patvirtino kompiuteriniu modeliavimu numatytą TVH baltymo globulinės dalies struktūrą (8 pav.) Su receptoriumi sąveikaujančią „galvos“ sritį, formuojančią homodimerą, sudaro kubo formą primenantis β klosčių propeleris. Tuo jis skiriasi nuo kitiems *Paramyxoviridae* šeimos virusams būdingų H baltymų, kurių globulinę dalį formuojantis β klosčių propeleris sudaro sferą (9 pav. C). Dėl prijungtų angliavandenių, homodimerą formuojančios molekulės išsilenkia viena nuo kitos link horizontalios plokštumos (Colf ir kt., 2007; Hashiguchi ir kt., 2007).



9 pav. Tymų viruso hemagliutinino baltymo globulinės dalies tretinė struktūros schema. Tretinės TVH baltymo globulės, kurią formuoja 6 β klostės (B1-B6) sudarytos iš 4 vijų, struktūros schema iš šono (A) ir viršaus (B). Asn215 ir Asn200 bei pilki rutuliukai žymi polisacharidus, nustatytus kristalinėje baltymo struktūroje, prijungtus prie 200 ir 215 padėtyse esančių asparagino ar. liekanų. Tymų viruso H baltymo (C TV) ir Niukaslio ligos viruso HN baltymo (C NLV) globulinių dalių paviršiaus diagrama žiūrint iš viršaus (pagal Colf ir kt., 2007; Hashiguchi ir kt., 2007).

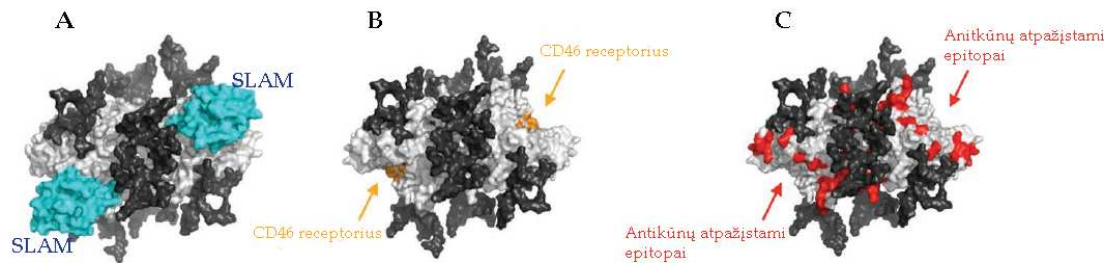
Neseniai buvo nustatytos TVH baltymo globulinės dalies struktūros kartu su CD46 ir SLAM receptoriais (Santiago ir kt., 2009; Hashiguchi ir kt., 2011). Struktūros parodė, kad už sąveiką su CD46 receptoriais yra atsakinga TVH baltymo B5 ir B6 klostės (9 pav. B). CD46 glikobaltymo SCR1 sritis įsiterpia į B5 ir B6 klosčių formuojamą hidrofobinę „kišenę“. Sąveika pakeičia TVH baltymo konformaciją ir yra sutvirtinama įvairiomis jungtimis tarp gretimų CD46 ir TVH aminorūgščių liekanų (plačiau Santiago ir kt., 2009). Tuo tarpu TVH sąveikos su SLAM receptoriais metu susidaro 4 sąveikos zonos tarp TVH baltymo B4, B5 ir B6 klosčių išorinių aminorūgščių liekanų ir SLAM receptoriaus A, G, F ir C vijų formuojamos β klostės, o TVH baltymo struktūra nepakinta (10 pav.). Sąveikos metu tarp TVH ir SLAM ar. liekanų

susidaro druskų tilteliai, hidrofobinės jungtys, tarpmolekulinė β klostė bei sąveikos tarp aromatinių aminorūgščių liekanų (išsamiau Hashiguchi ir kt., 2011)



10 pav. Tymų viruso hemagliutinino baltymo dimero globulinės dalies tretinė struktūros schema sąveikoje su SLAM receptoriais. Homodimero schema (kairėje) ir paviršiaus diagrama (dešinėje) žiūrint iš šono (pagal Hashiguchi ir kt., 2011).

Nustačius tretinę glikozilintos TVH baltymo globulės struktūrą (9 ir 10 pav.) parodyta, kad didelę dalį H homodimero paviršiaus ploto dengia angliavandeniai (11 pav. A). Didžiausią β propelerio paviršiaus plotą užima angliavandeniai prisijungę prie 215 padėtyje esančios asparagino ar. liekanos (Asn215) (Hashiguchi ir kt., 2011). Parodyta, kad N-acetilgliukozaminas prisijungęs prie Asn215 sąveikauja su Glu235, Met251, Asp283, Gly592 ir His593 ar. liekanomis ir stabilizuoja B1, B2 ir B6 klosčių konformaciją (Colf ir kt., 2007). Taip pat, prie TVH prisijungę angliavandeniai yra svarbūs TVH ir SLAM receptorių sąveikai (Hashiguchi ir kt., 2007).



11 pav. Tymų viruso hemagliutinino baltymo dimero globulinės dalies tretinė struktūros schema. Homodimero paviršiaus diagrama žiūrint iš viršaus. Juodi rutuliukai žymi angliavandenių grandines. A – SLAM receptoriaus prisijungimo vieta, B – CD46 receptoriaus prisijungimo schema, C – neutralizuojančių antikūnų atpažįstami epitopai (pagal Hashiguchi ir kt., 2011).

Beveik visas likęs angliavandenių neuždengtas TVH plotas yra reikalingas sąveikai su SLAM receptoriumi (11 pav. A). Tame pačiame TVH baltymo plote taip pat yra ir CD46 receptoriaus prisijungimo vieta bei neutralizuojančių antikūnų atpažįstami epitopai (11 pav. B ir C). Panašu, kad receptorių ir antikūnų atpažįstamos TVH baltymo dalys yra sutelktos labai nedideliame angliavandenių neuždengtame plote ir dalinai persidengia. Tai galėtų paaiškinti, kodėl pavienis antikūnas gali blokuoti viruso patekimą į ląstelę naudojant skirtingus receptorius. (Hashiguchi ir kt., 2011). Taip pat konservatyvi TVH ir SLAM bei CD46 receptorių sąveika bei persidengiančios nemaskuotos receptorių ir neutralizuojančių antikūnų atpažįstamos vietos paaiškina, kodėl tymų virusas nesugeba išvengti imuninio atsako, susidariusio infekcijos ar vakcinacijos metu, bei vis dar yra aptinkamas tik vieno serotipo (Griffin, 2007; Ruigrok ir Gerlier, 2007). Nustatyta TVH baltymo struktūra su aiškiai apibrėžtomis esminėmis baltymo dalimis, reikalingomis tymų viruso infekcijai, leidžia kurti naujos kartos vakcinas ir priešvirusinius vaistus.

2. Tyrimų metodika

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Visi šiame darbe naudoti reagentai yra aukščiausios prieinamos kokybės. Ruošiant tirpalus reagentai tirpinti vandenyje, jei darbe pateiktose metodikose nenurodyta kitaip.

2.1.2. Fermentai

Veršelio žarnų šarminė fosfatazė, DNR polimerazės, T4 DNR ligazė, RNRazėA, DNRazėI ir visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės buvo pagamintos UAB Fermentas (Lietuva) ir naudotos pagal gamintojo rekomendavimus (Fermentas, 2010-2011).

2.1.3 Oligonukleotidai PGR amplifikacijos reakcijoms

1. Žmogaus SRP72 geno padauginimui

SRP72 Fv 5'-ATATCTAGAATGGCGAGCGGCGGCAGCGG-3'
SRP72 Rv 5'-AGATCTAGATCACCCAGCCACCTTTTCCACC-3'

2. Žmogaus SRP68 geno padauginimui

SRP68 Fv 5'-ACATCTAGAATGGCTGCTGAGAAGCAGGTC-3'
SRP68 Rv 5'-AGATCTAGATTAGCTCCTGAATCCAAAGATG-3'

3. Žmogaus SRP54 geno padauginimui

SRP54 Fv 5'-AGATCTAGAACAATGGTTCTAGCAGACCTTGGAA-3'
SRP54 Rv 5'-CAGTCTAGATTACATATTATTGAATCCCATCATG-3'

4. Žmogaus SRP19 geno padauginimui

SRP19 Fv 5'-ACAAC TAGTATGGCTTGCACTGCCGCGCGG-3'
SRP19 Rv 5'-AGAAC TAGTTTACTTCTTTTTCTTTCTTTCC-3'

5. Žmogaus SRP14 geno padauginimui

SRP14 Fv 5'-AGATCTAGAATGGTGTTGTTGGAGAGCGAGC-3'
SRP14 Rv 5'-AGATCTAGATTACTGTGCTGCTGTTGCTGC-3'

6. Žmogaus SRP9 geno padauginimui

SRP9 Fv 5'-CTATCTAGAACAATGCCGCAGTACCAGACCTG-3'
SRP9 Rv 5'-CAGTCTAGATCACTCAGTTTCCATGGTAACATTG-3'

7. Žmogaus SRPR geno padauginimui

SRPR Fv 5'-AGATCTAGAATGCTCGACTTCTTCACC-3'
SRPR Rv 5'-ACATCTAGATTAAGCCTTCATGAGGGCAGC-3'

8. Žmogaus SRPRB geno padauginimui

SRPRB Fv 5'-AGATCTAGAATGGCTTCCGCGGACTCGCGC-3'
SRPRB Rv 5'-AGATCTAGATCAGGCAATTTTAGCCAGCC-3'

9. Žmogaus SEC61A1 geno padauginimui

SEC61A1Fv 5'-ATGTCTAGAACAATGGCAATCAAATTTCTGGAAG
TCATCAAGCCC-3'
SEC61A1Rv 5'-CAGTCTAGATCAGAAGAGCAGGGCCCCCATGC -3'

10. Žmogaus SEC61B geno padauginimui

SEC61B Fv 5'-AGATCTAGAATGCCTGGTCCGACCCCCAG-3'
SEC61B Rv 5'-AGATCTAGATTAAGAACGAGTGTACTTGC-3'

11. Žmogaus SEC61G geno padauginimui

SEC61G Fv 5'-AGATCTAGAATGGATCAGGTAATGCAGTTTG-3'
SEC61G Rv 5'-AGATCTAGATTAACCACCAACAATGATG-3'

12. Žmogaus TRAM1 geno padauginimui

TRAM1 Fv 5'-GTATCTAGAACAATGGCGATTCGCAAGAAAAG-3'
TRAM1 Rv 5'-CAGTCTAGATTATGAAGATTTCTCTTTTTTATTC -3'

13. Žmogaus HSPA5 geno padauginimui

HSPA5 Fv 5'-GTATCTAGAACAATGAAGCTCTCCCTGGTGG-3'
HSPA5 Rv 5'-CAGTCTAGACTACAACCTCATCTTTTTCTGCTGTA -3'

14. Žmogaus CANX geno padauginimui

CANX Fv 5'-GTATCTAGAACAATGGAAGGGAAGTGGTTGCTGT
GTATG -3'
CANX Rv 5'-CAGTCTAGATCACTCTCTTCGTGGCTTTCTGTTTCT
TGG-3'

15. Žmogaus CALR geno padauginimui

CALR Fv 5'-GTATCTAGAACAATGCTGCTATCCGTGCCGTTG-3'
CALR Rv 5'-CAGTCTAGACTACAGCTCGTCCTTGGCCTG-3'

16. Žmogaus P4HB geno padauginimui

P4HB Fv 5'-GTATCTAGAACAATGCTGCGCCGCGCTCTG-3'
P4HB Rv 5'-CAGTCTAGATTACAGTTCATCTTTTACAGCTTTCTG-3'

17. Žmogaus PDIA3 geno padauginimui

PDIA3 Fv 5'-GTATCTAGAACAATGCGCCTCCGCCGCCTAG-3'
PDIA3 Rv 5'-CAGTCTAGATTAGAGATCCTCCTGTGCCTTCTTC-3

18. Žmogaus HSPA5 geno suliejimui su mielių *S. cerevisiae* CNE1 ar OST1 transmembraninį domeną koduojančiomis sekomis (TM) ir serino bei glicino ar. stiebu (ST)

HSPA5rv_CNE_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGAGTAAGCACAAACAACATCTTTT
TCTGCTG-3'

HSPA5_ST_CNE_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGAGTAAGCACAAAAGACCCTCCGCC
ACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCGCCACCCGGACAACATCAT
CTTTTTCTGCTG-3'

HSPA5rv_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGCAACTCATCTTTTTTCTGCTG-3'

HSPA5rv_ST_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGAGACCCTCCGCCACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCG
CCACCCGGACAACATCATCTTTTTTCTGCTG-3'

19. Žmogaus CALR geno suliejimui su mielių *S. cerevisiae* CNE1 ar OST1 transmembraninį domeną koduojančiomis sekomis (TM) ir serino bei glicino ar. stiebu (ST)

CALRrv_CNE1_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGAGTAAGCACAAACAGCTCGTCCTTG
GCCTGGCC-3'

CALRrv_ST_CNE1_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGAGTAAGCACAAAAGACCCTCCGCC
ACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCGCCACCCGGACAGCTCGT
CCTTGGCCTGGCC-3'

CALRrv_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGCAGCTCGTCCTTGGCCTGGCC-3'

CALRrv_ST_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGAGACCCTCCGCCACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCG
CCACCGGACAGCTCGTCCTTGGCCTGGCC-3'

20. Žmogaus PDIA3 geno suliejimui su mielių *S. cerevisiae* CNE1 ar OST1 transmembraninį domeną koduojančiomis sekomis (TM) ir serino bei glicino ar. stiebu (ST)

PDIA3rv_CNE_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGCAGTAAGGAGATCCTCCTGTGCCTTC
TTCTTC-3'

PDIA3rv_ST_CNE_TM 5'-
ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGAACCGACGTCG
TCAAGAGCACGACGGCCGCAGTAAGCACAAAAGACCCTCCGCC
ACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCGAGATCCTCCTGTGCCTT
CTTCTTC-3'

PDIA3rv_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGGAGATCCTCCTGTGCCTTCTTCTTC-3'

PDIA3rv_ST_OST1_TM 5'-
ACATCTAGATCAGTTAGTTACGTTTCATGTTCAAAGTTTTTAAGAC
AAAAACTCCCATTAGTGCGGTGAAAATATAGCAAGCAATAGACA
GAGGAGACCCTCCGCCACCCGACCCTCCGCCACCTGACCCTCCG
CCACCGGAGAGATCCTCCTGTGCCTTCTTCTTC-3'

21. Žmogaus 7SL RNR detekcijai

7SLRNA Fv 5'-GCCGGGCGCGGTGGCGCGTGCCTGTAGTCC-3'
7SLRNA Rv 5'-AGAGACGGGGTCTCGCTATGTTGCCAGG-3'
7SLRNA130 Fv 5'-CAATATGGTGACCTCCCGGGAGCGG-3'
7SLRNA230 Rv 5'-CAGCACGGGAGTTTTGACCTGCTCCGTTTC-3'

22. Mielių *S. cerevisiae* CNE1 geno padauginimui

CNE1 Fv 5'-ACATCTAGAACAATGAAATTTTCTGCGTATTTATG-3'
CNE1 Rv 5'-ACATCTAGACTATGTAAATACTACACAACAAAGA-5'

23. Mielių *S. cerevisiae* PGK1 geno promotoriaus padauginimui

PGK1pr Fv 5'-TCCACTAGTAGCTTTCTTGATTAGGTTTATCAC-3'
PGK1pr Rv 5'-CTGTCTAGAGTATATTTGTTGTAAAAAGTAGATAA
TTAC-3'

24. Mielių *S. cerevisiae* *PGK1* geno terminatoriaus padauginimui

PGK1ter Fv 5'-CGATCTAGATCCCATGTCTCTACTGGTGGTGGT-3'
PGK1ter Rv 5'-CCTACTAGTAAGCTTTAACGAACGCAGAATTTT-3'

25. Mielių *S. cerevisiae* *TEF2* geno promotoriaus padauginimui

TEF2pr Fv 5'-ACAGAATTCCACCTGGGTGGCCAGATTGTGCGC-3'
TEF2pr Rv 5'-ACATCTAGAGTTTAGTTAATTATAGTTCG-3'

26. Mielių *S. cerevisiae* *TEF2* geno terminatoriaus padauginimui

TEF2ter Fv 5'-ACATCTAGAGAGTAATAATTATTGC-3'
TEF2ter Rv 5'-ACAGGATCCAGAAGTAATCTGGTATAATTTTC-3'

27. Mielių *S. cerevisiae* IGS2-RDN5-IGS1 lokuso padauginimui

IGS2 Fv 5'-GTTTAAACGCCGGCGCGGCCGCGATCGCGAAGTAC-3'
IGS1 Rv 5'-GTTTAAACGCCGGCGCGGCCGCGATCGCTTTTATT-3'

28. Mielių *S. cerevisiae* *CNE1* geno aplinkinių sekų padauginimui

CNE1Pr Fv 5' – CAAAGAATTCAAGAGCTGCTAGACAATC – 3'
CNE1Pr Rv 5' – AAATCTAGAAGTACTACTTTGTGTGGCCG – 3'
CNE1Ter Fv 5' – GTATCTAGATGGACAAGTGTTAGTTTATAAC – 3'
CNE1Ter Rv 5' – ATTGGATCCTATCGGGGATGCTAGTTGTTC – 3'
CNE1Rec Fv 5' – GTAGGATCCTGGACAAGTGTTAGTTTATAAC – 3'
CNE1Rec Rv 5' – CCATCTAGAGTCTGTGCGACTTGGAG – 3'

29. Mielių *S. cerevisiae* *SEC61* geno aplinkinių sekų padauginimui

SEC61pr Fv 5'-ACAGAATTCCGTACGCAAGAGGACGATGCCG-3'
SEC61pr Rv 5'-ACATCTAGATTTCAAAGTAAAGCGTGAACC-3'
SEC61ter Fv 5'-ACATCTAGAATATAAAAATGAAAATAATATCC-3'
SEC61ter Rv 5'-ACAGGATCCATGGGTTGTCTATCTTAGACTGG-3'
SEC61rec Fv 5'-ACAGGATCCATATAAAAATGAAAATAATATCC-3'
SEC61rec Rv 5'-ACAGTCGACGGTCACCAGTGAAGTTGGAAGC-3'

30. Mielių *S. cerevisiae* *SBH1* geno aplinkinių sekų padauginimui

SBH1pr Fv 5'-ACAGGTACCTGGCCATTCTATGAAGTCATCG-3'
SBH1pr Rv 5'-ACATCTAGATATGGAGTATGGTAGGAGGTAG-3'
SBH1ter Fv 5'-ACATCTAGAGAATTTTCTTCAGTAATGATTC-3'
SBH1ter Rv 5'-ACAGGATCCTGGCGTATTGCTAAAGGATATG-3'
SBH1rec Fv 5'-ACAGGATCCGAATTTTCTTCAGTAATGATTC-3'
SBH1rec Rv 5'-ACACTGCAGAGATCTGAAAATCCCCTTTG-3'

31. Mielių *S. cerevisiae* *SSS1* geno aplinkinių sekų padauginimui

SSS1pr Fv 5'–ACAGAATTCCCTAAGGACAATAGCACTGCAG–3'
SSS1pr Rv 5'–ACATCTAGATTATTTTTCAATGTTATACG–3'
SSS1ter Fv 5'–ACATCTAGAAAGAGATAAAAGACGAG–3'
SSS1ter Rv 5'–ACAGGATCCTTTTCATATCAGTGGTAGCAACG–3'
SSS1rec Fv 5'–ACAGGATCCAAGAGATAAAAGACGAG–3'
SSS1rec Rv 5'–ACAGCATGCCCTAGGTATCAATCGCTCCGG–3'

32. Mielių *S. cerevisiae* *KAR2* geno aplinkinių sekų padauginimui

Kar2Pr Fv 5' – CAATCGCGAGTCGACGCTATTACTGGACAAG – 3'
Kar2Pr Rv 5' – GAATCTAGAGGTATGTTTGATACGCTTTTTCCC – 3'
Kar2Ter Fv 5' – TAGTCTAGAATAAAATAGTTAAAAATTTTTGC – 3'
Kar2Ter Rv 5' – GTGGGATCCTGAGATGAGATGAGATGAGC – 3'
Kar2Rec Fv 5' – TAGGGATCCATAAAATAGTTAAAAATTTTTG – 3'
Kar2Rec Rv 5' – TGCCTGCAGGTTAACCGACCCATCCATCAC – 3'

33. Mielių *S. cerevisiae* *URA3* geno aplinkinių sekų padauginimui

URA3 5'Fv 5'–ACAGAATTCTACGTAGTTGCATCTGATGACC–3'
URA3 5'Rv 5'–ACAGGTACCCATGATATTAAATAGCTTGGCAGC–3'
URA3 3'Fv 5'–ACAGTCGACATTTGAGAAGATGCGGCCAGCA–3'
URA3 3'Rv 5'–ACACTGCAGGCATGCAAGGCATCTCATCCGG–3'

34. Bakteriofago T7 RNR polimerazės geno padauginimui

T7RNApol Fv 5'–ACATCTAGAACAATGAACACGATTAACATCG–3'
T7RNApol Rv 5'–ACATCTAGAACATTACGCGAACGCGAAGTCC–3'

2.1.4 Antikūnai

1. Triušių polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus BiP/GRP78 baltymui (Ab21685, Abcam, JK).
2. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus kalneksino baltymui (Ab49748, Abcam, JK).
3. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus kalretikulino baltymui (Ab22683, Abcam, JK).
4. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus PDI baltymui (Ab2792, Abcam, JK).
5. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus ERp57 baltymui (Ab13506, Abcam, JK).

6. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP72 baltymui (sc-21529, SantaCruz Biotechnology, JAV).
7. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP68 baltymui (sc-21526, SantaCruz Biotechnology, JAV).
8. Viščiukų polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP54 baltymui (Ab14072, Abcam, JK).
9. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP54 baltymui (sc-136303, SantaCruz Biotechnology, JAV).
10. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP19 baltymui (sc-21519, SantaCruz Biotechnology, JAV).
11. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP14 baltymui (sc-17013, SantaCruz Biotechnology, JAV).
12. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRP9 baltymui (sc-17010, SantaCruz Biotechnology, JAV).
13. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRPR baltymui (sc-324359, SantaCruz Biotechnology, JAV).
14. Ožio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus SRPRB baltymui (sc-100171, SantaCruz Biotechnology, JAV).
15. Pelių monokloniniai antikūnai specifiniai žmogaus Sec61 α 1 baltymui (Ab15575, Abcam, JK).
16. Triušio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus Sec61 β baltymui (ab78276, Abcam, JK).
17. Triušio polikloniniai antikūnai specifiniai žmogaus Sec61 γ baltymui (ab107385, Abcam, JK).
18. Antikūnai, specifiniai pelės IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze (Bio-Rad, JAV).
19. Antikūnai, specifiniai ožio IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze (sc-2768, SantaCruz Biotechnology, JAV).
20. Antikūnai, specifiniai triušio IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze (sc-2313, SantaCruz Biotechnology, JAV).

21. Antikūnai, specifiniai viščiuko IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze (ab112821, Abcam, JK).

2.1.5 Mikroorganizmų kamienai ir plazmidės

E. coli DH5 F^- ($\phi 80dlacZ \Delta M15$) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$ U169;*

E. coli GM119 F^- *dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1(thi-1)*;

S. cerevisiae AH22 MATa leu2 his4.

pUC57 – klonavimo vektorius (UAB Fermentas, Lietuva)

pFGG3 – *S. cerevisiae* mielių raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamus mielių *GAL7* ir *GAL10* genų promotorius (Slibinskas ir kt., 2004).

pFDC – *S. cerevisiae* mielių raiškos vektoriai, turintis pastoviai veikiančią mielių *PGK1* geno promotorių ir galaktoze indukuojamą *GAL7* geno promotorių (Čiplies ir kt., 2011b).

2.1.6 Bakterijų ir mielių auginimo terpės ir sąlygos

LB terpė. 1% peptonas, 0,5% mielių ekstraktas, 1% NaCl.

Agarizuota LB terpė. 2% agaras, 1% peptonas, 0,5% mielių ekstraktas, 1% NaCl.

YEPD terpė. 2% gliukozė, 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas.

YEPG terpė. 2,5% galaktozė, 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas

Agarizuota YEPD terpė. 2% agaras, 2% gliukozė, 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas.

Agarizuota YEPG terpė. 2% agaras, 2,5% galaktozė, 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas.

Agarizuota MD terpė. 2% agaras, 2% gliukozė, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

Agarizuota MM terpė. 2% agaras, 0,5% metanolis, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

BMG terpė, pH 6.0. 0,5% glicerolis, 100mM kalio fosfatas, pH6.0, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

BMM terpė, pH 6.0. 0.5% metanolis, 100mM kalio fosfatas, pH6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

MGY terpė. 1% glicerinas, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

MM terpė. 0.5% metanolis, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas.

BMGY terpė, pH 6.0. 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas, 100mM kalio fosfatas pH6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas, 1% glicerinas.

BMMY terpė, pH 6.0. 2% peptonas, 1% mielių ekstraktas, 100mM kalio fosfatas pH6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotinas, 0,5% metanolis.

Agarizuota MD terpė su 5-fluororotine rūgštimi. 2% agaras, 2% gliukozė, 1.34% YNB, 0.8% 5-FOA.

E. coli ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 37°C temperatūroje. Bakterinių transformantų atrankai ir auginimui į terpes buvo pridedama 50 µg/ml ampicilino. Mielių ląstelės buvo auginamos agarizuotoje arba skystoje terpėje 28-30°C temperatūroje. *S. cerevisiae* transformantų atrankai ir biomasės auginimui į agarizuotą bei skystą YEPD terpes buvo pridedama po 0.0125% formaldehido. *P. pastoris* transformantų atrankai naudota agarizuota YEPD terpė su 0.25, 0.5 ir 1.0 mg/ml antibiotiko G418 koncentracija (terpių sudėtys ir auginimo sąlygos pagal Guthrie ir Fink, 1991; Higgins ir Cregg, 1998; Sambrook ir Russell, 2001).

2.2 Metodai

2.2.1 DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdyta 0.8-1.0% agarozės, ištirpintos TAE buferyje (pH8.3; 0.04M Tris-acetato ir 0.2mM EDTA), geliuose su 0.1µg/ml etidžio bromidu, naudojant horizontalias agarozės plokšteles ir esant 10 V/cm įtampai. Elektroforezės aparato talpa taip pat buvo užpildoma minėtos sudėties TAE buferiu. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui, geliai buvo analizuojami UV šviesoje (Sambrook ir Russell, 2001).

2.2.2 DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

DNR fragmentai frakcionuojami 0.8% agarozės gelyje taip kaip aprašyta 2.3.1 skyriuje. Reikiamas DNR fragmentas išpjaunamas, o DNR iš agarozės gelio ekstrahuojama naudojant Amresco (JAV) „Cycle Pure“ ar UAB Fermentas „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkinius ir vadovaujantis gamintojų rekomendacijomis.

2.2.3 Rekombinantinių plazmidžių konstravimas bei analizė

Rekombinantinių plazmidžių konstravimo bei analizės eksperimentai buvo atliekami pagal plačiai naudojamas aprašytas metodikas (Ausubel, 1999; Sambrook ir Russell, 2001; Fermentas, 2010-2011).

2.2.4 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

PGR buvo atliekama panaudojant UAB Fermentas PGR skirtus produktus, atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas. Polimerazinė grandininė reakcija taikoma amplifikuoti DNR fragmentus, sukuriant jų galuose restrikcijos endonukleazių taikinius (naudojami atitinkamą seką turintys pradmenys). Reakcijai naudojami UAB Fermentas buferiniai tirpalai, dNTP mišinys, termostabili Taq arba Pfu DNR polimerazės. PGR taip pat buvo taikoma plazmidinės ir chromosominės DNR analizei. Šiuo atveju į reakcijos mišinį įnešama bakterijų iš tiriamos kolonijos arba mielių chromosominė DNR.

2.2.5 *E. coli* kompetentinių ląstelių paruošimas

E. coli kolonija inkubuojama per naktį 5ml LB terpės 37°C temperatūroje purtyklėje. Ši kultūra skiedžiama 50-100 kartų ta pačia terpe ir auginama apie 2.5val. (kol ląstelių kultūros tankis pasiekia 0,6 optinio vieneto prie 550nm bangos ilgio) tomis pačiomis sąlygomis. Auginimą nutraukus visos tolesnės procedūros atliekamos ledo vonioje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10min. 1000 x g jėga. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 5ml I tirpalo (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl, pH 7.5-8) ir vėl nucentrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 2.5ml II tirpalo (100mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl, pH 7.5-8) ir ši suspensija laikoma 0.5-1 valandą. Po to ląstelės nucentrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1/15 pradinio tūrio II tirpalo ir naudojamos transformacijai (Ausubel, 1999; Sambrook ir Russell, 2001).

2.2.6 *E.coli* kompetentinių ląstelių transformacija

Vykdam transformaciją vienam mėginiui imama 200µl kompetentinės kultūros ir 0.04-1µg DNR. Mišinys 30min. laikomas lede, po to 1.5 min. pernešamas į 42°C temperatūros vandens vonią, vėliau 1-2 min. laikomas lede. Po to DNR ir ląstelių mišinys užpilamas 1ml LB terpės ir 1-2 val. inkubuojamas 37°C temperatūroje. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant 5min. 1600 x g jėga ir išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. Lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje per naktį (~12-16 val.) (Ausubel, 1999; Sambrook ir Russell, 2001).

2.2.7 Plazmidinės DNR skyrimas iš *E. coli* ląstelių

Plazmidinė DNR buvo skiriama šarminės lizės metodu. Priklausomai nuo eksperimento tikslo buvo naudojamos įvairios šio metodo modifikacijos (Ausubel, 1999; Sambrook ir Russell, 2001).

2.2.7.1 Mažų plazmidės kiekių išskyrimas restrikcinei analizei

Į 5 ml LB terpės su ampicilinu užsėjama bakterijų kolonija. Inkubuojama per naktį 37°C temperatūroje kratytuve. Kultūra nucentrifuguojama 10 min. 1000 x g jėga. Ląstelės suspenduojamos 200 µl TE buferinio tirpalo. Pridedami 2 tūriai NaOH-NDS tirpalo, švelniai sumaišoma. Pridedama 1,5 tūrio natrio acetato (pH 4.8) tirpalo, sumaišoma. Pridėjus 500 µl chloroformo ir sumaišius, centrifuguojama 10 min. 1000 x g jėga. Vandens fazė nusiurbama į *Eppendorf* mėgintuvėlius, plazmidė išsodinama izopropanoliu (0.7-0.8 supernatanto tūrio), praplaunama 70% etanoliu, išdžiovinama. Ištirpinama vandenyje ir naudojama restrikcinei analizei.

2.2.7.2 Didelių plazmidinės DNR kiekių išskyrimas

Tiriama kolonija užsėjama į 50-1000 ml skystos LB terpės, auginama 16-20 val. 37°C kratytuve. Po to ląstelės surenkamos centrifuguojant ir suspenduojamos TE buferiniame tirpale (1 g biomasės - 10 ml TE). Prie gautos ląstelių suspensijos pridėjus 2 tūrius NaOH-NDS tirpalo mišinys švelniai sumaišomas, palaikomas 5 min. kambario temperatūroje ir į jį pridedama 1.5 tūrio NaAc (pH 4.8) tirpalo. Atsargiai suplakama ir centrifuguojama 15 min. 8000 x g jėga. DNR iš supernatanto išsodinama pridendant izopropanolio (0.7-0.8 supernatanto tūrio) ir surenkama centrifuguojant 15 min. 8000 x g jėga. DNR ištirpinama 5 kartus mažesniame vandens tūryje. RNR hidrolizei naudojama pankreatinė ribonukleazė, reakcija vykdoma 15 min. kambario temperatūroje. Deproteinizacija atliekama ekstrahuojant lygiu tūriu fenolio/chloroformo (1:1) mišiniu tris kartus, po to chloroformu vieną kartą. DNR iš vandens fazės išsodinama dviem tūriais etanolio. Nuosėdos suspenduojamos vandenyje.

2.2.7.3 Plazmidinės DNR skyrimas nukleotidinės sekos nustatymui

Plazmidinės DNR skyrimui naudojamas UAB Fermentas rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Į 5 ml LB terpės su ampicilinu užsėjama bakterijų kolonija. Inkubuojama per naktį 37°C temperatūroje kratytuve.

Kultūra nucentrifuguojama 10 min. 1000 x g jėga. Toliau DNR skiriama pagal rinkinyje pateiktas rekomendacijas.

2.2.8 *S. cerevisiae* mielių kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija

Į 5 ml YEED terpės užsėjamas mielių kamienas, kuris bus naudojamas transformacijai. Auginama per naktį 30°C temperatūros kratyvuve. Kultūra skiedžiama ta pačia terpe ir inkubuojama 30°C temperatūros kratyvuve iki optinio tankio 1-1.5 (bangos ilgis 600 nm). Ląstelės centrifuguojamos 5 min 800 x g jėga. Plaunamos 5 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) buferio ir vėl nucentrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės suspenduojamos 3 ml 0.1 M LiCl (ištirpinto TE buferyje) tirpalo ir inkubuojamos 1 val 30°C temperatūroje. Po to nusodinamos centrifuguojant 5 min 800 x g jėga ir suspenduojamos 100 µl 0.1 M LiCl tirpalo.

Transformacijai naudojama 15 µl aukščiau aprašytu būdu gautų kompetentinių ląstelių ir 5 µl plazmidinės DNR. Mišinys inkubuojamas 30 min 25-30°C temperatūroje. Po to pridedama 2 tūriai 50 % PEG-4000 (TE buferyje), inkubuojama 1 val 30°C temperatūroje, 20 min laikoma 42°C temperatūroje. Tada mišinys užpilamas 1 ml YEED terpės ir inkubuojama per naktį 30°C temperatūros termostate. Po 12-16 val inkubacijos į terpę pridedama vandeniu praskiesto formaldehido tirpalo, iki 0.0125 % galutinės jo koncentracijos. Inkubuojama 2-3 val Tada ląstelės nusodinamos 6 sekundes centrifuguojant stalinėje mikrofugoje ir išsėjamos ant agarizuotos YEED terpės su 0.0125 % formaldehido. Po dviejų dienų išaugę transformantų kolonijos persėjamos ant YEED terpės su 0.025 % formaldehido. Tolesnei analizei imami tik gerai šioje terpėje augantys transformantai (Guthrie ir Fink, 1991).

2.2.9 *S. cerevisiae* transformantų auginimas ir indukcija

S. cerevisiae transformantai auginami 18-22 val 30°C temperatūroje, purtant kratyvuve skystoje YEED terpėje su formaldehidu. Ląstelės atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 5 min 800 x g jėga ir suspenduojamos

indukuojančioje terpėje YEPG su tokia pat 0.0125 % formaldehido koncentracija. Indukcija, palaikant tokias pat inkubacijos sąlygas, vykdoma 18-22 val. Tada ląstelės vėl nucentrifuguojamos taip pat, gautos biomasės užšaldomos ir ardamos iškart arba koncervuojamos ilgesniam laikui -70°C temperatūroje (Samuel ir kt., 2002).

2.2.10 *P. pastoris* transformacijos metodai ir transformantų atranka

Į 5 ml YEPD terpės 50 ml tūrio konusinėje kolbutėje užsėjamas transformacijai naudojamas *P. pastoris* His⁻ mielių kamienas. Auginama per naktį 30°C temperatūros kratytuve. 20 μl šios kultūros užsėjama į 100 ml YEPD terpės ir vėl per naktį inkubuojama 30°C temperatūros kratytuve iki optinio tankio 1.3-1.5 (bangos ilgis 600 nm). Tada centrifuguojama 4°C temperatūroje 5 min. $800 \times g$ jėga. Ląstelės suspenduojamos 25 ml ledinio vandens ir vėl centrifuguojamos taip pat. Praplovus 13 ml ledinio vandens ir nucentrifugavus, ląstelės suspenduojamos 2 ml ledinio 1M sorbitolio tirpalo. Po centrifugavimo tomis pat sąlygomis ląstelės suspenduojamos 200 μl ledinio 1M sorbitolio tirpale. Elektroporacijai imama 40 μl iš gautos apie 300 μl suspensijos.

Paruoštos ląstelės sumaišomos su 5 μl linearizuotos plazmidinės DNR (2-5 μg) ir pernešamos į lede atšaldytą 0.2 cm elektroporacinę kiuvetę. 5 min. inkubuojama ledo vonioje. Tada elektroporacijos aparate (“Bio-Rad Gene Pulser”) kiuvetės turinys paveikiamas 10 ms trukmės, 7500 V/cm stiprumo elektros iškrova, nustačius 1500V įtampą. Į kiuvetę nedelsiant pridedama 1 ml ledinio 1M sorbitolio tirpalo. Visas kiuvetėje esantis mišinys išsėjamas ant agarizuotos MD terpės (po 200-600 μl į vieną lėkštelę). Lėkštelės 4 dienas inkubuojamos 30°C temperatūros termostate.

Užaugę His⁺ transformantų kolonijos persėjamos ant agarizuotų YEPD terpių su įvairiomis antibiotiko G418 koncentracijomis. Iš pradžių transformantų kolonijos nuplautos nuo agarizuotos MD terpės lėkštelių su 2-3 ml YEPD terpės, naudojant špatelį. Visos keliose lėkštelėse gautos tuo pačių raiškos vektoriumi transformuotos ląstelės buvo apjungiamos ir

suspenduojamos viename steriliame mėgintuvėlyje. Tada nustatytas ląstelių tankis, spektrofotometru matuojant įvairius ląstelių suspensijų praskiedimus (bangos ilgis 600 nm). Pagal optinį tankį suskaičiuotas ląstelių kiekis suspensijos tūryje, laikant kad 1 ml 1 optinio vieneto ląstelių kultūros yra 5×10^7 ląstelių. Tada ląstelių suspensijos praskiestos YEPD terpe iki apie 5×10^6 ląstelių/ml tankio ir po 10^5 ląstelių pasėta ant agarizuotų YEPD terpių su 0.25, 0.5 ir 1 mg/ml antibiotiko G418 koncentracijomis. Lėkštelės inkubuotos 30°C temperatūroje 2-4 dienas. Išaugę 0.5-1 mg/ml G418 koncentracijoms atsparios kolonijos išklonuotos ant agarizuotos YEPD terpės su 0.5-1.0 mg/ml G418 iki atskirų kolonijų.

Atrinktų klonų patikrintas metanolio metabolizavimo fenotipas. His⁺ transformantų kolonija naudojant sterilų pagaliuką yra persėjama ant MM ir MD agarizuotų terpių, pirmiausia išklonuojant ląsteles ant MM lėkštelės. Lėkštelės su tikrinamais klonais inkubuojamos 30°C temperatūros termostate dvi dienas. Klonai, gerai augantys abiejose terpėse, yra Mut⁺, o gerai augantys MD, bet prastai arba visiškai neaugantys MM - Mut^S fenotipo (Higgins ir Cregg, 1998; Romanos ir kt., 1998; Cregg ir kt., 2000).

2.2.11 *P. pastoris* transformantų indukcijos sąlygų optimizavimas

Viduląstelinės raiškos atveju atskiros rekombinantinių klonų kolonijos užsėjamos BMG pH 6.0 terpėje, o sekretuojamos – MG, BMG pH 6.0, BMGY pH 6.0 arba BMGY pH 8.0 terpėse auginamos 28°C temperatūroje, purtyklėje kol kultūrų optinis tankis pasiekia 2-6 optinius vienetus, stebint 600 nm bangos ilgio šviesoje (apie 16-18 valandų). Tada ląstelės centrifuguojamos 5min. 800 x g jėga ir suspenduojamos tokiose pat indukuojančiose terpėse su metanolio vietoj glicerino - BMM pH 6.0, MM, BMMY pH 6.0 ar 8.0, praskiedžiant taip, kad Mut⁺ fenotipo transformantų kultūros optinis tankis 600 nm šviesoje būtų 1. Mut^S fenotipo transformantų kultūra indukuojančioje terpėje sukonzentruojama iki 20 optinių vienetų. Indukcija vykdoma konusinėse kolbose, uždengtose 2 sluoksniais sterilios marlės, kultūros tūriui sudarant 10-15% nuo bendro indo tūrio. Inkubuojama tokiomis pat sąlygomis,

kaip auginimo terpėse su glicerinu, kas 24 valandas pridėdant 100%-io metanolio iki galutinio jo tūrio 0.5%. Mėginiai imami kas 24 valandas. 1 ml indukuotos kultūros 3 minutes centrifuguojama stalinėje mikrocentrifugoje maksimaliu greičiu. Tiriant viduląstelinę raišką pasiliekomos tik indukuotos ląstelės, o sekrecinės raiškos atveju paimami ir ląstelių, ir supernatanto mėginiai. Mėginiai užšaldomi -70°C temperatūroje ir taip yra saugomi iki baltymų išskyrimo.

Indukuotų *P.pastoris* ląstelių mėginiai suardomi ir grubiuose ląstelių lizatuose tiriamų baltymų raiška analizuojama NDS-PAGE metodu (2.3.13). Lyginant rekombinantinių baltymų raiškos stiprumą po įvairaus indukcijos laiko, atrenkamos optimaliausios indukcijos sąlygos (Higgins ir Cregg, 1998; Cregg ir kt., 2000).

2.2.12 Mielių sekretuojamų baltymų analizė kultūros terpėje

Analizuojant kultūros terpės mėginius naudotas baltymų išsodinimas chloroformo-etanolio mišiniu. 650 µl kultūros terpės maišyta su su 165 µl chloroformo ir 650 µl metanolio, centrifuguota 6 min. 16000 x g jėga. Vandeningą fazę pašalinama, ant tarpsluoksnio ir apatinės fazės užpilama 650 µl metanolio, sumaišyta ir centrifuguota 3 min. 16000 x g jėga (Wessel ir Flugge, 1984). Nuosėdos išdžiovintos ir tirpintos 40 µl 1x NDS-PAGE buferio. Išsodinti baltymai analizuoti NDS-PAGE ir imunoblotingo metodais (2.2.15).

2.2.13 Grubių mielių ląstelių lizatų paruošimas

0.5-1 ml indukuotų mielių ląstelių kultūros Ependorf tipo mėgintuvėlyje centrifuguojamas stalinėje centrifugoje 1.5 min. maksimaliu greičiu. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1ml vandens ir centrifuguojamos taip pat. Supernatantas nupilamas, centrifuguojama 30 sek. ir visas virš ląstelių surinktas skystis nusiurbiamas. Ląstelių biomasė pasveriamas. Įdedama į ledo vonią ir užpilama fosfatinio ardymo buferiu (50mM natrio fosfato, 5mM EDTA, pH 7.4), buferio tūrio/ląstelių svorio santykiu 10:1 (10-20 mg biomasės - 100-200 µl ardymo buferio), ląstelės suspenduojamos.

Pridedamas lygus tūris stiklo rutuliukų. 30 sek. ardoma intensyviai maišant ant kratyklės, 30 sek. šaldoma ledo vonioje. Atliekami 8 tokie ciklai. Tada į mėgintuvėlį pridedamas $2 \times$ NDS-PAGE pavyzdžių buferio tūris, lygus naudoto ardymo buferio tūriui. Gerai sumaišius mėgintuvėlis iš ledo vonios iškart perkeliamas į 100°C temperatūrą ir inkubuojama 10 min. Taip paruošti mėginiai frakcionuojami NDS-PAGE metodu (2.2.15 ir 2.2.16) (Slibinskas ir kt., 2004).

2.2.14 Baltymų išskyrimas iš mielių ląstelių ir frakcionavimas

Visi veiksmai atliekami šaldant ląsteles ledo vonioje. Ląstelių biomasė suspenduojama užpylus dvigubą ardymo buferio (50mM natrio fosfatas, pH7.4, 5mM EDTA, 1mM PMSF (fenilmetilsulfonyl fluoridas – proteazių inhibitorius)) tūrį, pridedamas 1 tūris stiklinių rutuliukų. 30sek. ardoma intensyviai maišant ant kratyklės, 30sek šaldoma ledo vonioje. Atliekama 16 tokių ciklų. Tada lizatas nuskaidrinamas centrifuguojant 5min. 500 x g jėga 4°C temperatūroje, supernatantas surenkamas į Eppendorf tipo mėgintuvėlį. Centrifuguojama 45min. 16000xg 4°C temperatūroje. Supernatantas nusiurbiamas (jame ištirpę baltymai, kurie yra tirpūs ardymo buferyje – 2 frakcija), nuosėdos suspenduojamos ardymo buferyje su 1% TritonX-100 (3 frakcija). Centrifuguojama 45min. 16000 x g jėga 4°C temperatūroje. Supernatantas nusiurbiamas (jame ištirpę membraniniai baltymai – 4 frakcija), nuosėdos suspenduojamos 1M NaCl pH 8.0 su 1% TritonX-100 ir 1mM PMSF (5 frakcija). Centrifuguojama 45 min. tomis pačiomis sąlygomis. Supernatantas nusiurbiamas (jame ištirpę baltymai tirpūs esant didelei joninei jėgai – 6 frakcija), o nuosėdos spenduojamos ardymo buferyje (7 frakcija) (Čiplys ir kt., 2011a).

2.2.15 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje ir jo dažymas

Ruošiant mėginius, ląstelių lizato arba bet kurios gautos skiriant baltymus frakcijos mėginys maišomas su $2 \times$ forezės buferiu (0.25M Tris-HCl, pH 6.8, 8% NDS, 0.01% bromfenolio mėlynojo, 20% glicerino ir 75mM DTT) santykiu 1:1. Mėginiai 5-10 min. virinami 100°C temperatūroje. Elektroforezei

naudojamas 10% skirstomasis poliakrilamido gelis (10% akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 30:0.8, 0.375M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% NDS, 0.1% amonio persulfato ir 0.001% TEMED), ir mažos koncentracijos koncentruojantis gelis (4% akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 30:0.8, 0.125M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% NDS, 0.1% amonio persulfato ir 0.001% TEMED). Elektroforezei naudojamas Tris-glicino/NDS elektroforezės buferis (0.3% Tris, 1.44% glicinas ir 0.1% NDS). Ji atliekama vertikalios elektroforezės aparate, palaikant tokius maksimalius ribojančius parametrus: 30mA nuolatinės srovės stiprį ir 200V įtampą (Schagger ir von Jagow, 1987).

Po elektroforezės gelis dažomas Kumasi mėliu (40% etanolis, 0.15% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% acto rūgštis) 30 min. švelniai purtant, po to 2 kartus po 1val. tokiom pat sąlygomis plaunamas blukinančiu tirpalu (5% acto rūgštis).

2.2.16 Baltymų imunoblotingas

Atliekant imunoblotingą baltymai iš pradžių frakcionuojami 10% koncentracijos PAA gelyje elektroforezės būdu (2.2.15). Apytiksliai tiriamų baltymų dydžiui nustatyti kartu frakcionuojami nudažytų baltymų molekulinio svorio standartai (UAB “Fermentas”). Po elektroforezės PAA gelis įmerkiamas į baltymų pernešimo buferį (10% metanolis, 150 mM glicinas, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3), ten pat įdedama ir forma bei dydžiu gelį atitinkanti nitroceliuliozinės GE Healthcare (JAV) “Hybond-ECL” membranos atraiža. Laikoma 30 min. Tada atliekamas pussausis išfrakcionuotų baltymų pernešimas ant nitroceliuliozinės membranos. Po pernešimo membranoje su prisitvirtinusiiais baltymais likęs “neužimtas” plotas 1 val. kambario temperatūroje blokuojamas 5% pieno miltelių, ištirpintų TTBS buferyje (0,5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1% Tween-20), tirpale. Trumpai praskalavus TTBS, membrana 1 val. orbitaliniame hibridizatoriuje (“Biometra”) 25°C temperatūroje plaunama su 0,1-0,2ml/1cm² tūrio reikiamai TTBS buferyje praskiestu pirminių antikūnų prieš tiriamą baltymą tirpalu (praskiedimą nurodo gamintojas). Neprisijungę pirminiai antikūnai nuo membranos atplaunami 3

kartus po 15 min. inkubuojant su 1,5 ml/cm² tūrio TTBS buferiu tomis pat sąlygomis. Tada 1 val. plaunama su TTBS praskiestu antrinių antikūnų, konjuguotų su krienų peroksidaze, tirpalu. Atplaunama taip pat, kaip ir nuo pirminių antikūnų. Prieš ryškinimą membrana dar 2 kartus po 5 min. atplaunama 2 ml/cm² tūrio TBS buferiu (0,5M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6), kad būtų pašalintas iš TTBS buferio sudėty įeinantis Tween-20. Su antikūnais reaguojančių baltymų juostelės ant membranos išryškinamos vykstant krienų peroksidazės fermentinei reakcijai, kurios metu susidaro spalvoti junginiai. Darbe naudotas ryškalas su 4-chloro-1-naftolio substratu (15 mg 4-chloro-1-naftolio, 3ml etanolio, 25 ml TBS, 20 µl 30% H₂O₂, sudėty išvardinta eilės tvarka) arba komercinis TMB tirpalas su 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino substratu (Sigma, Vokietija) (Walker, 2002).

2.2.17 Dvikryptė (2D) baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Grubių mielių ląstelių lizatų paruošimas 2D elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis. Mielių biomasės paruošiamos kaip aprašyta 2.2.13 skyriuje. Tolesnės manipuliacijos vykdomos kambario temperatūroje. Ant mielių biomasių užpilama 10 tūrių 2D pavyzdžių buferio (7 M šlapalas, 2 M tiošlapalas, 2% CHAPS detergentas, 0.5% amfolitai (pH 3-10), 0.002% Bromfenolio mėlynasis dažas, 0.05 M DTT). Suspendavus pridedamas lygus tūris stiklo rutuliukų. Stipriai kratoma ant kratyklės 30 sekundžių, tada 10 sekundžių atšaldoma ledo vonioje ir 30 sekundžių laikoma kambario temperatūroje. Atliekami 8 tokie ardymo ciklai. Tada lizatas nuskaidrinamas centrifuguojant 15 minučių 16000 × g jėga 16-22°C temperatūroje.

Mielių baltyminių frakcijų paruošimas 2D elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis. Gautos mielių baltymų frakcijos (2.2.14) tiesiogiai maišomos su 2D pavyzdžių buferiu, o esant didelei joninei jėgai (6 frakcija) prieš tai druskos pašalinamos naudojant 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas.

Pirmos krypties elektroforezė – izoelektrinis fokusavimas (IEF). IEF yra metodas baltymų atskyrimui pagal jų izoelektrinį tašką (pI) imobilizuoto pH

gradiento (IPG) gelio juostelėse. Šiame darbe naudojama komercinė Invitrogen (JAV) firmos IEF sistema. Paimama 50 µg mielių lizatų ir skiedžiama tuo pačiu 2D pavyzdžių buferiu iki galutinio 155 µl tūrio. Taip paruošti mėginiai užnešami į „IPGRunner“ kasetės duobutes. Į kasetės kanalus su baltymais įkišamos „ZOOM IPG“ juostelės ir paliekamos rehidratuotis kambario temperatūroje 16 valandų. Po rehidratacijos surenkama „ZOOM IPG Runner“ sistema ir vykdomas IEF. IEF atliekamas esant mažai srovei. Palaikomi tokie ribiniai parametrai:

- A. 20 min. - 200 V – 1mA – 0.5 W
- B. 10 min. - 350 V – 1mA – 0.5 W
- C. 4 val. - 500 V – 1mA – 0.5 W
- D. 2 val. - 2000 V – 1mA – 1 W

Po IEF IPG juostelės užšaldomos -70°C temperatūroje, arba iškart pereinama prie IPG juostelių pusiausvyrinimo ir antros krypties NDS-PAGE.

Antros krypties elektroforezė –NDS-PAGE. Po IEF IPG juostelės inkubuojamos 15 min. kambario temperatūroje redukuojančiame pusiausvyrinimo tirpale (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 % NDS, 6 M šlapalas, 30 % glicerolis, 0.002% Bromfenolio mėlynasis dažas, 75 mM DTT) ir dar 15 min. redukuojančiame alkilinamo tirpale (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 % NDS, 6 M šlapalas, 30 % glicerolis, 0.002% Bromfenolio mėlynasis dažas, 125 mM jodoacetamido). Nupusiausvyrintos juostelės imobilizuojamos PAA gelio duobutėje ir vykdoma NDS-PAGE. Palaikomi maksimalūs ribojantys parametrai - 30mA nuolatinės srovės stipris ir 125V įtampa. Po NDS-PAGE gelis dažomas Kumasi mėliu kaip aprašyta 2.2.15 (Sanchez ir Hochstrasser, 1999).

2.2.18 Dvikryptės baltymų elektroforezės gelių analizė ir baltymų identifikavimas

2D geliai buvo analizuojami naudojant ImageMaster 2D Platinum 7.0 programą (GE Healthcare, JAV). Aptikti baltymų taškai buvo įvertinti paskaičiuojant santykinį tūrį (%V), rodantį kokią procentinę tūrio dalį

kiekvienas baltymas sudaro nuo bendro viso baltymo tūrio. Baltymų raiškos pokytis buvo nustatomas lyginant kiekvieno baltymo santykinį tūrį kontrolinėse mielių ląstelėse su mielių ląstelėmis, sintetinančiomis tymų viruso hemagliutinino baltymą. Standartinis nuokrypis paskaičiuotas baltymų raiškos pokytį įvertinus trijuose nepriklausomuose bandymuose.

Baltymų identifikavimas atliktas firmoje WITA (Vokietija). Pasirinkti baltymai buvo ekstrahuoti iš PAA gelio ir per naktį skaldyti tripsinu. Peptidų masės nustatytos ir baltymai identifikuoti MALDI-PMF arba nanoLC-ESI-MS/MS metodais.

2.2.19 Mielių ląstelių stebėjimas mikroskopu

Po indukcijos skysta terpė su mielių ląstelėmis buvo skiedžiama vandeniu 2-4 kartus, užnešama ant objektyvinio stiklelio ir pridengiam dengiamuoju stikleliu. Mėginys pro imersinį objektyvą būdavo stebimas šviesiniu mikroskopu "OLYMPUS AX70". Stebimi ląstelių vaizdai buvo išsaugojami kompiuterio atmintyje naudojantis "Hamama-TSU" vaizdo analizės sistema.

2.2.20. Visos mielių ląstelės RNR išskyrimas

Visa mielių ląstelės RNR šiame darbe buvo išskirta rūgštaus fenolio metodu (Schmitt ir kt., 1990). *S. cerevisiae* mielės užaugintos 5 ml YEPD terpės. Ląstelės išsodintos centrifuguojant 5 min 800 x g jėga ir suspenduotos 400 µl AE buferio (50 mM natrio acetato, pH 5.3, 10 mM EDTA), suspensija perkeliama į Ependorf tipo mėgintuvėlį ir pridedama 40 µl 10 % NDS tirpalo. Sumaišius pridedamas lygus tūris rūgštaus fenolio (pridotinto AE buferiu iki pH 5.3), sumaišoma ir inkubuojama 65°C temperatūroje 4 min. Tada mišinys staigiai atšaldomas ledo vonioje ir inkubuojamas kol pasirodo fenolio kristalai (3-5 min.). Centrifuguojama stalinėje centrifugoje 12000 x g jėga. Vandeninė fazė nusiurbama į kitą mėgintuvėlį ir ekstrahuojama fenolio-chloroformo (1:1) mišiniu kambario temperatūroje. Vandeninė fazė perkeliama į mėgintuvėlį, veiktą 0.1 % DEPC (dietilpirokarbonato) tirpalu, pridedama 1/10 tūrio 3 M

natrio acetato (pH 5.3, veikto DEPC) tirpalo bei 2.5 tūrio etanolio, sumaišoma ir inkubuojama 2 val -70°C temperatūroje. RNR išsodinama centrifuguojant 10 min $16000 \times g$ jėga 4°C temperatūroje, nuosėdos praplaunamos 80 % etanolio ir suspenduojamos 20 μl DEPC veikto vandens. Išskirta RNR laikoma užšaldyta -70°C temperatūroje.

2.2.21 Mielių genominės DNR išskyrimas

Tiriama kolonija užsėjama į 5 ml skystos YEPD terpės su formaldehidu. Inkubuojama per naktį 30°C temperatūros purtyklėje. Po to ląstelės surenkamos centrifuguojant 5 min. $800 \times g$ jėga. Terpė nupilama, mielių ląstelės praplaunamos 1 ml distiliuoto vandens ir vėl surenkamos tomis pačiomis sąlygomis. Nupylus vandenį, ląstelės suspenduojamos 500 μl lizės buferio (100 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1 % NDS pH 8.0) ir perkeliama į Eppendorf tipo mėgintuvėlį. Pridėjus 0.5 ml stiklo rutuliukų, ląstelės 2 min. ardomos intensyviai maišant kratykle. Skysta fazė perkeliama į naują Eppendorf tipo mėgintuvėlį ir pridedama 275 μl 7 M amonio acetato tirpalo (pH 7.0). 5 min. laikoma 65°C temperatūroje ir staigiai perkeliama į ledoną, kurioje laikoma 5 min. Pridedama 500 μl fenolio chloroformo ir sukama stalinėje centrifugoje 3 min. maksimaliu greičiu. Supernatantas perkeliama į naują Eppendorf tipo mėgintuvėlį, pridedami 5 μl RNRazės ir 10 min. inkubuojama 37°C temperatūroje. Po inkubacijos į mėgintuvėlį pridedama 1 ml izopropanolio, švelniai sumaišoma ir laikoma kambario temperatūroje 5 min. Po to, mėgintuvėlis sukamas 3 min. stalinėje centrifugoje maksimaliu greičiu. Izopropanolis nusiurbiamas, ant nuosėdų užpilamas 1 ml 70 % etanolio ir laikoma 10 min. kambario temperatūroje. Mėgintuvėlis vėl nusukamas 3 min. stalinėje centrifugoje maksimaliu greičiu, etanolis nusiurbiamas ir nuosėdos 15 min. džiovinamos kambario temperatūroje. Ant išdžiūvusių nuosėdų užpilama 150 μl dejonizuoto vandens, 10 min. brinkinama ir atsargiai suspenduojama (Harju ir kt., 2004).

3. Rezultatai

Rezultatai šiame darbe padalinti į dvi dalis. Pirmoji rezultatų (3.1) dalis yra skirta TVH sintezės tyrimams mielėse. Antroji rezultatų (3.2) dalis skirta mielių humanizacijai ir jos pasekmių TVH brendimui tyrimams. Pirmoje dalyje išnagrinėta tymų viruso hemagliutinino (TVH) sintezės galimybės mielių *Saccharomyces cerevisiae* ir *Pichia pastoris* raiškos sistemose ir parodyta, kad šios mielės nėra tinkamos TVH glikobaltymo raiškai. Taip pat nustatytos sutrikusio TVH baltymo brendimo mielių ląstelėje priežastys ir pasekmės (Čiplys ir kt., 2011a). Šie rezultatai ne tik leidžia suprasti problemos, kuri nagrinėjama šiame darbe, esmę, bet ir nustato tikslus rekombinantinio TVH baltymo parametrus, kuriais remiantis galima tiksliai įvertinti pokyčius, kuriuos įtakoja mielių sekrecinio kelio modifikavimas, aprašytas antroje rezultatų dalyje. Šioje dalyje pateikiami rezultatai mielių sekrecinio kelio humanizavimo, pritaikant žmogaus virusų glikobaltymų sintezei ir brendimui, eksperimentai (Čiplys ir kt., 2011b).

Visi rezultatų skyriuje minimi plazmidiniai vektoriai buvo sukonstruoti ir padauginėti *E. coli* ląstelėse. Vektoriuose esančių genų padėtis bei kopijų skaičius buvo patikrinta PGR metodu bei restrikcine analize. Visų klonuotų genų nukleotidų sekos buvo nustatytos Biotechnologijos instituto sekoskaitos centre ir įsitikinta, kad jos atitinka duomenų bazėse (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) esančias sekas.

3.1 Tymų viruso hemagliutinino sintezė mielėse *S. cerevisiae* ir *P. pastoris*

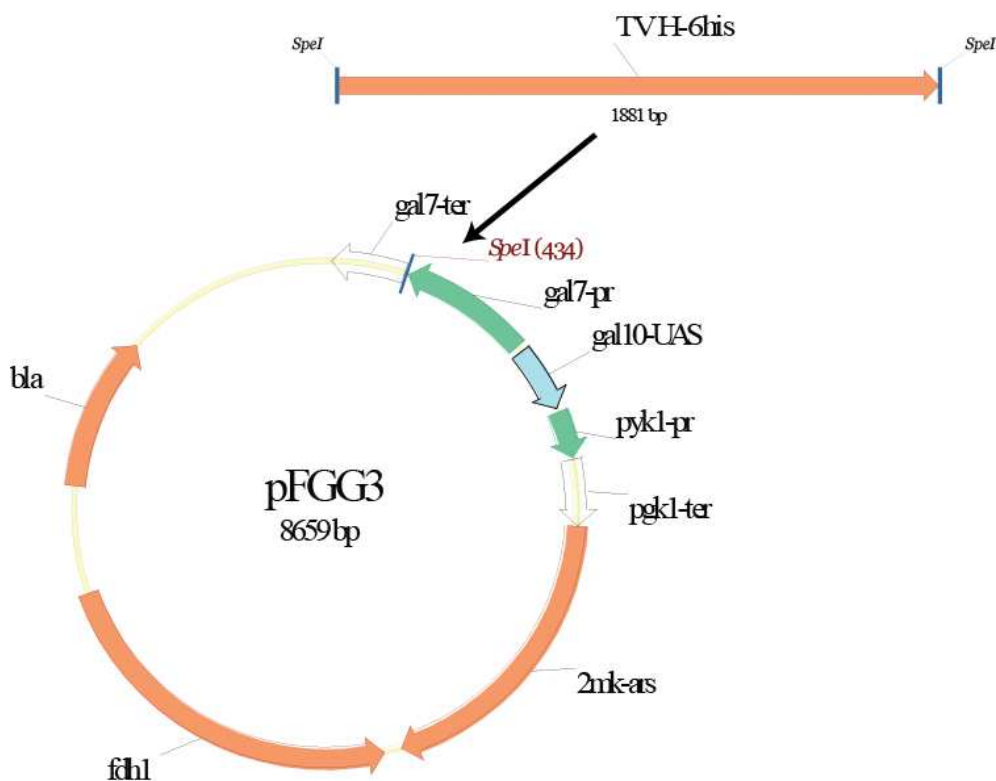
Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje mielių raiškos sistemos naudojamos įvairių virusinių baltymų sintezei. Laboratorija viena pirmųjų pasaulyje mieles *Saccharomyces cerevisiae* ir *Pichia pastoris* sėkmingai pritaikė įvairių virusų nukleokapsidų (Slibinskas ir kt., 2004; Juozapaitis ir kt., 2008; Petraitytė ir kt., 2009), virusus primenančių dalelių (Sasnauskas ir kt., 2002) bei gripo viruso polimerazės baltymų sintezei (Wunderlich ir kt., 2011). Visi šie baltymai yra sintetiniai

mielių citoplazmoje ir pasižymi natyviems baltymams būdingomis savybėmis. Tuo tarpu mielių ląstelės susintetinti aktyvių virusinių paviršiaus baltymų, išskyrus kelias išimtis (Valenzuela ir kt., 1982; Martinet ir kt., 1997), kurie bręsdami turi pereiti sekrecinį baltymų kelią, nesugeba. Medicinoje, rekombinantinių vakcinų kūrimui, iki šiol pritaikyti tik dviejų virusų paviršiaus baltymai, tai mielėse *S. cerevisiae* susintetintai žmogaus hepatito B viruso (HBV) paviršiaus baltymas S (Hilleman, 1987) ir žmogaus papilomos virusų (HPV) paviršiaus baltymas L1 (Koutsky ir kt., 2002), bet abu jie nėra glikobaltymai ir nepereina mielių baltymų sekrecinio kelio. Neefektyvios daugumos virusų paviršiaus glikobaltymų sintezės mielėse priežastys nėra išaiškintos, todėl šių priežasčių nustatymas yra labai svarbus, nes leistų patobulinti mielių raiškos sistemas pritaikant jas sudėtingų ir labai svarbių virusinių baltymų sintezei. Kaip minėta, šiame darbe tymų viruso hemagliutinino baltymas panaudotas modeliu tiriant virusų paviršiaus baltymų sintezės problemas mielėse.

3.1.1 *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* raiškos vektorių konstravimas ir mielių ląstelių transformacija

Darbe pasinaudota anksčiau klonuotu tymų viruso paviršiaus baltymą hemagliutininą koduojančiu genu, klonuotu iš tymų viruso vakcinoms naudojamo Schwarz kamieno viruso. Geno klonavimas į bakterijų plazmidę ir charakterizavimas buvo atliktas Londono HPA (*angl.* „Health Protection Agency“) laboratorijoje. Pilną šio viruso genomo seką galima rasti GenBank duomenų bazėje. Tymų viruso Schwarz kamieno genomo sekos atpažinimo numeris yra AF266291. Klonuojant TVH geną, geno galuose įvestos *SpeI* RE sekos bei tarp paskutinio 3' galo amino rūgšties ir translacijos terminacijos kodonų buvo įterpti šeši papildomi kodonai, koduojantys 6 histidino ar., reikalingas rekombinantinių baltymų aptikimui ir jų gryninimui. Anksčiau buvo parodyta, kad TVH baltymas turintis šešių histidino ar. inkarą baltymo C gale, susintetintas žinduolių ląstelių kultūrose, nepraranda savybių būdingų natyvios sekos baltymui (Kidokoro ir kt., 2002).

TVH geno raiškai *S. cerevisiae* ląstelėse, genas buvo hidrolizuotas *SpeI* RE ir klonuotas į pFGG3 vektorių, prijungiant jį prie stipraus, galaktoze indukuojamo mielių *GAL7* geno promotoriaus (Slibinskas ir kt., 2004). Gauta plazmidė pFGG3-TVH pavaizduota 12 pav.

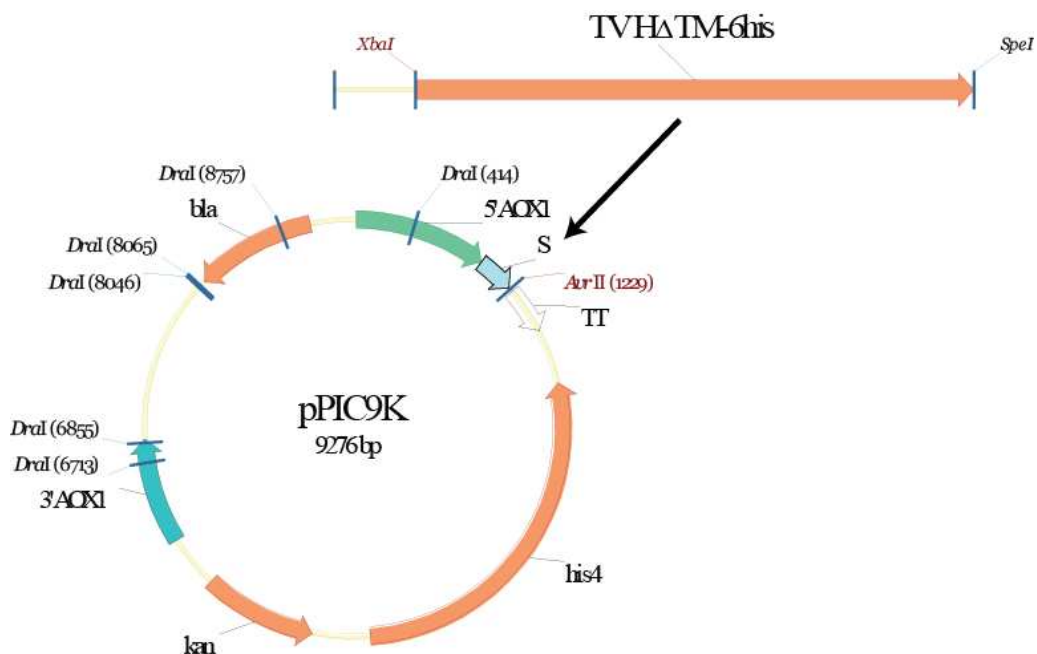


12 pav. *S. cerevisiae* TVH geno raiškos vektoriaus konstravimo schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *gal7-pr* – galaktoze indukuojamas mielių *GAL7* geno promotorius; *gal7-ter* – transkripcijos terminatorius; *gal10-UAS/pyk1-pr* – hibridinis, galaktoze indukuojamas mielių promotorius, sudarytas iš *GAL10* ir *PYK1* genų promotorių elementų; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *fdh1* – mielių *Candida maltosa* genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę, nulemiančią mielių atsparumą formaldehidui; *2mk-ars* – mielių 2μm plazmidės DNR, užtikrinanti vektoriaus replikaciją mielėse.

Darbe naudoti *P. pastoris* raiškos vektoriai autonomiškai nesireplikuoja ir yra skirti tikslinio geno integracijai į genomą. Darbe naudoti komerciniai (Invitrogen) *P. pastoris* pPIC3.5K ir pPIC9K vektoriai. Plazmidė pPIC3.5K-TVH, skirta baltymo sintezei ir kaupimui ląstelės viduje, buvo sukonstruota

įterpiant *SpeI* RE hidrolizuotą TVH koduojantį geną į vektorių pPIC3.5K naudojant *AvrII* RE atpažinimo seką, leidžiančią prijungti geną prie metanolio indukuojamo *AOXI* promotoriaus.

Vektorius pPIC9K nuo pPIC3.5K skiriasi tuo, kad šiame vektoriuje klonuojamas genas suliejamas su DNR fragmentu, koduojančiu baltymų sekreciją užtikrinančią signalinę seką. Konstruojant pPIC9K-TVH plazmidę, skirtą sekretuojamai baltymo raiškai, buvo panaudotas modifikuotas TVH genas (TVH Δ TM) su pašalinta geno dalimi, koduojančia transmembraninę TVH baltymo dalį, nes hidrofobinė membraninė baltymo dalis paprastai įsitvirtintina lipidų dvilauksnyje ir neleidžia vyksti baltymo sekrecijai. Šis geno fragmentas, koduojantis 77 ar. hidrofobinį domeną, buvo pašalintas skaldant geną *XbaI* RE pagalba, o likusi globulinę baltymo dalį koduojanti TVH geno seka buvo sulieta atstatant skaitymo rėmelį su pPIC9K vektoriuje prie *AOXI* promotoriaus esančia 269 bp ilgio *S. cerevisiae* MF(alpha)1 (α -faktorius) signaline seka, užtikrinančia tikslinio baltymo sekreciją į augimo terpę. Konstravimo schema pateikta 13 pav..



13 pav. *P. pastoris* pPIC9K-TVH raiškos vektoriaus, skirto modifikuoto TVH baltymo sekrecijai, konstravimo schema. bla – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E.coli* atsparumą ampicilinui; kan – genas, koduojantis baltymą, lemiantį atsparumą kanamicinui bakterijose ir atsparumą G418 – eukariotuose; his4 – *P. pastoris* *HIS4* genas; 5'AOX1 – *P. pastoris* *AOX1* geno promotorius; TT – transkripcijos terminacijos seka; 3'AOX1 – *P. pastoris* DNR seka žemiau *AOX1* geno 3' galo, skirta vektoriaus integracijai į *P. pastoris* genomą; S – *S. cerevisiae* α -faktorius signalinė seka.

Mielių *S. cerevisiae* AH22 ir *P. pastoris* GS115 ląstelių transformacija naudojant sukonstruotas šioms mielėms skirtas plazmidės, buvo atliekama vadovaujantis standartiniais protokolais (Sambrook ir Russell, 2001). *P. pastoris* vektoriai pPIC3.5K-TVH ir pPICK9K-TVH prieš transformaciją buvo linearizuojami naudojant *DraI* RE, siekiant padidinti plazmidės integracijos į genomą efektyvumą. Daugiakopijinių *P. pastoris* transformantų atranka buvo atliekama panaudojant kartu su tiksliniu genu, plazmidės sudėtyje integruotą *kan* geną, lemiantį mielių atsparumą antibiotikui G418 (gentamicinui). Mielių atsparumas šiam antibiotikui koreliuoja su geno *kan* kopijų skaičiumi, todėl ši atrankos sistema leido apytikriai įvertinti ir integruotų tikslinio geno kopijų skaičių (Romanos ir kt., 1998).

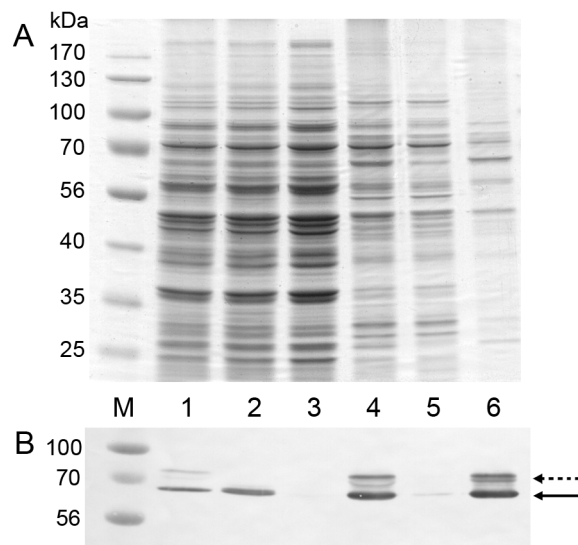
3.1.2 Tymų viruso rekombinantinio hemaglutinino, susintetinto mielėse *S. cerevisiae* ir *P. pastoris*, savybių analizė

Siekiant iširti TVH baltymo sintezės galimybes mielėse, gauti mielių transformantai buvo auginami standartinėmis sąlygomis (Samuel ir kt., 2002). Tyrimas buvo pasirinkti mielių *P. pastoris* transformantai, turintys vieną integruoto geno kopiją ir skirtingi transformantai, turintys daugiau TVH geno kopijų.

Analizuojant NDS-PAGE ir imunoblotingo pagalba grubius mielių *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* ląstelių, transformuotų atitinkamai pFGG3-TVH ir pPIC3.5K-TVH plazmidėmis, lizatus (14, 15 ir 16 pav.), nustatyta, kad TVH baltymo sintezės lygis abiejose mielių rūšyse yra žemas ir sudaro ne daugiau 3% nuo bendro mielių baltymų kiekio. NSD-PAGE parodė, kad mielių ląstelėse TVH baltymas randamas dviejose skirtingose formose – didžiausia baltymo dalis (80-90%) yra apie 65kDa molekulinės masės ir atitinka teoriškai

iš amino rūgščių sekos apskaičiuotą TVH molekulinę baltymo masę, o likusi baltymo dalis yra apie 75kDa ir formuoja dvi nežymiai atsiskiriančias baltymo juostas NDS-PAGE gelyje. Yra žinoma, kad žinduolių ląstelėse TVH baltymas yra glikozilinamas ir glikozilintas baltymas NDS-PAGE geliuose sudaro dvi apie 74-78kDa dydžio juostas (Kidokoro ir kt., 2002). Panaudojus fermentą PNGaseF (New England BioLabs), pašalinantį nuo baltymo struktūros polisacharidų molekules, parodėme, kad mielių ląstelėse susintetintas apytiksliai 75kDa molekulinės masės TVH baltymas yra N-glikozilinta baltymo forma, nes paveikus mielių lizatus PNGaseF, 75kDa baltymo forma išnyko (14 pav. 1 ir 2 takeliai).

Bandymai išgryninti rekombinantinį TVH baltymą naudojant Ni^{2+} - agarozės chromatografiją tiek natyviomis, tiek denatūruojančiomis sąlygomis buvo nesėkmingi, o mielių ląstelių baltymų frakcionavimas parodė, kad skirtingai nei žinduolių ląstelėse susintetintas natyvus TVH baltymas (Kidokoro ir kt., 2002), mielėse susintetintas rekombinantinis pilnos sekos TVH baltymas bei jo glikozilinta forma, yra visiškai netirpūs tirpaluose, turinčiuose nejoninį detergentą TritonX-100 (14 pav. 3-6 takeliai). Maža to, abi baltymo formos yra visiškai netirpios ir 8M šlapalo tirpale (19 pav.). Ištirpinti rekombinantinį TVH baltymą pavyko tik pridėjus 100 mM S-S tiltelius redukuojančios medžiagos 2-merkaptoetanolio. Be to, mielėse susintetintas TVH baltymas nereagavo su tymais sirgusių žmonių serumais imunofermentinėje analizėje bei nerodė jokio aktyvumo eritrocitų hemagliutinacijos testuose. Tai rodo, kad TVH baltymo molekulės mielių ląstelėse nėra teisingai suvyniojamos. TVH polipeptidai yra susijungę disulfidinėmis jungtimis į multimerinius darinius ir nepasižymi jokiais natyviame baltyme būdingomis savybėmis nepriklausomai nuo baltymo sintezei panaudotų mielių rūšies. TVH baltymas, susintetintas mielėse *P. pastoris* savo savybėmis nesiskyrė nuo tokios pat ar. sekos TVH baltymo, sintetinto mielėse *S. cerevisiae* (15 pav.).



14 pav. TVH rekombinantinio baltymo, susintetinto mielėse *S. cerevisiae*, TVH savybių analizė. A. *S. cerevisiae* AH22 ląstelių, transformuotų pFGG3-TVH plazmide, lizatų NDS-PAGE. B. imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais naudojant tuos pačius lizatus, kaip ir A-dalyje.

M – molekulinės masės standartai (UAB Fermentas SM0671);

1 – grubūs mielių ląstelių lizatai (1 frakcija);

2 – grubūs mielių ląstelių lizatai paveikus PNGaseF;

3 – supernatantas gautas po mielių ląstelių lizatų centrifūgavimo (2 frakcija);

4 – nuosėdos gautas po mielių ląstelių lizatų centrifūgavimo (3 frakcija), mielių baltymai netirpūs ardymo buferyje;

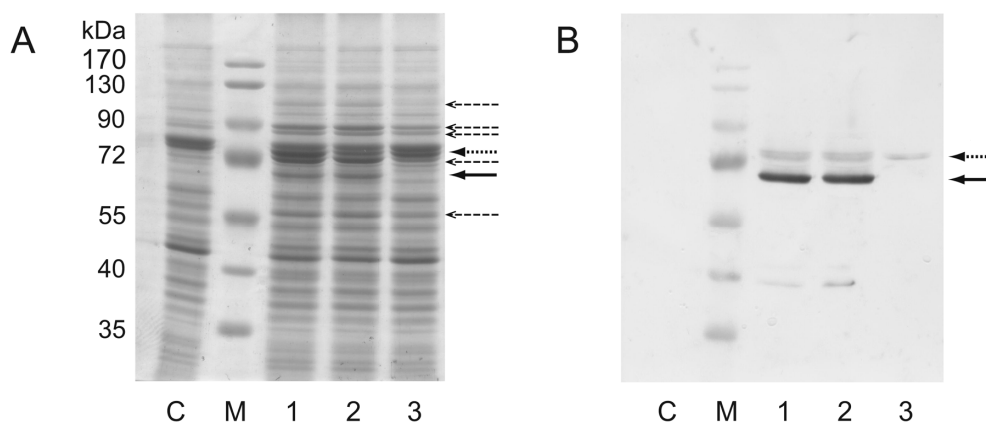
5 – baltymai tirpūs 1% TritonX-100 tirpale (4 frakcija);

6 – baltymai netirpūs 1% TritonX-100 tirpale (5 frakcija).

Ištisinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma.

Galimybė gauti ir analizuoti skirtingą TVH geno kopijų skaičių turinčius *P. pastoris* pPIC3.5K-TVH transformantus leido įvertinti sintetiamo baltymo kiekio ir savybių priklausomybę nuo geno kopijų skaičiaus. Manoma (Schrodel ir de Marco, 2005; Klepsch ir kt., 2011), kad membraninių baltymų perprodukcija mikrobiniėje ląstelėje naudojant labai stiprius promotorius ir daugiakopijines plazmides sukelia sintetamų rekombinantinių baltymų agregaciją ląstelės citoplazmoje. Vertinant *P. pastoris* ląstelių, sintetinančių pilnos sekos TVH baltymą, grubius lizatus (15 pav.), matyti, kad esant žemam TVH sintezės lygiui, visas sintetinas baltymas yra pernešamas į ET ir glikozilinimas (15 pav. 3 takelis), tuo tarpu, didėjant geno kopijų skaičiui, rekombinantinis baltymas pradeda kauptis citoplazmoje neglikozilinto polipeptido forma (15 pav. 1 ir 2 takeliai). Tai, kad esant mažam TVH geno

kopijų skaičiui, visas baltymas yra glikozilinamas ir lokalizuotas ET ertmėje, nepagerina rekombinantinio TVH baltymo savybių – baltymas yra agregavęs ir neveiklus, visiškai taip, kaip ir vykstant stipriai baltymo sintezei. Vienintelis pastebimas skirtumas – nesant citoplazmoje TVH polipeptido agregatų, sumažėja mielių ląstelių streso atsakas (aprašyta 3.1.3 skyriuje) (15 pav. A, ilgos punktyrinės rodyklės).



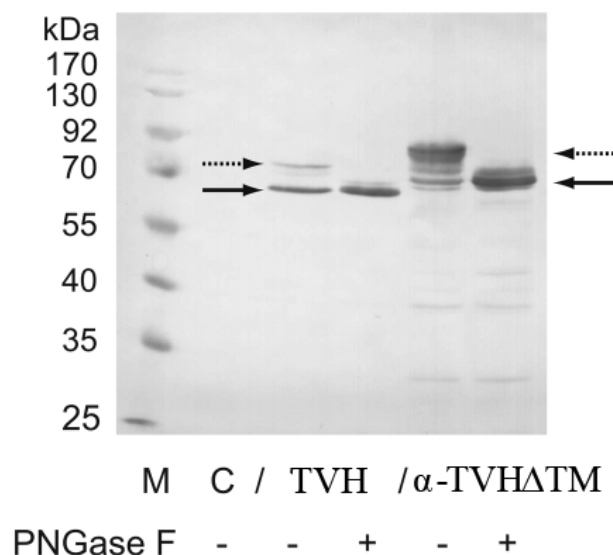
15 pav. Rekombinantinio TVH baltymo raiškos mielių *P. pastoris* ląstelėse analizė. A. Mielių GS115 kamieno ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE. B. Tų pačių lizatų imunoblotingas naudojant anti-tetraHis (Qiagen) antikūnus.

M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671); C – kontrolinių mielių ląstelių, transformuotų pPIC3.5K vektoriumi, grubūs lizatai; 1,2,3 – daugiakopijinių, įvairioms G418 antibiotiko koncentracijoms atsparių, pPIC3.5K-TVH plazmide transformuotų mielių ląstelių grubūs lizatai.

Ištisinė rodyklė – TVH polipeptidas, trumpa punktyrinė rodyklė – glikozilinta TVH baltymo forma, ilgos punktyrinės rodyklės – mielių ląstelių baltymai, kurių raiška padidėja kaip atsakas į TVH sintezę.

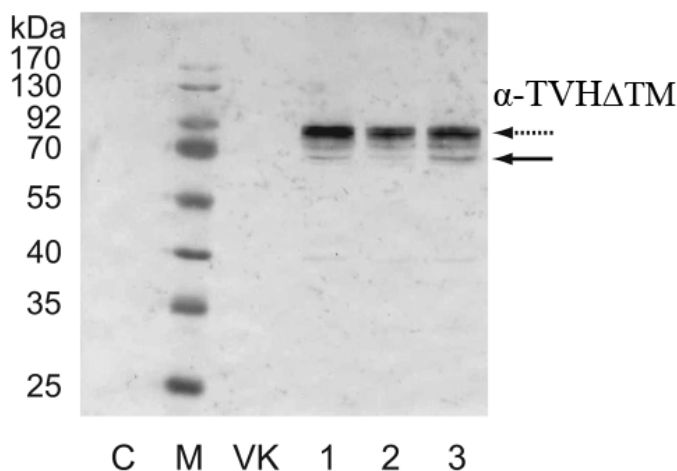
Analizuojant *P. pastoris* ląsteles transformuotas pPIC9K-TVH plazmide, skirta sekrecinei TVH baltymo raiškai, nustatyta, kad naudojant *S. cerevisiae* α -faktorius signalinę seką, nukreipiančią baltymą į ET, vietoje natyvios TVH baltymo transmembraninės sekos (α -TVH Δ TM), žymiai daugiau rekombinantinio α -TVH Δ TM baltymo yra pernešama į ET ir glikozilinama (16 pav.). Vis tik, mielių augimo terpėje sekretuojamo TVH Δ TM baltymo neaptikta, o aptiktas α -TVH Δ TM polipeptido (apie 70kDa) ir glikozilintos formos baltymo (apie 80kDa) molekulinė masė rodo,

kad α -faktorius signalinė seka nėra nukerpama. Įvertinus rekombinatinio baltymo savybes frakcionuojant mielių ląstelių lizatus ir imunofermentinės analizės metodais, nustatyta, kad α -TVH Δ TM baltymas pasižymi tokiomis pat savybėmis kaip ir natyvos sekos TVH baltymas – yra agreguotas ET arba citoplazmoje ir neįgyja tinkamos konformacijos ir nėra funkcionalus.



16 pav. Natyvos sekos ir chimerinio α -TVH Δ TM baltymų, susintetintų *P. pastoris* ląstelėse, glikozilinimo analizė. Mielių GS115 kamieno ląstelių, transformuotų vektoriumi pPIC3.5K (C), pilną TVH geno seką koduojančia pPIC3.5K plazmide (TVH) ir chimerinį α -TVH Δ TM geną koduojančia plazmide pPIC9K-TVH (α -TVH Δ TM), grubių lizatų, be ir po poveikio su PNGaseF (New England BioLabs), imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais. Ištininė rodyklė – TVH ar α -TVH Δ TM polipeptidai, punktyrinė – glikozilinta TVH ar α -TVH Δ TM baltymų forma. M – dydžių standartas (UAB Fermentas SM0671)

α -TVH Δ TM geno kopijų skaičiaus įtaka baltymo sintezei buvo identiška nustatytai natyvos sekos TVH baltymui – sintetinamo α -TVH Δ TM baltymo molekulių kiekiui viršijus sėkmingos translokacijos į ET ribą, neglikozilinti polipeptidai pradeda kauptis citoplazmoje (17 pav. 1 ir 3 takeliai palyginti su 2).



17 pav. Rekombinantinio chimerinio α -TVH Δ TM baltymo raiškos mielių *P. pastoris* ląstelėse analizė. Mielių GS115 kamieno ląstelių, transformuotų vektoriumi pPIC9K-TVH, grubių lizatų imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais. M – dydžių standartas (UAB Fermentas SM0671); C – kontrolinių mielių ląstelių, transformuotų pPIC9K vektoriumi, grubūs lizatai; VK – mielių ląstelių, su integruota viena α -TVH Δ TM raiškos kasete, grubūs lizatai; 1,2,3 – daugiakopijinių, įvairioms G418 antibiotiko koncentracijoms atsparių, pPIC9K-TVH plazmide transformuotų mielių ląstelių grubūs lizatai. Ištininė rodyklė – α -TVH Δ TM polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta α -TVH Δ TM baltymo forma.

Apibendrinus šiame skyriuje išdėstytus rezultatus, galima teigti, jog naudojant klasikines mielių rūšis bei standartinius rekombinantinių baltymų sintezės protokolus, imunogeniško ir veiklaus TVH baltymo gauti yra neįmanoma.

3.1.3 Mielių ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, analizė

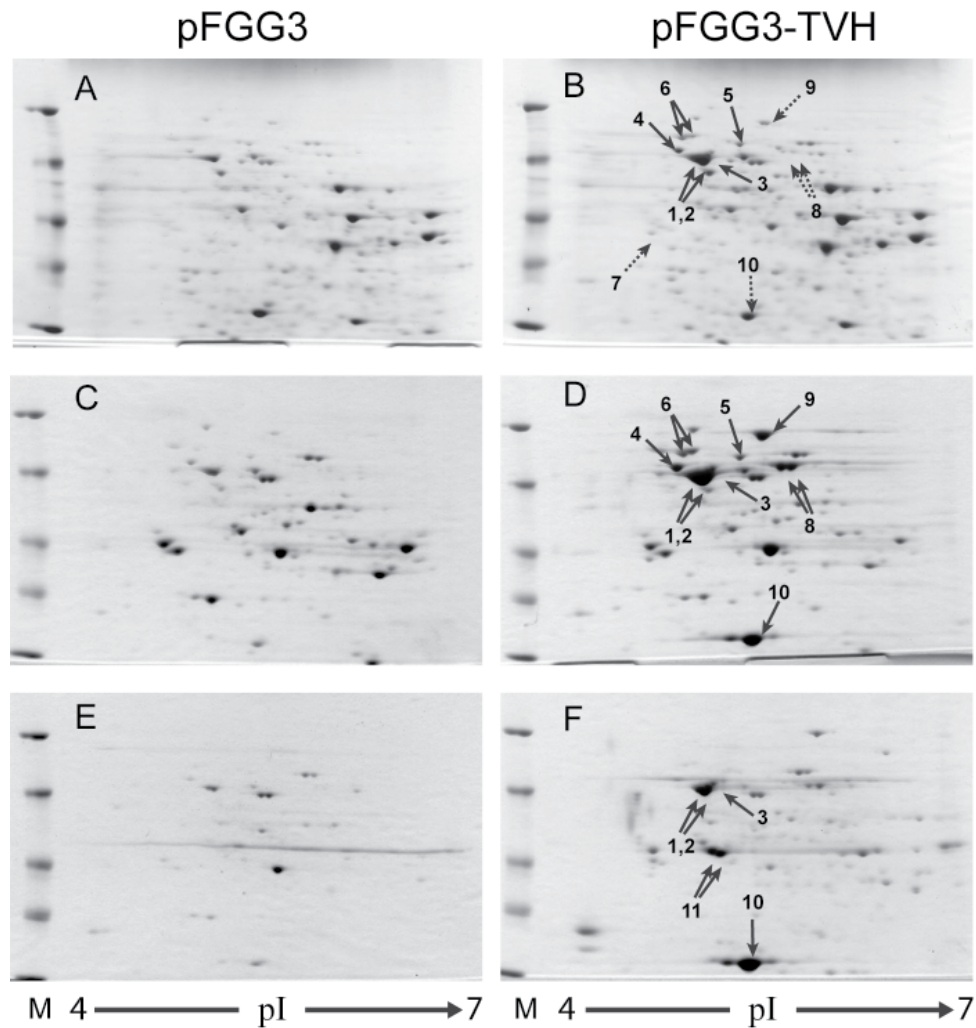
Išsiaiškinus, kad mielių *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* ląstelės nesugeba susintetinti natyvaus baltymo savybėmis pasižyminčio TVH baltymo, buvo bandyta išstudijuoti nesėkmės priežastis.

Pirmiausia pastebėta, kad TVH baltymo raiška sulėtina ląstelės augimą. *S. cerevisiae* ląstelių, transformuotų tuščiu pFGG3 vektoriumi, pasidalinimo laikas indukcinėje auginimo terpėje yra 3h, tuo tarpu sintetinančių TVH baltymą – 7h. Taipogi standartinio mielių auginimo ir baltymų indukcijos metu, mielių kultūrose, sintetinančiose TVH baltymą, priaugdavo 1.4 kartus mažiau mielių biomasės, lyginant su kontrolinėmis, pFGG3 vektoriumi transformuotomis, mielėmis. Pastebėta, kad mielių ląstelėse, gaminančiose TVH baltymą, susikaupia iki 1.5 karto daugiau baltymų, negu kontrolinėse

mielių ląstelėse. Gauti rezultatai rodo, kad TVH baltymo sintezė specifiskai sutrikdo normalią mielių ląstelių homeostazę. Palyginimui, mielėse *S. cerevisiae* ar *P. pastoris* sintetinant tymų viruso nukleokapsidės baltymą, mielių ląstelių augimas nesutrunka netgi esant labai stipriai rekombinantinio baltymo raiškai (Slibinskas ir kt., 2004).

Analizuojant grubius mielių ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, lizatus pastebėta, kad kai kurių mielių ląstelės baltymų raiška ryškiai padidėja lyginant su kontrolinių mielių baltymų lizatais (15 pav. ilgos punktyrinės rodyklės). Toks mielių ląstelių atsakas į TVH baltymo sintezę stebėtas abiejose mielių rūšyse. Proteominė mielių lizatų analizė leido identifikuoti mielių ląstelės baltymus, kurių sintezė pastebimai padidėja kartu sintetinant TVH ir nustatyti procesus, kuriuos indukuoja TVH baltymo sintezė mielių ląstelėse.

Atlikus dvikryptę (2D) grubių mielių *S. cerevisiae* lizatų baltymų (18 pav. A ir B), tirpių esant didelei joninei jėgai (18 pav. C ir D) bei netirpių natyviomis sąlygomis baltymų (18 pav. E ir F) elektroforezę bei masių spektrometrijos metodais identifikavus mielių baltymus (1 lentelė), kurių elgesys ir kiekis pakinta dėl TVH raiškos, parodyta, kad TVH sintezė mielėse *S. cerevisiae* sukelia neseniai literatūroje apibūdintą citoplazminį nesusivyniojusių baltymų atsaką (*angl. UPR - cyto – cytosolic unfolded protein response*) (Metzger ir Michaelis, 2009). Proteominė grubių *S. cerevisiae* lizatų analizė parodė (18 pav. A ir B, 1 lentelė), kad dėl TVH sintezės sukulto ląstelės streso padidėja citoplazminių mielių didžiųjų karščio šoko baltymų Ssa1p/Ssa2p, Ssa4p bei Sse1p (Hsp70 šeima), Hsc82p (Hsp90 šeima) ir Hsp104p (Hsp110 šeima) raiška. Taip pat raiška sustiprėja Sti1p ir Sgt2p košaperonų, kurie reguliuoja Hsp70, Hsp90 ir Hsp110 šeimų šaperonų aktyvumą (Angeletti ir kt., 2002; Wegele ir kt., 2003). Be to, dėl ląstelinio streso, kurį greičiausiai sukelia TVH baltymo agregatai ET, padidėja ir mielių pagrindinio ET šaperono KAR2/GRP78 raiška.



18 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelių atsako į TVH baltymo sintezės sukeltą stresą analizė A-F – mielių baltymų 2D elektroforezė. Mielių kamieno AH22, transformuoto kontroliniu vektoriumi (A, C, E) ir pFGG3-TVH plazmide (B, D, F), grubių lizatų (A ir B), tirpių esant didelei joninei jėgai (C ir D) ir netirpių natyviomis sąlygomis (E ir F) baltymų frakcijų NDS-PAGE po izolektrinio fokusavimo. Ištinės rodyklės žymi baltymus identifikuotus grubių lizatų geliuose, punktyrinės – baltymus, kurie identifikuoti kitose frakcijose. Identifikuotų baltymų numeriai atitinka 1 lentelėje pateiktus skaičius. M – baltymų molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0431, 120, 66, 45, 35, 25 kDa).

1 lentelė. Mielių *S. cerevisiae* baltymai, kurių raška pastebimai pakito dėl rekombinantinio TVH sintezės.

Nr	Pavadinimas ^a	Baltym o raiškos pokytis ^b	Funkcija ^c	Lokalizacija	Frakcija, kurioje aptinkamas ^d
1,2	Ssa1/2		Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma	Visose frakcijose, išskyrus netirpius denatūruojančiose sąlygomis; Gausiausiai tirpiose esant didelei joninei jėgai
3	Ssa4	2.4±0.2	Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma	Visose frakcijose, išskyrus netirpius denatūruojančiose sąlygomis; Gausiausiai tirpiose esant didelei joninei jėgai
4	Kar2	3.8±0.4	Šaperonas, atsakas į stresą	Endoplazminis tinklas	Tirpus esant didelei joninei jėgai
5	Sse1	2.3±0.2	Ko-šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma	Tirpus esant didelei joninei jėgai
6	Hsc82	2.1±0.3	Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma, mitochondrija	Tirpus esant didelei joninei jėgai
7	Sgt2	1.6±0.2	Ko-šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma	Tirpus nejoniam detergente
8	Sti1	1.6±0.3	Ko-šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma	Tirpus esant didelei joninei jėgai
9	Hsp104	2.6±0.3	Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma, branduolys	Tirpus esant didelei joninei jėgai
10	Hsp26	0.7±0.1	Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma, branduolys	Netirpus natyviomis sąlygomis
11	Hsp42	N	Šaperonas, atsakas į stresą	Citoplazma, citoskeletas	Netirpus natyviomis sąlygomis
13	Tef2	N	Transliacijos elongacijos faktorius	Citoskeletas, ribosoma	Netirpus denatūruojančiomis sąlygomis

^a baltymo pavadinimas pagal SGD (*Saccharomyces* genome database, <http://www.yeastgenome.org>); Ssa1p ir Ssa2p baltymai (97% sekos identiškumas), pažymėti 1 ir 2, sudaro mišinį nežinoma proporcija; Tef2 baltymas identifikuotas iš denatūruojančiose sąlygose netirpių baltymų frakcijos (pav.)

^b baltymo raiškos pokytis žymi santykių santykinio baltymo tūrio (2.2.18) tarp kontrolinių ir sintetinančių TVH baltymą mielių ląstelių grubiuose lizatuose; ± - standartinis nuokrypis; N – nenustatyta;

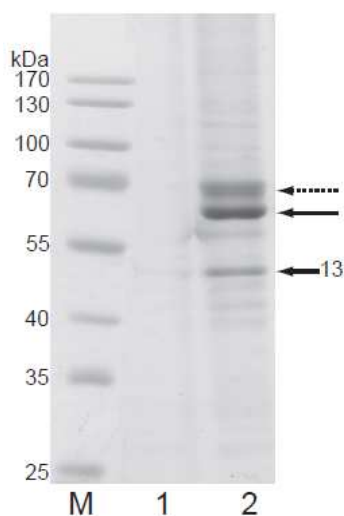
^c biologinė funkcija ir lokalizacija pagal SGD (<http://www.yeastgenome.org>);

^d mielių baltymai išfrakcionuoti į skirtingas frakcijas pagal tirpumą įvairiomis sąlygomis. Nurodyta frakcija, kurioje mielių atsako į TVH sintezę baltymas yra gausiausiai aptinkamas lyginant su kontrolinių mielių frakcijomis.

Frakcionuojant mielių *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, lizatus ir lyginant su kontrolinių, pFGG3 vektoriumi transformuotų, mielių ląstelių lizatų atitinkamos frakcijomis, pastebėta, kad kai kurie mielių baltymai yra susiję su TVH sudaromais agregatais ir koncentruojasi tam tikrose baltymų frakcijose. Proteominė analizė leido įvertinti mielių baltymų sąveikos su rekombinantiniu TVH baltymu pobūdį. Nustatyta, kad natyviomis sąlygomis (2 ir 3 frakcija) yra visiškai tirpus tik Sgt2p baltymas, ir tik nedidelė dalis Ssa1p/Ssa2p, Ssa4p baltymų. Analizuojant proteominiais metodais tirpias ir netirpias, esant didelei joninei jėgai, mielių ląstelių baltymų frakcijas (18 pav. C, D, E ir F; 1 lentelė), parodyta, kad didžioji dalis didžiųjų citoplazminių Hsp šaperonų (tik nedidelė dalis Ssa1p/Ssa2p, Ssa4p lieka netirpūs 1M NaCl tirpale) ištirpsta esant didelei joninei jėgai. Tai leidžia manyti, kad didieji Hsp šaperonai, kurių raiška padidėja dėl ląstelės patiriamo citoplazminio nesusivyniojusių baltymų streso, su TVH yra susiję joninėmis jungtimis. Tuo tarpu natyviomis sąlygomis netirpių baltymų frakcijose (18 pav. E ir F) buvo identifikuoti mažieji citoplazminiai Hsp šaperonai (Hsp26 ir Hsp42), kurie su TVH baltymo sudaromais agregatais yra susiję stipresne sąveika nei didieji Hsp šaperonai. Juos iš agregatų galima pašalinti tik denatūruojančioms sąlygoms 8M šlapalo tirpale. Tai rodo, kad mielių ląstelėse susidaro baltymų, įskaitant mažuosius Hsp šaperonus, agregatai, kurių neįmanoma pašalinti *in vivo* ir natyviomis sąlygomis *in vitro*. Taip pat įdomu, kad mažųjų Hsp baltymų raiška dėl TVH sintezės mielių ląstelėse nepadidėja (1 lentelė). Visa tai rodo, kad mažųjų Hsp dalyvavimas mielių ląstelių atsake į stresą, sukeltą nesusivyniojusių TVH polipeptidų, yra skirtingas nei didžiųjų Hsp šaperonų.

Denatūruojančiomis sąlygomis netirpių baltymų frakcijų analizė parodė, kad mielių *S. cerevisiae* ląstelėse susintetinto rekombinantinio TVH baltymo agregatai yra netirpūs 8M šlapalo tirpale (19 pav.). Kartu su TVH baltymo agregatais, netirpiaisi denatūruojančiomis sąlygomis tampa ir kai kurie mielių baltymai, tuo tarpu kontrolinėse mielėse, transformuotose pFGG3 plazmide, tokių baltymų nėra (19 pav.). Pagrindinis mielių baltymas (19 pav. ir 1 lentelė, 13), kurio sąveika su rekombinantinio TVH baltymo molekulėmis yra

stipriausia, yra transliacijos elongacijos faktorius 1A (eEF1A arba Tef1/2p). Šio baltymo nepavyko aptikti dvikryptės baltymų elektroforezės geliuose, todėl jis buvo identifikuotas iš vienos krypties gelio (19 pav.). Mielių eEF1A baltymą kartu su TVH agregatais pavyko ištirpinti tik pridėjus redukuojančios medžiagos (100mM 2-merkoptoetanolio). Tai rodo, kad eEF1A baltymas mielių ląstelėse yra tiesiogiai susijęs su TVH baltymo suformuotais sudėtingais multimeriniais agregatais.

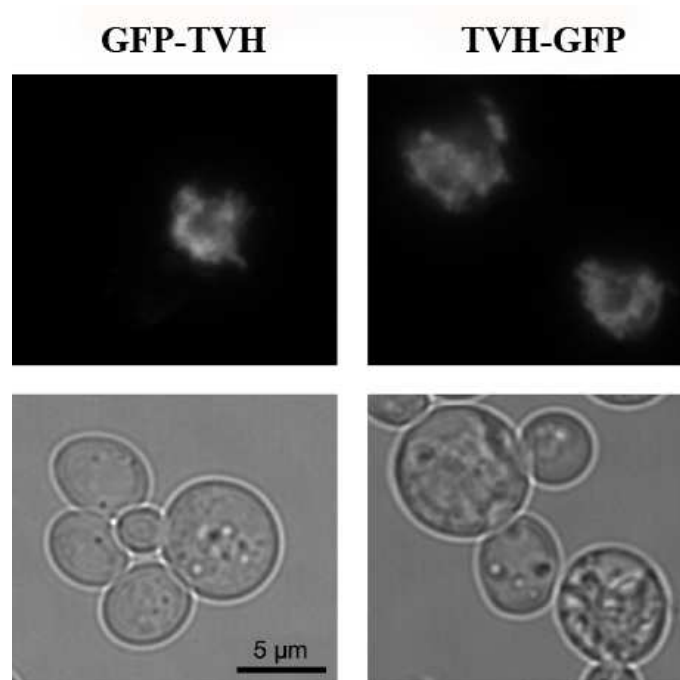


19 pav. Netirpių denatūruojančiomis sąlygomis *S. cerevisiae* mielių baltymų frakcijų analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFGG3 vektoriumi (1) ir pFGG3-TVH plazmide (2), baltymų, netirpių 8M šlapalo tirpale, NDS-PAGE. Ištinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma, trumpa ištinė (13) – mielių eEF1A baltymas. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

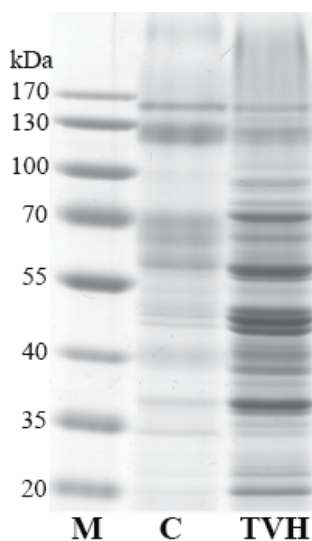
Apibendrinant mielių *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, baltymų lizatų frakcionavimo duomenis, galima teigti, kad baltyminių agregatų, susidarančių ląstelėje, šerdi sudaro disulfidinėmis jungtimis tarpusavyje susijungę TVH baltymo multimerai įtraukiantys mielių eEF1A baltymą. Šie agregatai yra stipriai susiję su mažaisiais Hsp šaperonais. Didieji Hsp baltymai, panašu, prie agregatų šerdies yra prisijungę silpnai, nes yra lengvai pašalinami esant didesnei joninei jėgai.

Mielių *S. cerevisiae* ląstelėse sintetinamo TVH baltymo sukeltas citolazminis neteisingai susivyniojusių baltymų stresas bei kartu su mielių baltymais suformuoti sudėtingi negrįžtamai susijungusių baltymų agregatai ne tik sutrikdo normalią mielių ląstelių homeostazę, bet ir drastiškai pakeičia mielių ląstelių morfologiją. Šie pokyčiai palaiapsniui baigiasi ląstelės žūtimi. Tokie pastebėjimai padaryti analizuojant mielių *S. cerevisiae* ląsteles

sintetinančias TVH baltymą, kuris C arba N gale buvo sulietas su baltymu GFP (20 pav.) bei analizuojant tokių mielių augimo terpę (21 pav.).



20 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelėse sintetinamo TVH baltymo sukiamų morfologinių pakitimų analizė. GFP-TVH – mielių ląstelės sintetinančios TVH baltymą su N gale sulietu GFP baltymu, TVH-GFP – GFP baltymas sulietas su TVH C galu. Viršutinės nuotraukos darytos su GFP florescenciją detektuojančiu filtru, apačioje – be, mikroskopo Olympus AX70 pagalba.



21 pav. Mielių *S. cerevisiae* augimo terpės analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFGG3 vektoriumi (C) ir pFGG3-TVH plazmide (TVH), augimo terpės, koncentruotos 50 kartų, NDS-PAGE. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Šviesinės mikroskopijos nuotraukose (20 pav.) matyti labai didelis kontrastas tarp *S. cerevisiae* ląstelių sintetinančių ir nesintetinančių TVH baltymą sulietą su GFP. Ląstelės, kuriose vyksta TVH sintezė, yra didesnės, apvalios, vietoj įprastinės ovalios, formos, o ląstelių viduje, tai ypač išreikšta ląstelėse sintetinančiose TVH-GFP chimerinį baltymą, matyti heterogeniški po visą ląstelę pasklidę agregatai. Akivaizdu, kad TVH sintezė ląstelėje sukelia negrįžtamus morfologinius ir fiziologinius pakitimus, kurie palaipsniui baigiasi ląstelės žūtimi. Tai patvirtina, mielių *S. cerevisiae* augimo terpės analizė (21 pav.). Ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, augimo terpė yra pripildyta mielių baltymų, o NDS-PAGE geliuose baltymų raštas yra beveik identiškas *S. cerevisiae* ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE (14 pav.).

Verta paminėti, kad labai panašūs rezultatai, apibūdinantys pakitimus mielių ląstelėje, sintetinančioje TVH baltymą, gauti ir tais pačiais metodais analizuojant *P. pastoris* mieles (neskelbti duomenys, Čiplys, 2007, magistro diplominis darbas). Akivaizdu, kad TVH sintezės sukeliama negrįžtami morfologiniai ir fiziologiniai pakitimai būdingi abiemis mielių rūšims.

Apibendrinant 3.1 skyriuje pateiktus rezultatus, galima konstatuoti, kad (a) mielės *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* nesugeba susintetinti natyviomis savybėmis pasižyminčio TVH baltymo; (b) TVH sintezė mielėse sutrinka ankstyvuosiuose baltymo brendimo etapuose – pernešime į ET ir brendime ET ertmėje; (c) TVH polipeptidas sukelia citoplazminį neteisingai susivyniojusių baltymų stresą ir sudaro sudėtingus agregatus kartu su mielių baltymais; (d) TVH sintezė sukelia mielių ląstelių žūtį.

3.2 Mielių *S. cerevisiae* baltymų sekretinio kelio humanizavimas

Identifikavus nesėkmingo TVH baltymo brendimo mielėse *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* ląstelines priežastis, nuspręsta įveikti šias kliūtis modifikuojant mielių sekretinį kelią. Logiškiausia atrodė bandyti pakeisti mielių sekretinio kelio baltymus žmogaus homologiniais baltymais, nes žmogaus ląstelėse infekcijos metu tymų virusas sėkmingai replikuojasi, o bręsdamas TVH baltymas pereina visą sekretinį kelią. Panaši taktika, vedama skirtingos

sėkmės, jau bandyta taikyti daugelio mokslininkų, kai kartu su tiksliniu baltymu buvo sintetinamas baltymai, reikalingi tikslinio baltymo brendimui. Dažniausiai tokiuose bandymuose įvairiose raiškos sistemose sintetinant žmogaus heterologinius baltymus perprodukuojami natyvūs pasirinktos raiškos sistemos šaperonai ir tik keliuose eksperimentuose vabzdžių ar *E. coli* ląstelėse rekombinantinio žmogaus baltymo savybėms pagerinti buvo bandyta naudoti žmogaus ląstelių šaperonai (Yokoyama ir kt., 2000; Ahn ir kt., 2004). Įvesti į mieles visus vieno žmogaus biocheminio kelio komponentus, bandymų nebuvo. Aišku, yra galimybė ne įvedinėti žmogaus baltymus, o modifikuoti pačius mielių sekretinio kelio komponentus, tam, kad jie gebėtų atpažinti ir teisingai apdoroti virusinius paviršiaus glikobaltymus. Vis tik tokia taktika yra rizikinga, su maža sėkmės galimybe, nes skirtingai nei fermentų, sekretinio kelio komponentų – SRP dalelės, Sec61 translokono ar ET šaperonų – veikimo mechanizmai yra nepilnai ištyrinėti, biocheminių reakcijų dinamika dažnai nežinoma. Buvo pasirinkta tokia eksperimento schema: klonuoti žmogaus sekretinio kelio (išskyrus su Goldžio aparatu susijusius baltymus, nes, kaip aptarta ankstesniame skyriuje, iki Goldžio aparato TVH baltymas nenukeliauja) baltymus koduojančius genus. Šių genų koduojamus baltymus sintetinti kartu su TVH baltymu ir atrinkti žmogaus sekretinio kelio komponentus, kurie turi teigiamą įtaką TVH brendimui.

Kaip jau minėta, vertinant TVH baltymo, sintetinamo mielių ląstelėse kartu su žmogaus baltymais, brendimo pokyčius, vadovaujamosi 3.1 skyriuje nustatytais tiksliais TVH baltymo, sintetinamo mielėse be žmogaus baltymų, parametrais: (a) baltymo raiškos lygis; (b) neglikozilinto ir glikozilinto baltymo santykis; (c) tirpumas nejoniniuose detergentuose; (d) baltymo imunogeniškumas ir hemagliutinacinis aktyvumas; (e) mielių ląstelėse sukiamo atsako į citoplazminį nesusiviniuojusių baltymų stresą lygis.

Modeliniu organizmu, žmogaus sekretinio kelio modeliavimui mielėse, pasirinktos mielės *Saccharomyces cerevisiae*, o ne *Pichia pastoris*, dėl kelių priežasčių: (a) Nustatytos ir laisvai prieinamos viso genomo sekos; (b) Galimybės genų raiškai naudoti nechromosominius DNR elementus –

autonomiškai besireplikuojančias plazmidės; (c) Išsamesnės molekulių bei biocheminių kelių, molekulinių sąveikų ir ląstelinių procesų duomenų bazės; (d) Paprastesnės darbo metodikos bei auginimo terpės.

3.2.1 Mielių *S. cerevisiae* SRP ir Sec61 kompleksų humanizavimas

Eukariotinėse ląstelėse SRP ir Sec61 baltymų kompleksai veikia kartu ir sąlygoja ko-transliacinį baltymų pernešimą į ET. Žinduolių ląstelėse sintetinamas TVH baltymas į ET yra pernešamas ko-transliaciniu būdu, todėl sintetinamas polipeptidas, skirtingai nei mielių ląstelėse, nėra eksponuojamas citoplazmoje. Be to, kaupiasi vis daugiau duomenų, rodančių (Skach, 2007; Zimmermann ir kt., 2011), kad translokuojamo polipeptido sąveika su SRP ir Sec61 kompleksų subvienetais skatina tinkamą baltymo susivyniojimą. Be to, žemesniuose eukariotuose, tame tarpe ir *S. cerevisiae*, dominuoja potransliacinis baltymų pernešimas ir TVH baltymas mielėse nėra efektyviai pernešamas į ET, o lieka citoplazmoje agregatų formoje, todėl pirmųjų mielių sekrecinio kelio etapų humanizavimas atrodo tikrai būtinas, siekiant sukurti efektyvius mielių kamienus virusinių paviršiaus glikobaltymų sintezei.

Humanizuojant mielių ko-transliacinio pernešimo mechanizmą, nuspręsta ne tik integruoti žmogaus SRP ir Sec61 kompleksų baltymų genus, bet ir pašalinti mielių SRP ir Sec61 komplekso baltymus pakeičiant juos žmogaus homologais. Toks mielių sekrecinio kelio modifikavimas sukurtų efektyvų žinduolių tipo ko-transliacinio pernešimo mechanizmą mielių ląstelėse.

Iš literatūroje aprašytų darbų, skirtų ko-transliacinio baltymų pernešimo atkūrimui liposomose *in vitro* buvo žinoma, kad ko-transliaciniam pernešimui yra būtini SRP ir Sec61 kompleksų bei TRAM1 baltymai (Gorlich ir Rapoport, 1993). Todėl šiame darbe buvo klonuota visų šiuos žmogaus baltymus koduojančių genų kDNR.

Genas	Identifikacijos nr. GenBank duomenų bazėje	Žmogaus baltymas	Identifikacijos nr. UniProt duomenų bazėje
SRP72	AF077019	SRP72	O76094
SRP68	AK074698	SRP68	Q9UHB9
SRP54	U51920	SRP54	P61011
SRP19	BC010947	SRP19	P09132
SRP14	X73459	SRP14	P37108
SRP9	U20998	SRP9	P49458
SRPR	X06272	SR α	P08240
SRPRB	AF141882	SR β	Q9Y5M8
SEC61A1	AF077032	Sec61 α 1	P61619
SEC61B	CR456883	Sec61 β	P60468
SEC61G	CR456979	Sec61 γ	P60059
TRAM1	X63679	TRAM1	Q15629

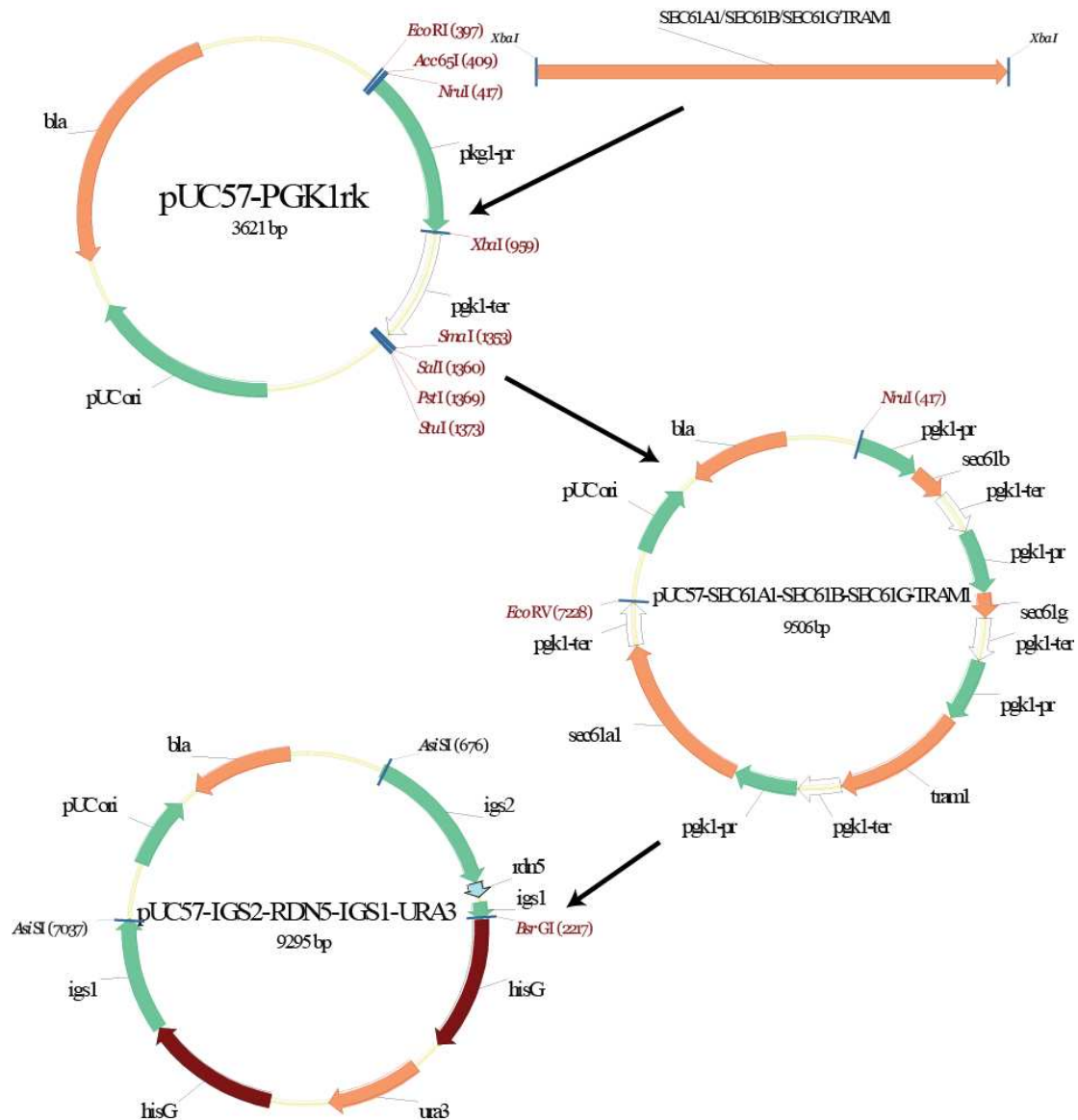
Eksperimento planas numatytas sekančiai: (a) Sukonstruoti mielių kamienus, kuriuose būtų integruoti žmogaus Sec61, SRP kompleksų ir TRAM1 genai; (b) Sukurtuose mielių kamienuose inaktyvuoti mielių Sec61 ir SRP kompleksus; (c) Įvertinti TVH baltymo translokacijos į ET efektyvumą humanizuotuose mielių kamienuose.

Žmogaus Sec61 translokoną sudaro Sec61 α , Sec61 β ir Sec61 γ baltymai, o mielėse Sec61p (55% sekos identiškumas), Sbh1p (26%) ir Sss1p (37%) baltymai. Sėkmingai baltymo translokacijai žinduolių ląstelėse reikalingas mielėse funkcinio homologo neturintis TRAM1 baltymas, kuris perneša signalinę sintetinio baltymo seką nuo SRP dalelės į Sec61 translokoną (Voigt ir kt., 1996). Žmogaus SEC61A1, SEC61B, SEC61G ir TRAM1 genų kDNR buvo klonuota naudojant komercinę žmogaus kepenų kDNR biblioteką (ClonTech). Žmogaus genai kDNR pavidale buvo klonuoti į konstitutyviai veikiančias mielių *PGK1* geno raiškos kasetes. Skirtingų žmogaus genų raiškos kasetės buvo apjungtos ir įstatytos į darbo metu sukonstruotą plazmidę, skirtą

tikslinių genų integracijai į *S. cerevisiae* ribosominės DNR IGS1 lokusus, taip kaip parodyta 23 paveiksluko schemoje. Ši plazmidė leidžia lengvai atrinkti mielių transformantus su integruotais reikalingais genais auksotrofiniuose *ura3* mielių kamienuose. IGS1 lokusas (22 pav.) yra tinkamas genų integracijai dėl keleto priežasčių: (a) Mielėse ribosominių genų rinkinys (rDNR) XII chromosomoje iš eilės pasikartoja nuo 150 iki 200 kartų; (b) IGS sekos nieko nekoduoja ir, manoma, kad nėra kaip nors ląstelei reikšmingos; (c) Visas regionas yra aktyviai transkribuojamas.



22 pav. Mielių *S. cerevisiae* ribosominės DNR schema. ETS1 ir ETS2 – išorinės transkribuojamos sekos (*angl.* external transcribed spacer); 18S, 5.8S, 26S, 5S – ribosominę RNR koduojančios sekos; ITS1 ir ITS2 – vidinės transkribuojamos sekos (*angl.* internal transcribed spacer), IGS1 ir IGS2 – tarpgeninės sekos (*angl.* intergenic spacer) (James ir kt., 2009).

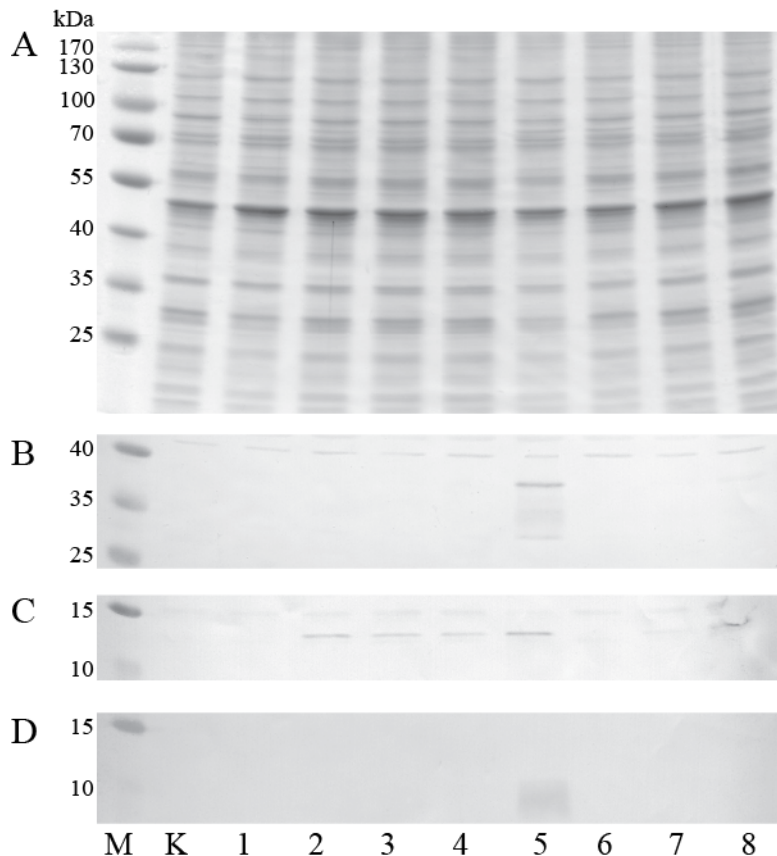


23 pav. Žmogaus SEC61A1, SEC61B, SEC61G ir TRAM1 genų integracijai į *S. cerevisiae* geno IGS1 lokusą skirtos plazmidės konstravimo schema. **bla** – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiantis *E. coli* atsparumą ampicilinui; **pgk1-pr** – mielių *PGK1* geno promotorius; **pgk1-ter** – transkripcijos terminatorius; **pUC-ori** – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; **igs1** ir **igs2** – mielių ribosominės DNR netranskribuojamos tarpgeninės sekos; **rdn5** – 5S ribosominės RNR genas; **ura3** – mielių *URA3* genas; **hisG** – pasikartojančios, homologinei rekombinacijai ir tarp jų esančio *URA3* geno pašalinimui, skirtos sekos. Homologinė rekombinacija vyksta tarp plazmidėje ir genome esančių **igs2-rdn5** ir **igs1 3'** sekų.

Sukonstruota pUC-IGS2-RDN5-IGS1-SEC61A1-SEC61B-SEC61G-TRAM1-URA3 plazmidė buvo linearizuota *AsiSI* RE homologinei rekombinacijai skirtų DNR fragmentų galuose ir panaudota *S. cerevisiae* AH22ura3 kamieno (kamienas buvo specialiai sukonstruotas inaktyvuojant

URA3 geną šio darbo metu) transformacijai. Kaip minėta, IGS1 seka mielių genome kartojasi nuo 150 iki 200 kartų, todėl gaunama daug skirtingą integruotų genų kopijų skaičių turinčių transformantų. Optimalus genų kopijų skaičius kiekvienam genui yra skirtingas, todėl kiekvienu atveju reikalinga atrinkti kamienus geriausiai sintetinančius rekombinantinius žmogaus baltymus. Transformantai, kuriuose įsistatė optimalus žmogaus Sec61 komplekso (Sec61c) ir TRAM1 genų kopijų skaičius, atrinkti pagal sekančią schemą:

- (a) Transformantai išsėjami ir išklonuojami ant terpės be uracilo;
- (b) Pasirinkti 8 kamienai perbraukomi ant terpės su 5-fluororoto rūgštimi, o tokiu būdu gauti auksotrofiniai *ura3* kamienai patikrinami fenotipiškai ir fiziologiškai įvertinant kamienų augimą ant įvairių mitybinių terpių (5-fluororoto rūgštis yra mutagenas);
- (c) Įvykę pakitimai pasirinktų mielių transformantų genome įvertinami PGR metodu ir tikrinant integruotų žmogaus genų nukleotidų sekas;
- (d) Atliekamas pasirinktų mielių transformantų ląstelių membraninių baltymų frakcijos NDS-PAGE ir imunoblotingas su specifiniais konkrečiam tiriamam rekombinantiniam baltymui antikūnais. Atrinkamas optimalus, t.y. geriausiai rekombinantinius baltymus sintetinantis transformantas.



24 pav. Humanizuoto mielių *S. cerevisiae* kamieno, su optimaliu IGS1 lokuse integruotų chimerinių žmogaus SEC61A1, SEC61B, SEC61G ir TRAM1 genų kopijų skaičiumi, atranka. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pUC-IGS2-RDN5-IGS1-SEC61A1-SEC61B-SEC61G-TRAM1-URA3 plazmide, membraninių baltymų frakcijos (3 frakcija) NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas su specifiniais žmogaus Sec61 α 1 (B) Sec61 β (C) ir Sec61 γ (D) baltymams. K – išėginiu mielių AH22 kamieno ląstelių baltymų mėginiai, 1-8 – pasirinkti mielių transformantai, M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Kaip matyti 24 paveiksliuke, IGS1 lokuse įterpti žmogaus genai funkcionuoja, o tikrintuose skirtinguose transformantuose, kaip ir tikėtasi, rekombinantinių žmogaus baltymų raiška skiriasi. Tai rodo, kad IGS1 lokusas yra tinkamas tokioms manipuliacijoms, bet yra būtina atrinkti geriausiai tikslinius baltymus sintetinantį kamieną. Vertinant gautus rezultatus, aiškiai matyti, kad geriausiai žmogaus Sec61 komplekso baltymus sintetina mielių kamienas nr. 5. Šis kamienas, pavadintas *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1, ir buvo pasirinktas tolimesniems bandymams. Aptikti mielėse susintetinto žmogaus TRAM1 baltymo nebuvo galimybės, nes nėra komerciškai platinamų antikūnų. Vis tik, tai, kad į mielių IGS1 lokusą buvo integruojama visų 4 genų raiškos kasetės viename DNR fragmente, bei tai, kad,

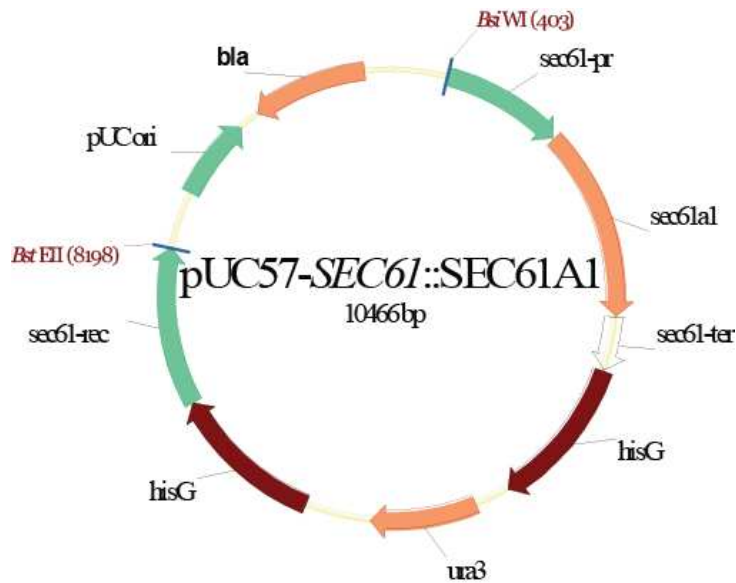
kaip matyti paveiksluke, atskirų baltymų raiška tuose pačiuose kamienuose koreliuoja, leidžia daryti logišką prielaidą, jog ir TRAM1 baltymas atrinktame, geriausiai žmogaus Sec61 baltymus sintetinančiame kamiene, turi būti sintetinamas. Maža to, po integracijos ir įvairių manipuliacijų, aprašytų kamienų atrinkimo schemoje, žmogaus genų seka buvo patvirtinta nuskaitant pirminę nukleotidų seką, o galimybė, kad DNR pažaida, sustabdanti genų raišką, susidarė visų integruotų TRAM1 genų promotoriuose ar terminatoriuose yra itin maža. Žinoma, teisinga geno seka sujungta su promotoriumi ir terminatoriumi dar negarantuoja, kad baltymas tikrai bus sintetinamas, todėl TRAM1 baltymo sintezę mielėse reiktų patvirtinti kitais metodais. Vis tik, nors ir tiesioginiais bei netiesioginiais metodais neįrodyta, kad žmogaus TRAM1 baltymas yra sintetinamas mielių ląstelėse, logiška tikėti, jog TRAM1 baltymas yra sintetinamas kartu su žmogaus Sec61 baltymais atrinktame *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamiene.

Analizuojant mielėse susintetintus rekombinantinius žmogaus Sec61 baltymus, pirmiausia, galima teigti, kad pagal elektroforezinį judrumą PAAG gelyje, jie atitinka praktiškai nustatytą išgrynintų žmogaus Sec61 α , Sec61 β ir Sec61 γ baltymų molekulinę masę PAA geliuose (Wirth ir kt., 2003). Stipriai hidrofobiški baltymai dažnai NDS-PAGE metu PAA geliuose migruoja skirtingai negu tokio pat dydžio globuliniai baltymai, todėl jų sudaromų juostų molekulinė masė, vertinant pagal baltymų dydžio standartus, neatitinka teoriškai iš ar. sekos paskaičiuotos baltymo molekulinės masės. Tai, kad žmogaus Sec61 komplekso baltymai buvo aptikti mielių membraninių baltymų frakcijoje bei buvo sėkmingai ekstrahuoti iš membranų nejoniniu detergentu (neparodyta) rodo, kad šie baltymai yra įterpiami į ET membranas. Eksperimentų įrodančių, kad rekombinantiniai žmogaus Sec61 baltymai sudaro funkcišką translokoną mielėse, šiame darbe atlikta nebuvo, bet tai, kad literatūros duomenimis (Voigt ir kt., 1996; Wirth ir kt., 2003) išgryninti žmogaus Sec61 komplekso baltymai dirbtiniame plokščiame lipidų dvisluoksnyje, taip pat kaip ir liposomose, sudaro veiklų translokoną, leidžia manyti, kad ir mielių ląstelėse žmogaus Sec61 baltymai susirenka ET

membranoje į funkcionalų heterotrimerą. Trumpai, mielių ląstelėse žmogaus Sec61 komplekso baltymai yra efektyviai sintetinami ir aptinkami ET tinklo membranoje, kurioje, greičiausiai, susirenka į translokoną.

Sukonstravus *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamieną, efektyviai sintetinantį žmogaus Sec61 baltymus, sekančiame darbo etape reikėjo inaktyvuoti mielių Sec61 kompleksą išmušant jį sudarančių baltymų genus. Mielių Sec61p ir Sss1p baltymai yra gyvybiškai svarbūs, o Sbh1p – ne. Suprantama, kad galima išmušti mielių *SBH1* geną ir Sec61 kompleksas bus neveiklus. Vis tik nuspręsta pabandyti išmušti ir gyvybiškai svarbius mielių Sec61 komplekso baltymų genus *SEC61*, *SSS1* ir *SBH1*, pakeičiant juos žmogaus homologais, siekiant nustatyti, ar žmogaus homologiški baltymai gali pakeisti mielių baltymus. Tokiu būdu rekonstruotų mielių ET membranose būtų tik žmogaus Sec61 translokonas be mielių homologiškų baltymų. Darbo principas reikalauja sukurti būtent tokius humanizuotus kamienus, be to, literatūroje nepavyko aptikti bandymų pakeisti mielių gyvybiškai svarbius genus žmogaus homologais, todėl tokius bandymus visada įdomu atlikti.

Šiuo tikslu buvo klonuotos mielių *SEC61*, *SBH1* ir *SSS1* genų aplinkinės sekos, o tarp jų įterpti žmogaus homoliniai genai ir sekos, skirtos rekombinantų atrankai. 25 paveiksliuke parodyta ir paaiškinta plazmidės, skirtos *SEC61* geno pakeitimui žmogaus SEC61A1 genu, schema ir veikimo principas. Plazmidės *SBH1* ir *SSS1* genų pakeitimui, atitinkamai, žmogaus SEC61B ir SEC61G genais, sukonstruotos identiškai. Šis bandymas patogus tuo, kad naudojant visiškai tokią pat strategiją buvo bandoma išmušti gyvybiškai svarbius ir nesvarbius mielių baltymus koduojančius genus, todėl buvo nesunku įvertinti pasirinktos taktikos teisingumą ir efektyvumą. .

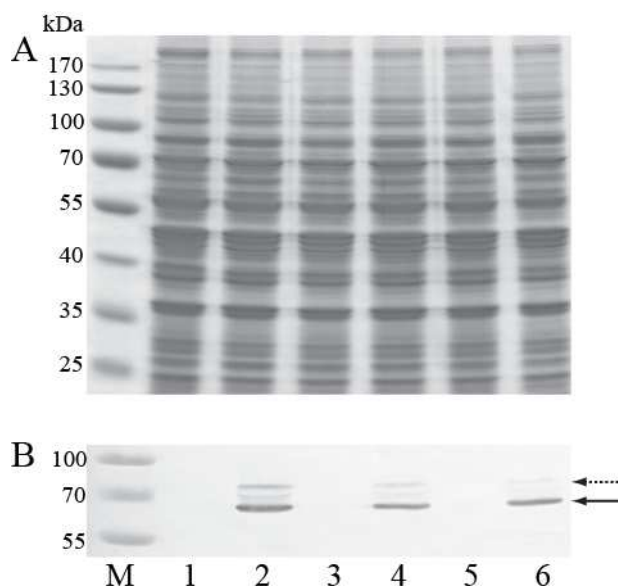


25 pav. Žmogaus SEC61A1 geno rekombinacijai į *S. cerevisiae* genomą, pakeičiant SEC61 geną, skirtos plazmidės schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *sec61-pr* – mielių *CNE1* geno promotorius; *sec61-ter* – transkripcijos terminatorius; *pUC ori* – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; *sec61a1* – žmogaus Sec61A1 baltymo genas; *sec61-rec* – apytiksliai 1kb mielių genomo seka nuo *SEC61* geno STOP kodono; *ura3* – mielių *URA3* genas; *hisG* – pasikartojančios, homologinei rekombinacijai ir tarp jų esančio *URA3* geno pašalinimui, skirtos sekos. Homologinė rekombinacija vyksta tarp *sec61-pr* ir *sec61-rec* sekų plazmidėje ir genome, ko pasėkoje, tiksliai vietoj mielių *SEC61* geno sekos nuo pirmo iki paskutinio kodono įsistato žmogaus SEC61A1 genas su *SEC61* geno terminatoriumi ir integrantų atrankai reikalingas mielių *URA3* genas, apsuptas HisG sekų.

Sukonstruotos plazmidės pUC57-*SEC61::SEC61A1*, pUC-*SBH1::SEC61B* ir pUC57-*SSS1::Sec61G* buvo linearizuotos homologinei rekombinacijai skirtų DNR fragmentų galuose, taip, kad nebūtų palikta nehomologiškų mielių genomui nukleotidų, ir panaudotos *S. cerevisiae* AH22_IGS1-*Sec61c*-TRAM1 kamieno transformacijai. Išsėjus transformantus ant selektyvios terpės bei įvykusius genomo pertvarkymus įvertinus PGR metodu naudojant specifinius pradmenis, nustatyta, kad rekombinacijos metu mielių kamienuose žmogaus homologu buvo pakeistas ne tik gyvybiškai nebūtinasis mielių *SBH1* genas, bet ir gyvybiškai būtinas *SSS1* genas. Gauti kamienai AH22_*SBH1::SEC61B_IGS1-Sec61c*-TRAM1 ir AH22_*SSS1::SEC61G_IGS1-Sec61c*-TRAM1. Tuo tarpu, mielių *SEC61* geno žmogaus SEC61A1 genu pakeisti nepavyko ir gyvybingų mielių kamienų, kuriuose įvyko toks pakeitimas nebuvo. Baltymų lygyje įvertinti įvykusių genų

pakeitimų nepavyko. Komerčiškai platinamų antikūnų prieš mielių Sbh1p ir Sss1p baltymus nėra, o kamienuose AH22_*SBH1*::SEC61B_IGS1-Sec61c-TRAM1 ir AH22_*SSS1*::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 žmogaus Sec61β ir Sec61γ baltymai jau yra sintetinami naudojant stiprius mielių *PGK1* geno promotorius, todėl papildomai susintetintą šių baltymų kiekį imunoblotinge įvertinti sunku. Vis tik vertinant PGR ir sekoskaitos rezultatus galima teigti, kad: (a) pasirinkta mielių genų pakeitimo žmogaus homologais strategija yra teisinga; (b) žmogaus Sec61γ baltymas funkciškai pakeičia mielių Sss1p ir mielių ląstelės funkcionuoja be gyvybiškai svarbaus baltymo; (c) žmogaus Sec61A1 baltymas nekomplementuoja mielių Sec61p baltymo funkciją, todėl negali jo pakeisti mielių ląstelėse.

Atlikus paprastas manipuliacijas buvo gautas ir *S. cerevisiae* AH22_*SBH1*::SEC61B_*SSS1*::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienas, kuriame žmogaus homologais pakeisti mielių *SBH1* ir *SSS1* genai. Tokiu būdu gautas humanizuotas mielių kamienas, kuriame sintetinami žmogaus Sec61 translokono baltymai ir tikėtina TRAM1 baltymas (24 pav.) bei pašalinti mielių translokono Sec61β ir Sec61γ baltymai. Šis ir AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 mielių kamienai buvo transformuoti pFGG3-TVH plazmide. Gautuose transformantuose buvo įvertinta žmogaus baltymų įtaka TVH baltymo pernešimui į ET mielėse (26 pav.).



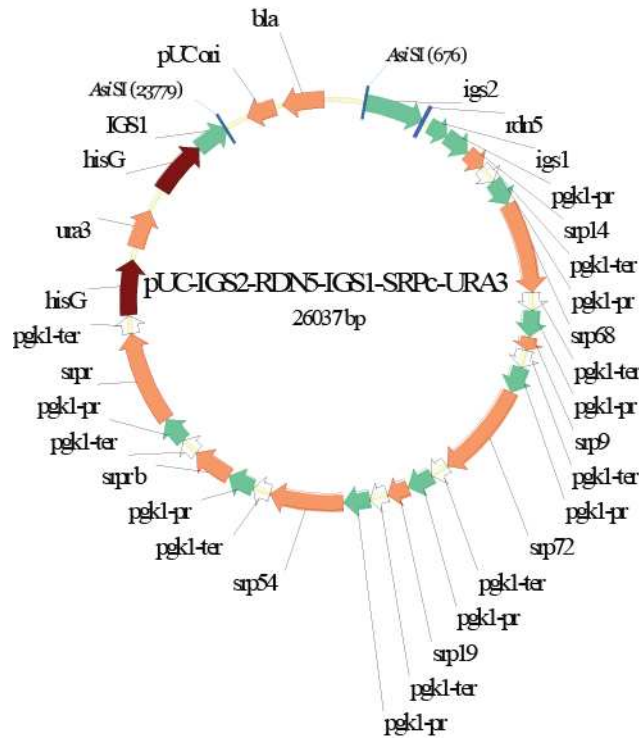
26 pav. Rekombinantinio, humanizuotuose mielių *S. cerevisiae* kamienuose susintetinto, TVH baltymo analizė. Mielių AH22 (1 ir 2), AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 (3 ir 4) ir AH22_ *SBH1*::SEC61B_ *SSS1*:: SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 (5 ir 6) kamienų ląstelių, transformuotų pFGG3 (1, 3 ir 5) ir pFGG3-TVH (2, 4 ir 6) plazmidėmis, grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais (B). **M** – dydžių standartas (UAB Fermentas SM0671); Ištisinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma.

Glikozilintos TVH formos kiekis lyginant su neglikozilintu baltymu buvo įvertintas kiekybiškai naudojant GE Healthcare ImageQuant TL programą (automatinis nustatymo režimas). Gauti duomenys rodo, kad kontroliniame *S. cerevisiae* AH22 kamienne į ET yra pernešama apie 20% (26 pav. 2 takelis), *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienne – 10% (26 pav. 4 takelis), o *S. cerevisiae* AH22_ *SBH1*::SEC61B_ *SSS1*::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienne – 4% (26 pav. 6 takelis) viso TVH baltymo. Rezultatai aiškiai rodo, kad mielių *S. cerevisiae* ląstelėse perprodukuotas žmogaus Sec61 translokonas kartu su TRAM1 baltymu sumažina į ET pernešamo TVH baltymo kiekį dvigubai, o papildomai pašalinus mielių Sec61 translokono komponentus, TVH beveik nebėra pernešamas į ET. Nors tokie rezultatai atrodo logiški, nes, kaip minėta, atkurti ko-transliacinį baltymų pernešimą *in vitro* reikalinga ne tik Sec61 translokonas ir TRAM1 baltymas, bet ir SRP dalelė bei SRP receptorius, vis tik, sunku paaiškinti, kodėl žmogaus Sec61 komplekso ir TRAM1 baltymai sutrikdo TVH pernešimą į ET (26 pav. 4

ir 6 takeliai). Įdomu tai, kad humanizuotų mielių kamienų *S.cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 ir *S. cerevisiae* AH22_SBH1::SEC61B_SSS1::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 ląstelės fenotipiškai ir fiziologiškai nesiskiria nuo kontrolinių *S. cerevisiae* AH22 kamieno ląstelių, tai pat nesiskiria grubių šių kamienų lizatų baltymų raštas PAAG (26 pav. 1, 3 ir 5 takeliai), todėl logiška manyti, jog žmogaus Sec61 komplekso ir TRAM1 baltymai nesutrikdo sekrecinių ir membraninių mielių ląstelių baltymų biosintezės, bet specifiškai sutrikdo tik TVH baltymo pernešimą į ET – kuo labiau humanizuotas mielių Sec61 translokonas, tuo mažiau TVH baltymo perkeliama į ET. Atrodo, lyg žmogaus Sec61 translokonas kartu su TRAM1 baltymu konkuruoja su mielių translokacijos aparatu dėl sąveikos su TVH baltymu, bet nesugeba atlikti savo funkcijos. Be to, vykstant ko-transliaciniam baltymų pernešimui, labai svarbi yra SRP ir Sec61 kompleksų baltymų sąveika (Helmers, 2003). Nesant natyvaus mielių Sec61 komplekso, mielių SRP dalelė negali atlikti savo funkcijos ir TVH baltymas nėra perkeliamas į ET. Todėl sekančiame darbo etape į mielių ląsteles buvo perkeltas ir žmogaus SRP kompleksas.

Žmogaus SRP dalelę sudaro 6 SRP baltymai (SRP72 (18% ar. sekos identiškas mielių homologui SRP72), SRP68 (15% ar. sekos identiškas mielių homologui SRP68), SRP54 (46% ar. sekos identiškas mielių homologui SRP54), SRP19 (ar. 11% sekos identiškas mielių homologui Sec65p), SRP14 (ar. 18% sekos identiškas mielių homologui SRP14) ir SRP9 (homologo mielėse *S. cerevisiae* neturi), 2 SRP receptorių sudarantys baltymai (SRPr, 28% ar. sekos identiškas mielių homologui Srp101p) ir SRPrB (22% ar. sekos identiškas mielių homologui Srp102p) bei 7SL RNR (27% nt sekos identiškas mielių scR1 RNR). Žmogaus SRP baltymus koduojantys genai buvo klonuoti naudojant specifinius pradmenis iš žmogaus kepenų kDNR bibliotekos, patikrinta kiekvieno geno nukleotidų seka, atrinkti genai, kurių nt sekos pilnai sutampa su Genų banke esančiomis atitinkamų genų sekomis. Klonuoti genai įstatyti į mielių *PGK1* geno raiškos kasetes, kasetės apjungtos ir perkeltos į pUC57-IGS2-RDN5-IGS1-URA3 plazmidę, skirtą genų integracijai į mielių ribosominės DNR IGS1 lokusą, lygiai taip,

kaip buvo daryta su žmogaus Sec61 komplekso ir TRAM1 genais (23 pav.). Gauta plazmidė pUC57-IGS2-RDN5-IGS1-SRPr-URA3 (27 pav.), skirta žmogaus SRP komplekso (SRPr) genų integracijai į mielių genomą. Visų klonuotų genų nukleotidų sekos buvo patikrintos.

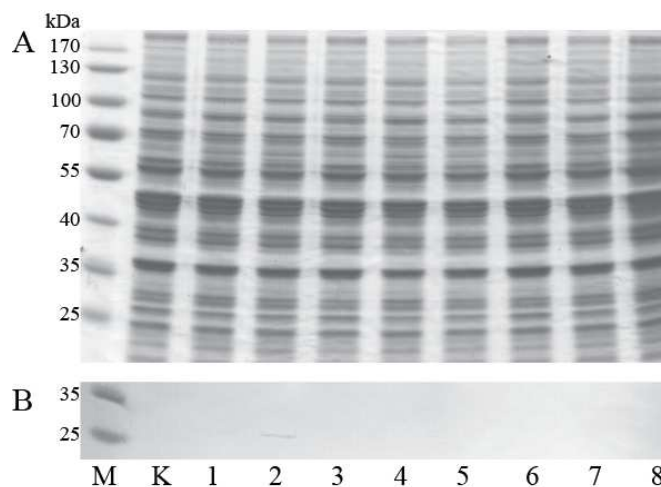


27 pav. Žmogaus SRP72, SRP68, SRP54, SRP19, SRP14, SRP9, SRPR ir SRPRB genų integracijai į *S. cerevisiae* genomo IGS1 lokusą skirtos plazmidės schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *pgk1-pr* – mielių *PGK1* geno promotorius; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *pUC-ori* – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; *igs1* ir *igs2* – mielių ribosominės DNR netranskribuojamos intergeninės sekos; *rdn5* – 5S ribosominės RNR genas; *ura3* – mielių *URA3* genas; *hisG* – pasikartojančios, homologinei rekombinacijai ir tarp jų esančio *URA3* geno pašalinimui, skirtos sekos. Homologinė rekombinacija vyksta tarp plazmidėje ir genome esančių *igs2-rdn5* ir *igs1* 3' sekų.

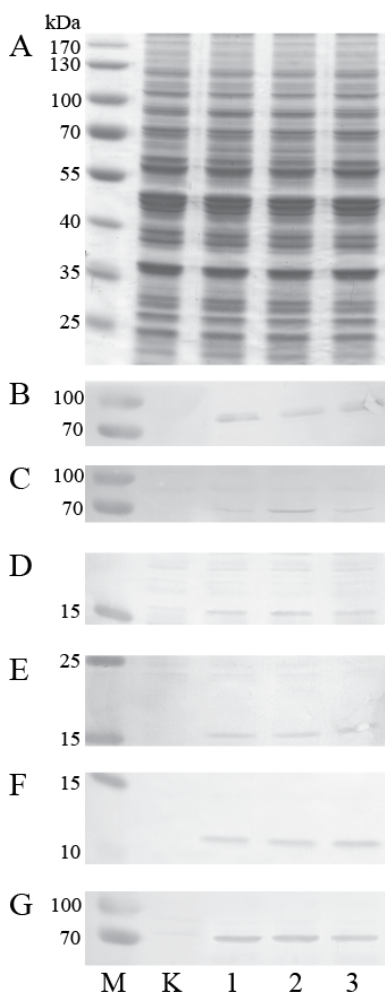
Gauta plazmidė pUC57-IGS2-RDN5-IGS1-SRPr-URA3 buvo linearizuota *AsiSI* RE homologinei rekombinacijai skirtų fragmentų galuose ir panaudota *S. cerevisiae* AH22*ura3*, *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 ir *S. cerevisiae* AH22_ SBH1:: SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienų transformacijai. Humanizuoti mielių kamienai *S. cerevisiae* AH22_IGS1-SRPr, *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPr ir *S. cerevisiae* AH22_ SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c -TRAM1-

SRPc, geriausiai sintetinantys žmogaus SRP baltymus, buvo atrinkti pagal tą pačią schemą, kaip ir *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienas (87 psl a-c.) :

- (d) kiekvienu atveju buvo atliekamas pasirinktų mielių transformantų ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE ir imunoblotingas su specifiniais SR β baltymui antikūnais, pagal signalo intensyvumą buvo atrenkamas optimalus, t.y. geriausiai rekombinantinį baltymą sintetintis transformantas (28 pav.);
- (e) taupant antikūnus ir laiką tik atrinktų pagal SR β baltymo sintezę *S. cerevisiae* AH22_IGS1-SRPc, *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc ir *S. cerevisiae* AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc transformantų ląstelių grubiuose lizatuose imunoblotingu buvo tikrinama ar sintetinami visi kiti žmogaus SRP baltymai (29 pav.).



28 pav. Humanizuoto mielių *S. cerevisiae* AH22_IGS1-SRPc kamieno, su optimaliu IGS1 lokuse integruotų chimerinių žmogaus SRPrB geno kopijų skaičiumi, atranka. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pUC57-IGS2-RDN5-IGS1-SRPc-URA3 plazmide, ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas (B) su specifiniais žmogaus SR β baltymui antikūnais. K – išėiginio mielių AH22 kamieno ląstelių baltymų mėginiai, 1-8 – pasirinkti mielių transformantai, M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671). Transformantai AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc ir AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc geriausiai sintetinantys SR β baltymą atrinkti identišškai.



29 pav. Humanizuotų mielių *S. cerevisiae* kamienų, su IGS1 lokuse integruotais žmogaus SRP komplekso genais analizė. Atrinktų mielių *S. cerevisiae* AH22_IGS1-SRPc (1), AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc (2) ir AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc (3) transformantų ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas su specifiniais antikūnais žmogaus SRP72 (B), SRP68 (C), SRP19 (D), SRP14 (E), SRP9 (F) ir SRα (G) baltymams. K – išieginio mielių AH22 kamieno ląstelių baltymų mėginiai. M – dydžių standartas (UAB Fermentas SM0671).

Kaip matyti paveiksluose, naudojant numatytą schemą, buvo atrinkti humanizuoti mielių kamienai ir įsitikinta, kad juose sintetinas visi žmogaus SRP baltymai, o jų dydis atitinka teoriškai apskaičiuotą šių baltymų dydį. (SRP54 išbandžius dvejus skirtingus antikūnus imunoblotinge reagavo labai silpnai, 29 paveiksluke neparodyta). Vis tik galima pastebėti, kad, greičiausiai dėl to, jog homologinės rekombinacijos metu į mielių genomą turėjo įsistatyti didelis, beveik 20 kb DNR fragmentas, rekombinantinių žmogaus SRP baltymų raiška yra nestipri – grubių mielių ląstelių lizatų PAAG rekombinantinių žmogaus SRP baltymų sudaromų juostų nėra matyti, o imunoblotinge su specifiniais antikūnais mielėse sintetinami SRP baltymai reaguoja silpnai.

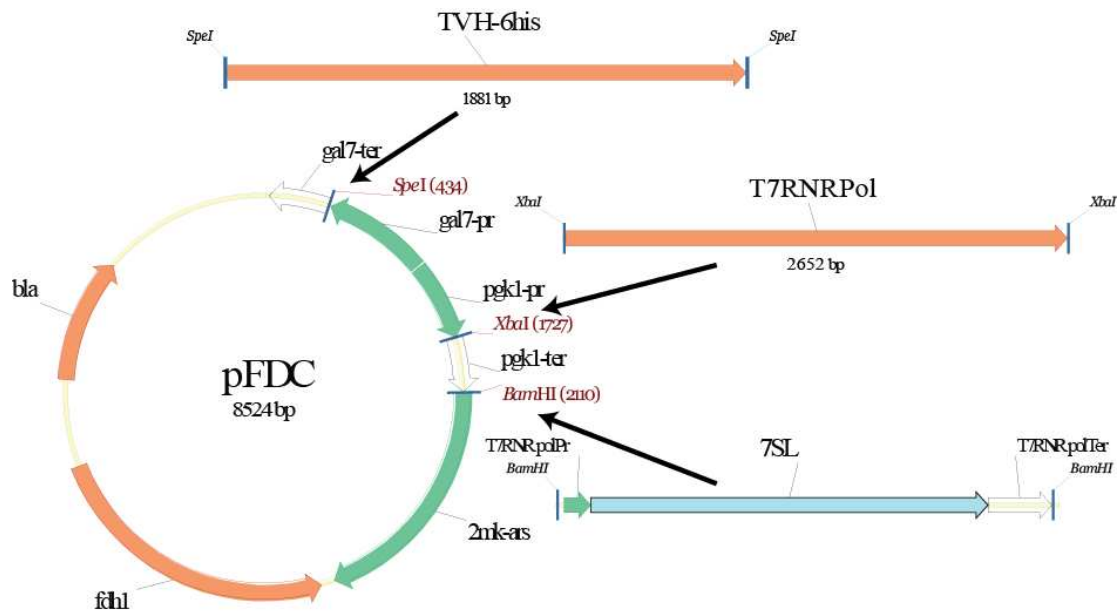
Sukonstravus humanizuotus mielių kamienus, sintetinančius žmogaus SRP baltymus, reikėjo į mielių ląsteles perkelti paskutinį SRP dalelės elementą

– žmogaus 7SL RNR. Tiek mielių, tiek žmogaus ląstelėse RNR genai yra transkribuojami RNR polimerazės III ir dažniausiai turi tiek išorines, tiek vidines promotorių sekas (Dieci, 2001; Englert ir kt., 2004). Palyginus žmogaus ir mielių SRP RNR (7SL ir scR1) sekas, nustatyta, kad tiek vidinės promotorinės sekos, tiek jų vieta gene nesutampa, todėl tikėtina, kad paprastai perkėlus žmogaus 7SL RNR geną į mielių ląstelę, jo transkripcija nevyks. Taip pat, negalima žmogaus 7SL RNR koduojančio geno transkribuoti RNR polimerazės II pagalba (pvz., šiame darbe SRP baltymų sintezei indukuoti naudotą mielių *PGK1* geno promotorių), nes RNR polimerazės II sintetinami pirminiai transkriptai yra ląstelėje modifikuojami: prie visų RNR polimerazės II eukariotuose sintetinamų RNR molekulių 5' galuose yra prijungiamos 7-metilganozino „kepurės“, o 3' galuose – „poliA uodegos“, sudarytos iš daug iš eilės pasikartojančių adenino nukleotidų. Tuo tarpu, žmogaus ląstelėse sintetinama 7 SL RNR tokių modifikacijų neturi. Todėl 7 SL RNR sintezei mielėse buvo pasirinkta bakteriofago T7 RNR polimerazė (T7RNRpol), kuri labai efektyviai vykdo genų, esančių tarp T7 RNR polimerazės atpažįstamų promotoriaus ir terminatoriaus, transkripciją ir eukariotinėse ląstelėse. Šiam tikslui buvo susintetintas 7 SL RNR koduojantis genas, su priekyje prijungtu T7 RNR polimerazės promotoriumi ir T7 RNR polimerazės transkripcijos terminatoriumi gale:

taatacgactcactataggggcccgggcgcggtggcgcgctgctgtagtagtcccagctactcgggaggctgagg
ctggaggatcgcttgagtccaggagtctgggctgtagtgcgctatgccgatcgggtgtccgcactaagtt
cggcatcaatatggtgacctcccgggagcgggggaccaccaggtgcctaaggagggtgaaccggcc
cagtcggaaacggagcaggtcaaaactcccgtgctgatcagtagtgggatcgcgctgtgaatagcca
ctgcactccagcctgggcaacatagcgagaccccgtctctctagcataacccttggggcctctaaacgggt
cttgaggggtttttg.

Geno seka paryškinta (GenBank atpažinimo nr. NR_002715), T7 RNR polimerazės promotorius ir terminatorius pabraukti. Bakteriofago T7 RNR polimerazės genas (GenBank atpažinimo nr. NC_001604, baltymo seka Uniprot

duomenų bazėse – P00573), TVH ir 7SL RNR genai buvo klonuoti į darbo metu sukonstruotą vektorių pFDC, taip, kaip parodyta 30 paveiksliuke.

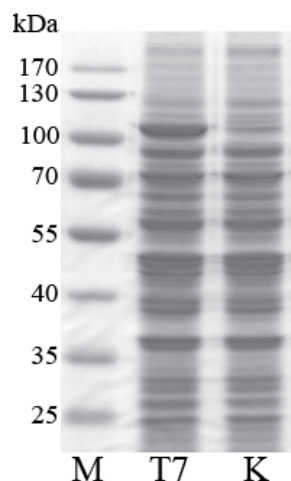


30 pav. *S. cerevisiae* TVH, T7 bakteriofago RNR polimerazės (T7RNRpol) ir žmogaus 7SL RNR genų raiškos vektoriaus konstravimo schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *gal7-pr* – galaktoze indukuojamas mielių *GAL7* geno promotorius; *gal7-ter* – transkripcijos terminatorius; *pgk1-pr* – konstitutyviai veikiantis mielių *PGK1* geno promotorius; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *fdh1* – mielių *Candida maltosa* genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę, nulemiančią mielių atsparumą formaldehidui; *2mk-ars* – mielių 2μm plazmidės DNR, užtikrinanti vektoriaus replikaciją mielėse.

Gautoje plazmidėje pFDC-TVH-T7RNRpolT7-7SL polimerazės genas, kaip ir SRP baltymus koduojantys genai, buvo sujungti su konstitutyviai veikiančiu mielių *PGK1* geno promotoriumi, o TVH su galaktoze indukuojamu mielių *GAL7* geno promotoriumi. Tokiu būdu užtikrinama, kad žmogaus SRP dalelė ir SRP receptoriai bei Sec61 komplekso ir TRAM1 baltymai *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc ir *S. cerevisiae* AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc kamienuose jau bus susintetinti mielių ląstelėje iki prasidedant TVH baltymo sintezė.

Pirmiausia, kad įsitikinti, jog žmogaus 7SL RNR sintezės sistema veikia mielių ląstelėse, plazmide pFDC-TVH-T7RNRpolT7-7SL ir pFDC vektoriumi

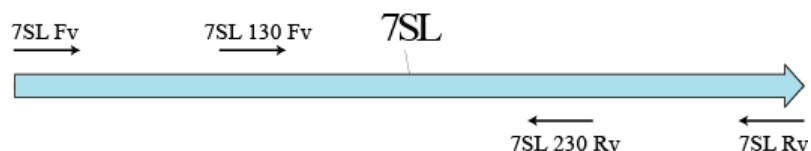
buvo transformuotas *S. cerevisiae* AH22 mielių kamienas. Mielių transformantų, užaugintų terpėje su gliukoze, grubūs lizatai analizuoti NDS-PAGE (31 pav.).



31 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių žmogaus šaperonus, augimo terpės analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFDC (**K**) ir pFDC-TVH-T7RNRpolT7-7SL (**7SL**) plazmidėmis, ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE. **M** – dydžių standartas (UAB Fermentas SM0671). Rodyklė žymi papildomą baltymą, sintetinamą pFDC-TVH-T7RNRpolT7-7SL plazmide transformuotose mielių ląstelėse – greičiausiai T7 RNR polimerazė.

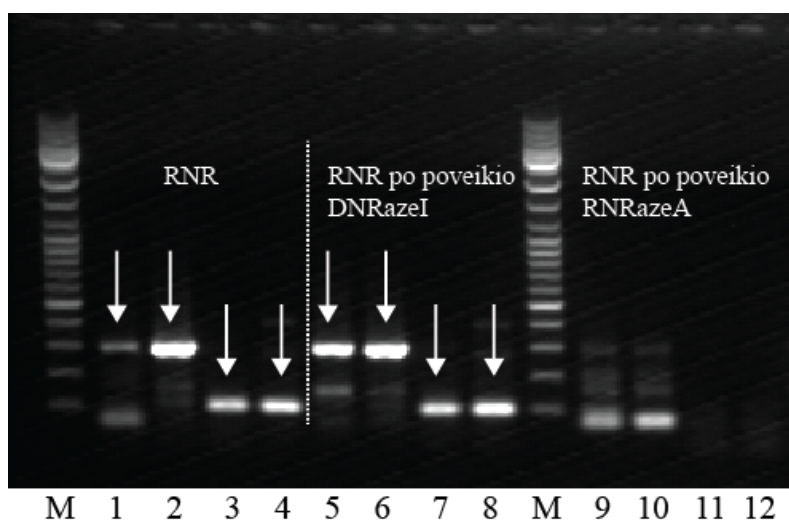
Kaip matyti 31 paveiksliuke, mielių ląstelių transformuotų pFDC-TVH-T7RNRpol-7SL plazmide grubių lizatų mėginiuose PAAG aiškiai matyti papildoma, lyginant su mielių ląstelių, transformuotų kontroline pFDC plazmide, grubių ląstelių lizatų mėginiais, baltymo juosta (parodyta rodykle). Papildoma baltymo juosta tiksliai atitinka teoriškai apskaičiuotą T7 RNR polimerazės dydį, todėl galima teigti, kad T7 RNR polimerazė mielių ląstelėse yra sintetinama naudojant šiame darbe sukonstruotą plazmidę.

Įvertinus, kad mielių ląstelėse naudojant pFDC-TVH-T7RNRpol-7SL plazmidę yra sintetinama T7 RNR polimerazė, reikėjo nustatyti, ar sintetinama žmogaus 7SL RNR T7 RNR raiškos kasetėje. Šiuo tikslu buvo išskirta mielių ląstelių, transformuotų pFDC ir pFDC-TVH-T7RNRpol-7SL plazmidėmis, visa RNR ir nuo jos vykdyta AT-PGR reakcija su specifiniais 7SL RNR pradmenimis, parodytais 32 paveiksliuke.



32 pav. AT-PGR reakcijai naudotų pradmenų užsėdimo ant 7SL RNR schema.

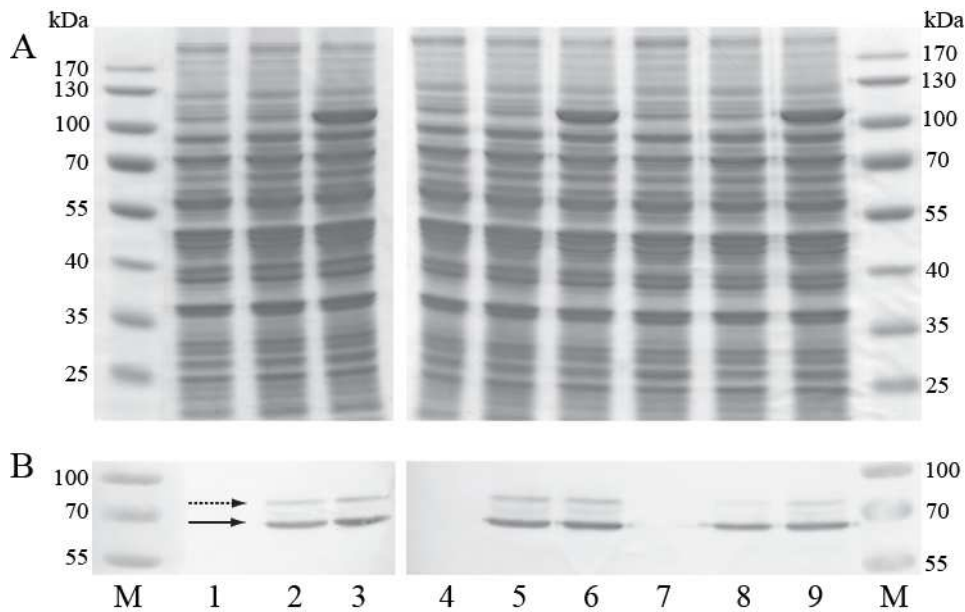
Pradžioje atlikta atvirkštinė transkripcija (AT) nuo visos mielių ląstelių RNR. Norint įsitikinti ar gryninant RNR neliko DNR priemaišų, kurios gali duoti klaidingai teigiamą rezultatą, atvirkštinė transkripcija atlikta ir nuo atskirai nukleazėmis RNRazeA bei DNRazeI paveiktos visos RNR preparatų. Tada buvo atlikta PGR reakcija naudojant tuos pačius pradmenis, kaip parodyta 32 paveiksliuke. Atitinkamai, jei AT buvo atlikta su 7SL Fv ar 7SL Rv pradmenimis, PGR reakcija vykdyta su šių pradmenų pora, o jei AT atlikta su 7SL 130 Fv ar 7SL 230 Rv pradmenimis, PGR reakcija vykdyta tik su šių pradmenų pora (33 pav.). Analizuojant mielių ląstelių, transformuotų kontroliniu pFDC vektoriumi, RNR AT-PGR metodu su specifiniais žmogaus 7SL RNR pradmenimis, jokių DNR produktų negauta (neparodyta).



33 pav. Mielių ląstelių, transformuotų pFDC-TVH-T7RNRPol-7SL plazmide, totalinės RNR analizė AT-PGR metodu naudojant specifinius žmogaus 7SL RNR pradmenis. 1.5% agarozės gelyje frakcionuota DNR. 1,2,5,6,9,10 – PGR su 7SL Fr ir 7SL Rv pradmenimis, 3,4,7,8,11,12 – su 7SL 130 Fv ir 7SL 230 Rv. 1,5,9 – AT su 7SL Fv pradmeniu, 2,6,10 – su 7SL Rv pr., 3,7,11 – su 7SL 130 Fr pr., 4,8,12 – su 7SL 230 Rv pr. Rodyklės žymi PGR produktus, kurie pagal dydį atitinka teorinį DNR ilgį. Pilnos 7SL RNR ilgis – 300nt (7SL Fr + 7SL Rv), vidinės 7SL RNR dalies – 100nt (7SL 130 Fv + 7SL 230Rv). RNR – produktai, gauti atlikus AT nuo totalinės RNR; RNR po DNazės – produktai, gauti nuo DNRazeI paveiktos totalinės RNR; RNR po RNAzės – produktai, gauti totaline RNR paveikus RNRazeA; M – DNR ilgių standartas.

Kaip matyti 33 paveiksliuke, atlikus AT-PGR reakciją naudojant visą mielių ląstelių, transformuotų pFG-MeH-T7RNRpol-7SL plazmide, RNR, gauti numatyto dydžio produktai (33 pav., baltos rodyklės). Atitinkamai, visą mielių RNR paveikus DNazeI gauti laukiamo dydžio PGR produktai, tuo tarpu, paveikus RNAzeA – produktų negauta, tai rodo, kad PGR produktai, gauti atlikus AT-PGR buvo gauti iš mielių RNR, o ne DNR. Todėl galima teigti, kad žmogaus 7 SL RNR yra sintetinama mielių ląstelėse naudojant šio darbo metu sukonstruota sistemą. Vis tik, teoriškai, T7 RNR polimerazė turi sintetinti tik vieną RNR grandinę, kurią mes aptinkame atvirkštinei transkripcijai naudodami Rv pradmenis (33 pav. 2, 4, 6 ir 8 takeliai). Beje, toks signalas ir yra ryškesnis. Tai, kad 7SL RNR ląstelėje yra abiejų grandinių, galima būtų paaiškinti nebent tuo, kad naudotoje plazmidėje yra keletas promotorių (*GAL7* ir *FDH1* genų promotoriai, 2 μ m DNR sekos promotoriai), kurie gali pagaminti ilgus RNR transkriptus siekiančius ir 7SL RNR geną.

Įsitikinus, kad naudojant T7 RNR polimerazę yra sintetinama žmogaus 7SL RNR, plazmide pFDC-TVH-T7RNRPol-7SL ir kontrolinėmis pFDC bei pFDC-TVH plazmidėmis buvo transformuoti humanizuoti mielių *S. cerevisiae* AH22_IGS1-SRPc, AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc ir AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc kamienai ir įvertinta žmogaus SRP komplekso bei SRP ir Sec61 kompleksų kartu su TRAM1 baltymu įtaka TVH baltymo pernešimui į ET mielių ląstelėse (34 pav.).



34 pav. Rekombinantinio, humanizuotuose mielių *S. cerevisiae* kamienuose susintetinto, TVH baltymo analizė. Mielių AH22_IGS1-SRPc (1, 2 ir 3), AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc (4, 5 ir 6) ir AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc (7, 8 ir 9) kamienų ląstelių, transformuotų pFDC (1, 4 ir 7), pFDC-TVH (2, 5 ir 8) ir pFDC-TVH-T7RNRPol-7SL (3, 6 ir 9) plazmidėmis, grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais (B). M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671); Ištinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma.

Vertinant gautus rezultatus, įdomu pastebėti, kad humanizuotame mielių *S. cerevisiae* AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc kamienne, lygiai kaip ir išeginiame *S. cerevisiae* AH22_SBH1::SEC61B_SSS::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1 kamienne, TVH pernešimas į ET tinklą yra sutrikęs (26 pav. 6 ir 34 pav. 8 takeliai), bet mielių ląstelėse sintetinant žmogaus SRP baltymus kartu su žmogaus 7SL RNR,

pernešimas dalinai atsistato (34 pav. 9 takelis). Kaip minėta anksčiau, mielėse sintetinant žmogaus Sec61 komplekso ir TRAM1 baltymus bei suardžius natyvų mielių Sec61 kompleksą, glikozilintos TVH formos kiekis, nuo bendro TVH baltymo kiekio ląstelėje, sudaro vos 4%, lyginant su 20% išėginiame AH22 kamiene. Tokiose mielių ląstelėse sintetinant žmogaus SRP baltymus kartu su 7SL RNR pernešamo į ET TVH baltymo kiekis padidėja iki 12% nuo bendro baltymo kiekio (34 pav. B; 9 takelis) Panašu, kad pilnas žmogaus SRP kompleksas mielių ląstelėse yra aktyvus ir kartu su žmogaus Sec61 komplekso ir TRAM1 baltymais sugeba į ET perkelti nedidelę dalį TVH baltymo. Vis tik, žmogaus baltymų sąlygojamas ko-transliacinis pernešimas į ET šiame darbe sukonstruotuose kamienuose yra nedidelis, o esant natyviems mielių ląstelių SRP ir Sec61 kompleksams net nepastebimas (34 pav. B; 2, 3, 5 ir 6 takeliai). Apibendrinus, mielių ko-transliacinio pernešimo į ET mechanizmas, nors ir nėra efektyvus perkeliant TVH baltymą į ET (apie 20% baltymo yra glikozilinama) veikia geriau, nei šiame darbe mielių ląstelėse perkelti žmogaus ko-transliacinio pernešimo komponentai (kai TVH pernešimas sutrikęs, perkelia iki 12% baltymo).

Efektyvaus žinduolių tipo ko-transliacinio TVH perkėlimo į ET, kai visas TVH baltymas būtų sintetinamas į ET ertmę, mielių ląstelėse naudojant žmogaus SRP, Sec61 ir TRAM1 baltymus sukurti nepavyko. Galimos priežastys: (a) Sukonstruotuose humanizuotuose kamienuose žmogaus SRP baltymų raiška buvo silpna; (b) Nustatyta, kad naudojant pFDC vektorių ir bakteriofago T7 RNR polimerazę, ląstelėje sintetinas abi žmogaus 7SL RNR grandinės, todėl jos gali susijungti į RNR dupleksus; (c) Žmogaus ląstelėse efektyvų sekretuojamų baltymų pernešimą į ET be bazinių komponentų, SRP, SEC61 ir TRAM1, užtikrina daugybė kitų baltymų, dalis kurių neturi homologų mielių ląstelėje (Zimmermann ir kt., 2011); (d) Mielėse esanti natyvioji SRP dalelė gali nukonkuruoti žmogaus SRP prisijungiant prie TVH baltymą sintetinančių ribosomų. Visos šios priežastys bus išspręstos ir įvertintos tolimesniuose darbuose.

Apibendrinant šiame skyriuje išdėstytus rezultatus, galima konstatuoti, kad, nors efektyvaus žmogaus ko-transliacinio aparato mielėse nepavyko sukurti ir išspręsti TVH baltymo perkėlimo į mielių ląstelių ET problemą, tačiau buvo sukurti humanizuoti mielių kamieniai, įvertinta žmogaus Sec61 ir SRP kompleksų baltymų sintezės mielėse galimybė ir gauti pirmieji rezultatai, kurių pagrindu bus toliau tobulinama mielių *S. cerevisiae* raiškos sistema, pritaikant virusinių paviršiaus glikobaltymų sintezei.

3.2.2 Žmogaus ET šaperonų sintezė mielių ląstelėse ir jų įtakos TVH baltymui analizė

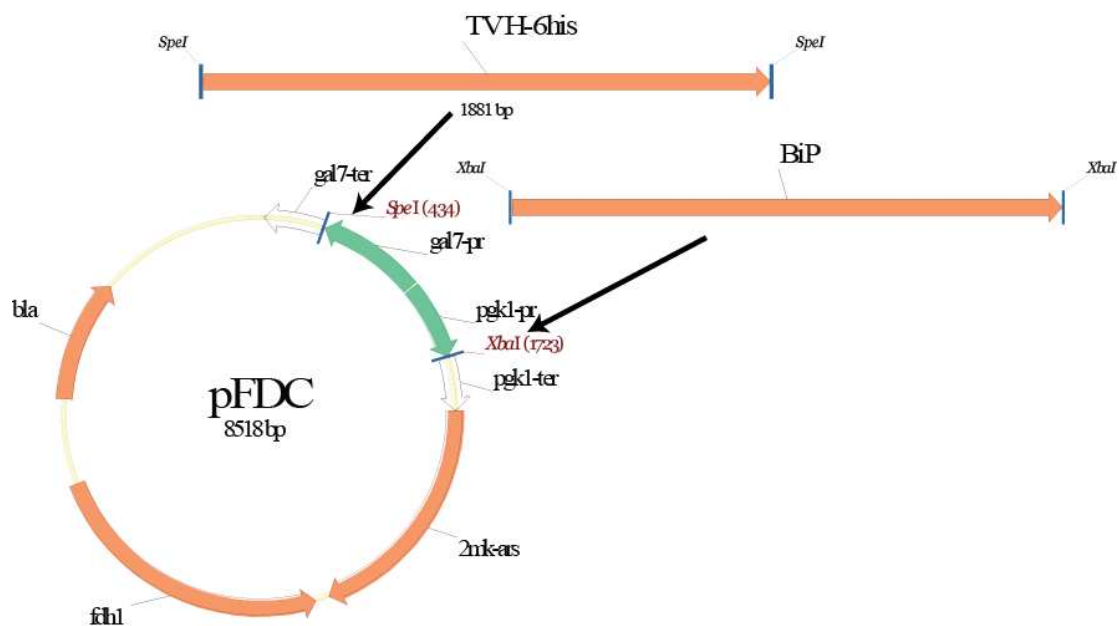
Analizuojant TVH sintezę mielių ląstelėse nustatyta, kad nedidelė dalis (10-20%) TVH yra pernešama į ET ir glikozilinama. Bręstančio glikobaltymo glikozilinimo pobūdis yra labai svarbus ET šaperonams atpažinti substratą ir vykdyti savo funkciją. Glikozilinimo fermentai ir reakcijos žmogaus ir mielių ET yra identiškos (Hamilton ir Gerngross, 2007), todėl tikėtina, kad rekombinantinis TVH baltymas mielių ET yra glikozilinamas lygiai kaip žmogaus ląstelėse – prie asparagino amino rūgšties liekanos N-X-T/S motyvuose prijungiant Glc3Man9GlcNAc2 cukrų grandinę ir po to pašalinant vieną manozės ir dvi gliukozės molekules. Todėl, tikėtina, kad TVH baltymo brendimas mielių ląstelėse stringa ET dėl trūkumo tinkamą baltymo susivyniojimą skatinančių šaperonų, o ne dėl netinkamo glikozilinimo. Šiame darbe nuspręsta klonuoti sekančius žmogaus ET šaperonus koduojančius genus:

Genas	Identifikacijos nr. GenBank duomenų bazėje	Žmogaus baltymas	Identifikacijos nr. UniProt duomenų bazėje
HSPA5	AF216292	BiP/GRP78	P11021
CANX	L18887	Kalneksinas	P27824
CALR	M84739	Kalretikulinas	P27797
P4HB	X05130	PDI	P07237
PDIA3	U42068	ERp57	P30101

Žmogaus baltymai pasirinkti atsižvelgiant į tai, ar literatūros šaltiniuose paminėta, jog jie sąveikauja su bręstančiais virusiniais paviršiaus baltymais žmogaus ląstelėse. Paminėtina, kad iš visų klonuoti pasirinktų žmogaus genų mielių *S. cerevisiae* ląstelės turi homologus BiP (63% sekos identiška), kalneksino (23% sekos identiškumas) ir PDI (28% sekos identiška) baltymus koduojantiems genams.

Šio eksperimento dizainas buvo sudėliotas sekančiai: (a) Susintetinti mielėse žmogaus ET šaperonus, nustatyti jų savybes; (b) Įvertinti kiekvieno žmogaus šaperono atskirai įtaką TVH brendimui mielių ląstelėse; (c) Atrinkti žmogaus šaperonų kombinacijas, kurios efektyviausiai skatina TVH baltymo brendimą mielių *S. cerevisiae* ET; (d) Sukonstruoti *S. cerevisiae* kamienus su integruotomis atrinktomis žmogaus ET šaperonų genų kombinacijomis.

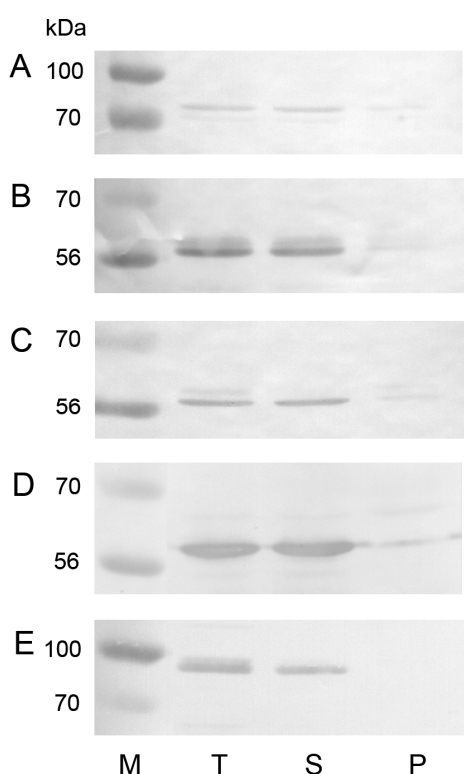
Žmogaus baltymus koduojantys genai buvo klonuoti naudojant komercinę žmogaus kepenų kDNR biblioteką (Clontech) genų galuose įterpiant *XbaI* RE taikinius. Gauti genai klonuoti į specialiai šiam eksperimentui sukonstruotą pFDC vektorių suliejant su konstitutyviai veikiančiu mielių *PGK1* geno promotoriumi, o TVH genas paskiau įterptas sujungiant su galaktoze indukuojamu mielių *GAL7* geno promotoriumi (35 pav.). Gautos plazmidės pFDC-TVH-BiP, pFDC-TVH-CNX, pFDC-TVH-CRT, pFDC-TVH-PDI ir pFDC-TVH-ERp57 užtikrina tai, kad galaktoze indukavus TVH sintezę, mielių ET ertmė jau būtų praturtinta žmogaus šaperonais. Tokia bandymo schema labiausiai primena žmogaus ląstelių ET vykstant TVH baltymo brendimui viruso vystimosi metu.



35 pav. *S. cerevisiae* TVH ir žmogaus BiP genų raiškos vektoriaus konstravimo schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *gal7-pr* – galaktoze indukuojamas mielių *GAL7* geno promotorius; *gal7-ter* – transkripcijos terminatorius; *pgk1-pr* – konstitutyviai veikiantis mielių *PGK1* geno promotorius; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *fdh1* – mielių *Candida maltosa* genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę, nulemiančią mielių atsparumą formaldehidui; *2mk-ars* – mielių 2mų plazmidės DNR, užtikrinanti vektoriaus replikaciją mielėse. Visų likusių žmogaus šaperonų kartu su TVH raiškos sistemų konstravimo schema identiška.

Sukonstruotomis plazmidėmis buvo transformuotos mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno ląstelės. Pirmiausia buvo įvertintos rekombinantinių mielėse susintetintų žmogaus šaperonų savybės, todėl mielių transformantai užauginti terpėje su gliukoze neindukuojant TVH baltymo sintezės. Tam, kad žmogaus ET šaperonai galėtų atlikti savo funkciją mielių *S. cerevisiae* ląstelėse, jie turi būti pernešti į mielių ET. Rekombinantinių žmogaus šaperonų lokalizacija mielių ląstelėse buvo nustatyta išfrakcionavus mielių ląstelių transformuotų plazmidėmis pFDC-TVH-BiP, pFDC-TVH-CNX, pFDC-TVH-CRT, pFDC-TVH-PDI, pFDC-TVH-ERp57 lizatus ir membraninėse frakcijose specifiniais antikūnais imunoblotingo pagalba detektavus žmogaus šaperonus (36 pav.). Kaip matyti iš rezultatų, pateiktų paveiksliuke, visi žmogaus šaperonai

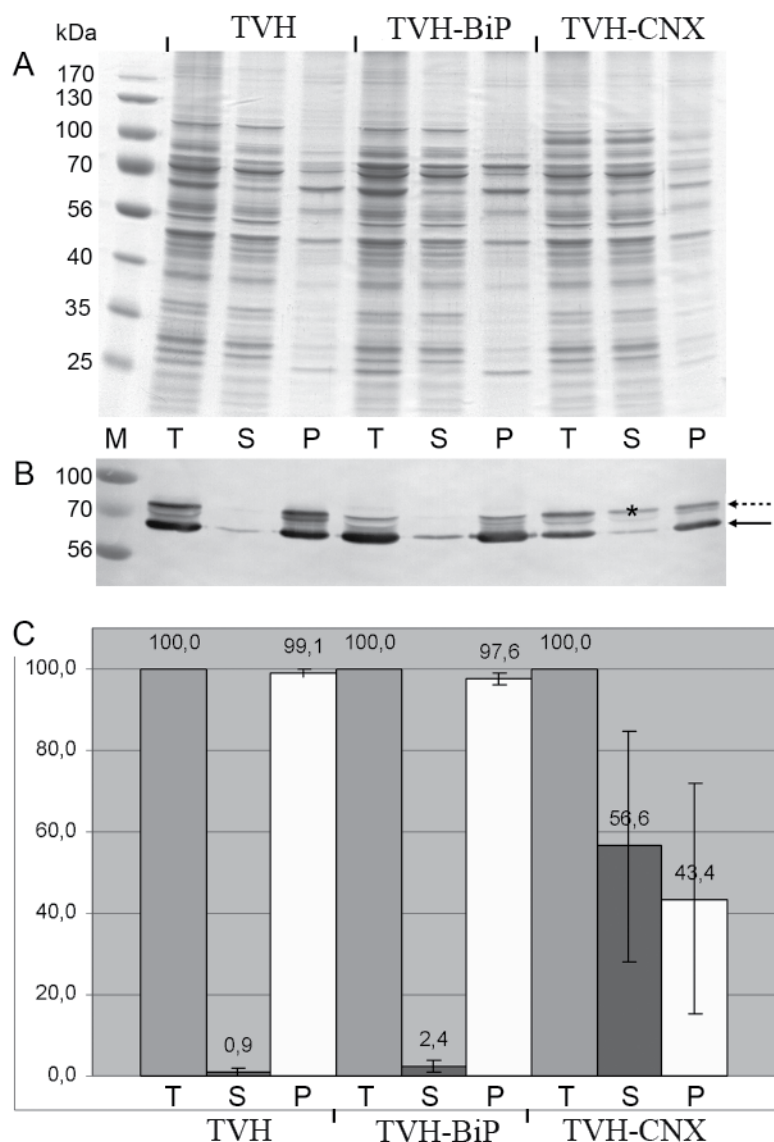
imunoblotinge formavo teoriškai numatyto dydžio juostas, o mielių ląstelėse jie buvo aptikti membraninėse frakcijose ir yra tirpūs nejoniniame detergente TritonX-100. Tokios rekombinantinių žmogaus šaperonų, susintetintų mielių *S. cerevisiae* ląstelėse, savybės pilnai atitinka natyvias šių baltymų savybes. Mažai to, Biochemijos instituto Proteomikos centre nustatius rekombinantinių žmogaus šaperonų N-galą, parodyta, kad mielėse susintetinti žmogaus šaperonai turi pašalintą į ET tinklą nukreipiančią signalinę seką. Mielių ląstelėse bręstančių į sekretinį kelią nukreipiamų baltymų signalinė seka yra nukerpama signalinės peptidazės jau ET ertmėje. Įvertinus šiuos faktus, galima teigti, kad mielių ląstelės sekretinio kelio komponentai atpažįsta ir į ET sėkmingai perneša sintetinius žmogaus ET šaperonus ir teisingai juos brandina.



36 pav. Rekombinantinių žmogaus šaperonų susintetintų mielių *S. cerevisiae* ląstelėse savybių analizė. Mielėse *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFDC-TVH-BiP (A), pFDC-TVH-CRT (B), pFDC-TVH-ERp57 (C), pFDC-TVH-PDI (D) ir pFDC-TVH-CNX (E) plazmidėmis, membraninių baltymų (3 frakcija) (T), tirpių (4 frakcija) (S) ir netirpių (5 frakcija) (P) 1% TritonX-100 tirpale membraninių baltymų frakcijų imunoblotingas, naudojant kiekvienam baltymui specifinius antikūnus. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Nustatius, kad mielėse susintetinti žmogaus šaperonai yra nukreipiami į reikiamas ląstelės struktūras, buvo įvertinta šių baltymų įtaka TVH baltymo brendimui mielių *S. cerevisiae* ląstelėse. Tuo tikslu, pFDC-TVH-BiP, pFDC-

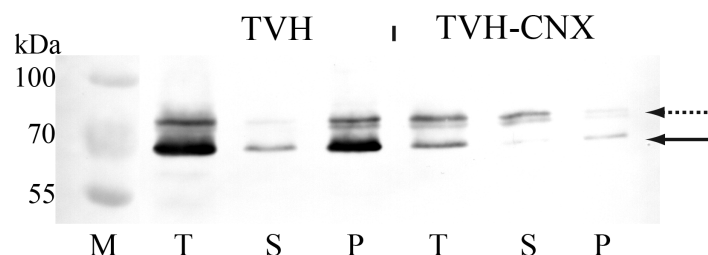
TVH-CNX, pFDC-TVH-CRT, pFDC-TVH-PDI, pFDC-TVH-ERp57 plazmidėmis transformuotos mielių ląstelės pradžioje buvo auginamos augimo terpėje su gliukoze, vėliau gliukozę buvo pakeičiama į galaktozę, indukuojančia TVH baltymo sintezę. Kaip jau minėta, buvo įvertinti penki TVH sintezės mielėse aspektai. Įvertinus grubius mielių ląstelių lizatus (neparodyta, vaizdas identiškas kaip 14 pav. 1 takelis), konstatuota, kad žmogaus ET šaperonai nepagerina TVH sintezės mielėse efektyvumo, baltymo pernešimo į ET proceso bei, logiškai, nesumažina mielių ląstelių atsako į TVH sintezės sukeliama stresą masto. Vis tik, frakcionuojant mielių ląstelių lizatus ir vertinant žmogaus šaperonų įtaką rekombinantinio TVH baltymo tirpumui nejoniniame detergente, pastebėta, kad žmogaus kalneksinas žymiai padidina tirpaus 1% TritonX-100 tirpale glikozilintos TVH baltymo formos kiekį (37 pav.). Kaip minėta, TVH baltymas, sintetinamas žinduolių ląstelėse, yra tirpus nejoniniuose detergentuose. Kiekybiškai (GE Healthcare ImageQuant TL programa, automatinis veikimo režimas) buvo įvertintas žmogaus kalneksino ištirpintos glikozilintos TVH formos kiekis trijuose nepriklausomuose bandymuose lyginant su tirpaus glikozilinto TVH baltymo kiekiu kai TVH mielių ląstelėse yra sintetinamas vienas ir su kitais šio darbo metu tikrintais žmogaus ET šaperonais. Kiekybinis įvertinimas atliktas imunoblotingo membranose, glikozilintos TVH baltymo formos bendroje membraninių baltymų frakcijoje kiekį vertinant kaip 100% ir šį kiekį išdalinant į tirpų ir netirpų baltymą TritonX-100 tirpale (37 pav.). Visų frakcijų baltyminių mėginių skiedimai ir kiekis užneštas į NDS-PAGE gelius buvo visiškai vienodas.



37 pav. Žmogaus ET šaperonų įtakos TVH tirpumui mielių *S. cerevisiae* ląstelėse analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFGG3-TVH (TVH), pFDC-TVH-BiP (TVH-BiP) ir pFDC-TVH-CNX (TVH-CNX) plazmidėmis, membraninių baltymų (3 frakcija) (T), tirpių (4 frakcija) (S) ir netirpių (5 frakcija) (P) 1% TritonX-100 tirpale membraninių baltymų frakcijų NDS-PAGE (A), imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais (B) ir kiekybinis tirpios glikozilintos TVH formos įvertinimas (C). M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671). Ištinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma. Papildoma, žmogaus kalneksino ištirpinta TVH baltymo forma, pažymėta žvaigždute. Skaičiai virš stulpelių žymi vidurkį gautą iš trijų nepriklausomų bandymų, rėmelis žymi standartinį nuokrypį. Žmogaus CRT, PDI ir ERP57 šaperonų įtaka TVH tirpumui identiška pavaizduotai BiP šaperono.

Kaip matyti paveiksliuke, žmogaus kalneksinas mielių ląstelių ET apsaugo vidutiniškai daugiau nei pusę glikozilintos TVH baltymo formos nuo agregacijos, kai tuo tarpu kiti žmogaus šaperonai tokiu aktyvumu mielių

ląstelėse nepasižymi. Moduluojant mielių ląstelių lizatų frakcionavimo sąlygas – baltyminių nuosėdų ir 1% TritonX-100 tirpalo tūrių santykį, membraninių baltymų ekstrahavimo laiką – pavyko pasiekti, kad virš 90% glikozilinto TVH baltymo, susintetinto mielių ląstelėse kartu su žmogaus kalneksino baltymu, būtų tirpus nejoniniame detergente (38 pav.). Nustatyta, kad svarbiausia yra 1% TritonX-100 tirpalo ir membraninių nuosėdų tūrių santykis – kuo santykis didesnis, tuo daugiau glikozilinto TVH baltymo pavyksta ekstrahuoti. Vis tik tai negalioja TVH baltymui, susintetintam be žmogaus kalneksino pagalbos – negrižtamai agregavusios TVH baltymo molekulės nėra tirpios jokiais sąlygomis (38 pav. TVH).

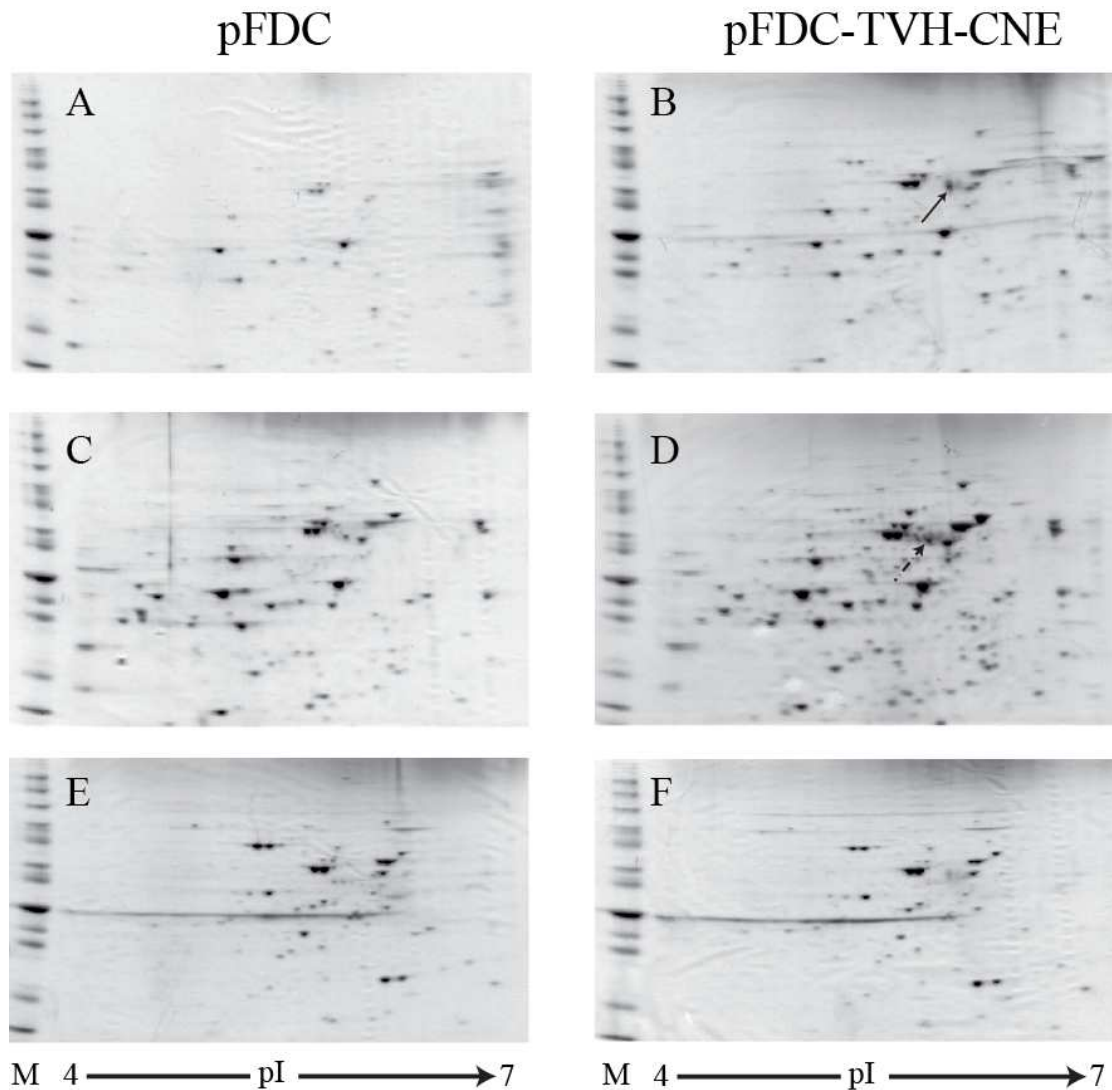


38 pav. Žmogaus kalneksino įtakos TVH tirpumui mielių *S. cerevisiae* ląstelėse optimizavimas. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFGG3-TVH (TVH), ir pFDC-TVH-CNX (TVH-CNX) plazmidėmis, bendros membraninių baltymų (3 frakcija) (T), tirpių (4 frakcija) (S) ir netirpių (5 frakcija) (P) 1% TritonX-100 tirpale membraninių baltymų frakcijų imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671). Ištinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma.

Tik tirpūs baltymai gali įgyti tinkamą konformaciją su būdingomis antigeninėmis ir imunogeninėmis savybėmis. Patikrinus nejoniniame detergente dėl žmogaus kalneksino įtakos tirpaus TVH baltymo savybes imunofermentinėje analizėje su žmonių sergančių tymais serumu bei eritrocitų hemagliutinacijos reakcijose nustatyta, kad TVH baltymas nėra reaktyvus. Žmogaus kalneksinas apsaugo mielių ląstelėse TVH baltymą nuo agregacijos, tačiau to nepakanka, kad TVH baltymas įgytų natyvią baltymui būdingą konformaciją ir aktyvumą.

Sekančiame eksperimento etape buvo nuspręsta įsitikinti, ar stebėta žmogaus kalneksino įtaka TVH brendimui yra būdinga tik žmogaus

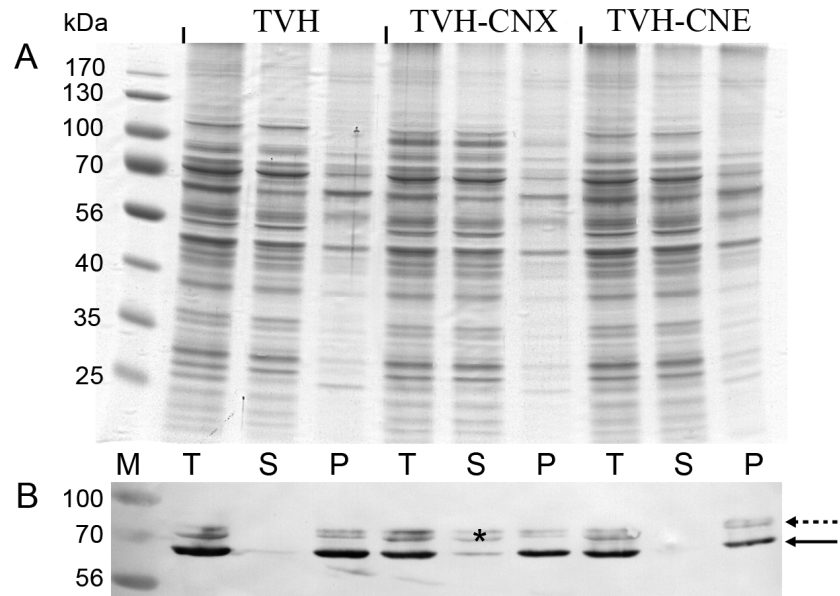
kalneksinui, nes tymų virusas evoliucionuodamas žmogaus ląstelėje sėkmingai adaptavo kalneksiną paviršiaus glikobaltymų brendimui (Parlati ir kt., 1995; Pieren ir kt., 2005), ar dėl to, kad palyginus su mielių kalneksinu, naudojant daugiakopijines plazmides, žmogaus kalneksino baltymo buvo prisintetinta žymiai daugiau daugiau, negu ląstelėje yra mielių kalneksino.. Mielių kalneksiną koduojantis genas *CNEI* yra reguliuojamas konstitutyviai veikiančio, bet silpno (mielių ląstelėje logaritminio augimo stadijoje mielių kalneksino baltymo suskaičiuojama apie 4500 molekulių) promotoriaus, o žmogaus kalneksino sintezė buvo indukuojama vieno stipriausių mielių *PGKI* (310000 molekulių ląstelėje) geno promotoriaus daugiakopijinėje plazmidėje. Todėl nuspręsta klonuoti mielių *CNEI* geną ir palyginti mielių ir žmogaus kalneksinų įtaką TVH brendimui mielėse identiškomis sąlygomis. Mielių *CNEI* genas buvo klonuotas į pFDC vektorių prijungiant jį prie mielių *PGKI* geno promotoriaus lygiai kaip žmogaus šaperonai (35 pav.). Gauta plazmidė pFDC-TVH-CNE. Pirmiausia, kaip ir žmogaus šaperonų atveju, (36 pav.) buvo patikrinta perprodukuoto mielių kalneksino savybės. Neradus komerciškai platinamų antikūnų prieš mielių kalneksiną, teko atlikti dvikryptę mielių ląstelių, transformuotų pFDC ir pFDC-TVH-CNE plazmidėmis, membraninių baltymų frakcijų elektroforezę (39 pav.). Rodykle paveiksluke pažymėtas baltymas, kuris aptiktas tik mielių, transformuotų pFDC-TVH-CNE plazmide, mėginiuose, Biochemijos instituto Proteomikos centre buvo identifikuotas kaip mielių kalneksino baltymas. Be to, kaip ir rekombinantiniai žmogaus šaperonai, perprodukuotas mielių kalneksinas buvo tirpus nejoniniame detergente (39 pav. punktyrinė rodyklė).



39 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelėse perprodukuoto mielių kalneksino identifikavimas ir savybių. A-F – mielių baltymų 2D elektrofrezė. Mielių kamieno AH22, transformuoto kontroliniu vektoriumi pFDC (A, C, E) ir pFDC-TVH-CNE plazmide (B, D, F), bendros membraninių baltymų (3 frakcija) (A ir B), tirpių (4 frakcija) (C ir D) ir netirpių (5 frakcija) (E ir F) 1% TritonX-100 tirpale baltymų frakcijų NDS-PAGE po izolektrinio fokusavimo. Ištinė rodyklė žymi masių spektrometrijos metodu identifikuotą mielių kalneksino baltymą, punktyrinė – atitinkantį baltymą nejoniniame detergente tirpių membraninių baltymų frakcijoje. Netirpių baltymų frakcijoje toks baltymas neaptiktas. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0661) (200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25 and 20 kDa).

Nustačius, kad tiek mielių, tiek žmogaus kalneksinai yra sintetinami vienodomis sąlygomis ir savybėmis, buvo identiškoms sąlygomis patikrinta abiejų kalneksinų įtaka glikozilinto TVH baltymo tirpumui nejoniniame detergente (40 pav.). Kaip matyti 40 paveiksluke, gebėjimas apsaugoti TVH glikobaltymą nuo agregavimosi yra būdinga tik žmogaus kalneksinui. Mielių

kalneksinas net ir perprodukuotas ląstelėje naudojant stiprius promotorius, nepasižymėjo žmogaus homologo savybėmis.

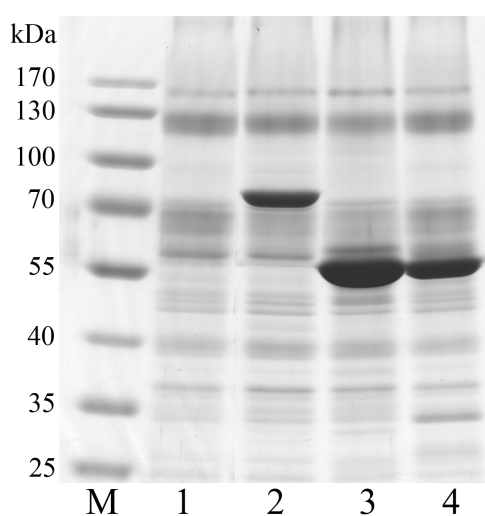


40 pav. Žmogaus ir mielių kalneksinų įtakos TVH tirpumui mielių *S. cerevisiae* ląstelėse analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFGG3-TVH (TVH), pFDC- pFDC-TVH-CNX (TVH-CNX) ir pFDC-TVH-CNE (TVH-CNE) plazmidėmis, bendros membraninių baltymų (3 frakcija) (T), tirpių (4 frakcija) (S) ir netirpių (5 frakcija) (P) 1% TritonX-100 tirpale membraninių baltymų frakcijų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas su anti-tetraHis (Qiagen) antikūnais (B). M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671). Ištinė rodyklė – TVH polipeptidas, punktyrinė – glikozilinta TVH baltymo forma. Papildoma, žmogaus kalneksino ištirpinta TVH baltymo forma, pažymėta žvaigždute.

Šie rezultatai ne tik parodo, kad evoliuciškai nutolę homologiški baltymai (žmogaus ir mielių kalneksinų ar. sekos identiškasumas 24%) nėra funkciškai lygiaverčiai, bet ir patvirtina darbo metu pasirinktos taktikos teisingumą – teisingam TVH brendimui mielėse trūksta būtent žmogaus ląstelių sekrecinio kelio komponentų.

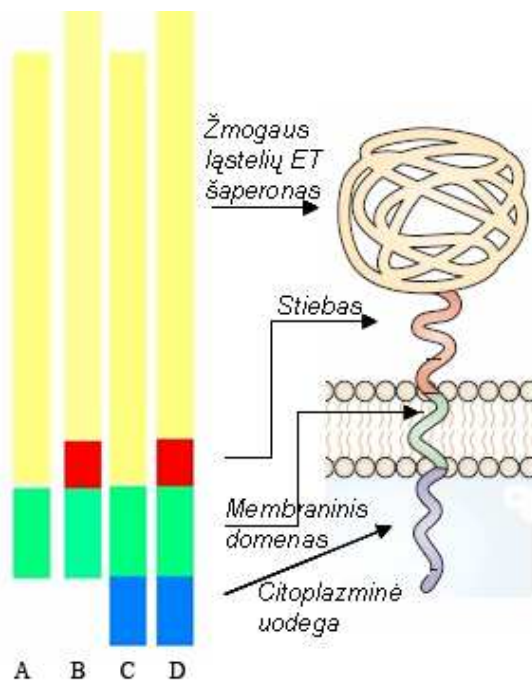
Nustačius žmogaus kalneksino teigiamą poveikį TVH brendimui mielėse, buvo susimąstyta, kodėl kiti šiame darbe tirti žmogaus ET šaperonai neturėjo jokios įtakos TVH baltymo sintezei ir savybėms. Išanalizavus žmogaus BiP, kalretikulino, kalneksino, PDI ir ERp57 baltymų sandarą, vienintelis akivaizdus skirtumas, kuris galėtų turėti svarbos baltymų funkcionalumui mielių ląstelėse, yra tai, kad žmogaus kalneksinas yra I tipo

membraninis baltymas, C galu vieną kartą kertantis ir taip įsitvirtinantis ET membranoje, kai tuo tarpu, visi kiti šiame darbe tirti žmogaus šaperonai žmogaus ląstelių ET ertmėje yra išlaikomi dėka baltymo C gale esančios KDEL ar. sekos, kurią atpažįsta žmogaus ET receptorius KDELR. Įdomu, kad mielių homologas, baltymas Erd2p, atpažįsta HDEL ar. sekas, esančias baltymų C galuose, tam, kad išlaikytų baltymus ET ertmėje. Maža to, kad yra žinoma (Dean ir Pelham, 1990), jog HDEL signalo ir Erd2p baltymo sistema yra pralaidi, t.y. neužtikrina visiško visų baltymų molekulių išlaikymo ET ertmėje, mielių Erd2p baltymo gebėjimas išlaikyti baltymus, kurių C gale yra ne HDEL, o KDEL ar. seka, nėra aprašytas. Įvertinus šiuos faktus buvo patikrinta mielių ląstelių, transformuotų pFDC-TVH-BiP, pFDC-TVH-CNX, pFDC-TVH-CRT, pFDC-TVH-PDI ir pFDC-TVH-ERp57 plazmidėmis ir augintų terpėje su gliukoze, augimo terpė (41 pav.). Kaip matyti 41 paveiksliuke, mielių augimo terpėje buvo aptikta žmogaus rekombinantinių BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonų (patvirtinta imunoblotingu, neparodyta), bet neaptikta PDI ir, kaip ir tikėtasi, kalneksino baltymų. Tokia analizė rodo, kad mielių ląstelių ET baltymas Erd2p neatpažįsta KDEL ar. sekos signalo, todėl žmogaus šaperonai, išskyrus PDI, nėra išlaikomi ET ertmėje ir yra sekretuojami į augimo terpę.



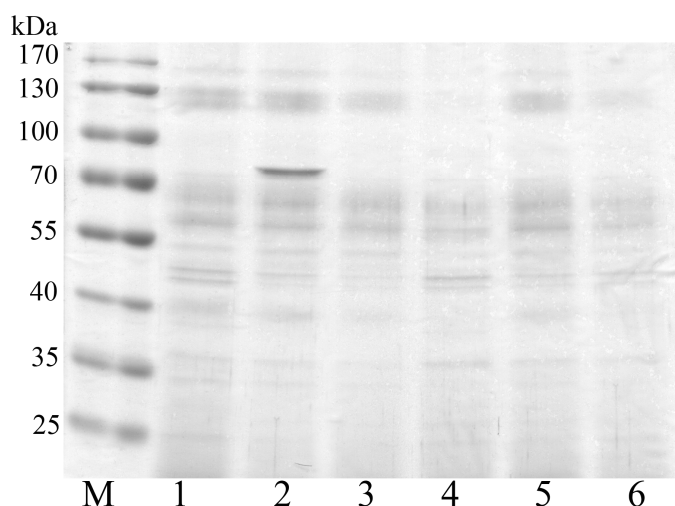
41 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių žmogaus šaperonus, augimo terpės analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFDC (1), pFDC-TVH-BiP (2), pFDC-TVH-CRT (3) ir pFDC-TVH-ERp57 (4) plazmidėmis, augimo terpės koncentruotos 50x NDS-PAGE. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Mielių ląstelių, sintetinančių rekombinantinius žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonus, analizė (36 pav.), rodo, kad šie šaperonai yra aptinkami ir mielių ląstelių membraninių baltymų frakcijose, bet, tai, kad mielių Erd2p neatpažįsta žmogaus baltymų išlaikymo ET signalo, leidžia ne tik abejoti, ar žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonai gali būti funkcionalūs mielių ląstelių ET, bet ir kiek šių šaperonų, aptiktų membraninėse frakcijose yra ET ertmėje, o kiek tolesniuose baltymų sekrecijos kelio membraniniuose skyriuose – pernešimo pūslelėse, Goldžio aparate ar ląstelės plazminėje membranoje. Todėl, įvertinus šias prielaidas, buvo nuspręsta pakeisti žmogaus baltymų struktūrą, taip, kad jie tikrai būtų lokalizuoti ET ertmėje. Buvo pasirinkta tiesmukiška, žmogaus kalneksino atveju patvirtinta taktika – įtvirtinti žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonus mielių ET vidinėje membranoje. Šiuo tikslu prie šių šaperonų C galų buvo prijungta mielių ląstelių ET I tipo, vieną kartą membraną C galu kertančių Cne1p ir Ost1p baltymų transmembraniniai regionai. Mielų Cne1p transmembraninis regionas yra 21 ar. ilgio, o Ost1p – taip pat 21 ar. ilgio, bet su papildoma 6 ar. seka, kuri yra eksponuojama citoplazmoje ET išorėje. Tam, kad suteiktų žmogaus šaperonams lankstumo, tarp šaperono ir transmembraninio regiono ar. buvo įterpta iš pasikartojančių serino ir glicino ar. sudaryta seka – stiebas. Iš viso prie žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonų buvo prijungta po 4 transmembraninių regionų variantus (42 pav.).



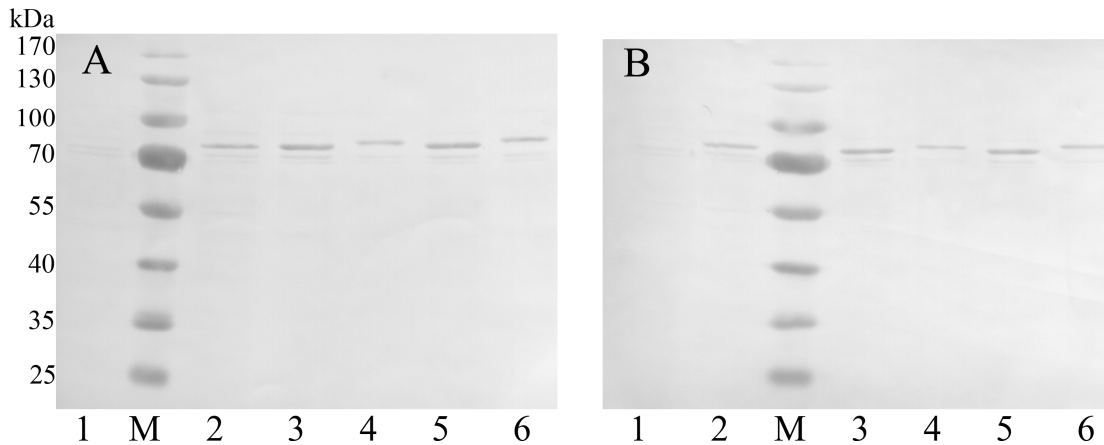
42 pav. Žmogaus ET šaperonų sujungimo su mielių ET transmembraninė seka schema. A – Cne1p baltymo transmembraninė seka (CNE_TM), B – CNE_TM su serino ir glicino ar. stiebu (ST_CNE_TM), C – Ost1p baltymo transmembraninė seka (OST_TM), D – OST_TM su serino ir glicino ar. stiebu (ST_OST_TM).

Sukonstruoti chimeriniai žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 baltymu (BiP_CNE_TM, BiP_ST_CNE_TM, BiP_OST_TM, BiP_ST_OST_TM ir CRT bei ERp57 atitinkamai) koduojantys genai buvo klonuoti į pFDC vektorių lygiai kaip parodyta 35 paveiksliuke. Gautos plazmidės pFDC-TVH-BiP_CNE_TM, pFDC-TVH-BiP_ST_CNE_TM, pFDC-TVH-BiP_OST_TM, pFDC-TVH-BiP_ST_OST_TM (taip pat ir CRT bei ERp57) buvo transformuotos į mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieną ir patikrintos chimerinių žmogaus šaperonų savybės (43 pav.) (Parodyta tik chimerinio žmogaus šaperono BiP savybės, kalretikulino ir ERp57 savybės buvo identiškos).



43 pav. Mielių *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių chimerinius žmogaus BiP šaperono baltymus, augimo terpės analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto, pFDC (1), pFDC-TVH-BiP (2), pFDC-TVH-BiP_CNE_TM (3), pFDC-TVH-BiP_ST_CNE_TM (4), pFDC-TVH-BiP__OST_TM (5), pFDC-TVH-BiP_ST_OST_TM (6) plazmidėmis, augimo terpės koncentruotos 50x NDS-PAGE. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Auginimo terpės analizė parodė, kad, žmogaus BiP šaperonas, sujungtas su mielių Cne1p ir Ost1p baltymų transmembraninėmis sekomis nėra sekretuojamas į terpę (43 pav. 3-6 takeliai), tuo tarpu, tokiomis pat sąlygomis sintetinamas natyvio sekos BiP šaperonas yra sekretuojamas į augimo terpę (43 pav. 1 takelis). Mielių ląstelių analizė (44 pav.) parodė, kad chimeriniai žmogaus šaperono baltymai yra aptinkami membraninių baltymų frakcijoje (44 pav. A) ir yra tirpūs nejoniniame detergente (44 pav. B), lygiai kaip natyvio sekos žmogaus BiP baltymas (44 pav. 2 takelis).



44 pav. Chimerinių žmogaus BiP baltymo, susintetinto mielių *S. cerevisiae* ląstelėse, savybių analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto, pFDC (1), pFDC-TVH-BiP (2), pFDC-TVH-BiP_CNE_TM (3), pFDC-TVH-BiP_ST_CNE_TM (4), pFDC-TVH-BiP_OST_TM (5), pFDC-TVH-BiP_ST_OST_TM (6) plazmidėmis, bendros membraninių baltymų (3 frakcija) (A) ir tirpių (4 frakcija) (B) 1% TritonX-100 tirpale membraninių baltymų frakcijų imunoblotingas su specifiniais žmogaus BiP baltymui antikūnais. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Vertinant chimerinio žmogaus šaperono BiP tyrimų rezultatus (taip pat ir kalretikulino bei ERp57), galima teigti, kad prijungiant mielių Cne1p ir Ost1p baltymų transmembranines sritis su serino ir glicino ar. stiebu ir be jo, pavyko išspręsti natyvos sekos BiP baltymui mielėse *S. cerevisiae* būdingą problemą – rekombinantinio šaperono sekreciją iš ląstelės vidaus į augimo terpę. Chimeriniai BiP šaperonai pasižymi natyvos seko BiP baltymo savybėmis, bet nėra pašalinami iš ląstelės, todėl tikėtina, kad šie baltymai yra lokalizuoti būtent ET ertmėje, o ne kituose membraniniuose ląstelės skyriuose, nes N-gale turi į ET tinklą nukreipiančią signalinę seką, kuri, kaip parodyta, mielėse efektyviai veikia, o C-gale į ET membranas įterpiančias sekas.

Įvertinus chimerinių žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonų savybes, buvo patikrinta šių baltymų įtaką TVH brendimui mielių ląstelėse. Indukavus pFDC-TVH-BiP_CNE_TM, pFDC-TVH-BiP_ST_CNE_TM, pFDC-TVH-BiP_OST_TM, pFDC-TVH-BiP_ST_OST_TM (taip pat ir CRT bei ERp57) plazmidėmis transformuotose ląstelėse TVH sintezę, įvertintos rekombinantinio TVH baltymo savybės po sąveikos su chimeriniais žmogaus šaperonais. Deja, lygiai, kaip ir naudojant natyvos sekos žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonus, TVH baltymo savybės, lyginant su TVH

baltymu, sintetinamu be žmogaus šaperonų pagalbos, buvo nepakitusios – tiek TVH glikozilintas, tiek neglikozilintas TVH agreguoja mielių ląstelėje ir nepasižymi natyviai TVH baltymui būdingomis savybėmis.

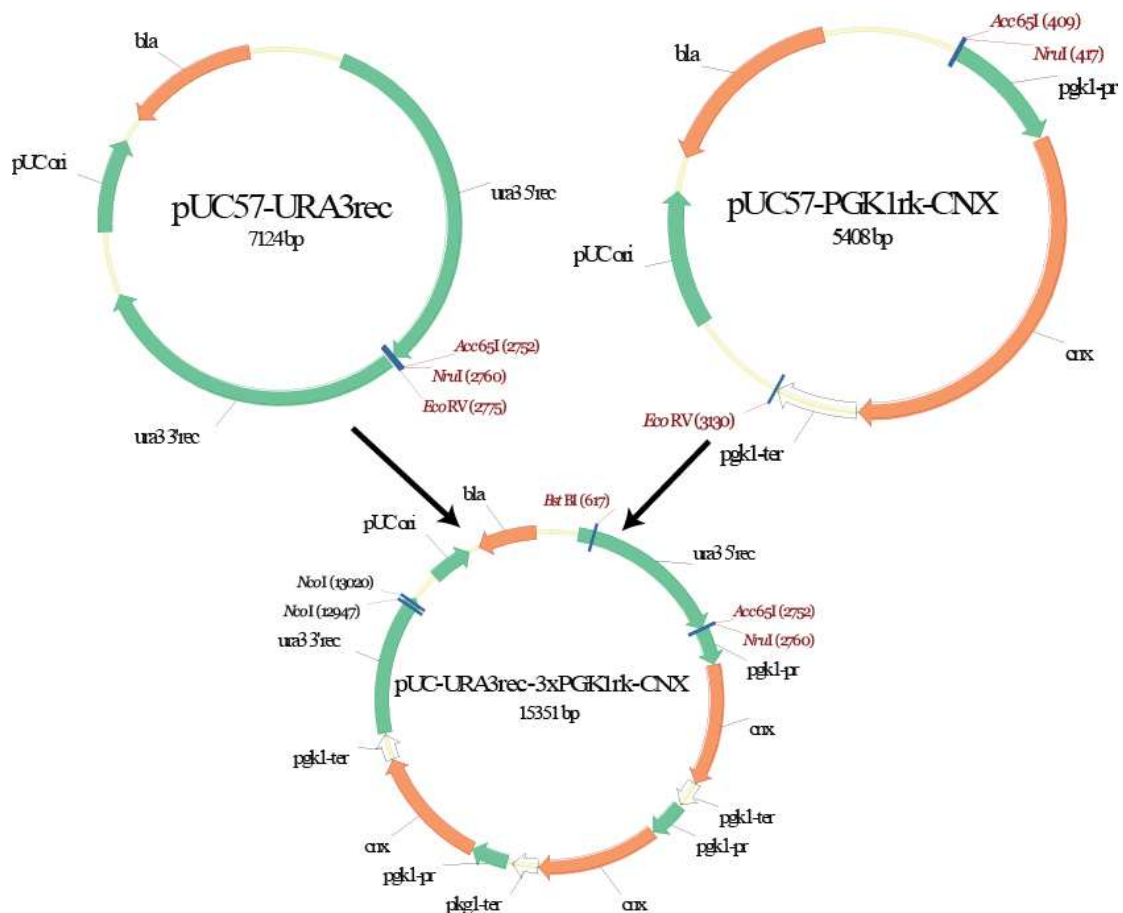
Apibendrinus šiame skyriuje pateiktus rezultatus, galima teigti, kad iš visų šiame darbe tikrintų žmogaus ET šaperonų, vienintelis kalneksinas turėjo aiškiai teigiamos įtakos TVH baltymo brendimui mielių *S. cerevisiae* ląstelėse. Nors sąveika su žmogaus kalneksinu padidino TVH tirpumą, rekombinantinis TVH baltymas neįgijo funkciją suteikiančios konformacijos, todėl nėra tinkamas diagnostiniams ar profilaktiniams tikslams. Sekantys šio eksperimento etapai – atrinkti tinkamą TVH baltymo brendimą užtikrinančias žmogaus šaperonų kombinacijas ir sukurti *S. cerevisiae* kamienus su integruotomis žmogaus ET šaperonų genų kombinacijomis – buvo sujungti. Nuspręsta įvairias žmogaus genų kombinacijas iš karto perkelti į mielių genomą, nes sukonstravus stabilius humanizuotuos mielių kamienus, juose be didesnių pastangų galima patikrinti ir kitų žmogaus virusų glikobaltymų brendimą.

3.2.3 Mielių *S. cerevisiae* kamienų, su integruotais žmogaus šaperonų genais, kūrimas

Siekiant sukurti mieles *S. cerevisiae*, sintetinančias aktyvius virusų glikobaltymus,, nuspręsta sukurti kamienus, kurių genome būtų ne tik integruotos įvairios žmogaus šaperonų genų kombinacijos, bet ir pašalinti mielių baltymai, potencialiai galintys trukdyti žmogaus glikobaltymų brendimui. Toks kamienas ne tik leistų susintetinti aktyvius virusinius paviršiaus baltymus, bet ir nustatyti, kurie žmogaus šaperonai virusų evoliucijos žmogaus ląstelėje eigoje buvo įdarbinti sėkmingai viruso replikacijai įvykti.

Pirmiausia į mielių genomą nuspręsta integruoti žmogaus kalneksino geną, kadangi buvo nustatyta, kad žmogaus kalneksinas turi teigiamos įtakos TVH baltymo brendimui (3.2.3). Toks kamienas būtų pagrindu kitų žmogaus šaperonų ir įvairių jų kombinacijų integracijai. Žmogaus kalneksiną pasirinkta

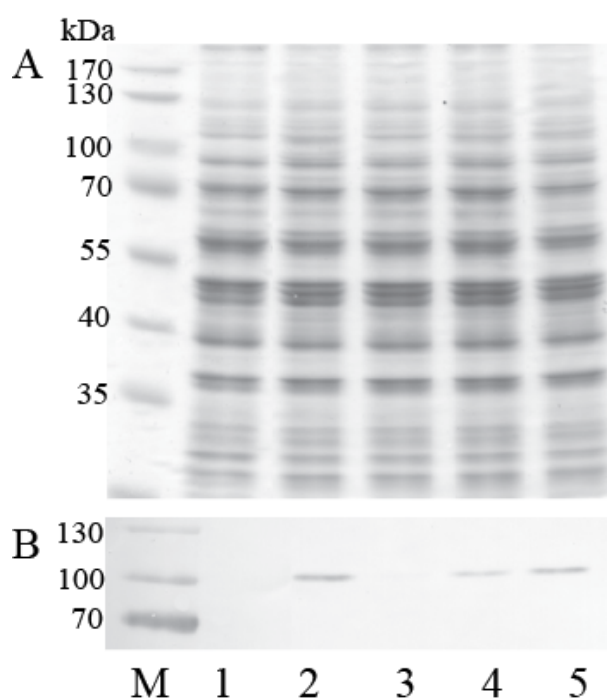
integuoti į mielių *URA3* geno lokusą, dėl dviejų priežasčių: (a) Panaudojant 5-fluororotinę rūgštį lengva atrinkti mielių ląsteles, kuriose įvyko rekombinacija, kurios metu išsimušė mielių *URA3* genas ir (b) Tokiu būdu gaunamas auksotrofinis mielių *ura3* kamienas su galimybe panaudoti mielių *URA3* geną kaip žymenį tolesnėse manipuliacijose. Šiuo tikslu klonuotos mielių *URA3* geną supančios sekos į pUC57 vektorių, o tarp jų žmogaus kalneksino geno mielių *PGK1* geno raiškos kasetėse 1, 2 ar 3 kopijos (45 pav.). Tokiu būdu sukonstruotos homologinei rekombinacijai skirtos plazmidės pUC-URA3rec-PGK1rk-CNX, pUC-URA3rec-2xPGK1rk-CNX ir pUC-URA3rec-3xPGK1rk-CNX. Panaudojant šias plazmides visas mielių *URA3* genas pakeičiamas 1, 2 ar 3 žmogaus CNX geno, mielių *PGK1* raiškos kasetėse, kopijomis. Nuspręsta integruoti į mielių genomą 1, 2 ar 3 žmogaus CNX geno kopijas, ne vien tam, kad įvertinti, kaip rekombinantinio baltymo raiška priklauso nuo geno dozės, bet ir palyginti baltymo raiškos lygį su daugiakopijinėje plazmidėje įklonuota CNX geno raiškos kasete.



45 pav. Žmogaus kalneksino geno rekombinacijos į *S. cerevisiae* *URA3* geno lokusą plamidžių konstravimo schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *pgk1-pr* – konstitutyviai veikiantis mielių *PGK1* geno promotorius; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *pUC-ori* – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; *cnx* – žmogaus kalneksino genas; *ura3 5'rec* – apytiksliai 2kb mielių geno seka iki *URA3* geno START kodono; *ura3 3'rec* – apytiksliai 2kb mielių geno seka nuo *URA3* geno STOP kodono. Žmogaus *CNX* genas mielių *PGK1* geno raiškos kasetėje iš plazmidės pUC57-PGK1rk-CNX iškerpamas *Acc65I* ir *EcoRV* RE ir įliuguojamas į pUC57-URA3rec plazmidę, linearizuotą *Acc65I* ir *EcoRV* RE, tarp rekombinacijai į mielių geno *URA3* lokusą skirtų sekų. Antra, tomis pačiomis RE iškirpta, *CNX* geno raiškos kasetė įliuguojama į pUC-URA3rec-PGK1rk-CNX plazmidę, linearizuotą *Acc65I* ir *NruI* RE. Trečia, atitinkamai kaip antra, tik į pUC-URA3rec-2xPGK1rk-CNX plazmidę.

Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamienas buvo transformuotas sukonstruotomis plazmidėmis, prieš tai jas linearizavus *NcoI* ir *BstBI* RE. Mielių kamienai, kuriuose įvyko numatytas homologinės rekombinacijos įvykis, atrinkti mielių transformantus auginant ant terpės su 5-fluororotine rūgštimi. Terpėje su 5-fluororotine rūgštimi augančios kolonijos buvo tikrinamos toliau PGR metodu naudojant specifinius pradmenis, siekiant įvertinti genome įvykusius pakitimus. Sekoskaitos būdu buvo patikrintos

integruotų genų sekos. Kadangi 5-fluororotinė rūgštis yra mutagenas, gauti mielių kamienai *S. cerevisiae* AH22_URA3::PGK1rk-CNX, *S. cerevisiae* AH22_URA3::2xPGK1rk-CNX ir *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1rk-CNX, su integruotomis 1, 2 ar 3 žmogaus CNX geno raiškos kasečių kopijomis vietoje mielių *URA3* geno, patikrinti fenotiškai. Humanizuoti kamienai auginti ant įvairių mitybinių terpių ir lyginami su išeginiu *S. cerevisiae* AH22 kamieniu. Buvo įsitikinta, kad pasirinktos mielių ląstelės dėl 5-fluororotinės rūgšties poveikio fiziologiškai nepakito. Paruošus grubius mielių ląstelių lizatus buvo patikrinta žmogaus kalneksino raiška humanizuotuose kamieniuose su integruotomis CNX geno kasetėmis ir palyginta su kalneksino raiška mielėse, kuriose CNX raiškos kasetė buvo daugiakopijinėje plazmidėje (46 pav.).



46 pav. Humanizuotų mielių *S. cerevisiae* kamienų, su integruotu įvairiu žmogaus CNX geno kopijų skaičiumi, analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22 kamieno, transformuoto pFDC (1) ir pFDC-TVH-CNX (2) plazmidėmis, ir AH22_URA3::PGK1rk-CNX, AH22_URA3::2xPGK1rk-CNX bei AH22_URA3::3xPGK1rk-CNX kamienų ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas (B) su specifiniais žmogaus kalneksino baltymui antikūnais. M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

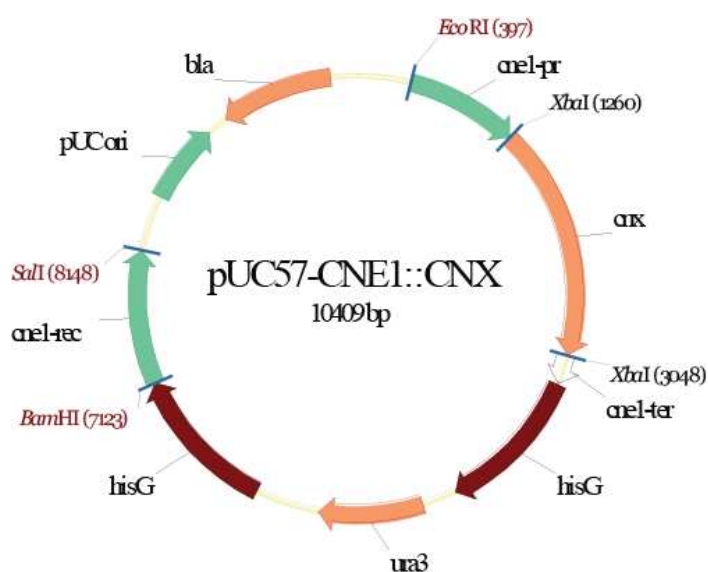
Kaip galima suprasti iš paveiksluko, sukurtuose humanizuotuose mielių *S. cerevisiae* kamienuose yra sintetinamas žmogaus kalneksino baltymas. Lyginant kamienus, kuriuose įstatytos 1, 2 ar 3 žmogaus CNX geno kopijos, galima pastebėti, kad didėjant genų kopijų skaičiui, aiškiai didėja ir rekombinantinio šaperono kiekis. Mielių kamiene, kuriame integruotos 3 mielių *PGK1* geno raiškos kasetėje esančios žmogaus CNX geno kopijos, sintetinamo žmogaus kalneksino kiekis yra tik nedaug mažesnis lyginant su baltymo kiekiu, kuris yra susintetinamas mielių ląstelėje naudojant tą pačią raiškos kasetę, patalpintą daugiakopijinnėje plazmidėje (46 pav. 2 ir 5 takeliai). Teoriškai, daugiakopijinės plazmidės, valdomos mielių dvimikroninės plazmidės replikaciją užtikrinančios sekos, ląstelės branduolyje būna apie 50 kopijų, todėl tai, kad baltymo, sintetinamo nuo plazmidėje esančio geno ir nuo integruotų 3 geno kopijų genome, kiekis yra apytiksliai vienodas, rodo, kad mielių *PGK1* promotorių reguliuojančių transkripcijos faktorių ląstelėje nėra tiek, kad užtikrintų 50 *PGK1* geno promotorių veiklą. Tolesniems darbams buvo pasirinktas 3 žmogaus CNX geno kopijas genome turintis mielių kamienas.

Patikrinus *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX kamiene gaminamo žmogaus kalneksino savybes ir jo įtaką TVH brendimui, buvo gauti tokie pat rezultatai, kaip ir sintetinant kalneksino baltymą naudojant daugiakopijinę plazmidę (37 ir 38 pav.). Tai atrodo visiškai logiška, nes integracijai į genomą naudota ta pati žmogaus CNX geno seka, o kalneksino baltymo kiekis ląstelėje yra panašus.

Toliau humanizuojant mielių sekrecinį kelią, buvo nuspręsta mielių kalneksiną pakeisti žmogaus kalneksinu. Mielių kalneksinas nėra gyvybiškai ląstelei būtinas baltymas, todėl tokia manipuliacija yra nesudėtinga. Kaip parodyta anksčiau aprašytuose rezultatuose (3.2.3), mielių kalneksinas netgi perprodukuotas mielių ląstelėje, neturi įtakos TVH baltymo brendimui ET. Vis tik, tai, kad žmogaus ir mielių kalneksinų atpažįstamas substratas yra vienodas, nes mielių ir žmogaus ET glikobaltymų pirmtakai yra N-glikozilinami visiškai vienodai, leidžia manyti, kad abu kalneksinai konkuruoja mielių ET dėl

sąveikos su TVH baltymu. Logiška prielaida – žmogaus kalneksinas negali sąveikauti su visomis TVH baltymo molekulėmis, nes dalis jų sąveikauja su mielių kalneksino baltymu. Aišku, tai, kad žmogaus kalneksino raiška *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX kamiene yra žymiai stipresnė nei mielių kalneksino bei tai, kad ankstesniuose bandymuose, naudojant pFDC-CNX-TVH plamidę, pavyko iš membraninių frakcijų ekstrahuoti apie 90% glikozilinto TVH baltymo (38 pav.) rodo, kad mielių kalneksinas didelės neigiamos įtakos žmogaus kalneksino ir TVH sąveikai neturi. Vis tik atliekant darbą, kurio rezultatai sunkiai nuspėjami, bet kokios įmanomos kliūtis pašalinimas, gali prisidėti prie galutinio teigiamo rezultato.

Šiam tikslui buvo sukonstruota plazmidė pUC57-CNE1::CNX (47 pav.), kurioje žmogaus CNX genas buvo įklonuotas tarp mielių *CNE1* geno promotoriaus ir transkripcijos terminatoriaus bei homologinei rekombinacijai ir transformantų atrankai reikalingų sekų.



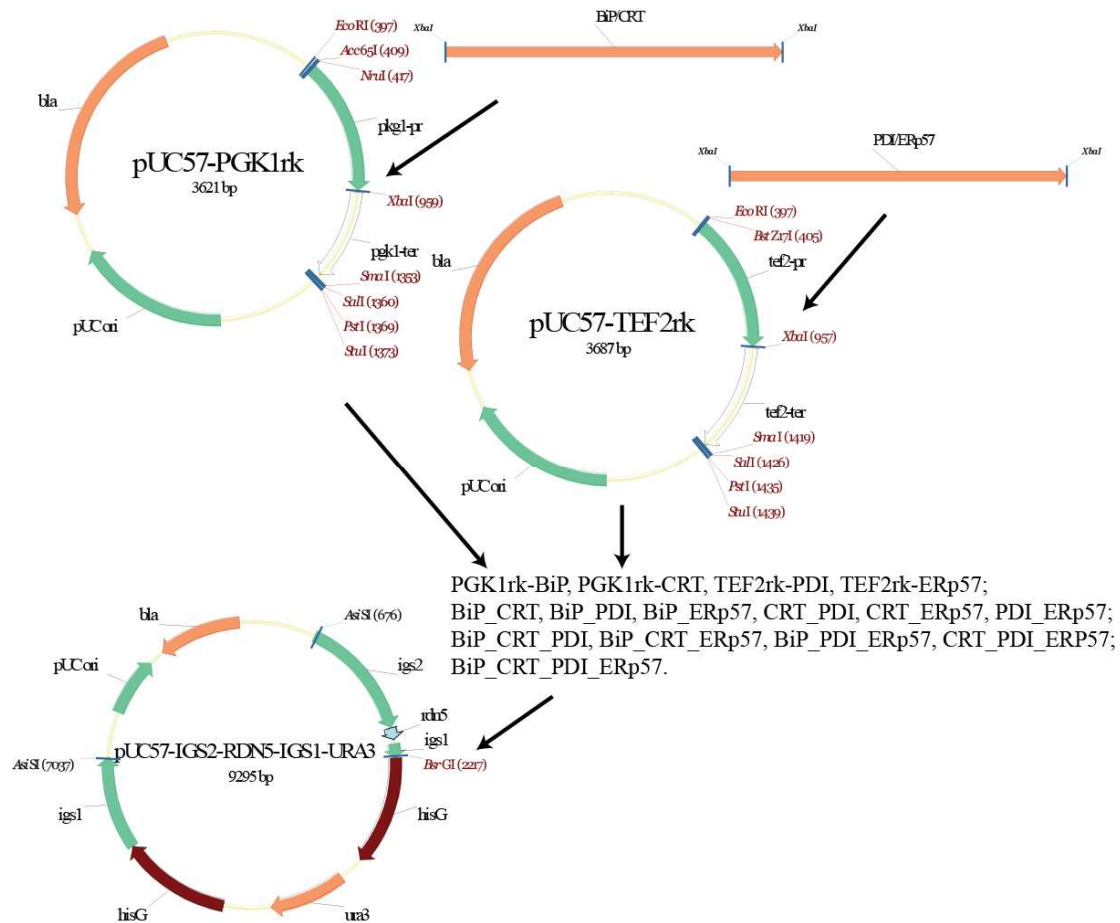
47 pav. Žmogaus kalneksino geno rekombinacijai į *S. cerevisiae* genomą, pakeičiant *CNE1* geną, skirtos plazmidės schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *cne1-pr* – mielių *CNE1* geno promotorius; *cne1-ter* – transkripcijos terminatorius; *pUC-ori* – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; *cnx* – žmogaus kalneksino genas; *cne1-rec* – apytiksliai 1 kb mielių genomo seka nuo *CNE1* geno STOP kodono; *ura3* – mielių *URA3* genas; *hisG* – pasikartojančios, homologinei rekombinacijai ir tarp jų esančio *URA3* geno pašalinimui, skirtos sekos. Homologinė rekombinacija vyksta tarp *cne1-pr* ir *cne1-rec* sekų plazmidėje ir genome, ko pasekoje, vietoj mielių *CNE1* geno sekos įsistato žmogaus CNX genas su *CNE1* geno terminatoriumi ir integrantų atrankai reikalingas mielių *URA3* genas, apsuptas *HisG* sekų.

Sall ir *EcoRI* linearizuota pUC57-CNE1::CNX plazmidė buvo panaudota *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX kamieno transformacijai. Transformantai, kuriuose mielių *CNE1* geną pakeitė žmogaus CNX genas, atrinkti išsėjus ant terpės be uracilo. Galimos genomo pertvarkos buvo įvertintos naudojant PGR su specifiniais pradmenimis bei nustatius lokuso nukleotidų seką. Gautas kamienas *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX, kuriame išmuštas mielių kalneksino *CNE1* genas ir įvestos 4 žmogaus CNX geno kopijos: 3 kopijos reguliuojamos mielių *PGK1* geno promotoriaus ir 1 – *CNE1* geno promotoriaus. Vis tik, baltymų lygyje patikrinti ar įvyko numatytas genų pasikeitimas nepavyko, nes: (a) kaip minėta, komerciškai platinamų antikūnų prieš mielių kalneksiną nėra; mielių kalneksino raišką indukuoja labai silpnas promotorius, todėl (b) mielių kalneksiną aptikti dvikryptės baltymų elektroforezės geliuose yra sunku, o (c) įvertinti nežymų žmogaus kalneksino baltymo kiekio padidėjimą kamiene, kuriame jau yra gausiai sintetinamas žmogaus kalneksinas, neįmanoma. Gautame mielių kamiene patikrinus rekombinantinio TVH baltymo savybes, nustatyta, kad mielių *CNE1* geno išmušimas bei papildomos žmogaus CNX geno kopijos įvedimas mielių genome, žymios įtakos, lyginant su *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX kamieniu, virusinio baltymo brendimui neturi – žmogaus kalneksino apsaugoto nuo agregacijos TVH baltymo kiekis lieka panašus ir, savaime suprantama, netampa aktyvus ir antigeniškas. Vis tik, tolimesniems bandymas pasirinkta naudoti *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamieną dėl keleto priežasčių: (a) Papildoma žmogaus CNX geno kopija, nors ir indukuojama silpno promotoriaus, reiškia daugiau žmogaus kalneksino, reikalingo TVH brendimui, baltymo; (b) Mielių kalneksino, kuris galėtų trukdyti žmogaus glikobaltymų brendimui mielėse, pašalinamas, nors ir teigiamos įtakos TVH brendimui nesuteikė, bet ir nepakeitė mielių *S. cerevisiae* fenotipo ir fiziologijos; (c) Pats darbo principas reikalauja sukurti humanizuotus mielių kamienus, todėl jei tik įmanomas, mielių sekrecinio kelio komponentų pakeitimas žmogaus

homologais gali ne tik turėti įtakos virusinių baltymų brendimui, bet ir atsakyti į fundamentaliai bei evoliuciškai įdomius klausimus.

S. cerevisiae AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamienas, pašalinus įvestą mielių *URA3* geną persėjant ant 5-fluororotinės rūgšties, panaudotas įvairių žmogaus šaperonų genų kombinacijų įvedimui. Šiuo tikslu buvo sukonstruotos plazmidės skirtos pavienių genų ir įvairių jų kombinacijų integracijai į mielių genomą.

Pirmiausia, BiP, kalretikulino, PDI ir ERp57 žmogaus šaperonų genai ir chimeriniai, su mielių Cne1p baltymo transmembraniniu regionu ir serino - glicino ar. stiebu sujungti šių genų variantai (3.2.3) buvo įklonuoti į mielių konstitutyviai veikiančias *PGK1* ar *TEF2* genų raiškos kasetes (48 pav.). Abu genų sekos variantai pasirinkti, nes galutinai nebuvo išsiaiškinta, kurios sekos žmogaus šaperonai yra aktyvūs mielių ET. Pasirinktos skirtingos mielių raiškos kasetės, turinčios *PGK1* ir *TEF2* genų promotorius nes, kaip aprašyta anksčiau, pastebėta, kad mielių ląstelė nėra pajėgi efektyviai aptarnauti daug *PGK1* geno promotoriaus kopijų. Žmogaus šaperonų mielių raiškos kasetės, pasinaudojant paveiksluke nurodytomis RE, buvo sujungtos po 2, 3 ar 4 vienoje plazmidėje, tokiomis kombinacijos, kurios nurodytos schemeje. Galiausiai, visos raiškos kasetės ir jų kombinacijos perkeltos į darbo metu sukonstruotą vektorių, skirtą tikslinių genų integracijai į mielių rDNR IGS1 lokusą ir transformantų atrankai auksotrofiniuose *ura3* mielių kamienuose.



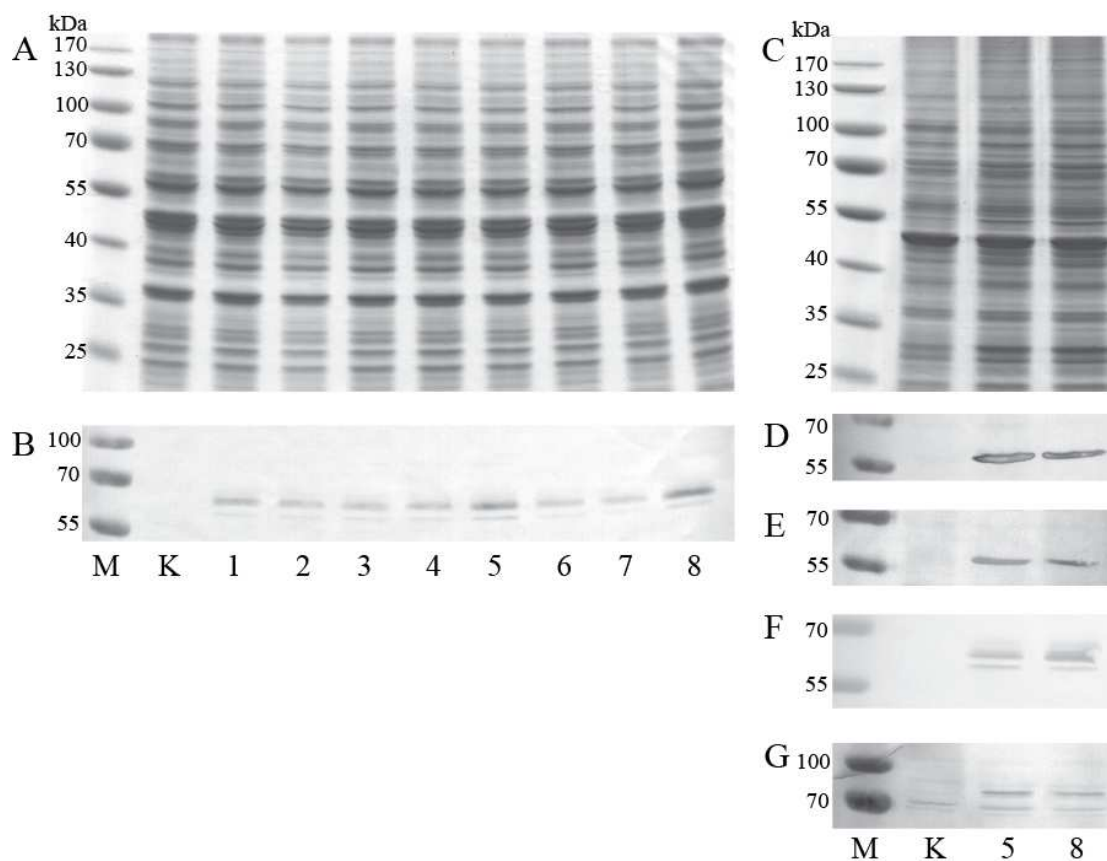
48 pav. Žmogaus BiP, CRT, PDI ir ERp šaperonus koduojančių genų integracijai į *S. cerevisiae* genomo IGS1 lokusą skirtų plazmidžių konstravimo schema. *bla* – genas, koduojantis β laktamazę, nulemiančią *E. coli* atsparumą ampicilinui; *pgk1-pr* – mielių *PGK1* geno promotorius; *pgk1-ter* – transkripcijos terminatorius; *tef2-pr* – mielių *TEF2* geno promotorius; *tef2-ter* – transkripcijos terminatorius; *pUC-ori* – plazmidės replikaciją bakterijose *E. coli* užtikrinanti seka; *igs1* ir *igs2* – mielių ribosominės DNR netranskribuojamos intergeninės sekos; *rdn5* – 5S ribosominės RNR genas; *ura3* – mielių *URA3* genas; *hisG* – pasikartojančios, homologinei rekombinacijai ir tarp jų esančio *URA3* geno pašalinimui, skirtos sekos. Viduryje surašytos visos pUC57 vektoriuje sukonstruotos žmogaus šaperonų genų kombinacijos. Kiekvieno geno raiškos kasetė tokia, kokia nurodyta pirmoje eilutėje. Homologinė rekombinacija vyksta tarp plazmidėje ir genome esančių *igs2-rdn5* ir *igs1* 3' sekų. Atitinkamai sukonstruotos ir plazmidės skirtos tų pačių genų chimerinių, su mielių Cne1p baltymo transmembraniniu regionu ir glicino bei serino ar. stiebu (BiP_ST_CNE, CRT_ST_CNE, PDI_ST_CNE ir ERp57_ST_CNE) sujungtų sekų integravimui į IGS1 lokusą.

Sukonstruotos 30 skirtingų plazmidžių buvo linearizuotos *AsiSI* RE ir panaudotos mielių *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamieno transformacijai. Kaip minėta, IGS1 seka mielių genome yra pakartota nuo 150 iki 200 kartų, todėl kiekvienu atveju reikalinga atrinkti kamienus geriausiai sintetinančius rekombinantinius žmogaus šaperonus. Kamienai,

kuriuose įsistatė optimalus žmogaus šaperonų genų kopijų skaičius, kiekvienu atveju atrinkti pagal sekančią schemą:

- (a) Transformantai išsėjami ir išklonuojami ant terpės be uracilo;
- (b) Pasirinkti 8 kamienai perbraukomi ant terpės su 5-fluororotine rūgštimi, o gauti auksotrofiniai *ura3* kamienai patikrinami fenotipiškai ir fiziologiškai;
- (c) Įvykę pakitimai pasirinktų mielių kamienų genome įvertinami PGR būdu ir nustatant integruotų žmogaus genų nukleotidų seką;
- (d) Atliekama pasirinktų mielių kamienų ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE ir imunoblotingas su specifiniais vienam iš baltymų, kurio genas buvo integruotas, antikūnais. Atrinkamas optimalus, t.y. geriausiai rekombinantinį šaperoną sintetinantis kamienas. Jeigu buvo integruota keletas genų, taupant antikūnus ir laiką, imunoblotingas prieš kitus žmogaus šaperonus grubiuose lizatuose neatliekamas, nes logiška, kad jeigu buvo integruojama keleto genų raiškos kasetė, visų genų įsistato vienodas kopijų skaičius;
- (e) Atrinkto optimalaus mielių kamieno ląstelių baltymai frakcionuojami ir bendroje membraninių baltymų frakcijoje (3 frakcija) imunoblotingu nustatoma ar yra sintetinami visi šaperonai, kurių genai buvo integruoti.

49 paveiksliuke parodyta, kaip atrinktas geriausiai žmogaus chimerinius BiP, kalretikulino, ERp57 ir PDI šaperonus sintetinantis mielių kamienas *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX_IGS1-PGK1rk-BiP_ST_CNE-PGK1rk-CRT-TEF2rk-PDI-TEF2rk-ERp57. Visi kiti 29 kamienai, geriausiai sintetinantys įvairias žmogaus šaperonų kombinacijas, atrinkti taip pat.



49 pav. Humanizuoto mielių *S. cerevisiae* kamieno, su optimaliu IGS1 lokuse integruotų chimerinių žmogaus BiP, CRT, PDI ir ERp57 šaperonų genų kopijų skaičiumi, atranka ir analizė. Mielių *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamieno, transformuoto pUC57-IGS2-RDN5-IGS1-BiP_ST_CNE-CRT_ST_CNE-PDI_ST_CNE-ERp57_ST_CNE plazmide, ląstelių grubių lizatų NDS-PAGE (A) ir imunoblotingas (B) su specifiniais žmogaus kalretikulino baltymui antikūnais bei bendros membraninių baltymų frakcijos NDS-PAGE (C) ir imunoblotingas su specifiniais antikūnais žmogaus ERp57 (D), PDI (E), kalretikulino (F) ir BiP (G) baltymams. K – išveiginio mielių AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamieno ląstelių baltymų mėginiai, 1-8 – pasirinkti mielių transformantai, M – molekulinės masės standartas (UAB Fermentas SM0671).

Kaip matyti 49 paveiksliuke, analizuojant grubius tikrinamo humanizuoto mielių kamieno ląstelių lizatus, kaip ir tikėtasi, pastebėti rekombinantinio baltymo raiškos skirtumai (49 pav. 1-8 takeliai). Tolimesniems bandymams pasirinktų transformantų (nr. 5 ir 8) baltymai buvo išfrakcionuoti ir bendroje membraninių baltymų frakcijoje įvertinta visų integruotų genų raiška (49 pav. C, D, E, F ir G). Vėl gi, tai rodo, kad tikslinių genų įterpimui į mielių genomą ribosominės DNR IGS sekos puikiai tinka, bet

būtina atrinkti geriausiai rekombinantinius baltymus sintetinančius transformantus.

Visi 30 atrinkti geriausiai žmogaus šaperonus ir įvairias jų kombinacijas sintetinantys mielių *S. cerevisiae* kamienai buvo transformuoti pFGG3-TVH plazmide ir įvertinta sinergetinė žmogaus šaperonų įtaka tymų viruso hemaglutinino baltymo brendimui mielių ląstelių ET. Išanalizavus humanizuotų mielių kamienų, transformuotų pFGG3-TVH plazmide, grubius ląstelių lizatus, membranine frakcijas ir įvertinus rekombinantinio TVH baltymo savybes, nustatyta, kad žmogaus BiP, kalretikulino, ERp57 ir PDI šaperonai, tiek natyvios sekos, tiek sulieti su mielių Cne1p baltymo ir glicino bei serino ar. stiebu, mielių ląstelėse sintetinami kartu su žmogaus kalneksino baltymu po vieną ar įvairiose kombinacijose, jokios teigiamos įtakos TVH baltymo brendimui neturi. Visuose humanizuotų mielių kamienų variantuose TVH baltymo pernešto į ET bei glikozilinto kiekis, tirpumas nejoniniame detergente ir imunogeniškumas liko nepakitę lyginant su išėjiniame *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX kamiene susintetintu rekombinantiniu TVH baltymu. Trumpai, vienintelis žmogaus ET šaperonas – kalneksinas – skatina TVH baltymo brendimą mielių ląstelių ET.

Taip pat šiame skyriuje verta paminėti nors ir nesėkmingus, bet įdomius ir daug darbo pareikalavusius bandymus, kurie buvo atlikti siekiant pakeisti vieną pagrindinių mielių ET baltymų – Kar2p – žmogaus homologu BiP. Kaip minėta, darbo tikslas reikalauja sukurti mielių kamienus, kuriuose būtų humanizuotas visas mielių sekrecijos kelias, todėl mielių Kar2p pakeitimas žmogaus homologu būtų labai svarbus žingsnis. Mielių Kar2p baltymas yra ląstelei gyvybiškai būtinas, todėl, kaip ir anksčiau aprašytuose bandymuose pakeisti mielių gyvybiškai svarbius baltymus, rezultatai sunkiai nuspėjami. Šiuo tikslu buvo sukonstruotos plazmidės, kuriose, panašiai kaip plazmidėje skirtoje mielių *CNE1* geno pakeitimui žmogaus CNX genu (47 pav.), žmogaus BiP genas buvo įterptas tarp mielių *KAR2* geno promotoriaus ir terminatoriaus bei homologinei rekombinacijai ir transformantų atrankai reikalingų sekų. Lygiai tokia pat plazmidė buvo sukonstruota ir naudojant chimerinę, su mielių

Cne1p baltymo transmembraniniu regionu sulietą žmogaus BiP geno seką. Linearizavus, šiomis plazmidėmis buvo transformuoti *S. cerevisiae* AH22 ir anksčiau aprašyti *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX_IGS1-PGKrk-BiP ir *S. cerevisiae* AH22_URA3::3xPGK1-CNX_CNE1::CNX_IGS1-PGKrk-BiP_ST_CNE kamienai, kuriuose jau sintetinamas žmogaus natyvos ir chimerinės struktūros BiP baltymas. Vis tik, nei viename iš tikrintų variantų nepavyko mielių *KAR2* geno pakeisti žmogaus BiP šaperono genu. Rezultatas aiškiai rodo, kad mielių Kar2p ir žmogaus BiP baltymai yra funkciškai nelygiaverčiai.

Apibendrinus šiame skyriuje pateiktus rezultatus, galima konstatuoti, kad didžiausias ir pagrindinis rezultatas yra sukurta humanizuotų mielių kamienų kolekcija, kurią galima panaudoti siekiant optimizuoti įvairiausių baltymų sintezę ir sekreciją mielėse. Ši mielių kamienų kolekcija bus naudojama tęsiant mielių humanizacijos eksperimentus, toliau modifikuojant mielių baltymų sekrecinį kelią.

4. Rezultatų aptarimas

Mielės, daugiausiai *Saccharomyces cerevisiae*, nuo seno naudojamos maisto pramonėje. Faktiškai visos istorijai žinomos žmonių bendruomenės vienaip ar kitaip išmoko panaudoti mieles maisto ir gėrimų fermentacijai. Vystantis mokslui ir kaupiantis žinioms apie mielių genetiką, biochemiją ir fiziologiją bei kuriant naujas technologijas, ypatingai rekombinantinės DNR metodus, mielės tapo bene svarbiausiu modeliniu organizmu biologijoje ir pradėtos naudoti biotechnologijoje. Mielės sėkmingai naudojamos rekombinantinių baltymų sintezei, chemikalų bei biokuro gamybai ir dar daugelyje kitų įvairių sričių (apžvalgai Roberts ir Oliver, 2011).

Mielių ląstelės, tam, kad patenkintų vis didėjantį įvairių rekombinantinių baltymų poreikį (Walsh, 2010), yra įvairiai modifikuojamos, siekiant padidinti sintetinių baltymų išėigą, pagerinti jų kokybę, aktyvumą bei gryninimo paprastumą. Mielių ląstelių tobulinimas apima beveik visas baltymų brendimo stadijas:

- (a) Šalinamos mielių proteazės atsakingos už sintetinių heterologinių baltymų degradaciją;
- (b) Didinamos ar keičiamos baltymų viduląstelinio transporto mechanizmų galimybės;
- (c) Perprodukuojami baltymo teisingam susivyniojimui reikalingi šaperonai ir fermentai;
- (d) Sukurtas žinduolių tipo baltymų N-glikozilinimo kelias Goldžio aparate.

Be to, heterologinių baltymų sintezei yra kuriami nauji vektoriai ir adaptuojamos naujos mielių rūšys (apžvalgai Idiris ir kt., 2010).

Pataruoju metu iškilo nauja biotechnologijos sritis – sintetinė biologija, ir, žinoma, mielės yra labiausiai naudojamos ir šioje srityje. Sintetinės biologijos esmė suteikti ląstelei savybių, kurių ji natūraliai neturi. Tai pasiekama kuriant naujas biologines dalis (genus, baltymus), modeliuojant esamus ir kuriant naujus biocheminius kelius. Tai atliekama modifikuojant mielių metabolitinį kelią pritaikant jį naujų junginių sintezei. Tokiu būdu

sukurti mielių kamienai galintys anglies šaltiniu biokurui gaminti naudoti neiprastus cukrus, sintetinantys įvairius augalų metabolitus izoprenoidus, omega-3 nesočiąsias riebalų rūgštis, butanolį bei kitus įvairius junginius (apžvalgai Krivoruchko ir kt., 2011). Taip pat sukurti mielių kamienai, pasižymintys žinduolių tipo baltymų N-glikoziliniu.

Šis darbas, lygiai kaip humanizuoto baltymų N-glikozilavimo kelio kūrimas, apima abi, mielių ląstelių tobulinimo pritaikant rekombinantinių baltymų sintezei ir sintetinės biologijos, sritis. Darbo metu buvo siekiama suteikti mielių ląstelei savybių, kurių ji natūraliai neturi – sintetinti aktyvius ir antigeniškus žmogaus virusų paviršiaus glikobaltymus. To siekiama perkeltant į mielių ląsteles žmogaus sekretinio kelio komponentus, užtikrinančius tinkamą sudėtingų glikobaltymų brendimą. Tokiu būdu norima mielių ląstelėje sukurti naują biocheminį kelią, suteikiantį jai naujų funkcijų.

Pirmoji šio darbo dalis skirta apibūdinti žmogaus tymų viruso glikobaltymo brendimo procesus mielių sekretiniame kelyje, nustatant neefektyvios šių baltymų raiškos mielėse priežastis. Darbo eigoje pirmą kartą buvo aprašytos tymų viruso hemagliutinino (TVH) sintezės galimybės mielėse *Saccharomyces cerevisiae* ir *Pichia pastoris* ir parodyta, kuriuose mielių baltymų sekretinio kelio etapuose yra sutrikęs rekombinantinio baltymo brendimas (Čiplys ir kt., 2011a). Klasikinės mielių rūšys ir standartiniai rekombinantinių baltymų raiškos ir gryninimo protokolai nėra tinkami diagnostikai ir vakcinų kūrimui reikalingo TVH baltymo gavimui. Didžioji dalis (80-90%) rekombinantinio TVH baltymo, susintetinamo mielėse naudojant stiprius promotorius, nėra glikozilinama, baltymas lieka mielių ląstelių citoplazmoje ir kartu su kai kuriais mielių baltymais negrįžtamai agreguoja. (14 pav.). Žinduolių ląstelėse susintetinto ir išgryninto TVH baltymo preparatuose neglikozilinto TVH baltymo neaptinkama visiškai (Kidokoro ir kt., 2002). Vabzdžių ląstelėse naudojant bakulovirusų raiškos sistemas, daugiau nei pusė susintetinto TVH baltymo sudaro neglikozilinta apie 65kDa molekulinės masės forma (Vialard ir kt., 1990). Rekombinantinis TVH baltymas, susintetintas transgeninėse morkose yra taip pat yra mažesnės

molekulinės masės nei natyvus baltymas, kas rodo skirtingą glikozilinimo pobūdį (Marquet-Blouin ir kt., 2003). Atrodo, kad TVH baltymo brendimas, pereinant nuo žinduolių ląstelių į mažiau sudėtingas raiškos sistemas, yra vis labiau sutrikęs, o žemesniuose eukariotuose - mielėse, didžioji TVH baltymo dalis aptinkama nesubrendusio baltymo formoje. Tik nedidelė dalis TVH baltymo mielėse yra sėkmingai perkeliama į ET ir glikozilinama. Tai rodo, kad mielių ląstelėse virusinio glikobaltymo translokacijos mechanizmas yra labai neefektyvus lyginant su žinduolių ląstelėmis.

Proteominė *S. cerevisiae* ląstelių, sintetinančių TVH baltymą, analizė leido nustatyti specifinį mielių atsaką į stresą, kurį sukelia TVH baltymo agregatai. Nustačius mielių baltymus, kurių raiška ląstelėje padidėja dėl TVH baltymo sintezės (18 pav., 1 lentelė), parodyta, TVH sintezė mielėse sukelia neseniai aprašytą citoplazminį nesusivyniojusių baltymų atsaką (UPR-cyto) (Metzger ir Michaelis, 2009). Pagrindinis šiame darbe aprašyto atsako į stresą požymis yra ypatingai didelių baltymų agregatų, kurių šerdį sudaro TVH ir mielių eEF1A baltymai, susidarymas (19 pav.). Eukariotų transliacijos elongacijos faktorius 1A (eEF1A) yra lokalizuotas ląstelės citoplazmoje ir atlieka daug svarbių funkcijų: (a) aminoacil-tRNR pristatymas į ribosomą (Grosshans ir kt., 2000); (b) aktino citoskeleto organizacija ir ląstelės morfologijos palaikymas (Gross ir Kinzy, 2005) ; (c) naujai susintetintų baltymų kokybės priežiūra (Hotokezaka ir kt., 2002); (d) netinkamai susivyniojusių baltymų nukreipimas degradacijai (Chuang ir kt., 2005). Nustatyta, kad eEF1A turi į šaperonus panašų aktyvumą ir, skirtingai nei kiti su transliacija susiję veiksniai, sąveikauja su naujai susintetintais polipeptidais (Hotokezaka ir kt., 2002). Šio darbo rezultatai leidžia manyti, kad eEF1A baltymas mielių ląstelėse ne tik vykdo naujai susintetintų baltymų kokybės priežiūrą, bet ir dalyvauja atsako į stresą formavime. eEF1A baltymo funkcija mielių ląstelių atsake į stresą kol kas nebuvo apibūdinta. Žinduolių ląstelėse karščio šoko RNR-1 (HSR1) ir eEF1A veikia kartu ir aktyvuoja karščio šoko transkripcijos faktorių HSF1, kuris indukuoja karščio šoko baltymų raišką (Shamovsky ir kt., 2006). Panašu, kad eEF1A sąveikauja su TVH polipeptidais

aktyvuoja mielių ląstelių atsaką į stresą tokiu pat būdu kaip ir žinduolių ląstelėse.

TVH baltymo sintezė mielių *S. cerevisiae* ląstelėse sąlygoja didžiųjų HSP šeimos baltymų raiškos padidėjimą, o mažųjų HSP raiška lieka nepakitusi (1 lentelė). Tokie pat rezultatai gauti analizuojant mielių ląstelių atsaką į UPR-cyto stresą bei parodyta, kad baltymai, kurių raiška padidėja atsako į stresą metu, yra Hsf1p taikiniai (Geiler-Samerotte ir kt., 2011). Skirtumus tarp mažųjų ir didžiųjų HSP baltymų reguliavimo galima paaiškinti tuo, kad mielių atsaką į įvairius stresus reguliuoja du pagrindiniai transkripcijos faktoriai – Hsf1p ir Msn2/4p. Parodyta, kad Hsp26 baltymo raišką indukuoja Hsf1p esant karščio šokui, o Msn2/4p kitomis streso sąlygomis, tuo tarpu Hsp104 raiška priklauso nuo Hsf1p visomis streso sąlygomis (Amoros ir Estruch, 2001). Panašu, kad TVH baltymo sąveika mielių ląstelių citoplazmoje su eEF1A aktyvuoja Hsf1p tuo pačiu keliu kaip ir žinduolių ląstelėse, o Msn2/4p nėra aktyvuojamas. Tokiu būdu eEF1A reaguoja į nesubrendusius TVH polipeptidus ir indukuoja mielių ląstelių atsaką į citoplazminį nesusivyniojusį baltymų stresą. Žinoma, tokių prielaidų patvirtinimui reikalingi papildomi bandymai.

Tai, kad mielių eEF1A su TVH baltymu ląstelių citoplazmoje sudaro agregatus gali paaiškinti morfologinius mielių ląstelių pakitimus, stebimus TVH baltymo sintezės metu (20 pav.). Kaip minėta, eEF1A yra būtinas aktino citoskeleto organizacijai ir ląstelės morfologijos palaikymui. eEF1A jungiasi prie aktino filamentų ir slopina jų depolimerizaciją arba skatina aktino monomerų jungimąsi. Taip eEF1A didina aktino polimerų kiekį ląstelėje (Murray ir kt., 1996). Gross ir Kinzy nustatė eEF1A sekas, kurios yra atsakingos už eEF1A baltymo jungimąsi su mielių ląstelių akitinu (Gross ir Kinzy, 2005). Pašalinus šias eEF1A baltymo sekas, mielių ląstelėse sutrinka aktino citoskeleto organizacija ir mielių ląstelių morfologija tampa labai panaši į mūsų darbe apibūdintą TVH baltymą sintetinančių mielių ląstelių morfologiją (20 pav.). Panašu, kad sumažėjus laisvo eEF1A baltymo kiekiui mielių ląstelėse dėl TVH baltymo sintezės, sutrinka ir aktino struktūra, lygiai taip,

kaip pašalinus už šią funkciją atsakingas eEF1A baltymo sekas. Veiklaus daugiafunkcinio eEF1A baltymo sumažėjimas mielių ląstelių citoplazmoje gali paaiškinti ir kitus TVH baltymo sintezės sukeliamus mielių ląstelių fiziologinius sutrikimus – dalinimosi laiko padidėjimą, baltymų kaupimąsi bei ląstelių lizę.

Šio darbo tikslas yra sukonstruoti humanizuotus mielių kamienus, tinkamus efektyviai veiklaus TVH baltymo sintezei. Žmogaus ląstelėse bręstantys virusiniai glikobaltymai yra transportuojami į ET nuo SRP priklausomu ko-transliaciniu keliu (Wilson ir kt., 1987). Mielių ląstelėje po-transliacinio ar ko-transliacinio pernešimo į ET kelio pasirinkimas priklauso nuo baltymo signalinės sekos hidrofobiškumo (Ng ir kt., 1996). Nuo SRP nepriklausomas kelias pasirenkamas tada, kai signalinės sekos hidrofobiškumas yra mažesnis už +2.0 U (pagal Kyte ir Doolittle, 1982), o viršijus +3.0 U – pasirenkamas ko-transliacinis baltymo perkėlimo į ET kelias. Virusinių paviršiaus glikobaltymai turi labai hidrofobiškas signalines sekas, TVH baltymo signalinės sekos hidrofobiškumas viršija +3.0 U, todėl mielių ląstelėse tokie baltymai turėtų būti pernešami į ET nuo SRP priklausomu keliu. Tai patvirtintų ir faktas, kad suliejus globulinę TVH baltymo dalį su mielių *S. cerevisiae* α -faktorius signaline seka, TVH baltymo pernešimas į mielių ląstelių ET smarkiai padidėja (16 pav.). Žinoma, kad mielių α -faktorius signalinę seką turintys baltymai yra perkeliama į ET po-transliaciniu keliu (Ng ir kt., 1996), todėl TVH baltymo sulieto su α -faktorius signaline seka efektyvesnį, lyginant su natyvios sekos TVH baltymo, pernešimą į ET galima paaiškinti efektyvesniu po-transliacinio kelio mechanizmu mielių *S. cerevisiae* ląstelėse. Neefektyvus mielių ko-transliacinis pernešimas lemia, kad sintetinamas TVH baltymas lieka citoplazmoje ir sukelia citoplazminį nesusivyniojusių baltymų stresą. Mielių ko-transliacinio pernešimo į ET kelio komponentų negebėjimą efektyviai perkelti visas sintetinamas TVH baltymo molekules galima aiškinti įvairiai. Tikėtina, kad:

- (a) Mielių nuo SRP priklausomo pernešimo kelio mechanizmas mielėse yra mažiau įdarbintas, todėl evoliucijos eigoje buvo silpniau išvystytas ir

sugeba perkelti į ET mažesnę baltymų kiekį nei po-transliacinio kelio komponentai. Žemesniuose eukariotuose dominuoja po-transliacinis baltymų pernešimas į ET (Rapoport, 2007). Mielėse *S. cerevisiae* SRP dalelės ir SRP receptorių baltymai netgi nėra gyvybiškai būtini ląstelei (Brown ir kt., 1994). Tai rodo, kad ko-transliacinis baltymų pernešimas į ET mielių ląstelėse yra mažiau naudojamas, todėl mažiau pajėgus.

- (b) Nuo SRP priklausomo kelio komponentai netinkamai sąveikauja su sintetinio TVH baltymo signaline seka. Žinoma, kad SRP dalelės sąveika su sintetinio polipeptido signaline seka priklauso tiek nuo SRP54 baltymo, tiek nuo SRP RNR ir su SRP šerdimi sudaro bent kelias jungtis. Teisinga SRP dalelės sąveika su ribosoma ir signaline sintetinio baltymo seka yra esminis žingsnis ko-transliaciniame baltymų pernešimo procese (Grudnik ir kt., 2009). Ši sąveika evoliucijos eigoje išliko labai konservatyvi ir sudėtinga (Janda ir kt., 2010), tad mielių SRP dalelė gali neefektyviai sąveikauti su ne natyvia signaline seka.
- (c) Mielių ląstelėse trūksta ko-transliacinio kelio komponentų, kurie žinduolių ląstelėse yra reikalingi teisingam ir efektyviam baltymų pernešimui į ET. Svarbiausi jų – TRAM1 baltymas ir TRAP baltymų kompleksas (Zimmermann ir kt., 2011). Yra parodyta, kad vezikulinio stomatito viruso G baltymo transmembraninis regionas sąveikauja su TRAM1 baltymu pernešimo į ET metu (McCormick ir kt., 2003).

Teisingam baltymo pernešimo į ET proceso užbaigimui, sulankstymui ir nukreipimui į Goldžio aparatą reikalingi ET šaperonai ir fermentai. Dažnai rekombinantinių baltymų produkcijoje šių šaperonų stygius (Martinez-Alonso ir kt., 2010) bei sekretuojamų baltymų išvedimas į Godžio aparatą (Schroder, 2007) įvardijami kaip pagrindinės neefektyvios rekombinantinių baltymų sekrecijos priežastys. Šiame darbe parodyta, kad sudėtingų baltymų sintezė mielėse stringa jau pirmajame baltymo brendimo etape – perkėlime į ET. Manoma, kad virusinių glikobaltymų antrinės struktūros formuojamos jau translokono kanale vykstant baltymo sintezei (Braakman ir van Anken, 2000).

Tinkama sintetinamo polipeptido sąveika su ko-transliacinio baltymų perkėlimo į ET kelio komponentais yra svarbi ne tik efektyviam baltymo pernešimui į ET, bet ir tinkamos struktūros formavimui. Panašu, kad mielėse sutrikęs TVH baltymo perkėlimas į ET sąlygoja ne tik nesubrendusių polipeptidų kaupimąsi citoplazmoje bei nesusivyniojusią baltymų stresą, bet ir netinkamą baltymo brendimą.

Negalima atmesti prielaidos, kad TVH baltymo brendimas yra sutrikęs ir dėl žinduolių šaperonų ir fermentų trūkumo mielių ląstelių ET. RNR virusai dėl mažo genomo evoliucijos eigoje sukūrė sudėtingus daugiafunkcinius paviršiaus glikobaltymus, kurių brendimas šeimininko ląstelėje gali trukti iki kelių valandų ir išnaudoja visą ląstelės šaperonų ir susivyniojimui reikalingų fermentų repertuarą (Braakman ir van Anken, 2000). Mielių ląstelės neprilygsta žinduolių ląstelėms ET šaperonų įvairove. Palyginimui žmogaus ląstelių disulfidinių tiltelių izomerazių šeimą sudaro 19 baltymų (Appenzeller-Herzog ir Ellgaard, 2008), tuo tarpu mielėse *S. cerevisiae* žinoma vos 5 tokia funkcija pasižymintys baltymai (Norgaard ir kt., 2001). Be to, žmogaus ir mielių proteomų palyginimas parodė, kad žmogaus ląstelėje yra beveik 6 kartus daugiau baltymų domenų struktūrų nei mielių ląstelėse. Beveik visos evoliucijos eigoje atsiradusios naujos baltymų sričių struktūros būdingos žmogaus membraniniams ir sekretuojamiems baltymams, kurie bręsdami pereina sekretinį baltyminį kelią (Lander ir kt., 2001). Visi šie faktai rodo, kad mielių baltymų sekretinis kelias yra primityvus lyginant su žmogaus ir nepritaikytas sudėtingiems virusiniams glikobaltymams apdoroti. Tą patvirtina faktas, kad nors ir sujungta su mielių α -faktorius signaline seka globulinė TVH baltymo dalis yra efektyviai perkeliama į ET po-transliaciniu keliu, ji lieka agreguota ET ir neįgyja teisingos konformacijos (16 ir 17pav.).

Apibendrinus pirmosios dalies rezultatus galima aiškiai teigti, kad dėl nurodytų priežasčių TVH sintezė mielėse yra sutrikusi ankstyvosiose baltymo brendimo stadijose. Mielių ko-transliacinio baltymų perkėlimo į ET ir ET baltymų sulankstymo mechanizmai nėra pritaikyti sudėtingų virusinių baltymų brendimui.

Antrojeje šio darbo dalyje aprašyti bandymai išspręsti mielių sekretinio kelio trūkumus į mielių ląsteles perkeltant žmogaus sekretinio kelio komponentus. Pirmiesiems mielių sekretinio kelio humanizavimo etapams buvo pasirinkti žmogaus baltymai atsižvelgiant į nustatytas neefektyvaus TVH baltymo brendimo mielių ląstelėse priežastis. Žmogaus tipo ko-transliacinį baltymų pernešimą į ET mielių ląstelėse bandyta atkurti perkeltant žmogaus SRP, Sec61 kompleksą ir TRAM1 baltymus. Šių baltymų pakanka norint *in vitro* atkurti ko-transliacinį baltymų pernešimo mechanizmą (Gorlich ir Rapoport, 1993). Norint sukurti tinkamas TVH baltymo brendimui sąlygas, mielių ląstelių ET buvo sintetiniai pagrindiniai žmogaus ląstelių ET šaperonai – BiP, kalretikulinas, kalneksinas, PDI ir ERp57. Nors virusų paviršiaus glikobaltynų brendimas žinduolių ląstelėse nėra išsamiai išstudijuotas, įvairūs pavieniai eksperimentai rodo, kad visi šie žmogaus ląstelių baltymai yra būtini tinkamai virusinių baltymų biosintezei (apžvalgai Maggioni ir Braakman, 2005). Tymų viruso hemagliutinino išsodinimo bandymai žmogaus ląstelėse parodė, kad TVH baltymas sąveikauja su ET šaperonais BiP, kalretikulinu ir kalneksinu (Bolt, 2001).

Tymų viruso hemagliutinino brendimas mielėse yra sutrikęs sintetinio polipeptido pernešimo į ET stadijoje. Šią problemą buvo siekiama išspręsti perkeltant į mieles *S. cerevisiae* žmogaus ląstelių ko-transliacinio baltymų perkėlimo į ET komponentus. Panaši strategija buvo naudota *Escherichia coli* ląstelėse siekiant padidinti membraninių baltymų raišką. Parodyta, kad bakterijų Sec translokono, homologiško mielių ir žmogaus Sec61translokonui, baltymų raiškos padidinimas sąlygoja didesnes bakterinių membraninių baltymų išėigas. Didesni kiekiai veiklių translokonų ET membranoje leido perkelti į ET daugiau sintetinių polipeptidų ir neleido jiems kauptis bakterijų citoplazmoje (Wagner ir kt., 2007). Tuo tarpu mielių Sec63p baltymo, reikalingo ko-transliaciniam baltymų pernešimui į ET mielėse *S. cerevisiae*, padidinta raiška mielių ląstelėse nepadidino mielių membraninių baltymų išėigų (Bonander ir kt., 2009). Šiame darbe buvo sukonstruotas humanizuotas mielių kamienas *S. cerevisiae* AH22_IGS1-Sec61c-TRAM1, kuriame

perprodukuoti žmogaus Sec61 komplekso baltymai Sec61 α , Sec61 β ir Sec61 γ bei translokacijai reikalingas TRAM1 baltymas. Taip pat, siekiant humanizuoti visą mielių *S. cerevisiae* ko-transliacinį baltymų perkėlimo į ET aparatą, mielių *SBH1* ir *SSS1* genai buvo pakeisti žmogaus homologais SEC61B ir SEC61G. Mielių Sss1p yra gyvybiškai svarbus Sec61 komplekso subvienetas. Kai kurie mielių *S. cerevisiae* gyvybiškai svarbūs baltymai gali būti pakeisti kitų organizmų homologais. Pavyzdžiui, šiame darbe minėtą mielių transkripcijos faktorių HSF1 funkciškai pakeičia pomidorų arba vaisinių muselių homologai (Boscheinen ir kt., 1997), tryptofenil-tRNR sintetazę gali pakeisti žmogaus ląstelių homologas (Johnson ir kt., 2002), o *Tripanosoma cruzi* PIN1 genas, koduojantis peptidyl-prolyl-cis/trans izomerazę, pakeičia mielių *S. cerevisiae* gyvybiškai svarbų baltymą Ess1p (Erben ir kt., 2007). Šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad mielių Sss1p galima pakeisti žmogaus ląstelių homologiniu baltymu Sec61 γ . Mielių *S. cerevisiae* Sss1p baltymo mutacijos sumažinančios baltymo aktyvumą sąlygoja baltymų kaupimąsi mielių citoplazmoje ir endoplazminio tinklo morfologinius pakitimus (Falcone ir kt., 2011). Sss1p baltymo pakeitimas žmogaus homologu Sec61 γ neturėjo jokios įtakos ląstelės morfologijai ir fiziologijai. Tai rodo, kad žmogaus ląstelių baltymas Sec61 γ visiškai komplementuoja Sss1p baltymo funkcijas. Tuo tarpu mielių Sec61p baltymo žmogaus homologas Sec61 α funkciškai neatstoja ir mielių ląstelės nėra gyvybingos. Žinoma, atliktus mielių baltymų pakeitimus žmogaus ląstelių homologiniais baltymais reiktų patvirtinti baltymų ar RNR lygyje. Šiame darbe to atlikti nebuvo galimybės.

Ko-transliacinį baltymų pernešimą užtikrina sudėtingos ribosomos, sintetinio baltymo signalinės sekos, SRP dalelės ir Sec61 translokono sąveikos (Jiang ir kt., 2008). Nors mielių Sec61 translokono humanizavimas ir žmogaus Sec61 heterotrimerio bei TRAM1 baltymo perprodukcija neturėjo jokios įtakos mielių ląstelių fiziologijai, pernešto į ET TVH baltymo kiekis šiuose kamienuose buvo sumažėjęs lyginant su išėjiniu mielių kamieniu (26 pav.). Tai rodo, kad žmogaus Sec61 translokono ir TRAM1 baltymai mielių ląstelėje turi įtakos TVH baltymo pernešimui į ET. Panašu, kad mielių ląstelėje

sukurtas chimerinis, mielių SRP ir žmogaus Sec61 baltymų, ko-transliacinio perkėlimo mechanizmas nėra tinkamas TVH baltymo perkėlimui į ET. Nors šiuose humanizuotuose kamienuose žmogaus sekretinio kelio baltymai turėjo priešingą įtaką nei siekiama šio darbo metu, tai, kad mielių ląstelėje žmogaus Sec61 ir TRAM1 baltymai yra puikiai toleruojami ir netgi funkciškai pakeičia mielių translokoną bei selektyviai atpažįsta TVH baltymą, rodo, kad mielių ląstelė yra tinkamas organizmas sukurti žinduolių tipo sekretinį baltymų kelią.

Siekiant sukurti pilnai humanizuotą ko-transliacinį baltymų perkėlimo mechanizmą mielių ląstelėse, buvo sukonstruotas kamienas sintetinant žmogaus SRP ir Sec61 kompleksų bei TRAM1 baltymus bei kamienas su pašalintais mielių *SBH1* ir *SSS1* genais – *S. cerevisiae* AH22_*SBH1*::SEC61B_*SSS*::SEC61G_IGS1-Sec61c-TRAM1-SRPc. Žmogaus 7SL RNR buvo sintetinama nuo daugiakopijinės plazmidės mielių ląstelėje pasinaudojant bakteriofago T7 RNR polimeraze. Tokiu būdu mielių ląstelėje vienu metu buvo sintetinamas visas pagrindinis žmogaus ko-transliaciniam baltymų pernešimui į ET reikalingas mechanizmas. Bakterijose *E. coli* natyvaus SRP komplekso baltymų perprodukavimas nepadidino membraninių baltymų kiekio perkeliama į plazminę membraną (Nannenga ir Baneyx, 2011), tuo tarpu mielėse *S. cerevisiae* atstatė dėl ribosominio baltymo Rlp25p mutacijos sutrikusį ko-transliacinį baltymų pernešimą į ER (Dalley ir kt., 2008). Skirtinga SRP, kaip ir Sec61, kompleksų baltymų padidintos raiškos įtaka netgi natyvių membraninių baltymų translokacijai į ET, rodo, kad skirtingų sekretinį kelią pereinančių baltymų sintezė yra ribojama skirtinguose etapuose ir norint padidinti šių baltymų raišką ar sukurti sąlygas aktyvaus baltymo sintezei yra reikalingas sisteminis viso sekretinio kelio modifikavimas, nes bandymai tobulinti tik atskiras baltyminio sekretinio kelio dalis dažnai būna nesėkmingi. Todėl, siekdami pritaikyti mieles efektyviai virusinių glikobaltymų sintezei, mes į mielių ląstelės perkėlėme visus pagrindinius žmogaus ląstelių ko-transliacinio perkėlimo į ET komponentus. Kaip jau aprašyta rezultatų skyriuje, žmogaus SRP komplekso perkėlimas dalinai atstatė dėl mielių *Sbh1p* ir *Sss1p* pašalinimo beveik visiškai sutrikusį

TVH baltymo perkėlimą į ET (34 pav.). Kol kas, dėl jau minėtų galimų priežasčių (3.2), nepavyko mielių ląstelėse sukurti efektyvaus visą sintetinamą TVH baltymą į ET perkeliančio mechanizmo. Žmogaus SRP ir Sec61 bei TRAM1 baltymų kompleksas į ET perkelia mažiau TVH baltymo nei mielių homologai (34 pav.). Vis tik, rezultatai rodo, kad žmogaus baltymai mielių ląstelėje yra lokalizuoti tinkamuose kompartmentuose ir panašu, kad formuoja veiklius kompleksus, o mielių ląstelė yra tinkama perkelti visus žmogaus sekretinio kelio komponentus. Taip pat eksperimento eigoje surinkta daugybė naudingos informacijos padėsiančios optimizuoti turimus humanizuotus mielių kamienus. TVH baltymo sintezė mielių ląstelėje yra indukuojama stipraus mielių *GAL7* geno promotoriaus, o kiekvienai vienu metu sintetinamai polipeptido grandinei yra reikalinga viena SRP dalelė, Sec61 translokonas ir TRAM1 bei kiti pagalbiniai baltymai. Nesubalansuotas kiekis kartu su tiksliniu baltymu produkuojamų pagalbinių, brendimui reikalingų baltymų, gali turėti neigiamą poveikį rekombinantinio baltymo sintezei ir kokybei (Martinez-Alonso ir kt., 2010). Tolimesniuose darbuose, siekiant sukurti efektyvų virusinių glikobaltymų sintezei skirtą mielių kamieną, būtina optimizuoti žmogaus ko-transliacinio baltymų perkėlimo kelio komponentų, įskaitant 7SL RNR, sintezę. Taip pat reikalinga klonuoti papildomus žmogaus ko-transliacinio kelio komponentus, Sec62/Sec63 ir TRAP kompleksų baltymus, bei translokacijos kelio humanizavimą derinti su žmogaus ET šaperonų perkėlimu. Apibendrinant, nors čia aprašyto darbo metu nepavyko išspręsti pagrindinės TVH baltymo biosintezės mielėse problemos – tinkamo baltymo perkėlimo į ET , gauti rezultatai leidžia manyti, kad mielių sekretinio kelio pirmųjų etapų humanizavimas, pritaikant virusinių glikobaltymų sintezei, yra galimas. Gauti rezultatai leidžia numatyti tolesnius konkrečius darbus kaip šį tikslą pasiekti.

Gauti rezultatai parodė, kad TVH baltymo brendimas mielių ląstelėje yra sutrikęs citoplazmoje ir ET ertmėje. Net ir išvengus TVH polipeptidų kaupimosi citoplazmoje suliejus TVH globulinę dalį su mielių α -faktoriumi ar sumažinus TVH raišką ląstelėje (16 ir 17 pav.), TVH baltymas nėra teisingai

apdorojamas mielių ET šaperonų ir lieka agregavęsis ET membranose. Baltymų biosintezė sekretiniame kelyje yra sudėtingas, daugiapakopis procesas, o virusai evoliucionuodami šeimininko ląstelėje paviršiaus glikobaltymų sintezei prisitaikė išnaudoti visą ląstelės ET baltymų repertuarą (Braakman ir van Anken, 2000). Kaip minėta, mielių, lyginant su žinduolių, ląstelių sekretinis kelias yra pakankamai primityvus ir, suprantama, nepritaikytas žmogaus virusinių glikobaltymų brendimui. Antroje šiame darbe vykdyto mielių sekretinio kelio humanizavimo kryptyje atlikti bandymai įvertinti žmogaus šaperonų įtaką TVH brendimui mielių ET (Čiplies ir kt., 2011b).

Bendra tikslinio baltymo ir padidinta baltymų pagalbininkų, dažniausiai šaperonų, sintezė ląstelėje yra dažnai naudojama siekiant pagerinti rekombinantinio baltymo išeią ir kokybę. Tokia taktika naudojama bakterinėse, mielių, augalų ir žinduolių ląstelių raiškos sistemose sintetinant tų pačių ar kitų organizmų tikslius baltymus, bet beveik visada yra perprodukuojami natyvūs ląstelių šaperonai. Taip pat yra aprašyta bandymų padidinti iš karto kelių ląstelės šaperonų sintezę įvertinant sinergetinę jų įtaką heterologiniam baltymui. Bendrai, beveik visuose aprašytuose tokiuose bandymuose šaperonai, kurie yra perprodukuojami, pasirenkami atsitiktinai, todėl tokie eksperimentai yra lydimi labai skirtingos sėkmės – pasisekė pataikyti, kurio šaperono sintezę padidinti, arba ne (apžvelgta Schroder, 2007; Khan ir Schröder, 2008; Freigassner ir kt., 2009; Idiris ir kt., 2010; Čiplies ir kt., 2011b). Šiame darbe mes pasirinkome kitokią strategiją. Visų pirma, mielių ląstelėse perprodukuojome ne mielių, o žmogaus ląstelių šaperonus. Tai atrodo būtina, nes ne tik mielių ląstelėje nėra kai kurių žmogaus šaperonų homologų, bet ir esamų homologinių šaperonų atpažįstami substratai ir galimybės juos apdoroti yra labai skirtingi, kas ir buvo įrodyta šiame darbe. Antra, eksperimento eiga buvo numatyta taip, kad į mielių ląstelę sistematiškai buvo perkelti visi žinomi žmogaus šaperonai ir įvertinta įvairių jų kombinacijų įtaką TVH baltymo brendimui ir atrinktas efektyviausias. Šiame darbe aprašyti

tik pirmieji šios strategijos žingsniai į mielių ET perkeliant pagrindinius 6 žmogaus šaperonus.

Kaip aprašyta rezultatų 3.3 skyriuje, vienintelis žmogaus kalneksino baltymas turėjo teigiamos įtakos TVH baltymo brendimui. Optimizavus sąlygas, virš 90% glikozilinto TVH baltymo, sintetinamo kartu su žmogaus kalneksinu, buvo apsaugota nuo agregacijos mielių ET. Kiti žmogaus ET šaperonai, sintetinami tiek natyvios sekos, tiek imobilizuoti ET membranoje sujungiant su mielių Cne1p ar Ost1p baltymų transmembraniniais domenais bei visose įmanomose kombinacijose, jokios įtakos TVH baltymui neturėjo (37 ir 44 pav.). Sėkmingai daugumos žmogaus virusų replikacijai šeimininko ląstelėje yra būtinas kalneksino ir kalretikulino ciklas paviršiaus glikobaltymų apdorojimui ET (Pieren ir kt., 2005). Net ir vienos hepatito B viruso paviršiaus baltymo glikozilinos sekos pašalinimas sutrikdo bręstančio baltymo sąveiką ET su lektiniais – kalneksinu ir kalretikulinu – ir slopina viruso dauginimąsi (Mehta ir kt., 1997). Tymų viruso hemagliutinino glikozilinas yra nevienalytis, nes bazinė cukrų grandinė yra prijungiama arba keturiose, arba penkiose baltymo vietose. Parodyta, kad TVH baltymo glikozilinimas yra būtinas tymų viruso dauginimuisi (Hu ir kt., 1994a). Žmogaus ląstelėse TVH baltymas sąveikauja su BiP, kalretikulino ir kalneksino šaperonais (Bolt, 2001). Akivaizdu, kad teisingas TVH baltymo glikozilinimas ir sąveika su žmogaus ET lektiniais yra būtinas etapas TVH brendimo kelyje. Šiame darbe parodyta, kad tik žmogaus kalneksinas mielių *S. cerevisiae* ląstelėse teigiamai veikia TVH baltymo brendimą. Mielių kalneksinas, net ir stipriai padidinus jo raišką, TVH baltymo brendimui įtakos neturėjo. Tai ne tik parodo skirtumus, atsiradusius evoliucijos eigoje tarp žmogaus ir mielių ląstelių sekretinio kelio komponentų, bet ir šiam darbui pasirinktos strategijos teisingumą. Nors kai kuriais atvejais natyvaus kalneksino baltymo raiškos padidinimas įvairiose raiškos sistemose padidina aktyvių heterologinių baltymų išėigą (apžvelgta Čiplys ir kt., 2011b), tokia taktika nėra tinkama tada, kai veiklaus rekombinantinio baltymo ląstelė apskritai nesugeba pagaminti. Tai, kad mielių sekrecijos kelią pritaikant žmogaus virusų glikobaltymų sintezei būtina

praturinti žmogaus ląstelių baltymais įrodo ir faktas, kad pašalinus mielių kalneksiną TVH brendimas ET nepakito. Kalneksino - kalretikulino sistema žinduolių ir tik kalneksinas mielių ląstelėse veikia kaip baltymų kokybės kontroliavimo sistema. Tik teisingai susivynioję baltymai yra šių šaperonų atpalaiduojami ir gali būti perkeltami į tolesnius sekretinio kelio etapus (Williams, 2006). Kai kuriais atvejais kalneksino baltymo pašalinimas teigiamai veikia heterologinių baltymų išėigas, nes panaikinamas „prikabus“ kokybės kontrolės mechanizmas (apžvelgta Freigassner ir kt., 2009). TVH sintezės mielėse atveju tai nepadedą, todėl akivaizdu, kad mielių ląstelė nėra pajėgi išspręsti sudėtingų virusinių glikobaltymų tinkamo suvyniojimo, bet yra tinkama norint atkurti žmogaus ląstelių ET esančią aplinką.

Žmogaus kalneksinas nors ir apsaugojo beveik visą glikozilintą TVH baltymą nuo agregacijos ET, nepadarė jo aktyviu ar antigenišku, todėl ne tiek svarbu yra suprasti kodėl žmogaus kalneksinas teigiamai veikė TVH brendimą, o suvokti, kodėl kiti žmogaus šaperonai mielių ląstelėje neįtakojo TVH baltymo kokybės. Kaip minėta rezultatų 3.2.2 skyriuje, žmogaus šaperonai mielių ET yra tinkamai apdorojami, bet nėra išlaikomi ET ertmėje ir sekretuojami į auginimo terpę. Šią problemą buvo bandoma išspręsti žmogaus šaperonus sujungus su mielių ET šaperonų Cne1p ir Ost1p transmembraniniais regionais. Vis tik, nėra aišku ar tokia modifikacija iš tikrųjų imobilizuoja baltymus ET membranoje, ir ar tai neįtakoja žmogaus šaperonų funkciškumo. Žmogaus KDELR baltymo, atsakingo už ET baltymų išlaikymą ET ertmėje, veikimo mechanizmas yra viena iš svarbiausių neišaiškintų ląstelės membraninių baltymų transporto mįslių (Pfeffer, 2007). Dabartinis modelis teigia, kad ET šaperonai iš ET kartu su baltymu, kurio brendimą skatina, ar dėl kitų priežasčių, yra pastoviai pernešami į Goldžio aparatą ir tik ten sąveikauja su KDELR baltymu, po to kartu su KDELR baltymu yra grąžinami ir išlaikomi ET (apžvalgai Capitani ir Sallese, 2009). Atrodo, kad globuliniai ET šaperonai funkcionuoja labai dinamiškoje aplinkoje, todėl šio darbo metu sukurtų chimerinių žmogaus šaperonų imobilizavimas membranose gali neigiamai veikti jų funkciją. Tai turbūt

patvirtintų ir tai, kad mielėse teigiamai TVH atžvilgiu veikė tik vienintelis žmogaus šaperonas – kalneksinas, kuris yra membraninis baltymas ir natūraliai būna įtvirtintas ET membranoje. Apibendrinus, žmogaus šaperonų perkėlimas į mielių ET atrodo labai perspektyvus siekiant sukurti mielių kamienus, tinkamus virusinių glikobaltymų sintezei, tik reikia išspręsti problemas, kylančias dėl skirtingos žmogaus ir mielių ląstelių biologijos. Šiuo metu atrodo, kad paprasčiausia ir geriausia taktika atrodo žmogaus šaperonų signalinės sekos KDEL pakeitimas mielėms būdinga HDEL seka ir mielių KDLER homologo Erd2p baltymo padidinta raiška, garantuojanti didesnę šaperonų kiekį išlaikomą ET.

Nors pagrindinė žmogaus šaperonų nefunkcionalumo priežastis atrodo yra netinkama baltymų lokalizacija, galimos ir kitos priežastys. Visi šaperonai veikia dideliuose baltymų kompleksuose taip užtikrindami teisingą baltymų brendimą (apžvalgai Bedard ir kt., 2005; Määttänen ir kt., 2010). Todėl pavienių ar net visų šiame darbe tikrintų žmogaus šaperonų sinergetinė įtaka TVH baltymui gali būti nepakankama tinkamai struktūrai suformuoti. Be to, kai kurių šaperonų veikimui yra reikalingi pagalbiniai baltymai. Pavyzdžiui, žmogaus BiP baltymo veikimui yra reikalingas nukleotidų pakeitimo faktorius Sli1, žmogaus Sli1 ir mielių homologo Sli1p sekos identiškumas yra tik 15%. Todėl tęsiant pradėtą darbą reikia į mieles perkelti ne tik kitus žmogaus ET šaperonus (Grp94, Hyou1, Ugg1, PDI šeima), bet ir pagalbinius baltymus užtikrinančius žmogaus šaperonų funkcionalumą mielių ląstelėse.

Sintetinant žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 šaperonus mielėse *S. cerevisiae* nustatyta, kad jie yra sekretuojami į auginimo terpę. Šių šaperonų sekrecija yra labai efektyvi, todėl terpėje aptinkami dideli kiekiai rekombinantinių baltymų (41 pav.). Nors tai ir nebuvo šio darbo tikslas, pastebėtas fenomenas leido sukurti efektyvią rekombinantinių šaperonų raiškos sistemą su itin paprastu baltymų gryninimu. Žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 baltymai yra platinami komerciškai tiek susintetinti *E. coli* ląstelėse, tiek išgryninti iš žmogaus ląstelių. Mūsų sukurta mielių raiškos sistema leidžia išgryninti itin didelius šių baltymų kiekius už nepalyginamai mažesnę kainą.

Be to, mielėse susintetinti šie baltymai, lyginant su rekombinantiniais šiais šaperonais, susintetintais *E. coli* ląstelėse, pereina visą eukariotų sekretinį baltymų kelią ir yra išgryninami nenaudojant jokių papildomų prie baltymo prijungiamų sekų, todėl pilnai atitinka žmogaus ląstelių baltymus bei turi platesnį pritaikymą.

Viską apibendrinant, šio darbo metu buvo nustatytos neefektyvios TVH sintezės mielėse priežastys bei atlikti pirmieji žingsniai jas sprendžiant. Nors šiame darbe nepavyko sukurti mielių kamienų, sintetinančių aktyvų TVH baltymą, mielių sekretinio kelio humanizavimas, pritaikant virusinių baltymų sintezei, atrodo įmanomas. Darbo metu sukonstruota naujų vektorių, skirtų genų integracijai į genomą bei rekombinantinių baltymų raiškai, surinkta daugybė informacijos ir numatyti tolimesni konkretūs šito darbo etapai.

Išvados

1. Standartiniai mielių *S. cerevisiae* ir *P. pastoris* kamienai nėra tinkami rekombinantinio tymų viruso hemagliutinino baltymo (TVH) raiškai. Šių mielių ląstelėse susintetintas tymų viruso hemagliutinino baltymas nėra tinkamai apdorojamas, todėl neįgyja natyviam baltymui būdingų savybių.
2. TVH glikobaltymo sintezė mielėse *S. cerevisiae* sukelia citoplazminį nesusivyniojusių baltymų stresą. Atsake į šį stresą mielių ląstelės padidina didžiųjų Hsp šeimos baltymų sintezę, o citoplazmoje suformuoja negrįžtamus baltyminius agregatus sudarytus iš TVH baltymo, mielių didžiųjų ir mažųjų Hsp šeimų baltymų bei transkripcijos elongacijos faktoriaus eEF1A.
3. Nustatyta, kad tymų viruso hemagliutinino raiška *S. cerevisiae* ląstelėse sutrinka ankstyvuosiuose sekrecijos kelio etapuose – pernešime į endoplazminį tinklą (ET) ir brendime endoplazminio tinklo ertmėje.
4. Darbo metu pasirinkta SRP, Sec61 kompleksų ir TRAM1 baltymų perkėlimo į mielių *S. cerevisiae* ląsteles strategija nesukuria efektyvaus ko-transliacinio TVH baltymo perkėlimo į endoplazminį tinklą mechanizmo. Parodyta, kad žmogaus baltymai selektyviai atpažįsta ir sugeba pernešti į ET dalį TVH baltymo.
5. Žmogaus ET šaperonas kalneksinas, sintetinamas mielių *S. cerevisiae* ląstelėje kartu su TVH baltymu, apsaugo dalį TVH glikobaltymo nuo agregacijos. Tirpus TVH baltymas neįgyja tinkamos konformacijos ir nėra aktyvus ar antigeniškas.
6. Žmogaus BiP/GRP78, kalretikulino, PDI ir ERp57 šaperonai neturi įtakos TVH baltymo brendimui mielių ląstelėse. Nustatyta, kad galima to priežastis – nevykstantis šių žmogaus šaperonų išlaikymas mielių ET ertmėje.
7. Sukurta efektyvi žmogaus BiP, kalretikulino ir ERp57 baltymų sintezės ir gryninimo sistema mielėse *S. cerevisiae*.

Mokslinių darbų sąrašas

Čiplys E, Samuel D, Juozapaitis M, Sasnauskas K, Slibinskas R. Overexpression of human virus surface glycoprotein precursors induces cytosolic unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2011 May 19;10:37.

Čiplys E, Sasnauskas K, Slibinskas R. Overexpression of human calnexin in yeast improves measles surface glycoprotein solubility. *FEMS Yeast Res*. 2011 Sep;11(6):514-23.

Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta konferencijoje stendinio pranešimo forma:

Slibinskas R, **Čiplys E**, Samuel D, Žvirblienė A, Sasnauskas K. Synthesis of human virus surface glycoproteins induces stress response in yeast cells. 2nd international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. 11.28–12.1 2007, Seville, Spain.

Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta konferencijose žodinių pranešimų forma:

Čiplys E, Sasnauskas K, Slibinskas R. Overexpression of human calnexin in yeast improves measles surface glycoprotein solubility. The 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular biology. 11-16 July, 2011, Olsztyn-Kortowo, Poland.

Slibinskas R, Sasnauskas K, **Čiplys E**. Coexpression of human calnexin rescues measles virus hemagglutinin glycoprotein from insolubility in the yeast expression system. 9th International Calreticulin Workshop. 29-31 August 2011, Statens Serum Institut (SSI), Copenhagen, Denmark.

Literatūros sąrašas

- Agarraberes FA, Dice JF. 2001. Protein translocation across membranes. *Biochim Biophys Acta* 1513:1-24.
- Ahn T, Yang S, Yun CH. 2004. High-level expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1(Hsp40). *Protein Expr Purif* 36:48-52.
- Amoros M, Estruch F. 2001. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol* 39:1523-1532.
- Angeletti PC, Walker D, Panganiban AT. 2002. Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell Stress Chaperones* 7:258-268.
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. 2008. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta* 1783:535-548.
- Ataide SF, Schmitz N, Shen K, Ke A, Shan So ir kt. 2011. The Crystal Structure of the Signal Recognition Particle in Complex with Its Receptor. *Science* 331:881-886.
- Ausubel FM, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl. 1999. Short protocols in molecular Biology. New York: Wiley.
- Barlowe C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1404:67-76.
- Barnett JA. 2003. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology* 149:557-567.
- Bartkevičiūtė D, Sasnauskas K. 2003. Studies of yeast *Kluyveromyces lactis* mutations conferring super-secretion of recombinant proteins. *Yeast* 20:1-11.
- Bartkevičiūtė D, Sasnauskas K. 2004. Disruption of the MNN10 gene enhances protein secretion in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 4:833-840.
- Becker T, Bhushan S, Jarasch A, Armache JP, Funes S ir kt. 2009. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* 326:1369-1373.
- Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. 2005. Cellular Functions of Endoplasmic Reticulum Chaperones Calreticulin, Calnexin, and ERp57. *International Review of Cytology* 245:91-121.
- Bolt G. 2001. The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperone expression. *Arch Virol* 146:2055-2068.
- Bonander N, Darby RA, Grgic L, Bora N, Wen J ir kt. 2009. Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. *Microb Cell Fact* 8:10.
- Boscheinen O, Lyck R, Queitsch C, Treuter E, Zimarino V ir kt. 1997. Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 255:322-331.
- Bouche FB, Ertl OT, Muller CP. 2002. Neutralizing B cell response in measles. *Viral Immunol* 15:451-471.
- Bowers K, Stevens TH. 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744:438-454.
- Braakman I, van Anken E. 2000. Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 1:533-539.
- Brown JD, Hann BC, Medzihradzky KF, Niwa M, Burlingame AL ir kt. 1994. Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *The EMBO journal* 13:4390-4400.
- Cabral CM, Liu Y, Moremen KW, Sifers RN. 2002. Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol Biol Cell* 13:2639-2650.

- Cai H, Wang CC, Tsou CL. 1994. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem* 269:24550-24552.
- Capitani M, Sallese M. 2009. The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 583:3863-3871.
- Casaregola S, Neuveglise C, Lepingle A, Bon E, Feynerol C ir kt. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett* 487:95-100.
- Chang MC, Keasling JD. 2006. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol* 2:674-681.
- Cho EY, Cheon SA, Kim H, Choo J, Lee DJ ir kt. 2010. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 149:1-7.
- Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH ir kt. 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5022-5027.
- Chuang SM, Chen L, Lambertson D, Anand M, Kinzy TG ir kt. 2005. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Mol Cell Biol* 25:403-413.
- Clemons WM, Jr., Menetret JF, Akey CW, Rapoport TA. 2004. Structural insight into the protein translocation channel. *Curr Opin Struct Biol* 14:390-396.
- Colf LA, Juo ZS, Garcia KC. 2007. Structure of the measles virus hemagglutinin. *Nature Structural & Molecular Biology* 14:1227-1228.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16:23-52.
- Čiplys E, Samuel D, Juozapaitis M, Sasnauskas K, Slibinskas R. 2011a. Overexpression of human virus surface glycoprotein precursors induces cytosolic unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 10:37.
- Čiplys E, Sasnauskas K, Slibinskas R. 2011b. Overexpression of human calnexin in yeast improves measles surface glycoprotein solubility. *FEMS Yeast Research* 11:514-523.
- D'Alessio C, Caramelo JJ, Parodi AJ. 2010. UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21:491-499.
- Dalley JA, Selkirk A, Pool MR. 2008. Access to ribosomal protein Rpl25p by the signal recognition particle is required for efficient cotranslational translocation. *Mol Biol Cell* 19:2876-2884.
- Dean N, Pelham HR. 1990. Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. *J Cell Biol* 111:369-377.
- Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. 2004. Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol* 14:217-229.
- Dieci G. 2001. Intragenic Promoter Adaptation and Facilitated RNA Polymerase III Recycling in the Transcription of SCR1, the 7SL RNA Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 277:6903-6914.
- Englert M, Felis M, Junker V, Beier H. 2004. Novel upstream and intragenic control elements for the RNA polymerase III-dependent transcription of human 7SL RNA genes. *Biochimie* 86:867-874.
- Erben ED, Daum S, Tellez-Inon MT. 2007. The *Trypanosoma cruzi* PIN1 gene encodes a parvulin peptidyl-prolyl cis/trans isomerase able to replace the essential ESS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* 153:186-193.
- Ertl OT, Wenz DC, Bouche FB, Berbers GA, Muller CP. 2003. Immunodominant domains of the Measles virus hemagglutinin protein eliciting a neutralizing human B cell response. *Arch Virol* 148:2195-2206.
- Falcone D, Henderson MP, Nieuwland H, Coughlan CM, Brodsky JL ir kt. 2011. Stability and function of the Sec61 translocation complex depends on the Sss1p tail-anchor sequence. *Biochem J* 436:291-303.
- Fermentas. 2010-2011. Catalog & Product Application Guide.

- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL. 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35:149-191.
- Freigassner M, Pichler H, Glieder A. 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories* 8:69.
- Galazka JM, Cate JH. 2011. A new diet for yeast to improve biofuel production. *Bioeng Bugs* 2:199-202.
- Ganatra MB, Vainauskas S, Hong JM, Taylor TE, Denson JP ir kt. 2011. A set of aspartyl protease-deficient strains for improved expression of heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 11:168-178.
- Geiler-Samerotte KA, Dion MF, Budnik BA, Wang SM, Hartl DL ir kt. 2011. Misfolded proteins impose a dosage-dependent fitness cost and trigger a cytosolic unfolded protein response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:680-685.
- Gellissen G, Hollenberg CP. 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene* 190:87-97.
- Gellissen G, Melber K. 1996. Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Arzneimittelforschung* 46:943-948.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L ir kt. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387-391.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B ir kt. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274:546, 563-547.
- Gorlich D, Rapoport TA. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75:615-630.
- Griffin DE. 2007. Measles virus. In "Fields Virology" (B N Fields, D M Knipe, and P M Howley) 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Gross SR, Kinzy TG. 2005. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nature Structural and Molecular Biology* 12:772-778.
- Grosshans H, Hurt E, Simos G. 2000. An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* 14:830-840.
- Grudnik P, Bange G, Sinning I. 2009. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biological Chemistry* 390:775-782.
- Guthrie C, Fink G. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 194:1-863.
- Haas IG, Wabl M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306:387-389.
- Halic M, Beckmann R. 2005. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology* 15:116-125.
- Hamilton SR, Gerngross TU. 2007. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology* 18:387-392.
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol* 4:8.
- Harmsen MM, Bruyne MI, Raue HA, Maat J. 1996. Overexpression of binding protein and disruption of the PMR1 gene synergistically stimulate secretion of bovine prochymosin but not plant thaumatin in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:365-370.
- Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K ir kt. 2007. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19535-19540.
- Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J ir kt. 2011. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nature Structural & Molecular Biology* 18:135-141.
- Hebert DN, Molinari M. 2007. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87:1377-1408.

- Helmers J. 2003. The α -Subunit of the Protein-conducting Channel of the Endoplasmic Reticulum Functions as the Guanine Nucleotide Exchange Factor for the β -Subunit of the Signal Recognition Particle Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278:23686-23690.
- Higgins DR, Cregg JM. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* 103:1-15.
- Hilleman MR. 1987. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection* 15:3-7.
- Holkeri H, Makarow M. 1998. Different degradation pathways for heterologous glycoproteins in yeast. *FEBS Lett* 429:162-166.
- Hong E, Davidson AR, Kaiser CA. 1996. A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol* 135:623-633.
- Hotokezaka Y, Tobben U, Hotokezaka H, Van Leyen K, Beatrix B ir kt. 2002. Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides. *J Biol Chem* 277:18545-18551.
- Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E. 1994a. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 5):1043-1052.
- Hu A, Kovamees J, Norrby E. 1994b. Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein. *Arch Virol* 136:239-253.
- Hu A, Norrby E. 1994. Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 9):2173-2181.
- Idiris A, Bi K, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y. 2006. Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast* 23:83-99.
- Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:403-417.
- Yokoyama N, Hirata M, Ohtsuka K, Nishiyama Y, Fujii K ir kt. 2000. Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1493:119-124.
- Jakob CA, Burda P, te Heesen S, Aebi M, Roth J. 1998. Genetic tailoring of N-linked oligosaccharides: the role of glucose residues in glycoprotein processing of *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Glycobiology* 8:155-164.
- James SA, O'Kelly MJT, Carter DM, Davey RP, van Oudenaarden A ir kt. 2009. Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome Research* 19:626-635.
- Janda CY, Li J, Oubridge C, Hernández H, Robinson CV ir kt. 2010. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465:507-510.
- Jarboe LR, Zhang X, Wang X, Moore JC, Shanmugam KT ir kt. 2010. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *J Biomed Biotechnol* 2010:761042.
- Jiang Y, Cheng Z, Mandon EC, Gilmore R. 2008. An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *The Journal of Cell Biology*.
- Johnson JD, Spellman JM, White KH, Barr KK, John TR. 2002. Human tryptophanyl-tRNA synthetase can efficiently complement the *Saccharomyces cerevisiae* homologue, Wrs1P. *FEMS Microbiol Lett* 216:111-115.
- Juozapaitis M, Zvirbliene A, Kucinskaite I, Sezaitė I, Slibinskas R ir kt. 2008. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 133:178-186.
- Kang HA, Kim JY, Ko SM, Park CS, Ryu DD ir kt. 1998. Cloning and characterization of the *Hansenula polymorpha* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* PMR1 gene. *Yeast* 14:1233-1240.
- Khan SU, Schröder M. 2008. Engineering of chaperone systems and of the unfolded protein response. *Cytotechnology* 57:207-231.

- Kidokoro M, Aoki A, Horiuchi K, Shida H. 2002. Large-scale preparation of biologically active measles virus haemagglutinin expressed by attenuated vaccinia virus vectors. In: *Microbes Infect.* France. p 1035-1044.
- Kitagawa T, Kohda K, Tokuhiko K, Hoshida H, Akada R et al. 2011. Identification of genes that enhance cellulase protein production in yeast. *J Biotechnol* 151:194-203.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.
- Kleizen B, Braakman I. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology* 16:343-349.
- Klepsch MM, Persson JO, de Gier JW. 2011. Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor, in *Escherichia coli*. In: *J Mol Biol.* England: 2011 Elsevier Ltd. p 532-542.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E et al. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 347:1645-1651.
- Krivoruchko A, Siewers V, Nielsen J. 2011. Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. *Biotechnol J* 6:262-276.
- Lamb RA, Kolakofsky D. 2007. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In "Fields Virology" (B N Fields, D M Knipe, and P M Howley) 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins:1:1449-1496.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Langedijk JP, Daus FJ, van Oirschot JT. 1997. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol* 71:6155-6167.
- Lee AS. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26:504-510.
- Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B et al. 2006. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 24:210-215.
- Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. 1997. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 272:30873-30879.
- Lu W, Ness JE, Xie W, Zhang X, Minshull J et al. 2010. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. *J Am Chem Soc* 132:15451-15455.
- Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY. 2010. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21:500-511.
- Maggioni C, Braakman I. 2005. Synthesis and quality control of viral membrane proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:175-198.
- Marciniak SJ, Ron D. 2006. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86:1133-1149.
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP. 2003. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 51:459-469.
- Martinet W, Saelens X, Deroo T, Neiryneck S, Contreras R et al. 1997. Protection of mice against a lethal influenza challenge by immunization with yeast-derived recombinant influenza neuraminidase. *Eur J Biochem* 247:332-338.
- Martinez-Alonso M, Garcia-Fruitos E, Ferrer-Miralles N, Rinas U, Villaverde A. 2010. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microb Cell Fact* 9:64.
- Martoglio B, Dobberstein B. 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8:410-415.
- Mason N, Ciuffo LF, Brown JD. 2000. Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *The EMBO journal* 19:4164-4174.

- McCormick PJ, Miao Y, Shao Y, Lin J, Johnson AE. 2003. Cotranslational protein integration into the ER membrane is mediated by the binding of nascent chains to translocon proteins. *Mol Cell* 12:329-341.
- Mehta A, Lu X, Block TM, Blumberg BS, Dwek RA. 1997. Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1822-1827.
- Metzger MB, Michaelis S. 2009. Analysis of quality control substrates in distinct cellular compartments reveals a unique role for Rpn4p in tolerating misfolded membrane proteins. *Mol Biol Cell* 20:1006-1019.
- Mironov AA, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Trucco A. 2005. Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochim Biophys Acta* 1744:340-350.
- Molinari M, Eriksson KK, Calanca V, Galli C, Cresswell P. 2004. Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol Cell* 13:125-135.
- Morjana NA, Gilbert HF. 1991. Effect of protein and peptide inhibitors on the activity of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 30:4985-4990.
- Moss WJ. 2009. Measles control and the prospect of eradication. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:173-189.
- Moss WJ, Griffin DE. 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4:900-908.
- Moss WJ, Griffin DE. 2011. Measles. *Lancet*.
- Muniz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H. 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148:925-930.
- Murray JW, Edmonds BT, Liu G, Condeelis J. 1996. Bundling of actin filaments by elongation factor 1 alpha inhibits polymerization at filament ends. *J Cell Biol* 135:1309-1321.
- Nannenga BL, Baneyx F. 2011. Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Sci*.
- Nasmyth K. 1978. Eukaryotic gene cloning and expression in yeast. *Nature* 274:741-743.
- Neumann H, Neumann-Staubitz P. 2010. Synthetic biology approaches in drug discovery and pharmaceutical biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:75-86.
- Nevoigt E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:379-412.
- Ng DT, Brown JD, Walter P. 1996. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134:269-278.
- Nickel W. 2010. Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 21:621-626.
- Norgaard P, Westphal V, Tachibana C, Alsoe L, Holst B. 2001. Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol* 152:553-562.
- Ogura H, Sato H, Kamiya S, Nakamura S. 1991. Glycosylation of measles virus haemagglutinin protein in infected cells. *J Gen Virol* 72 (Pt 11):2679-2684.
- Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:529-550.
- Pagano A, Letourneur F, Garcia-Estefania D, Carpentier JL, Orci L. 1999. Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274:7833-7840.
- Parlati F, Dominguez M, Bergeron JJ, Thomas DY. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* 270:244-253.
- Pearse BR, Hebert DN. 2010. Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1803:684-693.

- Petraitytė R, Tamosiunas PL, Juozapaitis M, Zvirbliene A, Sasnauskas K ir kt. 2009. Generation of Tioman virus nucleocapsid-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 145:92-96.
- Pfeffer SR. 2007. Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 76:629-645.
- Pieren M, Galli C, Denzel A, Molinari M. 2005. The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins. *J Biol Chem* 280:28265-28271.
- Puig A, Gilbert HF. 1994. Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme. *J Biol Chem* 269:25889-25896.
- Rapoport TA. 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450:663-669.
- Rapoport TA. 2008. Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS J* 275:4471-4478.
- Rapoport TA, Jungnickel B, Kutay U. 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65:271-303.
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL ir kt. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440:940-943.
- Roberts IN, Oliver SG. 2011. The yin and yang of yeast: biodiversity research and systems biology as complementary forces driving innovation in biotechnology. *Biotechnol Lett* 33:477-487.
- Romanos M, Scorer C, Sreekrishna K, Clare J. 1998. The generation of multicopy recombinant strains. *Methods Mol Biol* 103:55-72.
- Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE ir kt. 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* 58:133-145.
- Ruigrok RW, Gerlier D. 2007. Structure of the measles virus H glycoprotein sheds light on an efficient vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20639-20640.
- Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R. 2009. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136:272-283.
- Sakaguchi M. 1997. Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 8:595-601.
- Sakamoto S, Ide T, Tokiyoshi S, Nakao J, Hamada F ir kt. 1999. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine* 17:205-218.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Beard S, Zvirbliene A ir kt. 2002. High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation in mumps IgM serology. *J Med Virol* 66:123-130.
- Sanchez JC, Hochstrasser DF. 1999. High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112:227-233.
- Santiago C, Celma ML, Stehle T, Casasnovas JM. 2009. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to the CD46 receptor. *Nature Structural & Molecular Biology* 17:124-129.
- Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA ir kt. 2002. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* 45:308-317.
- Schagger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18:3091-3092.

- Schrodel A, de Marco A. 2005. Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochem* 6:10.
- Schroder M. 2007. Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnology Letters* 30:187-196.
- Sethuraman N, Stadheim TA. 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 17:341-346.
- Shamovsky I, Ivannikov M, Kandel ES, Gershon D, Nudler E. 2006. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* 440:556-560.
- Skach WR. 2007. The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *The Journal of Cell Biology* 179:1333-1335.
- Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Stanulis J, Sasnauskas K. 2004. Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 107:115-124.
- Smith RA, Duncan MJ, Moir DT. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 229:1219-1224.
- Sohn YS, Park CS, Lee SB, Ryu DD. 1998. Disruption of PMR1, encoding a Ca²⁺-ATPase homolog in *Yarrowia lipolytica*, affects secretion and processing of homologous and heterologous proteins. *J Bacteriol* 180:6736-6742.
- Springer S, Schekman R. 1998. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* 281:698-700.
- Uccelletti D, Farina F, Mancini P, Palleschi C. 2004. KIPMR1 inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol* 109:93-101.
- Ungar D. 2009. Golgi linked protein glycosylation and associated diseases. *Semin Cell Dev Biol* 20:762-769.
- Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298:347-350.
- van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA. 2003. Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 83:1-45.
- Vialard J, Lalumiere M, Vernet T, Briedis D, Alkhatib G ir kt. 1990. Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene. *J Virol* 64:37-50.
- Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E, Rapoport TA. 1996. Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134:25-35.
- Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS ir kt. 2007. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* 6:1527-1550.
- Walker JM. 2002. *The Protein Protocols, Handbook*. New Jersey: Humana Press.
- Walsh G. 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28:917-924.
- Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J. 2003. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem* 278:25970-25976.
- Westfall PJ, Gardner TS. 2011. Industrial fermentation of renewable diesel fuels. *Curr Opin Biotechnol*. 22(3):344-50.
- Wessel D, Flugge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141-143.
- Wieland F, Harter C. 1999. Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr Opin Cell Biol* 11:440-446.
- Wild K, Bange G, Bozkurt G, Segnitz B, Hendricks A ir kt. 2010. Structural insights into the assembly of the human and archaeal signal recognition particles. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66:295-303.
- Wildt S, Gerngross TU. 2005. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology* 3:119-128.

- Wilkinson B, Gilbert HF. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699:35-44.
- Willer M, Jermy AJ, Young BP, Stirling CJ. 2003. Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. *Yeast* 20:133-148.
- Williams DB. 2006. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 119:615-623.
- Wilson C, Gilmore R, Morrison T. 1987. Translation and membrane insertion of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *Mol Cell Biol* 7:1386-1392.
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K ir kt. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285:901-906.
- Wirth A, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J ir kt. 2003. The Sec61p Complex Is a Dynamic Precursor Activated Channel. *Molecular Cell* 12:261-268.
- Wunderlich K, Juozapaitis M, Ranadheera C, Kessler U, Martin A ir kt. 2011. Identification of high-affinity PB1-derived peptides with enhanced affinity to the PA protein of influenza A virus polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 55:696-702.
- Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M, Helms V. 2011. Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808:912-924.