

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ



СТАСИК ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 577.214:582.282.23:576.311.34

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ВУГЛЕЦЕВОЇ КАТАБОЛІТНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ
ТА ГОМЕОСТАЗУ ПЕРОКСИСОМ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Львів-2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі молекулярної генетики та біотехнології та відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України,
Сибірний Андрій Андрійович,
Інститут біології клітини НАН України,
директор, завідувач відділу молекулярної генетики та
біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України,
Підгорський Валентин Степанович,
Інститут мікробіології і вірусології НАН України
ім. Д.К.Заболотного
директор, завідувач відділу фізіології промислових
мікроорганізмів

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України,
директор, завідувач відділу генетичної інженерії

доктор біологічних наук, професор,
Федоренко Віктор Олександрович,
Львівський національний університет імені Івана
Франка,
завідувач кафедри генетики та біотехнології

Захист відбудеться «03» липня 2019 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.246.01, Інститут біології клітини НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітини НАН України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16

Автореферат розісланий «1» червня 2019 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



Т. М. Прокопів

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дослідження молекулярних механізмів регуляції метаболізму та гомеостазу органел еукаріотичної клітини є актуальною проблемою сучасної клітинної біології. Одними із основних регуляторних механізмів, що забезпечує адаптацію метаболізму до змін навколишнього середовища у мікроорганізмів, є диференційна регуляція транскрипції репресибельних генів та катаболітна інактивація, у тому числі деградація відповідних білків чи органел, які їх містять. Важливими факторами, що викликають таку регуляцію, є різні стресові умови, а також наявність у середовищі того чи іншого джерела азоту та вуглецю (Shashkova *et al.*, 2015).

Глюкоза є фаворитним для абсолютної більшості мікроорганізмів джерелом Карбону та енергії. Ця гексоза викликає глобальні регуляторні ефекти у клітинах дріжджів, що забезпечують її переважний транспорт та метаболізм, тоді як гени ферментів утилізації альтернативних джерел Карбону, підлягають ефективній транскрипційній репресії, а відповідні ферменти інактивації та деградації, протеасомній чи вакуолярній. Молекулярні механізми глюкозної катаболітної регуляції є одним із основних об'єктів дослідження даної дисертаційної роботи.

Слід зазначити, що сучасне знання про механізми катаболітної регуляції у дріжджів є обмеженим зокрема тому, що традиційним, а часто і єдиним об'єктом досліджень були пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Ці дріжджі належать до нечисленних так званих «Кребтрі-позитивних» видів, здатних до зброджування глюкози за присутності кисню. Регуляторні механізми, що забезпечують переважну утилізацію та ефективне бродіння глюкози у *S. cerevisiae*, є радше спеціалізованими і еволюційно адаптованими до ферментативного метаболізму, пов'язаного з високими екзогенними концентраціями гексоз та інших цукрів. Тому відповідні порівняльні дослідження мають бути проведені на ширшому колі експериментальних об'єктів.

Метилотрофні дріжджі, здатні засвоювати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії, мають ряд переваг як модельний еукаріотичний об'єкт для досліджень катаболітної регуляції (Sibirny, 2016). Синтез пероксисомних та цитозольних ферментів утилізації метанолу репресується у них глюкозою, деякими іншими цукрами, а також етанолом. Глюкозній репресії підлягає також біогенез пероксисом – органел, необхідних для метилотрофного росту, але не для утилізації глюкози та інших альтернативних субстратів-репресорів. Окрім цього, глюкоза та етанол викликають у метилотрофів автофагійну деградацію пероксисом, – високоселективний процес, щодо механізму якого були лише фрагментарні дані на момент, коли було розпочато виконання цієї дисертаційної роботи. Слід зазначити, що консервативний у еукаріотів механізм неселективної автофагійної деградації білків був встановлений в основному з використанням дріжджів як модельних об'єктів. Розуміння механізмів підтримання гомеостазу пероксисом є необхідним для ефективного лікування ряду спадкових захворювань людини, пов'язаних з пошкодженням біогенезу чи контролю деградації цих органел. Також мало дослідженими залишаються механізми сенсінгу та перших етапів передачі сигналу від карбонових субстратів-ефекторів. Важливою умовою успішного проведення

досліджень, описаних у цій роботі, є доступність повних послідовностей геномів двох використаних модельних видів метилотрофних дріжджів, – *Ogataea (Hansenula) polymorpha* та *Komagataella (Pichia) pastoris*, а також добре розроблені для них методи класичної та молекулярної генетики.

Таким чином, дослідження механізмів різних типів глюкозної катаболітної регуляції на моделі дріжджів-метилотрофів становить значний фундаментальний інтерес. Додатково слід зазначити, що на основі потужних промоторів репресибельних генів, зокрема гену алкогольоксидази метилотрофних дріжджів, була розроблена система експресії гетерологічних білків медичного та біотехнологічного значення (Stasyk, 2017). Штами–продуценти з пошкодженими фізіологічними механізмами катаболітної регуляції можуть бути альтернативою для ефективного синтезу рекомбінантних білків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота була частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАНУ за темою «Молекулярні механізми регуляції гомеостазу пероксисом, біосинтезу флавінів і гетерологічних білків та захисту від стресу у неконвенційних дріжджів» (№ держреєстрації 0102U000613, Шифр теми 2.2.9.13, 2002-2005 рр.). Окремі розділи дисертаційної роботи виконувались у рамках міжнародних проектів INTAS Європейського співтовариства INTAS-0015 «Селективна деградація пероксисом у дріжджів» (1996-1998), INTAS-0788 «Принципи біогенезу та деградації пероксисом у дріжджів» (2001-2003) та INTAS-0583 «Генетичний аналіз метаболічних шляхів *H. polymorpha* та функціональний аналіз генів, задіяних у метаболізмі метанолу, гомеостазі пероксисом, глікозилюванні білків, підтриманні цілісності клітинної стінки та секреції» (2002-2004); Двох грантів FIRCA (США): R03 TW00547 «Біогенез та деградація пероксисом у метилотрофних дріжджів *P. pastoris*» та 2R03 TW00547-04A2 «Селективна автофагічна деградація пероксисом у дріжджів» (2001-2004); а також проекту CRDF UB1-2447-LV-02 (США) «Автофагічна деградація пероксисом у дріжджів» (2002-2004).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи була ідентифікація та функціональний аналіз молекулярних компонентів механізмів карбонової катаболітної репресії, біогенезу пероксисом та їх автофагічної деградації (пексофагії) у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* та *P. pastoris*, та їх порівняльний аналіз із аналогами у пекарських та інших дріжджів. Окрім цього, було поставлено за мету вдосконалити систему експресії власних та гетерологічних білків на основі мутантних штамів дріжджів з пошкодженою катаболітною репресією чи біогенезом пероксисом.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити роль компонентів системи транспорту глюкози у механізмах сигналізування та катаболітної репресії у *H. polymorpha*
2. Ідентифікувати та провести молекулярно-генетичний та функціональний аналіз потенційних гомологів транскрипційних факторів Mig1, Mig2 та Nap4 у *H. polymorpha*.
3. Отримати колекцію мутантів, ідентифікувати та проаналізувати молекулярні

компоненти селективної деградації пероксисом (пексофагії) у метилотрофних дріжджів.

4. Виділити та провести функціональний аналіз мутантів *P. pastoris* та *H. polymorpha* з пошкодженою регуляцією біогенезу та гомеостазу пероксисом.

5. Розробити нові методи мультикопійної інтеграції векторів експресії та нову платформу продукції рекомбінантних білків у *H. polymorpha* на основі мутантів з пошкодженою глюкозною репресією чи біогенезом пероксисом.

Об'єкт дослідження: явища та молекулярні механізми карбонової катаболітної регуляції експресії генів та регуляції гомеостазу (біогенезу та деградації) пероксисом у метилотрофних дріжджів.

Предмет дослідження: нові гени та відповідні білкові продукти, задіяні у катаболітній регуляції та функціонуванні пероксисом, а також мутантні штами метилотрофних дріжджів з пошкодженими відповідними механізмами, зокрема: 1) мутантні штами дріжджів *H. polymorpha* з делетованими генами гомологів транспортерів гексоз, які можуть виконувати сенсорну, або транспортну функцію та брати участь у процесах катаболітної регуляції; 2) мутантні штами дріжджів *H. polymorpha* з делетованими генами гомологів транскрипційних факторів, задіяних у транскрипційній регуляції у *S. cerevisiae*; 3) мутантні штами метилотрофних дріжджів з пошкодженою селективною деградацією пероксисом чи їх біогенезом; 4) мутантні штами метилотрофних дріжджів – продуценти гетерологічних білків.

Методи дослідження. У роботі використовували класичні та сучасні методи генетичних, біохімічних, мікробіологічних, мікроскопічних досліджень та клітинної біології. Для конструювання рекомбінантних векторів використовували різноманітні молекулярно-біологічні методи маніпуляцій з ДНК і генетичної трансформації бактерій та дріжджів. Для аналізу мутантних штамів дріжджів та продуцентів рекомбінантних білків використовували метод ПЛР-аналізу та гібридизації ДНК за Саузерном. Експресію генів досліджували методами ПЛР у реальному часі, якісний та кількісний склад білків аналізували методом Вестерн-блот аналізу. Визначали активність ряду ферментів у безклітинних екстрактах та колоніях дріжджів. Застосовували методи спектрофотометрії для моніторингу культур мікробних об'єктів. Для клітинно-біологічних досліджень застосовували методи флуоресцентної та електронної мікроскопії. У роботі широко використовувались методи комп'ютерного аналізу послідовностей генів та білків, та баз даних геномів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше ідентифіковано компоненти транспортної системи гексоз у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, задіяні у механізмі транскрипційної індукції та репресії у відповідь на флуктуації рівня позаклітинної глюкози. Встановлено, що транспорт глюкози є важливим, але не єдиним чинником, що визначає ефективність глюкозної репресії. Встановлено, що нетранспортуючий сенсор гексоз Hxs1 (Hexose sensor) не бере участь у механізмах глюкозної репресії чи деградативної інактивації, але є необхідним для індукції функціонального транспортера гексоз Hxt1 (Hexose transporter). Запропоновано, що білок *H. polymorpha* Gcr1 (Glucose catabolite repression) є представником нового типу транспортуючого рецептора (трансцептора), унікальним для *H. polymorpha* та близькоспоріднених дріжджів. Показано, що компоненти

механізму глюкозної репресії у дріжджів *S. cerevisiae*, Mig1/2 не є необхідними для відповідного механізму у *H. polymorpha*. Вперше на моделі дріжджів встановлено, що комплекс кіназ Vps15/Vps34 є необхідним для механізму загальної автофагії. Розроблено новий ефективний метод позитивної селекції клонування *ATG* генів у *P. pastoris* шляхом функціональної комплементачії відповідних мутантів банком генів. Вперше ідентифіковано ряд генів метилотрофних дріжджів, задіяних у механізмі селективної деградації пероксисом, але не загальної автофагії у відповідь на голодування за джерелом азоту (Atg26, Atg28, Atg35). Ідентифіковано новий унікальний білок-пероксин Pex36 у метилотрофних дріжджів, задіяний у механізмі біогенезу та регуляції гомеостазу пероксисом. Розроблено нову ефективну систему для мультикопійної інтеграції векторів експресії у геном штамів-продуцентів.

Практичне значення одержаних результатів. На основі виділених мутантів із пошкодженим механізмом глюкозної репресії створено модифіковану платформу для експресії рекомбінатних білків біотехнологічного та медичного значення у *H. polymorpha*.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно, або спільно з науковим консультантом, академіком НАН України, д.б.н., проф. Сибірним А.А., сформульовано головні завдання дослідження, розроблено програму проведення досліджень, відібрано методи та об'єкти для розв'язання поставлених завдань та самостійно, або спільно з колегами, виконано викладені у роботі експерименти. Аналіз транспорту глюкози та експресії генів, що регулюються глюкозою, проводився к.б.н. Стасик О.Г. на базі лабораторії проф. Й. Тевелейна (Інститут ботаніки та мікробіології, м. Лювен, Бельгія), якому автор висловлює щире подяку за сприяння у проведенні цих досліджень. Частина морфологічних досліджень пексофагії з використанням методів електронної мікроскопії проводилась у співпраці з лабораторією проф. М. Венхауза (Біологічний центр університету м. Гронінген, Нідерланди) та проф. С. Субрамані (Університет Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Клонування генів пексофагії у дріжджів *P. pastoris* було здійснене дисертантом під час стажування у лабораторії проф. Д. Крегга (Орегонський інститут вищих студій, США). Окремі результати спільних досліджень використано в дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук Стасик О.Г. «Ідентифікація нових генів, що беруть участь у катаболітній регуляції у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*», 2008 р. Автор також висловлює подяку к.б.н. Кулачковському О.Р. (біологічний факультет Львівського національного університету ім. І. Франка) за сприяння у проведенні частини електронно-мікроскопічних досліджень. Результати вищевказаних досліджень опубліковано у спільних публікаціях. Автор висловлює щире подяку Красовській О.С. та усім іншим співавторам статей, опублікованих за результатами роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей на наступних наукових конференціях: I Конгресі Українського товариства клітинної біології (Львів, Україна, 2004), Міжнародній науковій конференції «Сенсинг поживних сполук плазматичною мембраною еукаріотичних клітин» (Сіренцестер, Великобританія, 2004), XII Міжнародному

дріжджовому конгресі «Дріжджі для прогресу людства» (Київ, 2008), XXVII Міжнародному спеціалізованому дріжджовому симпозиумі (Париж, Франція, 2009), II, IV та V Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Варшава, Польща, 2007, Вроцлав, Польща, 2011 та Чернівці, Україна, 2013), I міжнародному симпозиумі «Неконвенційні дріжджі у постгеномну еру» (Львів, Україна, 2011), III з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ялта, Україна, 2012), IV з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014), Міжнародній конференції по неконвенційних дріжджах NSY-2018 (Жешів, Польща, 2018), Міжнародній конференції «Досягнення мікробіології та біотехнології» (Львів, Україна, 2018) та інших.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 79 наукових робіт, з них 27 статей у міжнародних (19) із сумарним імпаکت-фактором 67 (згідно даних Thomson Reuters), та фахових вітчизняних виданнях (8), 1 розділ у міжнародній монографії, 1 патент США та 1 патент України на корисну модель та 49 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

Зміст та обсяг роботи. Дисертація включає розділи «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел». Текст дисертації викладено на 424 сторінках машинопису, з яких основна частина складає 280 сторінок. Робота містить 17 таблиць і 121 рисунок. Список літератури нараховує 492 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. У цьому розділі викладено дані про сенсинг глюкози та пов'язану регуляцію у дріжджів, включаючи опис Snf3/Rgt2-залежного шляху транскрипційної індукції, Mig1-Hxk2-Snf1 шляху глюкозної репресії, Grp1-cAMP/PKA шляху регуляції метаболізму. Висвітлено питання, пов'язані з фізіологічними функціями, біосинтезом, та селективною деградацією пероксисом, значенням метилотрофних дріжджів як об'єктів у фундаментальних та прикладних дослідженнях. На основі огляду наукової літератури обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертації.

Матеріали і методи досліджень. Штами дикого типу та похідні мутанти дріжджів вирощували при 30°C (*P. pastoris*, *S. cerevisiae*) або 37°C (*H. polymorpha*) на стандартних багатих середовищах YPD (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 1% глюкоза), або мінеральному синтетичному середовищі YNB (0,67 % Yeast Nitrogen Base «Difco», 0,5% сульфат амонію), з додаванням альтернативних джерел вуглецю у концентрації 1%, якщо не вказано інакше. Бактерії *Escherichia coli* DH5α вирощували при 37°C на багатому середовищі LB (Ausubel *et al.*, 1990). Усі агаризовані середовища для мікроорганізмів містили 1,5% агар.

У роботі використовували методи класичної, молекулярної генетики дріжджів, згідно (Gellissen *et al.*, 2001). Трансформацію дріжджів *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae* та бактерій *E. coli* проводили методом електропорації (Faber *et al.*, 1994; Sambrook *et al.*, 2012). Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів проводили як описано для *S. cerevisiae* (Wach *et al.*, 1994). Виділення плазмідної ДНК з клітин

бактерій, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК, розщеплення ДНК рестриктазами, дефосфорилування та затуплення кінців лінеаризованих векторів Т4 ДНК-полімеразою, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), аналіз ДНК методом гібридизації за Саузерном та інші подібні методи проводили згідно (Sambrook *et al.*, 1989, 2012) із застосуванням модифікацій, згідно з інструкціями виробників ферментів чи аналітичних наборів. При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірми «IDT Technologies» (США). Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США). Для певних молекулярно-біологічних методів використовували ензими фірми «Fermentas» (Литва) згідно з методиками виробника. Експресію генів за допомогою методу Q-PCR (кількісна полімеразна реакція в режимі реального часу) аналізували згідно з (Bustin, 2002). Нормалізацію даних проводили за геном актину *ACT1* з використанням порівняльного методу $\Delta\Delta C_t$.

Біомасу дріжджів визначали спектрофотометрично при $\lambda = 600$ нм. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі (Lowry *et al.*, 1951). Субклітинне фракціонування клітин дріжджів проводили за (Cregg *et al.*, 2009) з модифікаціями. Рівень індивідуальних білків визначали методом Вестерн-блот аналізу у безклітинних екстрактах, розділених SDS-електрофорезом (Laemmli, 1970). Визначення активності пероксисомної алкогольоксидази у безклітинних екстрактах проводили як описано в (Гончар *та ін.*, 1995), візуалізацію активності АOX *in situ* у дріжджових колоніях – згідно (Сибірний, Титаренко, 1986) з модифікаціями. Дослідження транспорту глюкози клітинами дріжджів проводили згідно з методикою (Gamo *et al.*, 1994). Електронно-мікроскопічні дослідження проводились як описано в (Stasyk *et al.*, 2004). Флуоресцентно-мікроскопічні дослідження здійснювались на мікроскопі Zeiss AxioLam A1 (Carl Zeiss, Німеччина).

У роботі використовувалися бази даних геномів *H. polymorpha* (<http://ssl.biomax.de/rheinbiotech>; <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>), *P. pastoris* (<http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>), *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), та відкриті бази даних PubMed та мережевого сервісу BLAST NCBI (Bethesda, MD, USA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Аналіз нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); та пакету програм з <http://www.bioinformatics.org/sms/>. Для порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей та філогенетичного аналізу використовували алгоритми ClustalW (Corpet, 1988) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> та PROSCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl). Для аналізу топології білків використовували програму TMpred (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPREDform.html>).

Для кожної групи показників, отриманих у трьох паралелях, визначали середнє арифметичне значення, середнє квадратичне відхилення та стандартну похибку. Для визначення істотної різниці використовували критерій Стюдента при 5% рівні достовірності кореляційного зв'язку (Деркач *и др.*, 1977).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження ролі компонентів системи транспорту глюкози в механізмах глюкозного сигналізування та катаболітної регуляції в *H. polymorpha*. Термотолерантні Кребтрі-негативні (нездатні до аеробної ферментації) метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* є важливим модельним об'єктом для досліджень молекулярних механізмів біогенезу та деградації пероксисом (Sibirny, 2016), ефективною платформою для експресії гетерологічних білків, що в основному регулюються репресованими глюкозою промоторами (Stasyk, 2017), та перспективним організмом для високотемпературної ко-ферментації основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози (Dmytruk *et al.*, 2017). Всебічне розуміння глюкозо-залежних сигнальних шляхів у цих дріжджів має таким чином фундаментальний та прикладний інтерес.

Ідентифікація та аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів *HXS1* та *HXT1* та їх порівняння з базами даних. Було проведено скринінг послідовності геному *H. polymorpha* з метою пошуку гомологів транспортерів гексоз, зокерма тих, що є потенційними сенсорами глюкози. Ідентифіковано ген *HXS1* (*HeXose Sensor*), який є найближчим внутрішньовидовим гомологом раніше описаного нами у *H. polymorpha* потенційного сенсора *Gcr1* (*Glucose catabolite repression*), необхідного для ефективного транспорту гексоз та глюкозної репресії, але не для механізму пексофагії у цього виду (Stasyk *et al.*, 2004). *Hxs1* виявляє 44% ідентичності первинної амінокислотної послідовності до *Gcr1* у ділянці 12-ти трансмембранних доменів (ТМ), характерних для всіх транспортерів гексоз з надродини фасилітаторів (MFS) (Рис. 1). *Hxs1* належить до окремої підгрупи гомологів транспортерів гексоз, до якої також входять усі відомі так звані нетранспортуючі сенсори глюкози, зокерма *S. cerevisiae* *Snf3* та *Rgt2*. При цьому *Hxs1* виявився ближчим гомологом, у порівнянні із *Gcr1*, до таких нетранспортуючих сенсорів (54% ідентичності до *Snf3* та *Rgt2*). Таким чином, відповідні гени *HXS1* та *GCR1* не виникли в результаті генної дуплікації у геномі *H. polymorpha*.

Також виявлено, що геном *H. polymorpha* містить ряд інших генів, чії передбачувані транспортер-подібні білкові продукти загалом виявляють менше 30% подібності до *Hxs1* та *Gcr1*. Єдиним винятком є продукт гена, позначеного як *HXT1* (*HeXose Transporter*). *Hxt1* виявляє 37% та 34% ідентичності до *Gcr1* та *Hxs1*, відповідно, але водночас більше 60% ідентичності до *Hxt1* *S. cerevisiae*. Відповідно, *Hxt1* належить до філогенетичної групи функціональних транспортерів глюкози.

Конструювання штамів з делеціями у генах *HXS1* та *HXT1*, подвійного делеційного штаму $\Delta gcr1 \Delta hxs1$ та аналіз їх фенотипів. Для з'ясування фізіологічних функцій двох ідентифікованих гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha*, сконструйовано відповідні $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$ делеційні мутанти та проведено їх детальний аналіз у порівнянні із раніше описаним $\Delta gcr1$ мутантом (Stasyk *et al.*, 2004).

Виявилось, що кінетика росту штамів $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$ у мінеральному середовищі YND з 1% глюкози чи фруктози не відрізнялась суттєво від динаміки росту штаму дикого типу, за винятком видовження лаг фази. Тривалість лаг фази була ще довшою у обох мутантів у середовищі з 5 % глюкози, тоді як час подвоєння

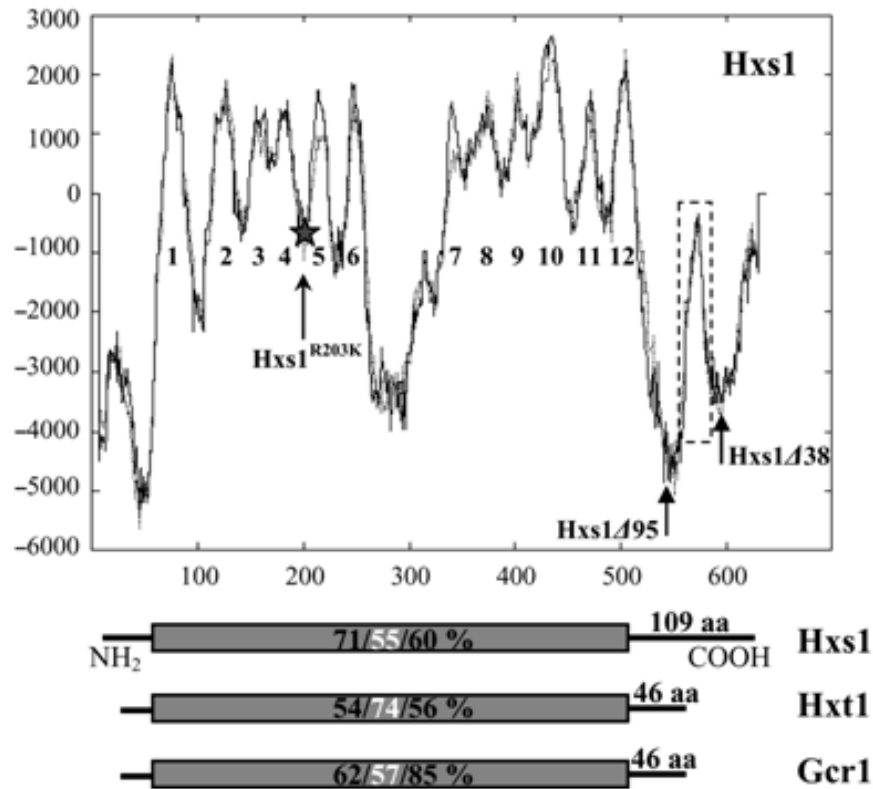


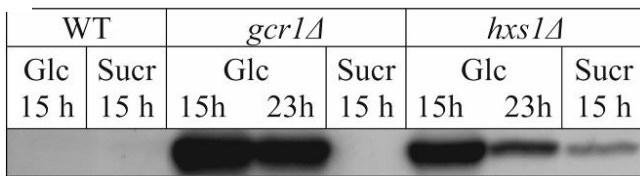
Рис. 1. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha* Hxs1, Hxt1 та Gcr1. (А) Передбачена топологія амінокислотної послідовності Hxs1. Показники гідрофобності відкладено на осі Y, порядкове число амінокислотних залишків – на осі X. Пронумеровано дванадцять передбачених трансмембранних сегментів (ТМ 1-12). Нижче схематично представлено структури трьох Hxt гомологів *H. polymorpha* та позначено у відсотках подібність їх послідовностей до *ScSnf3/ScHxt1/AnMSTA*, відповідно. Зірочкою позначено залишок R203 в Hxs1, що при заміні на залишок лізину (К) конвертує Hxs1 у конститутивно-сигналюючу форму. Вертикальні стрілки вказують на сайти С-кінцевих делецій, які роблять білок нефункціональним. Сектор обмежений пунктирною лінією позначає потенційний “домен глюкозного сенсора” у Hxs1.

біомаси в експоненціальній фазі росту не відрізнявся від штаму дикого типу. Слід зауважити, що затримка росту була більш вираженою у клітинах, вирощених на агаризованих середовищах (Рис. 2). При цьому аналіз транспорту міченої глюкози виявив, що *Δhxs1* та *Δhxt1* мають подібне зниження ефективності низькоафінного транспорту цього цукру. Таким чином, Hxt1 є функціональним низькоафінним транспортером, необхідним для ефективної адаптації до високих концентрацій гексоз, але не єдиним у *H. polymorpha*.

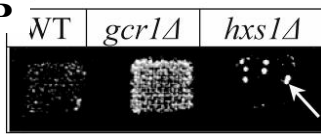
У середовищі з глюкозою клітини *Δhxs1*, але не *Δhxt1*, виявляли незначні рівні білка та питомої активності репресибельної пероксисомної алкогольоксидази (АОХ), і лише в лаг та ранній експоненційній фазах росту, що може свідчити про транзйентний дефіцит глюкозної репресії у досліджуваних мутантів. Подібну картину спостерігали також на фруктозо-вмісному середовищі, але дефект репресії у клітинах *Δhxs1* був більш вираженим. Дослідження методом ПЛР у реальному часі

(qRT-PCR) експресії генів, що кодують АОХ та репресибельну цитозольну мальтазу також виявили їх транзійтну дерепресію у клітинах $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$, перенесених на середовище з глюкозою. Таким чином, часткове зниження транспорту гексоз викликає *H. polymorpha* транзійтне пошкодження катаболітної репресії. Очевидно, що таке пошкодження репресії корелює з рівнем поглинання клітинами глюкози, оскільки є значно менш вираженим у клітинах $\Delta hxs1$ відносно штаму $\Delta gcr1$, що виявляють більш значне пошкодження транспорту (Stasyk *et al.*, 2004).

А



Б



В

Carbon substrates	Strains		
	WT	<i>gcr1Δ</i>	<i>hxs1Δ</i>
Methanol			
Ethanol			
Glucose			
Fructose			
Mannose			
Sucrose			

Рис. 2. Ефект мутацій $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$ на катаболітну репресію, індуковану різними джерелами вуглецю. **(А)** Детекція білка АОХ методом Western blot у клітинах, інкубованих у середовищах з глюкозою (Glc) чи сахарозою (Sucr) (1%). Позначено час (у год) адаптації до субстратів. **(Б)** Ріст мутантних клітин на твердому середовищі з 1% метанолом та 150 мг/л 2-ДГ. Спонтанні 2-ДГ-резистентні колонії позначено стрілкою. **(В)** Візуалізація активності АОХ у дріжджових колоніях, вирощених на різних джерелах вуглецю. Клітини перенесені методом реплік з багатого середовища YPS на тверді середовища YNB із вказаними джерелами вуглецю (усі 1%). Після інкубації протягом 24 год активність АОХ була візуалізована за допомогою реакційної суміші із пермеабілізуючим агентом.

Відповідно, клітини $\Delta hxs1$ є не здатні до росту на чашках з метанолом за присутності 2-деоксиглюкози (2-ДГ), аналога глюкози що спричиняє репресію метилотрофного метаболізму. Однак, спонтанні мутанти, резистентні до 2-ДГ, виникають із підвищеною частотою на фоні мутації $\Delta hxs1$ (Рис. 2Б).

Слід відзначити, що згідно показників питомої активності АОХ, репресія відповідного гена була більш пошкодженою у штаму $\Delta hxs1$ при рості у середовищах із фруктозою та манозою (Рис. 2В). З іншого боку, кінетики росту клітин $\Delta hxs1$ та $\Delta gcr1$ на фруктозі, а також ефективність її транспорту були подібними. Тому, хоча транспорт гексоз є очевидно важливим, він не єдиним фактором, що визначає ефективність репресії генів відповідним цукром. Також встановлено, що репресія АОХ сахарозою та етанолом у $\Delta hxs1$ не була пошкодженою (Рис. 2А, В).

Було також сконструювано та проаналізовано штам з делеціями двох генів потенційних сенсорів $\Delta gcr1\Delta hxs1$. Порівняльний аналіз засвідчив, що подвійний мутант, на відміну від вихідних моно-делеційних штамів, виявляв більш виражений дефект глюкозної репресії АОХ, а також репресії, спричиненої фруктозою та манозою. Спостережений аддитивний ефект мутацій *gcr1* та *hxs1*, є імовірно

наслідком кумулятивного дефіциту транспорту гексоз, і так званого ефекту “виключення ефектора” (“effector exclusion”), або підсилення дефектів сигналізування. Однак, як показано на Рис. 3, хоча подвійний мутант *Δgcr1Δhxs1* і виявляє підвищений конститутивний синтез АОХ, він не досягає показників мутанта ЕАО172 (Elevated Alcohol Oxidase), виділеного як надпродуцент гетерологічного білка у середовищі з глюкозою під промотором АОХ (P_{MOX}) (Krasovska *et al.*, 2007).

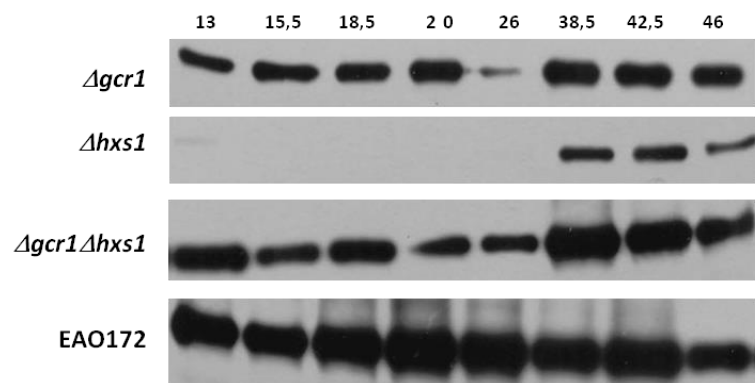


Рис. 3. Фенотиповий аналіз мутантів із пошкодженою катаболітною репресією. Вестерн-блот аналіз білка АОХ при рості клітин мутантів у середовищі з глюкозою. Вказано час інкубації (у год) після перенесення клітин із багатого середовища YPS на середовище YND з 1% глюкози.

Аналіз ефекту надекспресії генів *HXS1* та *HXT1* у *S. cerevisiae hxt null* мутанта, дефіцитного за транспортом гексоз. Щоб з’ясувати, чи ідентифіковані у *H. polymorpha* Hxs1 та Hxt1 є функціональними транспортерами, відповідні гени було надекспресовано у дефіцитному за усіма транспортерами гексоз мутанті *S. cerevisiae*. Показано, що лише експресія *HXT1* була здатна функціонально комплементувати дефект росту цього штаму на середовищі з глюкозою чи фруктозою в діапазоні концентрацій 5-100 мМ, тоді як експресія потенційних сенсорів не призводила до такого ефекту. Отже, у гетерологічній системі *S. cerevisiae* Hxt1 є функціональним транспортером, тоді як Hxs1 – нетранспортуючим білком.

Аналіз ролі цитозольного С-кінцевого фрагмента білка Hxs1 у глюкозному сигналюванні. З метою встановлення функціональної ролі С-кінцевого домену білка Hxs1 було сконструйовано його вкорочені форми, з делетованими С-кінцевими фрагментами довжиною 38 та 95 амінокислотних залишків (Рис. 1), які були експресовані під нативним промотором. Виявилось, що вкорочений на щонайменше 38 амінокислотних залишків білок був нездатний функціонально комплементувати дефект росту *Δhxs1* на гексозах (Рис. 4) та транзійної репресії АОХ. Більше того, делеція 95 С-термінальних амінокислотних залишків у конститутивно-активованій формі білка Hxs1^{R203K} (див. нижче) робила її нефункціональною: трансформанти, що експресували Hxs1^{R203K}Δ95С не відрізнялись за фенотипом від реципієнтного штаму *Δhxs1* (Рис. 4). Отже, подібно до сенсорів глюкози з інших дріжджів, гідрофільний С-термінальний домен Hxs1 є строго необхідним для його сигнальної функції.

Конструювання мутантних форм *HXS1* та *GCR1*, які конститутивно передають “глюкозний сигнал”. Раніше встановлено, що заміна одного із консервативних амінокислотних залишків аргініну у сенсорів гексоз, напр. *ScSnf3*, *ScRgt2* та *CaHgt4*, перетворює їх у конститутивно-активовані форми навіть за відсутності глюкози. Нами сконструйовано відповідні мутантні алелі потенційних сенсорів Hxs1 та Gcr1 (Рис. 1 та 5), та експресовано під нативними промоторами у

відповідних делеційних мутантах. Спостережено, що $Hxs1^{R203K}$ ефективно комплементує дефект росту клітин $\Delta hxs1$ на агаризованому середовищі з гексозами (Рис. 4), а також відновлює нормальну репресію синтезу АОХ фруктозою.

Media	Strains						
	WT	$hxs1\Delta$	$hxs1\Delta/Hxs1^{R203K}$	$hxs1\Delta/Hxs1\Delta C38$	$hxs1\Delta/Hxs1\Delta C95$	$hxs1\Delta/Hxs1\Delta C95$	$hxs1\Delta/Hxs1\Delta C95$
Methanol							
Fructose							
Glucose							
Glucose +antimycin A							

Рис. 4. Ефект С-термінальних делецій $Hxs1$ та мутації $R203K$ на його сенсорну функцію. Клітини підрощували на чашках з YPS, переносили на середовище YNB з вказаними джерелами вуглецю, та інкубували протягом 16 год; окрім клітин, що росли на метанолі, які інкубували протягом двох днів. Субстрати були використані у наступних концентраціях: метанол 1%, фруктоза – 2%, глюкоза – 5%, а антиміцин А – 6 мг/л.

Однак, фенотип $Hxs1^{R203K}$ -експресуючих трансформантів відрізнявся від клітин штаму дикого типу підвищеною резистентністю до інгібітора дихання антиміцину А у середовищі з високим вмістом глюкози (Рис. 4). Таким чином, конститутивна надекспресія $Hxt1$ та транспортерів гексоз у такого штаму краще підтримує залежний від гліколізу ріст за умови часткового інгібування дихання.

Було спостережено, що експресія аналогічного алелю потенційного сенсора $Gcr1$, $HpGcr1^{R165K}$ (Рис. 5А), функціонально не комплементувала дефект росту та глюкозної репресії у мутанта $\Delta gcr1$ на середовищі з глюкозою, що може свідчити про втрату його функції як транспортера, а також вказує на важливість транспорту глюкози для сигналізування катаболітної репресії.

Мутант $\Delta gcr1$ виявляє у порівнянні зі штамом дикого типу виразну затримку росту на таких моносахаридах як глюкоза, фруктоза, ксилоза, але також на метанолі, але не виявляє затримки росту на сахарозі та етанолі (Рис. 5Б). Експресія ж $HpGcr1^{R165K}$ додатково суттєво погіршувала ріст $\Delta gcr1$ на усіх тестованих джерелах карбону, включаючи сахарозу та етанол (Рис. 5Б). Таким чином, заміна $R165K$ перетворює $HpGcr1$ у активовану аберантно-сигналюючу форму, яка викликає погіршення росту незалежно від присутнього джерела вуглецю. Слід зазначити, що специфічний фенотип $HpGcr1^{R165K}$ мутанта нагадує характерні ознаки мутантів із надактивованим сигнальним шляхом протеїнкінази А (РКА) (Hlavatá *et al.*, 2008), і вказує на сигнальну функцію $HpGcr1$ у регуляції транскрипції великого набору генів, пов'язаних з метаболізмом вуглеводів.

Вплив мутацій гомологів транспортерів гексоз на пексофагію. Встановлено, що питома активність і рівень білка АОХ знижувались у клітинах $\Delta hxs1$ при адаптації до глюкози чи етанолу з тією ж кінетикою, що і у штаму дикого типу (Рис. 7). Мутант *H. polymorpha tup1* з дефектами транскрипційної регуляції та пексофагії (Leão-Helder *et al.*, 2004) був використаний як позитивний контроль. Отже, $Hxs1$, подібно до $Gcr1$ (Рис. 6; Stasyuk *et al.*, 2004), не є необхідним для сигналізування для катаболітної інактивації (пексофагії).

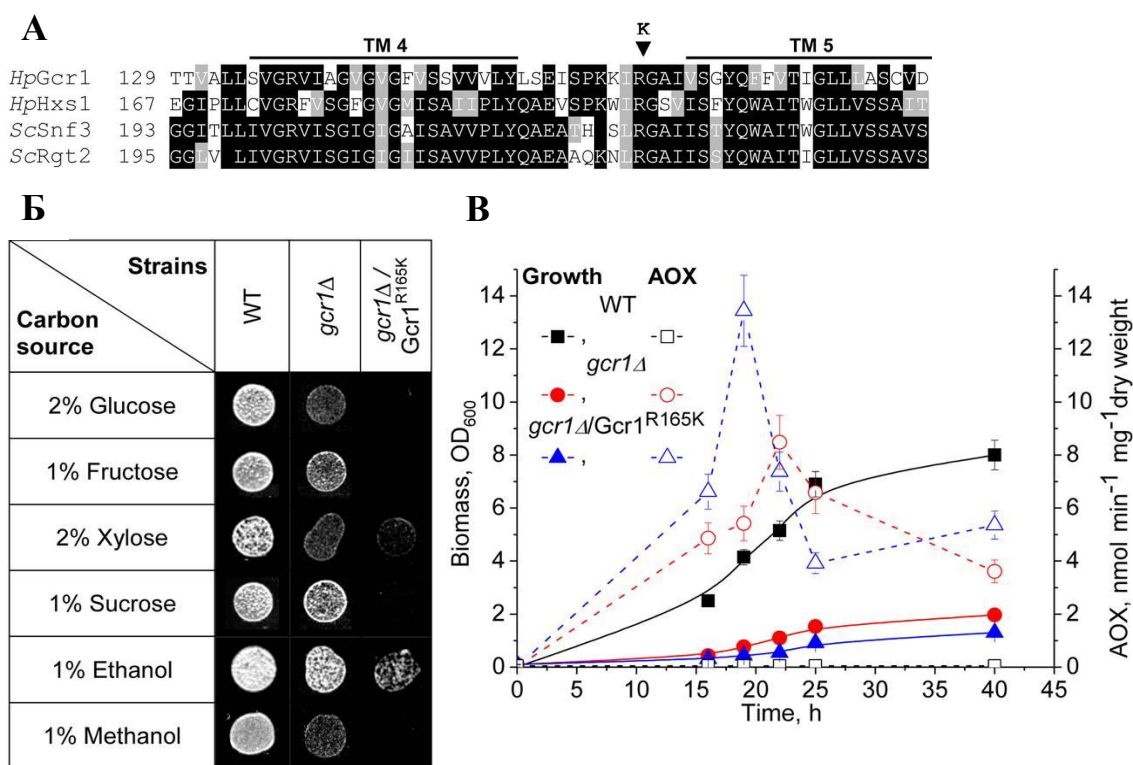


Рис. 5. Конструювання та аналіз фізіологічних ефектів мутантного алелю $Gcr1^{R165K}$. (А) Накладено послідовності двох трансмембранних сегментів (позначені лініями та пронумеровані) *H. polymorpha* *Gcr1* та *Hxs1*, та сенсорів *S. cerevisiae* *Snf3* та *Rgt2*. Сайт заміни консервативного залишку аргініну (R) на лізин (K) вказаний стрілкою. Ідентичні амінокислотні залишки затінені чорним кольором, подібні – сірим. (Б) $\Delta gcr1$, та $\Delta gcr1/HpGcr1^{R165K}$ на різних джерелах карбону. Клітини переносили з багатого середовища YPS за рівних OD_{600} на чашки з середовищем YNB з вказаними субстратами та інкубували протягом 24 год, у випадку метанолу – 48 год. (В) росту та активності АОХ при культивуванні у рідкому середовищі YND з 1 % глюкози.

Аналіз філогенетичного походження *HpGCR1*. Раніше встановлено, що імовірний транспортер-подібний сенсор гексоз *Gcr1* є необхідним для глюкозної репресії АОХ та інших генів метаболізму метанолу у *H. polymorpha* (Stasyk *et al.*, 2004), а його делеція суттєво пошкоджує як високо- так і низько-афінний транспорт глюкози в клітинах (Stasyk *et al.* 2012a). Філогенетичне позиціонування *Gcr1* серед відомих транспортерів гексоз виявило, що одна із груп транспортерів гексоз із нитчастих грибів містить найближчі гомологи *Gcr1* (Рис. 7). Так, білок *MstA* з *Aspergillus niger* є функціональним високоафінним H^+ -залежним симпортером моносахаридів (van Kuyk *et al.* 2004), який виявляє винятково високу гомологію до *HpGcr1* (74% ідентичності та 84% подібності). Для порівняння, подібність *HpGcr1* до нетранспортуючих сенсорів глюкози дріжджів, таких як *Snf3* та *Rgt2* *S. cerevisiae*, є суттєво нижчою (43-45 % ідентичності та 61-62 % подібності). Також встановлено, що геноми деяких найбільш тісно пов'язаних з *H. polymorpha* видів дріжджів з родини *Pichiaceae*, ряду *Saccharomycetales*, також містять у своєму геномі гени, що кодують потенційні *Gcr1*-подібні білки з більш ніж 71 % ідентичності до *HpGcr1* (Рис. 7).

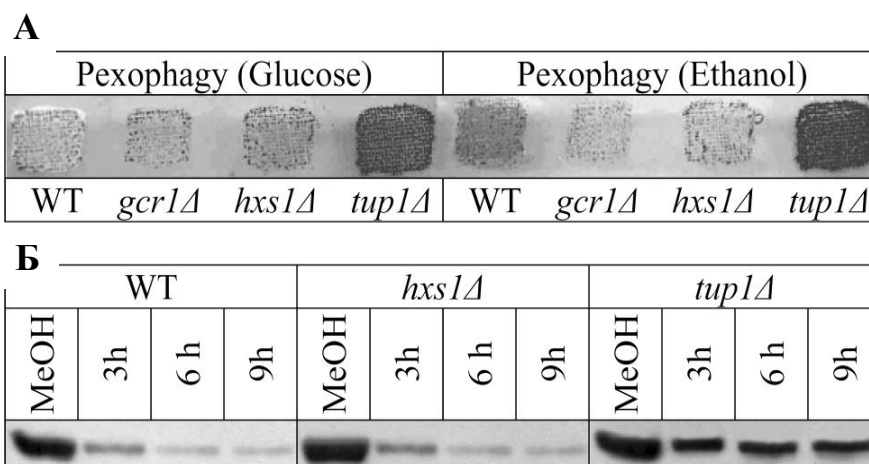


Рис. 6. Аналіз ролі сенсора Hxs1 у пексофагії. (А) Візуалізація активності АОХ в колоніях, вирощених на чашках з YNM з метанолом та перенесених на середовища з глюкозою чи етанолом (усі 1%) для індукції деградації пероксисом. Активність АОХ була візуалізована специфічною реакційною сумішшю з пермеабілізуючим агентом після 12 год інкубації. (Б) Вестерн-блот детекція білка АОХ в клітинах, перенесених із метанолу до середовища з глюкозою. Часові точки вказують на тривалість адаптації до глюкози.

При цьому ортолог HpGcr1 є відсутній у геномі більш віддаленого виду *P. pastoris*. Надзвичайно висока подібність послідовностей HpGcr1 до AnMstA та ряду інших білків грибів вказує на його унікальне походження внаслідок горизонтального трансферу генів (HGT) від одного із видів нитчастих грибів до предкового члена родини *Pichiaceae*. Альтернативою може бути рідкісне явище «збереження архаїчного гену» («archaic gene retention») у *H. polymorpha* та близькоспоріднених видів.

Конститутивна експресія HpHXT1 відновлює глюкозну репресію у клітинах Δgcr1. З метою в'яснити, як ефективність транспорту глюкози впливає на катаболітну репресію, гени *HpHXT1* та *HpGCR1* було надекспресовано під контролем конститутивного промотора у клітинах Δgcr1. Як показав RT-PCR-аналіз, результуючий рівень експресії *HpHXT1* на середовищі з глюкозою був вищим, ніж у Δgcr1 (Рис. 8). Слід відзначити, що у самого Δgcr1 рівень експресії *HpHXT1* є нижчим від фізіологічного рівня штаму дикого типу у середовищі з глюкозою, але вищим з метанолом (Рис. 8А). При цьому, хоча надекспресія *HpHXT1* лише частково комплементувала дефіцит росту у порівнянні із штамом дикого типу (Рис. 8Б), штам Δgcr1/P_{GAPDH}-*HpHXT1* виявляв нормальну репресію АОХ (Рис. 8 А, Б). Очевидно, додатковий синтез HpHxt1 забезпечив необхідне підвищення внутрішньоклітинного пулу глюкози чи її катаболітів для ефективної репресії.

Раніше ми описали, що серед плейотропних змін, викликаних делецією гена *HpGCR1*, є затримка індукції експресії АОХ та пролонгація фази адаптації у середовищі із метанолом (Stasyk *et al.* 2004). Як і очікувалось, конститутивна надекспресія *HpHXT1* не впливає цей фенотип (Рис. 8Б). Таким чином, *HpGcr1* є важливим для транскрипційної регуляції за відсутності глюкози.

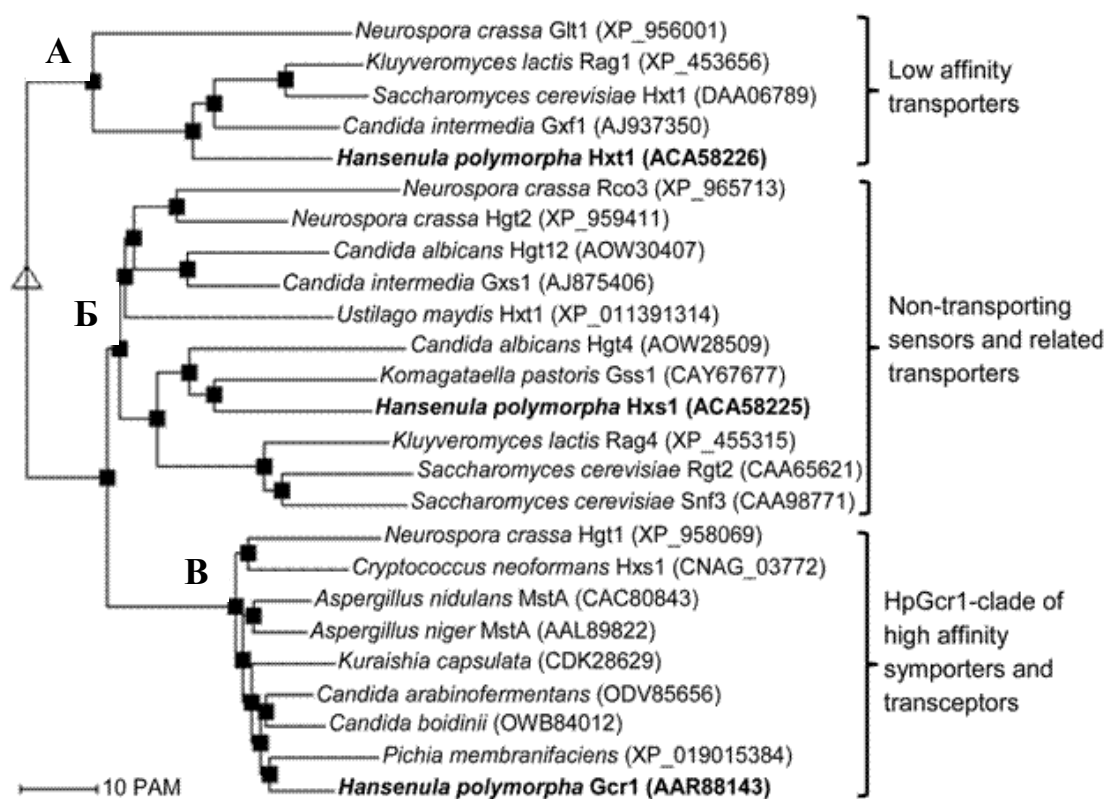


Рис. 7. Філогенетичне дерево, побудоване на основі подібності первинних послідовностей гомологів транспортерів гексоз дріжджів та грибів. Для спрощення формату на рисунку представлені лише окремі представники еволюційних груп транспортерів, чия функція була досліджена експериментально. Три основні філогенетичні гілки транспортерів позначено як **А**, **Б** та **В**. Група **А** складається з низько-афінних переносників-фасилітаторів гексоз; група **Б** – з нетранспортуючих сенсорів дріжджів та споріднених високо-афінних активних транспортерів; група **В** містить декілька гомологічних до *HpGcr1* транспортерів з невідомою функцією із близько-споріднених до *H. polymorpha* видів, та численні високоафінні симпортери грибів.

HpGcr1 внаслідок міслокалізації не відновлює ріст на гексозах *hxt*-дефіцитного штаму *S. cerevisiae*. Щоб з'ясувати, чи *HpGcr1*, незалежно від його рецепторної функції, є функціональним транспортером гексоз, відповідний ген, кон'югований з *GFP* під контролем регульованого промотора гену *S. cerevisiae* *MET25* експресували у клітинах *hxt*-нуль штаму *S. cerevisiae* з відсутніми усіма транспортерами гексоз. Регульовану експресію було використано для уникнення можливої токсичності чужорідного білка плазматичної мембрани при надекспресії. Встановлено, що клітини *hxt*-null штаму, що експресують *HpHXT1* в безметіоніновому середовищі, були здатні до росту на глюкозі у мілімолярному діапазоні. На противагу, клітини, що несли аналогічну транскрипційну касету із *HpGCR1*, не виявляли жодного росту у середовищі з різними концентраціями глюкози, незалежно від присутності метіоніну. Усі тестовані клітини при цьому мали здатність до росту за аналогічних умов на чашках з етанолом.

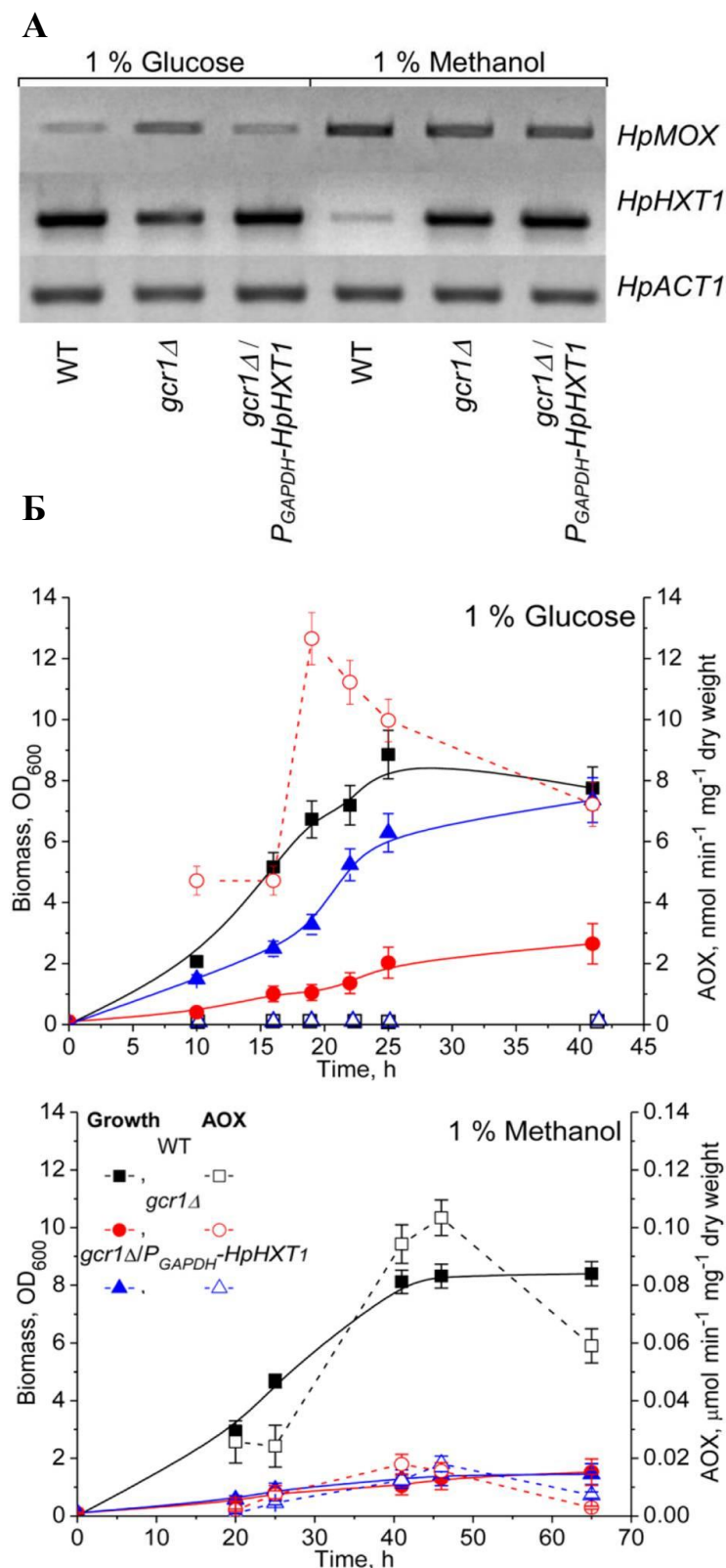


Рис. 8. Аналіз фізіологічних ефектів надекспресії *HpHXT1* у мутанта $\Delta gcr1$. (A) експресія генів *HXT1* та *MOX* у середовищах з 1 % глюкози чи 1 % метанолом. Клітини підросували у середовищі YPE та переносили за рівних OD₆₀₀ у середовище YNB з глюкозою чи метанолом та культивували протягом 2 год. кДНК було синтезовано з екстрагованої тотальної РНК та використано як матрицю у RT-PCR для генів *HpHXT1*, *HpMOX*, та *HpACT1*, що був використаний як референтний. (B) Кінетика росту та активності AOX у штамів $\Delta gcr1$ та $\Delta gcr1/P_{GAPDH}-HXT1$ у середовищах з глюкозою чи метанолом.

Виявилося, що химерний білок *HpHxt1*-GFP локалізувався до плазматичної мембрани клітин, тоді як *HpGcr1*-GFP мав головним чином цитозольну локалізацію, подібно до вільного GFP, експресованого під тим же промотором. Таким чином, міслокалізація *HpGcr1* в клітинах *S. cerevisiae* перешкодила його аналізу на функціональність як транспортера глюкози.

Надекспресія Gcr1 сенситизує клітини *H. polymorpha* до екзогенної 2-дезоксиглюкози. Було досліджено чутливість рекомбінантних штамів дикого типу з конститутивною надекспресією *HpGCR1* або *HpHXT1* до токсичного аналога глюкози 2-ДГ у середовищі з метанолом.

Спостережено, що 0.3 мМ та вищі концентрації 2-ДГ пригнічували ріст усіх протестованих штамів. При цьому штам дикого типу та NCYC495/*P_{GAP}-HXT1* виявляли значне подовження лаг-фази відносно середовища без 2-ДГ, відповідно на 25 та 45 годин, відображаючи інтенсивність поглинання ними 2-ДГ. У той же час, штам NCYC495/*P_{GAP}-GCR1* виявляв значно гострішу відповідь на дію 2-ДГ і був повністю нездатний до росту за таких умов. Також показано, що синтез АОХ довше залишався зарепресованим 2-ДГ у штаму NCYC495/*P_{GAPDH}-GCR1*. Таким чином, ці дані свідчать на користь функції *HpGcr1* як високо-афінного транспортера глюкози, надекспресія якого забезпечує ефективніше поглинання низьких концентрацій 2-ДГ, у порівнянні із надекспресією низькоафінного транспортера *HpHxt1*.

Отримані експериментальні докази також дозволяють запропонувати гіпотезу, що *Gcr1* є не звичайним транспортером, а новим типом транспортуючого рецептора (трансцептора) гексоз, який регулює РКА сигнальний шлях у *H. polymorpha*. Такий тип рецептора для цукрів і зокерма для гексоз на даний час у дріжджів не відомий.

Молекулярно-генетичний та функціональний аналіз гомологів транскрипційних факторів Mig1, Mig2 і Nap4 у *H. polymorpha*. Припускалось, що механізм глюкозної катаболітної репресії у метилортрофних дріжджів може імітувати Snf1-Mig1 сигнальний шлях *S. cerevisiae*. Його основними компонентами є субодиниця гексокінази II, Snf1 протеїнкіназа та репресор Mig1, що забезпечують зв'язування основного комплексу репресорів Tup1-Ssn6 з промоторами репресибельних генів у присутності глюкози (Kauyksi and Nielsen 2015; Coccetti *et al.*, 2018). На користь припущення свідчив той факт, що промотори генів *H. polymorpha* АОХ (Pereira and Hollenberg, 1996) та мальтази (Alamae *et al.*, 2003) репресувались глюкозою у гетерологічній системі *S. cerevisiae*. Tup1 був першим відомим представником транскрипційних репресорів, залучених у макропексофагію у *H. polymorpha*, однак його функція вважалась непрямую (Leao-Helder *et al.*, 2004). Метою наступного розділу роботи був пошук ортологів окремих транскрипційних факторів *S. cerevisiae* у геномі *H. polymorpha* та експериментальний аналіз їх важливості для катаболітної репресії та пексофагії.

Аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів *HpMIG1* і *HpMIG2* та порівняння з базами даних. Пошук у базі даних геному *H. polymorpha* виявив присутність двох гіпотетичних гомологів *ScMig1* – C2H2-репресора транскрипції з «цинковим пальцем» (zinc finger) (Nehlin and Ronne, 1990). Два ідентифіковані гомологи, позначені як *HpMig1* та *HpMig2*, виявляли обмежену загальну гомологію до Mig білків інших дріжджів: наприклад, 26% ідентичності та 41% подібності до *ScMig1* (та 33% ідентичності між собою). При цьому їх схожість у ділянці N-кінцевого ZnF домену «цинкового пальця» становить більше 70% (Рис. 9). ДНК-зв'язуючі домени обох Mig білків *H. polymorpha* виявились більш схожими (більше 85% ідентичності) до відповідних ділянок Mig-подібних CreA репресорів з нитчастих грибів (Ronne, 1995).

Окрім цього, Mig гомологи у дріжджів володіють іншими семі-консервативними послідовностями (Cassart *et al.*, 1997), представленими також у *HpMig1* і *HpMig2*, наприклад, так званим С-кінцевий “ефекторним доменом” (Ostling *et al.*, 1996). Білки *H. polymorpha* також включають ділянку, високоспоріднену до CreA репресорів грибів, яка є відсутньою у багатьох дріжджових гомологів, а також консенсус сайти фосфорилування для цАМФ-залежної протеїнкінази (Рис. 9).

		*	*	ZnF 1	*	*	*	*	ZnF 2	*	*																																																													
HpMig1	79	R	P	Y	K	C	P	M	C	D	K	A	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	Q	C	N	F	P	G	C	F	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	S	R	I	H	T	N	P	N	S	R	R	K	N	A	H	N	P	D	W	E
ScMig1	36	R	P	H	A	C	P	T	C	H	R	A	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	M	R	I	H	T	G	E	K	P	H	A	C	D	F	P	G	C	V	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	R	R	I	H	T	N	S	H	P	R	G	K	R	G	R	K	K	K	V	
CaMig1	29	R	P	Y	K	C	P	M	C	D	K	A	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	A	C	D	F	P	G	C	V	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	I	R	I	H	T	N	P	S	R	K	R	K	N	K	N	Q	N	M		
HpMig2	10	R	P	Y	K	C	P	M	C	D	K	A	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	A	C	D	F	P	G	C	F	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	I	R	I	H	T	N	P	T	V	R	K	R	S	Q	N	K	N	M	K	
ScMig2	15	R	P	F	R	C	D	T	C	H	R	G	F	H	R	L	E	H	K	K	R	H	L	R	T	H	T	G	E	K	P	H	H	C	A	F	P	G	C	K	S	F	S	R	S	D	E	L	R	H	M	R	T	H	T	G	Q	S	O	R	R	L	K	K	A	S	V	Q	K	Q		
KmMig1	30	R	P	Y	M	C	P	T	C	H	R	G	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	A	C	D	F	P	G	C	A	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	R	I	H	D	S	D	K	P	R	G	K	R	G	R	K	K	S	E		
KlMig1	24	R	P	Y	V	C	P	T	C	O	R	G	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	A	C	D	F	P	G	C	S	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	R	I	H	D	S	D	K	P	R	G	K	R	G	R	K	K	S	E		
SoMig1	22	R	P	Y	K	C	P	M	C	G	K	A	F	H	R	L	E	H	Q	T	R	H	I	R	T	H	T	G	E	K	P	H	S	C	T	F	P	G	C	F	K	R	F	S	R	S	D	E	L	T	R	H	S	R	I	H	T	N	P	N	S	R	R	N	K	N	L	N	K	Q	A	Q

Рис. 9. Накладання консервативних N-кінцевих ділянок «цинкового пальця» (ZnF) *HpMig1*, *HpMig2*, та океремих дріжджових та грибних CreA гомологів. Зірочками позначені функціонально важливі залишки цистеїну та гістидину. Підкреслено сайт фосфорилування для цАМФ-залежної протеїнкінази. Аббревіатури назв видів: *Hp* – *H. polymorpha*; *Sc* – *S. cerevisiae*; *Ca* – *C. albicans*; *Km* – *Kluyveromyces marxianus*; *Kl* – *K. lactis*; *So* – *Schwanniomyces occidentalis*; *An* – *Aspergillus nidulans*; *Nc* – *Neurospora crassa*.

Відповідно, білки *H. polymorpha* можуть бути потенційними об'єктами регуляції *Snf1* протеїнкіназою (Treitel *et al.*, 1998). Таким чином, структурний аналіз свідчить, що ідентифіковані *HpMig1* і *HpMig2* представляють потенційні білки-ортологі ScMig1/2.

Конструювання делеційних штамів та аналіз впливу мутацій *mig1* і *mig2* на механізми катаболітної регуляції у *H. polymorpha*. Було сконструйовано мутанти з делетованими генами *HpMIG1* і *HpMIG2*, і також, шляхом схрещування моноделетантів, виділено подвійний мутант по обидвох генах.

Спостережено, що мутанти *Δmig1* і *Δmig2* не відрізняються від штаму дикого типу за швидкістю росту на агаризованих середовищах з різними джерелами карбону: глюкозою, сахарозою, етанолом і метанолом, тоді як подвійний делеційний мутант виявляє сповільнення росту на гліколітичних субстратах. Поряд з тим, мутанти *Δmig1* та *Δmig1Δmig2* також здатні до росту на чашках з метанолом у присутності 2-ДГ, що свідчить про часткове порушення у них глюкозної репресії, тоді як мутант *H. polymorpha Δtup1* не виявляв такого фенотипу.

З метою подальшого з'ясування функції *HpMig1*, *HpMig2* і *HpTup1* у механізмі репресії було визначено рівні білка пероксисомної АOX за різних умов. Спостерігали достатньо помірне порушення репресії АOX для мутантів *Δmig1*, *Δmig1Δmig2* і *Δtup1*, інкубованих з різними концентраціями глюкози, яке однак було значно слабшим, у порівнянні із мутантом *Δgcr1*. Також, синтез АOX у *Δmig1*, *Δmig2*, а також у подвійного мутанта *Δmig1Δmig2* і клітинах *Δtup1* був незначно дерепресованим у середовищі з сахарозою чи етанолом, підтверджуючи обмежене

чи непряме залучення відповідних генів у механізм катаболітної репресії у *H. polymorpha*. Цікаво відзначити, що при додаванні метанолу до середовища з глюкозою дефект репресії у штамів $\Delta mig1$ і $\Delta mig1 \Delta mig2$, але не в $\Delta tup1$, стає більш вираженим (так званий «індуцибельний фенотип»). Цей факт вказує на те, що певні компоненти індукції транскрипції, необхідні для синтезу АОХ, активуються за таких умов, що пояснює здатність мутантів рости на метанолі у присутності 2-ДГ.

Раніше було продемонстровано, що репресор транскрипції *Tup1* є необхідним для макропексофагії у *H. polymorpha* (Leao-Helder *et al.*, 2004). Логічним наступним кроком було з'ясувати, чи передбачувані партнери *HpTup1* у катаболітній регуляції, *HpMig1* and *HpMig2*, також впливають на цей процес. Аналіз кінетики пексофагії за допомогою моніторингу рівня білка АОХ виявив, що швидкість його деградації була сповільненою у клітинах *mig* мутантів при адаптації до глюкози чи етанолу (Рис. 10А). При цьому у вирощених на метанолі клітин $\Delta mig1 \Delta mig2$ також спостерігались додаткові білкові смуги, які свідчать про надлишкову деградацію АОХ у порівнянні із штамом дикого типу (Рис. 10Б). Ці дані свідчать, що пексофагія не є повністю заблокованою у $\Delta mig1 \Delta mig2$.

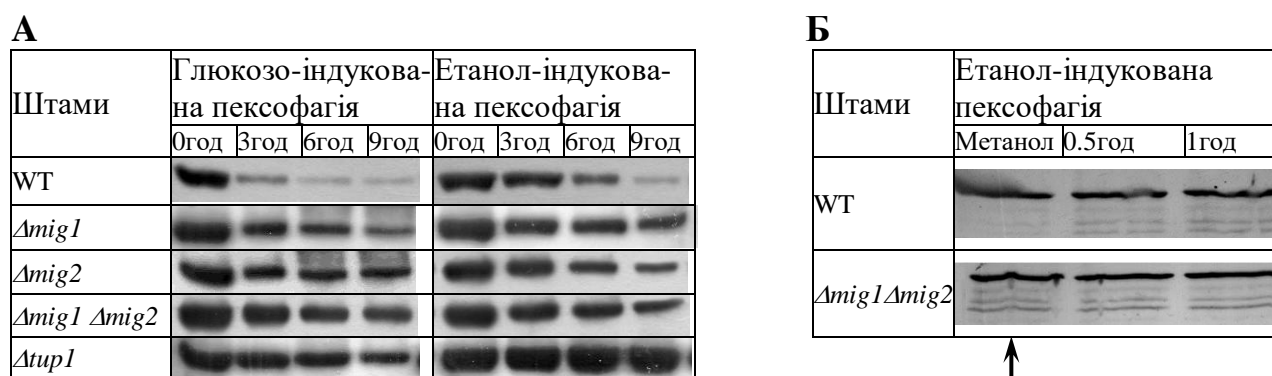


Рис. 10. Кінетичний аналіз пексофагії у *mig* мутантів. Індуковані метанолом клітини перенесли у середовище з глюкозою або етанолом для індукції пексофагії. Білок АОХ детектували за допомогою Вестерн-блот аналізу зі специфічними антитілами у вказані моменти часу. (А) Кінетика деградації АОХ, індукована глюкозою чи етанолом. (Б) Рання стадія деградації АОХ, індукованої етанолом, у штаму дикого типу (WT) і $\Delta mig1 \Delta mig2$ мутанта. Стрілка вказує на продукти деградації АОХ у екстрактах індукованих метанолом клітин $\Delta mig1 \Delta mig2$.

Електронно-мікроскопічне та імуноцитохімічне дослідження вирощених на метанолі і перенесених у середовище з етанолом клітин $\Delta mig1 \Delta mig2$ (проведене у співпраці з групою проф. М. Венхауза (M. Veenhuis, University of Groningen, The Netherlands)) виявило, що пероксисоми справді зазнають деградації і білок АОХ може бути виявлений у просвітах вакуоль (Рис. 11В). Неочікувано виявилось, що у той час як у контрольного штаму дикого типу органели деградували стандартним шляхом макропексофагії, у клітинах $\Delta mig1 \Delta mig2$ типова для неї секвестрація органел, що підлягають деградації, додатковими мембранами спостерігалась дуже рідко (Рис. 11Б). Натомість численною і помітною була поява вакуолярних виступів,

що оточують кластери пероксисом, які є морфологічно характерними для мікропексофагії (Рис. 11А). Отже, репресори *HpMig1/2* можуть бути позитивними регуляторами макропексофагії.

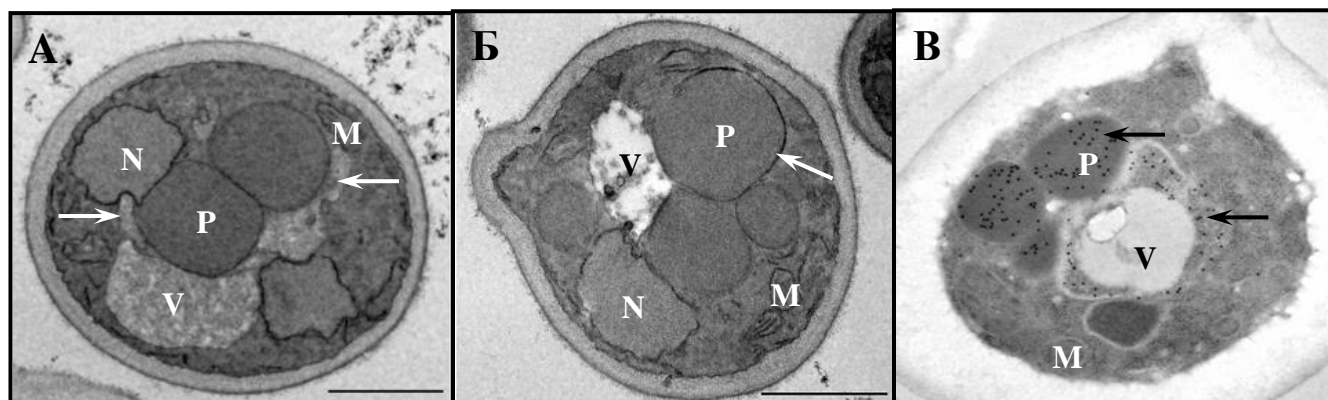


Рис. 11. Електронномікроскопічне дослідження морфологічних характеристик процесу пексофагії у $\Delta mig1\Delta mig2$ мутанта *H. polymorpha*. Клітини $\Delta mig1\Delta mig2$, вирощені на метанолі, були перенесені на 1 год у середовище з етанолом для індукції макропексофагії. (А) Позначені стрілками пероксисоми, оточені мембранними виступами вакуоль, вказують на активацію мікроавтофагії. (Б) Стрілка вказує не пероксисому, оточену додатковими шарами мембран, замикання яких є незавершеним. (В) Імуноцитохімічна детекція білка АОХ за допомогою мічених антитіл у клітинах $\Delta mig1\Delta mig2$ показала, що АОХ локалізується як у пероксисомах, так і вакуолях, що свідчить про їх деградацію. Умовні позначення: М – мітохондрія, V – вакуоля, P – пероксисома, N – ядро. Масштабна лінійка відповідає 1 мкм.

Конструювання делеційних штамів за генами *HAP4-A*, *HAP4-B*, подвійного мутанта, та аналіз впливу мутацій на процеси катаболітної регуляції. У *S. cerevisiae* переключення експресії генів, необхідних для ферментації або дихання, контролюється рядом спеціалізованих транскрипційних факторів. Одним із ключових регуляторів є *Hap4*, активатор *HAP* комплексу (Lascaris *et al.*, 2003). Основні компоненти цього комплексу, але не *Hap4*, є високо-консервативними у еукаріотів. Гіпотетичні ортологи *Hap4* у *S. cerevisiae*, *K. lactis* та інших аскоміцетів містять коротку консервативну послідовність із 16-ти амінокислотних залишків, N-*Hap4* (Sybirna *et al.*, 2005). При цьому білки *Hap4* з видів, філогенетично віддалених від *S. cerevisiae*, містять додатковий ДНК-зв'язуючий мотив так званої «лейцинової застібки» (leucine zipper, b-Zip) (Sybirna *et al.*, 2010). b-Zip домени є спільними для цих білків та родини транскрипційних факторів, представленими у *S. cerevisiae* білком *Yap1*, який містить також характерний цистеїн-багатий мотив (cysteine rich motif, CRM).

Аналіз геному *H. polymorpha* виявив присутність двох потенційних *Hap4* гомологів (з чи без b-Zip ділянки у їх структурі) (Рис. 12А). *HpHap4-A* був здатний функціонально комплементувати *S. cerevisiae* $\Delta hap4$ (Forsburg and Guarente, 1989), а *HpHap4-B* – лише частково (Sybirna *et al.*, 2010).

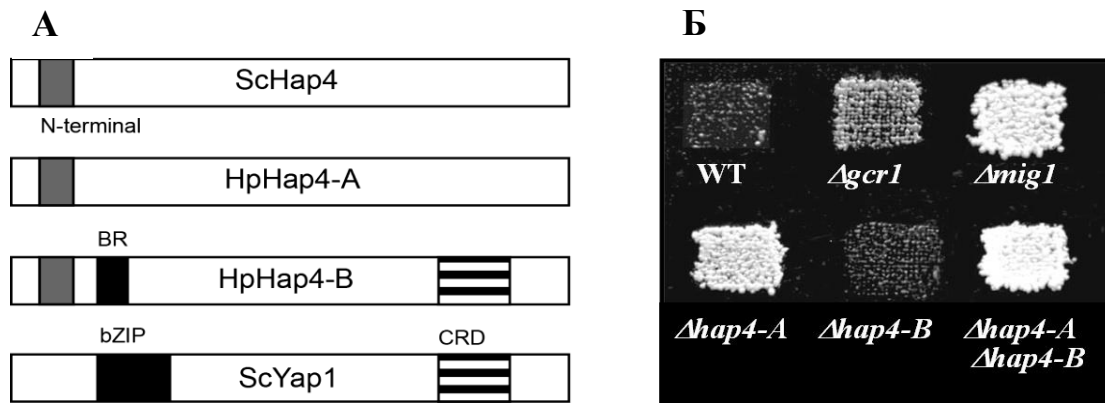


Рис. 12 Аналіз послідовностей та фізіологічних ефектів мутацій по генах *HpHap4-A* та *HpHap4-B* *H. polymorpha*. (А) Схематичне зображення структур транскрипційних факторів *Hap4* і *Yap1* з *S.cerevisiae* та двох гомологів *HpHap4-A* та *HpHap4-B* *H.polymorpha*. Основні ділянки позначені сірим кольором (N-*Hap4*), чорним (bZip чи BR ділянка; де BR – ДНК- зв'язуюча частина bZip), і смугастим (CRD, або цистеїн-багатий домен). (Б) Аналіз впливу *hap4* мутацій на катаболітну репресію у *H. polymorpha*. Клітини реплікували з середовища YPS на середовище YNB з 1% метанолом і 150 г/л 2-ДГ. Фото зроблено після двох діб інкубації.

З метою з'ясування фізіологічних функцій і відмінностей між двома типами *Hap4*-подібних білків та їх ролі у катаболітній регуляції у *H. polymorpha*, були сконструйовані індивідуальні та подвійний делеційні мутанти по відповідних генах. Виявлено, що на відміну від *S. cerevisiae*, мутації $\Delta hap4-A$ та $\Delta hap4-B$ у *H. polymorpha* не впливають на ріст на середовищах із метанолом, гліцеролом чи етанолом, а отже і на фізіологічну регуляцію глюконеогенезу. Також мутанти росли подібно до штаму дикого типу на глюкозі, сахарозі і ксилозі. Таким чином, цей результат передбачає суттєві відмінності функцій гомологів *Hap4* у Crabtree-позитивних та негативних дріжджів. При цьому ріст штаму $\Delta hap4-A$ чи подвійного мутанта, але не $\Delta hap4-B$, на глюкозі пошкоджувався інгібітором дихального ланцюга антимицином А. Окрім цього, мутант $\Delta hap4-B$ і подвійний делеційний штам були більш чутливими до пероксиду водню, тоді як штам $\Delta hap4-A$ ні. Таким чином, ідентифіковані гомологи *HpHAP4* мають відмінні спеціалізовані функції, один із яких пов'язаний з карбоновим та енергетичним метаболізмом, а інший, подібно до *ScYap1*, є залучений у регуляцію оксидативного стресу. Також неочікувано виявилось, що мутація *hap4-A* призводить до пошкодження глюкозної репресії і забезпечує ріст клітин на метанолі у присутності 2-ДГ (Рис. 12Б). Нами також не спостережено очевидних порушень процесу пексофагії у проаналізованих *hap4* мутантів.

Ідентифікація і аналіз молекулярних компонентів селективної деградації перексисом (пексофагії) у метилотрофних дріжджів. Метанол-індуковані перексисоми у метилотрофних дріжджів зазнають активної деградації при адаптації клітин до глюкози чи етанолу, коли органели стають зайвими для росту. У *H. polymorpha* цей механізм є подібним до макроавтофагії, описаної у клітинах ссавців (Veenhuis *et al.*, 1993). У той же час для *P. pastoris* є характерними два типи

селективної деградації пероксисом, макро- та мікропексофагія, при адаптації до етанолу та глюкози, відповідно (Tuttle and Dunn, 1995). Колекції мутантів *H. polymorpha* і *P. pastoris* з пошкодженою деградацією пероксисом були ізольовані і охарактеризовані у декількох лабораторіях (Titorenko et al. 1995; Tuttle and Dunn 1995; Sakai et al., 1998, Stasyk et al., 2005). Наступний розділ присвячено опису експериментальної роботи, спрямованої на ідентифікацію, і з'ясування функціональної ролі декількох раніше невідомих генів, залучених у процес пексофагії у метилотрофних дріжджів, головним чином у *P. pastoris*.

Клонування і функціональний аналіз VPS15 гену дріжджів *P. pastoris*. Комплекс білків Vps15/Vps34 *S. cerevisiae* був раніше відомий як необхідний для сортирування білків до вакуоль та ендцитозу (Munn and Riezman, 1994). Групою проф. М. Венхауза встановлено, що один із мутантів *H. polymorpha* з пошкодженою деградацією пероксисом *pdd1* несе пошкодження у гені-гомологу *ScVPS34* (Kiel et al., 1999). Внаслідок випадкової присутності фрагменту імовірного гомолога *ScVPS15* на векторі з банку генів *P. pastoris*, стало можливим перевірити, чи є також Vps15 важливим для селективної деградації пероксисом у метилотрофів. З метою виділення повної послідовності *PpVPS15*, геномна бібліотека *P. pastoris* була піддана двом етапам покрокового ПЛР аналізу ("chromosome walking") з використанням праймерів, комплементарних до присутніх ділянок гена і до вектора бібліотеки (примітка: під час цієї експериментальної роботи послідовність геному *P. pastoris* ще не була відомою).

Встановлено, що ген *PpVPS15* кодує поліпептид, передбачувана послідовність якого виявляє 32% ідентичності до *ScVps15*, а також 29% ідентичності до гомолога *VPS15* людини, білка p150. Порівняння послідовностей трьох білків виявило три консервативні фрагменти. Так N-кінцевий фрагмент кожного білка містить каталітичний домен, спільний для родини серин/треонінових кіназ (Hanks et al., 1988). Консервативними і функціонально важливими є трансмембранний домен і C-кінцевий фрагмент, який включає сайт фосфорилування. Отже, високий ступінь консерватизму первинної структури, і, зокрема, специфічних функціональних доменів, свідчили про те, що клонований ген є структурним гомологом *ScVPS15*.

Виявилось, що ріст клітин сконструйованого делеційного мутанта *Δvps15* на агаризованому середовищі з метанолом не відрізнявся від штаму дикого типу. За умов індукції пексофагії на чашках з глюкозою чи етанолом у клітинах *Δvps15* було виявлено значно підвищену залишкову активність АОХ, що вказувало на пошкодження пексофагії. Цей результат був підтверджений Вестерн-блот аналізом білка АОХ у клітинах, перенесених на субстрати-індуктори пексофагії, а також в електронно-мікроскопічному дослідженні: у мутанта не виявлено морфологічних ознак, характерних для ранніх етапів мікро- та макропексофагії (Рис. 13).

Розробка системи з використанням зеленого флуоресцентного білка (GFP) як маркера для вивчення біогенезу та деградації пероксисом. Для вивчення біогенезу і деградації пероксисом розробка зручного маркера, який би дозволяв відслідковувати пероксисоми *in vivo* методом флуоресцентної мікроскопії було важливим завданням. Зелений флуоресцентний білок (GFP), що походить з біоломінесцентної медузи *Aequorea victoria*, виявився найбільш придатним рекомбінантним білком для цієї мети. Білки пероксисом синтезуються на вільних

полісомах і пост-трансляційно доставляються до органел, завдяки присутності у відповідних білків трьох відомих типів послідовностей доставки до пероксисом (peroxisomal targeting signals, PTS), консервативних для усіх еукаріотів – двох для білків матриксу органел і третього для білків мембран пероксисом або пероксинів (Waterham and Cregg, 1997).

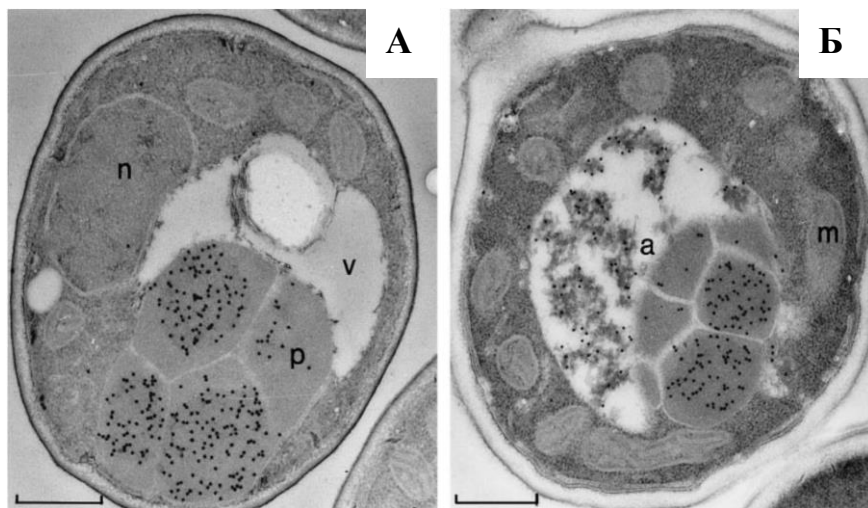


Рис. 13. Імуноцитохімічний аналіз локалізації АОХ у клітинах *P. pastoris* при індукції макропексофагії. (А) У $\Delta vps15$ мутанта сигнал мічення АОХ обмежений люменом пероксисом (Б). У клітинах штаму дикого типу (WT) білок АОХ спостерігається як у пероксисомах, так і у вакуолях та імовірних аутофагосомах. Умовні позначення: а – аутофагосома; m – мітохондрія; n – ядро; p – пероксисома. Масштабний відрізок – 0,5 мкм.

Першим і найбільш поширеним сигналом (PTS1) є С-кінцева трипептидна послідовність «SKL» або її видозміни (Subramani *et al.*, 1993). Другий сигнал, PTS2, є відносно менш поширеним і має консенсусну послідовність «RLX5H/QL», що розташовується поблизу N-кінця матриксних білків (Glover *et al.*, 1994). Сигнальною для РМР є внутрішня 20-амінокислотна послідовність з гідрофільних амінокислот. Ці дані були вперше використані нами для конструювання штамів *P. pastoris* з міченими GFP-кон'югатами з різними типами PTS пероксисомами та для аналізу нововиділених мутантів *P. pastoris*, дефіцитних за біогенезом (Johnson *et al.*, 1999) чи селективною деградацією пероксисом (Farre *et al.*, 2017).

Виділення колекції мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією (*pdg*) та їх фенотиповий та генетичний аналіз. На моделі дріжджів *P. pastoris* було розроблено метод селекції мутантів з пошкодженою деградацією пероксисом (*pdg* – peroxisome degradation deficient) на основі аналізу колоній на залишкову активність пероксисомної АОХ при зміні джерела карбону. Після УФ-мутагенезу, підрощені на метанолі колонії перенесли методом реплік на середовища з 2% глюкозою або 2% етанолом, і інкубували протягом 8-10 год, після чого активність АОХ візуалізувалась на чашках, наносячи поверх колоній реакційну суміш для АОХ з доданим дигітоніном (1 мг/мл) як пермебіалізуючим агентом. Колонії, що демонстрували відносно вищу залишкову активність АОХ, повторно перевіряли на

цей фенотип і підтверджені відбирали для подальшого дослідження. Виділені потенційні мутанти далі аналізували у рідких культурах для підтвердження *Pdg*-фенотипу, і проводили генетичний аналіз, зокрема тести на домінування та комплементарність. Генетичний аналіз 10-ти виділених індивідуальних мутантів виявив шість різних груп комплементарності (генів), позначених як *PDG1-PDG6*. Відповідні мутанти характеризувалися помітними дефектами у швидкості інактивації АОХ при адаптації до глюкози чи етанолу (Stasyk *et al.*, 1999).

Розробка методу клонування *ATG* генів у метилотрофних дріжджів. Опрацьовано метод позитивної селекції (збагачення функціонально-комплементаваних клонів) на основі субстрату АОХ, алілового спирту для клонування генів пексофагії (*ATG*) з геномних бібліотек дріжджів (Stasyk *et al.*, 1999). Такий метод може бути застосований до УФ- або хімічно індукованих мутантів, для яких дефектні гени не можуть бути ідентифіковані іншими засобами (Stasyk *et al.*, 2003; Stasyk *et al.*, 2006). Принцип підходу полягає у тому, що колонії, функціонально комплементовані до фенотипу дикого типу (тобто із відновленою пексофагією), деградують пероксисому АОХ (яка конвертує аліловий спирт до більш токсичного альдегіду акролеїну) із фізіологічною швидкістю при перенесенні з метанолу на глюкозу або етанол і, таким чином, є менш чутливими до дії алілового спирту, ніж вихідний дефіцитний за пексофагією мутант. Як підтверджено у наших експериментах, комплементовані колонії здатні до ефективнішого виживання та швидшого росту при індукції пексофагії у присутності 0,1 мМ алілового спирту.

Ідентифікація та функціональний аналіз генів *PDG2/ATG28* та *PDG3/ATG26*, задіяних у деградації пероксисом. Як свідчення механічного та генетичного взаємозв'язку різних шляхів автофагії, більшість ідентифікованих у метилотрофних дріжджів генів пексофагії виявились ортологами генів, які беруть участь у неселективній автофагії та *Cvt* шляху *S. cerevisiae* (Klionsky *et al.*, 2003; Farré and Subramani, 2004; Dunn *et al.*, 2005; Oku *et al.*, 2015; Sibirny, 2016). Тому у нашому скринінгу ми приділяли основну увагу тим мутантам, які не виявляли дефекту загальної автофагії, згідно тесту з флоксином В (Tsukada and Ohsumi, 1993). Таким чином, наші дослідження були зосереджені на виявленні селективних компонентів пексофагічного механізму, та вивченні їх молекулярних функцій.

Молекулярне клонування гена *PDG2/ATG28* і фенотиповий аналіз *atg28* мутантів. У результаті генетичного аналізу було виявлено два рецесивних і моногенних алельних мутанти, дефектних за геном, позначеним як *PDG2*, а пізніше *ATG28* (Stasyk *et al.*, 1995, 2003; Dunn *et al.*, 2006).

Ген *ATG28* було виділено з геномної бібліотеки *P. pastoris* за допомогою функціональної комплементарності мутанта *atg28-52* з використанням селекції із аліловим спиртом. Дані нуклеотидної послідовності гена *ATG28* внесено у базу даних GenBank (реєстраційний номер [AY753207](#)). Кодований *ATG28* білок виявляв незначну гомологію до відомих білків. Проте, пошук в базах даних з фрагментом *Atg28*, що містить передбачуваний coiled-coil домен та мотив «лейцинової застібки», виявив кілька білків, зі значним ступенем локальної подібності у *C. albicans* (GenBank acc. no. [EAL04283](#)), *D. hansenii* (GenBank acc. no. [CAG85344](#)), та *H. polymorpha* (ORF #741, contig 47 of genome database). У *S. cerevisiae* або *Schizosaccharomyces pombe*

відповідних потенційних гомологів не виявлено.

Було сконструйовано делеційну касету та виділено мутант із делетованим *ATG28* геном. Як показано на Рис. 14, вихідний УФ-індукований та сконструйований $\Delta atg28$ мутанти демонстрували ідентичний фенотип, – пошкодження мікро- та макропексофагії.

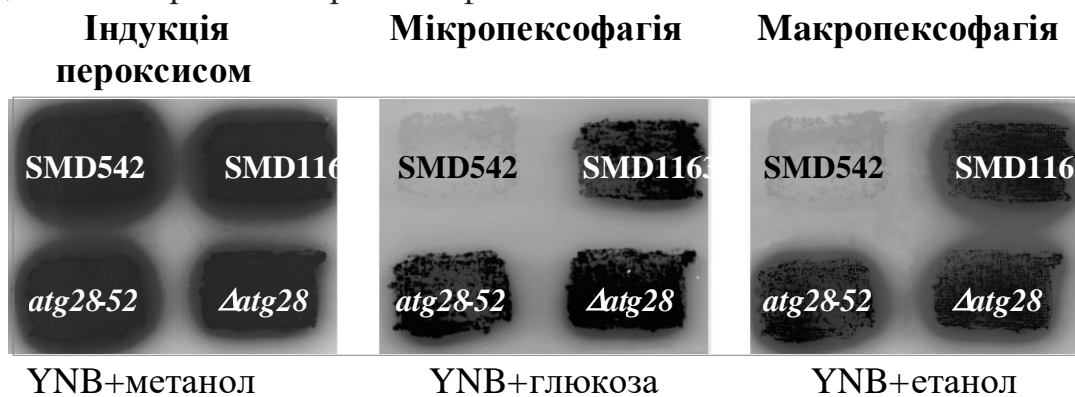


Рис. 14. Моніторинг активності АОХ у колоніях виділених мутантів *atg28*. Клітини переносились методом реплік з індукційного для пероксисом середовища з метанолом на глюкозо- та етанол-вмісні. Після 12 год інкубації наносили реакційну суміш АОХ з детергентом. SMD542 – штам дикого типу; SMD1163(*prb1 pep4*) – мутант, дефіцитний за вакуолярними протеазами.

Ці дані були підтверджені у детальному тесті інактивації АОХ у рідкій культурі. Однак структурний аналіз сконструйованих *atg28* мутантів з флуоресцентно-міченими BFP-PTS1 пероксисомами виявив, що незначна фракція пероксисом зазнає деградації при адаптації до глюкози. Таким чином, Atg28 виявився необхідним, але не критично важливим (*essential*) для пексофагії. Також, із використанням клітин з міченими специфічним барвником FM4-64 вакуолярними мембранами встановлено, що мікропексофагія є порушена в $\Delta atg28$ на стадії захоплення та ізолювання (*sequestration*) кластерів пероксисом мембранними випяченнями вакуоль. Електронно-мікроскопічний аналіз виявив, що інтактні пероксисоми в мутантних клітинах зберігались після 3 годин інкубації з глюкозою і 6 годин інкубації з етанолом (Рис. 15), тоді як клітини дикого типу на цьому етапі були повністю позбавлені великих органел. Також виявлено, що індукована етанолом макропексофагія є пошкодженою у мутанта на після утворення автофагійних мембран, що оточують індивідуальні пероксисоми, стадії. Згідно із результатами тесту із флоксином В, який забарвлює метаболічно неактивні клітини, процес загальної автофагії, індукований голодуванням за нітрогеном, є функціональним у *atg28* мутантів (Рис. 16). Детальний аналіз динаміки життєздатності клітин за таких умов виявив її помірне зниження у мутантів у порівнянні зі штамом дикого типу. При цьому клітини безпротеазного штаму SMD1163 (*pep4 prb1*), дефіцитного за усіма автофагійними шляхами, гинули значно швидше. Виявилось, що химерний білок Atg28-GFP, експресується під власним промотором на відносно низькому рівні та виявляє комплексну локалізацію. У метанол-індукованих клітинах Atg28-GFP білок був локалізований у цитозолі, зокрема у складі пунктатних структур невідомої природи, у безпосередній близькості до вакуолей.

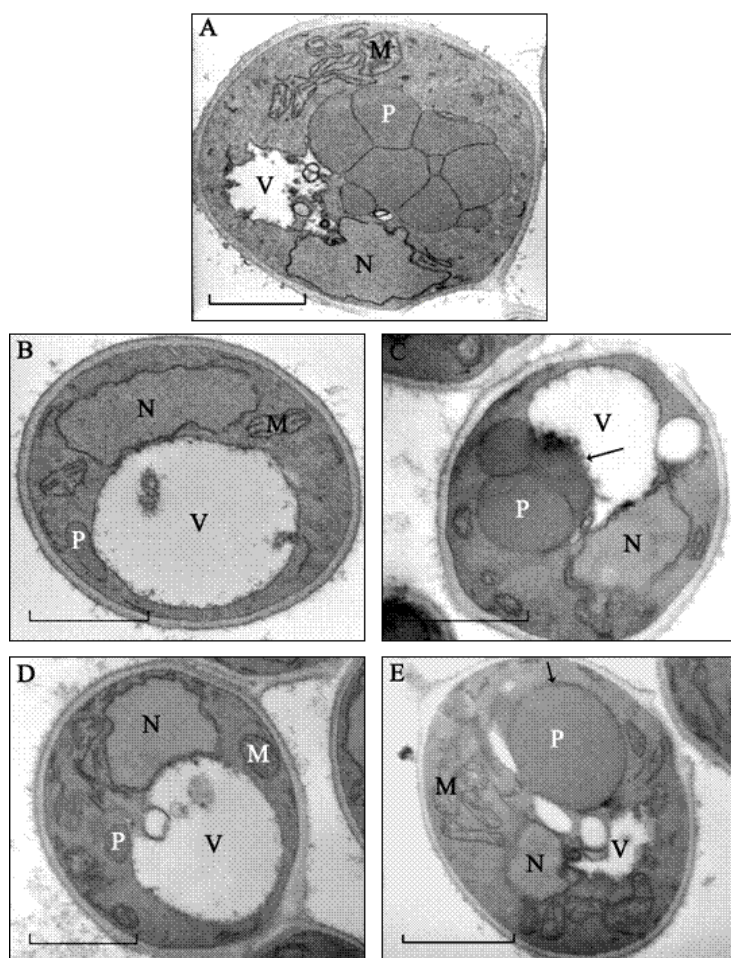


Рис. 15. Електронно-мікроскопічний аналіз морфології пероксофагії у клітинах *atg28* мутантів. (А) Штам дикого типу SMD542, метанол-індуковані клітини; (В) SMD542, після 3 год адаптації до глюкози; (С) $\Delta atg28$, після 3 год адаптації до глюкози; (D) SMD542, після 6 год адаптації до етанолу; (Е) $\Delta atg28$, після 6 год адаптації до етанолу. Стрілками показані: в (С) деградація пероксисом; в (Е) додаткові специфічні для макропероксофагії мембрани, що утворюються навколо пероксисом. Р – пероксисома, V – вакуоля N – ядро, М – мітохондрія. Бар = 1 мікромметр.

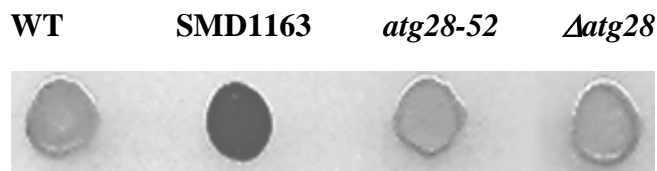


Рис. 16. Аналіз життєздатності клітин за умов індукції загальної автофагії. Клітини переносили із багатого середовища YPD на чашки YNB-N (без джерела нітрогену) з 1% глюкозою і 20 мг/л флоксину-В та інкубували 5 днів. Клітини з дефіцитом загальної автофагії (SMD1163) виявляють швидку втрату життєздатності і забарвлюються у червоний колір, тоді як клітини, здатні до загальної автофагії, зберігають життєздатність і залишаються незабарвленими (WT).

При адаптації до глюкози чи етанолу інтенсивність флуоресценції та кількість асоційованих із вакуолями Atg28-GFP-мічених структур зростала. Також встановлено, що Atg28 колокалізується з білком автофагії Atg17, маркером – преавтофагосомної структури (PAS), яка бере участь у механізмі пероксофагії (Aho *et al.*, 2005). Колокалізація та взаємодія із Atg17 вказує на те, що Atg28 є, ймовірно, одним із основних автофагійних білків (core autophagic protein), частково необхідним для декількох Atg шляхів але, особливо, для мікропероксофагії, таким чином, забезпечуючи її зв'язок з компонентами PAS у *P. pastoris* (Stasyk *et al.*, 2006, Nazarko, Farre і Subramani, 2009). Слід зазначити, що використовуючи Atg28 як білок-наживку (bait) у дріжджовій дигібридній системі (YTH), було ідентифіковано

його партнер – новий білок Atg35, специфічно необхідний для формування структури МІРА у механізмі мікропексофагії (Nazarko *et al.*, 2011).

Молекулярне клонування гена PDG3/ATG26 і фенотиповий аналіз atg26 мутантів. Нами та незалежно групою проф. Я. Сакаї (Y. Sakai, Kyoto University, Japan) було ідентифіковано новий ген ATG26 у *P. pastoris*, що кодує стеролглюкозилтрансферазу, каталітичний продукт якої ергостеролглюкозид (SG) є необхідним для пексофагії (Oku *et al.*, 2003; Stasyk *et al.*, 2003). Ген PDG3/ATG26 був виділений з геномної бібліотеки за допомогою функціональної комплементації мутанта *pdg3*, на основі селекції з аліловим спиртом. Білковий продукт відповідного гену виявляв високу ступінь гомології до UDP-глюкозилтрансферази Ugt51 *S. cerevisiae*, і містив специфічні РН, GRAM і каталітичний домени.

Було сконструйовано відповідний делеційний мутант та показано, що він, як і Уф-індукований мутант *pdg3-14*, є дефіцитним макро-, так мікропексофагію. (Рис. 17). Індукована глюкозою мікропексофагія є пошкодженою в *atg26* мутанта на стадії гомотипового злиття вакуолярних мембран навколо кластерів пероксисом (Рис. 17А). При індукції макропексофагії етанолом процес утворення додаткових мембран навколо пероксисом у мутанта був сповільненим, але не заблокованим (Рис. 17Б). Отже, каталітичний продукт Atg26 у *P. pastoris*, SG, очевидно не є строго необхідним для макропексофагії.

Аналіз загальної автофагії в *atg26* мутантів за допомогою тесту із флоксином В виявив, що відповідний процес не є пошкодженим. Тим не менше, деградація АОХ була повільнішою у порівнянні зі штамом дикого типу (Рис. 17В). І нарешті було виявлено, що *atg26* мутанти є більш чутливими до підвищення рН відносно штаму дикого типу (Рис. 17Г), що може свідчити про вплив мутації на одну із численних клітинних функцій, пов'язаних із вакуолями за стресових умов.

Цікаво відзначити, що мутант за геном-гомологом стеролглюкозилтрансферази в алкан-засвоюючих дріжджів *Y. lipolytica* демонстрував нормальну деградацію пероксисом (Stasyk *et al.*, 2003), і відповідний ген не комплементував дефект пексофагії при гетерологічній експресії у *atg26* мутанта *P. pastoris*.

З метою перевірки, чи функція білків Atg26 у пексофагії є консервативною для інших метилотрофів, ми сконструювали мутант по гену ATG26 в *H. polymorpha*, білковий продукт якого демонстрував 46% ідентичності до *PpAtg26*. Показано, що індуковані метанолом клітини $\Delta atg26$ мутанта *H. polymorpha* перенесені у середовища з глюкозою або етанолом виявляли підвищений рівень АОХ, хоча пошкодження макропексофагії було частковим. Таким чином, функція Atg26 в пексофагії може бути спеціалізованою адаптацією метилотрофів, пов'язаною із значним об'ємом пероксисом у цих видів при індукції метанолом.

Підсумовуючи результати цього розділу, нами виділено колекцію мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією, розроблено метод клонування пошкоджених генів та ідентифіковано три нових компоненти автофагійного апарату, що забезпечують селективність процесу пексофагії.

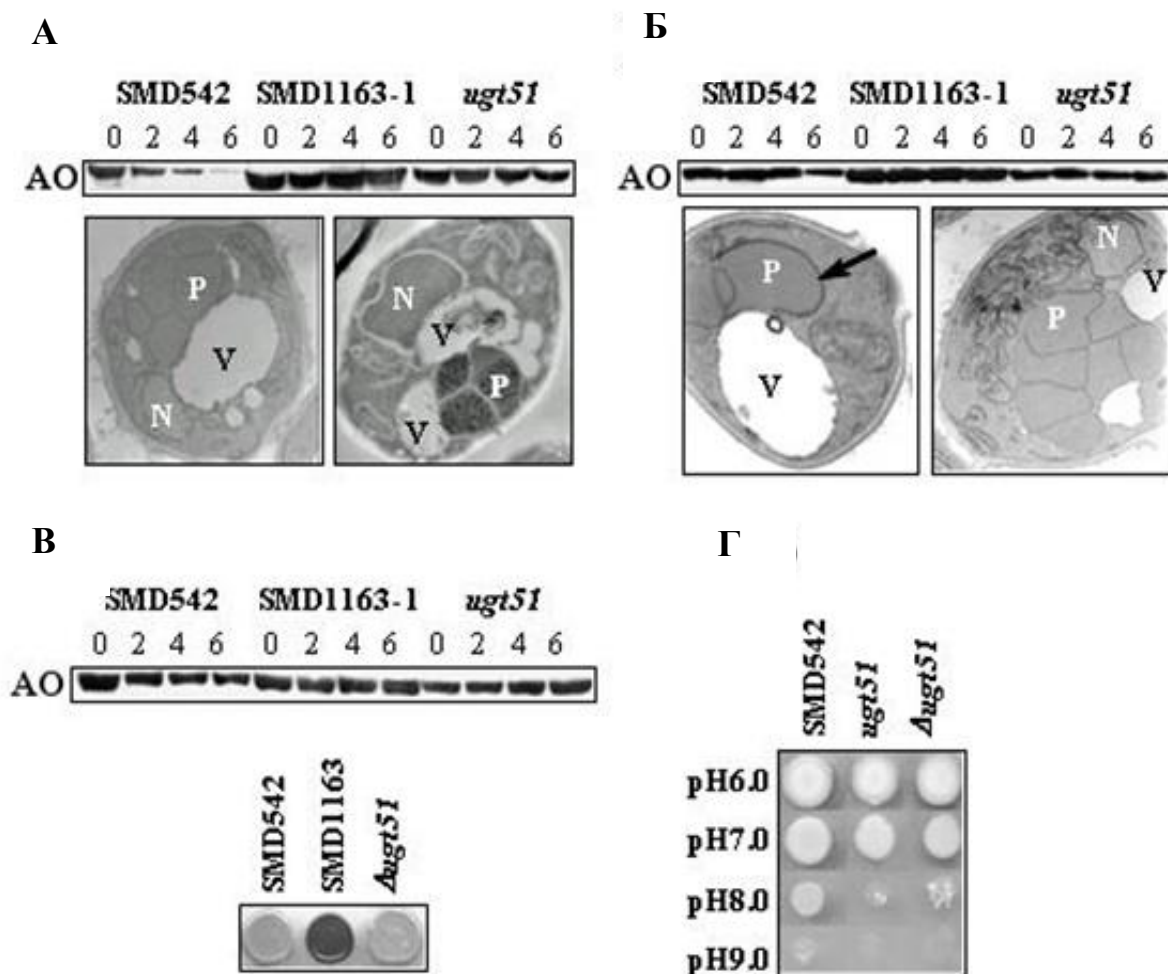


Рис. 17. Аналіз дефектів пексофагії та вторинних фенотипів *atg26/ugt51* мутантів *P. pastoris*. (А) Морфологія клітин *atg26* мутанта (позначеного як *ugt51*) через три год. після перенесення з метанолу на глюкозу (ліворуч). Імуноцитохімічна візуалізація АОХ після 1 год. адаптації до глюкози (праворуч) Р -пероксисома, V – вакуоля, N – ядро. Вище показано динаміку білка АОХ у клітинах штаму дикого типу (SMD542), протеазо-дефіцитного мутанта (SMD1163) і *ugt51* із зазначеними годинами адаптації до глюкози. (Б) Морфологія клітин штаму дикого типу через 1 годину адаптації до етанолу. Додаткові автофагійні мембрани, що оточують пероксисоми показані стрілкою (зліва); морфологія клітин *ugt51* через три години після перенесення у етанол-вмісне середовище; динаміка білка АОХ аналогічно до «А». (В) Динаміка білка АОХ після індукції загальної автофагії при голодуванні за нітрогеном та забарвлення клітин флоксином В після 2 діб голодування. (Г) Порівняльний аналіз чутливості клітин до підвищеного рН. Клітини інкубували на чашках з YPD із зазначеними показниками рН протягом 4 діб.

Виділення та аналіз мутантів *P. pastoris* і *H. polymorpha* з порушеною регуляцією біогенезу і гомеостазу пероксисом.

Молекулярне клонування гена *PDG1/PEX36* *P. pastoris* і фенотиповий аналіз мутантів *pdg1/pex36*. Один із виділених нами мутантів із потенційно пошкодженою деградацією пероксисом (Stasyk *et al.*, 1995), названий *pdg1*, характеризувався унікальним фенотипом: не лише сповільненою пексофагією, але й

одночасно помітним порушенням росту на середовищі з індуктором пероксисом метанолом. Генетичний аналіз підтвердив, що обидва фенотипи обумовлюються рецесивною моногенною мутацією. Ми припустили, що цей білок, може фізично чи регуляторно об'єднувати механізми біогенезу і деградації пероксисом у клітині.

Відповідний ген *P. pastoris PDG1*, пізніше перейменований у *PEX36* (Farre *et al.*, 2017), був виділений з геномної бібліотеки функціональною комплементацією дефекту росту на метанолі УФ-індукованого *pdg1* мутанта. Послідовність *PDG1/PEX36* внесена у базу даних GenBank під номером [CAU67701](#). Білок Pdg1 виявляв два потенційних трансмембранних домени та незначну подібність до білків з баз даних, включаючи усі відомі білки-пероксини. Сконструйований мутант $\Delta pdg1$ виявляв фенотип, аналогічний до УФ-індукованого мутанта, а саме пошкодження росту на метанолі та одночасно високу залишкову активність АОХ за індукції пексофагії (Рис. 18А). Одночасно, клітини мутанта *pdg1* не виявляли пошкодження загальної автофагії. Пошкодження ж росту на метанолі спостерігалось у мутантів як на агаризованому середовищі (Рис. 18Б), так і у рідкій культурі. При цьому дефект росту на іншому субстраті, індукторі біогенезу пероксисом, олеаті, був у *pdg1* мутантів менш вираженим.

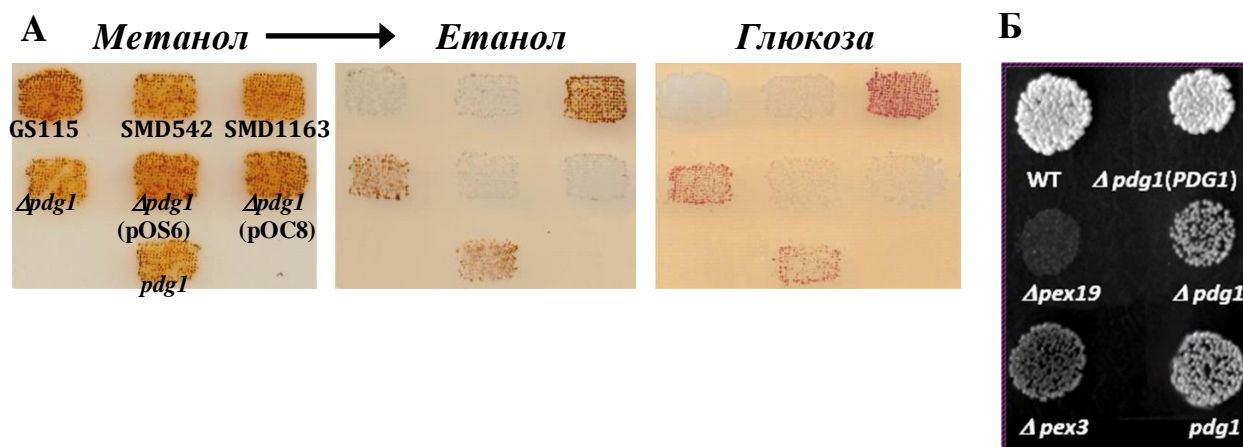


Рис. 18. Аналіз фенотипу мутанта $\Delta pdg1$. (А) Візуалізація активності АОХ за індукції мікро- (глюкозою) чи макро- (етанолом) пексофагії. GS115, SMD542 – штами дикого типу, SMD1163 – мутант із пошкодженими вакуолярними протеазами, $\Delta pdg1$ (pOS6), $\Delta pdg1$ (pOS8) – комплементовані до дикого типу мутанти (Б) Ріст УФ-індукованого *pdg1* та $\Delta pdg1$ на середовищі YNM з 1% метанолу, порівняно зі штамом дикого типу (WT) та мутантами $\Delta pex3$ і $\Delta pex19$, нездатними утилізувати метанол; $\Delta pdg1(PDG1)$, – мутант, функціонально комплементованим вектором pOS6 до дикого типу.

Сповільнена деградація білка АОХ при адаптації до глюкози також була підтверджена методом Вестерн-блотингу. Мікроскопічний аналіз *in vivo* сконструйованих клітин $\Delta pdg1$ з флуоресцентно-міченими пероксисомами також показав, що процес макропексофагії у мутанта є сповільненим: пероксисоми залишались інтактними і флуоресцентний сигнал не з'являвся у люмені вакуоль впродовж декількох годин після індукції мікропексофагії. Таким чином, на

початковому етапі дослідження ідентифікований ген *PDG1* був класифікований як такий, що бере участь у деградації пероксисом.

Щоб з'ясувати, яким чином білок *Pdg1* впливає на метилотрофний ріст, було сконструювано штами, що експресують GFP, кон'югований з різними типами сигналів доставки до пероксисом, описані вище. Показано, що при індукції метанолом, усі три форми кон'югатів GFP з PTS1, PTS2, або з PMP у клітинах мутанта були міслокалізованими (Рис. 19). Окрім цього, морфологічно-помітні пероксисоми з'являлись у клітинах *Δpdg1* тільки після 4-5 годин індукції метанолом, тоді як для штаму дикого типу впродовж однієї години.

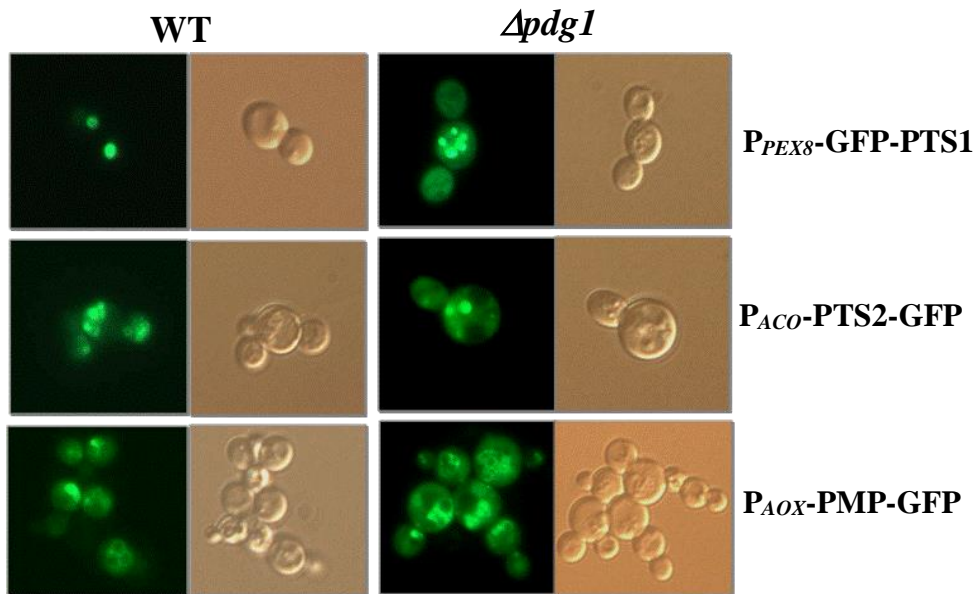


Рис. 19. Аналіз локалізації різних форм кон'югатів GFP з сигналами доставки до пероксисом. Флуоресцентно-мічені клітини штаму дикого типу (WT) та *Δpdg1* мутанта інкубували у середовищі з метанолом протягом 6 годин.

Таким чином, *Pdg1* необхідний для фізіологічного біогенезу пероксисом та коректної локалізації усіх типів PTS.

З використанням створених поліклональних анти-*Pdg1* антитіл, було проаналізовано внутрішньоклітинну локалізацію білка. *Pdg1* чи його функціонально неактивні кон'югатні форми з GFP спостерігались лише в отриманій у градієнті сахарози фракції органел, але не у фракції розчинних цитозольних білків. Окрім цього, *Pdg1-GFP*, експресований під нативним промотором у штаму дикого типу індукувався метанолом та локалізувався до пероксисом, тоді як у *Δpdg1* мутанта – до везикулярних структур, що очевидно є прекурсорами органел (Рис. 20).

У різних *rex* мутантів химерний білок був міслокалізований до цитозолу, підтверджуючи таким чином фізіологічну пероксисомну локалізацію. Слід зазначити, що пероксисомна мембранна локалізація *Pdg1* була остаточно доведена ко-експресуючи в одному штамі *Pdg1-GFP* із *BFP-PTS1*, які колокалізувались. Додатково групою S. Subramani було доведено, що *Pdg1* фізично взаємодіє з *Pex19*, одним із ключових пероксинів, що забезпечують доставку PMP при біогенезі органел (Farre *et al.*, 2017).

Шляхом конструювання мутантних (вкорочених) форм *Pdg1* було встановлено, що тільки ті з них, що містили два передбачені трансмембранні домени з *Pex19*-зв'язуючою послідовністю, були здатні до функціональної комплементції *Δpdg1*

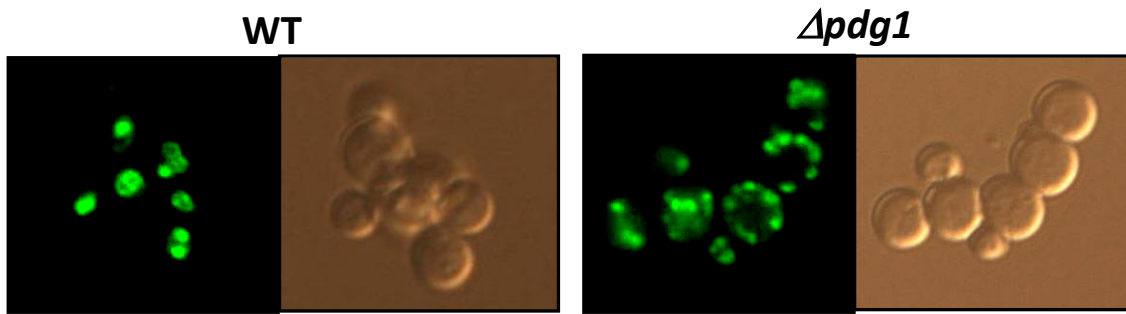


Рис. 20. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації Pdg1-GFP. Флуоресцентні фотографії клітин штаму дикого типу і мутанта *Δpdg1*, індукованих метанолом протягом 4 год. Pdg1-GFP локалізується до мембран пероксисом, відтворюючи локалізацію PMP-GFP (Рис 19).

мутанта, причому 17 С-кінцевих амінокислот були специфічно необхідними для комплементування дефекту пексофагії. Також встановлено, що Pdg1 поряд і пероксином Pex3, не зазнає деградації у складі пероксисом і видаляється із пероксисомних мембран до везикул невстановленої поки природи. Наші дані вказують на те, що видалення Pex14, Pex3 та Pdg1 з пероксисомних мембран у *P. pastoris* може бути передумовою подальшої ефективної їх деградації і пояснює чому цей процес частково порушений у *Δpdg1* мутанта. Також, Pdg1 може бути об'єктом раніше невідомого ретроградного транспорту PMP від пероксисом до ендоплазматичного ретикулулу.

Ідентифікація гомолога Pdg1 у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. У наступній серії експериментів було ідентифіковано гомолог Pdg1 у геномі *H. polymorpha*, та досліджено його вплив на регуляцію гомеостазу пероксисом. *HpPdg1* виявляв обмежену але добре виражену в області передбачених трансмембранних доменів гомологію до *PpPdg1*. Сконструйований делеційний штам також виявляв фенотип схожий до *pdg1 P. pastoris*: сповільнений ріст на середовищі з метанолом та високу залишкову активність АОХ при індукції макропексофагії.

Порівняльний аналіз *Δpdg1 H. polymorpha* з описаними вище мутантами *Δgcr1*, *Δhxs1*, *Δmig1* і *Δmig2*, дефіцитними за різними механізмами транскрипційної регуляції глюкозою, та делеційним мутантом по гену *ATG26 H. polymorpha*, виявив, що дефект індукованої глюкозою макропексофагії у *Δpdg1* є більш виражений, ніж у *Δmig1* та *Δatg26*, які характеризуються частковими дефектами макропексофагії (Рис. 21). Однак, такий фенотип може бути також викликаний частковою міслокалізацією АОХ у *Δpdg1* мутанта. Було сконструйовано штам *H. polymorpha Δpdg1*, що надекспресує *PDG1* з *P. pastoris* та показано, що він виявляв проміжний відносно штаму дикого типу та вихідного мутанта фенотип щодо утилізації метанолу та пексофагії, що свідчить про часткову міжвидову функціональну комплементування.

Пошук функціональних Pdg1 гомологів у немилотрофних дріжджів. Порівнюючи послідовності Pdg1 *P. pastoris* з наявними базами даних, також було ідентифіковано Ycl056c *S. cerevisiae*, білок з невідомою функцією з дуже обмеженою гомологією до Pdg1 у С-кінцевій області. Подібно до *HpPdg1*, Ycl056c є

значно коротшим, ніж *PpPdg1* (144 амінокислотних залишки проти 363), але при цьому два білки володіють схожою топологією в області передбачених

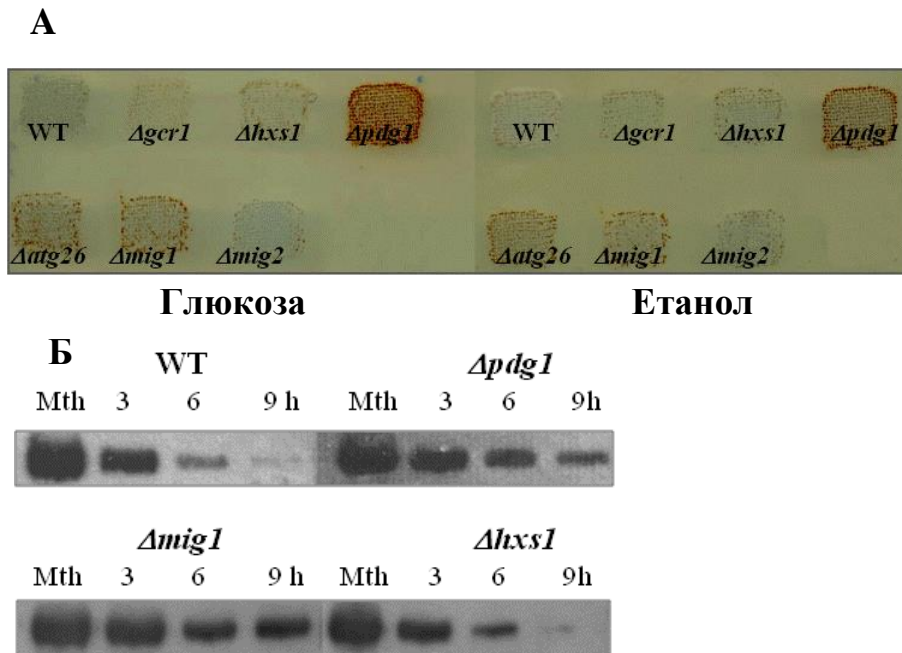


Рис. 21. Порівняльний аналіз деградації АОХ у сконструйованого мутанта *Δpdg1* з іншими регуляторними мутантами *H. polymorpha*. (А) Аналіз активності АОХ на чашках (Б) Вестерн-блот аналіз білка АОХ у безклітинних екстрактах за умов індукції макропексофагії глюкозою.

трансмембранних доменів. Така структурна схожість привела до припущення, що *Ycl056c* потенційно може бути функціональним гомологом *Pdg1* у *S. cerevisiae*.

Для експериментальної перевірки цієї гіпотези було сконструйовано вектор, що експресує *Ycl056c* у мутанта *Δpdg1 P. pastoris* і показано, що дійсно *Ycl056c* при надекспресії може частково функціонально комплементувати дефіцит метилотрофного росту. На підтвердження цих даних, *Ycl056c S. cerevisiae* був пізніше ідентифікований як новий пероксин *Pex34*, який бере участь у процесі поділу пероксисом (Tower et al., 2011).

Порівнюючи спектр відомих пероксинів у різних видів дріжджів з нашими даними про наявність потенційних гомологів *Pdg1*, ми несподівано виявили, що види, які містять потенційний гомолог *PpPdg1*, одночасно не мають у геномі гену пероксина *Pex16* (наприклад, *H. polymorpha*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae* і *P. pastoris*), і, vice versa, (наприклад, *Y. lipolytica*). Ми припустили, що *Pdg1*-подібні білки і *Pex16* можуть виконувати взаємовиключні функції у біогенезі пероксисом. Для перевірки цієї гіпотези було сконструйовано вектор, здатний до експресії *Y. lipolytica PEX16* під контролем P_{AOX} у *P. pastoris*. Встановлено, що гетерологічний *PEX16* функціонально комплементував дефект росту *Δpdg1 P. pastoris* у середовищі з метанолом. Додатково було показано, що *PpPDG1* здатен відновлювати біогенез пероксисом у фібробластах людини, що несуть мутований *HsPEX16* (Farre et al., 2017). Оскільки функції *Pex34*, *Pex16*, та *Pdg1* виявились спеціалізованими та відмінними, останньому білку було вирішено присвоїти статус нового пероксина, названого

Pex36 (Farre *et al.*, 2017). Необхідні додаткові дослідження для встановлення молекулярної ролі Pex36 у процесі пексофагії.

Біотехнологічне застосування мутантних штамів метилотрофних дріжджів з порушенням глюкозної регуляції. Метилотрофні дріжджі є відомою платформою для продукції гетерологічних білків. Однією з їх переваг є використання потужних і строго регульованих джерелами карбону промоторів генів метилотрофного метаболізму, зокрема алкогольоксидази (P_{AOX}) (Stasyk *et al.*, 2017). Однією з цілей останнього розділу роботи було вдосконалення платформи експресії на основі використання штамів зі зміненою катаболітною регуляцією, а також нових підходів для селекції мультикопійних трансформантів.

Зокрема нами розроблено нову ефективну систему для мультикопійної інтеграції векторів експресії у геном *H. polymorpha*, що базуються на селективних генах дріжджів, – *ADE1 P. pastoris* та *FLD1 H. polymorpha*, під контролем послаблених промоторів, яка не використовує потенційно екологічно-небезпечні гени резистентності до антибіотиків.

Вважається, що за певних умов великомасштабного промислового виробництва використання метанолу як індуктора синтезу гетерологічних білків становить проблему, оскільки ця сполука є токсичною, легкозаймистою, забезпечує повільну швидкість росту та вимагає посиленої аерації. З метою вироблення альтернативного підходу, нами сконструйовано, зокрема на основі мутанта *gcr1*, панель штамів *H. polymorpha* із пошкодженою глюкозною репресією, названих ЕАО (Elevated Alcohol Oxidase). На основі таких мутантних штамів – господарів було розроблено модифіковану платформу експресії, яка використовує зручні субстрати-цукри для нарощення біомаси (сахароза) та індукції експресії рекомбінантного білка (глюкоза або ксилоза). У таких штамів було продемонстровано ефективну регульовану за допомогою джерел карбону експресію декількох рекомбінантних білків, зокрема секреторних глюкозооксидази з гриба *Aspergillus niger* та міні про-інсуліну, і внутрішньоклітинного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg). Шляхом ступінчастої селекції з використанням різних маркерних генів, а також введення мутації, що пошкоджує біогенез пероксисом у штам-господар ЕАО, вдалось отримати високоефективний продуцент HBsAg. Наведені приклади підтверджують, що дослідження молекулярних сигнальних механізмів глюкозної регуляції та гомеостазу органел можуть мати важливе біотехнологічне використання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше ідентифіковано та з'ясовано молекулярні функції ряду генів метилотрофних дріжджів, що беруть участь у процесах катаболітної репресії, сигналізування глюкози, селективної деградації та біогенезу пероксисом, та встановлено ряд закономірностей. На основі сконструйованих мутантних штамів створено вдосконалені продуценти власних та гетерологічних білків біотехнологічного значення.

Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Ідентифіковано декілька нових генів, задіяних у процесах катаболітної регуляції, біогенезу та деградації пероксисом у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* (*VPS15*, *PDG1/PEX36*, *PDG2/ATG28*, *PDG3/ATG26*, *ATG35*) та *H. polymorpha* (*HXS1*, *MIG1*, *MIG2*, *HAP4A*, *HAP4B*, *ATG26*, *PEX36*), та із застосуванням методів генетичного, біохімічного та структурного аналізу функціонально охарактеризовано їх білкові продукти.

2. Встановлено, що сигналізування глюкози у механізмі транскрипційної регуляції транспортерів глюкози у *H. polymorpha* відбувається за участю класичного нетранспортуючого сенсора Hxs1, тоді як сигнальний механізм транскрипційної репресії у *H. polymorpha* є «неконвенційним» і регулюється як транспортом глюкози, так і білком Gcr1 – унікальним для метилотрофів трансцептором (транспортуючим рецептором), який має регуляторну функцію за відсутності глюкози.

3. Гомологи елементів головного шляху репресії *S. cerevisiae* транскрипційні фактори Mig1, Mig2 та Tup1 не є основними компонентами механізму глюкозної репресії пероксисомних ферментів у *H. polymorpha*. Таким чином, молекулярні механізми транскрипційної репресії зазнали видової спеціалізації у різних дріжджів.

4. Gcr1 і Hxs1 не беруть безпосередньої участі у сигнальному механізмі катаболітної інактивації, що включає селективну автофагійну деградацію пероксисом (пексофагію). При цьому репресори Mig1, Mig2 та Tup1 є необхідними для фізіологічної регуляції типу пексофагії у відповідь на зовнішні стимули.

5. Встановлено, що механізм пексофагії у метилотрофів контролюється як консервативними для загальної автофагії та для різних видів дріжджів білками, так і специфічними елементами. Так, Atg26, ергостеролглюкозилтрансфераза, є селективно необхідною для мікро- та макропексофагії у метилотрофів *P. pastoris* та *H. polymorpha*.

6. Білок Atg28 виявляє комплексну внутрішньоклітинну локалізацію та є одним із компонентів автофагійного апарату, що відповідає за селективне розпізнавання пероксисом та поєднує механізм загальної автофагії та селективної мікропексофагії, взаємодіючи із білком-партнером Atg35.

7. Новий білок пероксисомних мембран Pdg1/Pex36 є необхідним для біогенезу цих органел а також впливає на їх автофагійну деградацію у *P. pastoris* та *H. polymorpha*. На моделі Pex36 встановлено феномен селективної ексцизії та рециклізації білка-пероксина з пероксисомних мембран у процесі пексофагії.

8. Розроблено платформу для мультикопійної інтеграції векторів експресії у геном *H. polymorpha*, що базується на нових селективних маркерних генах (*P. pastoris ADE1* та *H. polymorpha FLD1*). На основі мутантів *H. polymorpha* з пошкодженими механізмами катаболітної регуляції та біогенезу пероксисом сконструйовано продуценти ряду білків медичного та біотехнологічного значення. Відповідна модифікована платформа експресії забезпечує ефективну регуляцію синтезу цільового продукту карбоновими субстратами-цукрами і не вимагає метанолу для індукції ферментації.

9. Таким чином, результати даної роботи підкреслюють необхідність порівняльних досліджень сигнальних механізмів у різних груп дріжджів, як з точки зору отримання нового фундаментального знання про біологію еукаріотичної клітини, так і його використання для різноманітних біотехнологічних процесів.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Статті:

1. Stasyk O. G., Denega I. O., Padhorny D., Dmytruk K. V., Kozakov D., Abbas C., **Stasyk O.V.** Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018. Vol. 103. P. 25–34. (IF – **3.50**). (Здобувачу належить ідея проведення досліджень, узагальнення результатів та підготовка публікації).
2. Kurylenko O. O., Ruchala J., Vasylyshyn R. V., **Stasyk O. V.**, Dmytruk O. V., Dmytruk K. V., Sibirny A. A. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol. Biofuels.* 2018. Vol. 11. P. 197. doi: 10.1186/s13068-018-1203-z. eCollection 2018. (IF – **5.50**). (Здобувач взяв участь у формулюванні ідеї та виконанні частини досліджень, аналізі отриманих даних та підготовці публікації).
3. Farré J.-C., Carolino K., **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Hodzic Z., Agrawal G., Till A., Proietto M., Cregg J., Sibirny A. A., Subramani S. A new yeast peroxin, Pex36, a functional homologue of mammalian *PEX16*, functions in the ER-to-peroxisome traffic of peroxisomal membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 2017. Vol. 429, No 23. P. 3743–3762. (IF – **4.63**). (Здобувач спільно зі співавторами сформулював ідею цієї роботи, провів ряд ключових досліджень, взяв участь в аналізі даних та підготовці публікації).
4. Petryk N., Sybirna K., Mucchielli M. H., Guiard B., Bao W., Zhou Y. F., **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Krasovska O. S., Budin K., Reymond N., Imbeaud S., Coudouel S., Delacroix H., Sibirny A., Bolotin–Fukuhara M. Functional study of the *HAP4*–like genes suggest that the key regulators of carbon metabolism *HAP4* and oxidative stress response *YAP1* in yeast diverged from a common ancestor. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, No 12: e112263. doi: 10.1371 (IF – **3.53**). (Здобувач брав участь у проведенні окремих експериментів та підготовці публікації).
5. Krasovska O. S., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A. Stable overproducer of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* due to multiple integration of heterologous auxotrophic selective markers and defect in peroxisome biogenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, No 23. P 9969–9979. (IF – **3.69**). (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у плануванні та проведенні досліджень, аналізі отриманих даних, та підготував публікацію).
6. Стасик О. Г., Деніга І. О., Сибірна Н. О., **Стасик О. В.** Експресія генів потенційних транспортерів гексоз у дріжджів *Hansenula polymorpha* диференційно регулюється сенсорами глюкози Hxs1 та Gcr1. *Біологічні студії.* 2012. Т. 6, № 3. С. 39–54. (Здобувачу належить ідея проведення досліджень, планування експериментів та участь в узагальненні результатів та підготовці публікації).
7. Стасик О. Г., Деніга І. О., Климишин Н. І., Сибірна Н. О., **Стасик О. В.** Особливості регуляції транспорту гексоз і катаболітної репресії сенсорами гексоз *HrGcr1* і *HrHxs1* дріжджів *Hansenula polymorpha*. *Біологічні Студії.* 2012. Т. 6, № 2,

С. 33–44. (Здобувач взяв участь у плануванні експериментів, узагальненні результатів та підготовці публікації).

8. Стасик О. Г., Стасик О. В. Селективна деградація пероксисом у дріжджів *Hansenula polymorpha* потребує стеролглюкозилтрансферазу Atg26. *Біологічні студії*. 2011. Т. 5, № 2. С. 93–104. (Здобувач спільно із співавтором сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у проведенні дослідження та підготовці публікації).

9. Nazarko V. Y., Nazarko T. Y., Farré J.-C., Stasyk O. V., Warnecke D., Ulaszewski S., Cregg J. M., Sibirny A. A., Subramani S. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2011. Vol. 7, No 4. P. 375–385. (IF – **6.64**). (Здобувач брав участь у проведенні окремих експериментів та підготовці публікації).

10. Stasyk O. V., Nazarko T. Y., Sibirny A. A. Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection of transformants for ATG gene cloning in yeasts. *Methods Enzymol*. 2008. Vol. 451. P. 229–239. (IF – **2.12**). (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи та спільно із співавторами підготував публікацію)

11. Stasyk O. G., Maidan M., Stasyk O. V., Van Dijck P., Thevelein J. M., Sibirny A.A. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryotic Cell*. 2008. Vol. 7, No 4 P. 735–746. (IF – **3.4**) (Здобувач сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у плануванні досліджень, аналізі даних, та підготовці публікації)

12. Ishchuk O. P., Voronovsky A. Y., Stasyk O. V., Gayda G. Z., Gonchar M. V., Abbas C. A., Sibirny A. A. Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature fermentation of xylose. *FEMS Yeast Res.* 2008. Vol. 8, No 7. P. 1164–1174. (IF – **2.27**). (Здобувач брав участь у проведенні окремих експериментів та підготовці публікації).

13. Stasyk O. G., van Zutphen T., Ah Kang H., Stasyk O. V., Veenhuis M., Sibirny A. A. The role of *Hansenula polymorpha* *MIG1* homologues in catabolite repression and pexophagy. *FEMS Yeast Res.* 2007. Vol. 7, No 7. P. 1103–1113. (IF – **2.27**) (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у плануванні та виконанні досліджень, аналізі отриманих даних та підготувавши публікації)

14. Krasovska O. S., Stasyk O. G., Nahorny V. O., Stasyk O. V., Granovski N., Kordium V.A., Vozianov O.F., Sibirny A.A. Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. *Biotech. Bioeng.* 2007. Vol. 97, No 4. P. 858–870. (IF – **3.00**) (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у проведенні експериментальних досліджень та підготовці публікації).

15. Saloheimo A., Rauta J., Stasyk O. V., Sibirny A.A., Penttilä M., and Ruohonen L. Xylose transport studies with xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2007. Vol. 74, No 5 P. 1041–1052. (IF – **2.44**). (Здобувач брав участь у виконанні окремої частини досліджень та підготовці публікації).

16. Красовська О. С., Федосюк С. П., Стасик О. В., Сибірний А. А. Нова система селекції мультикопійних інтегрантів у дріжджів *Hansenula polymorpha* на основі

ауксотрофного та ензиматичного маркерів. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології* : збірник наукових праць з'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. Алушта, 2007. Т. 1. С. 355–359. (Здобувачу належить ідея цієї роботи, участь у плануванні та проведенні дослідження та підготовці публікації).

17. **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Mathewson R. D., Farré J.-C., Nazarko V. Y., Krasovska O. S., Subramani S., Cregg J. M., Sibirny A. A. Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2006. Vol. 2, No 1. P. 30–38. (IF – **6.71**). (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у виконанні основної частини досліджень та підготовці публікації).

18. Krasovska O. S., Babiak L. Y., Nazarko T. Y., Stasyk O. G., Danysh T. V., Gaida G.Z., **Stasyk O. V.**, Gonchar M. V., Sibirny A. A. Construction of yeast *Hansenula polymorpha* overproducing amine oxidase as bioselective element of sensors for biogenic amines. *Collection of scientific works of Nat. Acad. Sci. of Ukraine* / Ed. G. V. Yel'ska and V. D. Pokhodenko. Kyiv, 2006. P. 141–148. (Здобувач взяв участь у проведенні окремих експериментів та підготовці публікації).

19. Демків О. М., Парижак С. Я., Красовська О. С., **Стасик О. В.**, Гайда Г. З., Сибірний А. А., Гончар М. В. Конструювання штамів – надпродуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*. *Біополімери і клітина*. 2005. Т. 21, № 6. С. 525–530. (Здобувач взяв участь у виконанні частини досліджень, аналізі отриманих даних та підготовці публікації).

20. Dunn W. A., Jr., Cregg J. M., Kiel J. A. K. W., van der Klei I. J., Oku M., Sakai Y., Sibirny A. A., **Stasyk O. V.**, Veenhuis M. Pexophagy: The selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy*. 2005. Vol. 1. P.75–83. (IF – **6.71**). (Здобувач спільно із науковим консультантом та співавторами сформулював ідею цієї роботи, виконав окремі дослідження та взяв участь в узагальненні результатів та у підготовці публікації).

21. **Stasyk O. V.**, Nazarko T. Y., Stasyk O. G., Krasovska O. S., Warnecke D., Nicaud J. M., Cregg J. M., Sibirny A. A. Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biol. Int.* 2003. Vol. 27, No 11. P. 947–952. (IF–**1.36**). (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у виконанні частини досліджень та підготовці публікації).

22. **Stasyk O. V.**, Nazarko V. Y., Pochapinsky O. D., Nazarko T. Y., Veenhuis M., Sibirny A. A. Identification of intragenic mutations in the *Hansenula polymorpha* PEX6 gene that affect peroxisome biogenesis and methylotrophic growth. *FEMS Yeast Res.* 2003. Vol. 4, No 2. P. 141–147. (IF–**2.27**). (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у плануванні та виконанні досліджень та підготовці публікації).

23. **Стасик О. В.**, Сибірний А. А. Механізми біогенезу та деградації пероксисом у дріжджів. *Праці Наукового товариства ім. Т.Г. Шевченка*. Львів, 2003. Т. 10. С. 271–283. (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, виконав окремі дослідження та взяв участь в узагальненні результатів та підготовці публікації).

24. Nazarko V. Y., Pochapinsky O. D., Nazarko T. Y., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A.

Isolation and characterization of cold sensitive *peхb* mutant of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biopolymers and Cells*. 2002. Vol. 18, P. 131–134. (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у виконанні досліджень та підготовці публікації).

25. **Stasyk O. V.**, van der Klei I. J., Bellu A. R., Kiel J. A. K. W., Shen S., Cregg J. M., and Veenhuis M. A *Pichia pastoris* VPS15 homologue is required in selective peroxisome autophagy. *Current Genetics*. 1999. Vol. 36. P. 262–269. (IF – **2.22**). (Здобувач спільно із співавторами сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у виконанні ключових досліджень та підготовці публікації).

26. Johnson M. A., Waterham H. R., Ksheminska G. P., Fayura L. R., Cereghino J. L., **Stasyk O. V.**, Veenhuis M., Kulachkovsky A. R., Sibirny A. A., Cregg J. M. Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics*. 1999. Vol. 151. P. 1379-1391. (IF – **4.24**). (Здобувач брав участь у проведенні окремих експериментів, аналізі результатів та підготовці публікації).

27. Kulachkovsky A. R., **Stasyk O. V.**, Ksheminska G. P., Fayura L. R., Moroz O. M., Sibirny A. A. Nutrition and ultrastructure of the mutants of methylotrophic yeasts defective in biogenesis and degradation of peroxisomes. *Food Technol. Biotechnol.* 1998. Vol. 36. P. 19–26. (IF – **0.42**). (Здобувач брав участь у проведенні окремих експериментів та підготовці публікації).

Сумарний IF(19 міжнародних публікацій) = 66.92

Розділи в монографіях:

1. **Stasyk O.V.** Methylotrophic yeasts as producers of recombinant proteins. *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi* : monograph / Ed. A. A. Sibirny. Springer International Publishing AG, 2017. P. 325–350. DOI 10.1007/978-3-319-58829-2. (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи та підготував публікацію).

Патенти:

1. Abbas C., Sibirny A. A., Voronovsky A. Y., **Stasyk O. V.**, Ishchuk O. P., Ryabova O. B. Increased Ethanol Production from Xylose: Patent #US 8071298 USA. N 20080254524; filed at April 16, 2008; published at October 16, 2008. (Здобувач взяв участь у виконанні частини досліджень та підготовці публікації).

2. Красовська О. С., **Стасик О. В.**, Сибірний А. А. Спосіб одержання поверхневого антигена вірусу гепатита В за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією: Пат. 73449 Україна. № 201202616; заявл. 05.03.2012; опубл. 25.09.2012, Бюл. № 18. 7 с. (Здобувач спільно із науковим консультантом сформулював ідею цієї роботи, взяв участь у проведенні досліджень та аналізі отриманих даних, та оформленні публікації).

Основні тези доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації

1. Stasyk O. G., Sibirny A. A., **Stasyk O. V.** Glucose signaling in the methylotrophic yeasts. *Advances in Microbiology and Biotechnology : Book of Abstracts of International Conference* (Lviv, October 29–31, 2018). Lviv, 2018. P. 16.
2. Stasyk O. G., **Stasyk O. V.** *Hansenula (Ogataea) polymorpha* hexose transporter Gcr1 is a non-conventional glucose receptor. *7th International Weigl Conference : Book of Abstracts* (Lviv, September 26–29, 2017). Lviv, 2017. P. 16.
3. Stasyk O. G., Denega I. O., Klymyshyn N. I., Sybirna N. O., **Stasyk O. V.** Single amino acid substitution converts unique yeast transporter-like glucose sensor HpGcr1 into a constitutively signalling form. *International symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology : Abstract Book* (Yalta, May 16–20, 2012), Yalta, 2012. P. 15.
4. Bolotin-Fukuhara M., Petryk N., Sybirna K., Mucchielli M., Budin K., Fairhead C., **Stasyk O.**, Sibirny A. Carbon metabolism diversity in yeasts: functional evolution of the HAP4 transcriptional regulator. *Non-conventional Yeasts in the Postgenomic Era : Abstract Book of International Symposium* (Lviv, September 11–14, 2011). Lviv, 2011. P. 4.
5. Kurylenko O., Krasovska O., Dmytruk K., **Stasyk O.**, Sibirny A. The role of the peroxisomal enzymes dihydroxyacetone synthase and transaldolase in xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Non-conventional Yeasts in the Postgenomic Era : Abstract Book of International Symposium* (Lviv, September 11–14, 2011). Lviv, 2011. P. 39.
6. Nazarko V. Y., Nazarko T. Y., **Stasyk O. V.**, Warnecke D., Ulaszewski S., Cregg J. M., Subramani S., Sibirny A. A. The novel microautophagy-related genes *ATG32* and *ATG33* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: identification and characterization. *12-th International Congress on Yeasts : Book of Abstracts* (Kyiv, August 11–15, 2008). Kyiv, 2008. P. 213.
7. Krasovska O. S., Stasyk O. G., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A. Development of expression system for production of recombinant proteins based on the mutant strains of *Hansenula polymorpha*. *12-th International Congress on Yeasts : Book of Abstracts* (Kyiv, August 11–15, 2008). Kyiv, 2008. P. 253.
8. **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Maidan M. M., van Zutphen T., van Dijk P., Veenhuis M., Thevelein J. M., Sibirny A. A. Hexose sensing for catabolite regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *12-th International Congress on Yeasts : Book of Abstracts* (Kyiv, August 11–15, 2008). Kyiv, 2008. P. 162.
9. Krasovska O. S., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A. Construction of efficient producer of hepatitis B surface antigen in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Microbiology in the XXI century : Proceedings of 2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference* (Warsaw, September 24–26, 2007). Warsaw, 2007. P. 69–73.
10. Nazarko V. Y., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A. Genetic control of selective autophagic peroxisome degradation (pexophagy) in yeasts. *Microbiology in the XXI century : Proceedings of 2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference* (Warsaw, September 24–26, 2007). Warsaw, 2007. P. 81-86.

11. **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Sibirny A. A. Catabolite repression and peroxisome homeostasis in *Hansenula polymorpha*. *4-th Hansenula polymorpha worldwide network conference* : Proceedings (Haren, September 3–5, 2006). Haren, 2006. L. 9.
12. **Stasyk O. V.**, Stasyk O. G., Krasovska O. S., Cregg J., Sibirny A. A. Sterol glucosyltransferase is required for peroxisome autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology* : Book of Abstracts (Lviv, April 25–28, 2004). Lviv, 2004. P. 333.
13. Stasyk O. G., **Stasyk O. V.**, Nazarko V., Cregg J., Sibirny A. Pdg2 is a unique coil-coiled protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology* : Book of Abstracts (Lviv, April 25–28, 2004). Lviv, 2004. P. 321.
14. **Stasyk O. V.**, Subramani S., Cregg J. M., Sibirny A. A. *Pichia pastoris pdg1* gene is involved in both peroxisome biogenesis and autophagic peroxisome degradation processes. *First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology* : Book of Abstracts (Lviv, April 25–28, 2004). Lviv, 2004. P. 323.
15. Nazarko V., Nazarko T., **Stasyk O.**, Veenhuis M., Sibirny A. Intragenic mutations in *Hansenula polymorpha PEX6* gene: the effect on methylotrophic growth and peroxisome biogenesis. *First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology* : Book of Abstracts (Lviv, April 25–28, 2004). Lviv, 2004. P. 328.

АНОТАЦІЯ

Стасюк О.В. «Молекулярні механізми вуглецевої катаболітної регуляції та гомеостазу пероксисом у метилотрофних дріжджів». На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2019.

Дисертаційна робота присвячена ідентифікації нових молекулярних компонентів механізмів глюкозної катаболітної регуляції та селективної пексофагії на моделі метилотрофних дріжджів.

Встановлено, що сигналізування глюкози у механізмі транскрипційної індукції у *H. polymorpha* опосередковується нетранспортуючим сенсором Hxs1, а механізм катаболітної репресії залежить від ефективності транспорту глюкози та потенційого трансцептора Gcr1. Аналоги транскрипційних факторів головного шляху репресії у *S. cerevisiae*, Mig1, Mig2 та Tup1, не є компонентами механізму глюкозної репресії у *H. polymorpha*, але є необхідними для фізіологічної регуляції типу пексофагії.

Розроблено ефективний метод клонування *ATG* генів пексофагії. Встановлено, що функція продукту гену *ATG26* – ергостеролглюкозилтрансферази, є селективно необхідною для пексофагії, але не загальної автофагії, і є консервативною у метилотрофів. Також показано, що продукт гену *ATG28* є одним із специфічних компонентів автофагійного апарату, відповідальних за селективне розпізнавання пероксисом. Новий білок пероксисомних мембран, Pex36, є необхідним для процесів як біогенезу, так і деградації пероксисом у *P. pastoris* та *H. polymorpha*. Також встановлено консервативну роль компонента вакуолярного сортиру білків Vps15 у автофагійних процесах.

Розроблена нова платформа для мультикопійної інтеграції векторів у геном *H. polymorpha* на основі маркерів селекції *ADE1* та *FLD1*. Базуючись на мутантних штаммах з пошкодженою глюкозною репресією, були сконструйовані ефективні продуценти ряду білків медичного та біотехнологічного значення.

Ключові слова: метилотрофні дріжджі, катаболітна регуляція, пероксисоми, автофагія, рекомбінантні білки.

АННОТАЦИЯ

Стасык О.В. «Молекулярные механизмы углеродной катаболитной регуляции и гомеостаза пероксисом у метилотрофных дрожжей». На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук за специальностью 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Институт биологии клетки НАН Украины, Львов, 2019.

Диссертационная работа посвящена идентификации новых молекулярных компонентов механизмов глюкозной катаболитной регуляции и селективной деградации пероксисом на модели метилотрофных дрожжей.

Установлено, что у *H. polymorpha* сигнализирование глюкозы в механизме транскрипционной индукции опосредовано нетранспортирующим сенсором Hxs1, а механизм катаболитной репрессии зависит от эффективности транспорта глюкозы и потенциального трансцептора Gcr1. Аналоги транскрипционных факторов главного пути репрессии у *S. cerevisiae*, Mig1, Mig2 и Tup1 не являются компонентами механизма глюкозной репрессии у *H. polymorpha*, но необходимы для физиологической регуляции типа пексофагии.

Разработан эффективный метод клонирования *ATG* генов пексофагии. Установлено, что функция продукта гена *ATG26* –эргостеролглюкозилтрансферазы, является селективно необходимой для пексофагии, но не общей автофагии, и консервативной у метилотрофов. Также показано, что продукт гена *ATG28* является одним из специфических компонентов автофагического аппарата, ответственным за селективное распознавание пероксисом. Новый белок пероксисомных мембран, Pex36, необходим для процессов как биогенеза, так и деградации пероксисом у *P. pastoris* и *H. polymorpha*. Также была установлена консервативная роль компонента вакуолярного сортирования белков Vps15 в автофагических процессах.

Разработана новая платформа для мультикопійної інтеграції векторів в геном *H. polymorpha* на основі маркерів селекції *ADE1* та *FLD1*. Базируясь на мутантних штаммах с поврежденной глюкозной репрессией, были сконструированы эффективные продуценты ряда белков медицинского и биотехнологического значения.

Ключевые слова: метилотрофные дрожжи, катаболитная регуляция, пероксисомы, автофагия, рекомбинантные белки.

SUMMARY

Stasyk O.V. «Molecular mechanisms of carbon catabolite regulation and peroxisome homeostasis in methylotrophic yeasts». – Manuscript.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology (specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology). – Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2019.

The main topic of this dissertation work concerns elucidating molecular components involved in regulation of peroxisome biogenesis and autophagic degradation, signaling mechanisms that maintain their homeostasis, sensing of hexose compounds and related catabolite regulation. Yeasts are convenient eukaryotic models for such cell biology research. It is of a significant fundamental and practical interest as some aspects of the obtained knowledge can be translated to human health and various biotechnological processes.

Methylotrophic yeasts have a number of advantages for studies on catabolite regulation. Like most other so-called «non-conventional yeasts», they are obligatory aerobes whose signaling mechanisms are not adapted to fermentative growth. Synthesis of peroxisomal and cytosolic enzymes of methanol utilization as well as peroxisome proliferation are induced by methanol but is strictly repressed by sugars and ethanol, – effector molecules that rely on distinct catabolic pathways. Catabolite inactivation of peroxisomal enzymes by glucose or ethanol involves degradation of organelles in vacuoles via pexophagy. Signaling and structural mechanisms providing selectivity for autophagy, pexophagy in particular, still remain not fully elucidated.

We demonstrated that glucose signaling in the mechanism of transcriptional induction of glucose transporters in *H. polymorpha* is mediated by a non-transporting sensor Hxs1 (Hexose sensor), whereas the signaling for transcriptional repression in *H. polymorpha* is rather «non-conventional» and depends on glucose transport and on the unique to this species protein Gcr1 (Glucose catabolite repression), – a potential transceptor (transporting receptor), which also possesses a regulatory function in the absence of glucose. It has also been established that putative homologs of transcriptional factors of the main repression pathway in *S. cerevisiae*: Mig1, Mig2 and Tup1, are not the essential components of glucose repression mechanism in *H. polymorpha*. It was also observed that Gcr1 and Hxs1 do not directly participate in the signaling for pexophagy. However, the *MIG1*, *MIG2* and *TUP1* gene products are necessary for the physiological regulation of the autophagy type in response to exogenous stimuli. Based on the *H. polymorpha* mutants with aberrant glucose regulation and developed new approaches for multicopy vector integration, producers of a number of recombinant proteins of medical and biotechnological significance have been constructed. The proposed modified expression platform relies only on sugar substrates for regulation of recombinant protein production.

Another goal was to identify new genetic elements controlling pexophagy, paying main attention on those not involved in general autophagy. A collection of *P. pastoris* pexophagy-deficient mutants has been isolated and a positive selection method for the cloning of the affected genes by functional complementation elaborated. By functional analysis of mutants in several newly identified pexophagy genes in *P. pastoris* and

H. polymorpha it has been established that function of the product of the *ATG26* gene – ergosterolglucosyl transferase, is selectively required only for pexophagy, but not for the general autophagy, and is conserved in these two methylotrophs. It was also found that the product of the *P. pastoris ATG28* gene is one of the components of the autophagic apparatus responsible for selective recognition of peroxisomes. A novel peroxisome membrane protein Pex36 has been identified as necessary for both peroxisome biogenesis and degradation in *P. pastoris* and *H. polymorpha*.

Our data highlight the importance of comparative studies on signaling mechanisms in different yeast species from the point of view of both, fundamental science and biotechnological applications.

Key words: methylotrophic yeasts, catabolite regulation, peroxisomes, autophagy, recombinant proteins.

Підписано до друку 30.05.2019. Формат 60х90/16
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк на різнографі.
Ук. Друк. Арк. 1,85. Наклад 100 прим. Замовлення №

Друкарня ПП «Арк-сервіс»
м. Львів, вул. Драгоманова 16, к.3. Тел.: (032) 261-13-80