

Механізми селективної автофагії цитозольних білків у дріжджів

Реєстраційний номер проєкту: 2023.05/0006

Назва конкурсу

Дослідницькі інфраструктури для проведення передових наукових досліджень

Тематичний напрям конкурсу

Тематика проєктів має відповідати принаймні одному з пріоритетних напрямів розвитку науки і техніки (у відповідності до статті 3 Закону України “Про пріоритетні напрями розвитку науки і техніки”).

Характер досліджень

Фундаментальні дослідження

Вид грантової підтримки

Інституційний грант

Напрямок грантової підтримки

- Виконання наукових досліджень і розробок

Науковий напрям

- Біологія, медицина і аграрні науки

Спеціальність

- Молекулярна біологія

Опис проєкту

Анотація проєкту

Автофагія, це як правило, неспецифічний процес деградації клітиною власних органел та ділянок цитоплазми за допомогою вакуолей. Цей процес відбувається за участі десятків так званих ATG генів. Ці гени виявляють високу гомологію від дріжджів до клітин ссавців, що свідчить про консервативність механізмів автофагії. Ми нещодавно показали, що інактивація цитозольних ферментів метаболізму метанолу (формальдегіддегідрогеназа, форміатдегідрогеназа) та глюконеогенезу (фруктозо-1,6-бісфосфатаза) у дріжджів *Komagataella phaffii* відбувається шляхом деградації у вакуолях шляхом автофагії, однак участь ATG генів в даному процесі залишається нез'ясованою. В даному проєкті ми плануємо ідентифікувати ті з відомих ATG генів, що залучені в автофагію нативних та гетерологічних цитозольних ферментів, селекціонувати мутанти з пошкодженою автофагією цитозольних білків та ідентифікувати нові специфічні гени, залучені в цей процес.

Короткий опис проєкту

Гомеостаз клітинних білків підтримується шляхом їх постійного синтезу та деградації. Деградація цитозольних білків може відбуватися двома шляхами – в цитозольному мультиензимному комплексі (протеасомі) або в спеціальній органелі, вакуолі (інша назва – лізосома). Останній процес називається автофагією. Як правило, автофагійна деградація цитозольних білків є неспецифічним процесом, при якому випадковий фрагмент цитозолу переноситься до вакуолі і деградує. В цьому процесі беруть участь так звані Atg білки (1). Відомі також процеси специфічної автофагії, але вони в основному стосуються деградації певних органел, як пероксисом (пексофагія), мітохондрій (мітофагія) тощо (2; 3; 4). Якщо розглядати специфічну автофагію цитозольних білків, то механізм його з'ясовано лише для біосинтетичного так званого Cvt (Cytosol to vacuole targeting) шляху доставки в вакуолю резидентних білків, зокрема, амінопептидази I. В ньому додатково беруть участь рецепторний білок Atg19, риштувальний білок Atg11 та убіквітин-подібний білок Atg8 (5; 6). Водночас механізми деградативної специфічної автофагії цитозольних білків не з'ясовані взагалі, та й поки що мало доведених випадків саме такої (специфічної автофагійної) деградації. Раніше було показано, що у дріжджів *Komagataella phaffii* цитозольний фермент форміатдегідрогеназа деградує в специфічному автофагійному шляху, що ініціюється перенесенням клітин з метанолу в середовище з глюкозою але не з етанолом (7). Ми підтвердили ці результати (8) і додатково показали, що інактивація цитозольних ферментів формальдегіддегідрогенази та фруктозо-1,6-бісфосфаази відбувається шляхом автофагії (8; 9). Деградація гальмувалася у мутантів з дефектом вакуолярних протеїназ та сенсору глюкози, водночас інгібітор протеасомної деградації MG-132 не впливав на цей процес. Отримано штами *K. phaffii*, що експресують рекомбінантну β -галактозидазу дріжджів *Kluveromyces lactis* під індукованим метанолом промотором FLD1 *K. phaffii*. Глюкоза викликала інактивацію β -галактозидази, що залежала від вакуолярних протеїназ (9). Продуцент β -галактозидази використано як систему для зручної селекції мутантів з пошкодженою автофагією, що дозволило ідентифікувати новий ген ACG1, залучений в автофагію цитозольних і пероксисомних білків (10). Таким чином, є незаперечні докази специфічної автофагійної деградації цитозольних ферментів у дріжджів, що спостерігаються у клітинах, вирощених в середовищі з метанолом, після їх перенесення на середовище з глюкозою, але не етанолом. Це істотно відрізняє даний

феномен від пексофагії, яка відбувається після перенесення клітин з середовища з метанолом в середовища як з глюкозою, так і етанолом (11; 12). Гени, залучені в автофагію цитозольних білків у дріжджів (подібно до інших організмів) не ідентифіковано. Не відомо навіть, чи специфічна автофагія цитозольних ферментів проходить через етапи утворення фагофору та автофагосоми, які є обов'язковими при неспецифічній автофагії цитозольних білків (13).

Вважається, що специфічна автофагія спостерігається після перебудови клітинного вмісту під час, наприклад, зміни вуглецевого субстрату (14). Цікаво що в доведених прикладах деградативної автофагії цитозольних білків вони завжди кодуються генами під контролем регульованих промоторів (формальдегіддегідрогенази FLD1 та форміатдегідрогенази FDH1). Чи зміна способу регуляції синтезу цих білків впливала б на їх автофагійну деградацію? На перший погляд, таке питання некоректне, оскільки яке відношення має регуляція синтезу білка на рівні транскрипції до його посттрансляційної деградації? Однак ми маємо дані, що у мутантів *acs1*, *acs2*, *acs3* та *icl1* у *Pichia methanolica* та у *gcr1* мутантів у *Ogataea polymorpha* спостерігається конститутивний біогенез пероксисом на етанолі (*P. methanolica*) або глюкозі (*O. polymorpha*) і відсутня пексофагія, ініційована цими субстратами (15; 16; 17; 18). Чи подібна ситуація спостерігатиметься для індивідуальних цитозольних білків після зміни регуляції їх синтезу, на разі невідомо.

Таким чином, в даному проєкті буде встановлено, які з відомих ATG генів залучені в специфічну деградативну автофагію цитозольних білків. Будуть також ідентифіковані нові гени, залучені в цей процес. Буде вивчено можливий зв'язок між транскрипційною регуляцією синтезу білків та їх автофагійною деградацією, а також з'ясовано, чи генетичний дефект автофагії нативних та гетерологічних цитозольних білків призводить до зростання їх продукції.

Ключові слова

Автофагія, дріжджі, *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*, цитозольні білки, ATG гени, формальдегіддегідрогеназа, форміатдегідрогеназа, β -галактозидаза

Мета наукового проєкту

Метою проєкту є вивчення механізмів селективної автофагійної деградації нативних та рекомбінантних цитозольних білків у дріжджів *Komagataella phaffii*. З цією метою автофагія цих білків буде вивчена у сконструйованих мутантів з делеціями основних ATG генів та у штамів зі зміненою регуляцією синтезу цитозольних білків. Буде розроблена система селекції мутантів з пошкодженою автофагійною деградацією цитозольних білків та ідентифіковано нові гени, залучені в даний процес.

Основні завдання проєкту

1. Делетувати гени ATG1, ATG6, ATG8, ATG9, ATG11, ATG12, ATG15 та ATG19 у штамів *K. phaffii*, що експресують злиті білки формальдегіддегідрогенази, форміатдегідрогенази та фруктозо-1,6-бісфосфатази з GFP білком, та провести первинний аналіз автофагії у отриманих делеційних штамів.
2. Дослідити інактивацію та деградацію цитозольних білків (*Fld1*, *Fdh1*, *Fbp1* та *Lac4*) у штамів з делецією ATG генів, та здійснити експресію FLD1 та LAC4 генів під контролем промоторів, які індукуються метанолом (FLD1), етанолом (ICL1) та конститутивним (TDH1) промотором.

3. Селекціонувати мутанти з дефектом автофагії цитозольних білків, вивчити їх властивості та ідентифікувати гени, залучені в цей процес. Визначити зміни в автофагійній деградації та накопиченні цитозольних білків Fld1, Fdh1 та Lac4 у селекціонованих мутантів.

Національна Академія Наук України
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ
вул. Драгоманова, 14/16, м. Львів, 79005
тел. (032) 261-21-08 факс (032) 261-21-48
www.cellbiol.lviv.ua
e-mail: institut@cellbiol.lviv.ua
ЄДРПОУ 25255758



National Academy of Sciences of Ukraine
INSTITUTE of CELL BIOLOGY
Drahomanov St., 14/16, 79005, Lviv, Ukraine
Tel. (380-32) 261-21-08 Fax. 380-32-261-21-48
www.cellbiol.lviv.ua
e-mail: institut@cellbiol.lviv.ua
USREOU 25255758

№ 36 від «12» лютого 2024 року
На № від « » _____ 20 року

Національний фонд
досліджень України

Інститут біології клітини НАН України

(найменування підприємства/установи/організації)

в особі заступника директора Інституту біології клітини НАН України Дмитрука Костянтина Васильовича

(посада, прізвище, ім'я, по-батькові керівника установи)

надає згоду на реалізацію проекту Механізми селективної автофагії цитозольних білків у дріжджів

(назва проекту)

в період з «01» серпня 2024 року по «31» грудня 2026 року

(строки реалізації проекту)

на базі Інституту біології клітини НАН України

(найменування підприємства/установи/організації)

у разі визначення переможцем за результатами конкурсу проектів із виконання наукових досліджень і розробок 2023.05 «Дослідницькі інфраструктури для проведення передових наукових досліджень»

(назва конкурсу)

Зміст заявки, поданої на участь в конкурсі не становить державну таємницю (згідно з Законом України «Про державну таємницю»).

Цим підтверджую, що науковий керівник проекту директор Інституту біології клітини НАН України, Сибірний Андрій Андрійович має досвід керівництва науковими проектами, які фінансувались у тому числі за рахунок бюджетних коштів.

Заступник директора Інституту біології клітини НАН України

(посада керівника установи)



Дмитрук К. В.
(прізвище, ім'я, по-батькові)

(дата)
12.02.2024