

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos magistrantas

Andrius BURDULIS

Magistrinis darbas

**Dolicholio kinazės mutantų tyrimai mielėse *Saccharomyces cerevisiae***

**Darbo vadovė:**

Habil. Dr. Alma Gedvilaitė

Vilnius, 2022 m.

**Dolicholio kinazės mutantų tyrimai mielėse *Saccharomyces cerevisiae***

Magistro baigiamasis darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro  
Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje

Andrius Burdulis

\_\_\_\_\_

/parašas/

Darbo vadovė:

Habil. Dr. Alma Gedvilaitė

Leisti gintis: \_\_\_\_\_

/parašas/

Įrašo data: 2022-01-14

## TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	5
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	9
1.1 Baltymų glikozilinimas ir jo reikšmė.....	9
1.1.1 Glikozilinimo tipai .....	9
1.1.2 N-glikozilinimas.....	12
1.1.3 Baltymų glikozilinimas prokariotuose .....	16
1.2 Dolicholio kinazė ir dolicholio sintezė .....	17
1.2.1 Mielių <i>S. cerevisiae</i> DK ir <i>sec59-1</i> mutanto tyrimai.....	20
1.2.2 Mielių <i>K. lactis</i> MD2/1-9 mutanto tyrimai .....	21
1.2.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> DK tyrimai.....	23
1.2.4 Žmogaus DK tyrimai.....	24
1.3 Glikozilinimo reikšmė baltymų sekrecijos procesui .....	26
1.3.1 Glikozilinimo poveikio mielių baltymų sekrecijos efektyvumui tyrimai .....	27
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	30
2.1. Darbo metu naudoti bakterijų ir mielių kamienai .....	30
2.2. Darbo metu naudotos plazmidės .....	30
2.3. Plazmidžių konstravimas .....	31
2.4. Polimerazės grandininė reakcija .....	33
2.5. Kompetentinių <i>Escherichia coli</i> ląstelių paruošimas, transformacija ir plazmidinės DNR gryninimas.....	35
2.6. Kompetentinių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija .....	37
2.7. Plazmidinės DNR pašalinimas iš mielių ląstelių .....	38
2.8. Mielių ląstelių lizatų mėginių paruošimas NDS-PAGE .....	38
2.9. Mielių auginimo terpės mėginių paruošimas NDS-PAGE .....	39
2.10. Baltymų NDS-PAGE ir imunoblotingas.....	40
2.11. Mielių jautrumo tunikamicinui ir CFW tyrimas .....	41
2.12. $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo tyrimas .....	42
3. REZULTATAI.....	43
3.1. WGLD mutanto konstravimas .....	43
3.1.1 pFG-SnrSC-TARGS59 ir pJET-SEC59-WGLD plazmidžių konstravimas ir donorinės DNR paruošimas .....	44

3.1.2 Mielių transformacija ir WGLD mutantų atranka.....	46
3.2 CPY glikozilinimo efektyvumo analizė mielių <i>S. cerevisiae</i> DK mutantuose .....	48
3.3 DK mutantų jautrumo tunikamicinui ir CFW įvertinimas .....	49
3.4 Glikozilinimo sutrikimų poveikio rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui mielėse <i>S. cerevisiae</i> tyrimai.....	50
3.4.1 Pen-m4 sekrecijos efektyvumo nustatymas .....	51
3.4.3 Rekombinantinės KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumo analizė .....	53
3.4.4 $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo įvertinimas .....	54
3.5 DK E319K mutacijos įtakos mielių <i>S. cerevisiae</i> glikozilinimui tyrimai.....	56
3.5.1 E319K aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos įvedimas į BY4741 ir WSS kamienų DK geną.....	57
3.5.2 DK E319K mutacijos poveikio mielių <i>S. cerevisiae</i> CPY glikozilinimui ir jautrumui tunikamicinui bei CFW nustatymas .....	60
3.6 <i>S. cerevisiae</i> kamienų su <i>K. lactis</i> ir žmogaus DK genais konstravimas.....	61
3.6.1 CPY glikozilinimo efektyvumo ir jautrumo CFW bei tunikamicinui nustatymas <i>S. cerevisiae</i> kamienuose su pakeistais DK genais .....	64
3.7 Žmogaus DK mutacijų tyrimas mielėse <i>S. cerevisiae</i> .....	65
3.7.1 C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančių mutacijų įvedimas į <i>S. cerevisiae</i> BY-HS kamieno <i>DOLK</i> geną .....	65
3.7.2 Žmogaus DK C99S, W304C ir Y441S mutacijų įtakos mielių CPY glikozilinimo bei jautrumo tunikamicinui ir CFW įvertinimas .....	66
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	68
IŠVADOS .....	74
SANTRAUKA.....	75
SUMMARY.....	76
PADĖKA .....	77
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	78

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Alg – su asparaginu susieto glikozilinimo genai/baltymai (angl. asparagine linked glycosylation);  
CDG – įgimti glikozilinimo sutrikimai (angl. congenital disorder of glycosylation);  
CFW – fluorescuojantis „Calcofluor white“ dažas;  
CPY – karboksipeptidazė Y;  
crRNR – CRISPR RNR;  
DK – dolicholio kinazė;  
Dol-P-Glc – gliukozildolicholio fosfatas;  
Dol-PP – dolicholio pirofosfatas;  
Dol-P-Man – manozildolicholio fosfatas;  
EGIS – Eukariotų genų inžinerijos skyrius;  
ERAD – su ET susijęs baltymų degradacijos kelias (angl. ER-associated degradation);  
ET – endoplazminis tinklas;  
FPP – farnezildifosfatas;  
GalNAc – N-acetilgalaktozaminas;  
GDP-Man – manozilguanozino difosfatas;  
GK – Goldžio kompleksas;  
GlcNAc – N-acetilgliukozaminas;  
GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;  
GRAS – saugaus organizmo statusas (angl. generally recognized as safe);  
gRNR – gido RNR CRISPR-Cas9 sistemoje;  
IPP – izopentenildifosfatas;  
YEPD – mielių mitybinė terpė su gliukoze;  
LB – Luria-Bertani mitybinė terpė;  
LLO – su lipidu sujungtas oligosacharidas (angl. lipid-linked oligosaccharide);  
NANA – N-acetilneuramino rūgštis;  
NDS-PAGE – baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis;  
OST – oligosachariltransferazės kompleksas;  
PAA – poliakrilamidas;  
PGK1 - 3-fosfogliceratkinazė;

PPRD – poliprenolio reduktazė;  
PVDF – polivinilideno difluoridas;  
RE – restrikcijos endonukleazės;  
TDH2 – gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazė;  
tracrRNR – trans-aktyvuojanti CRISPR RNR (angl. trans-activating CRISPR RNA);  
UDP-GlcNAc – N-acetilgliukozaminuridino difosfatas;  
Undec-P – undekaprenolio fosfatas;  
UPR - nesulankstytų baltymų atsakas (angl. unfolded protein response).

## IVADAS

Baltymų glikozilinimas – tai fermentinis polisacharidų prijungimas prie baltymų aminorūgščių. Glikozilinimo metų prie baltymų prijungiami glikanai yra reikalingi tinkamam jų susilankstymui, aktyvumui, stabilumui, sąveikoms su receptoriais. Glikoproteinai ląstelėse taip pat atlieka struktūrinę bei signalų perdavimo funkciją, yra svarbūs tarpląstelinėms sąveikoms. (Aebi, 2013; Krištić ir Lauc, 2017). Kertiniai baltymų glikozilinimo ir sekrecijos etapai yra panašūs tiek vienašachiuose, tiek aukštesniuose eukariotuose, todėl lengvai kultivuojamos ir genetiškai modifikuojamos mielės yra puiki modelinė sistema šių procesų tyrimams. Mielių baltymų sekrecijos ir glikozilinimo tyrimai yra svarbūs tiek norint daugiau sužinoti apie šių procesų mechanizmus aukštesniuose eukariotuose, tiek kuriant ypač dideliu baltymų sekrecijos efektyvumu pasižyminčius mielių kamienus (Mattanovich et al., 2012).

Šiame darbe tyrinėjama dolicholio kinazė (DK) veikia endoplazminio tinklo (ET) membranoje, o jos sintetinamas dolicholio fosfatas (Dol-P) yra svarbus ne tik kaip lipidinis nešiklis, ant kurio yra surenkamas šerdinis N-glikanas, bet ir kaip monosacharidų donoras, kurio pagalba į ET vidų yra pernešama gliukozė ir manozė, reikalingos N-, O- ir GPI-glikozilinimo reakcijoms (Orlean, 1992). Mielėse *Saccharomyces cerevisiae* dolicholio kinazę koduoja esminis *SEC59* genas, o sąlyginio šių mielių *sec59-1* mutanto, pasižyminčio sumažėjusiu DK aktyvumu tyrimai, leido atskleisti baltymų glikozilinimo svarbą mielių ląstelės sienelės sintezei, lipidų homeostazei, ET baltymų kokybės kontrolei ir rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui (Orłowski et al., 2007; William James et al., 2019). *sec59-1* mutanto glikozilinimo sutrikimų komplementacijos tyrimai taip pat leido parodyti žmogaus ir *Arabidopsis thaliana* DK gebėjimą atlikti *S. cerevisiae* DK funkciją (Fernandez et al., 2002; Kanehara et al., 2015).

Iš paskelbtų tyrimų duomenų nėra iki galo aišku, kuri – W332G ar G420D DK aminorūgščių mutacija yra atsakinga už sąlyginio *sec59-1* mutanto fenotipą (Orłowski et al., 2007; Shridas ir Waechter, 2006). Šis mutantas pasižymi sumažėjusiu endogeninės karboksipeptidazės Y (CPY) ir invertazės sekrecijos efektyvumu (Bernstein et al., 1989). Tuo tarpu *Kluyveromyces lactis* WSS mutantas su DK G405S ir I419S mutacijomis, nors ir pasižymėjo šiek tiek sumažėjusiu invertazės sekrecijos efektyvumu, tačiau net apie 2,5 karto efektyviau sekretavo rekombinantinę  $\alpha$ -amilazę, KEX2 peptidazę ir žmogaus augimo hormoną (Žiogienė et al., 2019).

Norint geriau suprasti baltymų glikozilinimo poveikį mielėse vykstantiems procesams, šio darbo metu buvo ištirtas *S. cerevisiae* DK mutacijų poveikis mielių ląstelės sienelės struktūrai ir CPY glikozilinimo bei rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui. Palyginimui rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumas buvo ištirtas ir neesmines glikoziltransferazes koduojančių *ALG* bei *OST5* genų nuliniuose mutantuose su glikozilinimo defektais. Be to, panaudojus CRISPR-Cas9 sistemą *S. cerevisiae* DK genas buvo pakeistas žmogaus ir *K. lactis* DK genais taip parodant jų gebėjimą atlikti *S. cerevisiae* DK funkcijas ne tik sąlyginuose mutantuose. Sukurtas mielių *S. cerevisiae* kamienas su žmogaus DK genu buvo išbandytas ir tiriant plataus spektro fenotipinius sutrikimus sukeliančių žmogaus DK mutacijų poveikį glikozilinimo procesams.

### **Darbo tikslas:**

Ištirti mielių *S. cerevisiae* *SEC59* geno mutacijų ir neesminių *ALG* bei *OST5* genų pašalinimo poveikį mielių glikozilinimo ir rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui bei įvertinti mielių *K. lactis* ir žmogaus DK gebėjimą atlikti mielių *S. cerevisiae* DK funkcijas.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Sukonstruoti mielių *S. cerevisiae* WGLD mutantus su DK G420D mutacija ir palyginti jų bei GGL, WSL, WGS ir WSS *sec59* mutantų CPY glikozilinimo efektyvumo ir ląstelės sienelės struktūros pokyčius.
2. Įvertinti rekombinantinės  $\alpha$ -amilazės, Pen-m4 alergeno ir KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumą mielių *S. cerevisiae* *sec59*,  $\Delta alg3$ ,  $\Delta alg5$ ,  $\Delta alg6$ ,  $\Delta alg8$ ,  $\Delta alg9$ ,  $\Delta alg12$  bei  $\Delta ost5$  mutantuose.
3. Ištirti DK E319K mutacijos poveikį *S. cerevisiae* BY4741 ir WSS kamienų CPY glikozilinimo efektyvumui bei ląstelės sienelės struktūrai.
4. Sukurti mielių *S. cerevisiae* kamienus su *K. lactis* ir žmogaus DK genais bei ištirti jų gebėjimą atlikti *S. cerevisiae* DK funkcijas įvertinant CPY glikozilinimo bei ląstelės sienelės struktūros pokyčius.
5. Į žmogaus DK geną, esantį mielėse *S. cerevisiae*, įvesti C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančias mutacijas ir ištirti jų poveikį mielių CPY glikozilinimo efektyvumui bei ląstelės sienelės struktūrai



# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Baltymų glikozilinimas ir jo reikšmė

Baltymų glikozilinimas – tai fermentinis polisacharidų, dar vadinamų glikanais, prijungimas prie baltymų aminorūgščių. Tai viena labiausiai paplitusių ir didžiausia įvairove pasižyminčių kotransliacinių ir potransliacinių baltymų modifikacijų eukariotuose – glikozilinti baltymai sudaro maždaug pusę jų proteomo (Apweiler et al., 1999). Toks didelis glikoproteinų paplitimas ir evoliucinis konservatyvumas rodo jų svarbą biologiniams procesams: prie baltymų prijungti glikanai yra būtini jų aktyvumui bei tinkamam susilankstymui, didina baltymų stabilumą ir gyvavimo trukmę, jie reikalingi baltymų sąveikoms su receptoriais. Glikoproteinai taip pat yra svarbus ląstelės sienelės struktūrinis komponentas, būtinas jos integralumo palaikymui (Krištić ir Lauc, 2017). Svarbu paminėti, kad baltymo glikano struktūra nėra užkoduota DNR sekoje – jie susintetinami per eilę fermentinių reakcijų, kurių metu monosacharidai yra perkeliama nuo vienos molekulės ant kitos, o šios reakcijos yra griežtai reguliuojamos. Yra žinoma, kad apie 1-2 % žinduolių genų koduoja glikoziltransferazes, glikozidazes, cukrų transporterius ir kitus baltymus, atsakingus už glikanų produkciją, modifikacijas, atpažinimą ir katabolizmą. Visgi, su šiais procesais susiejant vis naujus genus yra manoma, kad glikozilinimui reikalingus baltymus ir jų reguliatorius gali koduoti iki 5 % žinduolių genomo, o šių genų mutacijos lemia plataus spektro ląstelinių procesų pokyčius. Be to, daugėja duomenų ir apie epigenetinės reguliacijos svarbą glikozilinimo procesų kontrolei (Freeze ir Ng, 2011; Krištić et al., 2015; Lowe ir Marth, 2003). Nors ilgą laiką buvo manoma, kad glikozilinimas yra tik eukariotams būdinga baltymų modifikacija, glikozilinti baltymai taip pat buvo aptikti ir archėjose bei bakterijose, nors dėl didelės prokariotų glikoproteinų įvairovės, jie dar nėra išsamiai apibūdinti ir nėra tiksliai nustatyta, kokią jų proteomo dalį sudaro glikozilinti baltymai (Eichler ir Koomey, 2017).

### 1.1.1 Glikozilinimo tipai

Baltymų glikozilinimas vyksta ir eukariotuose, ir prokariotuose, tačiau glikanai prie baltymų gali būti prijungti daugiau nei vienu būdu. Šiuo metu yra išskirti 5 glikozilinimo tipai, aptinkami skirtinguose organizmuose: N-glikozilinimas, O-glikozilinimas, C-manozilinimas,

fosfoglikozilinimas ir glikozilfosfatidilinozitolinio (GPI) inkaro prijungimas prie baltymų. Mielių ląstelėse yra aptinkami N- ir O-glikozilinti baltymai, bei baltymai su prijungtu GPI inkaru, kai tuo tarpu žinduoliuose ir kituose aukštesniuose eukariotuose be šių glikozilinimo tipų vyksta ir C-manozilinimas. Bakterijose ir archėjose taip pat vyksta N- ir O-glikozilinimas, o fosfoglikozilinti baltymai iki šiol buvo aptikti tik protistuose (Spiro, 2002).

Žinduolių O-glikanai yra labai kompleksiški, kadangi juose O-glikozilinimo metu prie baltymų serino arba treonino šoninės hidroksilo grupės deguonies atomo yra prijungiami įvairūs monosacharidai. Jų endoplazminiame tinkle (ET) ir Goldžio komplekse (GK) prie baltymų yra prijungiama fukozė, gliukozė, manozė, galaktozė, ksilozė ir N-acetilgliukozaminas (GlcNAc). Vis dėlto žinduoliuose labiausiai paplitęs yra O-glikozilinimas, kurio metu prie baltymų yra prijungiamos N-acetilgalaktozamino (GalNAc) liekanos. Nustatyta, kad pirmąjį šios modifikacijos žingsnį gali atlikti daugiau nei 20 žinduolių GK veikiančių GalNAc-transferazių, pasižyminčių unikaliu, bet persidengiančiu specifiskumu substratams. Šis glikozilinimo tipas dar vadinamas mucinų tipo O-glikoziliniu, dėl jo metu susidarančių smarkiai glikozilintų mucinų (Magalhães et al., 2021). Nors O-glikozilinti baltymai aptinkami visų eukariotų ląstelėse, šio glikozilinimo tipo mechanizmai žinduoliuose ir vienląsčiuose grybuose smarkiai skiriasi. Mielėse *S. cerevisiae* O-glikozilinimas pradedamas, kuomet manozė nuo ET membranoje esančio manozildolicholio fosfato (Dol-P-Man) yra perkeliama ant baltymų veikiant Pmp1-Pmp6 O-manoziltransferazėms. Šios šeimos baltymai formuoja kompleksus ir pasižymi specifiskumu tam tikriems baltymams. Vėliau glikanas yra ilginamas GK prijungiant papildomas manozės liekanas, o kitose mielių rūšyse (pvz. *Schizosaccharomyces pombe*) prie glikanų yra prijungiamos ir galaktozės liekanos (Gemmill ir Trimble, 1999; Jigami, 2008). Buvo parodyta, kad netinkamai sulankstytų baltymų O-manozilinimas mielėms yra reikalingas sumažinti ET stresą. Netinkamai sulankstyti baltymai, kurie nebuvo pašalinti per su ET susijusį baltymų degradacijos kelią (ERAD, angl. ER-associated degradation) lieka ET, o netinkamai sulankstytų ir netirpių baltymų agregatai kartais būna ne tik neaktyvūs, bet ir toksiški ląstelėms. Tokių baltymų tirpumas didinamas įvairių ET šaperonų pagalba - jie uždengia hidrofobinius baltymų paviršius ir taip stabdo jų agregaciją. Buvo parodyta, kad hidrofilinių O-glikanų prijungimas prie netinkamai sulankstytų baltymų taip pat skatina jų tirpumą, o nesulankstytų baltymų atsako (UPR, angl. unfolded protein response) metu padidėja *PMT1-PMT4* O-manoziltransferazių transkripcijos efektyvumas. Manoma, kad O-manozilinimas padeda sumažinti ERAD kelią

užplūdusių netinkamai sulankstytų baltymų kiekį ir taip sumažina ET šaperonų poreikį ir ET stresą (Nakatsukasa et al., 2004). Nors O-manozilinimas ilgą laiką buvo laikomas mielėms specifiniu glikozilinimo tipu, O-manozilinti baltymai taip pat buvo atrasti ir žinduoliuose. Mažai to, buvo parodyta, kad kadherinai yra ypač smarkiai ir konservatyviai O-manozilinti baltymai, o E-kadherinų O-manozilinimas yra būtinas ląstelių adheziniams savybėms – O-manozilinimo blokavimas sustabdė pelės embrionų vystymąsi iš morulės į blastocistos stadiją dėl pakitusių ląstelių tarpusavio kontaktų vietų (Lommel et al., 2013). Prokariotuose taip pat buvo aptikti O-glikozilinti baltymai, o šis glikozilinimo tipas ypač paplitęs tarp Gram-teigiamų bakterijų. (Li et al., 2017).

Baltymai yra glikozilinami ir prie jų prijungiant glikofosfolipidą – GPI inkarą. GPI-glikozilinimas vyksta ET, kur GPI inkaras yra susintetinamas, ir tik tuomet perkeliamas ant baltymo, o ne palaipsniui ant jo surenkamas. Pirmiausia prie ET membranos citoplazminėje dalyje esančio fosfatidilinozitolio yra prijungiamas GlcNAc, kuris vėliau yra deacetilinamas, o susintetintas gliukozamin-fosfoinozitolis yra perverčiamas į ET vidinę pusę. Tuomet prie besiformuojančio GPI inkaro yra prijungiamos 3-4 manozės liekanos, kurių donoras yra ET membranoje esantis Dol-P-Man, o prie manozių yra prijungiamos trys fosfoetanolamino grupės. Susintetintą GPI inkarą prie baltymų C-galinės aminorūgšties prijungia GPI transamidazės kompleksas. GPI-glikozilinami baltymai savo C-gale turi 20-30 aminorūgščių ilgio signalinį peptidą, kurį šis kompleksas atpažįsta ir nukerpa, o vietoje jo prie baltymo prijungia GPI inkarą per vieną iš fosfoetanolaminų. Vėliau baltymas su GPI inkaru yra pernešamas į GK, kur toliau bręsta – prie GPI inkaro gali būti prijungiamos galaktozės, GalNAc ir sialo rūgšties liekanos, o glikoproteinas su subrendusiu GPI inkaru yra įterpiamas į ląstelės plazminę membraną. GPI inkarą turi daugiau nei 150 žmogaus baltymų, kurie atlieka įvairių fermentų, adhezinių molekulių, receptorių ir transporterių funkcijas (Gómez-Gaviria et al., 2021; Kinoshita, 2020). GPI-glikozilinti baltymai sudaro daugiau nei pusę mielių ląstelės sienelėje randamų baltymų ir yra reikalingi jos struktūros palaikymui bei mielių augimui – fosfatidilinozitolio nesintetinantis *S. cerevisiae gpi1* mutantas augo blogiau, nei laukinio tipo ląstelės (Leidich et al., 1994).

C-manozilinti baltymai arba jų gamybai reikalinga C-manoziltransferazė iki šiol buvo aptikta tik *Caenorhabditis elegans*, paukščiuose, augaluose, varliagyviuose ir žinduoliuose, bet ne vienaląsčiuose organizmuose. Vykstant C-manozilinimui, prie baltymų triptofano pirolo žiedo kovalentiniu ryšiu tarp dviejų anglies atomų yra prijungiama viena manozės molekulės ir

glikanas nebėra toliau modifikuojamas. Šis glikozilinimas vyksta ląstelių ET membranoje, o manozės donoras yra Dol-P-Man. Nors yra žinoma, kad sekretuojami baltymai yra gausiausiai C-manoziliniami ir manoma, kad ši modifikacija skatina tinkamą baltymų susilankstymą, o prie triptofano šoninių grandinių prijungti cukrūs gali mažinti baltymų hidrofobiškumą ir būti svarbūs įvairioms tarpmolekulinėms sąveikoms, C-manozilinimas ir jo reikšmė dar nėra gerai ištyrinėti (Crine ir Acharya, 2021; Ihara et al., 2014). Visgi, yra tyrimų, kuriuose parodyta, kad C-manozil triptofanas gali būti naudojamas kaip biožymuo, padedantis diagnozuoti kiaušidžių vėžį ankstyvoje stadijoje, o lėtiniu inkstų nepakankamumu sergančių pacientų šlapimo mėginiuose C-manozil triptofano kiekiai buvo ženkliai padidėję (Iwahashi et al., 2020; Sekula et al., 2017).

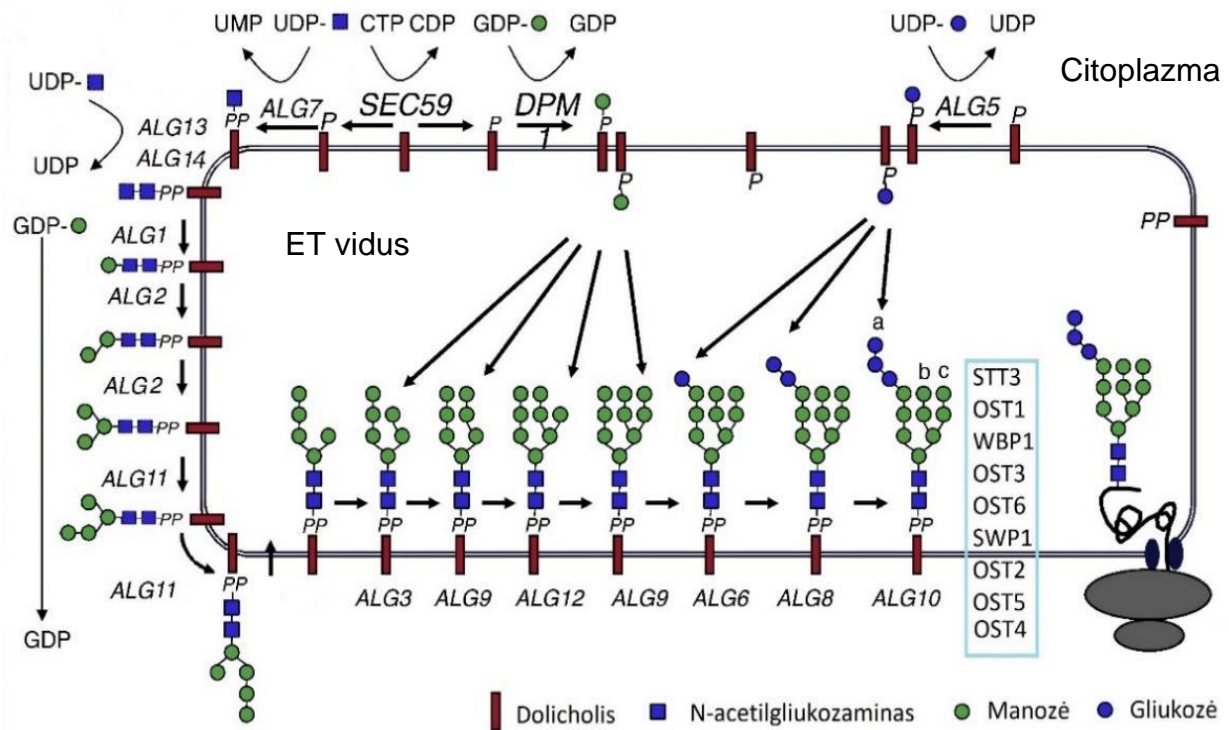
Fosfoglikozilinimo metu prie baltymų serino arba treonino aminorūgščių fosfodiesteriniu ryšiu yra prijungiamos GlcNAc, manozės, ksilozės ir fukozės molekulės. Šis glikozilinimo tipas iki šiol buvo aprašytas tik parazituose (*Leishmania* ir *Trypanosoma*) ir gleiviniuose pelėsiuose (*Dictyostelium*; Haynes, 1998). Fosfoglikozilinimas yra dažniausia baltymų modifikacija *Leishmania*, o jo metu susintetinti fosfoglikanai padeda parazitui išvengti šeimininko imuninės sistemos ir yra svarbūs jo išgyvenimui muselių žarnyne (Sacks et al., 2000).

### 1.1.2 N-glikozilinimas

N-glikozilinimas yra plačiausiai paplitęs glikozilinimo tipas. N-glikozilinti baltymai buvo aptikti visų karalysčių organizmų ląstelėse ir net 90 % visų žmogaus glikoproteinų yra N-glikozilinti (Apweiler et al., 1999). Nors N-glikozilinimo metu glikanai dažniausiai yra prijungiami prie baltymų asparagino amido grupės azoto atomo, pastaruoju metu vis dažniau pranešama apie aptiktas N-glikozilintas arginino aminorūgštis. Buvo parodyta, kad kai kurie bakterijų III tipo sekrecijos sistemos efektoriai pasižymi arginino N-glikoziltransferaziniu aktyvumu ir prijungia GlcNAc prie konservatyvių arginino aminorūgščių baltymų mirties domenuose (pvz. TRADD, FADD), taip slopindami šeimininko ląstelių mirtį (Araujo-garrido et al., 2020; Li et al., 2013). Visuose eukariotuose vykstantys pirminiai N-glikozilinimo etapai yra labai konservatyvūs: šerdinis  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  oligosacharidas yra surenkamas ant ET membranoje esančio lipidinio nešiklio, o susintetintas glikanas yra perkeliamas ant baltymo asparagino aminorūgščių ET viduje. Vėliau glikozilintas baltymas yra pernešamas į GK ir ten toliau modifikuojamas. Šiame etape išryškėja N-glikozilinimo skirtumai tarp mielių ir aukštesniųjų eukariotų – skirtingų organizmų ląstelėse prie baltymų glikanų yra prijungiami

skirtingi monosacharidai, taip suformuojant kompleksiškus ir specifines struktūras turinčius glikoproteinus. Iš GK subrendę glikoproteinai yra transportuojami į jiems skirtas vietas ląstelėje, arba iš jos sekretuojami (Aebi, 2013).

Baltymų N-glikozilinimas pradedamas nuo su lipidu sujungto oligosacharido (LLO, angl. lipid-linked oligosaccharide) sintezės: ET tinklo membranoje esantis lipidinis nešiklis dolicholis yra fosforilinamas dolicholio kinazės (DK), o ant susintetinto dolicholio fosfato (Dol-P) Alg (su asparaginu susieto glikozilinimo, angl. asparagine linked glycosylation) šeimos glikoziltransferazės palaipsniui prijungia 14 monosacharidų. Pirmieji 7 monosacharidai prie Dol-P yra prijungiami citoplazminėje ET pusėje nuo N-acetilgliukozaminuridino difosfato (UDP-GlcNAc) ir manozilguanozino difosfato (GDP-Man). Pirmiausia Alg7 glikoziltransferazė prie Dol-P prijungia GlcNAc-P, o ant susintetinto N-acetilgliukozamindolicholio pirofosfato Alg13/Alg14 glikoziltransferazių kompleksas prijungia antrą GlcNAc liekaną. Vėliau LLO yra modifikuojamas Alg1, Alg2 ir Alg11 glikoziltransferazių, kurios prie glikano palaipsniui prijungia 5 manozės liekanas, kol suformuojamas galutinis citoplazminės LLO sintezės produktas – šakotas Dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> lipopolisacharidas (Welti, 2013; Aebi, 2013; 1.1 pav.). Antrasis LLO sintezės etapas vyksta vidinėje ET dalyje ir tam citoplazminėje pusėje susintetintas glikanas turi būti pernešamas į ET vidų. Iki šiol buvo manoma, kad LLO pernašą per ET membraną atlieką Rft1 flipazė, tačiau vėliau buvo parodyta, kad šis baltymas tiesiogiai nedalyvauja glikano transporte, bet galimai veikia kaip šaperonas, padedantis nežinomoms flipazėms pasiekti Dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, arba stabdantis jo agregaciją (Jelk et al., 2013). Taip pat buvo parodyta, kad Rft1p yra svarbus ne tik N-glikozilinimui, bet ir GPI inkaro brendimui ir buvo aptiktas ne tik eukariotų ET, bet ir GK (Gottier et al., 2017). ET viduje Alg3, Alg9 ir Alg12 glikoziltransferazės prie LLO prijungia dar keturias manozes, o šerdinio glikano sintezę užbaigia Alg6, Alg9 ir Alg10 glikoziltransferazės, prijungdamos 3 gliukozės liekanas. Monosacharidų donoriai šioms reakcijoms yra ET membranoje esantys Dol-P-Man ir gliukozildolicholio fosfatas (Dol-P-Glc). Jie susintetinami veikiant ET membranoje esančioms Dpm1 ir Alg5 transferazėms, kurios perkelia manozės ir gliukozės liekanas ant Dol-P atitinkamai, o monosacharidai vėliau yra pernešami į ET vidų (Aebi, 2013; 1.1 pav.). ET išorėje veikiančias glikoziltransferazes bei Dpm1 koduojantys genai yra esminiai ir jų nuliniai mielių mutantai yra negyvybingi, tačiau ET viduje veikiančių glikoziltransferazių bei *ALG5* genai gali būti pašalinti (Giaever et al., 2002).



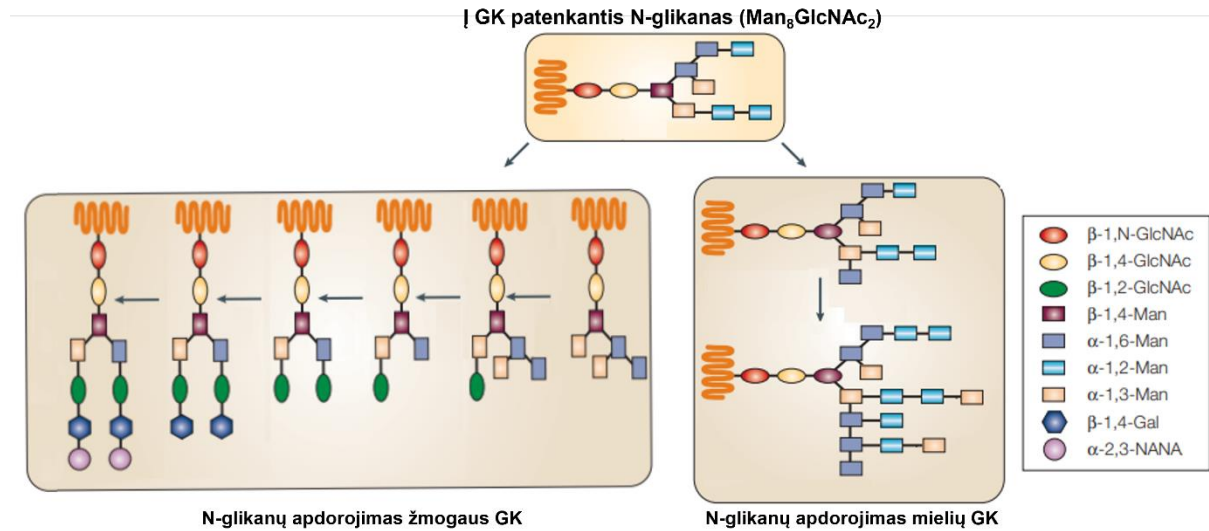
### 1.1 pav. Baltymų N-glikozilinimo mielių ET schema

Citoplazminėje ET membranos pusėje esantis dolicholis yra fosforilinamas DK (*SEC59*), o ant susintetinto Dol-P Alg šeimos glikoziltransferazės perkelia 7 monosacharidus nuo UDP-GlcNAc ir GDP-Man. Dol-PP-Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> LLO yra perkeliama į vidinę ET pusę, kur prie jo yra prijungiami dar 7 monosacharidai nuo Dol-P-Man ir Dol-P-Glc (jų sintezę atlieka Alg5 ir Dpm1 baltymai, kurie prie Dol-P prijungia monosacharidus nuo GDP-Man ir UDP-Glc atitinkamai). Vėliau šerdinis Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> glikanas yra perkeliama ant baltymo OST komplekso (redaguota pagal Aebi, 2013).

ET vidinėje pusėje susintetintas Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> šerdinis oligosacharidas yra perkeliama ant baltymo veikiant oligosachariltransferazės (OST) kompleksui (1.1 pav.). OST kompleksas atpažįsta baltymuose esanti Asn-X-Ser/Thr motyvą ir perkelia susintetintą glikaną nuo dolicholio pirofosfato (Dol-PP) ant motyve esančio asparagino šoninės grupės amido azoto atomo. Šiame motyve X gali būti bet kuri aminorūgštis, išskyrus proliną, kadangi glikozilinimo metu motyvas suformuoja beveik 180° kilpą, o prolinas trukdytų tokios konformacijos susidarymui (Lizak et al., 2011). Mielių OST kompleksas yra sudarytas iš 8 subvienetų – Stt3, Swp1, Wbp1, Ost1, Ost2, Ost4, Ost5 ir Ost3, tačiau mielių OST turi dvi izoformas, vienoje iš jų vietoje Ost3 yra aptinkamas Ost6 subvienetas. Tik pirmi penki OST komplekso subvienetai yra būtini mielių ląstelių gyvybingumui, o *OST4*, *OST5* ir *OST6/OST3* genai nėra esminiai.

Nustatyta, kad katalitinis OST komplekso subvienetas yra būtent Stt3, kuriame esantis konservatyvus WWDYG motyvas prisijungia prie Ser/Thr hidroksilo grupės, o  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  yra perkeliamas ant baltymo asparagino. Kiti OST subvienetai yra reikalingi sąveikai su substratais arba komplekso stabilumo užtikrinimui (Wild et al., 2018). Ant baltymo perkeltas glikanas pirmiausia yra toliau modifikuojamas ET. Triglikozilinta proteoglikano forma egzistuoja tik kelias sekundes ir viena gliukozė yra greitai pašalinama nuo šerdinio glikano ET veikiančios gliukozidazės I. Vėliau gliukozidazė II pašalina dar vieną gliukozės liekaną o prie  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  glikano prisijungia ET šaperonai kalneksinas ir kalrektikulinas, kurie yra svarbūs tinkamam baltymo susilankstymui. Tuomet gliukozidazė II pašalina paskutinę gliukozės liekaną. Nuo glikano taip pat yra pašalinama bent viena manozės liekana, o glikozilintas baltymas supakuojamas į COPII baltymais padengtas pūsleles ir transportuojamas į GK (Aebi et al., 2010).

Į GK patekę proteoglikanai yra skirtingai modifikuojami mielių ir žinduolių ląstelėse (1.2 pav.). Žinduolių GK glikanai yra apdorojami manozidazių, kurios pašalina kelias manozės liekanas, o vėliau glikanai yra modifikuojami įvairių glikozidazių ir glikoziltransferazių – prie jų gali būti prijungiamas fukozė, galaktozė ir GlcNAc, kol galiausiai glikanų apdorojimas baigiamas prie jų prijungiant N-acetilneuramino rūgštį (NANA). Taip yra susintetinami labai kompleksiški ir įvairūs glikozilinti baltymai, kurių glikanų skirtumai leidžia jiems atlikti skirtingas funkcijas ląstelėje. Tačiau į GK patekę N-glikozilinti baltymai gali būti ir neapdorjami, o iškart įkomponuojami į ląstelės sienelę, arba sekretuojami iš ląstelės (Fisher et al., 2019; Stanley, 2011). Mielėse, skirtingai nei žinduoliuose, į GK patekę proteoglikanai yra smarkiai manozilinami. Pirmiausia *cis*-GK esanti Och1 manoziltransferazė prie  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  polisacharido prijungia vieną manozės liekaną, o toliau yra suformuojama viena iš dviejų glikanų struktūrų. Šerdinio tipo glikanas suformuojamas prie  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  oligosacharido prijungiant 4 manozės liekanas, tokios glikanų struktūros yra būdingos viduląsteliniams mielių baltymams, pvz. karboksipeptidazei Y (CPY). Mielėse taip pat yra sintetinama šakota, hipermanozilinta glikanų struktūra, turinti daugiau nei 200 manozės liekanų. Tokie glikanai būdingi mielių ląstelės sienelėje arba periplazminėje ertmėje esantiems glikozilintiems baltymams. Įdomu, kad dalis šioje struktūroje esančių manozių mielėse *S. cerevisiae* turi prijungtus fosfatus, kurie suteikia mielių sienelės glikanų karkasui neigiamą krūvį (Bieberich, 2014; Jigami, 2008).



**1.2 pav. N-glikozilintų baltymų, patekusių į žmogaus ir mielių GK apdorojimo schema**  
 Iš ET baltymai su prijungtu Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> glikanu yra pernešami į GK, kur jie yra skirtingai apdorojami mielių ir žmogaus ląstelėse. Žmonių GK (kairėje) glikanai yra apdorojami manozidazių, o pašalinus manozes prie glikanų prijungiami įvairūs monosacharidai (GlcNAc, galaktozė, fukozė), o glikano sintezė užbaigiama prijungiant NANA. Mielių GK (dešinėje) glikanai yra apdorojami manoziltransferazių, kol gaunami gausiai hipermanozilinti glikoproteinai (redaguota pagal Wildt ir Gerngross, 2005).

### 1.1.3 Baltymų glikozilinimas prokariotuose

Baltymų glikozilinimas yra būdingas visiems gyviems organizmams ir daugelis šiuose procesuose dalyvaujančių baltymų ir mechanizmų yra konservatyvūs tiek eukariotuose, tiek ir bakterijose bei archėjose. Visgi, prokariotuose vykstantiems N- ir O-glikozilinimo procesams taip pat būdingi ir tam tikri skirtumai. Didžioji dalis prokariotinių glikoproteinų yra pilnai, flagelinai, ląstelės paviršiaus ir sekretuojami baltymai, svarbūs bioplėvelių formavimui. Bakterijose baltymų glikozilinimas taip pat glaudžiai susijęs su jų patogeniškumu (Schäffer et al., 2017).

Visų karalysčių organizmuose vykstantys N-glikozilinimo procesai prasideda nuo LLO sintezės. Nors archėjose ir eukariotuose lipidinę LLO dalį sudaro dolicholis, bakterijos naudoja undekaprenolį. Šio junginio karkaso sintezę bakterijose, panašiai kaip ir dolicholio sintezę eukariotuose, atlieka įvairios *cis*- ir *trans*-preniltransferazės. Galiausiai susintetintas undekaprenolio fosfatas (Undec-P) atlieka Dol-P vaidmenį bakterijose. Eukariotuose Dol-P susintetinamas DK fosforilinant dolicholį, tačiau Undec-P sintezės kelyje pirmiausia yra susintetinamas undekaprenolio pirofosfatas, kuris vėliau yra defosforilinamas fosfatazių, nors



keliose bakterijų rūšyse taip pat buvo aptikti ir undekaprenolio kinazės aktyvumu pasižymintys fermentai (TouzÉ ir Mengin-Lecreulx, 2008). Archėjos, kaip ir eukariotai, LLO sintezei naudoja Dol-P, visgi, atlikus DK homologų paiešką archėjose jie buvo aptikti tik keliose jų rūšyse, taigi yra manoma, kad Dol-P sintezę katalizuojantys fermentai archėjose ir eukariotuose gali skirtis (Eichler ir Guan, 2017).

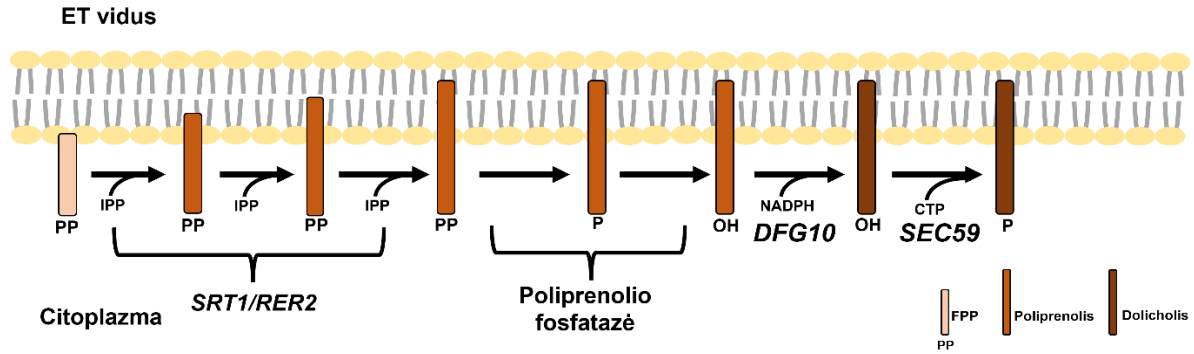
Kadangi bakterijos neturi eukariotams būdingų vidinių ET membranų sistemų, jose šerdiniai glikanai yra surenkami ant periplazminėje membranoje esančio Undec-P ir vėliau flipazių yra perkeliama iš citoplazminės dalies į periplazminę ertmę (Li et al., 2017). Tuo tarpu archėjos neturi nei ET, nei periplazmines membranas primenančių struktūrų, todėl yra manoma, kad LLO yra susintetinamas citoplazminėje ląstelės membranos dalyje ir vėliau perkeliama už ląstelės ribų, o ten nuo plazminėje membranoje esančio Dol-P šerdis glikanas yra prijungiamas prie baltymo (Dell et al., 2010).

Kiti LLO sintezės šiuose organizmuose skirtumai yra susiję su oligosacharidine LLO dalimi. Nors eukariotų N-glikozilinimo metu susintetinamas šerdis  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  glikanas yra labai konservatyvus, prokariotų šerdiniai oligosacharidai smarkiai skiriasi tarpusavyje. Dėl šios priežasties jų glikanai pasižymi ypač didele įvairove nepaisant to, kad po LLO perkėlimo per periplazminę arba plazminę membraną N-glikanai prokariotuose greičiausiai nebėra toliau modifikuojami. Visuose organizmuose N-glikano perkėlimą ant baltymo asparagino aminorūgščių atlieka OST kompleksas. Bakterijose ir archėjose OST sudaro vienas baltymas, pasižymintis dideliu homologiškumu su mielių OST katalitiniu Stt3 subvienetu, kai tuo tarpu eukariotų OST yra kelių baltymų kompleksas (Dell et al., 2010).

## 1.2 Dolicholio kinazė ir dolicholio sintezė

DK, mielėse *S. cerevisiae* koduojama 13 chromosomoje esančio *SEC59* geno, yra membraninis baltymas, katalizuojantis dolicholio fosforilinimą paskutiniame Dol-P sintezės etape. DK perkemia fosfato grupę nuo citidino trifosfato ant ET membranoje esančio dolicholio (Shridas ir Waechter, 2006). Izoprenoidinis lipidus dolicholis yra sintetinis mevalonato metaboliniame kelyje ir šie procesai yra panašūs visuose eukariotuose. Dolicholio sintezės kelias pradamas nuo Acetil-KoA ir pirminiai jo etapai sutampa su sterolio ir ubikvino sintezės, tačiau šie keliai išsiskiria susintetintus farnezildifosfatą (FPP). FPP yra apdorojamas ET membranoje esančios *cis*-preniltransferazės, mielėse *S. cerevisiae* koduojamos *RER2* geno. Šio

fermento svarbą įrodo tai, kad *SRT1* genas koduoja alternatyvią *cis*-preniltransferazę, galinčią komplementuoti *Rer2* funkciją. *SRT1* raiška padidėja *S. cerevisiae* *Arer2* mutantuose, o dvigubi *Arer2* ir *Δsrt1* mutantai yra negyvybingi (Grabińska ir Palamarczyk, 2002; Sato et al., 1999). Veikiant *cis*-preniltransferazėms prie FPP yra prijungiami izopentenildifosfatai (IPP), kol susintetinamas dolicholio karkasas – poliprenolio difosfatas, kuris vėliau apdorojamas poliprenolio fosfatazių, bet jas koduojantys genai dar nėra identifikuoti. Susintetinto poliprenolio redukcijos metu gaunamas dolicholis (1.3 pav.), tačiau šį žingsnį katalizuojantis fermentas ilgą laiką buvo nežinomas (Schenk et al., 2001). Poliprenolio reduktazę (PPRD) pavyko identifikuoti tik neseniai, tyrinėjant glikozilinimo sutrikimų sukeltas patologijas žmonėse. Buvo nustatyta, kad pacientuose aptikto mutantinio geno produktas koduoja baltymą, reikalingą nuo NADPH priklausomai poliprenolio redukcijai iki dolicholio. Aptikus žmogaus PPRD buvo identifikuota ir mielių *S. cerevisiae* *DFG10* geno koduojama PRDD (Cantagrel et al., 2010). Nors *dfg10* mielių mutantai buvo charakterizuoti labai seniai, iki šiol nebuvo žinoma, kokį baltymą koduoja šis genas (Mösch ir Fink, 1997). Tyrėjai parodė, kad žmogaus PPRD gali atstatyti sutrikusio glikozilinimo fenotipą mielių *S. cerevisiae* mutantuose, su neaktyviu *DFG10* genu (Cantagrel et al., 2010), Taip pat, neseniai atrastas maliarijos parazito *Plasmodium falciparum* PRDD genas dalinai atstatė mielių *Δdfg10* mutanto fenotipą (Zimbres et al., 2020). Visi Dol-P sintezės kelio etapai yra glaudžiai susiję tarpusavyje. Padidinta *RER2* ir *SRT1* *cis*-preniltransferazių genų raiška komplementavo jautrumo antigrybeliniams vaistams ir pakitusios ląstelės sienelės struktūros fenotipą mielių *S. cerevisiae* *sec59-1* ir *dpm1-6* mutantuose, turinčiuose fermentų aktyvumą sumažinančias mutacijas DK ir Dol-P-Man sintazės genuose atitinkamai. Greičiausiai šių mutacijų poveikis mielių glikozilinimo procesams buvo atsvertas padidėjusio dolicholio prieinamumo ET membranose. Įdomu, kad *sec59-1*, bet ne *dpm1-6* mutantų fenotipą taip pat išgelbėjo padidinta *ROT1* geno raiška. Rot1 šaperonas yra svarbus ET vykstančiai baltymų susilankstymo kokybės kontrolei, tačiau taip pat yra dalyvauja ir N- ir O-glikozilinimo procesuose. Rot1 sąveikauja su OST komplekso subvienetu Ost3 – sumažėjusiu Rot1 aktyvumu pasižyminčiuose *S. cerevisiae* *rot1-1* mutantuose, kuriuose taip pat buvo pašalintas ir *OST3* genas, sumažėjo CPY glikozilinimo efektyvumas, O-manoziltransferazių aktyvumas bei padidėjo mielių jautrumas temperatūrai. Padidėjusi *ROT1* raiška taip pat stimuliuo N-glikozilinimui svarbių Alg glikoziltransferazių aktyvumą (Orłowski et al., 2007; Juchimiuk et al., 2010; Pasikowska et al., 2012).



### 1.3 pav. Dolicholio fosfato sintezės mielių *S. cerevisiae* ET schema

Mevalonato metaboliniame kelyje susintetintas FPP ET membranose yra apdorojamas *cis*-preniltransferazių (*SRT1/RER2*), prie jo prijungiant IPP, kol susintetinamas tinkamo ilgio poliprenolio difosfatas. Jis defosforilinamas iki šiol neidentifikuotų fosfatazių, o gautas poliprenolis redukuojamas iki dolicholio *DFG10* geno koduojamos PPRD. Po šios reakcijos dolicholis yra fosforilinamas DK (*SEC59*), o susintetintas Dol-P yra naudojamas kaip lipidinis nešiklis ET vykstančioms glikozilinimo reakcijoms (redaguota pagal Schenk et al., 2001).

DK sintetinamas Dol-P eukariotams yra būtinas ne tik kaip lipidinis nešiklis, ant kurio yra surenkama oligosacharidų šerdis baltymo N-glikozilinimo metu, bet ir kaip monosacharidų donoras ET vykstančioms N-,O- ir GPI-glikozilinimo bei C-manozilinimo reakcijoms, taigi DK veiklos sutrikimai yra atsakingi už visų eukariotų glikoproteinų sintezės ir jų atliekamų ląstelių funkcijų sutrikimus. Dėl įvairialypės Dol-P svarbos eukariotų biocheminiams procesams, DK yra jiems būtinas fermentas, o mielių mutantai su pašalintu *SEC59* genu yra negyvybingi (Giaever et al., 2002; Orlean, 1990). Dol-P svarbą parodo ne tik DK, bet ir kitų Dol-P apytakoje dalyvaujančių baltymų mutacijų tyrimai. N-glikozilinimo metu perkėlus susintetintą šerdinį oligosacharidą nuo Dol-PP ant baltymo, Dol-PP fosfatazė, mielėse *S. cerevisiae* koduojama *CAX4* geno, defosforilina Dol-PP ir taip padeda atstatyti Dol-P kiekius ET membranoje. Yra žinoma, kad pakankami Dol-P kiekiai yra vienas iš efektyviam N-glikozilinimui būtinų veiksnių. Tyrinėjant mielių *S. cerevisiae*  $\Delta$ *cax4* mutantus buvo pastebėta, kad šio geno išveiklinimas sumažino mielių CPY glikozilinimo efektyvumą, ir lėmė plazminės membranos struktūros pokyčius, mutantuose buvo stebimas UPR aktyvavimas dėl ET streso, sukkelto didelio netinkamai sulankstytų baltymų kiekio. Šie rezultatai rodo *CAX4* geno svarbą ląstelės membranos integralumo palaikymui ir reguliuojant ET baltymų kokybės kontrolės procesus, Įdomu, kad  $\Delta$ *cax4* mutantų fenotipas buvo visiškai atstatytas juos transformavus plazmide su laukinio tipo mielių *SEC59* genu (James et al., 2016).

### 1.2.1 Mielių *S. cerevisiae* DK ir *sec59-1* mutanto tyrimai

Pirmą kartą *S. cerevisiae sec59-1* mutantas buvo aprašytas tyrinėjant temperatūrai jautrius šių mielių mutantus, pasižyminčius mažesniu invertazės sekrecijos efektyvumu 37°C temperatūroje, nei laukinio tipo ląstelės (Ferro Novick et al., 1984). Identifikuotuose *sec59-1* mutantuose taip pat buvo sumažėjęs CPY bei  $\alpha$ -faktorius glikozilinimo ir sekrecijos efektyvumas, jiems buvo būdingi augimo sutrikimai 37°C temperatūroje, mutantų ET buvo aptiktos nepilnai glikozilintų ir neaktyvių baltymų sancaupos. Išanalizavus *SEC59* geno seką ir mutacijų įtaką mielėms buvo nustatyta, kad ji koduoja hidrofobišką membraninį baltymą, atsakingą už baltymų glikozilinimą (Bernstein et al., 1989). Šie mutantai taip pat neįterpdavo palmitinės rūgšties ir mioinozitolio į membranoje esančius baltymus su GPI inkaru dėl manozės trūkumo (Conzelmann et al., 1990). Vėliau buvo nustatyta, kad *Sec59* baltymo sekoje yra aptinkamas glikoziltransferazės būdingas motyvas kuris, kaip manoma, yra atsakingas už dolicholio prisijungimą (Apweiler et al., 1999). *SEC59* geno funkcija išaiškėjo nustačius, kad *sec59-1* mutanto ląstelėse Dol-P kiekiai 24°C ir 38°C temperatūrose buvo atitinkamai 50 ir 90 % mažesni, nei laukinio tipo ląstelėse. Ištyrus, kad šio mutanto ląstelėse Dol-PP fosfatazės ir *cis*-preniltransferazės aktyvumas nesiskyrė nuo laukinio tipo ląstelių, o DK aktyvumas 38°C temperatūroje siekė tik 3 % laukinio tipo kamienui būdingo aktyvumo, buvo padaryta išvada, kad *SEC59* genas koduoja mielių *S. cerevisiae* DK (Heller et al., 1992).

Tolimesni *sec59-1* mutanto tyrimai parodė, kad dėl DK mutacijos pakinta mielių ląstelės sienelės struktūra. Joje esantys glikoproteinai yra svarbūs ląstelės sienelės integralumo palaikymui ir yra prijungiami prie sienelės per GPI inkarus. *sec59-1* mutanto ląstelės sienelėje esantys gausiai manozilinti baltymai, kitaip nei laukinio tipo ląstelėse, buvo pasiskirstę netolygiai ir formavo klasterius. Manoma, kad šie sienelės struktūros pokyčiai yra atsakingi už mielių mutantų augimo sutrikimus, jautrumą temperatūrai ir įvairiems antigrybeliniams vaistams: kaspofunginui, amfotericinui B ir fluorescuojančiam „Calcofluor white“ dažui, kuris prisijungia prie mielių sienelėje esančio chitino ir sutrikdo ląstelės sienelės sintezę (Orłowski et al., 2007; Juchimiuk et al., 2010). Tyrinėjant mielių *S. cerevisiae sec59-1* mutantą taip pat buvo aptiktas ryšys tarp baltymų glikozilinimo sutrikimų ir lipidų metabolizmo, ET baltymų kokybės kontrolės reguliacijos bei peroksisomų biogenezės. Buvo nustatyta, kad dėl sumažėjusio baltymų glikozilinimo efektyvumo šiose mielėse pakito daugiau nei 3000 genų raiška, iš kurių dalis buvo susijusi su lipidų metabolizmu, ląstelės sienelės sinteze ir surinkimu, baltymų sulankstymu,

ERAD kelio veikimu bei peroksisomų biogeneze. Šiame mutante buvo pakitusi plazminės ir viduląstelinių membranų morfologija, dėl didelio netinkamai sulankstytų baltymų kiekio mutantuose buvo padidėjęs ET stresas ir aktyvuotas UPR. Taip pat buvo parodyta, kad *sec59-1* mutantuose buvo ženkliai padidėjęs fosfolipidų kiekis ir už jų sintezę atsakingų genų raiška bei padidėjęs lipidų lašelių, saugančių membranos lipidų sintezei reikalingas medžiagas, kiekis. Manoma, kad už sutrikusį *sec59-1* mutantų augimą yra atsakingi dėl baltymų glikozilinimo sutrikimų nuolat aktyvūs UPR ir ET stresas bei sutrikęs lipidų metabolizmas, o mielių membranos sintezę DK reguliuoja veikdama per baltymų glikozilinimą ir lipidų homeostazę (William James et al., 2019).

Nors *sec59-1* mutantas buvo išsamiai tyrinėjamas ir jo dėka buvo daug sužinota apie baltymų glikozilinimo svarbą bei DK įtaką įvairiems ląsteliniams procesams, literatūroje randami duomenys apie *sec59-1* mutanto fenotipą lemiančią mutaciją yra prieštaringi. Kelių mėnesių laikotarpyje dvi tyrėjų grupės publikavo duomenis apie mutacijas, aptiktas *sec59-1* mutanto DK gene. P. Shridas su kolegomis nustatė, kad laukinio tipo mielių *S. cerevisiae* DK 420 pozicijoje esantis glicinas yra pakeistas į aspartatą *sec59-1* mutantuose. Tyrėjai parodė, kad įvedus G420D aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją į plazmidėje esantį DK geną ir ja transformavus *sec59-1* kamieno ląsteles, laukinio tipo mielėms būdingas fenotipas nebuvo atstatytas. Įvedus atitinkamą aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją į žmogaus DK geną (G443D) jis taip pat nekomplementavo *sec59-1* mutanto fenotipo (Shridas ir Waechter, 2006). Tuo tarpu J. Orłowski su kolegomis sekoskaitos būdu nuskaitė *sec59-1* mutanto DK geno seką ir nustatė, kad šie mutantai turėjo W332G aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją DK geno sekoje. Kadangi ši mutacija yra DK vietoje, kuri, kaip manoma, yra atsakinga už sąveiką su dolicholiu (Albright et al., 1989), autoriai teigė, kad dėl mutacijos sumažėjęs DK afiniškumas dolicholiui paaiškintų *sec59-1* mutantų ląstelėse sumažėjusius Dol-P kiekius (Orłowski et al., 2007). Visgi verta paminėti, kad *Saccharomyces* Genome Database duomenų bazėje būtent G420D DK mutacija yra nurodoma, kaip lemianti *sec59-1* mutanto fenotipą (SEC59 Phenotypes | SGD, 2021).

### 1.2.2 Mielių *K. lactis* MD2/1-9 mutanto tyrimai

Mielių *K. lactis* DK koduojantis genas buvo identifikuotas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriuje (EGIS) tyrinėjant šių mielių

mutantus, pasižyminčius padidėjusiu *Bacillus amyloliquefaciens* bakterijų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumu. Vienas iš gautų *K. lactis* mutantų – MD2/1-9, pasižymėjo penkis kartus efektyvesne  $\alpha$ -amilazės sekrecija, nei tėvinis MD2/1 kamienas. Kryžminant šiuos mutantus su laukinio tipo ląstelėmis ir analizuojant gautų mielių dukterinių ląstelių fenotipus buvo nustatyta, kad padidėjusios sekrecijos fenotipą MD2/1-9 kamienne lemia recesyvinė mutacija viename mielių gene (Bartkevičiute ir Sasnauskas, 2003). Šio mutanto genomo seka buvo išanalizuota sekoskaitos būdu ir mielių gene, kurio produkto seka sutapo su kitų mielių DK sekomis, buvo aptiktos G405S ir I419S aminorūgščių pokyčius koduojančios mutacijos. Buvo padaryta išvada, kad šis genas koduoja *K. lactis* DK ir jis buvo pavadintas *KISEC59*. Vėliau šios mutacijos buvo įvestos į laukinio tipo *K. lactis* CBS2359 kamieno DK geną ir buvo nustatyta, kad padidėjusios  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo fenotipo pasireiškimui buvo būtinos abi DK mutacijos, o pavienės mutacijos sekrecijos efektyvumo mielėse nepaveikė (Žiogienė et al., 2019).

Norint geriau įvertinti DK mutacijų poveikį šioms mielėms, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą buvo sukonstruoti keturi laukinio tipo *K. lactis* CBS2359 kamieno DK mutantai – GGI (W330G mutacija), WSI (G405S) mutacija, WGS (I419S mutacija) ir WSS (G405S ir I419S mutacijos). W330G mutacija *K. lactis* DK atitinka vieną iš aprašytų *S. cerevisiae* *sec59-1* mutantų DK aminorūgščių pokyčių (W332G). Buvo pastebėta, kad sukonstruoti mutantai buvo jautrūs temperatūrai – visi DK mutantai, o ypač GGI ir WSS kamienai, buvo labiausiai jautrūs tunikamicinui 24°C ir 34°C temperatūrose ir mažiausiai paveikti 30°C temperatūroje. Tunikamicinas inhibuoja Alg7 glikoziltransferazės veiklą ir sutrikdo N-glikozilinimą, todėl DK mutantai jam yra jautresni, nei laukinio tipo ląstelės. Visi tirti *K. lactis* mutantai buvo atsparūs CFW, o tai rodo, kad mielių ląstelės sienelės struktūra nebuvo pakitusi. WSS mutantuose taip pat buvo sumažėjęs CPY glikozilinimo efektyvumas, tačiau nors nedideli CPY glikozilinimo pokyčiai buvo stebimi ir GGI mutanto ląstelėse, tik WSS, bet ne GGI kamienas efektyviau nei laukinio tipo ląstelėse sekretavo  $\alpha$ -amilazę, transmembraninio domeno neturinčią *S. cerevisiae* KEX2 peptidazę ir žmogaus augimo hormoną. Kadangi sukonstruotų mutantų jautrumas tunikamicinui priklausė nuo temperatūros, buvo padaryta išvada, kad mutantinės *K. lactis* DK aktyvumas ypač sumažėja 24°C ir 34°C temperatūrose (Žiogienė et al., 2019).

Nepaisant didelio panašumo tarp visų eukariotų glikozilinimo procesų, įvairūs glikozilinimo mechanizmai gali skirtis net ir tarp skirtingų mielių rūšių. Mielėse *K. lactis* aptiktos mutacijos bei W332G aminorūgščių pokyti koduojanti mutacija buvo įvestos į mielių

*S. cerevisiae* SEC59 geną ir sukonstruoti GGL (W332G DK mutacija), WSL (G407S DK mutacija, atitinka G405S *K. lactis* DK mutaciją), WGS (L421S DK mutacija, atitinka I419S *K. lactis* DK mutaciją) ir WSS (G405S ir L421S DK mutacijos) mutantai. Juose buvo įvertintas CPY glikozilinimo efektyvumas bei mutantų jautrumas tunikamicinui ir CFW. Nors *S. cerevisiae* WSS mutantai irgi buvo jautrūs tunikamicinui ir pasižymėjo mažesniu CPY glikozilinimo efektyvumu nei laukinio tipo ląstelės, *S. cerevisiae* DK mutantuose, skirtingai nei *K. lactis* mielėse, buvo pakitusi ląstelės sienelės struktūra, kadangi tirtos mielės buvo jautrios CFW. Mažai to, *S. cerevisiae* DK aktyvumas buvo mažiau paveiktas žemesnėje 24°C temperatūroje, bet ypač sumažėjo aukštesnėje 34°C temperatūroje (Burdulis, 2020).

### 1.2.3 *Arabidopsis thaliana* DK tyrimai

DK yra išsamiai tyrinėjama ne tik vienaląsčiuose grybuose bet ir aukštesniuose eukariotuose, o šių tyrimų rezultatai padeda geriau suprasti baltymų glikozilinimo svarbą daugialąsčiuose organizmuose. *Arabidopsis thaliana* DK buvo identifikuota šių augalų genome ieškant genų, koduojančių citidililtransferazės motyvą turinčius baltymus, kadangi DK perneša fosfato grupę nuo CTP ant dolicholio. Iš identifikuotų baltymų tik vienas pasižymėjo dideliu panašumu su mielių *S. cerevisiae* DK. Aptiktas genas buvo pavadintas *AtDOK1*, o jo produkto DK aktyvumas buvo įrodytas transformuojant *S. cerevisiae* *sec59-1* mutantus daugiakopijine plazmide su *AtDOK1* raiškos kasete. Padidinta *A. thaliana* DK raiška atstatė sutrikusio CPY glikozilinimo ir augimo 37°C temperatūroje fenotipą mielių mutantuose. Siekiant išsamiau charakterizuoti *A. thaliana* DK, buvo sukonstruoti heterozigotiniai *dok1-1/+* mutantai, kuriuose buvo inaktyvuotas vienas iš šio geno alelių, tačiau abiejų *AtDOK1* alelių išveiklinimas augalams buvo mirtinas. Mutantų tyrimai parodė, kad nors jų vegetatyvinio augimo greitis nesiskyrė nuo laukinio tipo augalų, *dok1-1/+* mutantams buvo būdingi žiedadulkių struktūros pokyčiai ir jų gyvybingumo sumažėjimas, bei pakitusi sėklapradžio struktūra. Šie rezultatai rodo DK veiklos svarbą augalų dauginimosi procesams (Kanehara et al., 2015). Tolimesni *A. thaliana* mutantų, kuriuose DK geno raiška buvo prislopinta naudojant miRNR, tyrimai parodė, kad *AtDok1* veikla reikalinga šių augalų žydėjimo kontrolei – *A. thaliana* mutantai, kuriuose fermento aktyvumas buvo sumažėjęs 60 % pražysdavo anksčiau, nei laukinio tipo augalai (Cho et al., 2017).

#### 1.2.4 Žmogaus DK tyrimai

Tyrinėjant mielių *S. cerevisiae sec59-1* mutantus sukauptos žinios leido aptikti ir žmogaus DK koduojantį *DOLK* geną. Nors iki tol DK genai nebuvo aptikti žinduoliuose, išanalizavus žmogaus smegenų kopijinės DNR bibliotekas buvo surastas atviro skaitymo rėmelis, koduojantis baltymą, kurio seka buvo 30 % panaši į mielių DK seką. Įklonavus šį baltymą koduojančią seką tarp mielių *SEC59* promotoriaus ir terminatoriaus daugiakopijiniame mielių raiškos vektoriuje ir juo transformavus *S. cerevisiae sec59-1* mutantą, pavyko atstatyti mutanto CPY glikozilinimo efektyvumą bei mielių DK aktyvumą iki būdingo laukinio tipo ląstelėms. Tyrėjai taip pat pademonstravo, kad žmogaus DK veikė ir Sf-9 vabzdžių ląstelių linijoje (Fernandez et al., 2002). Tolimesni žmogaus DK tyrimai parodė, kad šį membranine baltymą sudaro 13 transmembraninių domenų. Pažymėjus žmogaus DK N galą žaliai fluorescuojančiu baltymu buvo pastebėta, kad jis yra lokalizuotas vidinėje ET pusėje, kai tuo tarpu baltymo C galas buvo išsidėstęs citoplazminėje pusėje. Palyginus žmogaus DK su kitais citidililtransferaziniu aktyvumu pasižyminčiais baltymais, tarp jų ir *S. cerevisiae* DK, buvo aptiktas baltymo C gale esantis konservatyvus DXXAXXXGXXXGX<sub>8</sub>K/NKTXE motyvas, kuris galėtų būti atsakingas už CTP prisijungimą. Mielių *S. cerevisiae* ir žmogaus DK kinazėse šis motyvas yra 430-453 ir 451-475 aminorūgščių pozicijose atitinkamai. Jo svarbą DK veiklai įrodo ir tai, kad žmogaus DK, turinčios aminorūgščių mutacijas šiame motyve nekomplementavo sutrikusio glikozilinimo fenotipo *S. cerevisiae sec59-1* mutantuose (Shridas ir Waechter, 2006).

Svarbu pabrėžti, kad nors ir žmogaus, ir *A. thaliana* DK gebėjimas atstatyti *S. cerevisiae sec59-1* mutantų fenotipą įrodo Dol-P sintezės ir kitų ET vykstančių N-glikozilinimo procesų panašumą tarp visų eukariotų, šie tyrimai buvo atlikti transformuojant DK koduojančius genus turinčias plazmides į sąlyginius mielių mutantus, kurie turėjo nors ir mutantinį, bet vis tiek dalinai funkcionalų mielių DK geną (Fernandez et al., 2002; Kanehara et al., 2015).

Kadangi glikozilinimas yra labiausiai paplitusi baltymų potransliacinė modifikacija, reikalinga jų stabilumui ir aktyvumui, nenormalus baltymų glikozilinimas lemia daugelio biologinių procesų sutrikimus. Mutacijos už glikozilinimą atsakinguose žmogaus genuose gali lemti įgimtus glikozilinimo sutrikimus (CDG, angl. congenital disorder of glycosylation), kurie pasireiškia plataus spektro fenotipiniais pokyčiais paveiktuose individuose (Paprocka et al., 2021). Didelė dalis šiandien žinomų CDG yra susiję su mutacijomis dolicholio metabolizme dalyvaujančių glikoziltransferazių, kinazių, fosfatazių bei reduktazių genuose (Haeuptle ir



Hennet, 2009). Išsamesni CDG lemiančių genų, o tarp jų ir DK, mutacijų tyrimai leistų ne tik susieti žinomus genus su tam tikrais CDG fenotipais, atrasti šių ligų biožymenis bei naujus gydymo būdus, bet ir aptikti iki šiol nežinomus genus, dalyvaujančius dolicholio metabolizme (Buczowska et al., 2015).

Pastaruoju metu vis daugėja duomenų apie DK mutacijų sukeltus žmonių CGD. Ištyrinėtos žmogaus DK mutacijos pateiktos 1.1 lentelėje. Vieni pirmųjų tokių atvejų buvo aptikti keturiuose naujagimiuose, kurie turėjo homozigotines mutacijas, koduojančias C99S arba Y441S aminorūgščių pokyčius savo DK geno sekoje. Pacientams pasireiškė įvairaus spektro sutrikimai – mikrocefalija, hiperkeratozė, hipoglikemija, dilatacinė kardiomiopatija, o galiausiai pacientai mirė nepaėjęs net devyniems mėnesiams nuo gimimo (Kranz et al., 2007). Dilatacinė kardiomiopatija taip pat buvo susieta su homozigotinėmis M1I, W304C ir H408D aminorūgščių pokyčius koduojančiomis žmogaus DK geno mutacijomis, aptiktomis trylikoje 5-13 metų pacientų. Tyrėjai parodė, kad dilatacinę kardiomiopatiją lėmė sutrikęs a-distroglikano N-glikozilinimas ir O-manozilinimas (Lefeber et al., 2011). Vėliau buvo aprašytas homozigotinės mutacijos, lemiančios MIT DK aminorūgščių pokytį, sukeltas išskirtinai neurologinio pobūdžio CDG. Šią mutaciją turintiems broliui ir sesei pasireiškė autizmo spektro sutrikimai, protinis atsilikimas, epilepsija. Įdomu, kad vaikams nebuvo diagnozuota dilatacinė kardiomiopatija ar kiti sutrikimai (Helander et al., 2013). Homozigotinė mutacija, koduojanti Q483K aminorūgščių pokytį DK geno sekoje, lėmė sutrikusį fibroblastų katalitinį aktyvumą ir gebėjimą prisijungti substratus, dėl to tirtam pacientui pasireiškė įvairių organų sistemų sutrikimai, tarp jų ir dilatacinė kardiomiopatija, lytinių organų anomalijos, hepatomegalija, insulinui atspari hiperglikemija, dismorfija, traukulių priepuoliai (Lieu et al., 2013). Heterozigotinės mutacijos, koduojančios T520A aminorūgščių pokytį ir Y317 pokytį į STOP kodoną skirtinguose DK geno aleliuose buvo susietos su dilatacine kardiomiopatija bei lipidų lašelių sankaupomis pacientų epidermyje (Rush et al., 2017). DK mutacijų tyrimai yra padėję išsiaiškinti net 60 metų senumo nenustatytą ligos diagnozę. Keturi vienos šeimos vaikai mirė dėl širdies sutrikimų bei įgimtos hiperkeratozės, tačiau ligos priežastis nebuvo nustatyta. Vėliau susiejus naujagimių simptomus su *DOLK* mutacijomis, išlikęs vieno paciento audinio mėginys, naudotas mikroskopijoje, buvo panaudotas DNR analizei. Buvo nustatyta, kad naujagimis turėjo heterozigotines DK geno mutacijas, koduojančias L421P ir G458V aminorūgščių mutacijas geno aleliuose, paveldėtuose iš tėvo ir motinos atitinkamai (Hall et al., 2020).

Dalis žmogaus DK aptiktų mutacijų buvo iširtos ir mielėse *S. cerevisiae*. Mielių *sec59-1* mutanto ląstelės buvo transformuotos plazmidėmis su žmogaus DK genu, turinčiu M1I, C99S, W304C, H408D ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančias mutacijas. Išvados apie sumažėjusį mutantinių DK aktyvumą buvo padarytos nustačius, kad plazmidėse esantys mutantiniai DK genai negebėjo atstatyti sutrikusio *sec59-1* mutanto jautrumo 37°C temperatūrai. Taip pat buvo pastebėta, kad skirtingos žmogaus DK mutacijos turėjo skirtingą poveikį mielių mutantų CPY glikozilinimo efektyvumui. Visgi, šie eksperimentai buvo atlikti naudojant *S. cerevisiae* mutantus, turinčius dalinai funkcionalų mielių DK geną, kurio veikla galėjo įtakoti tyrimo rezultatus (Kranz et al., 2007; Lefeber et al., 2011).

### 1.1 lentelė. Aptiktos žmogaus DK mutacijos, lemiančios CDG

	Žmogaus DK mutacija	Mutacijos tipas	
1	C99S	Homozigotinė	Kranz C. et al., 2007
2	Y441S	Homozigotinė	
3	M1I	Homozigotinė	Lefeber D. J. et al., 2011
4	W304C	Homozigotinė	
5	H408D	Homozigotinė	
6	M1T	Homozigotinė	Helander A. et al., 2013
7	Q483K	Homozigotinė	Lieu M. T. et al., 2013
8	Y317STOP ir T520A	Heterozigotinė	Rush E. T. et al., 2017
9	L421P ir G458V	Heterozigotinė	Hall B. D. et al., 2020

### 1.3 Glikozilinimo reikšmė baltymų sekrecijos procesui

Baltymų sekrecija – visiems organizmams reikalingas procesas, kurio pagrindiniai etapai yra panašūs visuose eukariotuose. Klasikinio baltymų sekrecijos kelio metu baltymai, N gale turintys sekrecijai reikalingą signalinę seką, yra pernešami į eukariotų ET potransliaciniu arba kotransliaciniu būdu. ET tinkle baltymai yra modifikuojami, tinkamai sulankstomi ir pernešami į GK. Ten baltymai toliau modifikuojami, supakuojami į pūsleles ir pernešami prie plazminės membranos, o pūslelėms su ja susiliejus, išskiriami už ląstelės ribų (Cohen et al., 2020; Delic et al., 2013).

Didelė dalis sekretuojamų baltymų yra glikozilinti ir ši modifikacija smarkiai įtakoja

baltymų sekrecijos efektyvumą. Tik natyvios struktūros baltymai gali būti efektyviai sekretuojami, o prie baltymų prijungti glikanai yra svarbūs tinkamam baltymų susilankstymui bei ET vykstančiai baltymų kokybės kontrolei (Shental-Bechor ir Levy, 2008). Tai buvo pastebėta prieš daugiau nei 30 metų nustačius, kad gripo viruso hemagliutinino N-glikozilinimas laukinio tipo baltymui nebūdingose vietose trukdydavo baltymams įgauti tinkamą struktūrą (Gallagher et al., 1988). Prie baltymų prijungti hidrofiliniai glikanai gali stabilizuoti baltymų struktūras ir stabdyti jų agregaciją, o tarp baltymų ir glikanų susidarantys tarpmolekuliniai ryšiai skatina tinkamą baltymų susilankstymą (Jayaprakash ir Surolia, 2017). Baltymų glikozilinimas taip pat svarbus ET vykstančios baltymų kokybės kontrolės užtikrinimui. N-glikozilinimo metu ET prijungus susintetintą šerdinį oligosacharidą prie baltymo, nuo jo yra pašalinamos dvi gliukozės liekanos, o prie paskutinės gliukozės gali prisijungti į lektinus panašūs šaperonai kalneksinas ir kalrektikulinas. Šie baltymai pritraukia kitus šaperonus, reikalingus tinkamam baltymo susilankstymui, o šios sąveikos metu nuo baltymų glikanų yra pašalinama paskutinė gliukozės liekana, dėl to prie tinkamai sulankstytų baltymų šaperonai nebeprisijungia. Visgi, jei baltymas neįgauna tinkamos struktūros, jis yra gliukozilinamas ir kalneksino-kalrektikulino ciklas kartojamas, kol baltymas yra tinkamai sulankstomas, arba demanozilinamas ir nukreipiamas į ERAD kelią (Xu ir Ng, 2015).

### **1.3.1 Glikozilinimo poveikio mielių baltymų sekrecijos efektyvumui tyrimai**

Mielių baltymų glikozilinimo ir sekrecijos tyrimai yra svarbūs ne tik siekiant geriau suprasti šių procesų mechanizmus, bet ir kuriant ypač dideliu baltymų sekrecijos efektyvumu pasižyminčius mielių kamienus. Tokie kamienai yra labai naudingi biotechnologijos pramonėje. Mielėms *S. cerevisiae* yra suteiktas saugaus organizmo (GRAS, angl. generally recognized as safe) statusas, taigi mielėse pagaminti produktai yra neužteršti endotoksinais bei bakteriofagais ir gali būti saugiai naudojami įvairiuose diagnostiniuose ir moksliniuose tyrimuose, bei farmacijos ir maisto pramonėje. Be to, mielėse susintetinti baltymai pasižymi eukariotams būdingomis potransliacinėmis modifikacijomis (Çelik ir Çalik, 2012; Martínez et al., 2012). Išsekretuotų baltymų gryninimas yra daug lengvesnis, pigesnis ir efektyvesnis, nei viduląstelinių, kadangi nereikia ardyti tvirtos mielių ląstelės sienelės, mielių auginimo terpėje esantis šeimininko baltymų kiekis, kurį reikia pašalinti gryninant tikslinį baltymą, yra daug mažesnis nei ląstelių lizatuose, o išsekretuoti baltymai dažniausiai būna tinkamai susilankstę ir biologiškai aktyvūs

(Mattanovich et al., 2012). Vienas iš būdų kurti dideliu sekrecijos efektyvumu pasižyminčius mielių kamienus yra konstruoti mielių mutantus, turinčius mutacijas už glikozilinimą atsakinguose genuose, arba įvedant ir pašalinant glikozilinimo vietas specifiniuose baltymuose.

Dažniausiai sutrikdžius specifinio baltymo glikozilinimą sumažėja ir jo sekrecijos efektyvumas. Vienos iš dviejų potencialių rekombinantinės *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -amilazės glikozilinimo vietų pašalinimas lėmė sumažėjusį šio baltymo sekrecijos efektyvumą mielėse, tačiau kitos glikozilinimo vietos pašalinimas tam neturėjo didelės įtakos (Carmona et al., 1998). Glikozilinimo vietų pašalinimas sumažino ir *Cryptococcus neoformans* fosfolipazės B sekrecijos efektyvumą mielėse *S. cerevisiae*, o mutantiniai baltymai buvo jautresni proteolizei (Turner et al., 2006). Kitu atveju papildomų glikozilinimo vietų įvedimas padidino rekombinantinės kutinazės sekreciją mielėse *S. cerevisiae* ir *Pichia pastoris*. Manoma, kad papildomas baltymų glikozilinimas stabdė jų agregaciją ir sąveiką su ET šaperonais, todėl rekombinantiniai baltymai neužsilaikė ET ir buvo efektyviai sekretuojami iš ląstelės (Sagt et al., 2000).

Literatūroje yra įvairių duomenų apie glikozilinimo procesuose dalyvaujančių genų mutacijų poveikį baltymų sekrecijos efektyvumui. Buvo parodyta, kad *Trichoderma reesei* ląstelės transformavus daugiakopijine plazmide su *S. cerevisiae* *DPM1* genu ir taip padidinus Dol-P-Man sintazės aktyvumą, padidėjo *T. reesei* celobiohidrolazės I sekrecija. Taip pat, tirtos *T. reesei* ląstelės buvo jautrios CFW, o jų ląstelės sienelėse esantis chitinas buvo pasiskirstęs netolygiai (Kruszewska et al., 1999; Perlinska-Lenart et al., 2006). Visgi, dalies glikozilinimui reikalingų genų išveiklinimas gali padidinti rekombinantinių baltymų sekreciją mielėse. *S. cerevisiae* mutantuose pašalinus neesminius Alg glikoziltransferazės koduojančius genus (*ALG3*, *ALG5*, *ALG6*, *ALG8*, *ALG9* ir *ALG12*) bei OST komplekso subvienetą koduojanti *OST5* geną padidėjo bakterinės  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas. Šie mutantai nepilnai glikozilino  $\alpha$ -amilazę, bet sekretavo ją daug efektyviau, nei laukinio tipo ląstelės, kur  $\alpha$ -amilazė buvo glikozilinta šešiose vietose, tačiau greitai degraduojama ERAD kelyje (Hoshida et al., 2013). Verta paminėti, kad *Alg3*, *Alg8* ir *Alg9* mutantuose buvo sumažėjęs CPY glikozilinimo efektyvumas, o kituose *Alg* mutantuose CPY glikozilinimo pokyčiai dar nebuvo įvertinti (Burda et al., 1996; Čopič et al., 2009; Stagljar et al., 1994). Už N-glikanų hipermanozilinimą atsakingų *OCH1*, *MNN9*, *MNN10*, ir *MNN11* genų delecijos ženkliai pagerino rekombinantinių bei endogeninių baltymų sekrecijos efektyvumą mielėse *S. cerevisiae*, o *KIMNN10* geno pašalinimas

pagerino rekombinantinių baltymų sekreciją mielėse *K. lactis*. Manoma, kad už glikozilinimą atsakingų genų išveiklinimas arba aktyvumą sumažinančios mutacijos lemia pokyčius mielių ląstelės sienelės struktūroje, kadangi joje esantys glikoproteinai yra svarbūs jos integralumui. Dėl mutacijų sienelėje esantys nepilnai glikozilinti baltymai gali lemti jos porėtumą ir taip paveikti baltymų sekrecijos efektyvumą (Bartkevičiute ir Sasnauskas, 2004; Tang et al., 2016).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Darbo metu naudoti bakterijų ir mielių kamienai

Plazmidžių padauginimui bei konstravimui buvo naudotas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  F-*gyrA96* (NaIr) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (rk–mk+) *glnV44 deoR*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 ( $\phi$  80d $\Delta$ (*lacZ*)M15) bakterijų kamienas (EGIS kolekcija).

DK geno mutacijos buvo įvestos į *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ ) kamieną.

*ALG3*, *ALG5*, *ALG6*, *ALG8*, *ALG9*, *ALG12* bei *OST5* genų pašalinimo įtakos mielių glikozilinimui ir rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumo tyrimams buvo naudota mielių nulinių mutantų kolekcija, sukurta BY4741 kamieno pagrindu (Thermo Scientific, Open Biosystems).

### 2.2. Darbo metu naudotos plazmidės

pJET1.2/blunt - klonavimo vektorius, turintis bakterijų Ori replikacijos pradžios seką ir *bla* geną, kurio koduojama  $\beta$ -laktamazė suteikia plazmidę turinčioms bakterijoms atsparumą ampicilinui (Thermo Fisher Scientific Baltics).

pJET-SEC59 - *SEC59* geno raiškos kasetė pJET1.2/blunt klonavimo vektoriuje (EGIS kolekcija).

pJET-SEC59-GGL - *sec59* geno raiškos kasetė su PAM sekos ir W332G aminorūgščių pokytį koduojančia mutacija pJET1.2/blunt klonavimo vektoriuje (Burdulis, 2020; EGIS kolekcija).

pJET-S59PT-KL/HS - *K. lactis* / *H. Sapiens* DK genų raiškos kasetė, kontroliuojama *S. cerevisiae* *SEC59* promotoriaus ir terminatoriaus pJET1.2/blunt klonavimo vektoriuje (EGIS kolekcija).

pFG - *S. cerevisiae* mielių raiškos vektorius, turintis bakterijų Ori ir mielių dvimikroninės plazmidės replikacijos pradžios sekas. Plazmidėje yra *bla* genas ir *FDH1* genas, koduojantis *Candida maltosa* formaldehido dehidrogenzę, kuri suteikia plazmidę turinčioms mielėms atsparumą formaldehidui (EGIS kolekcija).

pFG-SnrSC – pFG mielių raiškos vektorius su taikiniui specifinės sekos neturinčios gRNR raiškos kasete, kontroliuojama *S. cerevisiae* *SNR52* RNR promotoriaus ir *SUP4* terminatoriaus (EGIS kolekcija).

pFG-SnrSC-TARGS59-D392 – pFG mielių raiškos vektorius, su raiškos kasete, koduojančia

gRNR, nukreipiančia Cas9 endonukleazę prie *SEC59* geno taikinio, esančio ties D392 aminorūgštimi (Burdulis, 2020; EGIS kolekcija).

pJET-SnrK1 – taikiniui specifinės sekos neturinčios gRNR raiškos kasetė, kontroliuojama *K. lactis* *SNR52* RNR promotoriaus ir *SUP4* terminatoriaus pJET1.2/blunt klonavimo vektoriuje (EGIS kolekcija).

pKDSU-PGK1-Cas9 – plazmidė su bakterijų Ori ir mielių *K. lactis* PKD1 plazmidės replikacijos pradžios seka ir *bla* bei orotidino 5' fosfato dekarboksilazės genu (*URA3*), kurio produktas leidžia plazmidę turinčioms mielėms augti ant terpės be uracilo. Plazmidėje yra 3-fosfogliceratkinazės (*PGK1*) promotoriaus bei terminatoriaus kontroliuojama Cas9 raiškos kasetė (Burdulis, 2020; EGIS kolekcija).

pFG-TDH2-Kex2-His6 – rekombinantinės, transmembraninio domeno neturinčios *S. cerevisiae* Kex2 peptidazės genas su 6 histidino aminorūgščių motyvu, reguliuojamas gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenazės (TDH2) promotoriaus ir terminatoriaus pFG raiškos vektoriuje (EGIS kolekcija).

pFG-PGK1-Pen4-His6 – krevečių sarkoplazmos Ca prisijungiančio Pen-m4 alergeno (angl. sarcoplasmic calcium binding protein) genas su 6 histidino aminorūgščių motyvu, reguliuojamas *PGK1* promotoriaus ir terminatoriaus pFG raiškos vektoriuje (EGIS kolekcija).

pFX7-Amy – pFX7 mielių raiškos vektorius su bakterijų Ori ir dvimikroninės plazmidės replikacijos pradžios sekomis, *bla* ir *FDH1* genais bei *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilazės raiškos kasete (EGIS kolekcija).

### 2.3. Plazmidžių konstravimas

Visos fermentinės reakcijos, reikalingos plazmidžių konstravimui, buvo atliekamos remiantis klasikinais genų inžinerijos bei molekulinės biologijos metodais (Sambrook ir Russell, 2001) ir naudojant „Thermo Fisher Scientific Baltics“ (Lietuva) pagamintus buferinius tirpalus bei fermentus.

Plazmidinės DNR arba PGR produktų hidrolizės reakcijų restrikcijos endonukleazėmis (RE) mišiniai (20-100  $\mu$ l) buvo ruošiami naudojant FastDigest Green buferį, penkių buferinių tirpalų (B, G, O, R ir Tango) sistemą arba unikalius RE buferius ir laikantis gamintojo rekomendacijų.

Fosfatai nuo DNR 5' galų buvo pašalinami naudojant FastAP šarminę fosfatazę.

Reakcijos buvo atliekamos po DNR hidrolizės, naudotų RE buferiniuose tirpaluose ir laikantis gamintojo rekomendacijų.

DNR galų užbukinimui buvo naudojamas Klenow fragment fermentas ir jam specifinis buferinis tirpalas, o bukinimo reakcija atliekama laikantis gamintojo rekomendacijų.

DNR hidrolizės reakcijos produktų elektroforezė buvo atliekama 0,8 % agarozės gelyje su 0,2 µg/ml etidžio bromido. Reakcijos mišiniai buvo sumaišomi su 6x DNR užnešimo dažų ir suleidžiami į gelyje suformuotus 100-200 µl talpos šulinėlius. Elektroforezė buvo atliekama TAE buferyje (Thermo Fisher Scientific Baltics) 20-30 min., esant 10 V/cm elektriniam laukui, o agarozės geliai analizuojami transiliuminatoriaus ("ULTRA-LUM") UV šviesoje. DNR elektroforezė po restrikcinės analizės – DNR hidrolizės reakcijos 15 µl tūryje norint patikrinti, ar sukonstruotose plazmidėse yra įklonuotas norimas genas ir ar jis įsistatęs tinkama orientacija, buvo atliekama 1 % agarozės geliuose su 0,2 µg/ml etidžio bromido.

DNR fragmentų susiuvimo reakcijos buvo atliekamos naudojant T4 DNR ligazę ir T4 DNR ligazės buferinį tirpalą. Reakcijos mišiniai buvo paruošiami laikantis gamintojo rekomendacijų, vektoriaus ir į jį klonuojamo DNR fragmento santykis mišiniuose buvo 1:3.

DNR apvalymui po fermentinių reakcijų ir elektroforezės metu išfrakcionuotų DNR fragmentų išskyrimui iš agarozės gelio buvo naudojamas DNR gryninimo rinkinys „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics), DNR gryninama vadovaujantis gamintojo pateiktais protokolais.

DNR koncentracija buvo nustatoma spektrofotometru NanoDrop 2000. DNR nukleotidų seka buvo nustatoma Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre, automatinio sekoskaitos aparatu ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

### **Naudoti tirpalai:**

Agarozė – 0,8-1 % agarozės (Thermo Fisher Scientific Baltics) tirpalas TAE buferyje.

Etidžio bromido tirpalas – 10 mg/mL etidžio bromido (Sigma) tirpalas.

DNR užnešimo dažas – 6x DNA Loading Dye #R0611 (Thermo Fisher Scientific Baltics).

DNR fragmentų ilgio standartas – GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331 (Thermo Fisher Scientific Baltics).



## 2.4. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininėms reakcijoms (PGR) naudotų pradmenų sekos pateiktos 2.1 lentelėje, o pradmenų porų panaudojimas ir jų prisilydymo temperatūros – 2.2 lentelėje. PGR buvo naudojamos „Thermo Fisher Scientific Baltics“ pagamintos Phusion High-Fidelity arba DreamTaq DNR polimerazės, Phusion Green HF arba DreamTaq Green buferiai ir dNTP mišiniai. PGR reakcijos mišiniai buvo ruošiami ir PGR parametrai parenkami laikantis gamintojo rekomendacijų, reakcijos atliekamos plonasieniame PGR mėgintuvėlyje, Arktik Thermal Cycler arba Eppendorf SimpliAmp termocikleriuose. Jei PGR reakcijoms kaip matrica buvo naudojama mielių chromosominė DNR, mielių ląstelės pirmiausia buvo suspenduojamos 20 mM NaOH (Sigma) ir 0,1% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific Baltics) tirpale ir 20 min. verdamos 100°C temperatūroje, o į 20 µl PGR mišinį buvo dedama 1 µl mielių suspensijos. Bakterijų kolonijų PGR buvo atliekamas prieš reakciją suspenduojant nedidelį kiekį bakterijų biomasės PGR reakcijos mišinyje. Po reakcijos PGR produktai būdavo apvalomi nuo fermentų arba išskiriami iš 0,8 % agarozės gelio po DNR elektroforezės naudojant „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ DNR gryninimo rinkinį.

**2.1 lentelė. Darbe naudotų pradmenų pavadinimai ir sekos**

<b>Pradmens pavadinimas</b>	<b>Pradmens 5'- 3' seka</b>
G420D-D	CGTCACCTGCGGATTGGGAATTGGTGATTCACTAGCATC
G420D-R	GCACACCTGCAATTCCCAATCCTATTAGATCCATTGGAGAG
G420D-TARG1	GATCTTTACCAATAATAGATGCTA
G420D-TARG2	AAACTAGCATCTATTATTGGTAAA
ScSnr52-Pr	GGCGGCCGCTCTTCATCTTTGAAAAGATAATG
KlSnr52-Pr	CGCGGCCGCAATGAGCGATGACCACGTC
ScS59-D1	CTCAGCCTTTCATAGCTCCCACTC
ScS59-D3	GAAGGGCATTATCCTTGCTCTCAC
ScS59-D4	GTGAAAATCCGCTACTTTGGCTG
ScS59-R1	GCGATTCTTCCAACCTAAGAGC
ScS59-R2	GACGTAAACCTGAATTGGCTAAC
ScS59-ATG	ATATGGTTCGCTATAATACCTC
ScS59-ATG-TARG1	AATCTATTCTGTTCATTGCCTATA
ScS59-ATG-TARG2	AAACTAGCATCTATTATTGGTAAA
ScS59-STOP-TARG1	GATCTCACAAATCATCATAAATGC
ScS59-STOP-TARG2	AAACGCATTTATGATGATTTGTGA
C99S-D	CGTCACCTGCTGAAAGAAAGATCACAAACTGCTGGTAATC

C99S-R	GCACACCTGCATCTTTCTTTTCATAACTAATCCTAACAATGGCATA AC
C99S-TARG1	GATCGGTTATGCCATTGTTGGGTT
C99S-TARG2	AAACAACCCAACAATGGCATAACC
W304C-D	CGTCACCTGCTGCTCTTTGTTGGCTACTTTGGC
W304C-R	GCACACCTGCCAACAAAGAGCAGTAAGCCAACAAATAAATTC
W304C-TARG1	GATCGAATTTATTTGTTGGCTTAT
W304C-TARG2	AAACATAAGCCAACAAATAAATTC
Y441S-D	CGTCACCTGCTCCATCTGCTGGTGTTTTGGCTGTTG
Y441S-R	GCACACCTGCCAGCAGATGGAATAATGCTCTAGCACCAC
Y441S-TARG1	GATCTTTGGGTGGTGTAGAGCTT
Y441S-TARG2	AAACAAGCTCTAGCACCACCCAAA
DOLK-R1	CATCAACAAAATCAACAAATAC
DOLK-D1	GATTCTGGTACTTGGGCTTCTTC
DOLK-D3	ATGACTAGAGAATGTCCTTC

## 2.2 lentelė. Pradmenų panaudojimo tikslas

Pradmenų pora	Panaudojimas	Prisilydymo temperatūra
G420D-D G420D-R	G420D aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos ir PAM sekos mutacijos įvedimas į <i>SEC59</i> geno seką.	66.7°C
G420D-TARG1 G420D-TARG2	<i>SEC59</i> geno taikiniui, esančiam šalia G420D mutacijos pozicijos, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
G420D-TARG2 ScSnr52-Pr	Plazmidžių, koduojančių <i>SEC59</i> geno taikiniui šalia G420D mutacijos pozicijos specifinę gRNR atranka.	50°C
ScS59-D3 ScS59-R1	<i>S. cerevisiae SEC59</i> geno donorinės DNR gamyba	64.1°C
ScS59-D1 ScS59-R2	Mielių <i>SEC59</i> geno fragmento padauginimas DNR sekoskaitai.	63.2°C
ScS59-D4	Mielių <i>SEC59</i> geno fragmento sekoskaita.	-
ScS59-ATG	Mielių <i>SEC59</i> geno fragmento sekoskaita.	-
ScS59-D1 ScS59-R1	<i>SEC59</i> geno raiškos kasetės padauginimas donorinės DNR gamybai arba klonavimui.	64.1°C
ScS59-ATG-TARG1 ScS59-ATG-TARG2	<i>SEC59</i> geno taikiniui, esančiam šalia ATG kodono, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
ScS59-STOP-TARG1 ScS59-STOP-TARG2	<i>SEC59</i> geno taikiniui, esančiam šalia STOP kodono, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
KlSnr52-Pr	Plazmidžių su <i>K. lactis SNR52</i> RNR promotoriaus kontroliuojamomis gRNR raiškos kasetėmis sekoskaita.	-
ScSnr52-Per	Plazmidžių su <i>S. cerevisiae SNR52</i> RNR promotoriaus kontroliuojamomis gRNR raiškos kasetėmis sekoskaita.	-

C99S-D C99S-R	C99S aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos ir PAM sekos mutacijos įvedimas į <i>DOLK</i> geno seką.	66°C
C99S-TARG1 C99S-TARG2	<i>DOLK</i> geno taikiniui, esančiam šalia C99S mutacijos pozicijos, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
W304C-D W304C-R	W304C aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos ir PAM sekos mutacijos įvedimas į <i>DOLK</i> geno seką.	66°C
W304C-TARG1 W304C -TARG2	<i>DOLK</i> geno taikiniui, esančiam šalia W304C mutacijos pozicijos, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
Y441S-D Y441S-R	Y441S aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos ir PAM sekos mutacijos įvedimas į <i>DOLK</i> geno seką.	69°C
Y441S -TARG1 Y441S -TARG2	<i>DOLK</i> geno taikiniui, esančiam šalia Y441S mutacijos pozicijos, komplementarią RNR seką koduojančio fragmento gamyba.	-
DOLK-R1	<i>DOLK</i> geno fragmento, su C99S aminorūgščių pokytį koduojančia mutacija, sekoskaita.	-
DOLK-D1	<i>DOLK</i> geno fragmento, su W304C aminorūgščių pokytį koduojančia mutacija, sekoskaita.	-
DOLK-D3	<i>DOLK</i> geno fragmento, su Y441S aminorūgščių pokytį koduojančiomis mutacijomis, sekoskaita.	-

## 2.5. Kompetentinių *Escherichia coli* ląstelių paruošimas, transformacija ir plazmidinės DNR gryninimas

Kompetentinės *Escherichia coli* bakterijų ląstelės buvo ruošiamos pagal Bolivar ir Backman pasiūlytą metodiką (Bolivar ir Backman 1979): DH5 $\alpha$  kamieno *E. coli* ląstelės buvo auginamos 25 ml LB terpės, 37°C temperatūroje per naktį. Kitą dieną bakterijų suspensija buvo perkeliama į kolbą su 500 ml LB terpės ir ląstelės auginamos, kol suspensijos OT 600 nm bangos ilgio šviesoje pasieks 0,6-0,7. Vėliau ląstelės surenkamos centrifuguojant 3000 aps./min greičiu 4°C temperatūroje (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius), o nusėdusios ląstelės suspenduojamos 50 ml šalto CaCl tirpalo ir per naktį laikomos ledo vonelėje, 4°C temperatūroje. Kitą dieną ląstelės centrifuguojamos tomis pačioms sąlygomis, suspenduojamos 10 ml šalto CaCl ir glicerolio tirpalo, o gauta ląstelių suspensija išpilstoma į mikrocentrifuginius mėgintuvėlius ir iki panaudojimo užšaldoma -80°C temperatūroje.

Prieš transformaciją užšaldytos kompetentinės *E. coli* ląstelės buvo atitirpinamos ledo vonelėje ir 180  $\mu$ l bakterijų suspensijos sumaišoma su 20  $\mu$ l DNR susiuvimo mišinio. Vėliau mėginiai buvo 30 min laikomi ledo vonelėje, po to 2 min perkeliama į 42°C vandeninį termostatą ir dar 2 min grąžinami į ledo vonelę. Tuomet transformuotos ląstelės buvo suspenduojamos 1 ml

LB terpės, inkubuojamos 37°C termostate 1-2 h, o vėliau surenkamos centrifuguojant 2 min 5000 aps./min greičiu ir nupylus terpę bei suspendavus likusioje terpėje, išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu, ir auginamos per naktį 37°C termostate. Jei į *E. coli* ląsteles buvo transformuojamas ne DNR susiuvimo mišinys, o plazmidinė DNR, 50 µl bakterijų suspensijos buvo sumaišoma su 1 µl plazmidės ir mišinys po 2 min ledo vonioje buvo iškart išsėjamas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu.

Plazmidinė DNR iš transformuotų bakterijų buvo gryninama užsėjant užaugusių bakterijų kolonijas į 5 ml LB terpės su ampicilinu ir auginant jas 37°C purtyklėje 16-20 h, o užaugusios bakterijų ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant mėgintuvėlius 8 min 3000 aps./min greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga). Vėliau bakterijos buvo suspenduojamos, lizuojamos ir lizato mišinys neutralizuojamas naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ („Thermo Fisher Scientific Baltics“) DNR gryninimo rinkinio tirpalus ir laikantis gamintojo rekomendacijų. Vėliau suardytų bakterijų mėginiai buvo centrifuguojami 13200 aps./min greičiu (Eppendorf 5415 D centrifuga), o supernatantas su ten esančia plazmidine DNR sumaišomas su 700 µl izopropanolio ir 5 min centrifuguojamas tomis pačiomis sąlygomis. Tuomet DNR nuosėdos suspenduojamos 500 µl 70 % etanolio ir dar kartą nucentrifugavus tomis pačiomis sąlygomis bei nupylus supernatantą, mėginiai išdžiovinami traukos spintoje ir DNR nuosėda ištirpinama 50 µl vandens. Jei iš bakterijų gryninamos plazmidės buvo naudojamos DNR sekoskaitai, jos buvo gryninamos naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ DNR gryninimo rinkinį ir vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis.

#### **Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

CaCl<sub>2</sub> tirpalas – 100 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma) autoklavuotas tirpalas, laikomas +4°C temperatūroje.

CaCl<sub>2</sub> ir glicerolio tirpalas – 100 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma) ir glicerolio (Merck) autoklavuotas tirpalas (santykiu 4:1), laikomas +4°C temperatūroje.

LB terpė – 2,5 % LB terpės (Thermo Fisher Scientific Baltics) autoklavuotas tirpalas, gaminant agarizuotą LB terpę pridėta 2 % agaro (Merck).

Ampicilino tirpalas – 50 mg/ml ampicilino (Roth) tirpalas vandenyje/etanolyje (santykiu 1:1), laikomas -20°C temperatūroje. Ampicilino buvo dėta į agarizuotas (50 µg/ml) ir skystas (30 µg/ml) LB terpes, kuriose augintos *E. coli* ląstelės po transformacijos.

## 2.6. Kompetentinių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija

Kompetentinės *S. cerevisiae* ląstelės buvo ruošiamos ir transformuojamos vadovaujantis modifikuota Gietz ir kolegų pasiūlyta metodika (Gietz et al., 1995): transformuojamas mielių kamienas užsėjamas į 5 ml YEPD terpės ir per naktį auginamas 30°C purtyklėje, o ryte 1 ml mielių suspensijos perkeliama į mėgintuvėlį su šviežia YEPD terpe ir mielės auginamos tomis pačiomis sąlygomis dar 2,5-3 h. Jei buvo transformuojamos mielės jau turinčios plazmidę su formaldehido dehidrogenazės genu, ląstelės užsėjamos ir persėjamos į YEPD terpę su 0,3 µl/ml formaldehido. Užaugusios ląstelės surenkamos centrifuguojant 3 min 2500 aps./min greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga), plaunamos 3 ml TE tirpalo, o nucentrifugavus tomis pačiomis sąlygomis suspenduojamos 3 ml TE-LiCl tirpalo ir 1 h inkubuojamos 30°C temperatūroje. Po to mielės dar kartą centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis ir nupylus supernatantą suspenduojamos likusiame tirpalo laše.

Transformuojant mieles, 15 µl kompetentinių mielių ląstelių buvo sumaišoma su 5 µl plazmidinės DNR arba 5 µl plazmidinės ir donorinės DNR mišinio (~0,5 µg plazmidinės ir ~1 µg donorinės DNR), ir inkubuojama kambario temperatūroje 30 min. Vėliau mėginiai sumaišomi su 40 µl TE-PEG tirpalo ir 50 min inkubuojami 30°C temperatūroje, o po to 25 min perkeliama į 42°C vandeninį termostatą. Jei mielės transformuojamos plazmide su formaldehido dehidrogenazės genu, mielės suspenduojamos 1 ml YEPD terpės, mikrocentrifuginuose mėgintuvėliuose steriliai praduriamos skylutės ir folija apdengti mėginiai per naktį inkubuojami 30°C temperatūroje. Ryte mėgintuvėliai trumpai nucentrifuguojami, terpė nupilama, o mielės suspenduojamos likusiame terpės laše ir išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės su 0,3 µl/ml formaldehido tirpalo. Mielės dvi paras auginamos 30°C termostate, o užaugę transformantai persėjami ant agarizuotos YEPD terpės su dviguba formaldehido koncentracija (0,6 µl/ml formaldehido tirpalo) ir auginamos 2 paras tomis pačioms sąlygomis. Jei mielės transformuojamos plazmide su *URA3* genu, mėginiai po inkubacijos 42°C vandeniniame termostate praskiedžiami 60 µl TE tirpalo ir mielės išsėjamos ant agarizuotos mielių mitybinės terpės be uracilo (Ura-). Transformantai 3-4 paras auginami 30°C termostate, o vėliau persėjami ant agarizuotos Ura- terpės ir auginami tomis pačiomis sąlygomis dar 2-4 paras.

### Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:

TE buferinis tirpalas – 10 mM Tris-HCl (Sigma) ir 0,1 mM EDTA (Sigma) autoklavuotas tirpalas.

TE-LiCl buferinis tirpalas – 0,1 M LiCl (Amresco) autoklavuotas tirpalas TE buferyje.

TE-PEG tirpalas – 50 % PEG 4000 (Sigma) autoklavuotas tirpalas TE buferyje.

YEPD mitybinė terpė – 2 % sojų peptono (Applichem), 2 % gliukozės (Applichem) ir 1 % mielių ekstrakto (Merck) autoklavuotas tirpalas, gaminant agarizuotą YEPD terpę pridėta 2 % agarą (Merck).

Mielių mitybinė terpė be uracilo (Ura-) – 2 % gliukozės (Applichem), 1 % kazeino hidrolizato (Sigma), 0,67 % mielių azotinės bazės (Amresco), 0,002 % L-triptofano (Biochemica) autoklavuotas tirpalas, gaminant agarizuotą Ura- terpę pridėta 2 % agarą (Merck).

Formaldehido tirpalas – 37 % formaldehido tirpalas (Applichem). Formaldehido tirpalo buvo dėta į skystą YEPD terpę (0,3 µl/ml) ir į agarizuotas YEPD terpes, ant kurių augintos (0,3 µl/ml) ir persėtos (0,6 µl/ml) mielių ląstelės po transformacijos.

## **2.7. Plazmidinės DNR pašalinimas iš mielių ląstelių**

Mielės su plazmidine DNR buvo užsėjamos į 5 ml skystos YEPD terpės su 20 µg/ml uracilo ir auginamos 30°C purtyklėje 16-20 h. Vėliau 100 µl terpės su užaugusiomis mielių ląstelėmis buvo perkeliama į mėgintuvėlį su šviežia YEPD terpe su 20 µg/ml uracilo ir mielės auginamos tomis pačiomis sąlygomis. Mielių suspensija taip buvo skiedžiama dar du kartus, o užaugusios mielės vėliau išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės mikrobiologine kilpele ir auginamos 30°C termostate 2 paras. Užaugusios pavienės mielių kolonijos išsėjamos ant agarizuotos YEPD terpės, agarizuotos YEPD terpės su 0,6 µl/ml formaldehido tirpalo ir ant Ura- terpės, o tolimesniems tyrimams naudojami klonai, kurie augo tik ant YEPD terpės.

### **Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

YEPD mielių mitybinė terpė (žr. 2.2.4)

Mielių mitybinė terpė be uracilo (Ura-; žr. 2.2.4)

Formaldehido tirpalas (žr. 2.2.4)

Uracilo tirpalas – 0,04 % uracilo (Amresco) autoklavuotas tirpalas.

## **2.8. Mielių ląstelių lizatų mėginių paruošimas NDS-PAGE**

Mielės užsėjamos į 5 ml YEPD terpės ir 16 h auginamos 24°C, 30°C ir 34°C arba 30°C ir 37°C temperatūros purtyklėse. Tolimesni veiksmai atliekami ledo vonelėje. Į mikrocentrifuginį

mėgintuvėlį perkeliama 1-1,5 ml mielių suspensijos ir mėginiai centrifuguojami 5 min. 5000 aps./min greičiu 4°C temperatūroje (Eppendorf 5415 D centrifuga). Nupylus supernatantą mėginiai pasveriami ir pagal mielių masę į mėgintuvėlius pridedamas gamintojo rekomenduojamas mielių lizavimo reagento Y-PER™ (Thermo Fisher Scientific Baltics), sumaišyto su PMSF tirpalu santykiu 10:1, kiekis. Vėliau mėginiai 20 min intensyviai purtomi kambario temperatūroje, tuomet 10 min centrifuguojami 13200 aps./min greičiu, o po centrifugavimo susidariusi viršutinė fazė sumaišoma su baltymų mėginių dažu santykiu 1:1 ir mėginiai 10 min. verdami 100 °C temperatūroje.

**Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

YEPD mielių mitybinė terpė (žr. 2.2.4)

PMSF tirpalas – 20 mM proteazių slopiklio PMSF (Applichem) tirpalas izopropanolyje (Reachim), laikomas -20°C temperatūroje.

Baltymų mėginių dažas – 0,5 M Tris-HCl (Sigma); 20 % glicerolio (Merck); 4 % NDS (Sigma) tirpalo; 0,001 % bromfenolio mėlio (Merck) ir 10 % merkptoetanolio (Roth) tirpalas.

**2.9. Mielių auginimo terpės mėginių paruošimas NDS-PAGE**

Mielės, transformuotos pFG-TDH2-Kex2-His6 arba pFG-PGK1-Pen4-His6 plazmidėmis (žr. 2.2), užsėjamos į 3 ml YEPD terpės su 0,3 µl/ml formaldehido tirpalo ir 24 h auginamos 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių purtyklėse. Mielėms užaugus, suspensijos OT buvo išmatuotas esant 600 nm bangos ilgiui. Pagal mielių kultūros OT vėliau buvo proporcingai apskaičiuojamas mėginių, suleidžiamų į poliakrilamido (PAA) gelio šulinėlius, tūris. Vėliau mėginiai buvo centrifuguojami 3 min 2500 aps./min greičiu (Eppendorf 5810 R centrifuga), o supernatantas nusiurbiamas, sumaišomas su baltymų mėginių dažu santykiu 1:1 ir mėginiai 10 min. verdami 100 °C temperatūroje.

**Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

YEPD mielių mitybinė terpė (žr. 2.2.4)

Formaldehido tirpalas (žr. 2.2.4)

Baltymų mėginių dažas (žr. 2.2.6)

## 2.10. Baltymų NDS-PAGE ir imunoblotingas

Baltymų NDS-PAGE ir imunoblotingas buvo atliekami pagal Walker aprašytą metodiką (Walker, 2002): mielių ląstelių lizatų arba auginimo terpės mėginiai su baltymų dažu po 20-40  $\mu$ l suleidžiami į poliakrilamido (PAA) gelio šulinėlius, o elektroforezė atliekama 1,5-2 h Tris-glicino/NDS buferiniame tirpale, vertikalios elektroforezės aparate, esant 40 mA nuolatinės srovės stiprumui ir 90-160 V įtampai. Po elektroforezės gelis buvo 20 min dažomas Coomassie brilliantinio mėlio dažu bei 3-4 kartus plaunamas gelių blukinimo tirpalu ir fotografuojamas, arba pamerkiamas į pernešimo buferį ir naudojamas imunoblotingui. Ant imunoblotingo aparato (Invitrogen BI 8072111) apatinio elektrodo dedamas pernešimo buferyje sušlapintas vatmano popieriaus lakštas, etanolyje ir pernešimo buferyje sušlapinta polivinilideno difluorido (PVDF, Amersham) membrana, PAA gelis ir dar vienas pernešimo buferyje sušlapintas vatmano popieriaus lakštas. Vėliau pavoliojant stikline lazdele išvaromi oro burbuliukai, uždedama ir pritvirtinama viršutinė imunoblotingo aparato dalis, o baltymų pernešimas ant PVDF membranos atliekamas 30 min, esant 700 mA srovei ir 20 V įtampai. Po baltymų pernašos PVDF membrana pamerkiama į blokavimo tirpalą ir lengvai purtoma kambario temperatūroje 2 h, o tuomet perkeliama į buteliuką su 3 ml TTBS tirpalo su 5  $\mu$ l Anti-CPY arba Anti-His pirminių antikūnų (Ak, žr. 2.3 lentelę) ir inkubuojama lengvai vartant per naktį. Kitą dieną membrana 3 kartus po 15 min plaunama TTBS tirpalu, o po to užpilama 3 ml TTBS su 1-2  $\mu$ l Anti-Rabbit-HRP arba Anti-Mouse-HRP (žr. 2.3 lentelę) antrinių Ak, konjuguotų su krienų peroksidaze. Membrana 2 valandas inkubuojama lengvai vartant, o tuomet 3 kartus po 15 min plaunama TTBS tirpalu ir 2 kartus po 5 min plaunama TBS tirpalu. Galiausiai PVDF membrana ryškinama naudojant TMB (Sigma) substratą, o išryškėjus baltymų juostelėms pamerkiama į vandenį.

### **Naudoti tirpalai ir antikūnai:**

Koncentruojantis gelis – tirpalas iš 3,2 % akrilamido-bisakrilamido tirpalo (Roth); 1,25 M Tris-HCl (Sigma) tirpalo (pH = 6,8) ; 0,1 % amonio persulfato (Roth); 1 % NDS (Sigma) ir 0,001 % TEMED (Sigma).

Frakcionuojantis gelis – tirpalas iš 7, 12 arba 13 % akrilamido-bisakrilamido (Roth); 0,375 M Tris-HCl (Sima) tirpalo (pH = 8,8) ; 0,1 % amonio persulfato (Roth); 1 % NDS (Sigma) ir 0,001 % TEMED (Sigma).

Tris-glicino/NDS elektroforezės buferinis tirpalas – 25 mM Tris (Sigma); 0,2 M glicino (Thermo Fisher Scientific Baltics) ir 0,1 % NDS (Sigma) tirpalas, pH = 8,3.



Coomassie brilliantinio mėlio dažas – 50 % etanolio (Honeywell); 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) ir 10 % acto rūgšties (Honeywell) tirpalas.

Baltymų molekulinės masės standartas – PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0671 (Thermo Fisher Scientific Baltics).

Pernešimo buferinis tirpalas – 25 mM Tris (Sigma), 150 mM glicino (Thermo Fisher Scientific Baltics) ir 10 % etanolio (Honeywell) tirpalas.

TBS buferinis tirpalas – 20 mM Tris (Sigma) ir 0,5 M NaCl (Merck) tirpalas (pH = 7,5).

TTBS buferinis tirpalas – 0,1 % Tween 20 (Thermo Fisher Scientific Baltics) tirpalas TBS buferyje.

Blokavimo tirpalas – 5 % lieso pieno miltelių (Merck) ir 5 mM natrio azido (Serva) tirpalas TTBS buferyje.

### 2.3 lentelė. Darbe naudoti antikūnai ir jų gamintojai.

<b>Antikūno pavadinimas</b>	<b>Antigenas</b>	<b>Organizmas</b>	<b>Gamintojas</b>
Anti-CPY Ak	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CPY	Triušis	GeneTex, JAV
Anti-His Ak	4 histidino aminorūgščių motyvas	Pelė	Qiagen, JAV
Anti-Rabbit-HRP Ak	Triušių IgG sunkioji ir lengvoji grandinės	Ožka	Bio-Rad, JAV
Anti-Mouse-HRP Ak	Pelių IgG sunkioji ir lengvoji grandinės	Ožka	Bio-Rad, JAV

### 2.11. Mielių jautrumo tunikamicinui ir CFW tyrimas

Nedidelis kiekis mielių biomasės nuo agarizuotos terpės buvo suspenduojamas 200 µl TE buferio 96 šulinėlių plokštelėje. Vėliau mielių suspensija buvo skiedžiama skirtinguose šulinėliuose 10, 100, 1000 ir 10000 kartų, o po 5 µl mielių suspensijos iš kiekvieno šulinėlio buvo užnešama ant agarizuotos YEPD terpės, YEPD terpės su 0,4 µg/ml tunikamicino ir YEPD terpės su 20 µg/ml CFW. Lėkštelės paliekamos steriliai išdžiūti ir tuomet mielės auginamos 24°C, 30°C ir 34°C arba 30°C ir 37°C temperatūrose 2-4 paras.

#### **Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

YEPD mielių mitybinė terpė (žr. 2.2.4)

Tunikamicino tirpalas – 1 mg/ml tunikamicino (Biotech) tirpalas etanolyje.

CFW tirpalas – 1 mg/ml fluorescuojančio „Calcofluor white“ dažo (Sigma) tirpalas.

## 2.12. $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo tyrimas

$\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas mielių ląstelėse buvo įvertinamas naudojant modifikuotą Hoshida aprašytą metodiką (Hoshida et al., 2005). Tiriamų mielių kamienų ląstelės buvo transformuojamos pFX7-Amy plazmide su bakterinės  $\alpha$ -amilazės raiškos kasete (žr. 2.2), o atrinkti transformantai užsėjami į 3 ml YEPD terpės su 0,3  $\mu$ l/ml 37 % formaldehido tirpalo ir mielės 18 h auginamos 24°C, 30°C ir 34°C purtyklėse. Vėliau mielių ląstelių kultūros OT buvo išmatuojamas 600 nm bangos ilgio šviesoje, o 100  $\mu$ l mielių auginimo terpės po centrifugavimo buvo sumaišoma su 50  $\mu$ l krakmolo tirpalo ir 2 h inkubuojama 37°C temperatūroje. Po inkubacijos 20  $\mu$ l terpės mėginio plokščiadugnėje 96 šulinėlių plokštelėje buvo sumaišoma su 180  $\mu$ l kalio jodido tirpalo ir mišinio OT išmatuojamas TECAN Infinite M200 aparatu 660 nm bangos ilgio šviesoje. Gautos OT reikšmės buvo atimamos iš kontrolinio mėginio OT reikšmės. Kontrolei naudojama terpė, kurioje augo tėvinio kamieno, su tuščia pFX7 plazmide, ląstelės. Mielių kamienų mėginių OT reikšmės buvo padalinamos iš tų pačių kamienų ląstelių kultūrų OT reikšmių. Tėvinio BY4741 kamieno, auginto 30°C temperatūroje, mėginiuose nustatytas  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas buvo prilyginamas 100 %, o pagal jį apskaičiuojamas tirtų mutantų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas. Atlikus matavimus su trimis to paties kamieno transformantais buvo apskaičiuojamas aritmetinis vidurkis ir standartinis nuokrypis.

### **Naudoti tirpalai ir mitybinės terpės:**

YEPD mielių mitybinė terpė (žr. 2.2.4)

Formaldehido tirpalas (žr. 2.2.4)

Krakmolo tirpalas: 2 % krakmolo (Sigma) tirpalas.

KI tirpalas – 25 mM acto rūgšties, 0,0075 % I<sub>2</sub> (Reachim) ir 0,075 % KI (Reachim) tirpalas, laikomas tamsoje.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. WGLD mutanto konstravimas

Siekiant įvertinti *SEC59* geno mutacijų įtaką mielių baltymų glikozilinimo ir sekrecijos efektyvumui buvo iširti penki mielių *S. cerevisiae* DK geno mutantai. Į laukinio tipo mielių kamieno BY4741 *SEC59* geną įvestos mutacijos, jų koduojami DK aminorūgščių pokyčiai, sutrumpinti mutantų pavadinimai ir mielių kamienai, kuriuose šios mutacijos buvo aptiktos, pateikti 3.1 lentelėje. W332G ir G420D DK mutacijos skirtingų autorių buvo identifikuotos kaip mutacijos, lemiančios *S. cerevisiae sec59-1* mutanto fenotipą (Orłowski et al., 2007; Shridas ir Waechter, 2006), o G407S ir L421S DK mutacijos atitinka *K. lactis* MD2/1-9 mutante aptiktus DK aminorūgščių pokyčius (G405S ir I419S atitinkamai, Žiogienė et al., 2019). Mielių *S. cerevisiae* GGL, WSL, WGS ir WSS mutantai, turintys W332G, G407S, L421S ir dvigubą G407S ir L421S DK mutacija atitinkamai, buvo sukonstruoti anksčiau (Burdulis, 2020), o šio darbo metu, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą, buvo sukonstruotas WGLD mutantas, turintis G420D aminorūgščių pokytį DK sekoje koduojančią mutaciją.

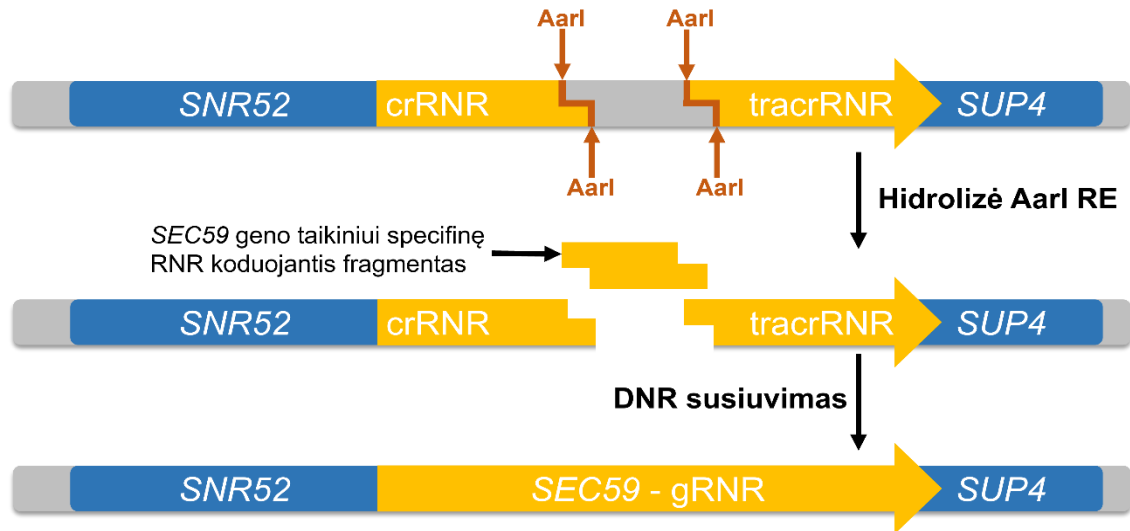
#### 3.1 lentelė. Į mielių *S. cerevisiae SEC59* geną įvestos mutacijos ir mutantų pavadinimai

	Trumpas mutanto pavadinimas	<i>SEC59</i> geno mutacijos	DK aminorūgščių sekos pokytis	Mielių kamienai, kuriuose buvo aptiktos mutacijos
1	<b>GGL</b>	TGG į GGT	W332G	<i>S. cerevisiae sec59-1</i> (Orłowski et al. 2007)
2	<b>WSL</b>	GGA į TCA	G407S	<i>K. lactis</i> MD2/1-9 (Ziogiene et al. 2019)
3	<b>WGLD</b>	GGT į GAT	G420D	<i>S. cerevisiae sec59-1</i> (Shridas ir Waechter 2006)
4	<b>WGS</b>	CTA į TCA	L421S	<i>K. lactis</i> MD2/1-9 (Ziogiene et al. 2019)
5	<b>WSS</b>	GGA į TCA ir CTA į TCA	G407S ir L421S	<i>K. lactis</i> MD2/1-9 (Ziogiene et al. 2019)

### 3.1.1 pFG-SnrSC-TARGS59 ir pJET-SEC59-WGLD plazmidžių konstravimas ir donorinės DNR paruošimas

Norint įvesti G420D aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją į laukinio tipo mielių *S. cerevisiae* BY4741 kamieno *SEC59* geną pirmiausia buvo sukonstruotos pFG-SnrSC-TARGS59 ir pJET-SEC59-WGLD plazmidės.

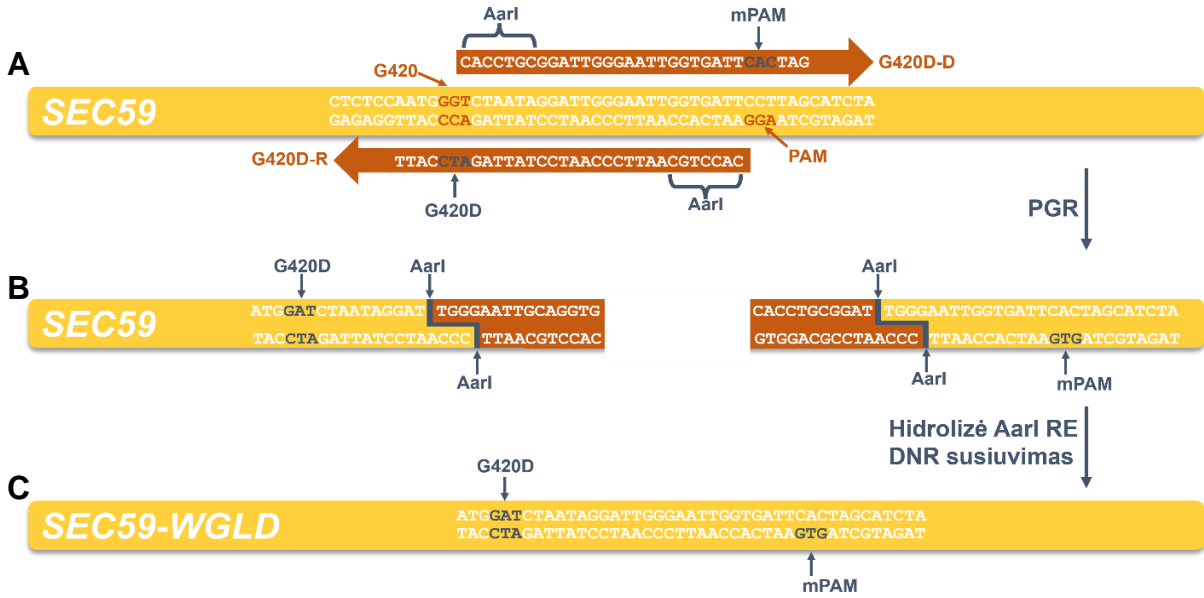
pFG-SnrSC-TARGS59 mielių raiškos vektorius, turintis *SEC59* geno taikiniui specifinę CRISPR-Cas9 sistemos gido RNR (gRNR) koduojantį fragmentą, buvo sukonstruotas naudojant pFG-SnrSC plazmidę (žr. 2.2). Šis mielių raiškos vektorius turi *S. cerevisiae* *SNR52* RNR promotoriaus ir *SUP4* terminatoriaus kontroliuojamą gRNR geną, sudarytą iš sulietų CRISPR-RNR (crRNR) ir trans-aktyvuojančią CRISPR-RNR (tracrRNR) koduojančių sekų (Burdulis, 2020). gRNR raiškos kasetėje vietoje taikinio DNR komplementarios sekos yra trumpa DNR seka su AarI RE atpažinimo taikiniaiais, kuri yra iškerpama iš plazmidės po hidrolizės šia RE ir tuomet į plazmidę galima įklonuoti norimam taikiniui specifinę RNR koduojančią seką (3.1 pav.). pFG-SnrSC plazmidė buvo hidrolizuota AarI RE, vektorius apvalytas nuo hidrolizės reakcijos mišinio komponentų, o vėliau, atliekant DNR susiuvimo reakciją, į linijinę plazmidę buvo įklonuotas *SEC59* geno taikiniui specifinę gRNR koduojantis 20 bp ilgio fragmentas (žr. 2.3), gautas hibridizuojant G420D-TARG1 ir G420D-TARG2 pradmenis (žr. 2.1 ir 2.2 lentelę). Vėliau DNR susiuvimo mišinys buvo transformuotas į kompetentines *E. coli* bakterijas (žr. 2.5) ir dešimt užaugusių bakterijų klonų buvo patikrinti atliekant bakterijų kolonijų PGR su DreamTaq polimeraze ir G420D-TARG2 – ScSnr52-Pr pradmenų pora (žr. 2.4). G420D-TARG2 pradmuo prisilydo prie taikinio sekai komplementarios gRNR dalies, todėl PGR reakcija galėjo vykti tik mėgintuvėliuose, kuriuose tirti bakterijų klonai turėjo pFG-SnrSC plazmidę su įklonuotu *SEC59* geno taikiniui specifinę gRNR koduojančiu fragmentu. PGR rezultatų analizė parodė, kad visi tirti bakterijų klonai turėjo pFG-SnrSC-TARGS59 plazmidę su įklonuotu taikinio sekai komplementariu fragmentu. Tai patvirtino ir iš kelių bakterijų klonų išskirtų plazmidžių (žr. 2.5) sekoskaitos, naudojant ScSnr52-Pr pradmenį, rezultatai.



### 3.1 pav. *SEC59* taikiniui specifinės gRNR raiškos kasetės konstravimo schema

*S. cerevisiae* SNR52 RNR promotoriaus ir SUP4 terminatoriaus (pažymėta mėlynai) kontroliuojamame gRNR gene, sudarytame iš crRNR ir tracrRNR koduojančių sekų (pažymėta geltonai) esantis DNR fragmentas (pažymėtas pilkai) yra iškerpamas po hidrolizės AarI RE (kirpimo vietos pažymėtos raudonai). Po hidrolizės į gRNR geną įklonuojama *SEC59* taikiniui specifinę RNR koduojanti gRNR dalis (pažymėta juoda rodykle).

WGLD mutantų konstravimui naudota donorinė DNR buvo paruošta į *SEC59* geno seką, esančią pJET-SEC59 vektoriuje (žr. 2.2), įvedus G420D aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją ir tylinčią PAM sekos mutaciją PGR pagalba. Mutagenezei buvo naudojama aukšto tikslumo Phusion High-Fidelity polimerazė bei G420D-D ir G420D-R pradmenys (žr. 2.4), turintys į *SEC59* geną norimas įvesti mutacijas ir AarI RE atpažinimo sekas savo galuose. Po PGR atlikus elektroforezę 0,8 % agarozės gelyje, išfrakcionuoti ~5 kb ilgio PGR produktai buvo išgryninti iš gelio ir hidrolizuoti AarI RE, o po hidrolizės reakcijos nuo fermentų apvalyti linijiniai DNR fragmentai buvo susiūti į žiedinę DNR molekulę ir transformuoti į *E. coli* bakterijas (žr. 2.3 ir 2.5). Padaugintų plazmidžių galuose su pradmenimis įvestos AarI RE atpažinimo sekos po hidrolizės šia RE yra nukerpamos, o susidarę komplementarūs lipnūs galai leidžia po DNR susiuvimo reakcijos atstatyti mutantinio *sec59* geno sekos integralumą ties įvestomis mutacijomis (3.2 pav.). Norint patvirtinti, kad sukonstruotose plazmidėse esančiuose DK geno fragmentuose buvo įvesta G420D aminorūgščių pokytį koduojanti mutacija ir PAM sekos mutacija buvo atlikta atrinktų plazmidžių sekoskaita su ScS59-D4 pradmeniu (žr. 2.1 lentelę).



### 3.2 pav. G420D aminorūgščių pokytį koduojančios ir PAM sekos mutacijų įvedimo į *SEC59* geną pJET-*SEC59* plazmidėje schema

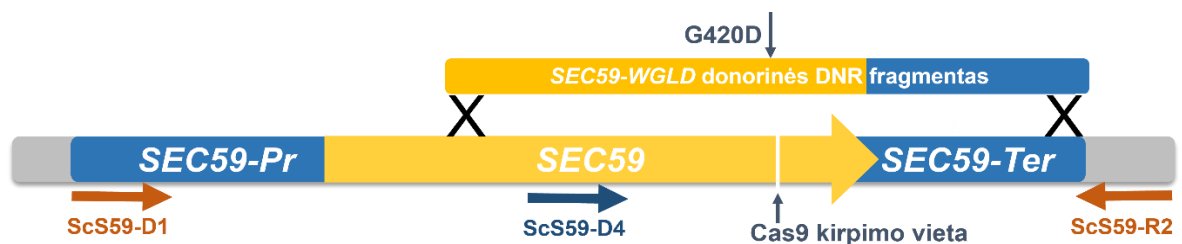
**A** - naudojant pJET-*SEC59* plazmidę su laukinio tipo *SEC59* genu (pažymėta geltonai, raudonai pažymėtas G420 aminorūgštį koduojantis kodonas ir PAM seka) buvo atlikta PGR su G420D-D ir G420D-R pradmenimis, turinčiais AarI RE atpažinimo sekas (pažymėta mėlynai) ir PAM sekos bei G420D aminorūgščių pokytį koduojančias mutacijas (mPAM ir G420 atitinkamai, pažymėta mėlynomis rodyklėmis). **B** - po PGR reakcijos gauti produktai buvo hidrolizuojami AarI RE, kuri nukerpa DNR fragmentų galuose esančius AarI atpažinimo taikinius (AarI RE kirpimo vietas pažymėtos mėlynai, nukerpamos DNR fragmentų dalys – raudonai). **C** – PGR produktai lipniais galais buvo susiūti į žiedinę DNR molekulę, sukonstruojama pJET-*SEC59*-WGLD plazmidė su G420D aminorūgščių pokytį koduojančia ir PAM sekos mutacija DK geno sekoje.

Donorinė DNR buvo susintetinta po PGR su aukšto tikslumo Phusion High Fidelity polimeraze ir ScS59-D3 – ScS59-R1 pradmenų pora, kaip matricą naudojant sukonstruotą pJET-*SEC59*-WGLD plazmidę (žr. 2.4). PGR būdu padaugintas 1,2 kb fragmentas, apimantis *sec59* geno dalį su įvestomis mutacijomis, bei DK geno terminatorių, buvo apvalytas nuo PGR reakcijos komponentų (žr. 2.4) ir naudojamas tolimesniuose eksperimentuose.

#### 3.1.2 Mielių transformacija ir WGLD mutantų atranka

Mielių *S. cerevisiae* mutantai, turintys G420D aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją DK geno sekoje, buvo sukonstruoti naudojant CRISPR-Cas9 sistemą. Pirmiausia laukinio tipo BY4741 kamieno mielių ląstelės buvo transformuotos pFG-SnrSC-TARGS59 plazmide su

gRNR raiškos kasete, o mielių transformantai atrinkti ant YEPD terpės su formaldehidu. Vėliau užaugusios mielės buvo transformuotos pKDSU-PGK1-Cas9 plazmide su Cas9 endonukleazės raiškos kasete (žr. 2.2) ir *sec59* geno donorinės DNR fragmentu su įvestomis PAM sekos ir G420D aminorūgščių pokyčių koduojančiomis mutacijomis, o transformantai atrinkti ant mielių mitybinės terpės be uracilo (žr. 2.6). Buvo tikimasi, kad gRNR nukreipus Cas9 endonukleazę prie *SEC59* geno taikinio, fermento padarytas dvigrandis DNR trūkis bus užtaisytas homologinės rekombinacijos būdu, kaip matricą naudojant kartu su plazmide transformuotą donorinės DNR fragmentą (3.3 pav.). Jam pakeitus mielių chromosomoje esantį *SEC59* geno fragmentą, pakartotinė hidrolizė Cas9 endonukleaze nebeturėtų vykti dėl kartu su G420D aminorūgščių pokyčių koduojančia mutacija įvestos PAM sekos mutacijos.



### 3.3 pav. Laukinio tipo mielių chromosomoje esančio *SEC59* geno fragmento pakeitimo donorinės DNR fragmentu schema

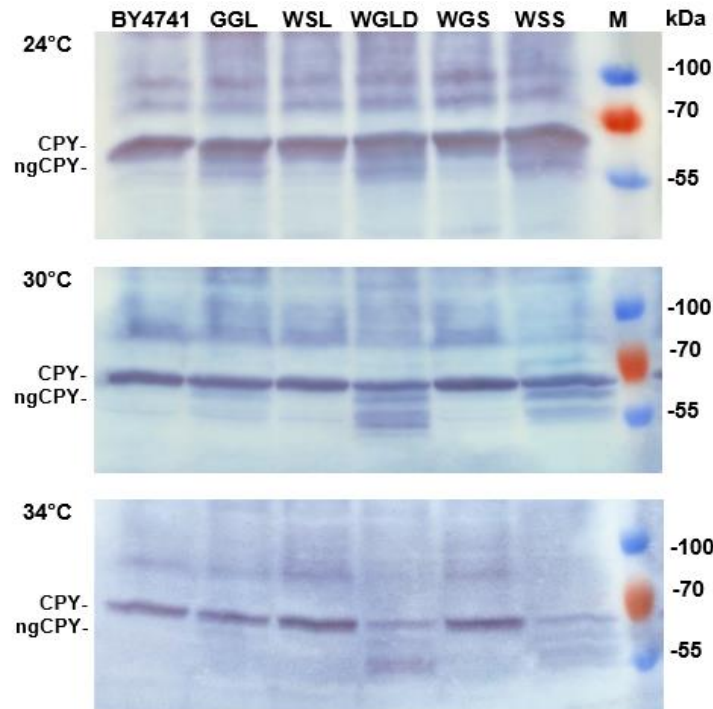
Cas9 endonukleazės kirpimo vietoje (pažymėta mėlyna rodykle) atsiradęs dvigrandis DNR trūkis užtaisomas homologinės rekombinacinės reparacijos būdu, kurios metu mielių chromosomoje esantis *SEC59* geno fragmentas pakeičiamas donorinės DNR fragmentu su DK geno sekoje įvesta G420D aminorūgščių pokyčių koduojančia mutacija. Raudonomis rodyklėmis pažymėta pradmenų pora (ScS59-D1 – ScS59-R2), naudojama WGLD mutantų *sec59* geno fragmento padauginimui, o mėlyne rodykle – pradmuo naudojamas jo sekoskaitai (ScS59-D4).

WGLD mutantai buvo atrinkti įvertinus 47 ant selektyvios terpės užaugusių mielių transformantų jautrumą tunikamicinui (žr. 2.11). Tunikamicinas inhibuoja Alg7p glikoziltransferazės veiklą ir DK mutantai yra jam jautresni nei laukinio tipo ląstelės. Tarp patikrintų mielių transformantų, 15 buvo jautrūs tunikamicinui, o trijų tunikamicinui jautrių klonų DK geno fragmentas buvo padaugintas atliekant PGR su aukšto tikslumo Phusion High Fidelity DNR polimeraze ir ScS59-D1 – ScS59-R2 pradmenų pora bei atlikta jo sekoskaita su ScS59-D4 pradmeniu (žr. 2.4 ir 3.3 pav.). Išanalizavus sekoskaitos duomenis nustatyta, kad tik vieno iš trijų patikrintų klonų DK geno sekoje buvo įvesta mutacija, koduojanti G420D aminorūgščių pokyčių. Vėliau iš šio mielių klonu buvo pašalintos transformuotos plazmidės (žr. 2.7), o sukonstruotas WGLD mielių kamienas buvo naudojamas tolimesniuose tyrimuose.

### 3.2 CPY glikozilinimo efektyvumo analizė mielių *S. cerevisiae* DK mutantuose

Į laukinio tipo mielių *SEC59* geną įvestų mutacijų įtaka *S. cerevisiae* baltymų glikozilinimo efektyvumui buvo įvertinta imunoblotingo metodu analizuojant mielių vakuolinės CPY glikozilinimo efektyvumą laukinio tipo BY4741 kamieno ir GGL, WSL, WGLD, WGS bei WSS mutantų, augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiuose (žr. 2.8 ir 2.10). Glikozilinimo metu prie baltymų prijungti glikanai ženkliai padidina jų molekulinę masę, todėl pilnai ir nepilnai glikozilintus baltymus galima atskirti pagal dydį, išfrakcionavus juos atliekant baltymų elektroforezę poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE, 3.4 pav.).

Išanalizavus imunoblotingo rezultatus buvo pastebėta, kad WGLD ir WSS mutantų CPY glikozilinimo efektyvumas tik nežymiai sumažėjo 24°C temperatūroje tačiau buvo smarkiai paveiktas aukštesnėse 30°C ir 34°C temperatūrose. Nedidelis CPY glikozilinimo efektyvumo sumažėjimas buvo stebimas ir GGL mutante, o WSL bei WGS mutantų CPY glikozilinimas nesiskyrė nuo laukinio tipo BY4741 ląstelių.



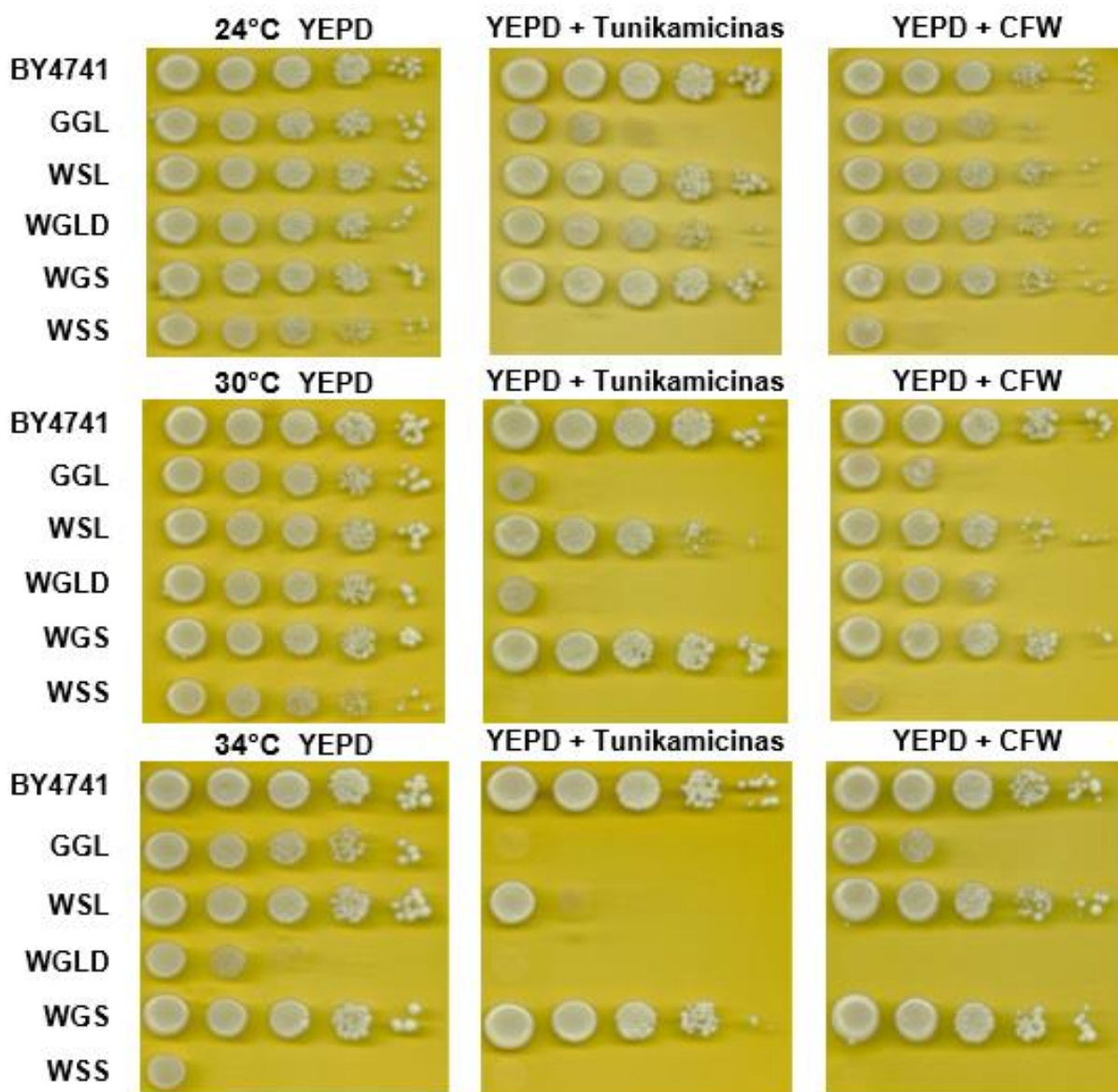
### 3.4 pav. CPY glikozilinimo efektyvumo analizė *S. cerevisiae* sec59 mutantuose imunoblotingo metodu

Takeliuose: laukinio tipo kamieno BY4741 ir GGL, WSL, WGLD, WGS bei WSS mutantų, augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas, kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY.



### 3.3 DK mutantų jautrumo tunikamicinui ir CFW įvertinimas

Mielių jautrumas tunikamicinui yra susijęs su N-glikozilinimo sutrikimais, o jautrumas CFW rodo mielių ląstelės sienelės struktūros pokyčius, kadangi CFW prisijungia prie ląstelės sienelėje esančio chitino, todėl DK mutantų augimo pokyčiai terpėse su tunikamicinu ir CFW skirtingose temperatūrose leidžia įvertinti tiriamų mutacijų poveikį mielėms (3.5 pav.; žr. 2.11).



### 3.5 pav. *S. cerevisiae sec59* mutantų jautrumo tunikamicinui ir CFW analizė

Laukinio tipo kamieno BY4741 ir GGL, WSL, WGLD, WGS bei WSS mutantų augimo skirtumai, auginant mieles 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių temperatūrose ant YEPD terpės, YEPD terpės su tunikamicinu, ir YEPD terpės su CFW.

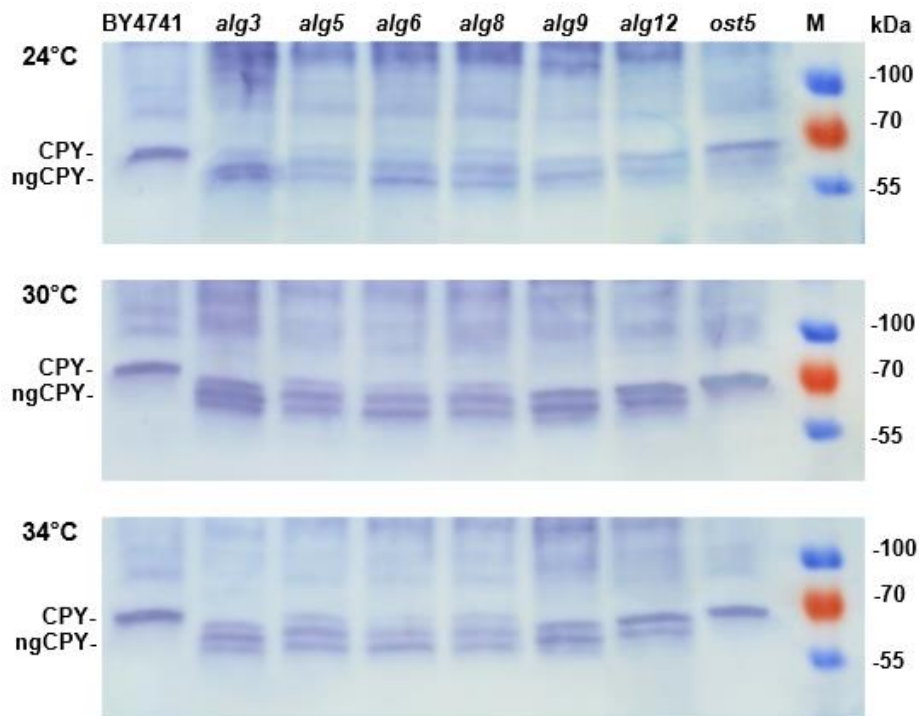
Užauginus mieles ant YEPD terpės be nuodų 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių temperatūrose buvo pastebėta, kad GGL, WSL ir WGS mutantai visose tirtose temperatūrose augo taip pat gerai, kaip ir laukinio tipo BY4741 kamieno ląstelės. Tiek WGLD, tiek WSS mutantai ženkliai blogiau augo tik 34°C temperatūroje, o žemesnėse 24°C ir 30°C laipsnių temperatūrose jų augimas buvo nepakitęs.

Tiriant sukonstruotų mielių mutantų jautrumą tunikamicinui ir CFW buvo pastebėta, kad nei WSL, nei WGS mutantų jautrumas šiems junginiams nebuvo padidėjęs 24°C ir 30°C laipsnių temperatūrose, tačiau WSL mutantas blogiau nei laukinio tipo ląstelės augo 34°C temperatūroje, jei terpėje buvo tunikamicino. Sukonstruotas WGLD mutantas buvo nejautrus nei tunikamicinui, nei CFW 24°C temperatūroje, tačiau aukštesnėse temperatūrose jo jautrumas šiems junginiams ženkliai padidėjo, kaip ir GGL kamieno. Tuo tarpu WSS mutantas buvo jautrus ir tunikamicinui, ir CFW visose tirtose temperatūrose.

### **3.4 Glikozilinimo sutrikimų poveikio rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui mielėse *S. cerevisiae* tyrimai**

Siekiant daugiau sužinoti apie glikozilinimo pokyčių poveikį baltymų sekrecijos efektyvumui, mielėse *S. cerevisiae* buvo iširtas trijų modelinių rekombinantinių baltymų – krevečių sarkoplazmos Ca prisijungiančio Pen-m4 baltymo, mielių *S. cerevisiae* KEX2 peptidazės ir *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas. Rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumo pokyčiai buvo įvertinti sukonstruotuose *sec59* mutantuose ir taip pat pirmame glikozilinimo ET etape dalyvaujančias glikoziltransferazes koduojančių neesminių genų mielių nuliniuose mutantuose: *Δalg3*, *Δalg5*, *Δalg6*, *Δalg8*, *Δalg9* ir *Δalg12* bei *Δost5* mutante, kuriame išaktyvintas *OST5* genas, koduojantis OST komplekso subvienetą.

CPY glikozilinimo efektyvumo analizė imunoblotingo metodu (žr. 2.8 ir 2.10) *Δalg* mutantų, augintų 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiuose parodė, kad nepriklausomai nuo auginimo temperatūros, CPY glikozilinimo efektyvumas šiuose mutantuose, kaip ir kai kuriuose *sec59* mutantuose, buvo ženkliai pakitęs. Tuo tarpu *OST5* geno nuliniuose mutantuose CPY glikozilinimo efektyvumas buvo panašus į laukinio tipo BY4741 kamieno ir nežymiai pablogėjo tik 24°C temperatūroje (3.6 pav.).

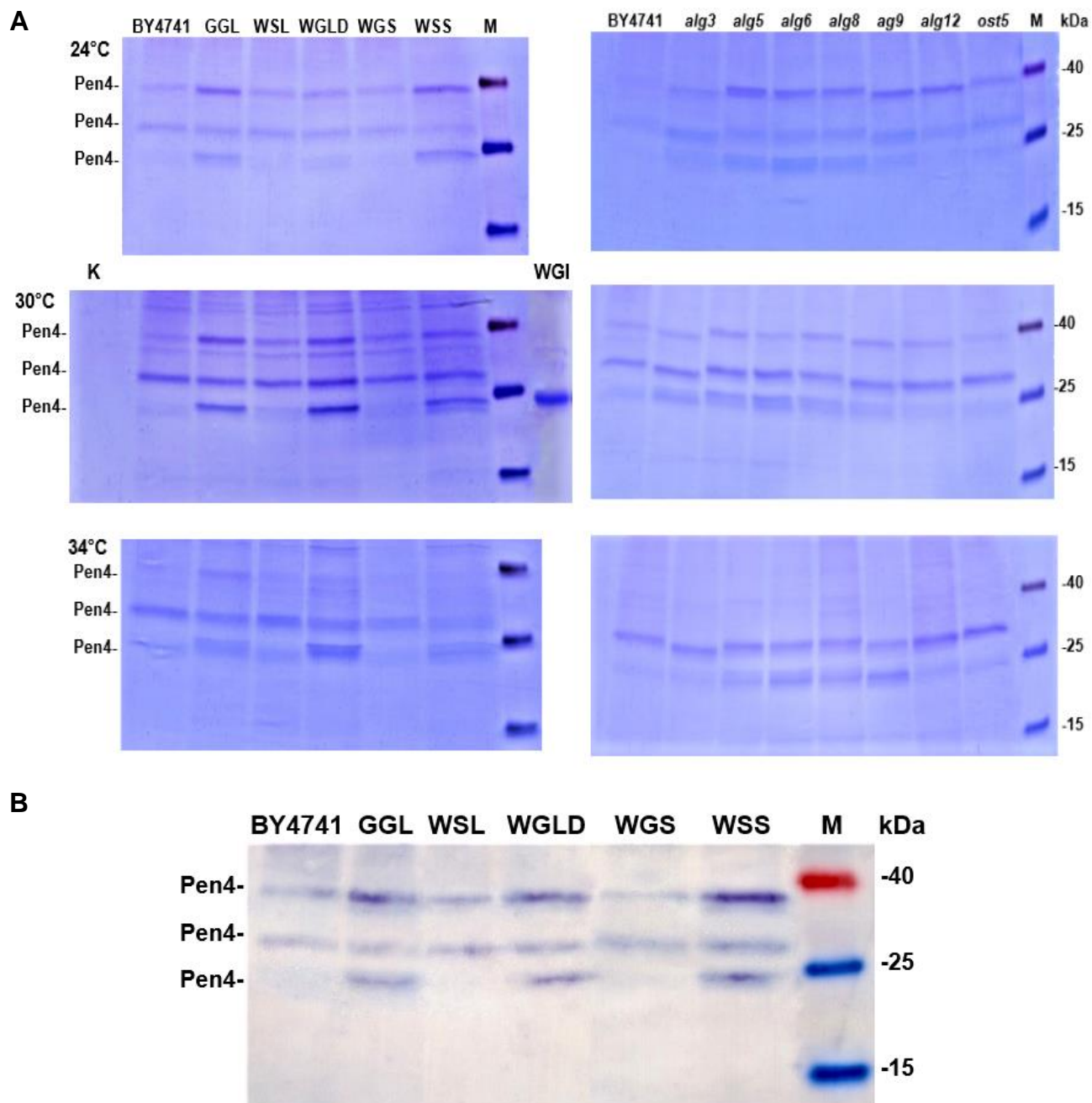


### 3.6 pav. *S. cerevisiae* $\Delta alg$ ir $\Delta ost5$ mutantų CPY glikozilinimo efektyvumo analizė imunoblotingo metodu

Takeliuose: laukinio tipo kamieno BY4741 ir  $\Delta alg3$ ,  $\Delta alg5$ ,  $\Delta alg6$ ,  $\Delta alg8$ ,  $\Delta alg9$ ,  $\Delta alg12$  bei  $\Delta ost5$  mutantų, augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas, kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY.

#### 3.4.1 Pen-m4 sekrecijos efektyvumo nustatymas

Pen-m4 baltymo sekrecijos efektyvumas mielių *sec59*,  $\Delta alg$  bei  $\Delta ost5$  mutantų kamienuose buvo tiriamas juos transformavus pFG-PGK1-Pen4-His6 plazmide (žr. 2.2) su Pen-m4 baltymo raiškos kasete. Atrinkti mielių transformantai buvo auginti skystoje YEPD terpėje su formaldehidu, 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių temperatūrose, o mielių auginimo terpės mėginiai išanalizuoti PAA geliuose po NDS-PAGE. Taip pat buvo išanalizuoti 30°C temperatūroje augintų laukinio tipo BY4741 kamieno, transformuoto pFG vektoriumi (neigiama kontrolė) ir mielių *K. lactis* CBS2359 laukinio tipo kamieno, transformuoto pFG-PGK1-Pen4-His6 plazmide auginimo terpių mėginiai. *sec59* mutantų, augintų 30°C temperatūroje, auginimo terpių mėginiai buvo papildomai išanalizuoti ir atliekant imunoblotingą, norint nustatyti, kurios PAA geliuose matomos juostelės yra mielių ląstelių išsekretuoti Pen-m4 baltymai. (žr. 2.9 ir 2.10).



### 3.7 pav. Mielių *S. cerevisiae* mutantų Pen-m4 sekrecijos efektyvumo analizė

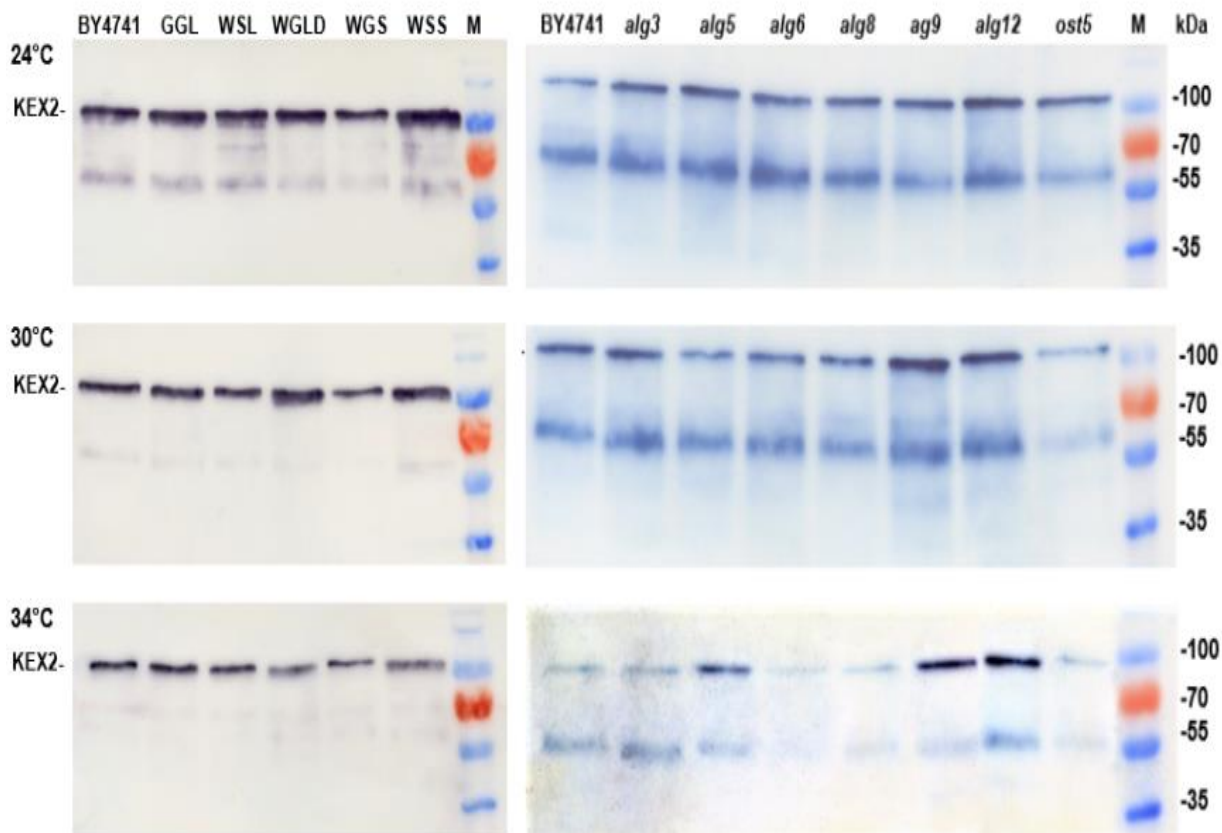
Takeliuose: laukinio tipo BY4741 ir *sec59*,  $\Delta$ *alg* ir  $\Delta$ *ost5* mutantų, transformuotų pFG-PGK1-Pen4-His6 plazmide ir augintų 24°C, 30°C bei 34°C temperatūrose, auginimo terpių mėginiai, išanalizuoti PAA geliuose po NDS-PAGE (A) ir imunoblotingo (B) metodu. K – BY4741 kamieno, transformuoto tuščia pFG plazmide ir auginto 30°C temperatūroje auginimo terpės mėginys, WGI – mielių *K. lactis*, transformuotų pFG-PGK1-Pen4-His6 plazmide ir augintų 30°C temperatūroje, auginimo terpės mėginys. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Išanalizavus NDS-PAGE ir imunoblotingo rezultatus buvo pastebėta, kad *S. cerevisiae* mielių ląstelės sekretavo tiek neglikozilintą (~25 kDa), tiek ir glikozilintą (~30 ir ~40 kDa) Pen-m4 formas, kai tuo tarpu *K. lactis* mielės sekretavo tik neglikozilintą Pen-m4 baltymą. Tarp tirtų DK mutantų GGL, WGLD ir WSS kamienų ląstelės geriausiai sekretavo Pen-m4 baltymą visose tirtose temperatūrose, bet ypač 30°C temperatūroje. Šie mutantai vieninteliai sekretavo neglikozilintą Pen-m4 baltymą 24°C temperatūroje, o ir glikozilinto Pen-m4 (~40 kDa) kiekis šiuose mutantuose buvo padidėjęs. Efektyviausia Pen-m4 sekrecija tarp visų tirtų *Δalg* mutantų pasižymėjo *Δalg5*, *Δalg6*, *Δalg8* ir *Δalg9* mutantai, o mielės su pašalintu *OST5* genu Pen-m4 sekretavo panašiai, kaip ir laukinio tipo ląstelės. Tiek *sec59*, tiek *Δalg* bei *Δost5* mutantų, ir net laukinio tipo ląstelių, augusių 34°C temperatūroje, auginimo terpių mėginiuose beveik nebuvo aptinkama labiausiai glikozilinta Pen4 baltymo forma (3.7 pav.).

### 3.4.3 Rekombinantinės KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumo analizė

Mielių *S. cerevisiae sec59*, *Δalg* bei *Δost5* mutantų, transformuotų pFG-TDH2-Kex2-His6 plazmide su rekombinantinės KEX2 peptidazės genu (žr. 2.2) ir augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, auginimo terpių mėginiai buvo panaudoti KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumo tyrimui imunoblotingo metodu (žr. 2.9 ir 2.10).

Išanalizavus imunoblotingo rezultatus pastebėta, kad efektyviausia KEX2 peptidazės sekrecija vyko 24°C temperatūroje ir tirtų DK geno mutantų grupėje geriausiai baltymą sekretavo dvigubas WSS mutantas, nors GGL ir WGLD mutantai taip pat pasižymėjo didesniu KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumu nei tėvinis BY4741 kamienas ir WSL bei WGS mutantai. KEX2 peptidazės sekrecijos skirtumai *Δalg* mutantuose labiausiai pasireiškė 34°C temperatūroje, o ypač efektyviai KEX2 peptidazę sekretavo mielių kamienai su pašalintais *AGL5*, *ALG9* ir *ALG12* genais, kai tuo tarpu *Δost5* mutanto KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumas buvo panašus į laukinio tipo ląstelių (3.8 pav.).

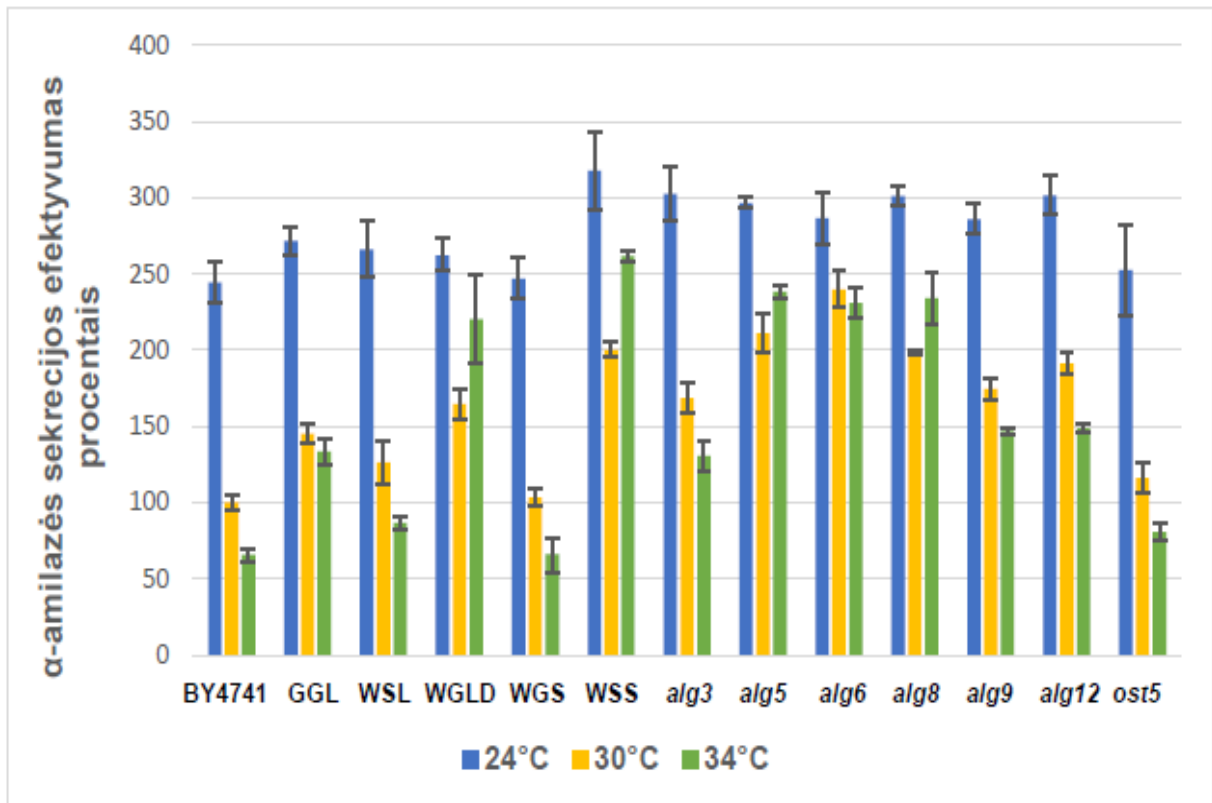


### 3.8 pav. KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumo analizė mielių *S. cerevisiae* *sec59*, $\Delta$ *alg* ir $\Delta$ *ost5* mutantuose imunoblotingu metodu

Takeliuose: laukinio tipo BY4741 ir mutantų, transformuotų pFG-TDH2-Kex2-His6 plazmide ir auginių 24°C, 30°C bei 34°C temperatūrose, auginimo terpių mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas „PageRuler Prestained Protein Ladder“. Kairėje pažymėta KEX2 peptidazės molekulinė masė.

### 3.4.4 $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo įvertinimas

$\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas mielių mutantuose buvo įvertintas transformavus mieles pFX7-Amy plazmide su bakterinės  $\alpha$ -amilazės raiškos kasete (žr. 2.2), o atrinktus transformantus užauginus 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose. Tuomet mielių auginimo terpės mėginiai buvo sumaišyti su 2 % krakmolo tirpalu, o po inkubacijos 37°C temperatūroje – su kalio jodido tirpalu. Išmatavus gauto mišinio OT 660 nm bangos ilgio šviesoje mielių kamienų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas buvo įvertintas pagal kontrolinio BY4741 kamieno  $\alpha$ -amilazės sekrecijos lygį 30°C temperatūroje, kuris buvo prilygintas 100 % (žr. 2.12, 3.9 pav.).

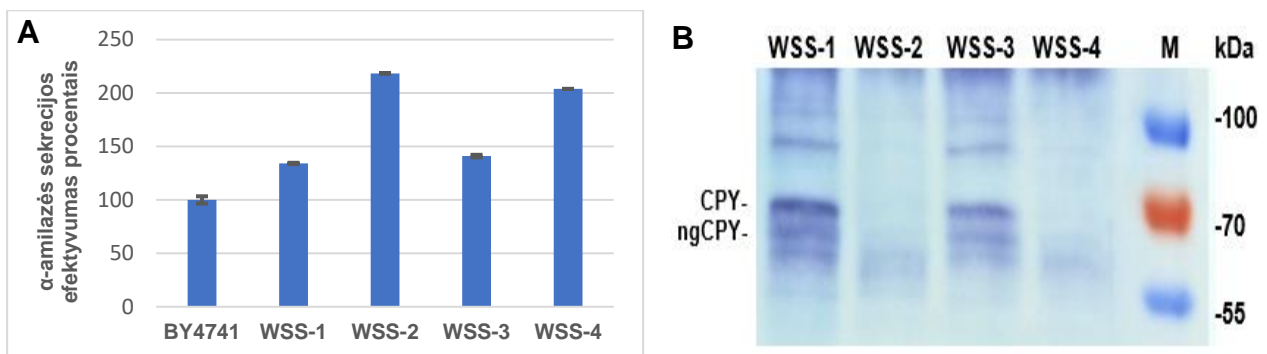


**3.9 pav. Mielių *S. cerevisiae* mutantų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo tyrimo rezultatai** Mielių *S. cerevisiae* mutantų, transformuotų pFX7-Amy plazmide,  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas apskaičiuotas tiriant mielių auginimo terpėje esančio krakmolo suskaidymo lygį. Sekrecijos efektyvumas, išreikštas procentais, pavaizduotas diagramos Y ašyje, kontrolinio BY4741 kamieno sekrecijos efektyvumas 30°C temperatūroje prilygintas 100 %. Stulpelių spalvos žymi  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumą 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose.

Išanalizavus gautus rezultatus buvo pastebėta, kad  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas 24°C temperatūroje buvo labai padidėjęs ir panašus ne tik visuose tirtuose mutantuose, bet ir laukinio tipo BY4741 kamieno. Tuo tarpu 30°C ir 34°C temperatūrose visi tirti  $\Delta alg$ , bet ne  $\Delta ost5$  mutantai  $\alpha$ -amilazę sekretavo ~1,5-2,5 karto efektyviau nei laukinio tipo kamieno ląstelės. Tarp tirtų DK mutantų, GGL kamieno  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas buvo maždaug 1,5 karto didesnis nei laukinio tipo ląstelių, o WSS ir WGLD mutantuose 34°C temperatūroje jis padidėjo net iki 2,5 karto. WGS ir WSL mutantuose  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas visose temperatūrose mažai skyrėsi nuo tėvinio BY4741 kamieno.

### 3.5 DK E319K mutacijos įtakos mielių *S. cerevisiae* glikozilinimui tyrimai

Tiriant  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumą keliuose WSS mutantų klonuose, transformuotuose pFX7-Amy plazmide, buvo pastebėta, kad jis stipriai skyrėsi tarp tirtų transformantų (3.10 pav., A). WSS-1 ir WSS-3 klonai 30°C temperatūroje pasižymėjo tik nežymiai efektyvesne  $\alpha$ -amilazės sekrecija, nei BY4741 kamieno ląstelės, kai tuo tarpu WSS-2 ir WSS-4 klonai, kaip ir įprasta šiems mutantams,  $\alpha$ -amilazę sekretavo dvigubai efektyviau, nei laukinio tipo kamieno ląstelės. Pastebėjus  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo pokyčius, imunoblotingo metodu buvo ištirtas šių klonų CPY glikozilinimo efektyvumas 34°C temperatūroje. Išanalizavus imunoblotingo rezultatus pastebėta, kad WSS-1 ir WSS-3 klonuose CPY buvo glikozilinama efektyviau, nei WSS-2 bei WSS-4 klonuose (3.10 pav., B).



### 3.10 pav. Mielių *S. cerevisiae* WSS mutantų klonų $\alpha$ -amilazės sekrecijos ir CPY glikozilinimo efektyvumo analizė

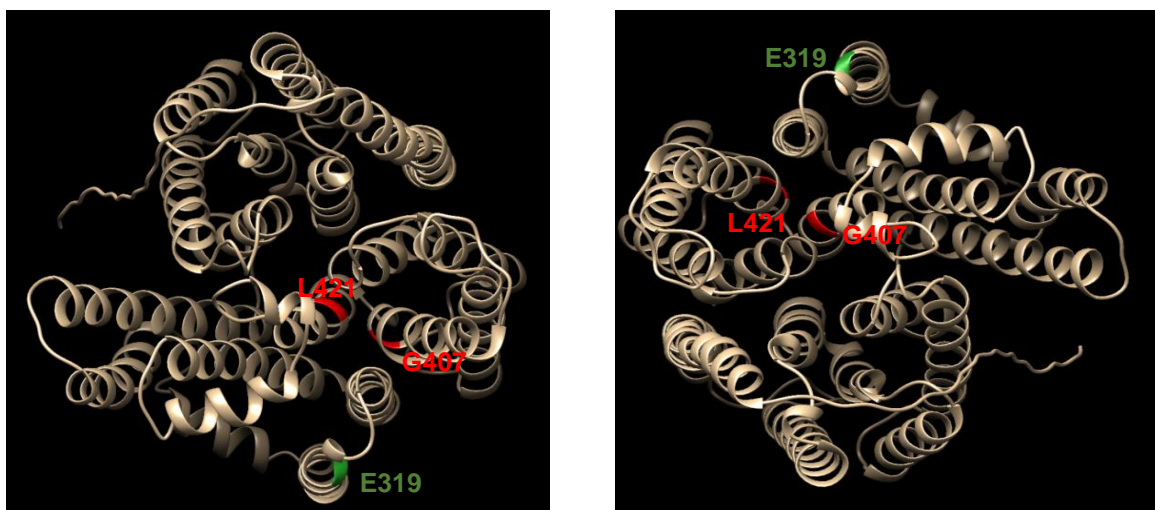
**A** - mielių *S. cerevisiae* WSS mutantų klonų, transformuotų pFX7-Amy plazmide,  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas 30°C temperatūroje, apskaičiuotas tiriant mielių auginimo terpėje esančio krakmolo suskaidymo lygį. Sekrecijos efektyvumas, išreikštas procentais, pavaizduotas diagramos Y ašyje, kontrolinio BY4741 kamieno sekrecijos efektyvumas 30°C temperatūroje prilygintas 100 %. **B** - mielių *S. cerevisiae* WSS mutantų klonų, transformuotų pFX7-Amy plazmide, CPY glikozilinimo efektyvumo tyrimas imunoblotingo metodu. Takeliuose – WSS-1, WSS-2, WSS-3 ir WSS-4 klonų, augintų 34°C temperatūroje, ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas, kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY.

Įtariant, kad  $\alpha$ -amilazės sekrecijos ir CPY glikozilinimo efektyvumo pokyčius galėjo nulemti tirtų WSS klonų DK gene atsiradusios spontaninės reversinės ar supresorinės mutacijos, jų DK geno fragmentas buvo padaugintas PGR būdu naudojant ScS59-D1 – ScS59-R1 pradmenų porą ir nusekvenuotas naudojant ScS59-ATG ir ScS59-D4 pradmenis (žr. 2.4). Išanalizavus sekoskaitos rezultatus buvo pastebėta, kad nors WSS-1 ir WSS-3 klonų DK gene išliko mutacijos, koduojančios G407S ir L421S aminorūgščių pokyčius, abu šie klonai turėjo



papildomą mutaciją, koduojančią E319K aminorūgščių pokytį (GAG -> AAG), kai tuo tarpu WSS-2 ir WSS-4 mutantų DK genai turėjo tik G407S ir L421S aminorūgščių pokyčius koduojančias mutacijas.

Išanalizavus sumodeliuotą mielių *S. cerevisiae* DK struktūrą (AlphaFold modelio ID: AF-P20048-F1) buvo pastebėta, kad nors G407 ir L421 aminorūgštys, kurių mutacijos aptinkamos WSS mutante, erdvinėje baltymo struktūroje yra išsidėsčiusios visiškai šalia viena kitos, E319 aminorūgštis yra smarkiai nuo jų nutolusi erdvėje. Visgi, baltymo spiralės, kurioje yra E319K mutacija, pozicija neleidžia atmesti prielaidos, kad 319 aminorūgštis gali priartėti prie 407 ir 421 aminorūgščių baltymo spiralių judėjimo metu (3.11 pav.).



### 3.11 pav. *S. cerevisiae* DK erdvinės struktūros modelis

WSS mutantuose pasikeičia raudonai nuspalvintos G407 ir L421 aminorūgštys, o šio mutanto klonuose (WSS-1 ir WSS-3) aptinkama žaliai nuspalvinta supresorinė E319K mutacija. DK modelio ID: AF-P20048-F1, baltymo struktūros vizualizavimui naudota UCSF Chimera programa

### 3.5.1 E319K aminorūgščių pokytį koduojančios mutacijos įvedimas į BY4741 ir WSS kamienų DK geną

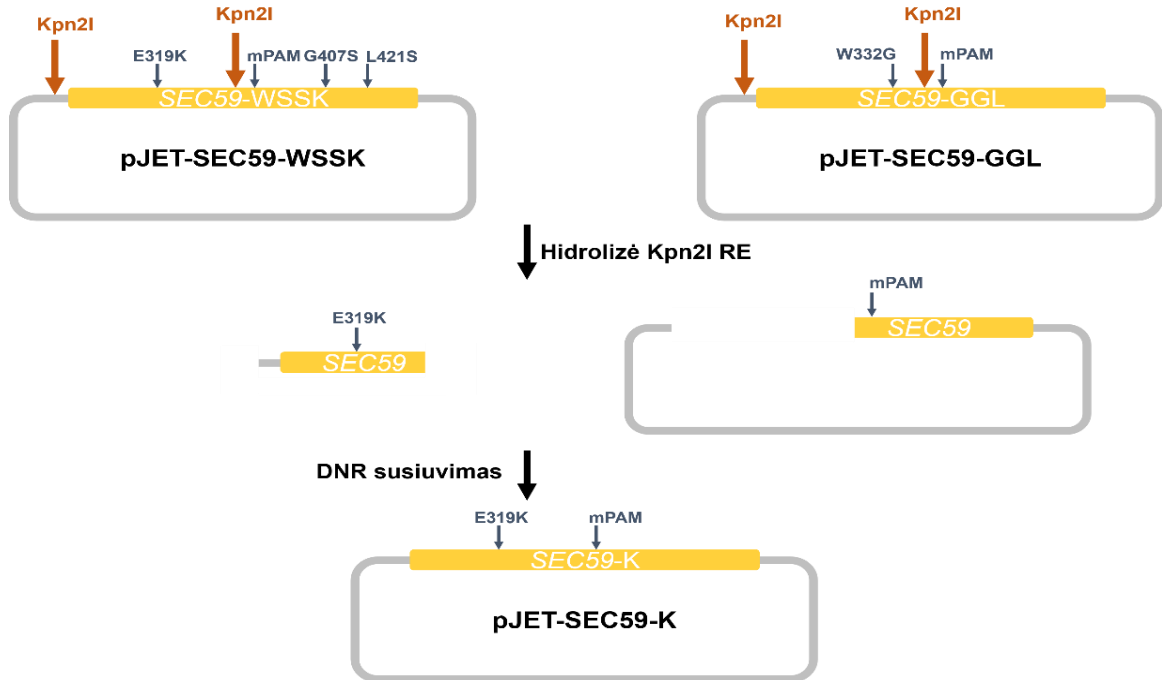
Norint įsitikinti, kad  $\alpha$ -amilazės sekrecijos ir CPY glikozilinimo efektyvumo pokyčius WSS-1 ir WSS-3 klonuose sąlygojo DK E319K mutacija, šį aminorūgščių pokytį koduojanti mutacija buvo įvesta į mielių *S. cerevisiae* BY4741 ir WSS kamienus. Tam pirmiausia buvo sukonstruota pJET-SEC59-K plazmidė su *sec59* geno fragmentu, turinčiu E319K aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją ir pJET-SEC59-WSSK plazmidė su *sec59* geno fragmentu, turinčiu

E319K, G407S ir L421S aminorūgščių pokyčius koduojančias mutacijas.

pJET-SEC59-WSSK plazmidė buvo sukonstruota į pJET1.2/blunt (žr. 2.2) vektorių įklonuojant WSS-1 klonu DK geno fragmentą, padauginant naudojant PGR su ScS59-D1 – ScS59-R1 pradmenų pora (žr. 2.3 ir 2.4). Sekoskaitos būdu patikrinus sukonstruotas plazmidės buvo patvirtinta, kad į jas buvo įklonuotas *sec59* genas su E319K, G407S ir L421S aminorūgščių pokyčius koduojančiomis mutacijomis, bei D392 aminorūgštį koduojančiame kodone esančia tylinčia PAM sekos mutacija, įvesta konstruojant WSS mutantus (Burdulis, 2020).

pJET-SEC59-K plazmidė buvo sukonstruota naudojant pJET-SEC59-WSSK vektorių ir pJET-SEC59-GGL plazmidę (žr. 2.2), kuri buvo naudota mielių *S. cerevisiae* GGL mutantų konstravimui (Burdulis, 2020). pJET-SEC59-GGL plazmidėje esančiame *sec59* gene yra įvesta W332G aminorūgščių pokytį koduojanti mutacija ir tylinči PAM sekos mutacija D392 aminorūgštį koduojančiame kodone. Šios plazmidės turi du Kpn2I RE atpažinimo taikinius – vienas taikinis yra pJET1.2/blunt klonavimo vektoriaus daugybinio įklonavimo vietoje, prieš įklonuotą DK geną, o kitas – DK geno viduje, tarp 332 aminorūgšties kodono ir PAM sekos mutacijos. Šios plazmidės buvo hidrolizuotos Kpn2I RE, o hidrolizės reakcijos mišiniai išfrakcionuoti 0,8 % agarozės gelyje. Vėliau iš gelio išgrynintas pJET-SEC59-WSSK plazmidėje buvęs *sec59* geno fragmentas su E319K aminorūgščių pokytį koduojančia mutacija buvo susiūtas su pJET-SEC59-GGL plazmidės dalimi, turinčia DK geno fragmentą su PAM sekos mutacija ir likusią pJET1.2/blunt klonavimo vektoriaus dalį (žr. 2.3, 3.12 pav.). DNR susiuvimo mišinys buvo transformuotas į kompetentines *E. coli* bakterijas, o sekoskaitos būdu patikrinus iš transformantų išskirtas pJET-SEC59-K plazmidės buvo įsitikinta, kad jose esančiame DK gene buvo įvesta E319K aminorūgščių pokytį koduojanti mutacija ir PAM sekos mutacija.

Norint sukonstruoti mielių *S. cerevisiae* BY-K ir WSSK mutantus, turinčius E319K ir E319K, G407S bei L421S aminorūgščių pokyčius koduojančias DK geno mutacijas atitinkamai, laukinio tipo BY4741 kamieno ląstelės buvo transformuotos pFG-SnrSC-TARGS59-D392 plazmide su DK geno taikiniui ties D392 aminorūgštimi specifinės gRNR raiškos kasete (žr. 2.2). Tuomet atrinkti mielių transformantai buvo transformuoti pKDSU-PGK1-Cas9 plazmide ir donorinės DNR fragmentu, gautu padauginant pJET-SEC59-K arba pJET-SEC59-WSSK plazmidėse esantį DK geno fragmentą atliekant PGR su ScS59-D3 – ScS59-R1 pradmenų pora (žr. 2.4).



### 3.12 pav. pJET-SEC59-K plazmidės konstravimo schema

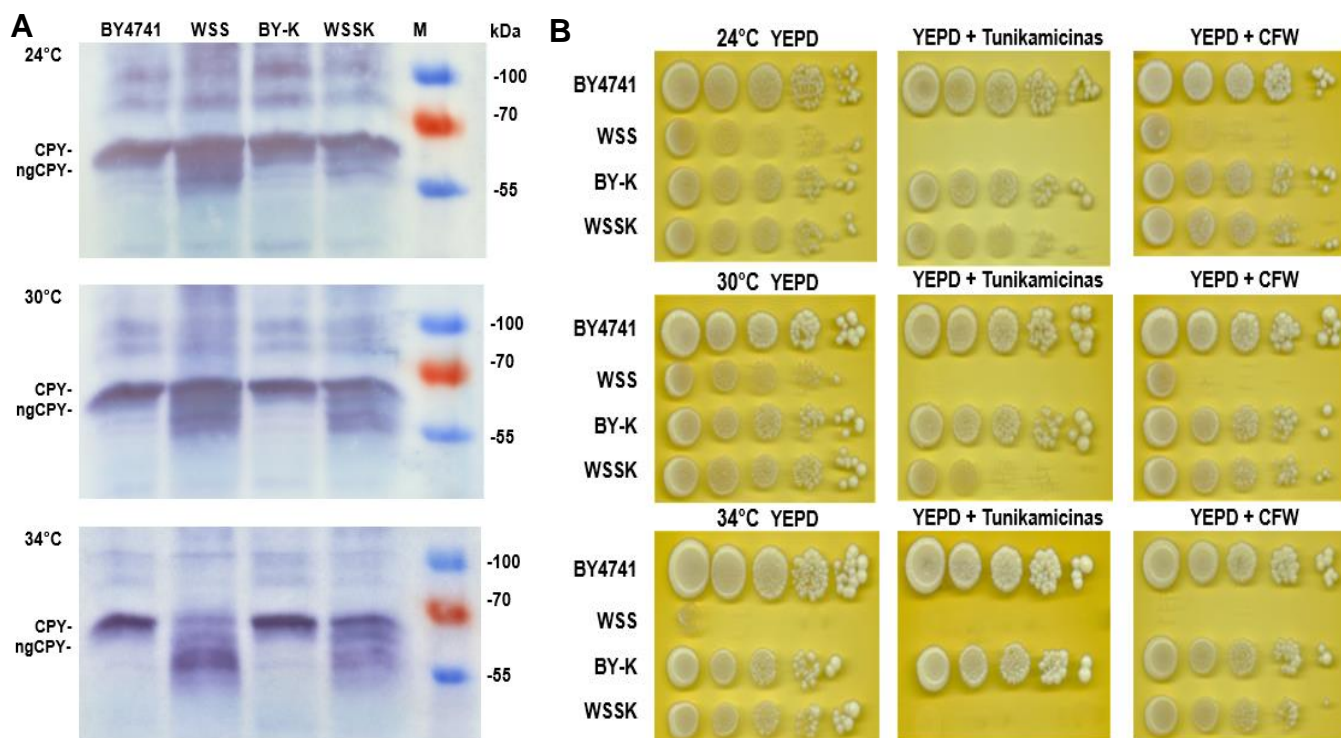
pJET-SEC59-WSSK ir pJET-SEC59-GGL plazmidės buvo hidrolizuotos Kpn2I RE (RE atpažinimo vietos pažymėtos raudonai). Po hidrolizės ir DNR elektroforezės iš agarozės gelio buvo išgrynintas pJET-SEC59-WSSK plazmidės fragmentas, su DK geno dalimi, turinčia E319K aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją ir pJET-SEC59-GGL plazmidės fragmentas, su DK geno dalimi, turinčia PAM sekos mutaciją (mPAM) ir likusia pJET vektoriaus dalimi. Išgryninti DNR fragmentai buvo susiūti į pJET-SEC59-K plazmidę.

Kadangi nebuvo žinoma, kaip E319K aminorūgščių pokytį koduojanti mutacija paveiks BY4741 ir WSS kamienų jautrumą tunikamicinui, buvo atrinkta po 10 šių kamienų transformantų, ir jų DK koduojantis geno fragmentas buvo padaugintas naudojant PGR su ScS59-D1 – ScS59-R2 pradmenų pora (žr. 2.4). Vėliau gauti PGR produktai buvo hidrolizuoti Eco47I RE (žr. 2.3). Šios RE atpažinimo seka, esanti DK gene, dingsta įvedus tylinčią PAM sekos mutaciją D392 aminorūgštį koduojančiame kodone, taigi pagal PGR produktų ilgus po hidrolizės galima nustatyti, kuriuose mielių transformantuose yra homologinės rekombinacijos metu įvesta PAM sekos mutacija. Įvertinus restrikcinės analizės rezultatus buvo pastebėta, kad PAM sekos mutaciją turėjo 3 iš 10 tirtų mielių klonų transformuotų donorinės DNR fragmentu su E319K DK mutacija ir 6 iš 10 tirtų klonų transformuotų donorinės DNR fragmentu su E319K, G407S bei L421S DK mutacijomis. Šių transformantų *SEC59* geno fragmentai, padauginami naudojant PGR su ScS59-D1 – ScS59-R2 pradmenų pora, buvo nusekvenuoti naudojant

ScS59-D4 pradmenį. Išanalizavus sekoskaitos rezultatus nustatyta, kad buvo sukonstruotas vienas BY-K mutantas ir trys WSSK mutantai, turintys E319K ir E319K, G407S bei L421S DK mutacijas atitinkamai.

### 3.5.2 DK E319K mutacijos poveikio mielių *S. cerevisiae* CPY glikozilinimui ir jautrumui tunikamicinui bei CFW nustatymas

Įvedus E319K aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją į mielių *S. cerevisiae* BY4741 ir WSS kamienų DK geną, buvo įvertintas šios mutacijos poveikis mielių CPY glikozilinimui ir jautrumui tunikamicinui bei CFW.



### 3.13 pav. *S. cerevisiae* DK geno mutantų CPY glikozilinimo efektyvumo ir jautrumo tunikamicinui bei CFW tyrimas

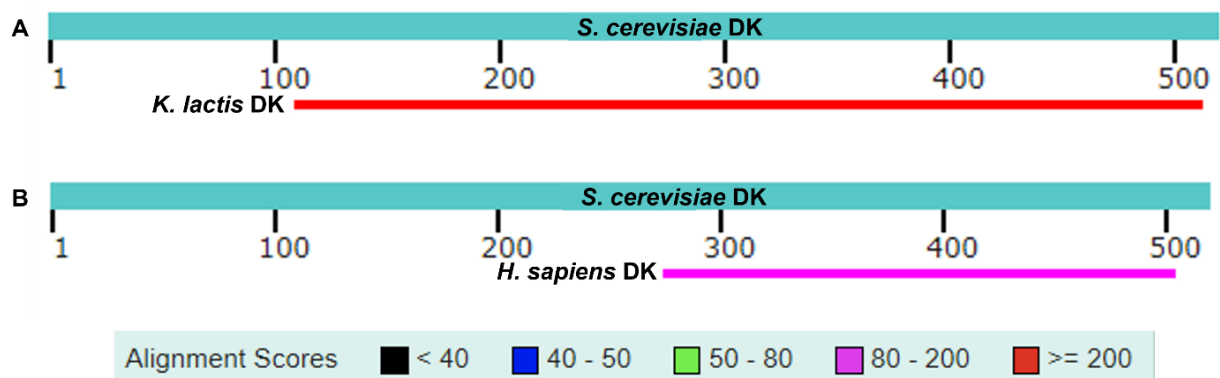
**A** – CPY glikozilinimo efektyvumo tyrimas imunoblotingo metodu. Takeliuose: laukinio tipo kamieno BY4741 ir WSS, BY-K bei WSSK mutantų, augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas, kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY. **B** - Laukinio tipo kamieno BY4741 ir WSS, BY-K bei WSSK mutantų augimo skirtumai, auginant mieles 24°C, 30°C ir 34°C laipsnių temperatūrose ant YEPD terpės, YEPD terpės su tunikamicinu, ir YEPD terpės su CFW.

CPY glikozilinimo efektyvumo tyrimas sukonstruotų mielių mutantų, auginamų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiuose parodė, kad WSSK mutante CPY glikozilinimo efektyvumas dėl DK E319K mutacijos padidėjo lyginant su WSS kamieniu ir šie glikozilinimo pokyčiai tarp WSS ir WSSK mutantų ypač išryškėjo 34°C temperatūroje. Tuo tarpu BY-K mutante DK E319K mutacija jokio poveikio neturėjo, nes BY-K mutantas CPY glikozilino taip pat gerai, kaip ir laukinio tipo BY4741 kamieno ląstelės (3.13 pav., A).

Išanalizavus mielių mutantų jautrumą temperatūrai ir tunikamicinui bei CFW 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose pasirodė, kad į *sec59* geną įvedus E319K aminorūgščių pokytį koduojančią mutaciją WSS mutantų atsparumas padidėjo (3.13 pav., B). WSSK mutantai, skirtingai nei WSS mutantai, augo ant terpės su tunikamicinu 24°C ir šiek tiek 30°C, bet ne 34°C temperatūroje, buvo atsparūs CFW visose tirtose temperatūrose, o ant YEPD terpės be nuodų 34°C temperatūroje augo taip pat gerai, kaip ir laukinio tipo BY4741 kamieno ląstelės.

### 3.6 *S. cerevisiae* kamienų su *K. lactis* ir žmogaus DK genais konstravimas

Nepaisant to, kad ET vykstantys glikozilinimo procesai yra panašūs visuose eukariotuose, skirtingų organizmų DK gali įvairiai skirtis tarpusavyje. Nors mielių *K. lactis* DK pasižymi gana dideliu panašumu į mielių *S. cerevisiae* DK (3.14 pav. A), žmogaus DK nuo jos smarkiai skiriasi ir mažiausiai panašios yra šių baltymų N galo sekos (3.14 pav. B). Vienas iš šio darbo tikslų buvo įvertinti, kaip *K. lactis* ir *H. sapiens* DK komplementuoja *S. cerevisiae* DK kinazės funkcijas mielėse su pašalinta jų DK.



**3.14 pav. Mielių *S. cerevisiae* DK baltymo sekos palyginimo su mielių *K. lactis* (A) ir žmogaus (B) DK sekomis schema**

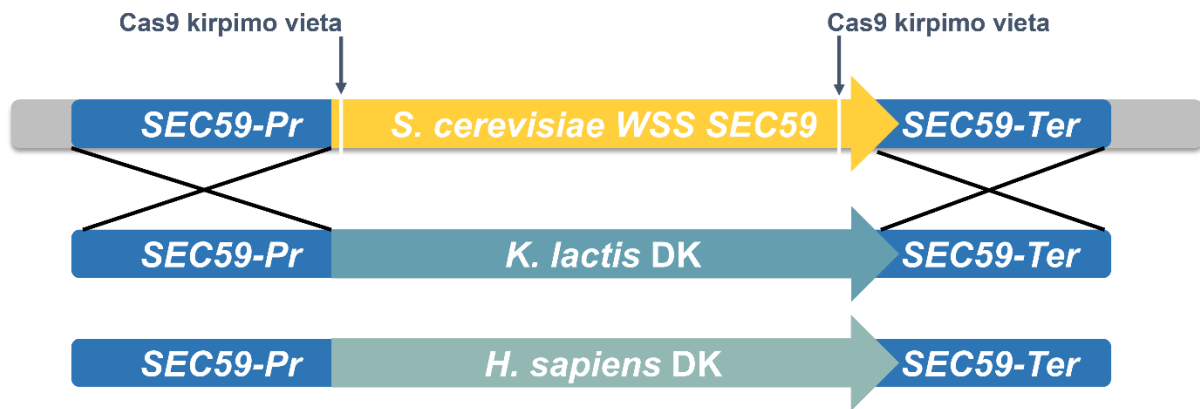
Sekų palyginimas atliktas naudojant BlastP įrankį, apačioje nurodytas sekų panašumo įverčių žymėjimas.

Tam buvo sukonstruoti mielių *S. cerevisiae* BY-KL ir BY-HS kamienai, kuriuose, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą, *S. cerevisiae* DK genas buvo pakeistas mielių *K. lactis* ir žmogaus DK koduojančias genais atitinkamai. Siekiant užtikrinti mielių genomo redagavimo efektyvumą, genų pakeitimui buvo naudojamos dvi gRNR molekulės, nukreipiančios Cas9 endonukleazę prie taikinių, esančių šalia *SEC59* geno ATG ir STOP kodonų. Tam buvo sukonstruota pFG-SnrSc-STOP plazmidė: į pFG-SnrSc vektorių buvo įklonuotas *SEC59* geno taikiniui šalia STOP kodono komplementarią RNR seką koduojantis fragmentas, gautas hibridizuojant ScS59-STOP-TARG1 ir ScS59-STOP-TARG2 pradmenis (žr. 2.2 lentelę ir 3.1.1). Papildomai buvo sukonstruota pJET-SnrKl-ATG plazmidė: hibridizuojant ScS59-ATG-TARG1 ir ScS59-ATG-TARG2 pradmenis gautas fragmentas, koduojantis šalia ATG kodono esančiam *SEC59* geno taikiniui specifinę RNR seką buvo įklonuotas į pJET-SnrKl plazmidę. pJET-SnrKl plazmidėje, kaip ir pFG-SnrSc plazmidėje, yra gRNR genas, sudarytas iš sulietų crRNR ir tracrRNR koduojančių sekų, tarp kurių yra įklonuojama taikiniui specifinę RNR koduojanti seka, tačiau šis gRNR genas yra reguliuojamas ne *S. cerevisiae*, o *K. lactis* *SNR52* RNR promotoriaus ir *SUP4* terminatoriaus (žr. 2.2). Tuomet pJET-SnrKl-ATG plazmidė buvo hidrolizuota BglII RE ir iš jos iškirptas ~500 bp fragmentas su gRNR raiškos kasete buvo išgrynintas iš agarozės gelio ir įklonuotas į pFG-SnrSc-STOP plazmidę, perkirptą SmaI RE (žr. 2. 3). Taip buvo sukonstruotas pFG-TARGS59-ATG-STOP mielių raiškos vektorius su raiškos kasetėmis, koduojančiomis *SEC59* geno taikiniams šalia ATG ir STOP kodonų specifines gRNR. Taikiniams specifines RNR koduojančių fragmentų įklonavimas į sukonstruotas plazmides buvo patvirtintas nustatant plazmidžių nukleotidų sekas sekoskaitos būdu, naudojant ScSnr52-Pr ir KlSnr52-Pr pradmenis (žr. 2.1 ir 2.2 lentelę).

Genomo redagavimui reikalingų donorinės DNR fragmentų gamybai buvo naudojamos pJET-S59PT-KL ir pJET-S59PT-HS plazmidės, turinčios *S. cerevisiae* *SEC59* promotoriaus ir terminatoriaus kontroliuojamus *K. lactis* ir *H. sapiens* DK genus atitinkamai. DK koduojantys genai nuo šių plazmidžių buvo padauginėti naudojant ScS59-D1 ir ScS59-R1 pradmenų porą ir atliekant PGR su aukšto tikslumo Phusion High Fidelity DNR polimeraze. Vėliau PGR produktai buvo apvalyti nuo PGR reakcijos mišinio komponentų ir naudojami tolimesniuose eksperimentuose.

Mielių genomo redagavimas buvo atliekamas pirmiausia transformuojant *S. cerevisiae* WSS kamieno kompetentines ląsteles pFG-TARGS59-ATG-STOP plazmidė, o atrinktus

transformantus dar kartą transformuojant pKDSU-PGK1-Cas9 plazmide ir pagamintu donorinės DNR fragmentu. Susintetinti donorinės DNR fragmentai savo galuose turėjo *S. cerevisiae* genomui komplementarias *SEC59* geno promotoriaus ir terminatoriaus sekas, kurių pagalba galėjo vykti homologinė rekombinacija ir po Cas9 hidrolizės *S. cerevisiae* DK geno fragmentas buvo pakeičiamas mielių *K. lactis* arba žmogaus DK koduojančiais fragmentais (3.15 pav.). Mielių *S. cerevisiae* kamienai su pakeistu DK genu buvo atrinkti įvertinant mielių transformantų jautrumą tunikamicinui (žr. 2.11). Buvo tikimasi, kad mielių WSS mutantuose pakeitus *sec59* geną, kurio mutacijos lemia mielių jautrumą tunikamicinui, *S. cerevisiae* kamienai taps jam atsparūs. Buvo pastebėta, kad iš 57 ir 53 patikrintų mielių klonų, transformuotų donorinės DNR fragmentu su mielių *K. lactis* arba žmogaus DK koduojančiais genais, atitinkamai 21 ir 11 klonų buvo atsparūs tunikamicinui. Atsitiktinai atrinkus po tris tunikamicinui atsparius mielių klonus, jų DK koduojantys fragmentai buvo padauginti atliekant PGR su ScS59-D1 – ScS59-R2 pradmenimis ir nusekvenuoti naudojant ScS59-R1 pradmenį. Buvo pastebėta, kad visuose tirtuose tunikamicinui atspariuose klonuose *S. cerevisiae* DK genas buvo pakeistas mielių *K. lactis* arba žmogaus DK koduojančiais genais atitinkamai.



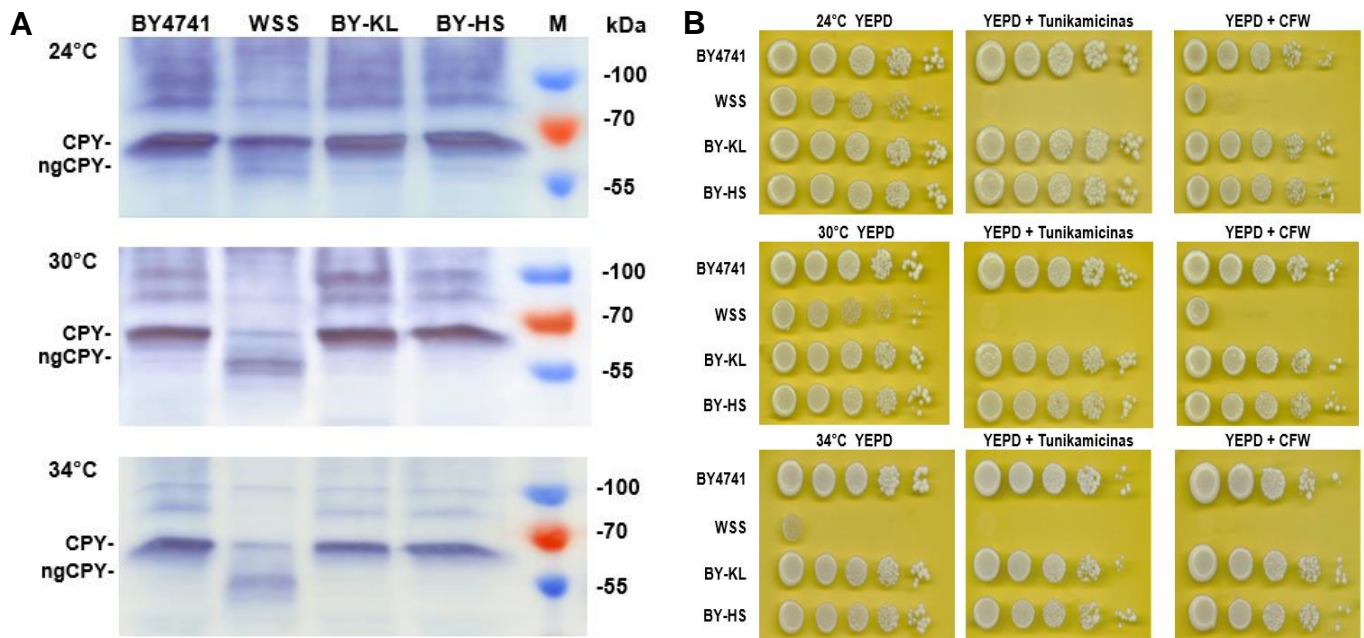
**3.15 pav. WSS mutantų chromosomoje esančio *sec59* geno pakeitimo donorinės DNR fragmentais, turinčiais mielių *K. lactis* arba žmogaus DK koduojančius genus schema**

Cas9 endonukleazės kirpimo vietose šalia DK geno ATG ir STOP kodonų (pažymėta mėlynomis rodyklėmis) atsiradę dvigrandžiai DNR trūkiai užtaisomi homologinės rekombinacijos būdu. Jos metu mielių chromosomoje esantis *sec59* geno fragmentas pakeičiamas donorinės DNR fragmentu su mielių *K. lactis* arba žmogaus DK koduojančiais genais (pažymėta žaliai). Homologinė rekombinacija vyksta per donorinės DNR fragmentuose esančias *SEC59* geno promotoriaus ir terminatoriaus sekas (pažymėta mėlynai).

### 3.6.1 CPY glikozilinimo efektyvumo ir jautrumo CFW bei tunikamicinui nustatymas *S. cerevisiae* kamienuose su pakeistais DK genais

Mielių *S. cerevisiae* kamienų su pakeistais DK genais CPY glikozilinimo efektyvumas 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose buvo įvertintas naudojant imunoblotingo metodą. Buvo pastebėta, kad mielių kamienai, turintys *K. lactis* arba žmogaus DK geną, visose tirtose temperatūrose glikozilino CPY taip pat gerai, kaip ir laukinio tipo BY4741 ląstelės (3.16 pav. A).

Mielių kamienų su pakeistais DK genais jautrumo tunikamicinui ir CFW tyrimas parodė, kad WSS mutantui būdingas jautrumas tunikamicinui, rodantis glikozilinimo sutrikimus ir jautrumas CFW, rodantis ląstelės struktūros pokyčius, nepasireiškė mielėms su *K. lactis* arba žmogaus DK genais, jos augo taip pat gerai, kaip ir laukinio tipo BY4741 ląstelės (3.16 pav. B). Reiškia, nežiūrint dalinės homologijos tarp DK sekų, tiek *K. lactis*, tiek ir žmogaus DK galėjo pilnai komplementuoti *S. cerevisiae* DK trūkumą.



**3.16 pav. *S. cerevisiae* kamienų su pakeistais DK genais CPY glikozilinimo efektyvumo ir jautrumo tunikamicinui bei CFW tyrimų rezultatai**

**A** – CPY glikozilinimo efektyvumo tyrimas imunoblotingo metodu. Takeliuose: laukinio tipo BY4741 kamieno, *S. cerevisiae* WSS mutanto ir *S. cerevisiae* kamienų, su pakeistais *K. lactis* arba žmogaus DK genais (BY-KL ir BY-HS atitinkamai), augintų 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas. Kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY. **B** – jautrumo tunikamicinui ir CFW tyrimas. Laukinio tipo kamieno BY4741, *S. cerevisiae* WSS mutanto ir *S. cerevisiae* kamienų, su pakeistais *K. lactis* arba žmogaus DK genais (BY-KL ir BY-HS atitinkamai), augimo skirtumai įvertinti auginant mieles ant YEPD terpės, YEPD terpės su tunikamicinu ir YEPD terpės su CFW 24°C, 30°C ir 34°C temperatūrose.



### **3.7 Žmogaus DK mutacijų tyrimas mielėse *S. cerevisiae***

Aptiktos žmogaus DK koduojančio *DOLK* geno mutacijos (1.1. lentelė) buvo susietos su įvairiais vystymosi sutrikimais naujagimiuose, o dalis šių mutacijų buvo tirtos ir pasitelkus mielių *S. cerevisiae sec59-1* mutantą. Šie tyrimai buvo atlikti transformuojant glikozilinimo sutrikimais pasižyminčius sąlyginius mielių *S. cerevisiae sec59-1* mutantus plazmidėmis su mutantiniais *DOLK* genais ir stebint, ar transformantuose bus atstatytas sutrikusio glikozilinimo fenotipas (Kranz et al., 2007, Lefeber et al., 2011). Šio darbo metu taip pat buvo siekiama įvertinti *DOLK* geno mutacijų įtaką mielių *S. cerevisiae* glikozilinimui, tačiau tiriamos mutacijos buvo įvestos į *DOLK* geną, esantį mielių BY-HS kamiene, kuriame *S. cerevisiae* DK genas buvo pakeistas žmogaus DK genu.

#### **3.7.1 C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančių mutacijų įvedimas į *S. cerevisiae* BY-HS kamieno *DOLK* geną**

Į mielėse esantį *DOLK* geną, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą, buvo įvestos jau anksčiau mielėse tirtos C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančios mutacijos. Tam buvo sukonstruotos plazmidės su gRNR raiškos kasetėmis ir su genomo redagavimui naudojamais donorinės DNR fragmentais. Kadangi aminorūgštys, kurias buvo norima pakeisti, yra smarkiai nutolusios viena nuo kitos, kiekvienos mutacijos įvedimui buvo pasirinkti skirtingi Cas9 endonukleazės taikiniai. pFG-SnrSC-C99S, pFG-SnrSc-W304C ir pFG-SnrSc-Y441S plazmidės buvo sukonstruotos į pFG-SnrSc plazmidę atitinkamai įklonavus *DOLK* geno taikiniams šalia C99, W304 ir Y441 aminorūgščių komplementarius fragmentus, gautus hibridizuojant C99S-TARG1 – C99S-TARG2, W304C-TARG1 – W304C-TARG2 ir Y441S-TARG1 – Y441S-TARG2 pradmenų poras (žr. 2.3, 2.4 ir 3.1.1) atitinkamai. Plazmidžių sekos buvo nuskaitytos sekoskaitos būdu, naudojant ScSnr52-Pr pradmenį, norint įsitikinti, kad į plazmidės buvo įklonuoti taikiniams specifines RNR koduojantys fragmentai.

Plazmidės su genomo redagavimui naudojamais donorinės DNR fragmentais buvo sukonstruotos į pJET-S59PT-HS plazmidėje (žr. 2.2) esantį *DOLK* geną įvedus PAM sekos ir C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančias mutacijas, naudojant PGR su C99S-D – C99S-R, W304C-D – W304C-R ir Y441S-D – Y441S-R (žr. 2.4) pradmenų poromis atitinkamai (žr. 2.4 ir 3.11). Tuomet sukonstruotos plazmidės buvo patikrintos sekoskaitos būdu, naudojant DOLK-R1, DOLK-D1 ir DOLK-D3 pradmenis (žr. 2.1 ir 2.2 lentelę), o *DOLK* geno

donorinės DNR fragmentai su įvestomis mutacijomis buvo padauginti nuo patikrintų plazmidžių atliekant PGR su ScS59-D1 – ScS59-R1 pradmenų pora, apvalyti nuo reakcijos mišinio komponentų (žr. 2.4) ir naudojami tolimesniuose eksperimentuose.

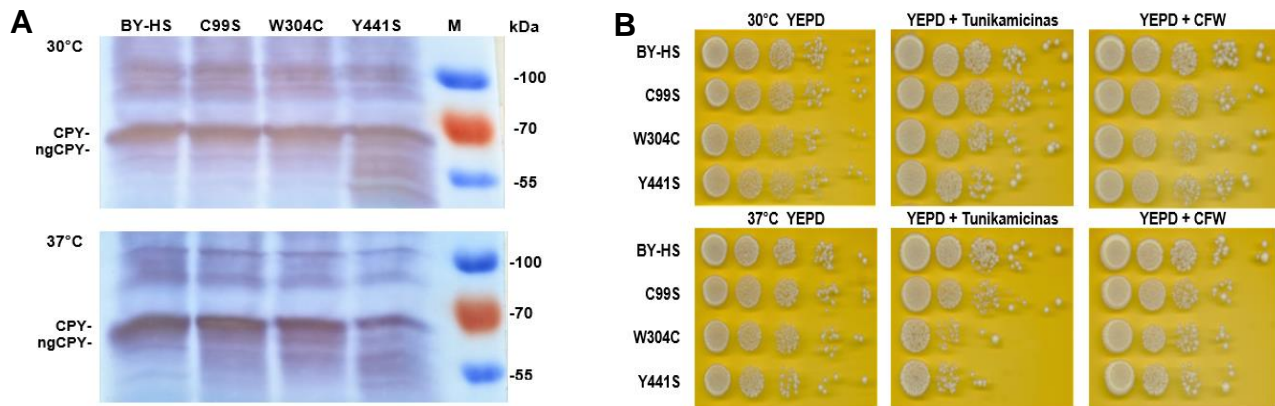
Mielių *S. cerevisiae* kamienai su mutacijomis *DOLK* koduojančioje sekoje buvo sukonstruoti transformuojant mielių BY-HS kamieną pFG-SnrSc-C99S, pFG-SnrSc-W304C ir pFG-SnrSc-Y441S plazmidėmis, o atrinktus mielių transformantus dar kartą transformuojant pKDSU-PGK1-Cas9 plazmide ir *DOLK* donorinės DNR fragmentu su C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančiomis mutacijomis atitinkamai. Kadangi nebuvo žinoma, kaip įvestos žmogaus DK mutacijos paveiks mielių kamienų atsparumą tunikamicinui, o įvesti nukleotidų pokyčiai nepakeitė gene esančių RE atpažinimo vietų, buvo atrinkta po 5 mielių transformantų klonus, kurių *DOLK* koduojanti seka buvo padauginta atliekant PGR su ScS59-D1 ir ScS59-R2 pradmenimis, o PGR produktų sekos nustatytos sekoskaitos būdu su *DOLK*-R1, *DOLK*-D1 ir *DOLK*-D3 pradmenimis. Išanalizavus sekoskaitos rezultatus buvo pastebėta, kad naudojant CRISPR-Cas9 sistemą C99S, W304C ir Y441S aminorūgščių pokyčius koduojančios mutacijos buvo įvestos į 3, 2 ir 3 mielių klonus atitinkamai.

### **3.7.2 Žmogaus DK C99S, W304C ir Y441S mutacijų įtakos mielių CPY glikozilinimo bei jautrumo tunikamicinui ir CFW įvertinimas**

C99S, W304C ir Y441S žmogaus DK mutacijų poveikis mielių *S. cerevisiae* baltymų glikozilinimui buvo tiriamas imunoblotingo metodu įvertinant CPY glikozilinimo efektyvumą mielių mutantų, augintų 30°C ir 37°C temperatūrose, ląstelių lizatų mėginiuose. Tyrimo rezultatai parodė, kad glikozilinimo sutrikimai mielių mutantuose labiausiai išryškėjo 37°C temperatūroje. Mutantų su W304C DK mutacija CPY glikozilino efektyvumas buvo mažesnis, nei mutantų turinčių C99S mutaciją DK sekoje. Mutantai su Y441S aminorūgščių pokyčių koduojančia mutacija *DOLK* sekoje 37°C temperatūroje buvo paveikti labiausiai tarp tirtų DK mutantų ir taip pat glikozilino CPY blogiau nei BY-HS kamienas jau ir 30°C temperatūroje (3.17 pav. A).

Ištyrus žmogaus DK mutacijų poveikį mielių *S. cerevisiae* jautrumui tunikamicinui ir CFW 30°C bei 37°C temperatūrose buvo pastebėta, kad *DOLK* mutacijos tik nežymiai padidino visų trijų mutantų jautrumą CFW 37°C temperatūroje. Tuo tarpu šių mutantų jautrumas tunikamicinui buvo skirtingas: C99S DK mutacija nežymiai paveikė mielių jautrumą

tunikamicinui tik 37°C temperatūroje, tačiau DK W304C mutantų jautrumas tunikamicinui šiek tiek, o DK Y441S mutantų truputį stipriau pasireiškė 30°C temperatūroje ir dar labiau sustiprėjo 37°C temperatūroje (3.17 pav. B). Gauti rezultatai leidžia tikėtis, kad net jei žmogaus DK aktyvumo įvertinimui *S. cerevisiae* BY-HS kamienne naudojami tokie nesudėtingi testavimo būdai, kaip CPY glikozilinimo efektyvumo ar mielių atsparumo nuodams įvertinimas leidžia nustatyti mutacijų poveikio DK aktyvumui skirtumus, sukurta mielių sistema galėtų būti panaudota kaip modelis mutantinių žmogaus DK tyrimams.



### 3.17 pav. *S. cerevisiae* DOLK mutantų CPY glikozilinimo efektyvumo ir jautrumo tunikamicinui bei CFW analizė

**A** – CPY glikozilinimo efektyvumo tyrimas imunoblotingo metodu. Takeliuose: mielių *S. cerevisiae* kamieno su *DOLK* genu (BY-HS) ir BY-HS kamienų, su C99S, W304C ir Y441S DK mutacijomis, augintų 30°C ir 37°C temperatūrose ląstelių lizatų mėginiai. M – baltymų molekulinės masės standartas. Kairėje pažymėta pilnai (CPY) ir nepilnai (ngCPY) glikozilinta CPY. **B** - mielių *S. cerevisiae* kamieno su *DOLK* genu (BY-HS) ir BY-HS kamienų, su C99S, W304C ir Y441S DK mutacijomis augimo skirtumai, įvertinti auginant mieles ant YEPD terpės, YEPD terpės su tunikamicinu ir YEPD terpės su CFW 30°C ir 37°C temperatūrose.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Baltymų glikozilinimo metu prie jų prijungiami glikanai yra svarbūs tinkamam baltymų susilankstymui, aktyvumui, stabilumui, sąveikoms su receptoriais. Pagrindinių baltymų glikozilinimo etapų panašumai tarp visų eukariotų leidžia tyrinėjant mielių glikozilinimo mechanizmus daugiau sužinoti apie šiuos procesus žinduoliuose, o gilesnis supratimas apie glikoproteinų sintezę bei jų funkcijas taip pat pasitarnautų kuriant dideliu baltymų sekrecijos efektyvumu pasižyminčius mielių kamienus (Aebi, 2013; Mattanovich et al., 2012). ET membranoje aptinkamos DK sintetinas Dol-P yra panaudojamas kaip lipidinis nešiklis, ant kurio surenkama oligosacharidų šerdis N-glikozilinimo metu, bei kaip cukrų donoras, pernešantis N-, O- ir GPI-glikozilinimo bei C-manozilinimo reakcijoms reikalingus monosacharidus į ET vidų (Orlean, 1992). Ankstesni DK tyrimai leido atskleisti baltymų glikozilinimo svarbą mielių ląstelės sienelės sintezei, lipidų homeostazei, ET baltymų kokybės kontrolei ir rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui (Orłowski et al., 2007; William James et al., 2019; Žiogienė et al., 2019). Taip pat, žmogaus DK pastaruoju metu yra išsamiai tyrinėjama plataus spektro sutrikimus sukeliančių CDG kontekste, o dalis šių tyrimų atliekami ir naudojant mielių *S. cerevisiae* modelines sistemas (Kranz et al., 2007; Lefeber et al., 2011).

Šio darbo metu, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą buvo sukonstruotas mielių *S. cerevisiae* WGLD mutantas, turintis DK G420D mutaciją (žr. 3.1), o jo baltymų glikozilinimo efektyvumas bei ląstelės sienelės struktūros pokyčiai buvo palyginti su anksčiau sukonstruotų *S. cerevisiae* GGL, WGS, WSL ir WSS mutantų (Burdulis, 2020). DK G420D mutacijos nulemti CPY glikozilinimo sutrikimai bei jautrumas tunikamicinui ir CFW sukonstruotame WGLD mutante buvo stipresni nei GGL, WGS ir WSL mutantuose ir labiau panašūs į DK G407S ir L421S mutacijas turinčio WSS mutanto. WGLD ir WSS mutantai buvo jautrūs temperatūrai: mutantinės *S. cerevisiae* DK aktyvumas mažiausiai paveiktas buvo 24°C, o labiausiai sumažėjęs 34°C temperatūroje (žr. 3.2 ir 3.3). Tuo tarpu tiriant atitinkamas DK mutacijas (G405S ir I419S) turinčius *K. lactis* WSS mutantus buvo parodyta, kad jų DK aktyvumas buvo labiausiai sumažėjęs ne 34°C, bet 24°C temperatūroje ir išliko nepakitęs toliau mažinant temperatūrą iki 20°C, 15°C ir 10°C (Žiogienė et al., 2019). Atsižvelgiant į skirtingą DK mutacijų poveikį *K. lactis* ir *S. cerevisiae* mielėms, būtų tikslinga ištirti *S. cerevisiae* DK mutantų CPY glikozilinimo ir jautrumo tunikamicinui bei CFW pokyčius žemesnėse nei 24°C temperatūrose.

Skirtingas temperatūros poveikis mutantinių DK aktyvumui nebuvo vienintelis tarp šių mielių rūšių mutantų pastebėtas skirtumas. DK mutacijų nulemti glikozilinimo sutrikimai mielėse *S. cerevisiae* paveikė mielių ląstelės sienelės struktūrą – mielių mutantai tapo jautrūs CFW, nors *K. lactis* DK mutantuose nebuvo aptikta ląstelės sienelės struktūros pokyčių. Šie rezultatai rodo, kad nepaisant didelio konservatyvumo tarp visų eukariotų glikozilinimo procesų, įvairūs glikozilinimo mechanizmai gali skirtis net ir tarp skirtingų mielių rūšių. Panašu, kad *S. cerevisiae* DK mutantuose, kitaip nei *K. lactis* mutantuose, mielių ląstelės sienelės integralumas yra labiau paveiktas per GPI-glikozilinimo arba lipidų metabolizmo pokyčius (Žiogienė et al., 2019).

Tiek G420D, tiek W332G aminorūgščių pokyčius koduojančios mutacijos, įvestos į WGLD ir GGL mutantų DK genus atitinkamai, buvo identifikuotos kaip mutacijos, lemiančios sutrikusio glikozilinimo fenotipą *S. cerevisiae sec59-1* mutantuose (Orłowski et al., 2007; Shridas ir Waechter, 2006). Šio darbo metu buvo ištirtas abiejų mutacijų poveikis mielių CPY glikozilinimo efektyvumui bei jautrumui tunikamicinui ir CFW. Nors nedideli CPY glikozilinimo efektyvumo pokyčiai buvo stebimi ir GGL mutante, WGLD mutante jie buvo ryškesni ir jame nustatytas CPY glikozilinimo efektyvumo sumažėjimas ir padidėjęs jautrumas aukštai temperatūrai atitinka aprašytą *sec59-1* fenotipą labiau, nei GGL mutanto (Fernandez et al., 2002; Orłowski et al., 2007).

Siekiant daugiau sužinoti apie baltymų glikozilinimo sutrikimų įtaką rekombinantinių baltymų sekrecijai mielėse *S. cerevisiae*, šio darbo metu buvo įvertintas trijų rekombinantinių baltymų – krevečių Pen-m4 alergeno, *S. cerevisiae* KEX2 peptidazės ir bakterinės  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas mielių *S. cerevisiae sec59* mutantuose ir  $\Delta alg3$ ,  $\Delta alg5$ ,  $\Delta alg6$ ,  $\Delta alg8$ ,  $\Delta alg9$ ,  $\Delta alg12$  bei  $\Delta ost5$  nuliniuose mutantuose (žr. 3.4). Šie trys modeliniai baltymai sekrecijos efektyvumo įvertinimui buvo pasirinkti dėl skirtingų savo savybių. KEX2 peptidazė mielėse *S. cerevisiae* sekretuojama neglikozilinta, todėl jos sekrecijos efektyvumas turėtų būti nepriklausomas nuo sutrikusio paties baltymo glikozilinimo. Bakterinės  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas mielėse buvo vertinamas pagal krakmolo skaidymo lygį, kuris priklauso nuo mielių išsekretuotos  $\alpha$ -amilazės kiekio ir jos aktyvumo. Bakterijose  $\alpha$ -amilazė nėra glikozilinama, tačiau mielės šį baltymą glikozilina šešiose vietose. Visgi buvo parodyta, kad glikozilinimas neįtakoja šio baltymo aktyvumo, todėl krakmolo suskaidymo lygis šio darbo metu atliktuose tyrimuose priklausė nuo į mielių auginimo terpę išsekretuotos  $\alpha$ -amilazės kiekio, o ne aktyvumo pokyčių (Hoshida et al., 2013). Taip pat įdomu, kad tyrinėjant  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumo

pokyčius mielėse *S. cerevisiae* buvo nustatyta, jog baltymo sekrecija laukinio tipo kamienuose yra neefektyvi dėl prie baltymo prijungtų glikanų.  $\alpha$ -amilazė buvo mažiau glikozilinta ir efektyviau sekretuojama mielių mutantuose su sutrikusiu glikoziliniu, o pašalinus potencialias glikozilinimo vietas  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas laukinio tipo kamienuose patrigubėjo (Hoshida et al., 2013). Tai leidžia daryti prielaidą, kad ir šiame darbe tyrinėtuose mutantuose stebimas  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas galėtų dalinai priklausyti ir nuo  $\alpha$ -amilazės glikozilinimo pokyčių. Pen-m4 baltymą *S. cerevisiae*, skirtingai nei *K. lactis* mielės, glikozilina, todėl jo sekrecijos efektyvumas taip pat galėtų dalinai priklausyti nuo Pen-m4 glikozilinimo pokyčių.

Tarp *S. cerevisiae* *sec59* mutantų visus tirtus rekombinantinius baltymus efektyviausiai sekretavo WGLD ir WSS mutantai, kuriuose CPY glikozilinimo efektyvumas buvo labiausiai sumažėjęs. GGL mutante CPY glikozilinimo sutrikimai buvo mažiau išreikšti, todėl jis pasižymėjo tik šiek tiek efektyvesne baltymų sekrecija nei laukinio tipo ląstelės, o WGS ir WSL mutantuose, kuriuose nebuvo stebimi CPY glikozilinimo pokyčiai, baltymų sekrecijos efektyvumas išliko laukinio tipo mielių lygyje. Šio darbo metu atlikto rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumo tyrimo  $\Delta alg$  mutantuose, kuriuose buvo sutrikęs CPY glikozilinimo efektyvumas, rezultatai buvo panašūs į rezultatus, gautus tiriant šių mutantų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumą (Hoshida et al., 2013).  $\Delta ost5$  mutanto CPY glikozilinimo efektyvumas buvo panašus į laukinio tipo ląstelių, išskyrus nedidelius pokyčius 24°C temperatūroje, todėl šio mielių kamieno rekombinantinių baltymų sekrecijos lygis nepadidėjo. Skirtingų *ALG* genų išveiklinimo poveikis CPY glikozilinimui, skirtingai nuo *sec59* mutantų, nepriklausė nuo temperatūros. Be to, visų trijų tirtų rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumas skirtinguose  $\Delta alg$  mutantuose padidėjo nevienodai. Geriausiai visus baltymus sekretavo  $\Delta alg5$  ir  $\Delta alg9$  kamienai, o  $\alpha$ -amilazę ir Pen-m4, bet ne KEX2 baltymą dar ir  $\Delta alg6$  bei  $\Delta alg8$  mutantai. Gauti rezultatai leido padaryti išvadą, kad nors rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumo mielėse padidėjimas galėjo priklausyti nuo sumažėjusio tirtų baltymų glikozilinimo efektyvumo, reikėtų atsižvelgti ir į kitas netiesiogines priežastis, kurias galėjo sukelti glikozilinimo pokyčiai mielių ląstelėse. Pirmiausia, tirti *sec59* ir  $\Delta alg$  mutantai su sutrikusiu glikoziliniu sekretavo didesnius neglikozilinamos Kex2 peptidazės kiekius. Antra, nors  $\alpha$ -amilazės sekrecijos efektyvumas galėjo dalinai priklausyti ir nuo jos glikozilinimo pokyčių, tačiau Pen-m4 sekrecijos efektyvumo tyrimo rezultatai parodė, kad *sec59* ir  $\Delta alg$  mutantai efektyviau sekretavo ne tik

neglikozilintą, bet ir pilnai glikozilintą Pen-m4 baltymą. Tai rodo, kad tirtų rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumas *sec59* ir *Δalg* mutantuose pagerėjo ne vien dėl pakitusio sekretuojamų baltymų glikozilinimo, bet ir dėl sutrikusios glikozilinimui svarbių baltymų veiklos nulemtų plataus spektro pokyčių mielių fiziologijoje. Dalinai jie galėtų būti susiję su mielių ląstelės sienelės struktūros pokyčiais ir padidėjusiu jos porėtumu bei pralaidumu, lipidų homeostazės pokyčiais, ET stresu ir nuolat aktyviu UPR bei padidinta ET šaperonų raiška (Bartkevičiute ir Sasnauskas, 2004; William James et al., 2019).

Šio darbo metu tyrinėjant *S. cerevisiae* WSS kamieną buvo pastebėta, kad dviejų šio mutanto klonų  $\alpha$ -amilazės sekrecijos ir CPY glikozilinimo efektyvumo fenotipas skyrėsi nuo kitų dviejų tirtų klonų (žr. 3.5). Išanalizavus dviejų pakitusio fenotipo klonų DK geno sekas, jų chromosomose buvo aptikta spontaninė mutacija, koduojanti E319K aminorūgščių pokytį DK sekoje. Įvedus šią mutaciją į BY4741 ir WSS kamienų DK genus buvo nustatyta, kad ši supresorinė mutacija dalinai atstatė WSS mutantų sutrikusio CPY glikozilinimo efektyvumo ir padidėjusio jautrumo tunikamicinui bei CFW fenotipą. Kadangi WSS mutantuose DK aktyvumo sumažėjimas buvo labiausiai paveiktas tarp visų tirtų *sec59* mutantų, šios spontaninės supresorinės mutacijos atsiradimas dar kartą parodo DK svarbą mielių ląstelėse vykstantiems baltymų glikozilinimo procesams.

Pagal sumodeliuotą *S. cerevisiae* DK struktūrą (AlphaFold modelio ID: AF-P20048-F1), E319 aminorūgštis erdvėje yra nutolusi nuo G407 ir L421 aminorūgščių, kurių mutacijos aptinkamos WSS mutantuose, todėl sunku tiksliai atsakyti į klausimą, kaip E319K mutacija paveikia WSS mutantuose sumažėjusį DK aktyvumą. E319K mutacija yra prie pat DK domeno, kuris gali būti atsakingas už dolicholio prisijungimą (331-346 aminorūgštys; Albright et al., 1989). Tuo tarpu G407S ir L421S mutacijos yra arti DK motyvo, kuris buvo identifikuotas kaip citidililtransferazių CTP prisijungimo domenas (430-453 aminorūgštys; Shridas ir Waechter, 2006). Gali būti, kad dėl E319K mutacijos padidėja DK afiniškumas dolicholiui ir dėl to yra atsveriamas dėl G407S ir L421S mutacijų sumažėjęs fermento aktyvumas, juo labiau, kad laukinio tipo DK aktyvumui (BY-K kamienas) E319K mutacija neturi jokio neigiamo poveikio. Tačiau taip pat negalima atmesti galimybės, kad baltymo spiralė, kurioje yra E319K mutacija, priartėja prie mutavusių S407 ir S421 aminorūgščių ir su jomis sąveikaudama sumažina mutacijų poveikį DK aktyvumui. G407S ir L421S mutacijos gali šiek tiek pakeisti baltymo  $\alpha$ -spiralę, kuriose jos yra išsidėsčiusios, pozicijas ir taip paveikti DK aktyvumą susilpnindamos jos sąveiką

su CTP, reikalingu fosfato grupės pernešimui ant dolicholio, o E319K mutacija galėtų šią sąveiką sustiprinti. Tolimesni DK mutacijų poveikio baltymo aktyvumui tyrimai galėtų padėti patikslinti sumodeliuotą baltymo struktūrą bei suprasti regionų, kuriuose buvo aptiktos šiame darbe ištyrinėtos DK mutacijos, svarbą fermento veiklai.

Ankstesniuose tyrimuose jau buvo pademonstruotas žmogaus ir *A. thaliana* DK gebėjimas atstatyti sutrikusio glikozilinimo fenotipą sąlyginiame *sec59-1* mutante į fenotipą, būdingą laukinio tipo *S. cerevisiae* mielėms. Visgi, atliekant šiuos tyrimus, tirtų mielių genome buvo ir mutantinis *sec59-1* genas, todėl kartu veikė ir dalinai funkcionali jų DK, o tai galėjo įtakoti tyrimo rezultatus. Maža to, komplementacijos tyrimams buvo naudotos daugiakopijinės plazmidės, vadinasi tiriamo baltymo raiška buvo ženkliai didesnė, nei įprasta (Fernandez et al., 2002; Kanehara et al., 2015). Šio darbo metu buvo pirmą kartą sukonstruoti mielių *S. cerevisiae* kamienai, kurių *SEC59* genas buvo pakeistas mielių *K. lactis* ir žmogaus DK genais (žr. 3.5). Nors *K. lactis* DK genas yra labai panašus į *S. cerevisiae*, žmogaus DK yra mažiau homologiška šių mielių baltymui, ypač N gale. Sukonstruotų mielių kamienų tyrimai parodė, kad skirtingų organizmų DK turinčių mielių CPY glikozilinimas ir jautrumas tunikamicinui bei CFW nesiskyrė nuo laukinio tipo ląstelių. Vadinasi, nepaisant dalinės žmogaus ir *K. lactis* DK homologijos su *S. cerevisiae* DK, šie baltymai geba atlikti jos funkciją net kai mielių genome nėra *S. cerevisiae* DK koduojančio geno, o tiriamus baltymus koduoja tik viena, chromosomoje esanti geno kopija. Gautus rezultatus, kad dideli aminorūgščių sekos skirtumai DK N galuose neįtakoja fermento aktyvumo skirtinguose organizmuose galėtų paaiškinti tai, jog DK N galas yra patalpintas ET viduje. Tuo tarpu DK C galas, kuriame aptinkamas citidiltransferazių šeimos baltymams būdingas motyvas, yra išsidėstęs citoplazminėje ET pusėje, kur gali sąveikauti su dolicholiu ir CTP (Shridas ir Waechter, 2006).

*S. cerevisiae sec59-1* mutantas jau anksčiau buvo panaudotas žmogaus DK tyrimuose – mielių ląsteles transformavus plazmidėmis, su mutantiniais žmogaus DK genais buvo stebimas jų gebėjimas atstatyti sutrikusio glikozilinimo fenotipą mielių mutantuose (Kranz et al., 2007; Lefeber et al., 2011). Šio darbo metu C99S, W304C ir Y441S žmogaus DK mutacijos buvo ištyrtytos mielių *S. cerevisiae* BY-HS kamieno su pakeistu žmogaus DK genu (žr. 3.7). Įvestos DK mutacijos skirtingai paveikė mutantų CPY glikozilinimo efektyvumą ir jautrumą tunikamicinui bei CFW, o eksperimentų rezultatai buvo panašūs į anksčiau atliktų tyrimų rezultatus. BY-HS kamieno mutante su Y441S DK mutacija, kaip ir *sec59-1* mutante, transformuotame plazmide su



šią mutaciją turinčios žmogaus DK genu, CPY glikozilinimas buvo pažeistas labiausiai tarp visų tirtų mutantų. Įdomu, kad arčiau DK N galo esančios mutacijos neturėjo tokio didelio poveikio baltymo aktyvumui, kaip mutacijos esančios jo C gale. Šie rezultatai dar kartą sufleruoja, kad DK aktyvumui yra svarbiausias baltymo C galo konservatyvumas. Šiame tyrime galima pastebėti, kad žmogaus DK W304C mutacija BY-HS kamieno CPY glikozilinimo efektyvumą bei jautrumą tunikamicinui paveikė labiau nei C99S mutacija. Tuo tarpu, tiriant šių žmogaus DK mutacijų poveikį *sec59-1* mutantuose tokie skirtumai aptikti nebuvo (Lefeber et al., 2011). Panašu, kad mielių mutantai, turintys pakeistą žmogaus DK geną, galėtų būti naudojami kaip jautresnė modelinė sistema žmogaus DK mutacijų analizei. Tokia sistema būtų pranašesnė, nei iki šiol naudojami komplementacijos tyrimai mielių *sec59-1* mutante, kadangi šiuo atveju mielės genome neturėtų net ir dalinai funkcionalaus savo DK geno, kurio veikla galėtų užmaskuoti nedidelius skirtingas mutacijas turinčių DK aktyvumo pokyčius. Ateityje būtų įdomu BY-HS kamiene iširti ir kitas homozigotines žmogaus DK mutacijas (žr. 1.1 lentelę), tačiau mielių modelinė sistema galėtų būti panaudota ir aptiktų heterozigotinių DK mutacijų tyrimams. Įvedus vieną iš heterozigotinių mutacijų į *DOLK* geną esantį mielėse *S. cerevisiae*, kitą mutaciją būtų galima įvesti į *DOLK* geną esantį centromerinėje plazmidėje arba mutacijas tirti diploiduose po dviejų skirtingų mielių mutantų sukryžminimo. Naudojant tokią strategiją būtų imituojamas skirtinguose DK geno aleliuose esančių mutacijų poveikis baltymų glikozilinimo procesams žmogaus ląstelėse. Taip pat verta paminėti, kad tirtos C99S, W304C ir Y441S DK mutacijos mielių baltymų glikozilinimą paveikė daug mažiau, nei DK mutacijos WSS ir WGLD mutantuose. Nepaisant to, žmonių organizme šios DK mutacijos sukelia labai plataus spektro fenotipinius sutrikimus, kurie labai dažnai baigiasi ankstyva pacientų mirtimi (Kranz et al., 2007). Tai rodo, kad nedideli baltymų glikozilinimo pokyčiai daugialąsčiuose eukariotuose yra daug mažiau toleruojami nei vienaląsčiuose, nes greičiausiai yra susiję su baltymų glikozilinimo įtaka tarpląstelinėms sąveikoms, sekretuojamų glikoproteinų svarba įvairioms organizmų funkcijoms, signalų perdavimui ir sąveikoms su receptoriais (Krištić and Lauc, 2017).

## IŠVADOS

1. DK G420D, W332G bei dvigubos G407S ir L421S mutacijos, kaip ir neesminių *ALG* (3,5,6,8,9,12), bet ne *OST5* genų pašalinimas mielėse *S. cerevisiae* sumažino CPY glikozilinimo efektyvumą ir įtakojo pokyčius ląstelės sienelės struktūroje.
2. Rekombinantinės  $\alpha$ -amilazės, Pen-m4 alergeno ir KEX2 peptidazės sekrecijos efektyvumas mielių *S. cerevisiae* *sec59*,  $\Delta$ *alg3*,  $\Delta$ *alg5*,  $\Delta$ *alg6*,  $\Delta$ *alg8*,  $\Delta$ *alg9*,  $\Delta$ *alg12* bei  $\Delta$ *ost5* mutantuose priklausė nuo glikozilinimo efektyvumo: kuo labiau buvo pažeistas CPY glikozilinimo efektyvumas tuo efektyviau buvo sekretuojami tirti rekombinantiniai baltymai.
3. Supresorinė DK E319K mutacija beveik pilnai atstatė sutrikusio CPY glikozilinimo ir pakitusios ląstelės sienelės struktūros fenotipą *S. cerevisiae* WSS mutantuose, bet neturėjo jokio aptinkamo poveikio BY4741 kamienne.
4. Sukonstruoti mielių *S. cerevisiae* kamienai su *K. lactis* ir žmogaus DK genais pilnai glikozilino CPY ir neturėjo ląstelės sienelės struktūros pokyčių.
5. DK mutacijų C99S, W304C ir Y441S poveikis DK aktyvumui mielių *S. cerevisiae* kamienne su žmogaus DK genu buvo skirtingas ir aptinkamas vertinant CPY glikozilinimo efektyvumą bei ląstelės sienelės struktūros pokyčius, todėl sukurtas mielių modelis galėtų būti panaudotas žmogaus DK mutacijų tyrimams.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

**Dolicholio kinazės mutantų tyrimai mielėse *Saccharomyces cerevisiae***

**SANTRAUKA**

Glikozilinimas – viena dažniausių baltymų potransliacinių modifikacijų eukariotuose. Prie baltymų prijungti glikanai yra svarbūs jų aktyvumui, stabilumui, tinkamam susilankstymui, o glikoproteinai ląstelėse atlieka reguliacines, signalines, katalitines ir kitas funkcijas. Dolicholio kinazė (DK) yra esminis endoplazminio tinklo membranoje vykstančiuose glikozilinimo procesuose dalyvaujantis fermentas, o šių procesų etapai yra labai konservatyvūs nuo mielių iki aukštesniųjų eukariotų. Baltymų glikozilinimo sutrikimai mielėse yra susiję su baltymų sekrecijos efektyvumo pokyčiais, tačiau geresniam šių procesų sąryšio supratimui reikalingi išsamesni tyrimai. Šio darbo metu buvo siekiama įvertinti glikozilinimo sutrikimų, tarp jų ir DK mutacijų, poveikį rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumui mielėse *S. cerevisiae* bei iširti skirtingu homologiškumu pasižyminčių žmogaus ir *K. lactis* DK gebėjimą atlikti *S. cerevisiae* DK funkcijas.

Rekombinantinių baltymų sekrecijos efektyvumas iširtuose mielių mutantuose priklausė nuo baltymų glikozilinimo efektyvumo. Didžiausią poveikį DK aktyvumui, kuris pasireiškė sumažėjusiu karboksipeptidazės Y glikozilinimo efektyvumu, bei ląstelės sienelės struktūros pokyčiais mielėse *S. cerevisiae*, turėjo DK G420D ir dviguba G407S bei L421S mutacija, todėl mielių kamienuose su šias mutacijas turinčia DK rekombinantinės  $\alpha$ -amilazės, KEX2 peptidazės ir Pen-m4 sekrecijos efektyvumas buvo didžiausias. Baltymų sekrecijos efektyvumo padidėjimas mielėse gali būti susijęs su baltymų glikozilinimo sutrikimų sukeltais plataus spektro fiziologiniais pokyčiais, tarp jų ir lipidų homeostazės, ET streso reguliacijos ir ląstelės sienelės struktūros pakitimais. Šiame darbe buvo sukurti *S. cerevisiae* kamieniai, kurių DK genas mielių chromosomoje pirmą kartą buvo pakeistas žmogaus bei *K. lactis* DK genais. Nepaisant tik dalinės homologijos tarp mielių ir žmogaus DK baltymų sekų, abu genai pilnai komplementavo *S. cerevisiae* DK funkciją, o mielių kamienas su žmogaus DK genu buvo panaudotas ir žmogaus DK mutacijų poveikio glikozilinimo procesams tyrimuose.

**Investigation of dolichol kinase mutants in *Saccharomyces cerevisiae***

**SUMMARY**

Glycosylation is one of the most prevalent post-translational protein modifications in eukaryotes. Glycans attached to proteins are important for their activity, stability, and correct folding, also, glycoproteins perform regulatory, signaling, catalytic, and many other functions in cells. Dolichol kinase (DK) is an essential enzyme involved in glycosylation processes in the membrane of the endoplasmic reticulum and core steps of these processes are highly conserved from yeasts to higher eukaryotes. Defects in protein glycosylation pathway in yeasts have already been linked to changes in protein secretion efficiency, but more detailed studies are required for better understanding of these processes. The aim of this study was to evaluate the impact of protein glycosylation deficiencies, including defects caused by DK mutations, to the secretion efficiency of recombinant proteins in *S. cerevisiae* and to investigate the ability of homologous human and *K. lactis* DK to complement *S. cerevisiae* DK functions.

The secretion efficiency of recombinant proteins in examined yeast mutants was dependent on protein glycosylation efficiency. The activity of DK was most affected by G420D and double G407S and L421S mutations, which was detected by decrease of carboxypeptidase Y glycosylation efficiency and changes in *S. cerevisiae* cell wall structure. Despite glycosylation defects, the mutants with DK carrying these mutations exhibited higher secretion efficiency of recombinant  $\alpha$ -amylase, KEX2 peptidase and Pen-m4 protein. This improvement of protein secretion efficiency in *S. cerevisiae* might be related to a wide range of physiological changes caused by protein glycosylation defects leading to changes in lipid homeostasis, ET stress regulation, and cell wall structure. In this study for the first time, *S. cerevisiae* DK gene was replaced by human and *K. lactis* DK genes which, despite partial homology between protein sequences, were able to fully complement *S. cerevisiae* DK function. The constructed yeast strain with the human DK gene was also used to study the effects of human DK mutations on glycosylation processes in *S. cerevisiae*.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei Almai Gedvilaitei už skatinimą tobulėti, kantrybę bei patarimus ir konstruktyvią kritiką ruošiant šį baigiamąjį darbą. Ačiū Danguolei Žiogienei už pagalbą atliekant įvairius eksperimentus ir Mildai Norkienei, išmokiusiai dirbti laboratorijoje. Dėkui Emilijai Vasiliūnaitei bei Ievai Lingytei už nesuskaičiuojamas iš termostato išimtas lėkšteles, naudingas konsultacijas, diskusijas, emocinę pagalbą bei gerą nuotaiką ir puikų laiką praleistą Eukariotų genų inžinerijos skyriuje.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aebi, M. 2013. N-Linked Protein Glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833(11):2430–37.
2. Aebi, M., R. Bernasconi, S. Clerc, and M. Molinari. 2010. N-Glycan Structures: Recognition and Processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35(2):74–82.
3. Albright, C. F., P. Orlean, and P. W. Robbins. 1989. A 13-Amino Acid Peptide in Three Yeast Glycosyltransferase May Be Involved in Dolichol Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(19):7366–69.
4. Burdulis A. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* dolicholio kinazės mutantų konstravimas ir įvestų mutacijų poveikio baltymų sekrecijos ir glikozilinimo procesams tyrimai [bakaluro darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2020.
5. SEC59 Phenotypes | SGD. Retrieved December 23, 2021 (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000004615/phenotype>).
6. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon. 1999. On the Frequency of Protein Glycosylation, as Deduced from Analysis of the SWISS-PROT Database. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1473(1):4–8.
7. Araujo-garrido, J. L., J. Bernal-bayard, and F. Ramos-Morales. 2020. Type III Secretion Effectors with Arginine N-Glycosyltransferase Activity. 8(3).
8. Bartkevičiūtė, D., and K. Sasnauskas. 2003. Studies of Yeast *Kluyveromyces Lactis* Mutations Conferring Super-Secretion of Recombinant Proteins. 20(1):1–11.
9. Bartkevičiūtė, D., and K. Sasnauskas. 2004. Disruption of the MNN10 Gene Enhances Protein Secretion in *Kluyveromyces Lactis* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4(8):833–40.
10. Bernstein, M., F. Kepes, and R. Schekman. 1989. Sec59 Encodes a Membrane Protein Required for Core Glycosylation in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1191–9.
11. Bieberich, E. 2014. Synthesis, Processing, and Function of N-Glycans in N-Glycoproteins. *Adv. Neurobiol.* 9:47–70.
12. Bolivar, F., and K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia Coli* as Cloning Vectors. *Methods Enzymol.* 68(C):245–67.
13. Buczkowska, A., E. Swiezewska, and D. J. Lefeber. 2015. Genetic Defects in Dolichol Metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38(1):157–69.
14. Burda, P., S. Te Heesen, A. Brachat, A. Wach, A. Düsterhöft, and M. Aebi. 1996. Stepwise Assembly of the Lipid-Linked Oligosaccharide in the Endoplasmic Reticulum of *Saccharomyces Cerevisiae*: Identification of the ALG9 Gene Encoding a Putative Mannosyl Transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(14):7160–65.
15. Cantagrel, V., D. J. Lefeber, B. G. Ng, Z. Guan, J. L. Silhavy, S. L. Bielas, L. Lehle, H. Hombauer, M. Adamowicz, E. Swiezewska, A. P. De Brouwer, P. Blü, J. Sykut-Cegielska, S. Houliston, D. Swistun, B. R. Ali, W. B. Dobyns, D. Babovic-Vuksanovic, H. Van Bokhoven, R. A. Wevers, C. R. H. Raetz, H. H. Freeze, E. ´Va Morava, L. Al-Gazali, and J. G. Gleeson. 2010. SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder. *Cell* 142:203–17.
16. Carmona, T. A., M. Tiemblo, and A. Jime. 1998. *Expression of the Schwanniomyces Occidentalis SWA2 Amylase in Saccharomyces Cerevisiae : Role of N-Glycosylation on Activity, Stability and Secretion.* Vol. 329.

17. Çelik, E., and P. Çalik. 2012. Production of Recombinant Proteins by Yeast Cells. *Biotechnol. Adv.* 30(5):1108–18.
18. Cho, Y., C. Y. Yu, Y. Nakamura, and K. Kanehara. 2017. Arabidopsis Dolichol Kinase AtDOK1 Is Involved in Flowering Time Control. *J. Exp. Bot.* 68(12):3243.
19. Cohen, M. J., W. J. Chirico, and P. N. Lipke. 2020. Through the Back Door: Unconventional Protein Secretion. *Cell Surf.* 6:100045.
20. Conzelmann, A., C. Fankhauser, and C. Desponds. 1990. Myoinositol Gets Incorporated into Numerous Membrane Glycoproteins of *Saccharomyces Cerevisiae*; Incorporation Is Dependent on Phosphomannomutase (Sec53). *EMBO J.* 9(3):653.
21. Čopič, A., M. Dorrington, S. Pagant, J. Barry, M. C. S. Lee, I. Singh, J. L. Hartman IV, and E. A. Miller. 2009. Genomewide Analysis Reveals Novel Pathways Affecting Endoplasmic Reticulum Homeostasis, Protein Modification and Quality Control. *Genetics* 182(3):757–69.
22. Crine, S. L., and K. R. Acharya. 2021. Molecular Basis of C-Mannosylation – a Structural Perspective. *FEBS J.* doi: 10.1111/FEBS.16265.
23. Delic, M., M. Valli, A. B. Graf, M. Pfeffer, D. Mattanovich, and B. Gasser. 2013. The Secretory Pathway: Exploring Yeast Diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(6):872–914.
24. Dell, A., A. Galadari, F. Sastre, and P. Hitchen. 2010. Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes. *Int. J. Microbiol.*
25. Eichler, J., and Z. Guan. 2017. Lipid Sugar Carriers at the Extremes: The Phosphodolichols Archaea Use in N-Glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1862(6):589.
26. Eichler, J., and M. Koomey. 2017. Sweet New Roles for Protein Glycosylation in Prokaryotes. *Trends Microbiol.* 25(8):662–72.
27. Fernandez, F., P. Shridas, S. Jiang, M. Aebi, and C. J. Waechter. 2002. Expression and Characterization of a Human CDNA That Complements the Temperature-Sensitive Defect in Dolichol Kinase Activity in the Yeast Sec59-1 Mutant: The Enzymatic Phosphorylation of Dolichol and Diacylglycerol Are Catalyzed by Separate CTP-Mediated Kinase Activities in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Glycobiology* 12(9):555–62.
28. Ferro Novick, S., P. Novick, C. Field, and R. Schekman. 1984. Yeast Secretory Mutants That Block the Formation of Active Cell Surface Enzymes. *J. Cell Biol.* 98(1):35–43.
29. Fisher, P., J. Thomas-Oates, A. J. Wood, and D. Ungar. 2019. The N-Glycosylation Processing Potential of the Mammalian Golgi Apparatus. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:157.
30. Freeze, H. H., and B. G. Ng. 2011. Golgi Glycosylation and Human Inherited Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(9):1–22.
31. Gallagher, P., J. Henneberry, I. Wilson, J. Sambrook, and M. J. Gething. 1988. Addition of Carbohydrate Side Chains at Novel Sites on Influenza Virus Hemagglutinin Can Modulate the Folding, Transport, and Activity of the Molecule. *J. Cell Biol.* 107(6 I):2059–73.
32. Gemmill, T. R., and R. B. Trimble. 1999. Overview of N- and O-Linked Oligosaccharide Structures Found in Various Yeast Species. *Biochim. Biophys.* 1426(2):227–37.
33. Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Véronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. André, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Güldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kötter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M.

- Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional Profiling of the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome. *Nature* 418(6896):387–91.
34. Gietz, D., R. Schiestl, A. Willems, and R. Woods. 1995. Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast* 11(4):355–60.
35. Gómez-Gaviria, M., A. P. Vargas-Macías, L. C. García-Carnero, I. Martínez-Duncker, and H. M. Mora-Montes. 2021. Role of Protein Glycosylation in Interactions of Medically Relevant Fungi with the Host. *J. Fungi* 7(10).
36. Gottier, P., A. Gonzalez-Salgado, A. K. Menon, Y. C. Liu, A. Acosta-Serrano, and P. Bütikofer. 2017. RFT1 Protein Affects Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchor Glycosylation. *J. Biol. Chem.* 292(3):1103–11.
37. Grabińska, K., and G. Palamarczyk. 2002. Dolichol Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: An Insight into the Regulatory Role of Farnesyl Diphosphate Synthase. *FEMS Yeast Res.* 2(3):259–65.
38. Haeuptle, M. A., and T. Hennet. 2009. Congenital Disorders of Glycosylation: An Update on Defects Affecting the Biosynthesis of Dolichol-Linked Oligosaccharides. *Hum. Mutat.* 30(12):1628–41.
39. Hall, B. D., R. E. Stevenson, and J. R. Jones. 2020. Fatal Hyperkeratosis Syndrome in Four Siblings Due to Dolichol Kinase Deficiency. *Am. J. Med. Genet. Part A* 182(6):1421–25.
40. Haynes, P. A. 1998. Phosphoglycosylation: A New Structural Class of Glycosylation? *Glycobiology* 8(1):1–5.
41. Helander, A., T. Stödberg, J. Jaeken, G. Matthijs, M. Eriksson, and G. Eggertsen. 2013. Dolichol Kinase Deficiency (DOLK-CDG) with a Purely Neurological Presentation Caused by a Novel Mutation. *Mol. Genet. Metab.* 110(3):342–44.
42. Heller, L., P. Orlean, and W. L. Adair. 1992. *Saccharomyces Cerevisiae* Sec59 Cells Are Deficient in Dolichol Kinase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(15):7013–16.
43. Hoshida, H., T. Fujita, K. Cha-Aim, and R. Akada. 2013. N-Glycosylation Deficiency Enhanced Heterologous Production of a *Bacillus Licheniformis* Thermostable  $\alpha$ -Amylase in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(12):5473–82.
44. Hoshida, H., T. Fujita, K. Murata, K. Kubo, and R. Akada. 2005. Copper-Dependent Production of a *Pycnoporus Coccineus* Extracellular Laccase in *Aspergillus Oryzae* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(6):1090–97.
45. Ihara, Y., Y. Inai, M. Ikezaki, I.-S. L. Matsui, S. Manabe, and Y. Ito. 2014. C-Mannosylation: A Modification on Tryptophan in Cellular Proteins. Pp. 1–8 in *Glycoscience: Biology and Medicine*. Tokyo: Springer Japan.
46. Iwahashi, N., Y. Inai, S. Minakata, S. Sakurai, S. Manabe, Y. Ito, K. Ino, and Y. Ihara. 2020. C-Mannosyl Tryptophan Increases in the Plasma of Patients with Ovarian Cancer. *Oncol. Lett.* 19(1):908–16.
47. James, A. W., R. Gowsalya, and V. Nachiappan. 2016. Dolichyl Pyrophosphate Phosphatase-Mediated N-Glycosylation Defect Dysregulates Lipid Homeostasis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1861(11):1705–18.
48. Jayaprakash, N. G., and A. Surolia. 2017. Role of Glycosylation in Nucleating Protein Folding and Stability. *Biochem. J.* 474(14):2333–47.
49. Jelk, J., N. Gao, M. Serricchio, A. Signorell, R. S. Schmidt, J. D. Bangs, A. Acosta-Serrano, M. A. Lehrman, P. Bütikofer, and A. K. Menon. 2013. Glycoprotein Biosynthesis in a



- Eukaryote Lacking the Membrane Protein Rft1. *J. Biol. Chem.* 288(28):20616–23.
50. Jigami, Y. 2008. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Yeast Glycobiology and Its Application. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(3):637–48.
  51. Juchimiuk, M., M. Pasikowska, E. Zatorska, A. E. Laudy, G. Smoleńska-Sym, and G. Palamarczyk. 2010. Defect in Dolichol-Dependent Glycosylation Increases Sensitivity of *Saccharomyces Cerevisiae* towards Anti-Fungal Drugs. 27(8):637–45.
  52. Kanehara, K., Y. Cho, Y. Lin, C. Chen, C. Yu, and Y. Nakamura. 2015. Arabidopsis DOK1 Encodes a Functional Dolichol Kinase Involved in Reproduction. *Plant J.* 81(2):292–303.
  53. Kinoshita, T. 2020. Biosynthesis and Biology of Mammalian GPI-Anchored Proteins. doi: 10.1098/rsob.190290.
  54. Kranz, C., C. Jungeblut, J. Denecke, A. Erlekotte, C. Sohlbach, V. Debus, H. G. Kehl, E. Harms, A. Reith, S. Reichel, H. Gröbe, G. Hammersen, U. Schwarzer, and T. Marquardt. 2007. A Defect in Dolichol Phosphate Biosynthesis Causes a New Inherited Disorder with Death in Early Infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 80(3):433–40.
  55. Krištić, J., and G. Lauc. 2017. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. Pp. 1–12 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1503. Humana Press Inc.
  56. Krištić, J., V. Zoldoš, and G. Lauc. 2015. Complex Genetics of Protein N-Glycosylation. *Glycosci. Biol. Med.* 1303–10.
  57. Kruszewska, J. S., A. H. Butterweck, W. Kurza, T. Tkowski, A. Migdalski, C. P. Kubicek, and G. Yna Palamarczyk. 1999. Overexpression of the *Saccharomyces Cerevisiae* Mannosylphosphodolichol Synthase-Encoding Gene in *Trichoderma Reesei* Results in an Increased Level of Protein Secretion and Abnormal Cell Ultrastructure. Vol. 65.
  58. Lefeber, D. J., A. P. M. de Brouwer, E. Morava, M. Riemersma, J. H. M. Schuurs-Hoeijmakers, B. Absmanner, K. Verrijp, W. M. R. van den Akker, K. Huijben, G. Steenbergen, J. van Reeuwijk, A. Jozwiak, N. Zucker, A. Lorber, M. Lammens, C. Knopf, H. van Bokhoven, S. Grünewald, L. Lehle, L. Kapusta, H. Mandel, and R. A. Wevers. 2011. Autosomal Recessive Dilated Cardiomyopathy Due to DOLK Mutations Results from Abnormal Dystroglycan O-Mannosylation. *PLoS Genet.* 7(12):1–10.
  59. Leidich, S. D., D. A. Drapp, and P. Orlean. 1994. A Conditionally Lethal Yeast Mutant Blocked at the First Step in Glycosyl Phosphatidylinositol Anchor Synthesis. *J. Biol. Chem.* 269(14):10193–96.
  60. Li, H., A. W. Debowski, T. Liao, H. Tang, H. O. Nilsson, B. J. Marshall, K. A. Stubbs, and M. Benghezal. 2017. Understanding Protein Glycosylation Pathways in Bacteria. *Future Microbiol.* 12(1):59–72.
  61. Li, S., L. Zhang, Q. Yao, L. Li, N. Dong, J. Rong, W. Gao, X. Ding, L. Sun, X. Chen, S. Chen, and F. Shao. 2013. Pathogen Blocks Host Death Receptor Signalling by Arginine GlcNAcylation of Death Domains. *Nature.*
  62. Lieu, M. T., B. G. Ng, J. S. Rush, T. Wood, M. J. Basehore, M. Hegde, R. C. Chang, J. E. Abdenur, H. H. Freeze, and R. Y. Wang. 2013. Severe, Fatal Multisystem Manifestations in a Patient with Dolichol Kinase-Congenital Disorder of Glycosylation. *Mol. Genet. Metab.* 110(4):484–89.
  63. Lizak, C., S. Gerber, S. Numao, M. Aebi, and K. P. Locher. 2011. X-Ray Structure of a Bacterial Oligosaccharyltransferase. *Nature* 474(7351):350–56.
  64. Lommel, M., P. R. Winterhalter, T. Willer, M. Dahlhoff, M. R. Schneider, M. F. Bartels, I. Renner-Müller, T. Ruppert, E. Wolf, and S. Strahl. 2013. Protein O-Mannosylation Is Crucial for E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(52):21024–29.

65. Lowe, J. B., and J. D. Marth. 2003. A Genetic Approach to Mammalian Glycan Function. *Annu. Rev. Biochem.* 72(1):643–91.
66. Magalhães, A., H. O. Duarte, and C. A. Reis. 2021. The Role of O-Glycosylation in Human Disease. *Mol. Aspects Med.* 79:100964.
67. Martínez, J. L., L. Liu, D. Petranovic, and J. Nielsen. 2012. Pharmaceutical Protein Production by Yeast: Towards Production of Human Blood Proteins by Microbial Fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23(6):965–71.
68. Mattanovich, D., P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer, and D. Porro. 2012. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Methods Mol. Biol.* 824:329–58.
69. Mösch, H. U., and G. R. Fink. 1997. Dissection of Filamentous Growth by Transposon Mutagenesis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 145(3):671–84.
70. Nakatsukasa, K., S. Okada, K. Umebayashi, R. Fukuda, S. Nishikawa, and T. Endo. 2004. Roles of O-Mannosylation of Aberrant Proteins in Reduction of the Load for Endoplasmic Reticulum Chaperones in Yeast\*. doi: 10.1074/jbc.M403234200.
71. Orlean, P. 1990. Dolichol Phosphate Mannose Synthase Is Required in Vivo for Glycosyl Phosphatidylinositol Membrane Anchoring, O Mannosylation, and N Glycosylation of Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10(11):5796–5805.
72. Orlean, P. 1992. Enzymes That Recognize Dolichols Participate in Three Glycosylation Pathways and Are Required for Protein Secretion. *Biochem. Cell Biol.* 70(6):438–47.
73. Orłowski, J., K. Machula, A. Janik, E. Zdebska, and G. Palamarczyk. 2007. Dissecting the Role of Dolichol in Cell Wall Assembly the Yeast Mutants Impaired in Early Glycosylation Reactions. 24(4):239–52.
74. Paprocka, J., A. Jezela-Stanek, A. Tylki-Szymańska, and S. Grunewald. 2021. Congenital Disorders of Glycosylation from a Neurological Perspective. *Brain Sci.* 11(1):1–25.
75. Pasikowska, M., G. Palamarczyk, and L. Lehle. 2012. The Essential Endoplasmic Reticulum Chaperone Rot1 Is Required for Protein N- and O-Glycosylation in Yeast. *Glycobiology* 22(7):939–47.
76. Perlin´ska-perlin´ska-Lenart, U., J. Orłowski, A. E. Laudy, E. Zdebska, G. yna Palamarczyk, and J. S. Kruszewska. 2006. Glycoprotein Hypersecretion Alters the Cell Wall in *Trichoderma Reesei* Strains Expressing the *Saccharomyces Cerevisiae* Dolichylphosphate Mannose Synthase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*
77. Rush, E. T., C. V. Baker, and W. B. Rizzo. 2017. Dolichol Kinase Deficiency (DOLK-CDG): Two New Cases and Expansion of Phenotype. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173(9):2428–34.
78. Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Späth, L. Epstein, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2000. The Role of Phosphoglycans in Leishmania-Sand Fly Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(1):406–11.
79. Sagt, C. M. J., B. Kleizen, R. Verwaal, M. D. M. De Jong, W. H. Muller, A. Smits, C. Visser, J. Boonstra, A. J. Verkleij, and C. T. Verrips. 2000. Introduction of an N-Glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4940–44.
80. Sambrook JF, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
81. Sato, M., K. Sato, S. Nishikawa, A. Hirata, J. Kato, and A. Nakano. 1999. The Yeast RER2 Gene, Identified by Endoplasmic Reticulum Protein Localization Mutations, Encodes Cis-Prenyltransferase, a Key Enzyme in Dolichol Synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 19(1):471.

82. Schäffer, C., S. Schäffer, and P. Messner. 2017. Emerging Facets of Prokaryotic Glycosylation. *FEMS Microbiol. Rev.* 036:49–91.
83. Schenk, B., F. Fernandez, and C. J. Waechter. 2001. The Ins(Ide) and out(Side) of Dolichyl Phosphate Biosynthesis and Recycling in the Endoplasmic Reticulum. *Glycobiology* 11(5).
84. Sekula, P., K. Dettmer, F. C. Vogl, W. Gronwald, L. Ellmann, R. P. Mohny, K. U. Eckardt, K. Suhre, G. Kastenmüller, P. J. Oefner, and A. Köttgen. 2017. From Discovery to Translation: Characterization of C-Mannosyltryptophan and Pseudouridine as Markers of Kidney Function. *Sci. Rep.* 7(1).
85. Shental-Bechor, D., and Y. Levy. 2008. Effect of Glycosylation on Protein Folding: A Close Look at Thermodynamic Stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(24):8256–61.
86. Shridas, P., and C. J. Waechter. 2006. Human Dolichol Kinase, a Polytropic Endoplasmic Reticulum Membrane Protein with a Cytoplasmically Oriented CTP-Binding Site. *J. Biol. Chem.* 281(42):31696–704.
87. Spiro, R. G. 2002. Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds. *Glycobiology* 12(4).
88. Stagljar, I., S. Te Heesen, and M. Aebi. 1994. New Phenotype of Mutations Deficient in Glucosylation of the Lipid-Linked Oligosaccharide: Cloning of the ALG8 Locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(13):5977–81.
89. Stanley, P. 2011. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(4):1–13.
90. Tang, H., S. Wang, J. Wang, M. Song, M. Xu, M. Zhang, Y. Shen, J. Hou, and X. Bao. 2016. N-Hypermannose Glycosylation Disruption Enhances Recombinant Protein Production by Regulating Secretory Pathway and Cell Wall Integrity in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sci. Rep.* 6(1):25654.
91. Touzé, T., D. Mengin-Lecreulx. 2008. Undecaprenyl Phosphate Synthesis. *EcoSal Plus* 3(1).
92. Turner, K. M., L. C. Wright, T. C. Sorrell, and J. T. Djordjevic. 2006. N-Linked Glycosylation Sites Affect Secretion of Cryptococcal Phospholipase B1, Irrespective of Glycosylphosphatidylinositol Anchoring. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(10):1569–79.
93. Walker JM. The Protein Protocols, Handbook. New Jersey: Humana Press; 2002.
94. Welte, M. 2013. Regulation of Dolichol-Linked Glycosylation. *Glycoconj. J.* 30(1):51–56.
95. Wild, R., J. Kowal, J. Eyring, E. M. Ngwa, M. Aebi, and K. P. Locher. 2018. Structure of the Yeast Oligosaccharyltransferase Complex Gives Insight into Eukaryotic N-Glycosylation. *Science* (80-. ). 359(6375):545–50.
96. Wildt, S., and T. U. Gerngross. 2005. The Humanization of N-Glycosylation Pathways in Yeast. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005 32 3(2):119–28.
97. William James, A., C. Ravi, M. Srinivasan, and V. Nachiappan. 2019. Crosstalk between Protein N-Glycosylation and Lipid Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sci. Reports* 2019 91 9(1):1–15.
98. Xu, C., and D. T. W. Ng. 2015. Glycosylation-Directed Quality Control of Protein Folding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(12):742–52.
99. Zimbres, F. M., A. L. Valenciano, E. F. Merino, A. Florentin, N. R. Holderman, G. He, K. Gawarecka, K. Skorupinska-Tudek, M. L. Fernández-Murga, E. Swiezewska, X. Wang, V. Muralidharan, and M. B. Cassera. 2020. Metabolomics Profiling Reveals New Aspects of Dolichol Biosynthesis in *Plasmodium Falciparum*. *Sci. Reports* 2020 101 10(1):1–17.
100. Žiogienė, D., M. Valavičiūtė, M. Norkienė, A. Timinskas, and A. Gedvilaitė. 2019. Mutations of *Kluyveromyces Lactis* Dolichol Kinase Enhances Secretion of Recombinant Proteins. *FEMS Yeast Res.* 19(3).