

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УДК 577.214:582.282.23:576.311.34

СТАСИК ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О.В. Стасик

Науковий консультант: Сибірний Андрій Андрійович, академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор

Львів-2019

АНОТАЦІЯ

Стасик 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.

Провідною темою дисертаційної роботи є дослідження в галузі клітинної біології органел, сигнальних механізмів підтримання їх гомеостазу, регуляції біогенезу та деградації пероксисом, механізмів сенсингу гексоз та спорідненої катаболітної регуляції.

Дріжджі є зручним модельним еукаріотичним об'єктом для таких клітинно-біологічних досліджень. Відповідні дослідження становлять значний фундаментальний інтерес, оскільки отримані знання часто можуть бути перенесені на багатоклітинні організми, включаючи людину. Вони також мають прикладне значення для більш ефективного використання дріжджів у біотехнологічних процесах, зокрема у виробництві гетерологічних білків під контролем регульованих глюкозою промоторів генів.

Найбільш відомим прикладом катаболітної регуляції, що індукується таким ростовим субстратом як глюкоза, є «катаболітна репресія», один із основних механізмів транскрипційної регуляції експресії генів у дріжджів. Іншим важливим механізмом є «катаболітна інактивація», – механізм регуляції ензиматичних активностей, що діє на посттрансляційному рівні. У середовищі, що містить суміш карбонових ростових субстратів, ці два регуляторні механізми забезпечують селективну утилізацію клітинами дріжджів більш енергетично вигідного, так званого «фаворитного» субстрату, який підтримує відносно вищу швидкість росту. Обидва регуляторних механізми є тісно взаємопов'язаними, оскільки регулюють поєднані об'єкти впливу, та є індукованими тими ж субстратами-ефекторами. У той же час, вони мають відмінні молекулярні механізми, багато з компонентів яких залишаються не цілком вивченими. У випадку катаболітної чи транскрипційної репресії, це стосується природи білків-сенсорів та механізму

перших етапів сигналювання від молекули-ефектора, наприклад глюкози, до промоторів репресибельних генів.

Одним із обмежень сучасного знання щодо механізмів транскрипційної регуляції у дріжджів є той факт, що воно переважно засноване на вивченні вузького кола модельних об'єктів, або лише одного об'єкта – пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Основними мішенями механізму глюкозної репресії у *S. cerevisiae* є ферменти глюконеогенезу, гліоксилатного циклу, мітохондріальні ферменти окисного фосфорилування, а також інші білки, задіяні у транспорті та катаболізмі альтернативних карбонових субстратів, таких як галактоза, мальтоза чи етанол. У метилотрофних дріжджів, синтез пероксисомних та цитозольних ферментів утилізації метанолу індукується цим субстратом і репресується глюкозою, іншими цукрами та етанолом. Індукований глюкозою чи етанолом процес катаболітної інактивації пероксисомних ферментів у метилотрофів полягає в автофагійній деградації пероксисом у вакуолях, або «пексофагії».

Автофагійна деградація білків та органел є одним із ключових регуляторних механізмів підтримання клітинного гомеостазу та реутилізації клітинних компонентів. Лише нещодавно було встановлено, що автофагійні механізми є важливими для програмованої смерті клітини, імунної відповіді на патогени, відповідь на різні типи стресу (напр. оксидативний, дефіцит ростових та поживних факторів), канцерогенезу, морфогенезу та старіння клітин. Автофагійні процеси активно досліджувались на різноманітних об'єктах, але одним із основних були одноклітинні еукаріоти дріжджі. Виявилось, що багато компонентів автофагійних шляхів та пов'язаних сигнальних механізмів (багато з яких були вперше ідентифіковані у дріжджів) є консервативними у вищих еукаріотів, такі як ATG білкові комплекси, mTOR, PI3K-I, GTP-ази та інш. Автофагійні механізми можуть бути як неселективними, так і специфічними щодо певних мішеней. Сигнальні та структурні механізми, що забезпечують таку селективність залишались або невідомими на момент, коли була розпочата дана робота, або залишаються недостатньо дослідженими і понині.

Метилотрофні дріжджі мають ряд специфічних переваг як модельні об'єкти для досліджень механізмів катаболітної регуляції. Перш за все, метилотрофи, як і більшість інших так-званих «неконвенційних дріжджів», є конвенційними obligatними аеробами, сигнальні механізми яких не є специфічно адаптованими до анаеробного метаболізму та аеробної ферментації цукрів, що має місце у випадку пекарських дріжджів. Регуляторні механізми метилотрофів можуть досліджуватись як на рівні індивідуальних генів та ензимів, так і морфологічно на рівні органел пероксисом, які підлягають масивній надпродукції при метилотрофному рості, але стають надлишковими при утилізації більшості інших джерел Карбону. Таким чином, синтез та деградація пероксисом можуть ефективно контролюватись і маніпулюватись через присутність певних джерел карбону. Такі субстрати ефектори і репресори як глюкоза та етанол обидвоє викликають катаболітну репресію та інактивацію, але, одночасно, їх утилізація є залежною від суттєво відмінних катаболічних апаратів. Розуміння особливостей задіяних молекулярних регуляторних механізмів у різних модельних дріжджів становить значний фундаментальний інтерес для клітинної біології.

Об'єктами даної роботи є філогенетично-споріднені метилотрофні дріжджі *Hansenula (Ogataea) polymorpha* та *Pichia (Komagataella) pastoris* (традиційні (перші) видові назви використовуються у роботі, оскільки були використані у більшості оригінальних публікацій здобувача). Обидва організми також мають важливе біотехнологічне значення, наприклад для продукції гетерологічних білків медичного значення. Для обидвох видів існують добре розроблені методи класичної та молекулярної генетики, а також повні послідовності їх геномів є відомими та публічно доступними. На додаток, *P. pastoris* є також унікальним видом, оскільки у нього існують два морфологічно-відмінні типи селективної автофагійної деградації пероксисом, – мікро- та макропексофагії, що можуть викликатись додаванням карбонових субстратів-ефекторів, глюкози та етанолу відповідно. Це, у свою чергу, надає можливість генетичної диссекції відповідних механізмів, поряд із процесом загальної неселективної автофагії.

Ідентифікація та функціональний аналіз молекулярних компонентів механізмів катаболітної регуляції, зокрема сигнальних механізмів глюкозної репресії та ролі компонентів системи транспорту гексоз у транскрипційній регуляції, а також ідентифікація компонентів механізму селективної пексофагії, були основними завданнями даної дисертаційної роботи.

У результаті виконаної експериментальної роботи було встановлено, що сигналювання глюкози у механізмі транскрипційної індукції транспортерів гексоз у *H. polymorpha* опосередковується нетранспортуючим сенсором Hxs1 (Hexose sensor), тоді як сигнальний механізм транскрипційної репресії у *H. polymorpha* «неконвенційним» та залежить від транспорту глюкози та унікального для цього виду білка Gcr1 (Glucose catabolite repression), – потенційного транспортуючого рецептора (трансцептора), який має регуляторну функцію також за відсутності глюкози. Також встановлено, що аналоги відомих елементів головного шляху репресії у *S. cerevisiae*, транскрипційні фактори Mig1, Mig2 та Tup1 не є ключовими компонентами механізму глюкозної репресії пероксисомних ферментів у *H. polymorpha*. Показано, що рецептори Gcr1 та Hxs1 не беруть безпосередньої участі у сигнальному механізмі катаболітної інактивації, – селективній деградації пероксисом. Однак, продукти генів *MIG1*, *MIG2* та *TUP1* є необхідними для фізіологічної регуляції типів автофагії у відповідь на різні екзогенні стимули.

Наступною метою роботи була ідентифікація елементів генетичного контролю автофагійної деградації у метилотрофних дріжджів, звертаючи головну увагу на гени, специфічні для селективної пексофагії, що не задіяні і механізмі загальної автофагії. У результаті встановлено, що гомолог білка Vps15 *S. cerevisiae* та P150 *Homo sapiens*, який регулює транспорт вакуолярних ензимів у цих організмів, є необхідним для пексофагії та загальної автофагії у *P. pastoris*. Була запропонована гіпотеза про консервативну роль комплексу Vps15/Vps34 протеїнкіназ у формуванні мембранних везикулярних структур, асоційованих із автофагійними процесами у еукаріотів.

Було розроблено оригінальний метод позитивної селекції на основі алілового спирту як селективного агента з метою клонування *PDG* (*P*eroxisome *D*e*G*radation) генів, задіяних у пексофагії у метилотрофних дроїжджів. За допомогою функціонального аналізу мутантів по ідентифікованих генах у *P. pastoris* та *H. polymorpha*, встановлено, що функція відповідних білків, напр. продукту гену *ATG26* – ферменту ергостеролглюкозилтрансферази, є селективно необхідною для пексофагії, але не загальної автофагії, і є консервативною у метилотрофів. Також показано, що продукт гену *P. pastoris ATG28* є одним із компонентів автофагійного апарату, що є відповідальним за селективне розпізнавання пероксисом. Одним із сайтів комплексної внутрішньоклітинної локалізації цього білка є так звана «перивакуолярна структура (PVS)», функціональне значення якої потребує подальшого вивчення. Новий білок пероксисомних мембран, Pdg1, був ідентифікований як необхідний для обох процесів біогенезу та деградації пероксисом у *P. pastoris* та *H. polymorpha*. На моделі Pdg1 було встановлено феномен селективної ексцизиї пероксину з мембран органел і його рециклізації у процесі пексофагії.

Було проведено дослідження з метою вдасконалити платформу експресії власних та рекомбінантних білків, зокрема на основі регульованих карбоновими субстратами промоторів, використовуючи мутанти з пошкодженою глюкозною регуляцією. У результаті, була розроблена нова система для мультикопійної інтеграції векторів у геном *H. polymorpha*, що базується на нових маркерах селекції, гетерологічному *ADE1* та власному *FLD1*, і яка не залежить від маркерів резистентності до антибіотиків. Базуючись на мутантних штаммах *H. polymorpha*, були сконструйовані продуценти власних та рекомбінантних білків медичного та біотехнологічного значення (алкогольоксидази, глюкозооксидази, проінсуліну людини, HBsAg). Така модифікована платформа експресії не вимагає легкозаймистого метанолу для індукції ферментації та може мати переваги над традиційною для певних біотехнологічних застосувань.

У підсумку, декілька нових генів, задіяних у механізмах катаболітної регуляції та транспорту гексоз, біогенезу та деградації пероксисом у

метилотрофних дріжджів *P. pastoris* (*VPS15*, *PDG1/PEX36*, *PDG2/ATG28*, *PDG3/ATG26*) та *H. polymorpha* (*HXS1*, *HXT1*, *MIG1*, *MIG2*, *HAP4*, *ATG26*, *PEX36*) були ідентифіковані і охарактеризовані. За допомогою генетичного, біохімічного та структурного аналізу виділених та сконструйованих мутантів по відповідних генах, функція відповідних білкових продуктів у механізмах катаболітної регуляції була встановлена або запропонована.

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

ANNOTATION

***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 is research in the field of cellular biology of organelles, signaling mechanisms that maintain their homeostasis, regulation of peroxisome biogenesis and autophagic degradation, sensing of hexose compounds and related catabolite regulation.

Yeasts are convenient eukaryotic model objects for such cell biology research. It is of a significant fundamental interest as the obtained knowledge can be often translated to multicellular organisms including humans. It is also of an applied value for more efficient application of yeasts in biotechnological processes, in particular in the production of heterologous proteins controlled by regulated by glucose gene promoters.

The most well known examples of catabolite regulation induced by such favorite growth-promoting carbon substrates as glucose are “catabolite repression”, one of the main mechanisms for regulating the expression of genes in yeasts, and “catabolite inactivation”, a mechanism for regulation of enzymatic activities acting on the protein level. In a medium containing a mixture of carbon substrates, these two regulatory mechanisms provide a selective utilization by the yeast cells of the more energy-

efficient or “preferential substrate”, which supports a relatively higher growth rate. Both regulatory routes are closely interconnected and coordinated as they relate to common objects of influence and are induced by the same effector substrates. At the same time, they have dissimilar molecular mechanisms many components of which are still not fully elucidated. In the case of catabolite or transcriptional repression, this is particularly true about the nature of the protein-sensors and the mechanism of the first stages of signaling from the effector molecule, for example glucose, to the promoters of the repressible genes.

One of the limitations of the current knowledge on the mechanisms of transcriptional regulation in yeasts is that it is predominantly based on the studies of a narrow circle of objects, or just a single organism – baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The main targets for glucose repression in *S. cerevisiae* are enzymes of gluconeogenesis, glyoxylate cycle, mitochondrial enzymes of oxidative phosphorylation, as well as other proteins involved in transport and catabolism of alternative carbon substrates such as galactose, maltose or ethanol. In the methylotrophic yeasts, the synthesis of peroxisomal and cytosolic enzymes of methanol utilization is induced by methanol and repressed with glucose, other sugars and ethanol. The processes of catabolite inactivation of peroxisomal enzymes in methylotrophs evoked by glucose or ethanol involves autophagic degradation of peroxisomes in vacuoles, or pexophagy.

Autophagic degradation of proteins and organelles is one of the key regulatory mechanisms for maintaining cellular homeostasis and reutilization of cellular components. Only recently it has been established that autophagic mechanisms are important for processes of programmed cell death, immune response to pathogens, responses to various types of stresses (e.g., oxidative, nutrient or growth factors limitations etc.), carcinogenesis, morphogenesis and cell longevity regulation. Autophagic processes have been actively investigated on a variety of models, but one of the main is unicellular eukaryotes yeasts. It turned out that many of the components of autophagic pathways and signaling mechanisms involved (many of which were first established on the yeast models) are conserved also in higher eukaryotes, such as ATG

protein complexes, mTOR, PI3K-I, GTPases and others. Autophagic mechanisms can be both non-selective and specific to particular targets. Signaling and structural mechanisms providing such selectivity remained either unknown at the time this dissertation work had been initiated or remain not fully elucidated till now.

Methylotrophic yeasts have a number of specific advantages as model objects for investigating mechanisms of catabolite regulation. First of all, methylotrophic yeasts, like most other so-called «non-conventional yeasts», are actually conventional obligatory aerobes whose signaling mechanisms are not specifically adapted to anaerobic metabolism and aerobic fermentation of sugars, as is the case in baker's yeast. Regulatory mechanisms in methylotrophs can be studied at the levels of individual genes or enzymes and morphologically at the level of whole organelles peroxisomes, which are massively overproduced under methylotrophic growth, and which are dispensable for utilization of most of the carbon sources. Therefore, peroxisome synthesis and degradation can be easily controlled and manipulated by availability of certain carbon substrates. Such repressor or effector substrates as glucose and ethanol both trigger catabolite repression and inactivation but simultaneously their utilization relies on a very distinct catabolism. Understanding peculiarities of the involved molecular regulatory mechanisms in different model yeasts is of a significant fundamental interest in cell biology.

The objects of this research are phylogenetically related methylotrophic yeasts *Hansenula (Ogataea) polymorpha* and *Pichia (Komagataella) pastoris* (traditional species names are used throughout the study as they were used in most of the author's original publications). Both organisms also have an important biotechnological value, for example, for the production of heterologous proteins for medicine. For both of them, well-developed methods of classical and molecular genetics were established, complete sequences of their genomes are also known and publicly available. In addition, *P. pastoris* is also unique with respect of molecular mechanisms of selective autophagic degradation of peroxisomes (pexophagy), since in this species two morphologically different mechanisms of micro- and macropexophagy are observed, which can be induced by distinct carbon substrate effectors, glucose and ethanol, respectively. This in

turn provides an opportunity to genetically dissect the involved mechanisms and also the process of general nonselective autophagy.

Identification and functional analysis of the molecular components of catabolite regulation, in particular the signaling mechanisms of glucose repression and the role of hexose transport components in transcriptional regulation, as well as identification of the components of selective pexophagic mechanism, were the main tasks of this work.

As the result of experimental work it was demonstrated that glucose signaling in the mechanism of transcriptional induction of glucose transport in *H. polymorpha* is mediated by a non-transporting sensor Hxs1 (Hexose sensor), whereas the signaling mechanism of transcriptional repression in *H. polymorpha* is «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 analogs of the known elements of the main repression pathway in *S. cerevisiae*: transcriptional factors Mig1, Mig2 and Tup1 are not key components of the mechanism of glucose repression of peroxisomal enzymes in *H. polymorpha*. It was also observed that Gcr1 and Hxs1 do not directly participate in the signaling mechanism of catabolite inactivation (selective degradation of peroxisomes). However, the *MIG1*, *MIG2* and *TUP1* gene products are necessary for the physiological regulation of the autophagy type in response to various exogenous stimuli.

Our next goal was to identify elements of the genetic control of autophagic degradation in the methylotrophic yeasts, paying main attention at selective pexophagy specific components which are not involved in general autophagy. As a result, it has been shown for the first time that the homologue of the Vps15 protein of *S. cerevisiae* and P150 of *Homo sapiens*, which regulate the transport of vacuolar enzymes in these organisms, is involved in pexophagy and general autophagy in *P. pastoris*. The hypothesis about the conserved role of the protein complex of Vps15/Vps34 kinases in the formation of membraneous vesicular structures associated with autophagic processes in eukaryotes has been proposed.

An original positive selection method was elaborated for the cloning of the *PDG* (Peroxisome DeGradation) genes required for pexophagy in methylotrophic yeasts by functional complementation using allyl alcohol as a selective agent.

By isolation and functional analysis of mutants in the identified pexophagy genes in *P. pastoris* and *H. pylomorpha*, it has been established that the function of the respective proteins, e.g., product of the *PDG3/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 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. One of the sites of its complex intracellular localization is the structure called PVS – perivacuolar structure, with yet an unidentified function. A novel peroxisome membrane protein Pdg1 has been identified that is necessary for both biogenesis and degradation of these organelles in *P. pastoris* and *H. polymorpha*. On the Pdg1 model, the phenomenon of selective peroxine excision from the peroxisomal membranes and its recycling in the course of pexophagy was observed.

In addition, we aimed to improve the system for expression of own and heterologous proteins, in particular based on the regulated by carbon substrates gene promoters, in the mutant yeast strains with affected glucose regulation. As a result of this work a system for multicopy integration of vectors into *H. pylomorpha* genome based on new marker genes (heterologous *ADE1* and native *FLD1*) which does not use markers of resistance to toxic antibiotics has been developed. Based on *H. pylomorpha* mutants with aberrant catabolite regulation, producers of a number of yeast own and heterologous proteins of medical and biotechnological significance (alcohol oxidase, HBsAg, human proinsulin, glucose oxidase etc.) have been constructed. Such a modified expression platform does not require inflammable methanol for the induction of fermentation and may be preferable over traditional for some biotechnological applications.

In summary, several new genes involved in the mechanisms of catabolite regulation, peroxisome biogenesis and degradation in the methylotrophic yeasts

P. pastoris (*VPS15*, *PDG1 PEX36*, *PDG2/ATG28*, *PDG3/ATG26*) and *H. polymorpha* (*HXS1*, *HXT1*, *MIG1*, *MIG2*, *HAP4*, *ATG26*, *PEX36*) have been identified and characterized. By genetic, biochemical and structural analysis of the isolated and constructed mutants with impaired respective genes, the functions of the protein products of these genes in different mechanisms of catabolite regulation were established or proposed.

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 HprGcr1 і HprHxs1 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 підготовці 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., Sybirny 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 *peх6* 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	27
ВСТУП	29
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	36
1.1. Сенсинг глюкози та глюкозна регуляція у дріжджів	36
1.1.1. Механізми глюкозної регуляції у <i>S. cerevisiae</i> та їх фізіологічна важливість	36
1.1.1.1 Шлях опосередкований нетранспортуючими рецепторами глюкози Snf3/Rgt2- і регуляція <i>HXT</i> генів у <i>S. cerevisiae</i>	37
1.1.1.2. Mig1-Hxk2 шлях глюкозної репресії та Snf1 кінза	41
1.1.1.3. Сигнальний шлях cAMP/РКА <i>S. cerevisiae</i> та функції Grp1 та Ras1/2	47
1.1.1.4. Взаємозв'язок та координація сигнальних шляхів глюкози	49
1.1.2. Глюкозна регуляція у метилотрофних дріжджів	53
<i>Pichia (Komagataella) pastoris</i>	54
<i>Hansenula (Ogataea) polymorpha</i>	57
1.2. Пероксисоми і механізми їх біогенезу	61
1.2.1. Загальна інформація про пероксисоми	61
1.2.2. Еволюційне походження пероксисом	64
1.2.3. Фізіологічні функції пероксисом дріжджів	65
1.2.4. Імпорт пероксисомних білків і біогенез пероксисом у дріжджів	67
1.3. Молекулярний механізм автофагії і її селективної форми – пексофагії	70
1.3.1. Загальна інформація про автофагію	70
1.3.2. Фізіологічні функції пексофагії у дріжджів	72
1.3.3. Морфологічні типи пексофагії – мікро- та макропексофагія	75
1.3.4. Молекулярний механізм пексофагії у дріжджів	77
1.3.4.1. Специфічні фактори макро- та мікропексофагії	77
1.3.4.2. Молекулярні механізми трансдукції сигналу при пексофагії	79
1.3.4.2.1. Розпізнавання глюкози при пексофагії	79

1.3.4.2.2. MAP кіназне сигналювання в пексофагії	81
1.3.4.3. Молекулярні механізми формування PAS та інших пексофагійних мембранних структур.....	82
1.3.4.4. Адаптерні білки залучені до пексофагії	83
1.3.4.5. Взаємозв'язки між молекулярними механізмами деградації пероксисом та динамікою вакуолей при формуванні автофагійних мембран.....	85
1.4. Метилотрофні дріжджі як об'єкти фундаментальних і прикладних досліджень	87
1.4.1. Філогенез метилотрофних дріжджів.....	87
1.4.2. Метилотрофні дріжджі як експериментальні моделі	90
1.4.3. <i>H. polymorpha</i> як платформа для експресії рекомбінантних білків	93
<i>Штами, використані для експресії гетерологічних білків</i>	95
<i>вектори H. polymorpha</i>	95
<i>Промотори генів для регулювання експресії рекомбінантних білків</i>	96
<i>Інші підходи та методи</i>	97
<i>Промислове, фармацевтичне та інші застосування H. polymorpha</i>	98
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	100
2.1. Матеріали досліджень	100
2.2. Штами мікроорганізмів	100
2.3. Вектори та праймери ПЛР.....	100
2.4. Поживні середовища.....	100
2.5. Біохімічні методи	101
2.5.1. Отримання безклітинних екстрактів.....	101
2.5.2. Визначення активностей ферментів.....	102
2.5.3. Аналіз транспорту глюкози/фруктози	102
2.5.4. Електрофорез білків в ПААГ та імуноблот-аналіз.....	104
2.6. Основні молекулярно-генетичні методи	104
2.6.1. Мутагенез.....	104
2.6.2. Трансформація дріжджів <i>H. polymorpha</i> та бактерій <i>E. coli</i>	105

2.6.3. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів.....	106
2.6.4. Виділення сумарної РНК з клітин дріжджів.....	106
2.6.5. Виділення плазмідної ДНК з клітин <i>E. coli</i>	106
2.6.6. Конструювання векторів.....	107
2.6.7. Умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПЛР у режимі реального часу.....	108
2.7. Конструювання делеційних мутантів та інших рекомбінантних штамів.....	109
2.7.1. Конструювання мутанта <i>H. polymorpha</i> з делецією гена <i>HpHXS1</i>	109
2.7.2. Конструювання мутанта <i>H. polymorpha</i> з делецією гена <i>HpHXT1</i>	110
2.7.3. Конструювання штамів <i>H. polymorpha</i> з надекспресією <i>HpHXS1 HpHXT1</i> , та <i>HpGCR1</i> та мутованих форм відповідних білків.....	112
2.7.4. Конструювання мутантів з делеціями по генах <i>HpMIG1</i> та <i>HpMIG1</i>	116
2.7.5. Конструювання мутантів з делеціями по генах <i>HpHAP4-A</i> та <i>HpHAP4-B</i>	118
2.7.6. Клонування та конструювання мутанта з делецією гена <i>P. pastoris VPS15</i>	119
2.7.7. Конструювання штамів <i>P. pastoris</i> з флуоресцентно-міченими пероксисомами.....	121
2.7.8. Клонування та конструювання мутанта з делецією гена <i>P. pastoris ATG28</i>	123
2.7.9. Клонування та конструювання мутантів з делецією гомологів <i>ATG26 P. pastoris</i> та <i>H. polymorpha</i>	126
2.7.9.1. Ідентифікація та функціональний аналіз <i>ATG26 P. pastoris</i>	126
2.7.9.2. Ідентифікація та функціональний	

аналіз <i>ATG26 H. polymorpha</i>	127
2.7.10. Клонування та конструювання мутантів з делецією генів <i>PDG1/PEX36</i> у <i>P. pastoris</i> та <i>H. polymorpha</i>	128
2.7.10.1. Ідентифікація та функціональний аналіз <i>PDG1/PEX36 P. pastoris</i>	128
2.7.10.2. Ідентифікація та функціональний аналіз <i>PDG1 H. polymorpha</i>	129
2.7.11. Селекція та функціональний аналіз умовних мутантів <i>H. polymorpha</i> по гену <i>PEX6</i>	130
2.7.12. Конструювання продуцентів амінооксидази (АМО) <i>H. polymorpha</i>	131
2.8. Методи детекції АОХ та клонування <i>ATG</i> генів	131
2.8.1 Візуалізація активності АОХ у дріжджових колоніях при аналізі мутантних штамів	131
<i>Pichia pastoris</i>	133
<i>Hansenula polymorpha</i>	133
2.8.2. Позитивна селекція для клонування <i>ATG</i> генів з використанням алілового спирту як селективного агента	135
2.9. Програмне забезпечення для <i>in silico</i> аналізу	136
2.10. Статистичний аналіз експериментальних даних	136
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	137
3.1. Дослідження ролі компонентів системи транспорту глюкози в механізмах глюкозного сигналювання та катаболітної регуляції в <i>H. polymorpha</i>	137
3.1.1. Ідентифікація та аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів <i>HXS1</i> та <i>HXT1</i> та їх порівняння з базами даних	137
3.1.2. Конструювання штамів з делеціями у генах <i>HXS1</i> та <i>HXT1</i> , штаму <i>Δgcr1Δhxs1</i> з делеціями обох генів та аналіз їх фенотипів	143
3.1.3. Аналіз ефекту надекспресії генів <i>HXS1</i> , <i>GCR1</i>	

та <i>HXT1</i> у <i>S. cerevisiae hxt-null</i> мутанта, дефіцитного за транспортом гексоз.....	149
3.1.4. Аналіз ролі цитозольного С-кінцевого фрагмента білка Hxs1 у глюкозному сигналюванні.....	150
3.1.5. Конструювання специфічних мутантних форм <i>HXS1</i> та <i>GCR1</i> , які конститутивно передають «глюкозний сигнал»	151
3.1.6. Аналіз експресії гомологів гексозних транспортерів та генів-мішеней глюкозної регуляції у мутантів <i>H. polymorpha</i> , з пошкодженими гексозними транспортерами чи сенсорами.....	154
3.1.7. Вплив мутацій у гомологах транспортерів гексоз на пексофагію у <i>H. polymorpha</i>	156
3.1.8. Фенотипова характеристика потенційного трансцептора <i>H. polymorpha Gcr1</i>	157
3.1.8.1. <i>HpGCR1</i> може бути результатом як горизонтального трансферу гена з грибів, так і специфічного збереження архаїчного гена у геномі <i>H. polymorpha</i>	162
3.1.8.2. Конститутивна експресія <i>HpHXT1</i> у клітинах $\Delta gcr1$ відновлює глюкозну репресію	162
3.1.8.3. Продуктивність транспорту глюкози та сповільнення метилотрофного росту не є взаємопов'язаними у мутанта $\Delta gcr1$	163
3.1.8.4. <i>HpGcr1</i> внаслідок міслокалізації не відновлює ріст <i>hxt</i> -дефіцитного штаму <i>S. cerevisiae</i> на гексозах	163
3.1.8.5. Надекспресія <i>Gcr1</i> підвищує чутливість клітин <i>H. polymorpha</i> до екзогенної 2-дезоксиглюкози	167
3.1.9. Обговорення	168
3.1.10. Підсумки	178
3.2. Молекулярно-генетичний та функціональний аналіз потенційних гомологів транскрипційних факторів <i>Mig1</i> , <i>Mig2</i> і <i>Hap4</i> у <i>H. polymorpha</i>	180
3.2.1. Аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів	

генів <i>MIG1</i> і <i>MIG2</i> та порівняння з базами даних	181
3.2.2. Конструювання делеційних штамів у генах <i>MIG1</i> , <i>MIG2</i> , подвійного мутанта <i>mig1mig2</i> та аналіз їхніх фенотипів	183
3.2.3. Аналіз впливу мутацій <i>mig1</i> і <i>mig2</i> на механізми катаболітної регуляції у <i>H. polymorpha</i>	183
3.2.4. Конструювання делеційних штамів за генами <i>HAP4-A</i> , <i>HAP4-B</i> , подвійного делеційного мутанта та аналіз їхніх фенотипів.	187
3.2.5. Обговорення	193
3.2.6. Підсумки	196
3.3. Ідентифікація і аналіз молекулярних компонентів селективної деградації перекисом (пексофагії) у метилотрофних дріжджів	197
3.3.1. Клонування і функціональний аналіз гена <i>VPS15</i> дріжджів <i>P. pastoris</i> і його білкового продукту	198
3.3.2. Розробка системи з використанням зеленого флуоресцентного білка (GFP) як маркера для вивчення біогенезу та degradaції пероксисом.....	202
3.3.3. Розробка методів моніторингу активності алкогольоксидази (АОХ) та пексофагії на чашках Петрі та клонування <i>ATG</i> генів у метилотрофних дріжджів	206
3.3.3.1. Аналіз активності АОХ на чашках при відборі дріжджових мутантів з дефектною пексофагією або катаболітною репресією	207
<i>Pichia pastoris</i>	207
<i>Hansenula polymorpha</i>	208
3.3.3.2. Позитивна селекція для клонування <i>ATG</i> генів з використанням алілового спирту як селективного агента.....	209
3.3.4. Виділення колекції мутантів <i>P. pastoris</i> з пошкодженою пексофагією (<i>pdg</i>) та їх фенотиповий та генетичний аналіз	209
3.3.5. Клонування та функціональний аналіз генів <i>PDG2/ATG28</i> та <i>PDG3/ATG26</i> , задіяних у degradaції пероксисом.....	211

3.3.5.1. Молекулярне клонування гена <i>PDG2/ATG28</i> і фенотиповий аналіз <i>atg28</i> мутантів	212
3.3.5.1.1. Виділення і аналіз послідовності <i>ATG28</i> гена <i>P. pastoris</i>	212
3.3.5.1.2. Конструювання делеційного мутанта по гену <i>ATG28</i> та аналіз фенотипу <i>atg28</i> мутантів	213
3.3.5.1.3. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації <i>Atg28</i>	221
3.3.5.1.4. Ідентифікація нового білка <i>Atg35</i> як взаємодіючого партнера <i>Atg28</i> у <i>P. pastoris</i>	224
3.3.5.2. Молекулярне клонування гена <i>PDG3/ATG26</i> і фенотиповий аналіз <i>atg26</i> мутантів	227
3.3.5.2.1. Клонування та аналіз послідовності <i>ATG26</i> гена <i>P. pastoris</i>	228
3.3.5.2.2. Конструювання делеційного мутанта <i>pdg3/atg26</i> та фенотиповий аналіз <i>atg26</i> мутантів	228
3.3.5.3. Виділення і характеристика мутанта <i>H. polymorpha</i> , дефіцитного за гомологом <i>Atg26</i>	235
3.3.5.3.1. <i>In silico</i> аналіз амінокислотної послідовності <i>H. polymorpha Atg26</i>	235
3.3.5.3.2. Конструювання делеційного мутанта по <i>HrATG26</i> гену та аналіз його фенотипу	235
3.3.6. Селекція етанол-неутилізуючих мутантів <i>H. polymorpha</i> та аналіз процесів катаболітної регуляції	236
3.3.6.1. Виділення мутантів <i>H. polymorpha</i> , що не утилізують етанол	237
3.3.6.2. Аналіз фенотипу мутантів <i>H. polymorpha</i> , не здатних утилізувати етанол.....	238
3.3.7. Обговорення	240
3.3.8. Підсумки	249
3.4. Виділення та аналіз мутантів <i>P. pastoris</i> і <i>H. polymorpha</i>	

із порушеною регуляцією біогенезу та гомеостазу пероксисом	249
3.4.1. Молекулярне клонування гена <i>PDG1/PEX36 P. pastoris</i> і фенотиповий аналіз мутантів <i>pdg1/pex36</i>	249
3.4.1.1. Виділення УФ-індукованого <i>pdg1</i> мутанта <i>P. pastoris</i> і відповідного гена та його характеристика	249
3.4.1.2. Конструювання делеційного штаму <i>pdg1 P. pastoris</i> і його характеристика	253
3.4.1.3. Аналіз фізіологічних функцій Pdg1 та його внутрішньоклітинної локалізації	257
3.4.1.4. Ідентифікація і характеристика гомолога Pdg1 у <i>H. polymorpha</i>	267
3.4.1.5. Пошук функціональних гомологів PpPdg1 у неметилотрофних дріжджів	269
3.4.2. Виділення й аналіз умовних мутантів <i>H. polymorpha</i> , дефіцитних за біогенезом пероксисом	273
3.4.2.1. Виділення і характеристика холодочутливого мутанта <i>pex6 H. polymorpha</i>	273
3.4.2.2. Генетичний аналіз та ідентифікація <i>PEX6</i> мутацій	275
3.4.3. Обговорення	279
3.4.4. Підсумки	285
3.5. Біотехнологічне застосування мутантних штамів дріжджів з порушеннями глюкозної регуляції і гомеостазу пероксисом	286
3.5.1. Розробка системи мультикопійної інтеграції векторів у геном <i>H. polymorpha</i> на основі власних та гетерологічних генетичних маркерів	286
3.5.1.1. Клонування та використання біосинтетичного гена <i>ADE1 P. pastoris</i> як селективного маркера для мультикопійної інтеграції у <i>H. polymorpha</i>	287
3.5.1.2. Клонування та використання гена <i>FLD1</i> формальдегіддегідрогенази <i>H. polymorpha</i>	

як селективного маркера для мультикопійної трансформації.....	290
3.5.2. Використання нових методів мультикопійної інтеграції для конструювання поліпшених продуцентів амінооксидази (АМО) у <i>H. polymorpha</i>	291
3.5.3. Виділення надпродуцентів гетерологічних ферментів на основі мутантів <i>H. polymorpha</i> , дефектних за глюкозною регуляцією, та розробка нових методів мультикопійної інтеграції векторів.....	294
3.5.3.1. Характеризація мутантів <i>H. polymorpha</i> як штамів-господарів для продукції рекомбінантних білків.....	295
3.5.3.2. Секреторна експресія глюкозооксидази <i>A. niger</i> у дефектного за глюкозною репресією мутанта <i>H. polymorpha</i>	297
3.5.3.3. Експресія поверхневого антигена вірусу гепатиту В (HbsAg) у мутантного штаму ЕАО2	299
3.5.3.4. Продукція секретованого міні-проінсуліну людини (МРІ) в мутантів ЕАО.....	304
3.5.4. Конструювання стабільного надпродуцента HBsAg другого покоління в <i>H. polymorpha</i> за допомогою мультикопійної інтеграції і дефекту біогенезу пероксисом	308
3.5.4.1. Виділення покращеного продуцента HBsAg, шляхом поєднання двох методів селекції мультикопійних трансформантів.....	309
3.5.4.2. Вплив делеції гена <i>PEX3</i> на продуктивність синтезу HBsAg у штамів з дефектом глюкозної репресії	312
3.5.5. Обговорення результатів.....	317
3.5.6. Підсумки	322
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ	
РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	324
ВИСНОВКИ	343
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	345
ДОДАТКИ.....	400

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОХ	– алкогольоксидаза
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ДТТ	– дитіотрейтол
ЕДТА	– етилендіамінтетраацетат, динатрієва сіль
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
СБ	– середовище Беркгольдера
ТМ	– трансмембранні домени
т.п.н.	– тисяч пар нуклеотидів
ТХО	– трихлороцтова кислота
УФ	– ультрафіолет
ФБ	– фосфатний буфер
АВТС	– 2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонат)
АТG	– гени автофагії
АТP (АТФ)	– аденозин-трифосфат
2-DG	– 2-дезоксиглюкоза
Eth	– етанол
Fru	– фруктоза
HBsAg	– поверхневий антиген вірусу гепатиту В
GFP (YFP, RFP)	– зелений флуоресцентний білок та модифікації
Glc	– глюкоза
GOD	– глюкозооксидаза
G418	– генетицин
<i>HpGcr1</i>	– білок, продукт гену <i>HpGCR1</i>
<i>HXT</i>	– гени транспортерів гексоз
Man	– маноза
Mth	– метанол
OD	– оптична густина

ORF	– відкрита рамка трансляції
<i>pdg</i>	– мутанти з пошкодженою деградацією пероксисом
<i>PEX</i>	– гени біогенезу пероксисом
PKA	– протеїнкіназа А
<i>P_{MOX}</i>	– промотор гену алкогольоксидази, <i>HpMOX1</i>
PMSF	– фенілметансульфонілфторид
PTS	– сигнал доставки до пероксисом
SDS	– додецилсульфат натрію
Suc	– сахароза
TBS	– ізотонічний Тріс-буфер
WT	– Wild Type, штам дикого типу
YNB	– середовище на основі yeast nitrogen base

ВСТУП

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 [1].

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 [2]. 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 сенсингу 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 [3]. 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 дегративної 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. О.Г. Стасик 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 О.Г. Стасик «Ідентифікація нових генів, що беруть участь у катаболітній регуляції у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*», 2008 р. Автор також висловлює подяку к.б.н. О.Р. Кулачковському (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 становить 280 сторінок. Робота містить 17 таблиць і 121 рисунок. Список літератури нараховує 492 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сенсинг глюкози та глюкозна регуляція у дріжджів

1.1.1. Механізми глюкозної регуляції у *S. cerevisiae* та їх фізіологічна важливість

Серед різноманітних джерел вуглецю, які можуть використовувати клітини дріжджів, найбільш вигідним, чи «фаворитним» є глюкоза. Глюкоза здійснює домінуючі регуляторні ефекти на клітинний метаболізм через ряд скоординованих сигнальних шляхів, які діють на транскрипційному, пост-транскрипційному та пост-трансляційному рівнях. Ці шляхи вивчалися насамперед на моделі пекарських дріжджів *S. cerevisiae*, які є екологічно адаптовані до аеробної ферментації глюкози. Нижче розглянуто зібрану на теперішній час інформацію щодо глюкозо-залежних регуляторних шляхів у *S. cerevisiae*, а також в інших, так званих «нетрадиційних» дріжджів, щодо яких є доступні дані.

За доступності глюкози, метаболізм клітин *S. cerevisiae* переключається на ферментативний режим, навіть за наявності кисню (так званий ефект Кребтрі (Crabtree), для огляду див.: [4]), при цьому індукуються транспорт глюкози та її метаболізм. Одночасно відбувається репресія катаболітної активності залученої в утилізацію альтернативних джерел вуглецю, включаючи глюконеогенез і дихання [5]. Ці метаболічні зміни є результатом перехресних взаємодій між декількома глюкозними сигнальними шляхами: 1) Rgt2/Snf3 шляхом глюкозної індукції, який також називають «сенсор/рецептор-репресорний (SRR)» шлях, що регулює поглинання клітинами глюкози (розглянуто в [6], [7]); 2) Snf1/Mig1 основний шлях глюкозної репресії, який негативно регулює експресію генів залучених в утилізацію альтернативних джерел вуглецю (розглянуто в [8]–[10]; 3) cAMP-залежний шлях протеїнкінази А (РКА), який регулює енергетичний статус клітини, а також впливає на експресію генів *HXT* (розглянуто в [11], [12]. Ці шляхи та відповідні аспекти їх функціональної координації коротко охарактеризовано нижче.

Слід зазначити, що повне виснаження глюкози з ростового середовища призводить до зниження рівня синтезу АТФ та зниження життєздатності клітин. Крім того, в умовах ліміту глюкози відбувається гальмування механізмів загальної трансляції [13], [14].

Розуміння молекулярних механізмів глюкозної регуляції і, зокрема, глюкозо-залежної репресії транскрипції, має велике значення для розвитку біотехнологічних процесів, де є бажаним регулювання потоків вуглецевих сполук і скерування їх на синтез необхідних продуктів [15], [16].

1.1.1.1 Шлях опосередкований нетранспортуючими рецепторами глюкози Snf3/Rgt2- і регуляція *HXT* генів у *S. cerevisiae*

Дріжджові клітини ефективно детектують доступну для росту глюкозу як поза-, так і внутрішньоклітинно. У *S. cerevisiae* сигнальний шлях Snf3/Rgt2 репрезентує сенсорний каскад для детекції рівня позаклітинної глюкози і регулює насамперед експресію семи головних генів транспортерів гексоз (*HXT*) у цих дріжджів [6], [17], [18]. Оскільки генерація енергії шляхом ферментації є досить неефективною, клітини дріжджів мають перекачувати великі кількості глюкози через гліколіз, підвищуючи її поглинання [19]. Також цей сигнал додатково транслюється в глюкозну репресію (див. нижче).

Snf3/Rgt2 рецептори *S. cerevisiae* належать до родини білків *HXT* (Hexose Transporter). Однак, на відміну від численних функціональних гексозних транспортерів-перенощиків *S. cerevisiae* (Hxt1-17 та Gal2), вони втратили здатність транспортувати глюкозу і стали спеціалізованими мембранними сенсорами, які детектують рівень позаклітинної глюкози [19]–[21]. Показано, що Snf3 детектує низький рівень глюкози, тоді як Rgt2 – її високі рівні [17], [22] Snf3/Rgt2-опосередкований сигнал транслюється до промоторів генів, чутливих до глюкози, зокрема генів *HXT*, що кодують функціональні транспортери (Рис. 1.1).

Слід зазначити, що нетранспортуючі сенсори гексоз є специфічними для дріжджів і не ідентифіковані у вищих еукаріотів. У той же час, вони присутні у більшості, якщо не у всіх видів дріжджів, як показано на прикладах *Kluveromyces*

lactis Rag4 [23], *Candida albicans* Hgt4 [24], *Hansenula polymorpha* Hxs1 [25], *Pichia pastoris* Gss1 [26]. У той же час, такі транспортери, як наприклад *U. maydis* Hxt1 [27], *Neurospora crassa* Hgt1 і Hgt2 [28] та *Hansenula polymorpha* Gcr1 [29], [30] можуть являти собою новий клас дріжджових і грибкових гексозних транспортуючих рецепторів або трансцепторів, які беруть участь у сигналюванні цукрів для катаболітної репресії, та є взаємопов'язані з шляхом РКА (див. нижче). Зазначимо, що у геномі *S. cerevisiae* і споріднених дріжджів такий гомолог транспортерів гексоз не присутній.

Як правило, низько-афінні транспортери, представлені Hxt1 *S. cerevisiae*, індуються, коли глюкоза є у надлишку (детектується Rgt2), тоді як експресія високо-афінних транспортерів, представлених Hxt7, індукується тільки при низькому рівні позаклітинної глюкози (детектується Snf3) [31]. У той же час, транскрипція високо-афінних транспортерів пригнічується високими концентраціями глюкози (див. нижче). Таким чином, Snf3/Rgt2-опосередкована регуляція транскрипційної активності специфічних гексозних транспортерів дозволяє швидко адаптувати ефективність транспорту у залежності від доступності глюкози. Таке регулювання генів *HXT* має вирішальне значення в контексті поглинання глюкози, що є критичним регуляторним етапом її метаболізму [32]. Цікаво, що для підтримки внутрішньоклітинного гомеостазу глюкози також було запропоновано роль сенсорів Snf3 і Rgt2 для одночасної детекції внутрішньої та позаклітинної концентрацій глюкози, і відповідного модулювання її поглинання клітинами.

Виявлено, що спорідненість клітин до глюкози зворотно корелює з її внутрішньоклітинною концентрацією [33]. Таким чином, ці дані відповідають моделі «альтернативного доступу» для транспортер-подібних сенсорів, де внутрішньоклітинний ліганд інгібує зв'язування того ж позаклітинного ліганду. Таким чином, внутрішньоклітинна концентрація глюкози в *S. cerevisiae* підтримується через жорстке регулювання гексозних транспортерів, гарантуючи, що поглинання глюкози є достатнім майже незалежно від її зовнішніх концентрацій [34].

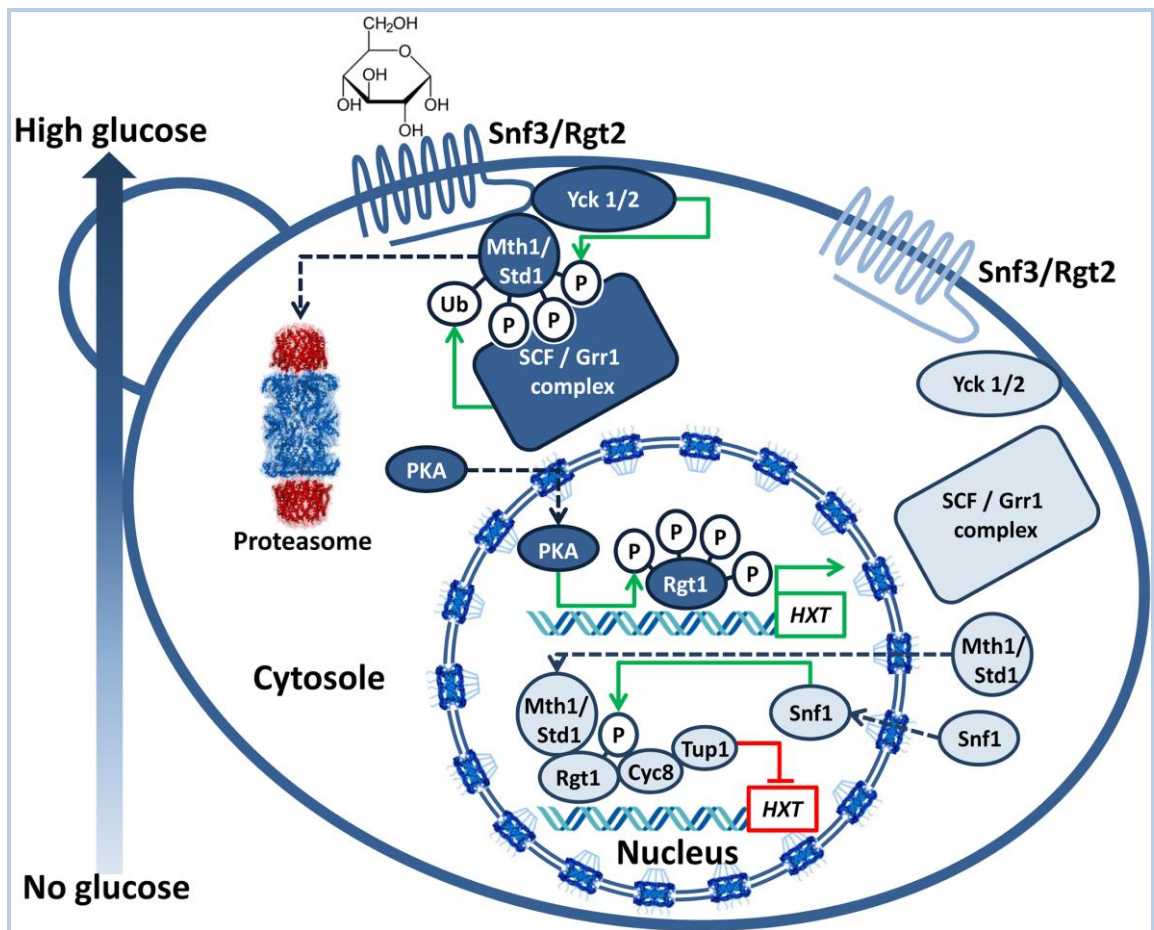


Рис. 1.1. Сигнальний шлях сенсингу глюкози «sensor/receptor-repressor (SRR)», опосередкований нетранспортуючими рецепторами глюкози Snf3 та Rgt2. Глюкоза (зображено структуру) розпізнається Snf3/Rgt2, що призводить до активації Yck1/2 і наступного фосфорилювання регуляторних білків Mth1 і Std1. Активовані Mth1 і Std1 розпізнаються убіквітинлігазою SCF/Grr1 і зазнають деградації у протеасомах. Під час глюкозного голодування комплекс Mth1/Std1 не деградує і локалізується в ядрі, де взаємодіє з транскрипційним репресором Rgt1. Це дозволяє Rgt1 зв'язуватись з і рекрутувати генеральний репресор Cyc8/Tup1 до промоторів репресованих *HXT* генів. Зв'язування Rgt1 з ДНК відбувається після його Snf1-опосередкованого фосфорилювання, тоді як дисоціація ініціюється РКА-опосередкованим гіперфосфорилюванням. РКА фосфорилювання Rgt1 відбувається тільки тоді, коли Mth/Std1 деградує. Темно-сині зони вказують на стан білків при високій глюкозі, світло-блакитні – при низькому вмісті або за відсутності глюкози. Зелені стрілки репрезентують активацію, червоні лінії або сектори позначають інгібування, пунктирні стрілки вказують на події транслокації білків.

Зовнішній глюкозний сигнал в SRR шляху переноситься від Snf3 та Rgt2 до мембрано-асоційованих казеїнових кіназ типу I Yck1 та Yck2. Було запропоновано, що ці кінази є необхідні для деградації двох регуляторних білків-паралогів Mth1 та Std1 (Рис. 1.1) [33], [34]. Проте також повідомлялося, що Mth1 найбільш ймовірно не фосфорилується безпосередньо Yck1/2 і деградує в ядрі незалежно від них [35]. Таким чином, сенсори глюкози Snf3/Rgt2 найбільш ймовірно передають глюкозний сигнал до ще не ідентифікованого білка(ів), що діє вище від Mth1 у сигнальному шляху.

Слід відмітити, що хоча постульовано, що Yck функціонують нижче по відношенню до нетранспортних сенсорів Snf3 і Rgt2, нещодавно було встановлено, що надекспресія Yck1 не здатна відновити глюкозне сигналювання у мутанта за глюкозним сенсором. І навпаки, дефект сигналювання мутанта *uck* може бути супресований надекспресією глюкозного сенсора Rgt2. Крім того, було виявлено, що фосфорилування Yck консенсусних сайтів у С-кінцевій ділянці Rgt2 є необхідним для зв'язування ко-репресорів [36]. Ці дані у сукупності дозволяють припустити, що шлях Snf3/Rgt2 може бути в кінцевому підсумку переглянтий, так що Yck діють вище або на рівні глюкозних сенсорів. Необхідні додаткові дослідження для підтвердження цієї гіпотези.

Таким чином, згідно з прийнятою на даний час моделлю (Рис. 1.1), за умови високого рівня позаклітинної глюкози Mth1 і Std1 локалізуються до плазматичної мембрани і, після фосфорилування, піддаються убіквітинуванню за допомогою убіквітин-протеїн лігази SCF (Grr1) та деградує в убіквітин-протеасомний шляху [34], [37]–[39]. Крім того, при надлишку глюкози транскрипційний репресор Mig1 (див. нижче) репресує експресію гена *MTH1*, що в свою чергу транслюється у репресію високоафінних *HXT* генів [39].

Mth1 та Std1 є активаторами Rgt1, – репресора транскрипції, що діє на ряд генів, індукованих глюкозою, включаючи *HXT* та гени гексокіназ [40]. Після деградації Mth1/Std1 Rgt1 також підлягає деградації, що, у свою чергу, вивільняє експресію їх генів-мішеней. Для дисоціації Rgt1 від відповідних промоторів необхідне його гіперфосфорилування, опосередковане протеїнкіназою А, яка

транслокується до ядра у відповідь на сигнал глюкози [41]. І навпаки, за відсутності глюкози Mth1 та Std1 діють на Rgt1, приховуючи сайти РКА фосфорилування на Rgt1, що, у свою чергу, призводить до зв'язування Rgt1 з промоторами репресованих генів (Рис. 1.1) [37], [42].

Нарешті, фосфорилування Rgt1 каталітичною α -субодиницею АМР-активованої кінази (АМРК) дріжджів, Snf1, переключає його здатність зв'язуватися з промотором і його репресорну активність [40]. На відміну від РКА, Snf1 локалізується в ядрі під час депривації глюкози [43]. За умови низького вмісту глюкози, ДНК-зв'язаний Rgt1 у комплексі з Mth1/Std1 формує загальний транскрипційний репресорний комплекс, що складається з Cys8 та Tup1 для інгібування експресії *HXT* генів [18], [42], [44] (Рис. 1.1). Слід зазначити, що взаємодія між Rgt1 і Snf1 кіназою є важливою для загального механізму глюкозної репресії шляхом забезпечення «поступової» дерепресії *HXT* генів.

Нещодавно запропоновано новий механізм, за допомогою якого активність Snf1 регулюється білком Std1, і його регулятором Sip5 [45], [46]. Було з'ясовано, що протеїнкіназа Vhs1 фосфорилує Sip5 у відповідь на доступність глюкози, від'єднуючи її від Std1 у ядрі і сприяючи секвеструванню Std1 в цитоплазматичні агрегати, які перебувають на межі ядра і вакуолі. Процес є зворотнім і потребує білків-шаперонів, тобто ці Std1-вмісні структури розчиняються, коли глюкоза знову стає дефіцитною [46].

1.1.1.2. Mig1-Hxk2 шлях глюкозної репресії та Snf1 кіназа

Добре відомо, що в присутності глюкози відбувається репресія ряду генів *S. cerevisiae*, що беруть участь в утилізації альтернативних джерел вуглецю, глюконеогенезі та мітохондріальних функціях [9], [12], [47]. Також було показано, що гліколітичний фермент гексокіназа II (Hxk2) є необхідним для цього ефекту транскрипційної репресії [48]. Крім того, було встановлено, що дріжджова Hxk2 є фактично внутрішньоклітинним сенсором доступності глюкози з подвійною цитозольною та ядерною локалізацією [48]–[52] (Рис. 1.2).

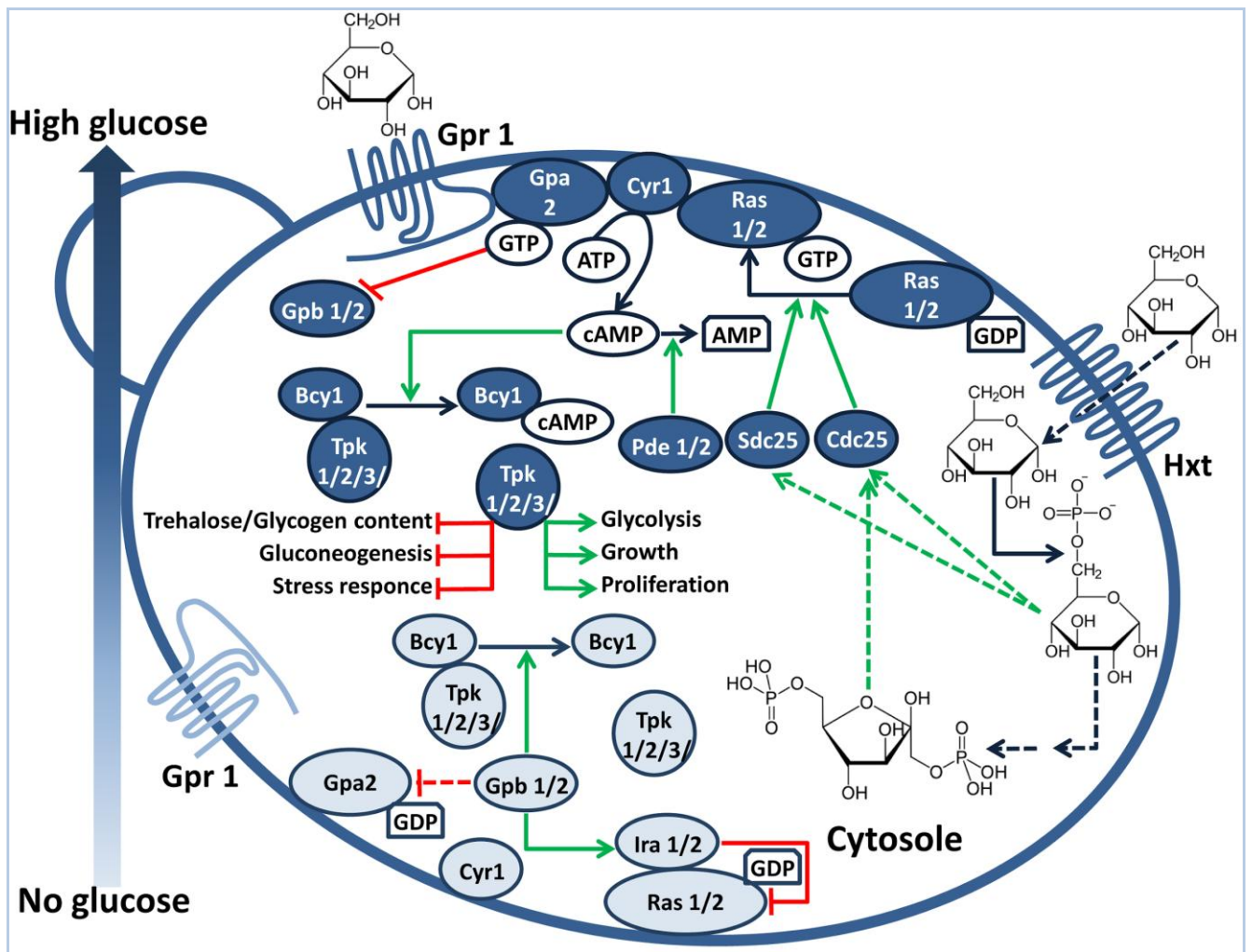


Рис. 1.2. Шлях Snf1 і Mig1-Hxk2-опосередкованої глюкозної репресії в *S. cerevisiae*. Високі концентрації глюкози роблять Snf1 неактивною, що залишає фактор транскрипції Mig1 і Hxk2 дефосфорильованими за допомогою Reg1-Glc7 і, отже, Mig1 присутній в ядрі, де він разом з комплексом Ssn6/Tup1 і Med8 виявляє репресуючий ефект на гени, що беруть участь в утилізації альтернативних джерел вуглецю. Механізм, що відповідає за зниження активності Snf1, не до кінця зрозумілий, але дефосфорилування за допомогою Reg1-Glc7 вважається важливим. Коли кількість глюкози стає лімітованою, Snf1 є активним і фосфорилує як Mig1, так і Hxk2, що дозволяє їх транслокацію з ядра, і тим самим вивільнення від глюкозної репресії експресії генів, експресія яких стимулюються факторами Med8, Adr1 і Cat8. Активність Snf1 в умовах низького вмісту глюкози стимулюється АДФ, що захищає Snf1 від Reg1-Glc7-опосередкованого дефосфорилування. Темно-сині сектори вказують на стан білків при високих концентраціях глюкози, світло-блакитні – при низьких концентраціях або за відсутності глюкози. Зелені стрілки вказують на активацію, червоні лінії чи сектори позначають інгібування, пунктирні стрілки вказують на внутрішньоклітинні переміщення білків.

У ядрі Hxk2 бере участь в інгібуванні експресії ряду генів, включаючи добре відому мішень репресії глюкозою в *S. cerevisiae* – ген інвертази SUC2. Запропоновано, що дія Hxk2 опосередковується транскрипційним репресором Mig1 [50], [51], [55]. Також продемонстровано, що Hxk2 взаємодіє і негативно регулює Med8 – субодиницю медіаторного комплексу РНК-полімерази II [56]. Це спостереження є цікавим, оскільки, хоча сам Med8 репресує експресію гена HXK2, він також одночасно індукує експресію SUC2 (Рис. 1.2) [57].

Ключовий транскрипційний репресор механізму глюкозної репресії в *S. cerevisiae*, Mig1, контролює експресію генів, що кодують білки, які функціонують у метаболізмі і транспорті таких джерел вуглецю, як мальтоза, галактоза і сахароза [58], [59]. Як показано на рисунку 1.2, у багатому на глюкозу середовищі Mig1 є локалізований в ядрі у дефосфорильованій формі [49], [55]. Він зв'язується з промоторами цільових генів-мішеней в комплексі із загальним ко-репресором Ssn6-Tup1 [60], [61]. Слід відмітити, що, хоча Mig1 також безпосередньо взаємодіє з Hxk2, альтернативний розподіл Hxk2 між ядром і цитоплазмою, як видається, регулюється Mig1 через ще невідомий механізм [48], [53]. Ядерний експорт Mig1 ініціюється Snf1-опосередкованим фосфорилуванням його специфічного залишку Ser311. Проте взаємодія з Hxk2 захищає цей залишок і протидіє транслокації Mig1 до ядра [54]. Hxk2-Mig1, крім взаємодії з Med8, також зв'язуються з комплексом Cys8-Tup1, утворюючи таким чином репресорний комплекс, чутливий до рівнів позаклітинної глюкози (Рис. 1.2) [55]. Нещодавно було показано, що різні функціональні домени загального транскрипційного репресора Tup1, а саме Ssn6 взаємодіючий, N-кінцевий та C-кінцевий репресуючий домени, відіграють диференційну роль у глюкозній репресії метаболізму мальтози [56].

Важливо відзначити, що згаданий залишок Ser311 Mig1 необхідний для регулювання гена SUC2, і його фосфорилування за допомогою Snf1 викликає дисоціацію Mig1 від Cys8-Tup1 [54], [55]. Крім Mig1, Hxk2 також фосфорилується Snf1 по Ser14 за умов низького вмісту глюкози [57], [58]. Подібно до Mig1, саме

ця фосфорильована форма Hxk2 експортується з ядра [59], тоді як Hxk2 та Mig1 для транслокації до ядра повинні дефосфорилуватися [54] (Рис. 1.2).

Також було виявлено, що Hxk2 підтримує цілісність репресорного комплексу, відповідального за транскрипційну репресію гена *SUC2*, в якому присутні ДНК-зв'язуючі репресори Mig1 і Mig2 та регуляторні білки Snf1 і Reg1 [60]. За умови низького рівня глюкози, Hxk2 знаходиться у відкритій конфігурації і залишає репресорний комплекс, що у свою чергу індукує його дисоціацію від промотора. І навпаки, замкнута конформація, яку приймає Hxk2 при високих рівнях глюкози, сприяє її зв'язуванню з білком Mig1 і повторному збиранню активного репресорного комплексу. Таким чином, було запропоновано, що білок Hxk2 функціонує як внутрішньоклітинний сенсор рівня глюкози у цитоплазмі, який за допомогою зміни конформації передає сигнал безпосередньо репресибельним промоторам [60].

Дефосфорилування як Mig1, так і Hxk2 є опосередковане Glc7, каталітичною субодиницею протеїнфосфатази 1 (PP1) (Рис. 1.2) [50], [51], [58], [61]. Оскільки, як відомо, Glc7 має широку специфічність, його функція у глюкозній репресії забезпечується регуляторною субодиницею Reg1 [61], [62]. Повідомлялося, що Mig1 дефосфорилується, окрім глюкозозалежного Glc7-Reg1 механізму, також за допомогою механізму, незалежного від глюкози та Glc7-Reg1 [63]. Тому, дефосфорилування Mig1, як видається, контролюється дуже складним чином, мабуть, для швидкої і чутливої регуляції у відповідь на мінімальні зміни екзогенних концентрацій глюкози.

Слід відмітити, що протеїнкіназа Snf1 є ще однією важливою мішенню фосфатазного комплексу Reg1-Glc7 [64]. Було показано, що дефіцит регуляторного білка Ssb, – шаперона, гомологічного людському Hsp70, призводить до дефектів глюкозної репресії в клітинах *S. cerevisiae*, внаслідок здатності білка Ssb формувати з'єднання між комплексами Snf1 і Glc7 [65]. Також показано, що Ssb виконує свою функцію за допомогою С-кінцевого зв'язування з білком 14-3-3 Bmh. Надекспресія Ssb або Bmh дозволяє Glc7 дефосфорилувати Snf1 навіть у клітинах *Δreg1*, таким чином ефективно супресуючи транскрипційну дерегуляцію. Було запропоновано,

що Ssb і Bmh можуть включати новий шапероновий модуль, який бере участь у тонкому налаштуванні залежного від фосфорилування Snf1 перемикачів між ферментацією та диханням у *S. cerevisiae* [65].

Протеїнкіназа Snf1, дріжджовий гомолог висококонсервативної в еукаріотичних клітинах АМР-активованої протеїнкінази – АМРК, є центральним елементом, що інтегрує сигналювання глюкозної репресії і сигналювання, що збалансовує енергетичні потреби клітини. Разом з однією із трьох β -субодиниць, Sip1, Sip2 або Gal83, і регуляторною γ -субодиницею Snf4, каталітична α -субодиниця Snf1 утворює гетеротримерний комплекс, який регулює різні клітинні процеси через репертуар транскрипційних факторів та сигнальних шляхів. З огляду на їх функціональну універсальність, розуміння регулювання АМРК у різних організмах представляє фундаментальний інтерес, і багато знань про цей фермент було зібрано у *S. cerevisiae* як модельного організму [8], [10], [66].

Комплекс Snf1 бере участь, крім регуляції *HXT* та генів, що підлягають глюкозній репресії, у великій кількості клітинних процесів, важливих для проліферації, старіння, енергетичного гомеостазу, автофагії та відповіді на стрес [67]–[71]. Хоча вважається, що головною роллю комплексу Snf1 є регуляція адаптації до різних рівнів глюкози [72], він також регулює ферменти, що беруть участь у метаболізмі жирних кислот, вуглеводів і є залучений в GCN4-залежну трансляцію та біосинтез амінокислот [8], [73]. Також показано, що Snf1 безпосередньо взаємодіє із загальним транскрипційним апаратом і бере участь у модифікації хроматину [74]. На додаток до відповіді на лімітацію глюкози та інші стресові фактори, нещодавно показана нова неконвенційна роль комплексу Snf1 у глюкозній репресії [10].

Snf1-кіназний комплекс відіграє подвійну роль у глюкозній репресії, як активатор і репресор. На даний момент відомо, що Snf1 активується фосфорилуванням по Thr210 трьома кіназами, – Sak1, Elm1 і Tos3, і інактивується дефосфорилуванням, опосередкованим Reg1-Glc7 (Рис. 1.2) [61], [75], [76]. Цікаво, що активність Reg1-Glc7 або трьох вищезгаданих кіназ фактично не залежить від концентрації глюкози, хоча було показано, що рівень

фосфорилування Snf1 зростає за низьких концентрацій глюкози [61], [75]. Таким чином, доступність Snf1 Thr210 для дії Reg1-Glc7 була запропонована як механізм регулювання активності Snf1 [61]. Таке регулювання базується на конкуренції між двома безпосередніми альтернативними взаємодіями Reg1 з Glc7 або Snf1 [77], [78]. Іншими словами, якщо Thr210 Snf1 маскується взаємодією між Reg1 і Snf1, то це запобігає дефосфорилуванню Snf1 за допомогою Glc7 (Рис. 1.2) [61], [79]. Передбачається, що зв'язування ADP з регуляторною субодиницею захищає Thr210 від дефосфорилування [80]. Останні дані дозволяють припустити, що за умови надлишку глюкози, дефосфорилування Snf1 ймовірно опосередковано, крім Glc7-Reg1/2, також PP2A фосфатазою, Sit4 та Ptc1 [81]–[83]. Оскільки було показано, що ADP, але не AMP, захищає від дефосфорилування, тим самим активуючи як дріжджову Snf1, так і AMPK ссавців, це може свідчити про еволюційно консервативний регуляторний механізм [80], [84]. Дерепресія ряду репресибельних генів, залучених у глюконеогенез та β -окислення, вимагає транскрипційних регуляторів Cat8 і Adr1, які залежать від Snf1-опосередкованої індукції [85]–[87] (Рис. 1.2).

Тим не менш, механізм, яким шлях Snf1-Mig1 регулюється на молекулярному рівні, є не повністю з'ясованим. У недавньому дослідженні, із використанням аналітичного підходу «одна-клітина» («single-cell») та математичного моделювання, було запропоновано «тісний зв'язок між швидкістю поглинання глюкози, яка визначає рівень гліколізу, та активністю системи Snf1-Mig1» [88]. Було показано, що відмінності у кількості молекул гексозного транспортера (наприклад, Hxt7) в клітині можуть викликати міжклітинну мінливість при активації шляху Snf1-Mig1. Ця модель передбачає раніше невизнаний регуляторний етап шляху Snf1-Mig1 на рівні дефосфорилування Mig1 [88].

Зокрема, показано, що Snf1 є необхідним для продовження хронологічної тривалості життя (CLS) при обмеженні калорій в хронологічно старіючих клітинах дріжджів. Було виявлено що спонтанні мутації в транскрипційному корепресорі Cus8, який специфічно опосередковує репресію через транскрипційний

репресор Mig1, і в самому гені *MIG1*, супресують короткий хронологічний час життя в мутанта *delta snf1 S. cerevisiae* [89].

Snf1 S. cerevisiae також є залучений у процес швидкої деградації транскриптів, що кодують білки, необхідні для аеробного метаболізму, таких, як алкогольдегідрогенази *Adh2*, при переході від дихання до бродіння. Повідомлялмсь інтригуючи дані про те, що зміни у промоторі гена *ADH2* є причиною того, що він стає незалежним від *Snf1*, запобігаючи індукованому глюкозою розпаду мРНК що експресується з такого модифікованого промотора. Було запропоновано, що *Snf1* може впливати на стабільність мРНК, змінюючи активність транскрипційного фактора *Adr1*. З іншого боку, інгібування шляху протеїнкінази А (див. нижче) не впливало на індукований глюкозою розпад мРНК *Adh2* [90].

1.1.1.3. Сигнальний шлях cAMP/РКА *S. cerevisiae* та функції Grp1 та Ras1/2

Дріжджові клітини *S. cerevisiae*, які проліферують у повному поживному середовищі з ферментованим (так званим «фаворитним») джерелом вуглецю, виявляють фенотипи, що свідчать про високу активність шляху РКА (протеїнкінази А), тоді як клітини, інкубовані з джерелом вуглецю непридатним для ферментації, або ті, що знаходяться у стаціонарній фазі росту, виявляють альтернативні фенотипи, характерні для низької активності РКА. Останні включають серед інших низькі темпи росту, індукцію шляхів відповіді на стрес, низьку експресію рибосомальних білків, накопичення резервних вуглеводів, таких як трегалоза і глікоген [91]. Також добре встановлено, що протягом декількох хвилин після експозиції клітин *S. cerevisiae* до глюкози відбувається сплеск рівня cAMP, який супроводжується РКА-опосередкованою активацією фермента трегалази, що, у свою чергу, викликає мобілізацію дисахариду трегалози і його гідроліз до мономерної глюкози [92]–[94]. Оскільки для його постійної активації необхідна не тільки глюкоза, але і повноцінне ростове середовище, РКА шлях є, очевидно, відповідальним за комплексний моніторинг, чи усі умови підходять для активної проліферації клітин [12], [95].

Механізми, за допомогою яких глюкоза ініціює активацію шляху сАМР-РКА та змінює чутливий клітинний метаболізм на наступних етапах був встановлений у деталях [12], [96]. Було показано, що регуляція шляху РКА у відповідь на зміни концентрації глюкози включає трансмембранний білок GPCR (G- protein-coupled receptor) Gpr1 (Рис. 1.3) [97], [98]. Крім глюкози, сахароза також діє як ліганд для Gpr1 [99], [100]. Цей білок зв'язується та взаємодіє з GTP-зв'язаною альфа-субодиницею G-білка Gra2, яка у подальшому взаємодіє з аденілатциклазою Cyr1, а остання перетворює АТФ у цАМФ [96], [97], [101], [102]. Було продемонстровано, що у відповідь на глюкозу рівень внутрішньоклітинного цАМФ зростає у Gpr1-залежний спосіб, хоча пряма взаємодія Gpr1 з глюкозою ще не доведена [103].

Виходячи з вищезазначених спостережень, шлях сАМР/РКА діє наступним чином: і) глюкоза індукує Gpr1 і тим самим сприяє обміну GDP-зв'язаного Gra2 на GTP-зв'язаний; ii) GTP-зв'язаний Gra2 транслює сигнал стимулюючи Cyr1, і таким чином підвищує цитоплазматичну концентрацію сАМР; iii) підвищення рівня сАМР активує РКА (Рис. 1.3) [99], [104].

У *S. cerevisiae* РКА є гетеротетрамером, що складається з двох каталітичних субодиниць, кодованих трьома різними генами *TPK1-3*, і димерної регуляторної субодиниці, кованою геном *BCY1* [104]. Як відомо, *TPK1-3* мають багато різноманітних мішеней, залучених у регуляцію відповіді на стрес, глюконеогенез та гліколіз, а також проліферацію клітин [91], [104], [105].

На додаток до Gra2, активність аденілатциклази і, отже, підвищена активність РКА може бути стимульована двома альтернативними GTP-зв'язуючими білками, Ras1 та Ras2 у відповідь на сигнал, отриманий від гліколізу (Рис. 1.3) [106]–[108]. Активність Ras1/2 також модулюється: фактори обміну гуанінових нуклеотидів такі як Cdc25 і Sdc25 активують його [108], а два GTPase активуючі білки Ira1 та Ira2 інгібують Ras1/2 [107].

Було виявлено, що для стимулювання Ras1/2 глюкозою необхідне її поглинання та перетворення в глюкозо-6-фосфат. Тому передбачається, але остаточно не підтверджено, що глюкозо-6-фосфат ймовірно активує Ras1/2 через Cdc25 та/або Sdc25 [107], [108].

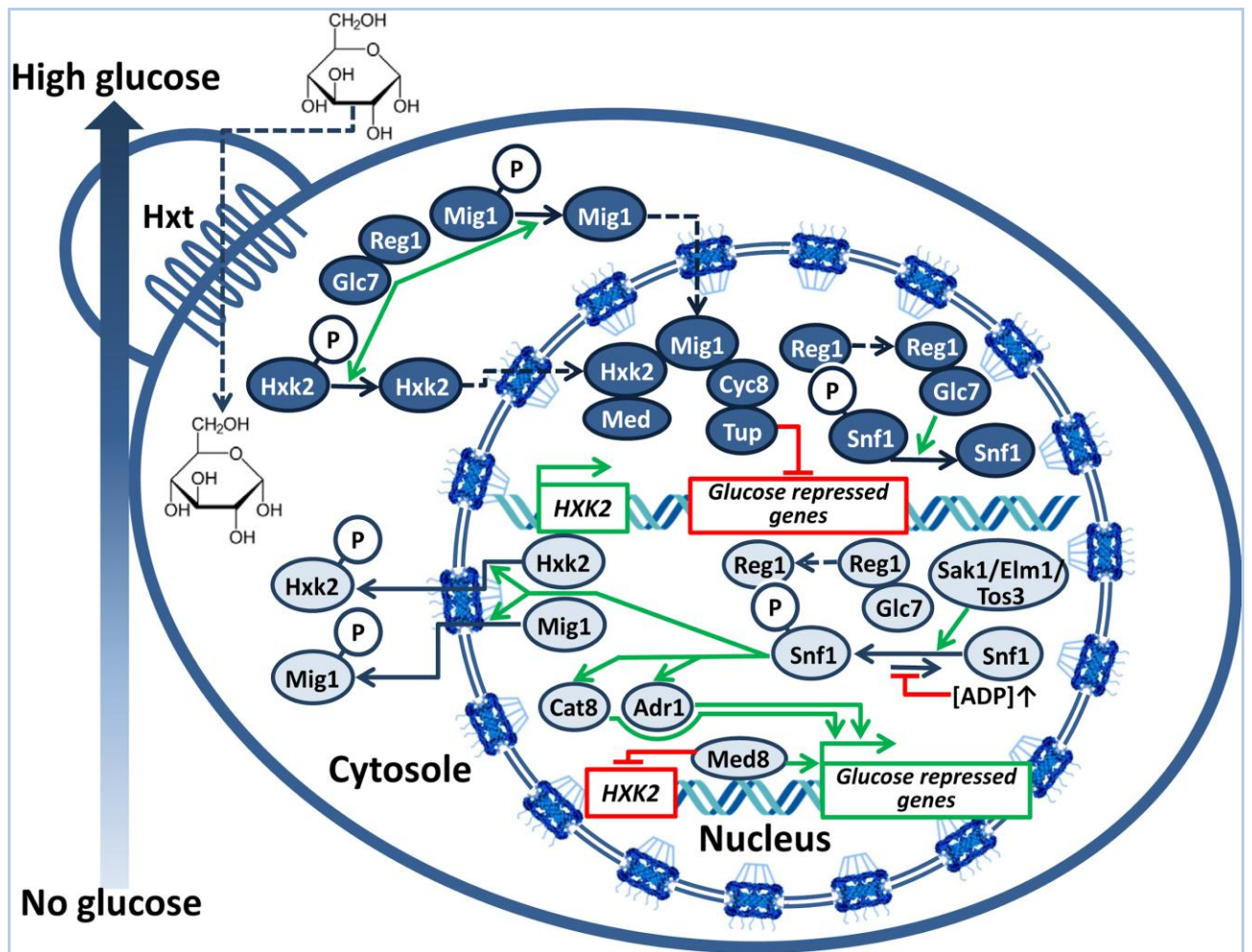


Рис. 1.3. Сигнальний шлях сАМР/РКА. Білок плазматичної мембрани Gpr1 детектує присутність позаклітинної глюкози, що ініціює обмін від GDP- до GTP-зв'язаного Gra2. GTP-зв'язаний Gra2 активує Cyr1, що призводить до конверсії АТФ в цАМФ. Далі цАМФ активує Trk1/2/3, каталітичні субодиниці РКА, дисоціюючи їх від регуляторної субодиниці Vcy1. Cyr1 також стимулюється GTP-зв'язаним Ras1/2, активованим у свою чергу Cdc25 і Sdc25. Запропоновано, що глюкозо 6-фосфат опосередковує стимуляцію Cdc25 і Sdc25 глюкозою. Під час глюкозного голодування сАМР/РКА сигналювання послаблюється дією Gpb1/2. Gpb1/2 стимулює Ira1/2, який каталізує гідроліз GTP-зв'язаного Ras1/2. Gpb1/2 також посилює асоціацію Vcy1 і Trk1/2/3. GTP-зв'язаний Gra2 інгібує Gpb1/2, тоді як Gpb1/2 також може мати негативний вплив на Gra2. Додатково, дві фосфодіестерази, Pde1 і Pde2 протидіють РКА сигналюванню в *S. cerevisiae*. Темно-сині сектори вказують на стан білків при високій глюкозі, світло-блакитні – при низьких концентраціях або за відсутності глюкози. Зелені стрілки позначають активацію, червоні лінії або сектори позначають інгібування.

Ras1/2 інгібітор, Ira1/2, є функціонально стабілізований двома так званими kelch-repeat білками Gpb1 і Gpb2 [100]. Gpb1/2 перешкоджає взаємодії Gpr1–Gra2 [98] і взаємодії між Trk1/2/3 і PKA-регуляторною субодиницею Vcy1, тим самим послаблюючи активність PKA [96]. Також повідомлялося, що активність Gpb1/2 може бути інгібованою за допомогою GTP-зв'язаного Gra2 [102]. На додаток, фосфодіестерази Pde1 і Pde2 були ідентифіковані як такі, що знижують рівні cAMP шляхом перетворення cAMP до AMP і, таким чином, протидіючи сигнальному шляху cAMP/PKA (Рис. 1.3) [109]. Також було припущено, що активація Ras може залежати від активності вакуолярної АТФази, яка регулюється в залежності від рівня АТФ і цитозольного рН [110].

Нещодавно було показано, що зовнішньоклітинний механізм сенсингу глюкози на основі GPCR (Gpr1) не здатний активувати Cyr1 і стимулювати синтез cAMP до тих пір, поки аденилатциклаза не активується одночасно за допомогою Ras білків. Важливо, що остання стимуляція вимагає транспорту глюкози в клітини, а також її гліколітичної конверсії до фруктозо-1,6-бісфосфату, який активує Ras, безпосередньо стимулюючи фактор обміну гуанінових нуклеотидів Cdc25 [96], [111].

1.1.1.4. Взаємозв'язок та координація сигнальних шляхів глюкози

Дріжджові клітини координують сигнальні шляхи у перехресній мережі для модулювання їх інтегрованої відповіді на доступність глюкози, як схематично зображено на Рис. 1.4 [1], [112]. Наприклад, генерування репресорного сигналу глюкози, який інгібує активність дріжджової АМПК кінази Snf1, вимагає поглинання глюкози і її метаболізму, і ці сигнали повинні бути узгодженими. Це забезпечує клітинам гнучкий механізм, який об'єднує різні стимули індивідуальних сигнальних шляхів і налаштовує загальну регуляторну відповідь [1].

Перш за все, шляхи Snf1 і Rgt2/Snf3 пов'язані на рівні регуляції експресії генів. Таким чином, Mig1 у кооперації з Mig2, паралогом Mig1, який не регулюється Snf1, є залучений у репресію генів гексозних транспортерів *HXT2* і *HXT4*, та генів, що кодують компоненти Rgt2/Snf3 шляху, *MTH1* та *SNF3*, за умов високого рівня глюкози (Рис. 1.4) [6], [22], [113], [114].

Це свідчить про те, що експресія *HXT* генів у відповідь на глюкозу контролюється Snf1 подвійним механізмом, опосередкованим Rgt1 і Mig1, або взаємодією між індукцією і репресією. Математична кінетична модель, що описує цю регуляторну мережу, передбачає, що взаємозв'язок між шляхами Snf1 і Rgt1/Snf3 гарантує, що афінність системи транспорту коректно відповідає фактичній зовнішній концентрації глюкози [115]. Також було виявлено, що Snf1 регулює транскрипцію *HXT* генів шляхом фізичної взаємодії з ключовими компонентами шляху Rgt2/Snf3 (Рис. 4) [116]. Відповідно, Std1 і Mth1 не убіквітинувалися та не деградували навіть при високих рівнях глюкози, якщо Snf1 був аномально активованим [117]. Запропоновано, що спостережений ефект є обумовлений гальмуванням ядерного експорту Std1 і Mth1, і запропонована пряма взаємодія Snf1 з цими двома білками [116], [118], [119]. Крім того, для індукованої глюкозою деградації Mth1, мабуть, необхідне SUMOлювання (SUMOylation) Snf1 [120]. Інші компоненти глюкозного репресорного шляху також беруть участь у сигналюванні Rgt2/Snf3. Наприклад, Snf1 фосфатаза Glc7-Reg1 є активатором кіназ Yck1/2, що діють на Std1 та Mth1 репресори (Рис. 1.4) [34][121].

Існує також реципроктна регуляція в клітинах *S. cerevisiae*, тобто шлях Rgt2/Snf3 також впливає на шлях Snf1. Було показано, що втрата активності Snf1, наприклад через делецію SNF4, може бути компенсована мультикопійною експресією Std1, що припускає, що Std1 може впливати на глюкозну репресію через її взаємодію з Snf1 [116]. Також було повідомлено, що надекспресія Std1 стабілізує активний комплекс Snf1 [118]. Транскрипційні фактори Mig1 та Mig2 мають часткове перекривання промоторів-мішеней і є функціонально частково надлишковими [133]. Однак їх експресія контролюється через різні механізми: Mig2 перебуває під транскрипційним контролем шляху Rgt2/Snf3, і це впливає на шлях репресії, оскільки він є транскрипційним репресором Mig1 [113]. Таким чином, існують два різних механізми, за допомогою яких шлях Rgt2/Snf3 прецизійно налаштовує глюкозну репресію: по-перше – стабілізуючи комплекс Snf1 і захищаючи функціонально важливий залишок Thr210 Snf1 від дефосфорилювання, та по-друге – впливаючи на глюкозну репресію через Mig2 (Рис. 1.4).

З іншого боку, активність РКА-шляху необхідна для установалення глюкозної репресії. Наприклад, знижена активність РКА призводить до порушення глюкозної репресії [122], тоді як надекспресія компонентів цього шляху призводить до супресії дефектів росту в дельта *snf4* мутанта [118]. Також повідомлялося, що регуляторні субодиниці *Vcy1* і *Ras GAP* білків *Ira1/2* є необхідні для активації шляху *Snf1* у відповідь на лімітування глюкози [123]. Більш того, *Vcy1* також фосфорилується *Snf1*-залежним чином [124] (Рис. 1.4).

Хоча передбачалося, що *upstream* кінази фосфорилують *Snf1* конститутивно і незалежно від екзогенної концентрації глюкози [61], виявилось, що мутації в передбачуваних сайтах фосфорилування РКА в кіназі *Sak1* [125] призводять до помірного збільшення фосфорилування *Snf1* за присутності глюкози [123]. Також було продемонстровано, що активність *Snf1* підвищується незалежно від статусу *Sak1*, якщо шлях *cAMP*-РКА пригнічений, що дозволяє припустити, що інші компоненти *Snf1*-залежного каскаду також є мішенями РКА [123]. Наприклад, такою мішенню може бути *Reg1-Glc7* (PP1 фосфатаза) комплекс, оскільки його активація глюкозою включає *Php1*-залежну посттрансляційну модифікацію [81].

Крім того, було запропоновано, що шлях *cAMP*-РКА впливає на просторову локалізацію та активацію комплексу *Snf1*. Наприклад, при лімітуванні глюкози, комплекс, що містить *Sip1* β -субодиницю, локалізується в безпосередній близькості до вакуолі, тоді як при високій глюкозі він має цитозольну локалізацію [43], [125]. Було виявлено, що у штамів, які не мають регуляторної субодиниці *Vcy1*, *Sip1* є конститутивно локалізований до вакуолі [125]. Таким чином, обидва шляхи *Rgt2/Snf3* і шлях РКА тонко налаштовують шлях *Snf1* у відповідь на зміни рівня глюкози [1].

Крім того, *Rgt2/Snf3* та *cAMP*-РКА шляхи також взаємодіють. Як згадано вище, активація аденілатциклази вимагає одночасної дії обох активованих білків *Gpr1* і *Ras* [111]. Глюкозна активація синтезу *cAMP* у дріжджів потребує взаємодії позаклітинної нетранспортуючої сенсорної системи з внутрішньоклітинною системою сенсингу катаболітів глюкози, зокрема фруктозо-1,6-бісфосфату. Це був перший встановлений приклад такої комбінованої сенсорної системи. Проте,

останні дані також свідчать, що також продукт гексокінази глюкозо-6-фосфат може бути залучений у сигналювання гліколітичної каталітичної репресії [60], [126]. Також залишається неясним, чи високоафінні транспортери глюкози Hxt6 і Hxt7, які експресуються у середовищі, позбавленому глюкози, також відіграють роль у індукованій глюкозою активації сАМР-РКА шляху. Як альтернатива, білок з kelch-повторами, який обходить етап аденілатциклази, також може бути відповідальним за цей спосіб гліколітичної активації РКА, без залучення сигналювання сАМР [102], [127].

1.1.2. Глюкозна регуляція у метилотрофних дріжджів

Як згадувалося вище, екологічно адаптовані до аеробної гліколітичної ферментації *S. cerevisiae* були головним модельним організмом для розшифрування яким чином організовані і як взаємодіють механізми сенсингу глюкози та відповідні сигнальні механізми в клітинах дріжджів [4]. Однак така екологічна адаптація *S. cerevisiae* може специфічно впливати на механізми каталітичного сигналювання у цих дріжджів [128]. Не можна виключати, що більшість інших, так званих «неконвенційних» Crabtree-негативних видів дріжджів найімовірніше виявляють відмінну організацію механізмів сенсингу глюкози. Ця гіпотеза отримує в останні роки підтримку, оскільки все більше експериментальних і геномних даних було зібрано на різних альтернативних видах дріжджів. Нижче ми коротко узагальнюємо дані щодо гліколітичного сигналювання у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*, використаних як експериментальні моделі у цій роботі.

Pichia (Komagataella) pastoris

Метилотрофні Crabtree-негативні дріжджі, такі як *P. pastoris*, *H. polymorpha* і *Candida boidinii*, широко використовуються для продукції гетерологічних білків [3]. Сильні індукційні промотори, отримані з генів утилізації метанолу або конститутивні промотори напр. гліколітичних генів, зазвичай використовують для експресії чужорідних генів. Цікаво, що гени, які беруть участь в утилізації

метанолу, не тільки репресуються за присутності глюкози, але і дисахаридів у випадку *H. polymorpha*, або гліцеролу у випадку *P. pastoris* (для ґрунтового огляду регулювання шляхів утилізації метанолу у дріжджів див.[129].

Цікаво, що, всупереч попереднім припущенням, нещодавно було запропоновано, що весь шлях асиміляції метанолу у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* локалізується в пероксисомах, а не покладається на частину цитозольного пентозофосфатного шляху для регенерації ксилулозо-5-фосфату. З цією метою *P. pastoris* (і, ймовірно, також інші метилотрофи) виробили дублюючий набір метанол-індукованих ферментів асиміляції формальдегіду, локалізований у пероксисомах.

За допомогою мікроеррей-аналізу (global microarray) також було встановлено, що *P. pastoris* регулює свою специфічну відповідь на різні джерела вуглецю на транскрипційному, а не трансляційному рівні [130]. Цікаво, що, незважаючи на відносно низькі темпи росту, глобальна трансляція була найбільш активною у вирощених на метанолі клітинах *P. pastoris*, порівняно із клітинами, вирощеними з гліцеролом або глюкозою. Було підтверджено, що гени утилізації метанолу та біогенезу пероксисом підлягають репресії вуглецевими субстратами (глюкозою або гліцеролом), але також виявлено, що вони, на додаток до індукції метанолом, сильно деререпресуються в умовах лімітації за глюкозою, як це часто застосовується при культивуванні в режимі періодичної культури fed-batch [130].

Mxr1 (methanol expression regulator 1) був ідентифікований як важливий фактор для індукції пероксисомної алкогольоксидази AOX1 у *P. pastoris* і нормального пероксисомного біогенезу у відповідь на метанол. Mxr1 є великим білком з zinc finger ДНК-зв'язуючим доменом поблизу N-кінця, який має певну схожість до Adr1 *S. cerevisiae*. Показано, що Mxr1 локалізується в ядрі в клітинах, вирощених на метанолі або інших глюконеогенних субстратах, проте є цитозольним у глюкозо-вмісному середовищі. Було запропоновано, що Mxr1 *P. pastoris* є девіантним гомологом Adr1 *S. cerevisiae*, який отримав адаптовані до метилотрофного метаболізму нові функції [131].

Встановлено що PpNrg1, Cys2His2 транскрипційний репресор з мотивом «цинкового пальця» (zinc finger), є локалізованим в ядрі і бере участь у репресії P_{AOX1} *P. pastoris* та ряду інших генів, залучених в утилізацію метанолу та біогенез пероксисом в клітинах, вирощених на глюкозі та на гліцеролі. Деякі сайти зв'язування PpNrg1 перекриваються з сайтами PpMxr1, передбачуваним індуктором P_{AOX1} [132].

У спеціальному скринінгу у *P. pastoris* було ідентифіковано 27 кіназ, які беруть участь у рості клітин за різних умов, зокрема в регуляції P_{AOX1} . З них 5 кіназ були залучені в активації P_{AOX1} і 5 в репресії P_{AOX1} , більшість з яких виявилася пов'язаною зі шляхами Snf1 і Hog1. Примітно, що одна з цих кіназ була ідентифікована як субодиниця PpGal83 *P. pastoris* Snf1, яка залучена у позитивній регуляції P_{AOX1} [15].

Повідомлялося, що мутанти *P. pastoris* за генами, що кодують передбачені гомологи транскрипційних репресорів *MIG1* і *MIG2*, були дефіцитні за катаболітною репресією пероксисомної алкогольоксидази у середовищі з гліцеролом, але не в середовищі з глюкозою. Порівняльний аналіз геному та секвенування послідовностей РНК показали, що катаболізм метанолу і шляхи біогенезу пероксисом були значно підвищені (напр. гени периксисомних алкогольоксидаз *AOX1* та *AOX2* більш, ніж у 30 разів) в мутантних клітинах *P. pastoris* $\Delta mig1 \Delta mig2$, які росли на середовищі з гліцеролом. У подвійного мутанта було також посилено зв'язування важливого транскрипційного активатора Mit1 з *AOX1* промотором [133].

У *P. pastoris* були також ідентифіковані і охарактеризовані два гомологи транспортерів гексоз, PpHxt1 та PpHxt2 [134]. При експресії в мутантному hxt-нуль штамі *S. cerevisiae*, який не здатний до транспорту та росту на моносахаридах, вони відновлювали ріст на глюкозі або фруктозі. Обидва *HXT* гени *P. pastoris* були транскрипційно регульовані глюкозою: рівні транскрипту PpHXT1 були індуковані високими рівнями глюкози, тоді як транскрипти PpHXT2 були відносно менш численними і повністю індукувалися тільки при низьких рівнях глюкози. Хоча PpHxt2 був важливим для росту на глюкозі або фруктозі,

коли дихання було інгібованим, делеція *PpHXT1*, але не *PpHXT2*, призводила до дерепресії (порушення катаболітної репресії) гена *AOX1* в присутності гексоз. Автори припустили що регульований цукрами P_{AOX1} у дельта *hxt1* штамі може бути перспективним інструментом для експресії гетерологічних білків без участі метанолу [134].

Крім того, у *P. pastoris* був ідентифікований єдиний гомолог не-транспортуючих дріжджових сенсорів глюкози, названий *PpGss1* (glucose sensor). Делеція відповідного гена виражено негативно впливала на ріст на глюкозі, і одночасно на глюкозу репресію і регульовану глюкозою автофагійну деградацію пероксисом у мутантних клітинах [26]. Цікаво, що С-кінцевий фрагмент сенсора *Gss1* виявився не обов'язковим для сигналювання при глюкозній катаболітній репресії. Крім того, заміщення однієї консервативної амінокислоти R180K у *Gss1* не викликало видимого фенотипу, на відміну від аналогічних мутацій в інших подібних сенсорів глюкози з *S. cerevisiae*, *C. albicans* або *H. polymorpha*, що призводили до конститутивного сигналювання мутантних форм сенсорів та надеспресії *HXT* генів. Однак залишається не до кінця зрозумілим, чи не викликає *gss1* мутація так званий ефект «виключення ефектора» (недостатнє поглинання глюкози клітинами), що веде до пошкодження сигналювання глюкози у багатьох регуляторних механізмах [135].

Hansenula (Ogataea) polymorpha

Ще в ранніх роботах з *H. polymorpha* було показано, що регуляція пероксисомної алкоголь (чи метанол) оксидази (АОХ), тобто її репресії глюкозою, депресії, а також індукції метанолом, контролюється на рівні транскрипції [136].

У мутантів *H. polymorpha*, які виявляли нечутливість до глюкозної репресії асиміляції метанолу та формування пероксисом, було показано, що при тривалій інкубації з глюкозою цей фенотип маскується катаболітною інактивацією та деградацією метилотрофних ферментів. Таким чином, глюкозна репресія і катаболітна інактивація (яка включає пексофагію), як видається, контролюються різними наборами генів [137], [138]. При цьому етанол продовжував пригнічувати

метанольний метаболізм у таких мутантів. Ці дані свідчать що, подібно до інших метилотрофів, напр. *Pichia methanolica*, глюкоза і етанол, мають різні шляхи репресії в *H. polymorpha* [137], [139], [140].

Також було встановлено, що дефіцитні за глюкозною репресією мутанти метилотрофних дріжджів можуть мати порушення в транспортній системі глюкози [141], [142].

Цікавим було спостереження, що P_{AOX} *H. polymorpha* забезпечував репресовану глюкозою експресію репортерного гена *lacZ* в *S. cerevisiae*. Ділянка P_{AOX} довжиною 200 п.н., відповідальна за глюкозну регуляцію, отримала назву MOX-B, та містила передбачуваний консенсусний сайт зв'язування для Adr1, транскрипційного фактора, залученого у дерепресію білків пероксисом *S. cerevisiae*. Ці дані свідчать, що Adr1 може бути консервативним регулятором для генів, що кодують пероксисомні білки в різних дріжджів *Saccharomycetaceae* [143].

Нещодавно регуляція P_{AOX} *H. polymorpha* була досліджена щодо катаболітної репресії на рівні окремих клітин. Автори повідомили, що виділення показників окремих клітин від загальної активності популяції виявило досі недооцінену ультрачутливість P_{AOX} до глюкозної репресії. Так, хоча попередні базовані на оцінці популяцій дослідження показали повну дерепресію P_{AOX} при концентраціях позаклітинної глюкози ~ 1 г/л, глюкозна репресія на рівні окремих клітин відбувалася вже при таких низьких концентраціях як 5×10^{-4} г/л [144].

Ген мальтази (*HpMAL1*) *H. polymorpha* є важливим для росту цих дріжджів на мальтозі та сахарозі [145]. Цікаво, що експресія гена мальтази *MAL62* *S. cerevisiae* із власного промотору була індукована мальтозою і сахарозою, і репресована глюкозою, коли він був кспресований у мутанта дельта *mal1* *H. polymorpha*, і навпаки, промотор *HpMAL1* також розпізнавався і коректно регулювався джерелами вуглецю в мальтазо-негативному мутанті *S. cerevisiae*. Тому було запропоновано, що транскрипційні регулятори генів *S. cerevisiae* *MAL* (включаючи репресор Mig1) можуть впливати на експресію гена мальтази *H. polymorpha*, і що гомологи цих білків можуть існувати в *H. polymorpha*. Також

було запропоновано, що завдяки своїй силі і строгій регуляції, промотор гена *HpMAL1* може бути зручною платформою для певних біотехнологічних застосувань, наприклад, індукованої мальтозою і репресивної глюкозою продукції рекомбінантних білків [145]. Аналіз 2-DG-резистентних мутантів дозволив припустити, що *H. polymorpha* найбільш ймовірно має білок-репресор, який у присутності глюкози може знижувати експресію як мальтази, так і ферментів обміну метанолу [146].

Досліджено регуляцію синтезу репресованих цукрами алкогольоксидази, каталази та мальтази в ізольованих гексокіназо-негативних, глюкочкіназо-негативних і подвійних кіназо-негативних мутантах *H. polymorpha*. Було встановлено, що у мутантів, що володіють одним з ензимів фосфорилування глюкози, глюкозна репресія згаданих ферментів залишається незмінною, тоді як у подвійному кіназо-негативному мутанті вона була скасована. Зроблено висновок, що глюкозна репресія в *H. polymorpha* вимагає глюкозо-фосфорилуючого ферменту. Відповідно до цієї гіпотези, присутність фруктозо-фосфорилуючої гексокінази була особливо необхідна для фруктози репресії алкогольоксидази, каталази та мальтази. Отже, глюкозо-6-фосфат, імовірно, є так званою «ко-репресорною» молекулою, яка регулює сигнали гексозної репресії у цих дріжджів [147].

Також повідомлялося, що ген глюкочкінази *H. polymorpha*, *HpGLK1*, був здатний функціонально комплементувати дефект репресії глюкозою, але не фруктозою, у подвійному кіназо-негативному мутанті. Відповідно було показано, що фермент здатний фосфорилувати глюкозу, манозу та 2-ДГ, але не фруктозу. Коли *HpGLK1* був трансформований в потрібний кіназо-негативний мутант *S. cerevisiae*, він був нездатний функціонально комплементувати дефект глюкозної репресії синтезу інвертази і мальтази. Таким чином, було підтверджено, що фосфорилування гексози необхідне для функціональної репресії сигналювання в *H. polymorpha*. Більш того, гексокіназа як білок не є суттєво важливою для цього процесу і, на відміну від ситуації в *S. cerevisiae*, вона може бути функціонально заміщена глюкочкіназою I в сигналюванні репресії [148]. Ген гексокінази *HpHXK1* *H. polymorpha* клонували за допомогою функціональної комплементування згаданого

подвійного кіназного мутанта. Було встановлено, що гексокіназа дійсно є необхідною для встановлення фруктозної репресії у *H. polymorpha* [149].

У наступних дослідженнях експресію рекомбінантної β -глюкуронідази під альтернативними промоторами генів *MOX*, *FMD*, *MPP1* і *MAL1* *H. polymorpha* у відповідь на моно- та дисахариди було перевірено у мутантів дефіцитних за 1) гексокіназою, 2) гексокіназою та глюकोкіназою, 3) пермеазою мальтози чи 4) мальтазою [126]. Було підтверджено, що глюкоза і фруктоза репресують згадані промотори тільки в тому випадку, якщо транспортуються до та фосфорилуються у клітині. Таким чином, гіпотеза про те, що глюкозо-6-фосфат є сигнальним метаболітом репресії у *H. polymorpha*, отримала додаткову підтримку. Однак було також виявлено, що глюкоза і фруктоза сильно активують експресію промоторів *MOX*, *FMD*, *MPP1* і *MAL1* в подвійному гексокіназному та глюкокіному делеційному штамі, що інтригуючи вказувало на те, що самі нефосфорильовані моносахариди володіють явним промоторо-дерепресуючим ефектом. Також було показано, що дисахариди мальтоза і сахароза повинні бути інтерналізовані і розщеплені на моносахаридів для здійснення ними репресії P_{AOX} . Іншими словами, саме катаболіти моносахаридів запускають сигналювання. Оскільки дерепресія метанол-індукованих промоторів *AOX* і *FMD* у глюкозному середовищі легко відбувається в моногексокіназному, або подвійнихому мутанті, ці штами були запропоновані як господарі для без-метанольної продукції чужорідних білків під контролем одного із зазначених промоторів [126].

Гомолог транспортера гексоз *Gcr1* (**G**lucose **C**atabolite **R**epression) був ідентифікований нами у *H. polymorpha* за допомогою функціональної комплементачії мутанта, резистентного до 2-DG [29]. Дефіцит гена *GCR1* призводив до плейотропного фенотипу, який включав частково порушений транспорт глюкози, і, відповідно, порушення росту на глюкозі, а також конститутивну присутність пероксисом і пероксисомних ензимів у клітинах, що росли на глюкозі. На додаток до глюкози, маноза, трегалоза і фруктоза були нездатні до репресії *AOX* в дельта *gcr1* мутантних клітинах. Встановлено що катаболітна репресія пероксисомних ензимів і біогенезу пероксисом, викликана

етанолом, сахарозою і мальтозою, була інтактними в мутантних клітинах *gcr1*. Певні фенотипові відмінності між сконструйованим *gcr1*-дельта мутантом і вихідним УФ-індукованим *gcr1-2* мутантом, що несе одну амінокислотну заміну S85F [29], [150], свідчили, що Gcr1 бере участь у механізмі глюкозної репресії не як звичайний гексозний транспортер, а радше як специфічний сенсорний білок [29].

Продовження цієї роботи по транспорту та глюкозному сигналюванню, а також біотехнологічне застосування мутантів зі зміненою глюкозною регуляцією описано у розділах 3.1 та 3.5 цієї дисертаційної роботи. Ми пропонуємо, що *HpGcr1* може функціонувати як новий транспортуючий рецептор глюкози, або «трансцептор». Важливо підкреслити, що транспортуючі рецептори або трансцептори для ряду сигнальних молекул добре відомі у дріжджів, і в основному залучені до трансдукції сигналів доступності поживних речовин через шлях РКА (для огляду див. [12], [96]. Однак такі трансцептори раніше не були відомі для глюкози або інших цукрів, хоча деякі кандидати були недавно запропоновані [27].

Щоб з'ясувати, чи присутній Snf1-залежний регуляторний шлях в *H. polymorpha*, *HpTUP1* і *HpSNF1* були ідентифіковані і делетовані [143]. Делеція *HpTUP1* не впливала на глюкозну репресію основних генів метилотрофного метаболізму (наприклад, *AOX*, *DAS*), що свідчило про те, що функція *Tup1* в сигналізації репресії, показана у *S. cerevisiae*, не зберігається в *H. polymorpha*. На відміну від цього, делеція *HpSNF1* порушувала активацію метилотрофних генів у відсутності глюкози, що свідчить про збережену функцію відповідного гена в індукції транскрипції репресованих глюкозою генів. Раніше ідентифікований *Adr1*-подібний фактор [143] був запропонований для взаємодії з *HpSnf1* в такому регулюванні [151].

Нарешті, було продемонстровано, що дефіцит у передбачуваних гомологах транскрипційних репресорів *Mig1* (*HpMig1* та *HpMig2*) у *H. polymorpha*, так само як *HpTup1* гомолога, задіяного у регуляції макропексофагії у *H. polymorpha* [152],

лише частково і диференційно впливає на репресію АOX цукрами і етанолом [153] див. більш детальний опис у Розділі 3.3.).

1.2. Пероксисоми і механізми їх біогенезу

1.2.1. Загальна інформація про пероксисоми

Пероксисоми – це високодинамічні внутрішньоклітинні одномембранні органели, залучені у різноманітні метаболічні процеси. Окислення довголанцюгових і розгалужених жирних кислот, синтез фосфоліпідів, жовчних кислот і холестеролу та окислення D-амінокислот – ключові функції пероксисом у всіх організмах, де вони наявні. Оксидози пероксисом генерують активні форми кисню (АФО) і похідних нітрогену, зокрема гідрогену пероксиду, який детоксифікується у пероксисомах за допомогою ферментів, що розщеплюють пероксид. Саме ця пероксидазна ферментативна активність започаткувала назву цих органел як «пероксисом» [2].

Пероксисомам притаманні специфічні властивості, такі як здатність імпортувати пошкоджені білки, можливість синтезуватися *de novo*, які помітно відрізняють їх від інших органел. Однак вони також демонструють функції, властиві іншим органелам, такі як поділ органел, контрольований рух чи регульована деградація за допомогою автофагії, які є схожими для пероксисом, мітохондрій і хлоропластів [154], [155].

Еукаріотичні пероксисоми характеризуються високим ступенем морфологічної і метаболічної пластичності, що відображає їхню адаптивність до різних умов навколишнього середовища [156]. Їхня форма (зазвичай сферична, витягнута чи ретикулоподібна), розмір (від приблизно 0,1 до 1,5 мкм), кількість, ферментативний склад і функціональні властивості відрізняються залежно від типу клітин і оточення [157]. Для прикладу, у ссавців, пероксисоми знайдені у всіх типах клітин, за винятком сперматозоїдів і еритроцитів, а у печінці вони становлять приблизно 2% від загальної кількості клітинних білків. Методи флуоресцентного мічення дали змогу оцінити кількість пероксисом на клітину, що коливалася від однієї до декількох сотень органел залежно від виду організму,

тканини і зовнішніх стимулів. Для функціонування, успадкування та розподілу пероксисом всі організми потребують цитоскелету мікротрубочок і мікрофіламентів. Однак пероксисоми рослин і дріжджів переважно рухаються вздовж актинових філаментів, тоді як клітини тварин для транспортування пероксисом на великі відстані використовують мікротубулярну мережу [158].

Пероксисоми метаболізують жирні кислоти з довгими (>C22) і розгалуженими карбоновими ланцюгами до менших, з вісьмома чи менше одиницями Карбону, що потім переходять у мітохондрії у формі кон'югатів карнітину для подальшого окислення та виробництва енергії за допомогою дихального ланцюга. Проте деякі катаболіти жирних кислот можуть використовуватися як субстрати для утворення складних ліпідів у межах пероксисом. У нижчих еукаріот, наприклад, у більшості дріжджів й у рослин, L-окислення жирних кислот відбувається тільки у пероксисомах. Пероксисоми рослин виконують дві специфічні функції: 1) при проростанні насіння вони забезпечують енергію та сировинний матеріал для росту шляхом перетворення збережених жирних кислот у вуглеводи за допомогою реакцій гліоксилатного циклу; 2) у листках пероксисоми залучені у фото дихання, метаболізуючи побічні продукти фотосинтезу [159].

Хоча пероксисоми не містять власної ДНК, вони здатні, подібно до мітохондрій автономно реплікуватися завдяки звичайному поділу. Таким чином, біогенез пероксисом залежить від цитозольної трансляції кодованих ядерним геномом білків та їх транспортування до цих органел. На загальне ідентифіковано близько 100 генів у *Homo sapiens* і понад 60 генів у пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що кодують пероксисомні білки [157]. Слід зазначити, що філогенетичний аналіз доводить, що значна частина (приблизно 20%) пероксисомного протеому є альфа-протеобактерійного походження [160]. Також в останні роки стає все більш зрозумілим, що пероксисоми функціонально інтегровані у складну мережу комунікації з іншими внутрішньоклітинними органелами. Наприклад, пероксисоми мають тісні фізичні і метаболічні зв'язки з мітохондріями і ендоплазматичним ретикулумом [161], хоча точний механізм інформаційного

обміну між ними до кінця незрозумілий. Також припускається, що пероксисоми еволюційно з'явилися як архейна клітинна відповідь на передмітохондріальний бактерійний симбіонт, який виробляв активні форми кисню в поєднанні з окисленням жирних кислот (симбіогенетична гіпотеза) [162].

Віднедавня пероксисоми почали визнавати як сигнальні органели і важливі сайти перехресту між декількома сигнальними шляхами, в яких задіяні комплекс-2 туберкулярного склерозу (TSC-2), mTOR, АМФ-активована кіназа (AMP-activated kinase (AMPK)) [163], [164]. Ці пероксисомо-пов'язані сигнальні шляхи відіграють важливу роль у селективній автофагії пероксисом (пексофагії) у ссавців [165].

У людей дефекти в біогенезі пероксисом чи їхньому функціонуванні викликають розвиток захворювань, які називаються хворобами біогенезу пероксисом (Peroxisomal Biogenesis Disorders (PBD)), і, залежно від їхньої природи, викликають різні аномалії та порушення розвитку мозку, що у важких випадках призводять до смерті у ранньому віці [161], [166]. Фізіологічне старіння, а також розвиток таких нейродегенеративних захворювань як хвороби Альцгеймера та Паркінсона, також пов'язані з функціональними дефектами пероксисом [167], [168]. Окрім цього, надмірна кількість пероксисом чи надпродукція активних форм кисню, вироблених у пероксисомах, може збільшувати оксидативний стрес і сприяти прискоренню старіння й розвитку раку [164], [168], [169].

Загалом гомеостаз пероксисом повинен бути адаптованим до метаболічного стану клітини, який забезпечується поєднанням успадкування і біогенезу пероксисом, їхньою проліферацією і рухливістю та видаленням надміру органел автофагією (пексофагією). Нижче наводиться короткий огляд цих процесів, що впливають на гомеостаз пероксисом з акцентом на механізмах, що відбуваються у дріжджах, дослідницькій моделі цієї роботи.

1.2.2. Еволюційне походження пероксисом

Необхідно зазначити, що тільки нещодавно встановлено, що існують очевидні відмінності між апаратом біогенезу пероксисом у дріжджів і ссавців. Для прикладу, у ссавців для біогенезу пероксисом необхідною є функція *PEX16*, тоді як у дріжджів *S. cerevisiae* цей ген є втрачений, що може бути прикладом специфічної і значної редукції геному цих дріжджів (дивитись розділ 3.4 про ідентифікацію потенційних партнерів дріжджового Pex16 у *P. pastoris* (Pex36) і Pex34 у *S. cerevisiae*). Іншим прикладом відмінності є той факт, що перед формуванням пероксисом Pex3 *S. cerevisiae* проходить через ER, тоді як у людських фібробластах цей процес відбувається через мітохондрії [170]. Припускається, що у *S. cerevisiae* пероксисоми гібридного походження (мітохондріальні і ER) не формуються завдяки високоспецифічній метаболічній природі пекарських дріжджів [171]. Відомо, що *S. cerevisiae*, на противагу клітинам ссавців, втратили мітохондріальний комплекс I дихального ланцюга й повністю переключили окислення всіх жирних кислот на пероксисоми, таким чином [162]. Окрім того, у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* і *P. pastoris*, яким також притаманний перерозподіл у катаболізмі жирних кислот у пероксисомах, Pex3 переходить до пероксисом через ER [172], [173]. На цей момент невідомо, чи у таких дріжджів як *Ustilago maydis*, які накопичують жирні кислоти, схожі до тих, які є у ссавців, доповнюючи окисний шлях у мітохондріях, біогенез пероксисом залучає мітохондрії. Слід зауважити, що старіша теорія, яка розглядала походження пероксисоми від іншого ендосимбіонта, ймовірно, актинобактерійного походження з більш древньою і, таким чином, менш ефективною формою окислення, зазнала критики в останні роки [174].

1.2.3. Фізіологічні функції пероксисом дріжджів

Дріжджі є зручною і широко уживаною моделлю у вивченні біогенезу пероксисом та інших механізмів, залучених до їх гомеостазу. Найбільш популярними видами є пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, метилотрофні дріжджі *Pichia (Komagataella) pastoris* і *Hansenula (Ogataea) polymorpha* та алкан-

засвоюючи дріжджі *Yarrowia lipolytica*. Метилотрофні дріжджі є винятковим видом, що дає змогу легко візуалізувати проліферацію пероксисом на середовищі з метанолом й автофагійну деградацію при перенесенні на середовище з глюкозою чи етанолом [175].

Подібно до інших організмів, пероксисоми дріжджів містять оксидази і каталази, що розщеплюють утворений гідрогену пероксид. Ферменти β -окислення жирних кислот і гліюксилатного циклу асоційовані з пероксисомами дріжджів. Наприклад, пероксисоми містять чотири основні ферменти β -окислення та допоміжні ферменти окислення ненасичених жирних кислот і кислот з непарним числом атомів карбону у ланцюзі [176]. У цей же час локалізація ферментів гліюксилатного циклу, зокрема ізоцитрат-ліази, відрізняється у різних видів дріжджів [177]. Недавно було встановлено, що у деяких видів дріжджів окремі ферменти окисної частини пентозо-фосфатного шляху, такі як малатдегідрогеназа, локалізовані і в цитозолі, і в пероксисомах [178]. Крім вищезгаданої каталази, пероксисоми дріжджів також містять інший фермент, що розщеплює гідрогену пероксид, глутатіонпероксидазу [179]. Ферменти, залучені у метаболізм таких нетрадиційних джерел карбону і нітрогену як метанол, *n*-алкани, пурини, D-амінокислоти, метиленамін, етиленамін, піпеколінова кислота, саркозин, гліюклат, спермідин також мають пероксисомну локалізацію в клітинах дріжджів [2]. Відповідно дефекти у біогенезі пероксисом часто ведуть до порушення використання джерел карбону, метаболічні ферменти яких виявляють пероксисомну локалізацію внаслідок перерозподілу до цитозолю, що призводить до того, що ці ферменти стають не функціональними, а міслокалізовані оксидази зумовлюють отруєння гідрогеном пероксиду [180], [181]. Такі субстрати карбону, у свою чергу, діють як проліфератори пероксисом і викликають збільшення їхніх розмірів і кількості. Для прикладу, при певних умовах у хеMOSTатованих культурах пероксисоми метилотрофних дріжджів займають переважну частину клітинного об'єму і формують добре видимі кристалоїди внутрішньоклітинної алкогольоксидази, як представлено на рис. 1.5 (відтворено з [182]).

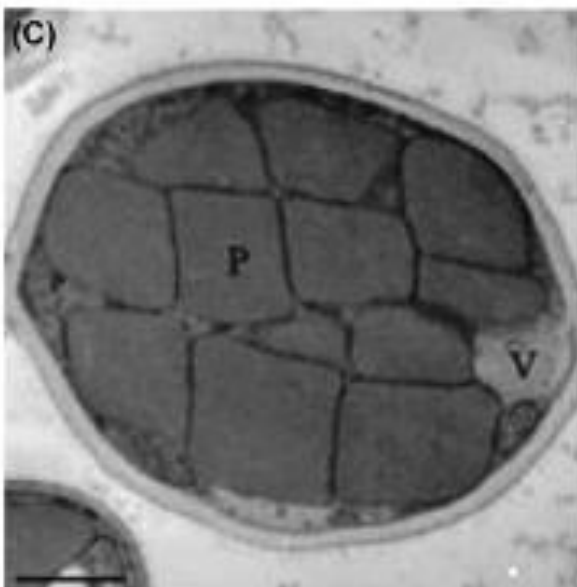
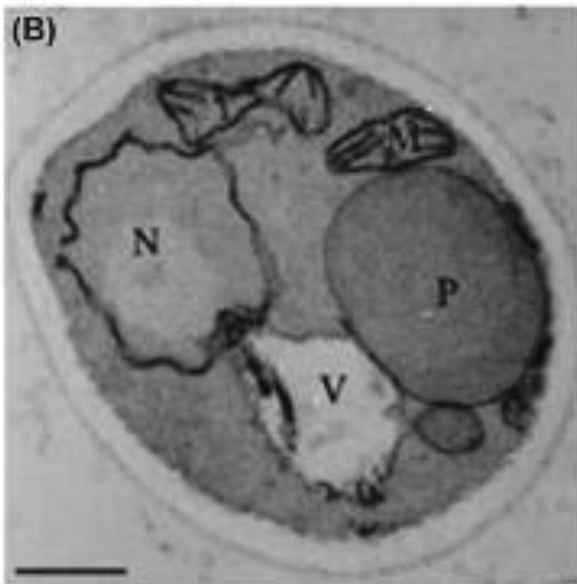
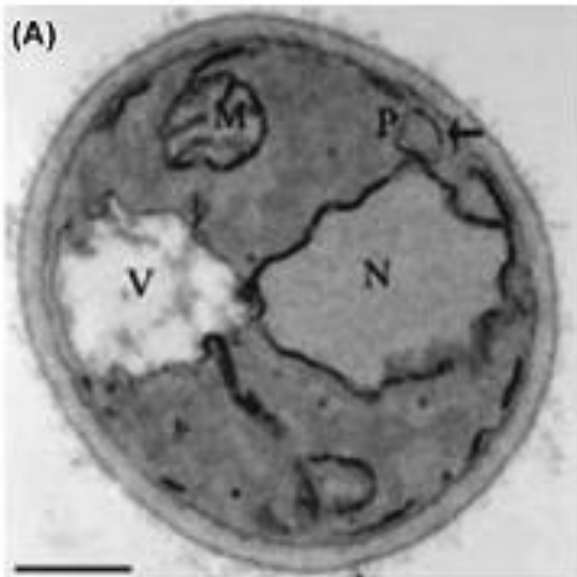


Рис. 1.5. Peroxисоми у клітинах метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. (A) Ріст клітини у середовищі з глюкозою (присутні маленькі пероксисоми). (B) Клітина після перенесення з середовища з глюкозою на середовище з метанолом (пероксисома зростає до великого розміру). (C) Клітини після тривалого культивування на середовищі з метанолом (спостерігається масивна проліферація пероксисом).

Слід зазначити, що в пероксисомах локалізовані тільки ферменти початкових стадій шляху утилізації метанолу, а саме: алкогольоксидаза, каталаза і дигідрокси-ацетонсинтаза, тоді як ферменти, що залучені у детоксикацію та засвоєння формальдегіду та подальші кроки ксилулозомонофосфатазного шляху, є цитозольні.

1.2.4. Імпорт пероксисомних білків і біогенез пероксисом у дріжджів

Унікальною особливістю пероксисом є той факт, що вони можуть імпортувати складні, навіть олігомерні білки, хоча механізм цього явища ще достеменно не з'ясований. Транспорт білків у пероксисоми залежить від трьох консервативних в еукаріотів сигналів доставки до пероксисом (peroxisome targeting signals – PTS). Встановлено також, що транспорт пероксисомних матриксних і мембранних білків (peroxisomal membrane proteins – PMP) здійснюється різними механізмами.

Топогенез PMP залежить від білків Pex3, Pex19 і Pex16. Існуюча концепція імпорту пероксисомних матриксних білків передбачає функціонування низки рецепторів, які можна поділити на чотири групи, відповідно до їхньої функції: 1) впізнавання PTS-сигналів у білках цитозольними рецепторами і складання комплексу рецептор-носій, 2) доставка комплексу рецептор-носій до пероксисомної мембрани, 3) транслокація комплексу в люмен пероксисоми та вивільнення рецептора, 4) рециркулювання вільного рецептора до цитозолу [2], [155], [157].

На сьогодні визначено більше 36 генів, продукти яких необхідні для біогенезу пероксисом (*PEX* генів). Білкові продукти цих генів називаються пероксинами (до них не належать вищезгадані матриксні пероксисомні ферменти). Більшість пероксинів залучені в імпорт пероксисомних матриксних білків [183]. Багато, але не всі з них, були ідентифіковані у дріжджів, в основному у *S. cerevisiae*, оскільки деякі пероксини представлені тільки у вищих організмах.

Структурні аспекти розпізнавання вантажу і стикування рецепторів у PTS1- і PTS2-опосередкованому імпорті крізь мембрану пероксисом обговорюється

детально в огляді [184]. До основних функціонально важливих пероксинів належать рецептори Pex5 (для пероксисомних матриксних білків, що містять PTS1 сигнальну послідовність) і Pex7 (для тих, що містять PTS2 сигнальну послідовність), і пероксисомомо-зв'язані стикувальні білки Pex14, який приєднує обидва Pex5 і Pex7 рецептори, та Pex13, який зв'язує Pex5. Схематичне зображення імпорту пероксисомних матриксних білків наведено на рис. 1.6.

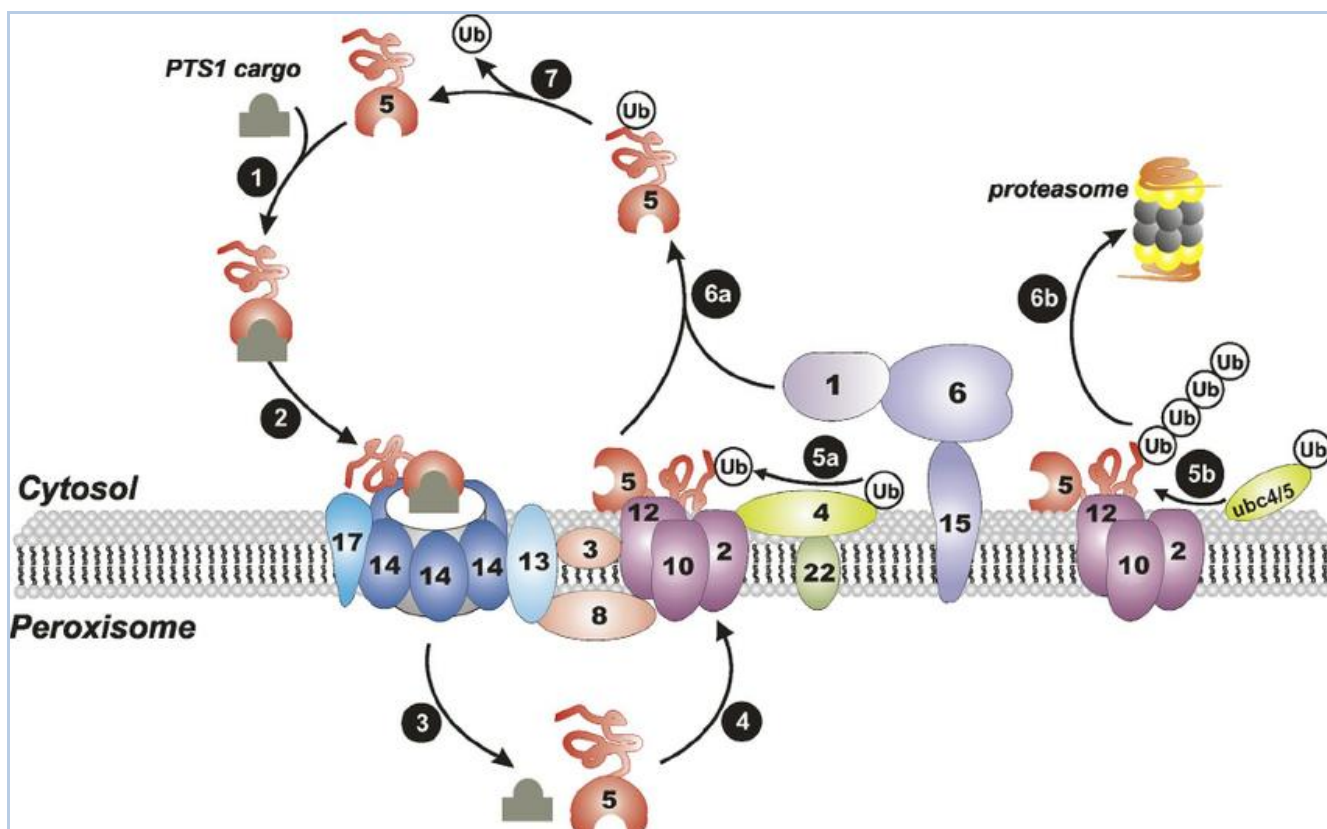


Рис. 1.6. Імпорт пероксисомних матриксних білків (адаптовано з [185]). Процес поділяється на декілька окремих етапів (позначені білими числами у закритих чорних колах). Номери жирним шрифтом вказують на відповідні Pex білки. Представлені етапи: **(1)** Взаємодія рецептор-носій у цитозолі (PTS2 шлях не показаний). **(2)** Приєднання комплексу рецептор-носій до пероксисомної мембрани з комплексом стикування, який включає комплекс транслокони. **(3)** Транслокація комплексу рецептор-носій крізь мембрану з подальшою дисоціацією комплексу рецептор-носій, тобто вивільнення носія. **(4)** Експорт рецептора від пероксисомного матриксу до мембрани. **(5a)** Моноубіквітування рецептора за залишком цистеїну білками Pex4 і Pex2 (для рециклізації рецептора) чи **(5b)** поліубіквітування рецептора за залишком лізину білками Ubc4/5 і Pex10/12 (для деградації RADAR шляхом). **(6a)** Рециклізація рецептора з пероксисомної мембрани до цитозолу за допомогою AAA АТф-аз (Pex1 і Pex6) та

гідролізу АТФ, чи **(6b)** деградація рецептора, що вилучається з рециклізації через RADAR шлях, який залучає протеасому. **(7)** Деубіквітинування рецептора перед наступним колом імпорту. Хвилястою лінією на Pex5 позначений його невпорядкований N-кінцевий сегмент.

Дві консервативні пероксисомні сигнальні послідовності для матриксних білків (C-кінцевий PTS1 і N-кінцевий PTS2 сигнали) було виявлено близько 30 років тому. Еволюція різних типів пероксисомних мішеневих сигналів у древніх еукаріотичних клітин обговорюється у (198).

Як зображено на рис. 1.7, три пероксини, Pex2, Pex10 і Pex12, відомі як RING пероксини, є інтегральними мембранними білками з мотивами «цинкового пальця», які діють як лігази E3 під час етапу рециклізації рецептора. Пероксини Pex1 і Pex6 є АТФ-азами родини AAA, що беруть участь у реорганізації рецепторів. Іншими важливими пероксидами є Pex4, що належить до убіквітин-кон'югуючих ферментів; Pex11, який бере участь у проліферації пероксисом; матричний білок Pex8, який утворює мультибілковий комплекс і бере участь в імпорті пероксисомних білків; два білки, Pex16 і Pex17, пов'язані зі зовнішньою поверхнею мембрани пероксисом і залучені до перенесення РМР до пероксисом через ER. Сучасне розуміння механізму біогенезу пероксисом та імпорту РМРs у дріжджів, узагальнено на рис. 1.7.

1.3. Молекулярний механізм автофагії і його вибіркового напрямку – пексофагії

1.3.1. Загальна інформація про автофагію

Автофагія – це катаболітний процес, в якому клітини контролювано транслюють цитоплазматичні компоненти в лізосому для деградації. Автофагія відіграє важливу роль при виживанні клітин за різних видів стресу, зокрема голодуванні, а також бере участь у підтримці нормального клітинного гомеостазу.

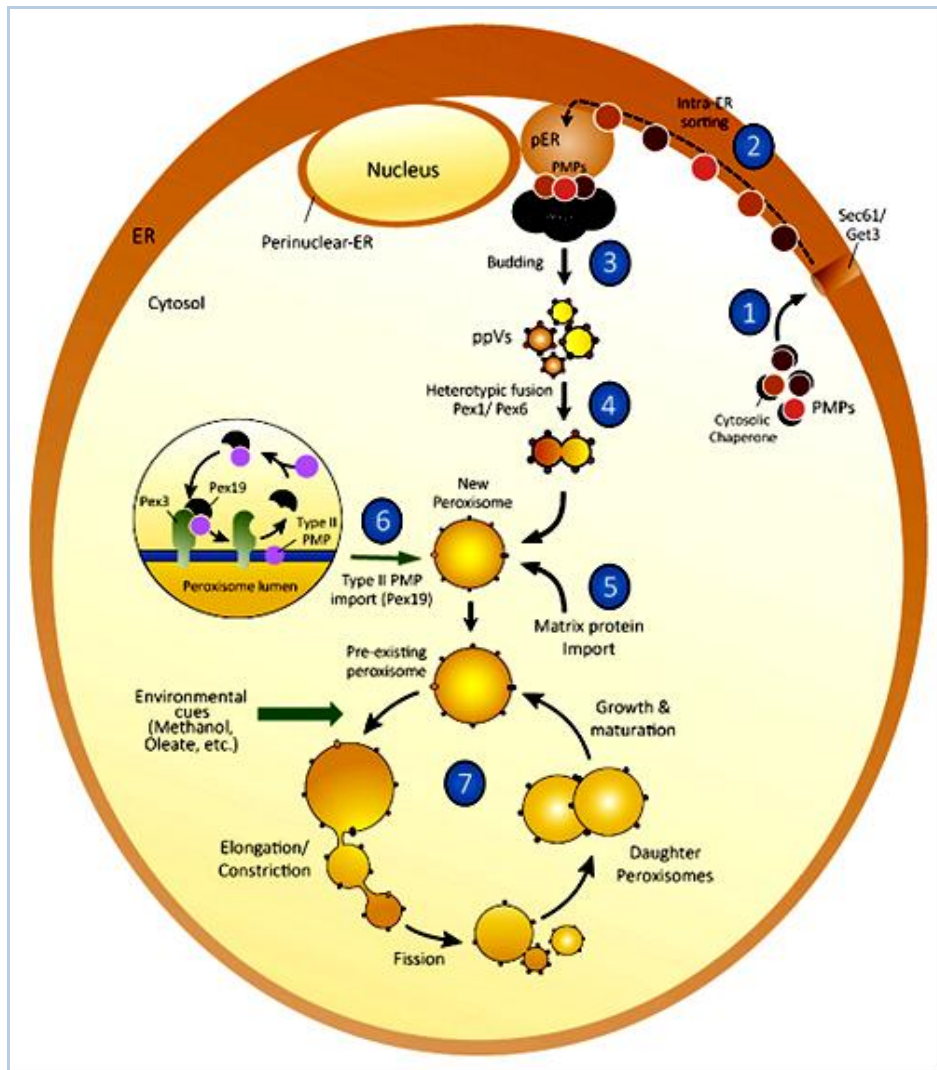


Рис. 100 Схематичне зображення шляхів біогенезу пероксисом (адаптовано з [173]). 1) PMP синтезуються на вільних або на ER-асоційованих рибосомах і пост- або ко-трансляційно включаються в мембрану ER. ER-транслокон, Sec61, важливий для процесу транслокації PMP. 2) Сортування білків у люмені ER спрямовує PMP на відповідні pER домени. 3) PMP експортуються з ER у складі везикул за допомогою Pex19 (а також Pex16 у клітинах ссавців). 4) Везикулярні носії, що містять PMP, зливаються з утворенням імпортомерного комплексу. Процес злиття вимагає пероксинів Pex1 і Pex6. 5) Цей комплекс дає змогу сформованій пероксисомі імпортувати матричні білки і набувати метаболічної активності. 6) PMP типу II включаються безпосередньо в мембрану пероксисом за допомогою Pex3 і Pex19. 7) Шлях утворення пероксисом *de novo* за участю ER також сприяє збільшенню клітинної популяції пероксисом. Використовуючи цей резервний шлях, після введення відсутнього гена в мутантні клітини (такі як клітини *pex3Δ* і *pex19Δ*), у яких відсутні функціональні попередники пероксисом, утворюються пероксисоми *de novo*.

Деградація пошкоджених внутрішньоклітинних органел сприяє очищенню клітин від потенційно токсичних побічних продуктів і дає змогу повторно використовувати компоненти органел для біоенергетичних і біосинтетичних потреб. Селективна деградація органел автофагією має вирішальне значення для регуляції клітинного гомеостазу в еукаріот від дріжджів до людини. Оскільки період напіврозпаду пероксисом становить близько двох днів, пексофагія є високодинамічним процесом, який безпосередньо пов'язаний із біогенезом пероксисом. Дефекти у деградації завдають шкоди нормальному гомеостазу клітини і сприяють нейродегенерації, раку та процесам запалення у людей [178], [181].

Специфічна автофагія забезпечує вилучення пошкоджених мітохондрій, пероксисом, лізосом, ER, хлоропластів і фрагментів ядра [186]. Основний механізм загальної та селективної автофагії залежать від консервативного набору генів, які називаються *ATG* генами [187]. Слід зазначити, що *ATG* гени також важливі для спрямованої доставки лізосомних гідролаз з цитозолу до вакуолі (так званий CVT шлях – cytosol to vacuole tagging) [188]. Важливо, що багато випадків PBD у людей, які раніше пов'язували з дефектами біогенезу пероксисом, насправді можуть виникнути внаслідок порушення деградації пероксисом [189], в якій пероксисомний комплекс AAA-АТФаза відіграє ключову роль [190]. Вплив мутацій у одній з AAA АТФаз Pex6 *H. polymorpha* на гомеостаз пероксисом є частиною цієї роботи, описаною в розділі 3.4.

Нижче наведено сучасне розуміння механізмів, що регулюють знешкодження пероксисом автофагією (пексофагією) у дріжджах.

1.3.2. Фізіологічні ролі пексофагії у дріжджів

Пексофагія є селективним способом автофагійної деградації пероксисом і основним механізмом для зниження чисельності внутрішньоклітинних органел. Завдяки важливій ролі пероксисом у знешкодженні токсичних АФО [163] критичним є гомеостаз пероксисом, що включає формування нових пероксисом, а також видалення пошкоджених або незрілих пероксисом. Вивчення молекулярної

машини пексофагії було розпочато в дослідженнях на пекарських дріжджах *S. cerevisiae* і метилотрофних дріжджах *Pichia (Komagataella) pastoris* та *Hansenula (Ogataea) polymorpha* [2], [191]. У дріжджах пероксисоми швидко індукуються так званими субстратами проліферації пероксисом, такими як олеїнова кислота, або метанол у метилотрофах, але також швидко переміщуються у вакуолі для автофагійної деградації після того, як метаболізм джерела карбону в органелі стає непотрібним. Вважається, що пероксисоми, які містять метанол-окислюючий фермент, є енергетичним тягарем для клітини за відсутності метанолу. При дослідженні механізмів пексофагії у дріжджів дослідники зіткнулися із проблемою, яка полягала в тому, що втрата пексофагічної активності часто не супроводжувалася появою змінених фенотипів, таких як дефекти росту мутантів з пошкодженою пексофагією. Однак недавні дослідження виявили, що пексофагія дійсно важлива за певних умов, які імітують природне середовище або викликають утворення білкових агрегатів в органелі.

Однією з важливих екологічних ніш для мікробів, які метаболізують метанол, є поверхня рослини, що називається філосферою. Відомо, що коливання концентрації метанолу відбувається на молодих листах *Arabidopsis thaliana* у відповідь на щоденні цикли «світло-темрява». Резидентні метилотрофні дріжджі *Candida boidini* реагують на такі коливання індукцією та деградацією пероксисом [192]. Відповідно штами *C. boidinii* $\Delta atg26$ і $\Delta atg30$, в яких відсутні гени *ATG*, необхідні для пексофагії, втратили здатність до проліферації на листках, хоча цей фенотип росту не був очевидний під час метилотрофного росту в лабораторних умовах [191] (рис. 1.8 А).

Пексофагія також відіграє важливу роль у фізіології патогенних видів грибів. Для прикладу, виживання патогенних дріжджів *Candida glabrata* при поглинанні макрофагами господаря зменшується при втраті *ATG* генів, необхідних як для селективної пексофагії, так і для загальної автофагії [193].

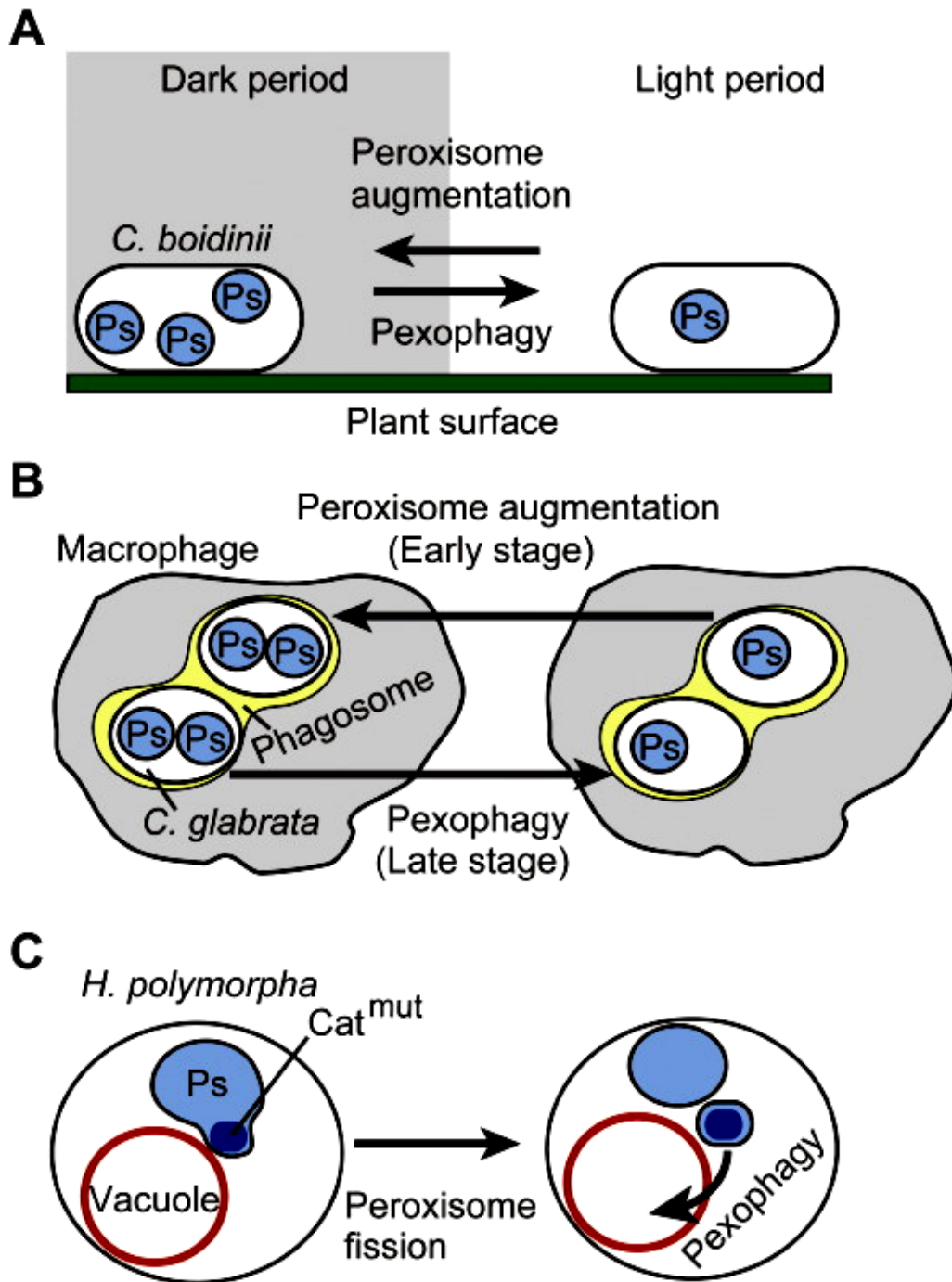


Рис. 1.8. Фізіологічне значення пексофагії у дріжджів (адаптовано з [191]). **(А)** Цикл проліферації пероксисом і пексофагії у *C. boidinii*, культивованих на рослинній поверхні. Ps позначення для пероксисоми. **(В)** Клітини *C. glabrata*, захоплені у фагосому макрофага, індукують проліферацію пероксисом і пексофагії. **(С)** Агрегат, що утворюється всередині пероксисоми внаслідок експресії мутантної каталази (Cat^{mut}), знешкоджується розпадом пероксисоми і пексофагією у *H. polymorpha*.

Інший рослинний патогенний гриб *Colletotrichum orbiculare*, за відсутності Atg26, не в змозі ефективно деградувати пероксисоми, що призводить до порушення його проникнення в рослину-господар [194]. Ці дані дають очевидні приклади фізіологічної важливості пексофагії в природному середовищі.

Пексофагія також відіграє важливу роль у контролі якості пероксисом. Клітини *H. polymorpha*, які експресують агрегуючу форму каталази та накопичують значні кількості АФО, характеризуються помітним дефектом росту на тлі мутації *rex11*, коли розпад пероксисом заблокований, чи у мутанта з пошкодженою автофагією [195] (рис. 1.8С). Ці результати свідчать про роль розпаду пероксисом і процесів пексофагії у відокремленні агрегатів від решти органел і знешкодженню таких відокремлених агрегатовмісних органел шляхом пексофагії. Вважається, що білки, задіяні в деградації пероксисом, беруть участь у біогенезі автофагії мембрани в ділянці часткового руйнування цієї органели, забезпечуючи знешкодження агрегатів, які містяться в пероксисомі [195].

1.3.3. Морфологічні типи пексофагії – мікро- та макропексофагія

Перші дослідження клітин метилотрофних дріжджів, перенесених із середовища з метанолом на середовища з альтернативними джерелами карбону виявили, що пероксисоми дуже швидко захоплюються вакуолею, що є ознакою автофагії деградації, а активність пероксисомної алкогольоксидази та каталази втрачалися впродовж декількох годин [196], [197]. Подальші дослідження продемонстрували два відмінні шляхи (типи) для транспорту пероксисом у вакуолі [198]. Один з цих шляхів, що називається макропексофагією, індукується при перенесенні клітин із середовища з метанолом на те, що містило етанол (рис. 1.9).

Морфологічні особливості цього шляху схожі до тих, які проявляються під час неселективної макроавтофагії (тобто транспортування цитоплазматичних компонентів у лізосоми). При макропексофагії пероксисома повністю оточується подвійною мембранною структурою, яка називається макропексофагосома (МРР), з подальшим злиттям зовнішньої мембрани МРР з вакуолярною мембраною і

вивільненням захопленої органели у вакуолярний просвіт для деградації резидентними гідролазами [202].

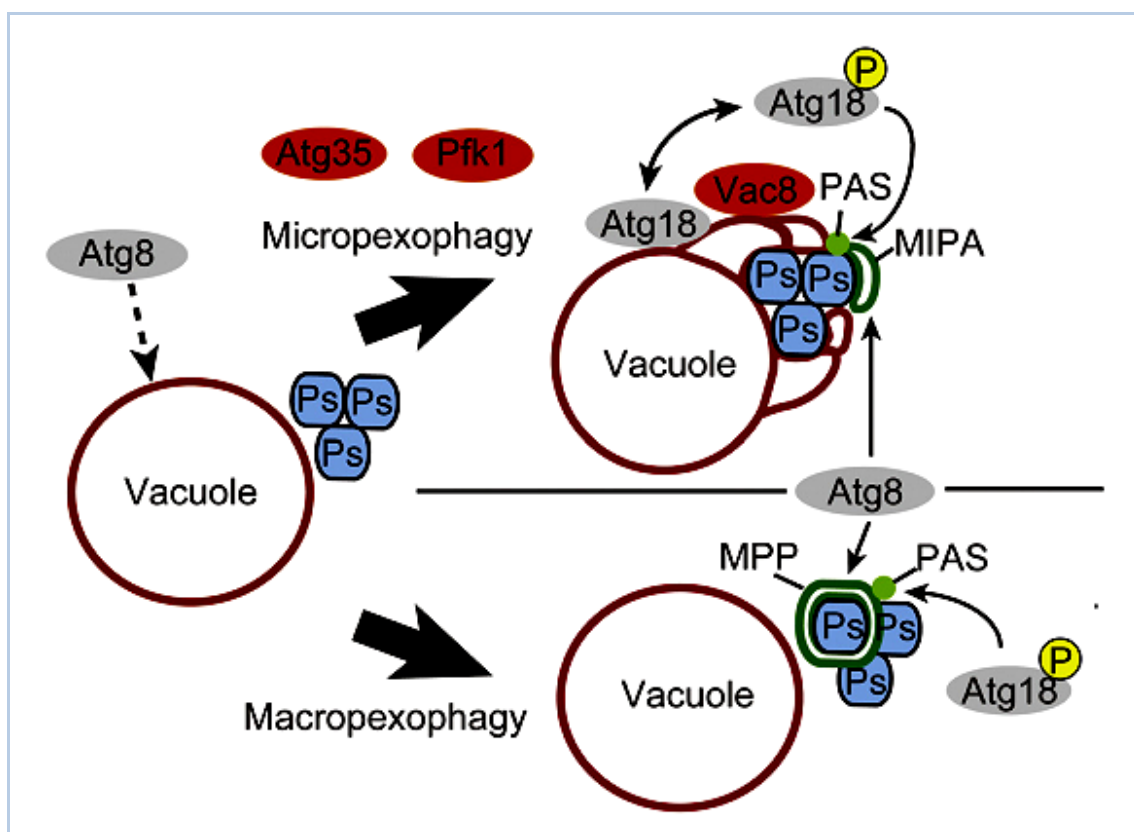


Рис. 1.9. Схематичне зображення динаміки мембран під час реалізації двох шляхів пексофагії у *P. pastoris* (адаптовано з [191]). Білки, необхідні для мікропексофагії, позначені помаранчевим; білки з подвійною локалізацією у вакуолярних і автофагійних мембранах, позначені сірим кольором. Штрих-пунктирна лінія вказує на ліпідонезалежну локалізацію Atg8. Ps – позначення для пероксисом і P у жовтому колі позначає фосфорилування. Скорочення: MIPA – мікропексофагійно-специфічний апарат); MPP – макропексофагосома; PAS – phagophore-assembly site (фагофор-збираючий сайт) чи псевдоавтофагосома структура.

Окрім *P. pastoris* макропексофагія також притаманна для клітин інших видів дріжджів, зокрема для клітин *H. polymorpha*, перенесених з середовища з метанолом на середовище з глюкозою чи етанолом, а також у *S. cerevisiae* при перенесенні клітин, які росли на середовищі з олеатом на таке, що містило глюкозу [199], [200]. Альтернативний, морфологічно відмінний, шлях пексофагії (названої мікропексофагія) відбувається, коли клітини *P. pastoris*, вирощені на середовищі з метанолом, переносили на середовище з глюкозою. У цьому випадку

відбувалося пряме поглинання кластерів пероксисом за допомогою вакуолярної мембрани без утворення додаткових мембран довкола кожної окремої пероксисоми [198]. Під час мікропексофагії плоска структура автофагійної мембрани, яка називається мікропексофаго-специфічний апарат (microperoxophagy-specific apparatus (MIPA)) формується поблизу поверхні пероксисоми потім зливається з випинами вакуолярної мембрани, в підсумку поглинаючи кластер пероксисом [201]. Крім *P. pastoris*, мікропексофагія відбувається у *S. cerevisiae* [202] і *H. polymorpha* (пексофагія, викликана холодом). Однак у *H. polymorpha*, процес мікропексофагії подібний до неселективного шляху автофагійної деградації при обмеженні джерела нітрогену і називається мікроавтофагією пероксисом [203].

1.3.4. Молекулярний механізм пексофагії в дріжджах

1.3.4.1. Специфічні фактори макро- та мікропексофагії

Виявлення двох різних типів пексофагії у *P. pastoris* спонукало декілька наукових груп до подальших досліджень, спрямованих на розшифрування конкретних молекулярних механізмів. Слід підкреслити, що обидва шляхи пексофагії мають, в основному, спільні зі загальною (неспецифічною) автофагією етапи або молекулярні складові.

Відповідно до даних [2], [204], ці елементи (або білки) в дріжджах можуть бути поділені на такі групи: білки, що беруть участь у 1) клітинному сигналюванні для індукції автофагії, наприклад, протеїнкіназа Tor1, протеїнкіназа А, Sch9, Tap42 і фосфатаза типу 2А; 2) упакування органел, спрямованих на деградацію (Atg19, Atg11 і Atg8); 3) формування пре-автофагосомної структури (PAS) (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 і Atg31); 4) везикулярна нуклеація (Atg6, Atg9 і фосфатидилінозитол 3-кіназа); 5) дозрівання везикул (Atg3-5, Atg6, Atg7, Atg8, Atg10, Atg12, Atg14 і Atg16), 6) розпізнавання білків (Atg1, Atg2, Atg18, Atg23 і Atg27); 7) гомотипове злиття ізольованої мембрани (Tlg2); 8) транспорт і гетеротипове злиття автофагосом і вакуолей (v- і t-SNAREs, Ccz1, Mon1 і HOPS

комплекс); і 9) деградацію інтравакуолярних везикул (Atg15, протеїназа А і протеїназа В).

Серед 42 відомих Atg (Autophagy-related) білків (список можна знайти у Supplementary Table S2 у [2]) менше половини [204] є спільними для всіх типів автофагії, тоді як інші є специфічними або для одного із селективних автофагічних шляхів, або характерними для конкретного виду дріжджів. Нижче наведено кілька прикладів. Інші специфічні фактори згадуються в підрозділах про механізми сигналювання пексофагії та динаміки мембран.

До сьогодні Atg24, Atg26, Atg28 і Atg30, Atg35 були ідентифіковані як специфічні білки пексофагії, не притаманні для інших типів автофагії. У *P. pastoris* Atg24, PtdIns-3P-зв'язуючий білок, бере участь у злитті пексофагосом із вакуолярними мембранами в ході мікропексофагії [205]. Примітно, що MIRA і пексофагосоми походять з PAS [191], а декілька Atg білків (Atg11, Atg17 і Atg30) залучені до формування останньої структури [206]. Інший специфічний для пексофагії білок Atg26 є ферментом, а саме ергостерол глюкозилтрансферазою, і бере участь у формуванні MIRA [207], [208]. Цей ензим має як шляхо-специфічні (пексофагія проти загальної автофагії), так і видоспецифічні (метилотрофи *P. pastoris* та *H. polymorpha* проти дріжджів *Y. lipolytica*, що утилізують алкани) функції [208]–[211]. Ідентифікація та характеристика цього білка детально описана в Розділі 3.3 цієї дисертації.

Інший ідентифікований нами специфічний для пексофагії білок *P. pastoris* Atg28 бере участь в обох пексофагійних механізмах (макро- та мікропексофагії) і лише частково впливає на загальну (неспецифічну) автофагію, що індукується дефіцитом нітрогену у середовищі [212], [213]. Детальна інформація про цей білок наведена в Розділі 3.3.

Ще один білок пексофагії Atg30 взаємодіє з пероксисомними мембранними білками, пероксидами Pex3 і Pex14, які задіяні у ранніх стадіях біогенезу пероксисом (див. вище) [214], [215]. Доведено, що N-кінцевий фрагмент, що містив 64 амінокислоти, білка Pex14 *H. polymorpha*, є важливими для ефективної пексофагії [203], [216]. Нещодавно повідомлялося, що пексофагія контролюється

рецептор-білковим комплексом, до складу якого входять пероксини Pex3 і Pex14, пероксисомний рецептор Atg30, риштувальні (скефолд) білки Atg11 і Atg17, білки фагофора Atg8 і Atg37, які беруть участь в організації цього комплексу [217]. Отже, механізми біогенезу та деградації пероксисом, безсумнівно, тісно пов'язані, що свідчить про фізіологічний сенс цього процесу. Крім того, ідентифікований нами і описаний у цій роботі (див. Розділ 3.4, [218]) *P. pastoris* новий пероксин Pdg1/Pex36, очевидно, прямо або опосередковано бере участь у координації біогенезу пероксисом і пексофагії. Також виявлено, що ген *ATG25 H. polymorpha* необхідний для макропексофагії. Atg25, локалізований на пексофагосомах, бере участь на пізній стадії оточення пероксисом або в злитті пексофагосом з вакуолярною мембраною [219], [220].

Як зазначалося вище, різні морфологічні спостереження виявили, що поглинання пероксисом вакуолею індукується тільки у разі мікропексофагії. Крім того, виявлені автофагійні Atg8-вмісні мембранні структури (Рис. 1.9), морфологічно відмінні у двох пексофагійних процесах. Відповідно, для проходження пексофагії необхідні певні генетичні механізми, які визначають специфічну динаміку вакуолярної та автофагосомної мембран цих типів пексофагії.

Цікаво, що динаміка вакуолярних мембран під час мікропексофагії для захоплення кластерів пероксисом, як вважають, залежить від внутрішньоклітинного рівня АТФ, а не від конкретного походження джерела карбону, що відображає енергоємність цього типу пексофагії [221]. Примітно, що мікропексофагія, але не макропексофагія, у *P. pastoris* також залежить від Pfk1, альфа-субодиниці фосфофруктокінази, а каталітична активність цього ферменту є обов'язковою для цієї функції [222]. Також встановлено, що мембранний вакуолярний білок Vac8 був залучений тільки в мікропексофагію, але не в макропексофагію [223], [224]. Слід зазначити, що у делеційного мутанта *vac8* під час мікропексофагії вип'ячування вакуолярної мембрана не утворюється, а скефолд білок Atg11, що бере участь у формуванні автофагійних мембран,

втрачає свою вакуолярну локалізацію, що свідчить про те, що Vac8 опосередковує зв'язування вакуолярної мембрани з PAS і MIRA [224].

Atg35 *P. pastoris* був ідентифікований як Atg28-взаємодіючий партнер і як специфічний елемент, необхідний для формування MIRA і мікропексофагії [225], що описаний у розділі 3.3 цієї дисертації. Цей білок, необхідний для мікропексофагії. Він утворює комплекс з іншим білком Atg17 шляхом взаємодії з ідентифікованим нами Atg28 [212]. Дійсно, Atg28 і Atg35 є не обов'язковими для формування MPP (макропексофагосоми, подвійної мембранної структури, характерної для макропексофагії). Примітно, що під час мікропексофагії утворення Atg17–(Atg28)–Atg35 комплексу відбувається у перинуклеарному просторі, що свідчить про те, що цей компартмент є важливим для регуляції динаміки мембран при мікропексофагії.

Нарешті, виявлено, що мутації в декількох генах *GCN1-4 P. pastoris*, що беруть участь у загальному контролі амінокислот, інгібують пізню стадію мікропексофагії після захоплення кластерів пероксисом вакуолею [226]. Проте, залучений до цього молекулярний механізм залишається нез'ясованим. Крім того, транскрипційний репресор Tup1 *H. polymorpha* виявився необхідним для макропексофагії [152], тоді як дефекти взаємодіючих з ним партнерів Mig1 і Mig2 особливим чином змінювали регуляцію пексофагію [153]; див. також Розділ 3.2). Ці дані вказують на важливість низки транскрипційних факторів у фізіологічному контролі типів пексофагії.

1.3.4.2. Молекулярні механізми трансдукції сигналу при пексофагії

1.3.4.2.1. Розпізнавання глюкози при пексофагії

У деяких видів дріжджів глюкоза, як ефекторний субстрат, запускає пексофагію. Це дозволило припустити, що механізм розпізнавання глюкози включений у трансдукцію сигналу, що ініціює пексофагію. Відповідно до даних біохімічного аналізу, у *S. cerevisia*, мембранний G-білок спряжений рецептор Gpr1 клітинної мембрани в комбінації з його зв'язуючим партнером Gra2, які є регуляторами сАМР-сигнального шляху, є необхідними для пексофагії [227]. Крім

того, два нетранспортуючих глюкозу сенсора Snf3 і Rgt2, які регулюють експресію функціональних гексозних транспортерів (див. Розділ 1.1 вище), не задіяні у мікропексофагії в пекарських дріжджів [228].

Проте, слід зазначити, що подібний до Snf3 і Rgt2 нетранспортуючий сенсор глюкози *P. pastoris* Gss1 був залучений як до глюкозної репресії, так і до пексофагії [26], [135]. Звісно, ці дані щодо регуляції пексофагії білком Gss1 повинні бути додатково перевірені на мутантах з пошкодженим транспортом глюкози, тому що так зване «виключення ефектора» тут може мати місце. Іншими словами, необхідно оцінити, наскільки дефіцит транспорту глюкози (подібний до того, який спостерігається у мутанта *gss1 P. pasoris*), впливає на перебіг мікропексофагії як такої. У *H. polymorpha*, як детально описано в розділі 3.1. цієї дисертації, нетранспортуючий сенсор Hxs1 [229] та потенційний трансептор Gcr1 [29], [30] не є важливими елементами сигналювання глюкози для індукції пексофагії. Однак порушення глюкозної репресії та транспортування цього вуглеводу, ймовірно, опосередковано впливають на процеси пексофагії у цього метилотрофу. Як згадано вище, принаймні для мікропексофагії *P. pastoris*, деградація пероксисом виявилася чутливою до внутрішньоклітинного рівня АТФ [221], і доцільно припустити, що порушення транспорту глюкози призводить до падіння внутрішньоклітинного АТФ. Що стосується макропексофагії у *H. polymorpha* (індукованої як глюкозою, так і етанолом), досі залишається без відповіді питання про те, як той самий спосіб пексофагії індукується двома джерелами карбону з несхожим транспортом і катаболізмом. Слід зазначити, що ще не відомо, чи і як PFK1 субодиниця [222] бере участь у глюкозному сигналюванні в мікропексофагії у *P. pastoris* і чи може вона мати подібну функцію в інших дріжджах.

1.3.4.2.2. MAP кіназне сигналювання в пексофагії

Скринінг цілого генома мутантів *S. cerevisiae*, дефектних у пексофагії, виявив ген *SLT2*, який кодує MAP-кіназу, як необхідний фактор пексофагії, що обумовлює MAP-кіназний каскад у сигналюванні пексофагії [204]. Мутації

факторів, від яких MAP кіназа передає сигнал (протеїнкіназа C (Pkc1), bck1 (MAP кіназа-кінази кінази), і Mkk1/Mkk2 (MAP-кіназа кінази) також впливали на пексофагію, що вказує на те, що цей каскад бере участь у трансдукції сигналу та індукції пексофагії. Важливо, що цей каскад не потрібний для неселективної макроавтофагії у *S. cerevisiae*, хоча обидва процеси (пексофагія і макроатофагія) індукуються однаковими умовами при перенесенні клітин на глюкозне середовище з відсутнім джерелом нітрогену [204]. Подальші дослідження мітофагії виявили, що цей процес, як і пексофагія, також залежить від Slr2 і цього каскаду кіназ [230]. Досі залишається нез'ясованим як і де глюкозо-розпізнавальний і MAP кіназний шляхи взаємодіють під час індукції пексофагії і як ними регулюється формування пексофагійної мембрани.

1.3.4.3. Молекулярні механізми формування PAS та інших пексофагійних мембранних структур

Сайти локалізації більшості білків Atg дріжджів на поверхні вакуолей при індукції автофагії були ідентифіковані за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Цей важливий для формування автофагійних мембран внутрішньоклітинний компартмент був визначений як пре-автофагосомна структура або PAS [231] (Рис. 1.8). Як детально описано в [232] та показано на Рис.1.8, білки Atg збираються до PAS в ієрархічний спосіб. Atg11 і Atg17 рибозомальні білки діють першочергово за інші Atg при формуванні PAS в CVT шляху (selective cytoplasm-to-vacuole targeting), а також неселективній автофагії, індукованій голодуванням, мітофагії та пексофагії [233]–[235]. Як згадувалося вище, Atg17 також є ключовим білком для утворення специфічного для мікропексофагії комплексу Atg17–Atg28–Atg35 [225], а також є критичним для ефективної пексофагії метанол-індукованих органел великих розмірів, що взаємодіють з Atg28 і Atg35 ([225], а також ця дисертація). Таким чином, комплекси, що містять Atg17, є важливими для загальної неселективної автофагії та для селективних специфічних шляхів, таких як мікропексофагія у *P. pastoris*.

Новий білок пексофагії, Atg37, нещодавно був ідентифікований у *P. pastoris* як взаємодіючий з Rex3 партнер [236], який виконує важливу функцію в біогенезі пексофагійних мембран (див. нижче). Слід зазначити, що Atg37 містить домен зв'язування з ацил-СоА і фізично взаємодіє з адаптерним пексофагійним білком Atg30 (див. нижче). Коли його ацил-СоА-зв'язуючий домен мутований, Atg37 неправильно розподіляється при формуванні пероксисомних мембран і комплекс з Atg30 порушується. Приймаючи до уваги той факт, що гомолог Atg37, ACBD5, також бере участь у пексофагії в клітинах ссавців, було висловлено припущення, що ацил-СоА-залежне регулювання пексофагії є консервативним процесом [217]. Ця гіпотеза є обґрунтованою, оскільки залежно від активності бета-окислення в пероксисомах концентрація ацил-СоА змінюється, і таким чином може служити загальним індикатором властивостей пероксисом у різних організмах [191].

1.3.4.4. Адаптерні білки залучені до пексофагії

Беручи до уваги наведені вище дані, виникає питання, як селективність певних типів автофагії, зокрема пексофагії, забезпечується на молекулярному рівні. Останнім часом стало очевидним, що таку селективність підтримують специфічні адаптерні білки (Рис. 1.10).

Перший адаптерний білок пексофагії, Atg30, був ідентифікований у *P. pastoris* [231]. Показано, що цей білок безпосередньо взаємодіє з автофагійними білками Atg11, Atg17 і Atg8, а також з ключовими пероксидами Rex3 і Rex14 [232]. У послідовності Atg30 були знайдені дві функціональні ділянки, одна з яких – амінокислотна послідовність WILF, позначена як «Atg8 взаємодіючий мотив» (AIM), інша містить залишок серину (S112) для взаємодії з Atg11, позначена як «Atg11-зв'язуючий сайт» (11-BS). Відомо, що функціонально подібний адаптерний білок у *S. cerevisiae*, Atg36, взаємодіє з Atg8, Atg11 і Rex3 у цих дріжджів [237]. Хоча *PpAtg30* і *ScAtg36* демонструють невелику схожість послідовностей, вони обидва мають послідовності AIM і 11-BS. Слід зазначити, що функція Atg30 в пексофагії залежала від його статусу фосфорилування. А саме, фосфорилування Atg30 по двох залишках серину поблизу WILF-мотиву

(S71) і в 11-BS (S112), відповідно, є функціонально значущим для пексофагії [3; 3]. Важливо, що Pex3 *P. pastoris* необхідний для фосфорилування Atg30, його взаємодії з Atg11 і пероксисомною локалізацією останньої (Рис. 1.10).

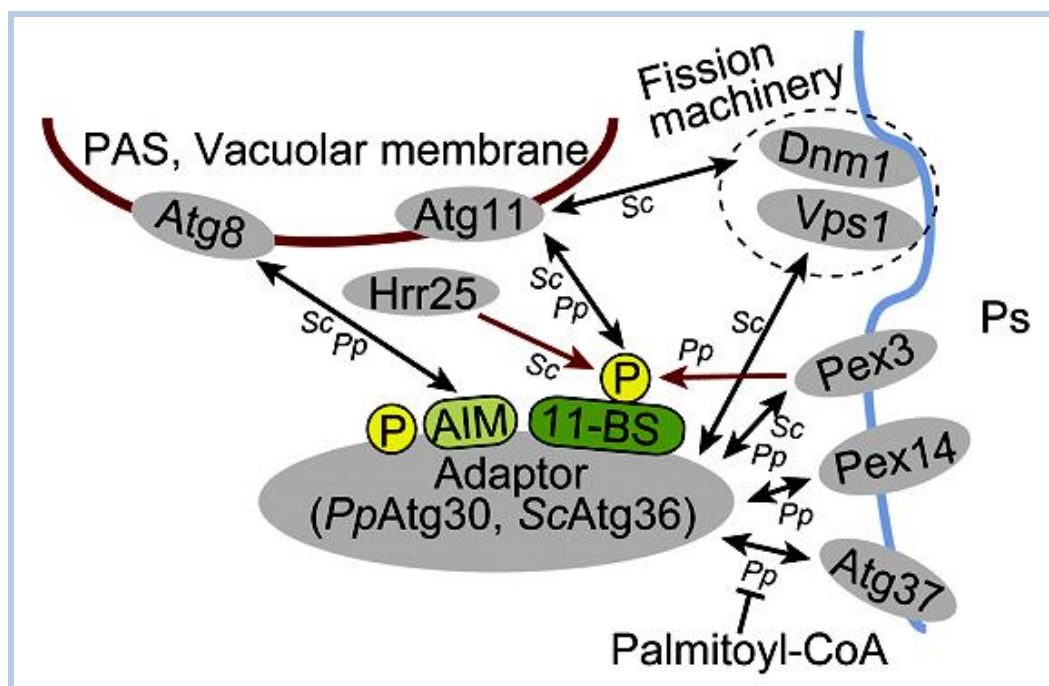


Рис. 1.10. Мережа рiштувальних і адаптерних бiлкiв для формування автофагiйних мембран при пексофагiї у *P. pastoris* (Pp) та *S. cerevisiae* (Sc) (адаптована з [191]). Чорнi стрiлки вказують на встановленi взаємодiї у вказаних організмах. Червонi стрiлки вказують на результат фосфорилування адаптерних бiлкiв, представлених як «P». Передбачуваний Atg8-взаємодiючий мотив (AIM), сайт зв'язування Atg11 (11-BS) і пероксисома (Ps) є представлени на схемі.

Вважається, що Pex3 безпосередньо, можливо в поєднанні з Pex14, зв'язується з адаптерним бiлком Atg30, переміщуючи його до поверхні пероксисом і підтримуючи його фосфорилування. Це, у свою чергу, iндукує його взаємодію з Atg11, тим самим сприяючи формуванню Atg11-залежних автофагiйних мембранних структур, таких як PAS і MIPA [215]. Можливо, iснують видоспецифiчнi вiдмiнностi таких взаємодiй. Наприклад, у *H. polymorpha*, видалення Pex3 з поверхні пероксисом і його протеасомна деградація передує початку пексофагiї [237]. Нещодавно було iдентифiковано кiназу Hrr25, гомолог казеїнової кiнази 1δ, що вiдповiдає за фосфорилування адаптерного бiлка Atg36 *S. cerevisiae*, яка також взаємодiє з Pex3, Atg11 і Atg8 [238] (Рис. 1.10). Hrr25

фосфорилує Atg36 за залишком серину (S97, відповідає S112 в 11-BS PpAtg30), а дефіцит Hrr25 призводить до порушення фосфорилування Atg36 і взаємодії Atg11-Atg36. Слід зазначити, що ця ж кіназа потрібна для активації шляхом фосфорилування адаптерного білка Atg19, необхідного для шляху Cvt [239]. Ці дані свідчать про те, що специфічна кіназа є ключовим компонентом, яка ініціює взаємодію між Atg11 і адаптерними білками, що, у свою чергу, забезпечує селективність для різних автофагійних процесів.

Нарешті, вищезгаданий Atg37 *P. pastoris*, що являє собою інтегральний білок пероксисомної мембрани, був ідентифікований як Rex3 і Atg30, але не Rex14 або Atg8, зв'язуючий партнер [236]. За відсутності Atg37, розпізнавання Rex3 і залучення Atg17 перебувають в межах норми, тоді як рекрутинг Atg11 є значно пошкоджений. Ці дані вказують на роль Atg37 як координатора взаємодії Atg30-Atg11. Така функція може бути збережена в організмі людини, оскільки аналог Ag38 людини, ACBD5, також локалізується в пероксисомах і специфічно необхідний для пексофагії [236]. Останні дані дають змогу припустити, що Rex3 і Atg37 фізично конкурують за регуляцію взаємодії між пексофагійним рецептором Atg30 та кіназою Hrr25 [189].

1.3.4.5. Взаємозв'язки між молекулярними механізмами деградації пероксисом та динамікою вакуолей при формуванні автофагійних мембран

У процесі автономного поділу пероксисом відбувається їхнє накопичення у клітинах. Цей процес у дріжджах опосередковується пероксином Rex11 і двома невеликими динаміноподібними GTPазами, Dnm1 і Vps1 [240]. Нещодавно для *S. cerevisiae* [241] і *H. polymorpha* [195] було досліджено функціональне залучення компонентів апарату поділу пероксисом у пексофагію. Ці дослідження виявили, що пексофагія помітно блокується в мутантах *H. polymorpha* Dnm1 і *S. cerevisiae* $\Delta dnm1 \Delta vps1$ [195]. Пероксисомна локалізація Dnm1 вимагає білків Fis1 і Mdv1, залучених до механізмів поділу мітохондрій, і зберігається у *S. cerevisiae* і *H. polymorpha* [242], [243].

Було встановлено, що у *S. cerevisiae* під час пексофагії як Dnm1, так і Vps1 взаємодіють з пероксисомним адаптерним білком Atg36 і риштувальним білком Atg11 у PAS (Рис. 1.10). Примітно, що динаміноподібні білки можуть взаємодіяти навіть з декількома мутантними формами Atg36, які містять мутації в серинових залишках, необхідних для зв'язування Atg8 або Atg11 [241], що свідчить про те, що взаємодія Dnm1 і Vps1 з Atg36 передуює активації автофагії. Результати нових досліджень також припускають, що Rex11, який часто може бути локалізований на поверхні пероксисом і мітохондрій [244], є об'єднуючою ланкою таких процесів як 1) поділ пероксисом, 2) пексофагія, а також 3) сигналювання від мітохондрій до пероксисом [157], [163]; див. також Розділ 1.2.1 вище)

Аналіз автофагійного білка Atg18 виявив механізм залучений до регуляції динаміки автофагійних і вакуолярних мембранних структур за різних типів пексофагії [245]. (Рис. 1.10). Цей білок також важливий для рециклізації вакуолярних мембранних білків і вакуолярної відповіді при змінах осмолярності [246]. Atg18 має фосфатидилінозитол-3,5-бісфосфат-зв'язуючий домен з кількома консервативними залишками серину, які значно фосфорильовані в умовах, що викликають макропексофагію. Фосфорильовання зменшує зв'язок цього білка з вакуолярною мембраною, що співпадає зі зменшенням ступеня вакуолярного поглинання. Примітно, що Atg18 менш фосфорильований при мікропексофагії. Atg18-залежне регулювання динаміки вакуолярних мембран також відбувається у відповідь на осмотичний або оксидативний стрес [247]. Залишається з'ясувати, чи гомолог ссавців Atg18, WIPI, також бере участь у подібному регулюванні.

Крім того, частина пулу Atg8 була локалізована на вакуолярній мембрані у *P. pastoris*, що культивувалися у метанол-вмісному середовищі. Крім цього Atg8 був задіяний у регуляцію морфології вакуолей у клітинах *S. cerevisiae* при гіпоосмотичному стресі [245]. Вакуолярна локалізація Atg8 не залежала від його кон'югації з фосфатидилетаноламіном, що є необхідним при пексофагії [248] (Рис. 1.10). Таким чином, Atg8, мабуть, має консервативну функцію у формуванні автофагійних мембранних структур, а також у регулюванні динаміки вакуолярної мембрани, з'єднуючи, таким чином, два процеси.

1.4. Метилотрофні дріжджі як об'єкти фундаментальних і прикладних досліджень

1.4.1. Філогенез метилотрофних дріжджів

Постійно зростаюча впродовж останніх десятиліть кількість видів дріжджів з повністю секвенованими геномами дозволила їх порівняльний аналіз і швидкий прогрес еволюційної геноміки дріжджів [249]. Однак, серед численних філогенетичних ліній дріжджів, що репрезентують широкий еволюційний діапазон [250], вибірка геномів залишалася певним чином концентрованою на членах родини *Saccharomycetaceae* і, меншою мірою, так званої «групи СТГ» та інших видів, відповідальних за інфекції людини [249]. На даний час майже половина всіх доступних послідовностей геному дріжджів походить з родини *Saccharomycetaceae*. Ці геноми мають спільну з *S. cerevisiae* загальну глобальну архітектуру геному, яка еволюціонувала після дуплікації всього генома у цієї груп видів. Серед небагатьох послідовностей геномів інших філогенетичних гілок *Saccharomycotina* субфіли *Ascomycota* (тобто, дріжджів, що брунькуються) є *Yarrowia lipolytica* [251], *Pichia (Komagataella) pastoris* [252], [253], *Hansenula (Ogataea) polymorpha* [254], *Dekkera bruxellensis* [255], [256], і *Kuraishia capsulata* [257].

Геном *H. polymorpha* має певні спільні ознаки з геномами *D. bruxellensis*, *K. capsulata* і, в меншій мірі, з менш еволюційно спорідненими *P. pastoris* [257]. Слід відзначити, що *H. polymorpha*, *D. bruxellensis* і *K. capsulata* (але не *P. pastoris*) є нітрат-асимілюючими дріжджами, *H. polymorpha* і *P. pastoris* – метилотрофними, і всі вони очевидно мають спільне походження. Унікальний кластер нітрат-асимілюючих генів, присутній в геномах трьох згаданих видів, що засвоюють нітрати, але не у *P. pastoris* та всіх інших дріжджах з секвенованими на даний момент геномами, складається з гомологів *crnA*, *niaD* і *niiaA* генів грибів, які кодують нітратні транспортери та ензими для перетворення нітратів і нітритів, що свідчить про їхнє можливе походження шляхом горизонтального переносу генів. Незважаючи на те, що механізм цього переносу генів (ancestral acquisition) залишається гіпотетичним, передача великих хромосомних сегментів від грибів до дріжджів демонструє аналогію з іншими документально підтвердженими

інтрогресіями великих хромосомних сегментів між віддалено спорідненими видами дріжджів [258]. Подібний переніс генетичного матеріалу можливо трапився і між грибом і предком вищезгаданих нітрат-засвоюючих дріжджів. Відомо, що кластер генів утилізації нітратів дуплікований у геномі *H. polymorpha*, але не в їхніх близьких родичів [259].

Проте, в цих видах не було виявлено слідів збереження загальної геномної синтениї, що свідчить про древність їхнього спільного походження [257]. Для порівняння, *H. polymorpha* і *O. parapolymorpha* виявляють практично повну синтению, що узгоджується з дуже недавнім їх роз'єднанням [250]. Однак їхня спільна синтения з *D. bruxellensis* стосується лише дуже коротких блоків ДНК, що чітко вказує на широкий еволюційний діапазон часу, охоплений цією групою дріжджів. Тим не менше, консервативні ознаки *H. polymorpha*, *K. capsulata* та *D. bruxellensis* включають також спільну для них нову стратегію відповідності тРНК (tRNA-sparing strategy), різке зменшення відносно інших дріжджів дублювання генів тРНК, і наявність згаданого вище кластера генів асиміляції нітратів [257].

Відповідно до структур тРНК, філогенетичний аналіз на основі окремих дерев генів розміщує дріжджі, що засвоюють нітрати, включаючи *H. polymorpha*, в проміжному положенні між *P. pastoris*, членом родини *Phaffomycetaceae*, і великою групою так званих «СТГ» дріжджів (Рис. 1.11) [257]. Зокрема, дріжджі останньої групи використовують бактерійний тип відповідності для сімейства кодонів Arg CGN і зчитують CUG як серин, тоді як *P. pastoris*, подібно до *Y. lipolytica*, для родини кодонів Arg CGN і Leu CUN використовують еукаріотичний тип. Слід відзначити, що майже всі члени сімейства *Saccharomycetaceae* використовують бактерійний тип розпізнавання для обох вищезгаданих сімейств кодонів. Незважаючи на значну еволюційну дивергенцію, нітрат-асимілюючі дріжджі використовують бактерійний тип відповідності для сімейства кодонів Arg, але зберігають еукаріотичний для кодонів сімейства Leu, підтримуючи таким чином ідею монофілетичного походження цієї групи дріжджів.

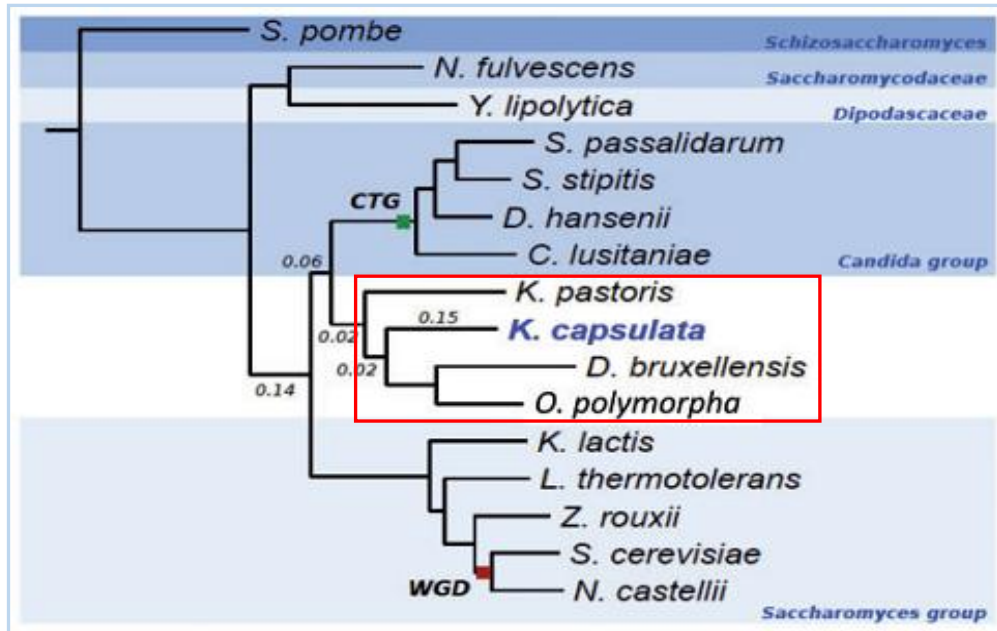


Рис. 1.11. Філогенетичне позиціонування *H. polymorpha* та споріднених дріжджів (адаптовано з [257]). Рисунок репрезентує філогенію *Hansenula (Ogataea) polymorpha* відносно інших 14 видів *Saccharomycotina*, а саме *Saccharomyces cerevisiae*, *Naumovozyma castelli*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Lachancea thermotolerans*, *Kluveromyces lactis*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia (Komagatella) pastoris*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Nadsonia fulvescens* і *Kuraishia capsulata*, а *Taphrinomycotina* дріжджі *Schizosaccharomyces pombe* позиціонуються як outgroup. Основні еволюційні події, такі як повне дублювання геному (WGD) та зміна генетичного коду (CTG) позначені на дереві квадратами.

Як показано на Рис. 1.11, дріжджі *H. polymorpha* філогенетично згруповані з *D. bruxellensis*, *K. capsulata*, тоді як *P. pastoris* представляють близьке відгалуження (outgroup) до цих трьох геномів. Об'єднана група, що складається зі згаданих вище чотирьох видів, очевидно, відокремилася від CTG-групи незадовго після відокремлення їхнього загального предка від дріжджів *Sacchromycetaceae*. Топологія, зображена на Рис. 1.11, загалом збігається з попередніми глобальними даними щодо філогенезу грибів [260].

1.4.2. Метилотрофні дріжджі як експериментальні моделі

Метилотрофні дріжджі відносяться до так званих Crabtree негативних дріжджів, які, на відміну від *S. cerevisiae*, не зброджують і не продукують етанол в повністю аеробних умовах. Це дає їм можливість досягати дуже високої густини клітин в культурах біореакторів і робить їх привабливими як платформи для експресії рекомбінантних білків [3], [261]. Метилотрофні дріжджі характеризуються унікальними ферментатами, залученими в утилізацію токсичного метанолу, а також їх специфічною внутрішньоклітинною компартменталізацією. Багато ензимів, особливо із пероксисомною локалізацією, характеризуються високою надекспресією і строго регулюються джерелами Карбону, і їх промотори використовуються для продукції гетерологічних білків (див. нижче) (Рис. 1.12).

У цій дисертаційній роботі були використані дві основні експериментальні моделі дріжджів. Нижче наведено їх короткий опис.

Pichia (Komagataella) pastoris

Слід зазначити, що вид *Pichia pastoris* зазнав перекласифікації [262], і нові назви видів, такі як *Komagataella pastoris* або *Komagataella phaffii*, можна знайти у більш сучасній літературі (для більш докладної інформації про систематику та організацію геному див. [263], [264]).

Після невдалого впровадження Phillips Petroleum більш ніж сорока років тому для комерційного виробництва білків одноклітинних організмів, метилотрофні дріжджі *P. pastoris* стали на сьогодні найбільш часто використовуваним штамом – господарем для продукції гетерологічних білків. Ці дріжджі відрізняються своєю здатністю рости до дуже високої густини клітин, наявністю сильних і строго регульованих промоторів генів, дуже ефективною секрецією білка і здатністю продукувати рекомбінантні білки в кількостях до грамів на літр культури (див. [265]–[267]). У фундаментальних дослідженнях *P. pastoris* є дуже популярною моделлю дріжджів для вивчення молекулярних механізмів біогенезу та деградації пероксисом [268].

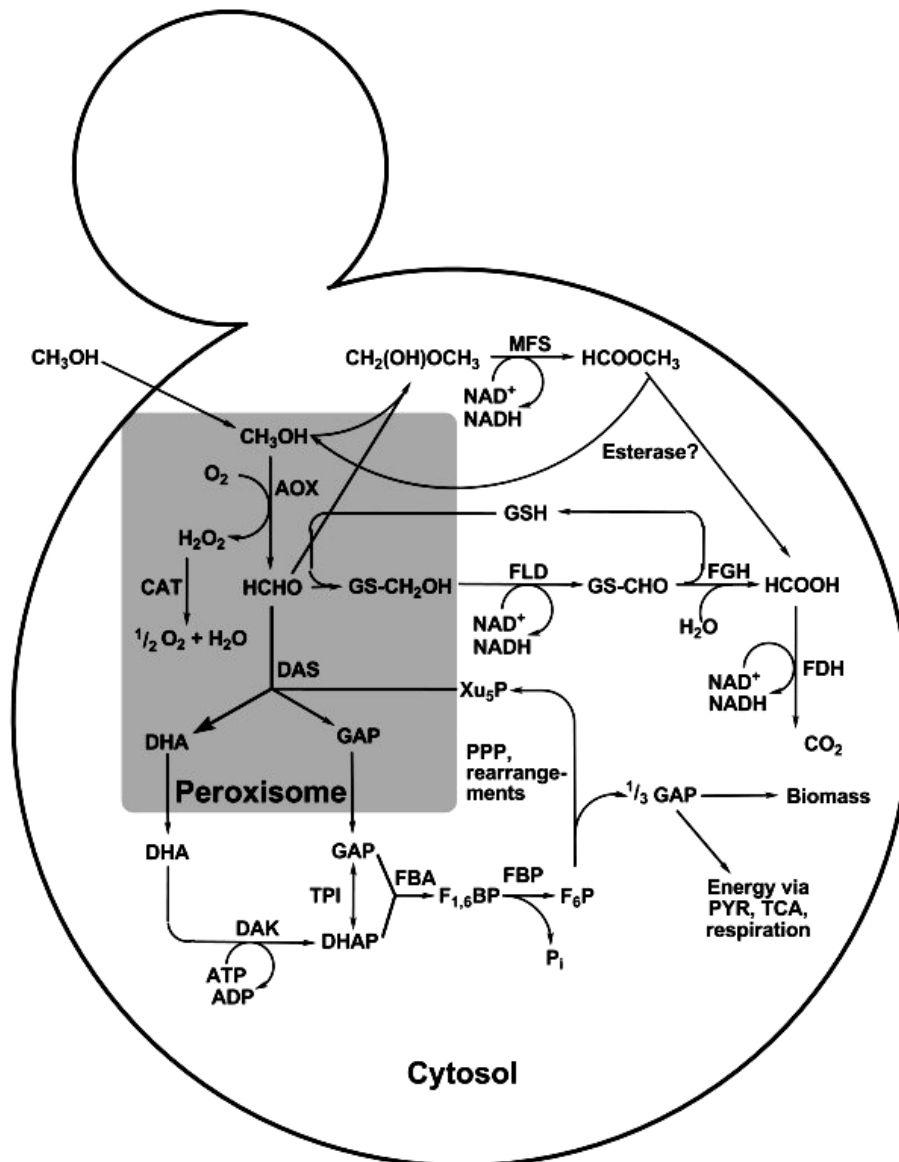


Рис. 1.12 Асиміляційний і дисиміляційний шляхи метаболізму метанолу в метилотрофних дріжджів. Умовні позначення: AOX: алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13), CAT: каталаза (КФ 1.11.1.6), FLD: формальдегідегідрогеназа (КФ 1.2.1.1), FGH: S-формілглутатіон-гідролаза (КФ 3.1.2.12), FDH: форміатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.2), DAS: дигідроксиацетонсинтаза (КФ 2.2.1.3), TPI: тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1), DAK: дигідроксиацетонкіназа (КФ 2.7.1.29), FBA: фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза (КФ 4.1.21.13), FBP: фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ 3.1.3.11), MFS: метилформіатсинтаза; DHA: дигідроксисацетон, GAP: гліцеральдегід-3-фосфат, DHAP: дигідроксиацетонфосфат, F_{1,6}BP: фруктозо-1,6-дифосфат, F₆P: фруктозо-6-фосфат, P_i: фосфат, Xu₅P: ксилулозо-5-фосфат, GSH: глутатіон, PYR: піруват; PPP: пентозо-фосфатний шлях (pentose phosphate pathway), TCA: цикл трикарбонових кислот (tricarboxylic acid cycle)

P. pastoris – гомоталічні гаплоїдні дріжджі, здатні до гібридизації, утворення диплоїдних клітин і продукування аскоспор в умовах обмеження Нітрогену. Зазвичай гаплоїдні ауксотрофні штами або штами, які містять додаткові маркери резистентності до антибіотиків, що дозволяють селективний ріст отриманих диплоїдних клітин, використовують у генетичних схрещуваннях при конструюванні штамів [269].

Як метилотрофний організм, *P. pastoris* може використовувати однуглицевий метанол як єдине джерело Карбону і енергії за відсутності такого репресора як глюкоза. Оскільки *P. pastoris* є облігатним аеробом і надає перевагу дихальному типу росту, продукти ферментації, такі як етанол і оцтова кислота, не накопичуються в культурі, що дозволяє досягати дуже високої біомаси клітин [270].

Також, *P. pastoris* є ефективним секретуючим господарем для рекомбінантних білків, і оскільки в його позаклітинному середовищі містяться лише декілька власних мінорних білків, це дозволяє просту очистку продуктів секреції. Іншою перевагою *P. pastoris* є менш інтенсивне, порівняно з *S. cerevisiae*, гіперманозилування, а також відсутність α -1, 3-маннозилтрансферази, яка продукує високоіммуногенні кінцеві α -1,3-маннозильні епітопи у *S. cerevisiae* [271]. Слід зазначити, що дріжджі глікозилують рекомбінантні білкові продукти, додаючи кор (Man)₈-(GlcNAc)₂ груп, таким чином, виконуючи лише деякі етапи, спільні із тваринами.

Hansenula (Ogataea) polymorpha

Відомо, що дріжджі *H. polymorpha* та їх близькоспоріднений сестринський вид *O. parapolyomorpha* належать до особливої групи нітрат –асимілюючих метилотрофних дріжджів, які неодноразово були перекласифіковані, і нові синонімічні назви видів, такі як *Pichia angusta* або *Ogataea polymorpha*, можна знайти у недавній літературі (для більш докладної інформації див. [250], [263], [272], [273]).

H. polymorpha успішно використовуються як платформа для експресії рекомбінантних білків. Особливість цього виду полягає в тому, що це надзвичайно термотолерантні дріжджі, здатні рости за температури до 45°C і навіть вище, а також стійкі до важких металів і оксидативного стресу [274], тому вони добре підходять для продукції термостабільних ферментів і білків. Система експресії *H. polymorpha* також відома завдяки високій стабільності штамів-продуцентів, що дуже важливо для великомасштабного виробництва [275]. Пероксисомні мембрани у *H. polymorpha* можуть бути зручним сайтом локалізації для мембрано-асоційованих рекомбінантних продуктів [276] (Рис. 1.13).

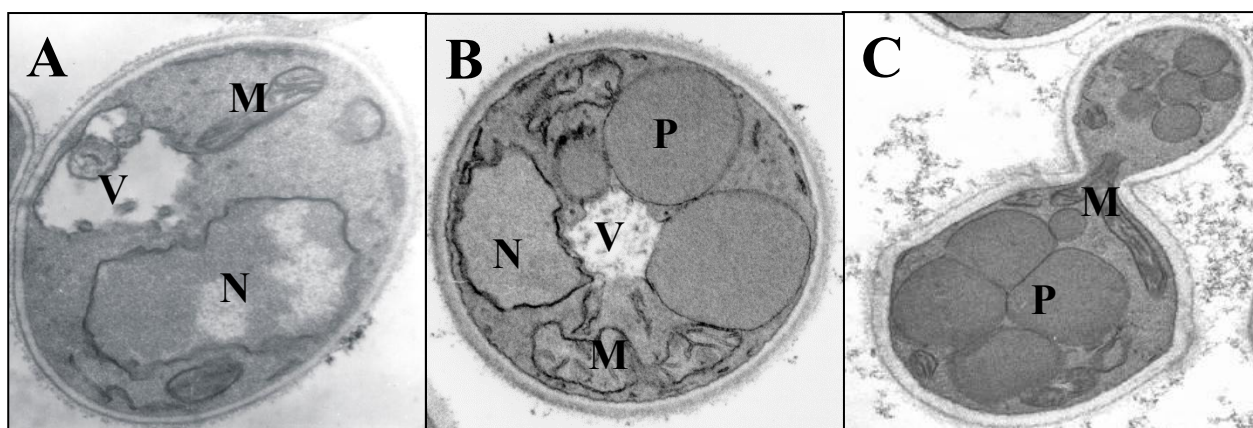


Рис 1.13. Індукція пероксисом у клітинах *H. polymorpha* (адаптовано з [3]). (А) клітини вирощували в періодичній (batch) культурі за присутності глюкози, (В) клітини вирощували за присутності метанолу, (С) клітини вирощували в культурі хемостату на метанолі для максимальної індукції P_{AOX} . Великі кристалоїди білка АОХ, щільно спаквані в пероксисомах, і внутрішньоклітинний об'єм, який вони займають, свідчить про сильний P_{AOX} . Скорочення: N – ядро, М – мітохондрія, Р – пероксисоми, V – вакуолі.

1.4.3. *H. polymorpha* як платформа для експресії рекомбінантних білків

Впродовж багатьох років для продукції рекомбінантних білків, включаючи біофармацевтичні препарати, харчові та кормові ензими і протеїни для структурних досліджень, успішно використовувалися різні системи експресії дріжджів. Хоча *S. cerevisiae* є одним із найкраще генетично охарактеризованих еукаріотичних організмів, протягом досить тривалого часу найбільш часто використовуваними видами дріжджів для експресії гетерологічних білків є

P. pastoris (для огляду: [277]–[282]). Для цього виду та інших метилотрофних дріжджів доступність комерційних наборів для експресії і великих колекцій штамів, широкий спектр інтеграційних векторів і ауксотрофних або доміантних маркерів селекції, дозволяють інтегрувати в геноми контрольовану кількість копій касет експресії. Промотори генів, що використовуються для продукції рекомбінантних білків, які є строго регульовані джерелами Карбону, і ефективні протоколи трансформації у поєднанні з добре розробленими великомасштабними методами ферментації роблять цю платформу для експресії дуже привабливою у плані біотехнологічного застосування. На додаток до таких поширених властивостей дріжджів, як здатність до складних посттрансляційних модифікацій, а також те, що вони не є пірогенними чи патогенними, що дуже важливо для фармацевтичних білків, метилотрофні дріжджі також відомі тим, що здатні секретувати рекомбінантні білки більш ефективно, ніж інші дріжджі. Деякі метилотрофні дріжджі вже мають статус GRAS (Generally Regarded As Safe), тобто загалом вважаються безпечними для застосування в харчовій промисловості [3].

Подібно до *P. pastoris*, як Crabtree-негативні дріжджі, *H. polymorpha* можуть досягати високих виходів біомаси та ефективно адаптуватись до умов біореактора. Що стосується продукції гетерологічних білків, то *H. polymorpha* ефективно секретує їх і проявляє меншу ступінь гіперманозилування та відсутність кінцевих імуногенних залишків α -1,3-маннози, які вважаються алергенними, у порівнянні з *S. cerevisiae* [283]–[285].

Кілька рекомбінантних продуктів, отриманих на основі платформи експресії *H. polymorpha*, досягли комерційного ринку, а саме вакцина проти гепатиту В Неравах-Gene (Crucell, NL), інсулін і інтерферон альфа-2 (Rhein-Biotech, DE). Крім того, *H. polymorpha* отримав статус GRAS як продуцент харчових ферментів [261]. Оскільки частина цієї дисертаційної роботи стосується розробки нової модифікованої платформи на основі *H. polymorpha* для експресії рекомбінантних білків, її коротка характеристика представлена нижче. Для більш глибокої додаткової інформації про систему експресії *H. polymorpha* див. огляди [3], [261], [286], [287].

Штами, використані для експресії гетерологічних білків

Існують три основних штами *H. polymorpha*, які мають незалежне походження. Для біотехнологічних застосувань використовують, в основному, похідні штамів CBS4732 і DL-1, тоді як штам NCYC495 використовується переважно у фундаментальних дослідженнях [263]. Нещодавно штам DL-1 був перекласифікований як сестринський вид *Hansenula (Ogataea) polymorpha* – *Ogataea parapolymorpha* [250], [288]. Всі природні ізоляти *H. polymorpha* є гомоталічними і їх розмноження відбувається вегетативно за допомогою брунькування. Для *H. polymorpha* добре розроблені методи класичної і молекулярної генетики [261], [274].

Вектори *H. polymorpha*

Існує багато варіантів векторів *H. polymorpha*, які забезпечують реплікативну або інтегративну експресію гетерологічних генів у штамі господаря [289]. Серед ауксотрофних маркерних генів найбільш часто використовуються нативний і гетерологічний *LEU2* і *URA3*. У цій дисертаційній роботі описано нещодавно опрацьований гетерологічний ген *ADE1* дріжджів *P. pastoris* для виділення мультикопійних трансформантів та нативний ген *FLD1* дріжджів *H. polymorpha* під вкороченим промотором GAP як новий селективний маркер у *H. polymorpha* [290], [291]. Сконструйовано широкомасштабну векторну систему дріжджів (CoMedTM), яка забезпечує універсальний підхід трансформації/експресії для низки дріжджів, а саме: *H. polymorpha*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Arxula adeninivorans* і *Kluyveromyces lactis*. За своєю базовою формою вектор складається з генетичних модулів, які функціонують у всіх вищезгаданих дріжджах, відповідного маркера селекції та касети експресії під контролем промотора TEF1 з різних джерел [292].

Ефективні стратегії заміни генів, рециклізації маркерів та введення декількох гетерологічних генів є істотними для розроблених платформ експресії. На додаток до контр-селекційної стратегії з використанням маркера *URA3*, яка традиційно застосовувалася у дріжджів, були також розроблені більш передові

підходи, такі як системи Cre/loxP і Flp/FRT, що базуються на рекомбіназах. Ці системи діють за допомогою активного вирізання фрагментів маркерного гена, щоб забезпечити послідовні цикли делецій у декількох видів дріжджів, в тому числі і *H. polymorpha* [293]. Слід зазначити, що частота гомологічної проти негомологічної рекомбінації при інтеграції чужорідних фрагментів ДНК в геном *H. polymorpha* є значно нижчою, ніж у *S. cerevisiae* [275].

Позитивні маркери селекції, такі як гени резистентності до генетицину або зеоцину, зазвичай застосовуються в *H. polymorpha* для отримання мультикопійних трансформантів з різними векторами. Однак стало очевидним, що не завжди існує лінійна кореляція між кількістю копій касети експресії і рівнем експресії протеїну, особливо для секреторних рекомбінантних білків [294]. Наприклад, дослідження секреторної продукції альбуміну сироватки людини у *H. polymorpha* показало, що впливу дози гена на експресію не спостерігалось, а однієї копії оптимізованої касети експресії, інтегрованої в локус *AOX*, було достатньо для максимальної експресії білка [295].

Промотори генів для регулювання експресії рекомбінантних білків

Платформа експресії *H. polymorpha* базується на сильних, строго регульованих промоторах генів шляху утилізації метанолу (Рис. 1.13), що кодують алкогольоксидазу (*AOX*) та форміатдегідрогеназу (*FMD*) [3], [129]. На відміну від системи експресії на основі промотора *AOX1 P. pastoris*, яка строго вимагає метанолу для індукції, P_{AOX} *H. polymorpha* сильно дерепресується за умов вичерпання глюкози, таким чином, підтримуючи процес ферментації без присутності метанолу. Також промотор гена *FMD H. polymorpha* часто використовується для регуляції продукції рекомбінантних білків [296]. Крім метилотрофних промоторів, у *H. polymorpha* використовують нативні та гетерологічні конститутивні промотори, напр. гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAP*) (313).

Інші підходи та методи

Повна послідовність геному дріжджів *H. polymorpha* є встановленою і доступною он-лайн для штаму NCYC495 за посиланням:

(<http://genome.jgi.doe.gov/Hanpo1/Hanpo1.home.html>),

що дозволяє проводити ефективний скринінг для гомологів генів і застосовувати різні системні біологічні підходи до даного виду.

Нещодавно було встановлено, що *H. polymorpha* відрізняється від *S. cerevisiae* або *P. pastoris* тим, що має унікальну частоту використання кодонів. Навіть кодон-оптимізовані гени, які добре експресуються в *S. cerevisiae* і *P. pastoris*, можуть бути неефективно експресовані в *H. polymorpha*. Тому, слід уникати рідкісних кодонів, коли розробляються універсальні оптимізовані генні версії для експресії в панелі господарів, що включає і *H. polymorpha* [297].

Крім того, як і у випадку з *P. pastoris*, були проведені початкові дослідження *H. polymorpha* з метою конструювання штамів-господарів для «гуманізованого» (за людським типом) глікозилювання рекомбінантних білків [298]. Результатом цих досліджень стали штами *H. polymorpha*, здатні продукувати глікопротеїни, що містять, головним чином, триманнозильний коровий N-глікан (Man3GlcNAc2) (315).

Відомо, що правильний фолдинг білків в ендоплазматичному ретикулумі (ER) дріжджів є дуже важливим фактором, оскільки визначає, чи ввійде білок в рекомбінантний секреторний шлях або стане мішенню для ER-асоційованої деградації (ERAD), таким чином, впливаючи на продуктивність синтезу. У літературі повідомлялося, що збільшення дози геуа кальнексину, який відповідає за згортання і якісний контроль глікопротеїнів, підвищує секрецію рекомбінантних білків у *H. polymorpha* [299]. Також було описано шлях поліпшення процесингу секреторних білків у *H. polymorpha* через зміни послідовності поблизу сайту процесингу секреторної послідовності [300].

H. polymorpha, подібно до *P. pastoris*, можуть при культивуванні досягати високої густини клітин і секретувати рекомбінантні білки з виходом 13,5 г/л, як показано у випадку фітази [301]. Стандартні підходи до регламенту ферментації у

H. polymorpha детально описано в [302]. Подібно до *P. pastoris*, для підтримки росту використовують визначене мінімальне мінеральне середовище, що містить солі, вітаміни і мікроелементи. В залежності від використаних промоторів (FMD чи АОХ) розроблено стратегії ферментації з використанням глюкози або гліцерину на першому етапі, з наступним обмеженням джерела Карбону на другому етапі [302]. Варто відзначити, що нещодавно з'явився один із перших прикладів порівняльного аналізу продукції ротавірусу VP6, де *H. polymorpha* перевершував як *P. pastoris*, так і *E. coli* під час культивування в біореакторі, але не в періодичних культурах колб при струшуванні [303].

Промислове, фармацевтичне та інші застосування *H. polymorpha*

Хоч і не так часто як *P. pastoris*, *H. polymorpha* використовувалися для продукції низки рекомбінантних білків, зокрема, ферментів: глюкозооксидази [290], [304], фітази [301], гліколатоксидази та каталази [305], ізопеніцилін-N синтази [306], фібринолітичної рекомбінантної стафілокінази [307]; та фармацевтичних препаратів: IFN α -2a [308], інтерлейкіну-6 [309], рекомбінантного сироваткового альбуміну людини [310].

Як уже згадувалося, рекомбінантна вакцина проти гепатиту В, вироблена в *H. polymorpha* [311], була комерціалізована. Виявлено, що поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HbsAg), продукований *H. polymorpha*, вбудовується в ліпідні мембрани дріжджів. Інші дослідження показали, що така структура ліпопротеїнових псевдовірусних частинок є суттєвою для антигенності HBsAg [312]. Індукція метанолом, яка рутинно використовується для високого рівня продукції рекомбінантних білків у *H. polymorpha*, є сприятливою умовою для надсинтезу ліпідних мембран (наприклад, пероксисом). Так, кодон-адаптований HPV52L1 ген, що кодує рекомбінантний білок папіломи людини (human papilloma virus), нещодавно був успішно експресований в *H. polymorpha*. Було виявлено, що цей білок, подібно до HBsAg, може утворювати вірусоподібні частинки у клітинах штаму-господаря [297], [313].

Нещодавно *H. polymorpha* стали новою перспективною дріжджовою «фабрикою» для виробництва біопаливного етанолу з пентози ксилози [314]. Кілька гетерологічних білків були успішно експресовані в штаммах *H. polymorpha* – поліпшених ферментаторах ксилози, а саме: бактерійна ксилозоізомераза [315], [316], амілолітичні ферменти альфа-амілаза і глюкоамілаза з дріжджів *Schwanniomyces occidentalis*, ендоксилаза з гриба *Trichoderma reesei*, а також бета-ксилозидаза гриба *Aspergillus niger* [317].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

У роботі використані хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм: «Sigma» (США), «Fluka» (Німеччина), «Reanal» (Угорщина) «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Ferak» (Німеччина), «Promega» (США), «Difco» (США). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва – «хч» та «осч».

2.2. Штами мікроорганізмів

Колекційні та сконструйовані чи селекціоновані мутантні штами метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, *P. pastoris*, пекарських дріжджів *S. cerevisiae* та бактерій *E. coli*, що використовувались у даній роботі, представлені у таблицях розділу нижче.

2.3. Вектори та праймери ПЛР

Вектори та праймери ПЛР, використані у цій роботі перелічено у таблицях розділу нижче.

2.4. Поживні середовища

Штами *H. polymorpha* вирощували при 37°C а *P. pastoris* при 30°C у багатому середовищі YPD (1% дріжджовий екстракт, 2% бактопептон, 1% глюкоза), YPS (1% дріжджовий екстракт, 2% бактопептон, 1% сахароза), YPE (1% дріжджовий екстракт, 2% бактопептон, 1% етанол), мінеральному середовищі YNB (0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco)), або мінеральному середовищі Беркгольдера (СБ) наступного складу, у г/л: KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; дріжджовий екстракт «Difco» – 0,5. Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактори росту – лейцин, метіонін, аденін в концентрації 40-50 мг/мл. Концентрація джерел вуглецю становила 1% (масовий або об'ємний), якщо не вказано інакше. Агаризовані середовища містили агар (2%). Селекцію трансформантів *H. polymorpha* проводили на агаризованому

середовищі з зеоцином (130-300 мг/л), чи генетицином (0,3-1 г/л). Для створення середовища з дефіцитом азоту використовували синтетичне середовище YNB без амінокислот та сульфату амонію (YNB 0,17%).

Середовища стерилізували автоклавуванням; водні розчини нестабільних сполук фільтрували через нітроцелюлозні фільтри (0,2 мкм) і додавали до середовищ після охолодження безпосередньо перед використанням. Агаризовані середовища для бактерійних, і дріжджових штамів містили 1,5% агар.

Для біохімічних експериментів дріжджі культивували до середини логарифмічної фази росту в колбах на качалці при 220 об./хв, якщо не вказано інакше. Біомасу клітин (в одиницях оптичної густини (OD_{600}) визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі «Helios-γ» при довжині 600 нм у кюветі 1 см.

Бактерійні штами вирощували при 37°C на середовищі LB. Для селекції плазмідовмісних бактерій додавали ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

2.5. Біохімічні методи

2.5.1. Отримання безклітинних екстрактів. Безклітинні екстракти отримували двома способами: 1) екстракцією білків трихлороцтовою кислотою (ТХО), та 2) з використанням скляних кульок «балотіні».

Для приготування безклітинних екстрактів з використанням ТХО до осаду відмитих від культуральної рідини клітин додавали 0,4 мл 12,5% трихлороцтової кислоти. Отриману суспензію клітин витримували не менше 2 год при -70°C і осаджували центрифугуванням протягом 3 хв при 14000 об./хв. Осад двічі промивали 0,5 мл 80% розчину ацетону, підсушували при кімнатній температурі і ресуспендували в 0,1мл лізуючого буферу (1% SDS+0,1 М NaOH). До одержаного лізату додавали рівний об'єм двократного буферу Леммлі (62,5 мМ Тріс-HCl, рН 6,8, 1 мМ ЕДТА, 2% SDS, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,4% бромфеноловий синій).

Для приготування безклітинних екстрактів з використанням кульок до осаду відмитих від культуральної рідини клітин додавали 50 мМ К-фосфатний буфер, рН

7,5 з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфторид) до кінцевої концентрації клітин 50-100 мг/мл. Одержану суспензію переносили у пластикові пробірки –Епендорф” та додавали скляні кульки (діаметр 0,45-0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували на методом вібрації протягом 15 хв при +4°C з охолодженням на льоді через кожні 5 хв Для отримання безклітинного екстракту гомогенізували центрифугували протягом 20 хв при 14000 об./хв при +4°C на мікроцентрифузі. Супернатант після додавання додаткової порції PMSF (до 1 мМ концентрації) використовували для подальшого аналізу.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі та співавторами [318], використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

2.5.2. Визначення активностей ферментів. Напівкількісний аналіз активності пероксисомної алкогольоксидази (АОХ) в дріжджових колоніях на агаризованому середовищі проводили згідно з протоколом, описаним у [319].

Кількісне визначення активності АОХ проводили або *in situ* в пермеабілізованих дигітоніном клітинах дріжджів, або у безклітинних екстрактах [320]. Питому активність АОХ визначали за кількістю продукованого перекису водню за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка або клітин. Перекис водню аналізували фотометрично за утворенням кольорового продукту пероксидазного окислення о-дианізидину або АВТS.

Визначення питомої активності глюкозооксидази проводили згідно з опублікованими раніше методом [304]. Активність β-галактозидази визначали як описано раніше для *S. cerevisiae* [219].

2.5.3. Аналіз транспорту глюкози/фруктози. Транспорт радіоактивно міченої глюкози в клітину визначали згідно з методом, описаним у [321] з модифікаціями. Клітини підрощували на мінеральному середовищі з різними концентраціями глюкози та фруктози до середини експоненційної фази росту та осаджували при оптичній густині 60 мг/мл. Поглинання глюкози/фруктози визначали додаванням 0,1 мл клітин (при 37°C) до 0,05 мл розчину радіоактивно-міченої ¹⁴C-

глюкози/¹⁴C-фруктози (з питомою радіоактивністю 0,11 мКі/ммоль для 50 мМ розчину глюкози/фруктози, 1,1 мКі/ммоль для 5 мМ і 5,4 мКі/ммоль для 0,5 мМ) в 0,1 М фосфатному буфері (рН 6,5) до кінцевого об'єму 0,15 мл. Суха маса клітин становила 15 мг/мл. Після інкубації протягом 5 с з радіоактивно міченим цукром, 0,1 мл суспензії клітин переносили в 10 мл охолодженого на льоді 0,5 М розчину цукру для зупинки реакції. Суспензію клітин швидко (до 20 сек.) фільтрували з використанням вакуумного фільтру та двічі відмивали в 10 мл охолодженої неміченої 500 мМ глюкози/фруктози. Зразки (фільтрувальні папірці з осадженими клітинами) переносились в сцинтиляційну рідину. Порція (0,01 мл) реакційної суміші використовувалась для визначення загальної радіоактивності. Радіоактивність визначали на сцинтиляційному лічильнику (Rac-Beta 1219, ЛТ.П.Н., Швеція). Швидкість засвоєння (транспорту) глюкози/фруктози (V_{Glc}) виражалась у нмоль глюкози на мг сухої маси клітин за 1 хв

$$[\text{Glc}]_{\text{клітинна}} = \frac{(\text{срм}^{14}\text{C-Glc}_{\text{проби}} - \text{срм}^{14}\text{C-Glc}_{\text{В0}}) \cdot [\text{нмоль мкл}^{-1} \text{Glc}] \cdot 100 \text{ мкл}}{\text{срм}^{14}\text{C-Glc}_{\text{С0}} \cdot 10}$$

де $\text{срм}^{14}\text{C-Glc}_{\text{В0}}$ – радіоактивність неспецифічно зв'язаної ¹⁴C-глюкози з фільтрувальним папірцем; $\text{срм}^{14}\text{C-Glc}_{\text{С0}} \cdot 10$ – вихідна радіоактивність розчину ¹⁴C-глюкози, 100 мкл – порція суспензії клітин та ¹⁴C-глюкози, в якій визначалась радіоактивність; нмоль мкл⁻¹ Glc – вираження концентрації глюкози (ммоль л⁻¹), яка додавалась до суспензії клітин.

$$V [\text{нмоль} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг}^{-1} \text{СМ}] = \frac{[\text{Glc}]_{\text{клітинна}}}{0,083 \text{ хв} \times 1 \text{ мг сухої маси клітин}}$$

де 0,083 хв – вираження 5 с (часу інкубації клітин з розчином ¹⁴C-Glc) в хв 1 мг сухої маси клітин – маса клітин в порції суспензії, в якій визначалась радіоактивність.

2.5.4. Електрофорез білків в ПААГ та імуноблот-аналіз. Для проведення електрофоретичного розділення білків безклітинні екстракти, вирівняні за концентрацією білка чи «об'ємом клітин», прогрівали при 95°C протягом 5 хв в буфері Леммлі для зразків.

Електрофорез білків проводили в 8-12% ПААГ за присутності SDS в буферній системі Леммлі [322]. Отримані гелі використовували для наступного імуноблотингу. Для визначення молекулярної маси білків на електрофореграмах використовували білкові стандарти «Fermentas» (Литва) чи «BioRad» (США).

Переніс білків з SDS-ПААГ на полівінілдіфторидну (PVDF) або целюлозну мембрани проводили протягом 2 год при силі струму 250 мА в буфері, що містив: 25 мМ *трис*-HCl, рН 8,3, 20% метанол, 192 мМ гліцин. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5%-ним BSA або 5%-ним сухим знежиреним молоком в TBS-T (20 мМ *трис*, 14 мМ NaCl, 0,1% Твін-20). В подальшому мембрану інкубували з первинними антитілами у блокуючому буфері протягом 1 год з наступним промиванням блокуючим буфером 3 разів по 10-15 хв Як вторинні антитіла використовували анти-кролячі або анти-мишачі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому в розведенні 1:20000 у блокуючому буфері. Інкубацію з вторинними антитілами проводили протягом 1 год, після чого мембрану відмивали TBS-T 5 разів по 10-15 хв Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору фірми «Amersham» (Велика Британія). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1–15 хв Плівки проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

2.6. Основні молекулярно-генетичні методи

2.6.1. Мутагенез. Отримання мутантів дріжджів індукували УФ-світлом (лампа БУВ-15). Доза опромінення, яку було використано при мутагенезі, забезпечувала 5% виживання клітин.

2.6.2. Трансформація дріжджів *H. polymorpha* та бактерій *E. coli*.

Електротрансформацію дріжджів та бактерій здійснювали за допомогою електропоратора ЕСМ600 фірми «ВТХ» (США) згідно з інструкціями виробника. Компетентні клітини для електропорації готували згідно з методикою, описаною в [323]. Мітотичну стабільність дріжджових трансформантів визначали шляхом інкубації клітин трансформантів у неселективних умовах (середовище YPD) протягом не менше десяти генерацій та наступного аналізу фенотипу колоній у селективних умовах.

2.6.3. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів. Сумарну ДНК з клітин *H. polymorpha* та *P. pastoris* виділяли згідно з методикою, яка є модифікацією розробленої для *S. cerevisiae* [322], з використанням зимоліази для сферопластування клітин, протеїнази К для руйнування білків, рибонуклеази А для розщеплення РНК та подальшого осадження сумарної ДНК спиртом. Цей метод використовувався для виділення (через ретрансформацію в *E. coli*) плазмідної ДНК з клітин дріжджових трансформантів.

Клітини вирощували в 10 мл рідкого селективного середовища (YNB) при 30°C до ранньої логарифмічної фази (оптична густина OD₆₀₀ 1-2). Біомасу осаджували центрифугуванням при 6 тис. об./хв і ресуспендували в 5 мл 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН 7,5) з 50 мМ 2-меркаптоетанолом. Клітини інкубувались 10 хв при кімнатній температурі та осаджувались центрифугуванням. Осад клітин промивали у 2 мл 100 мМ натрій-цитратного буферу (рН 5,8) з 10 мМ ЕДТА та осаджувались. Осад ресуспендували у 0,5 мл цього ж буферу з ферментом зимоліазою 100Т (0,2 мг/мл) та інкубували 30 хв при 30°C. Після цього до суспензії додавали 25 мкл 10% SDS, інкубували 10 хв при 60°C, а також 2 мкл розчину протеази К (10 мг/мл) та інкубували протягом години при 55°C. Фенольною екстракцією відділяли білки від розчину ДНК (додаванням рівного об'єму суміші фенолу та центрифугуванням при 14000 тис. об./хв, 10 хв) та осаджували ДНК етанолом (0,1 об'єму 3 М ацетату натрію, 2,5 об'єми 96% етанолу, охолодження протягом 15 хв при -70°C, центрифугування при

5 тис. об./хв, 7 хв). Осад промивали у 70% етанолі та висушували при 37°C 10-15 хв, ресуспендували у ТЕ буфері (10 мМ *трис*-HCl, 1 мМ ЕДТА, рН 7,5). До розчину ДНК для видалення РНК додавали розчин РНКаз А (2 мг/мл). Інкубували при 37°C протягом 30 хв ДНК відділяли фенольною екстракцією та осадженням етанолом, як описано вище. Осад ДНК ресуспендувався у ТЕ-буфері та зберігався при -20°C.

2.6.4. Виділення сумарної РНК з клітин дріжджів. Сумарну РНК з клітин дріжджів виділяли з використанням реагенту Трізол («Invitrogen», США). Усі подальші маніпуляції з РНК проводили при охолодженні. Клітини дріжджів осаджували при 4 тис./хв протягом 5 хв, ресуспендували в 1 мл Трізолу. До отриманої суспензії додавали 0,2 мл скляних кульок (діаметр 0,45 мм) і руйнували шляхом струшвання на вортексі «FastPrep» при 6000 об./сек. протягом 20 сек. Гомогенну суміш центрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв Супернатант переносили в чисті пробірки типу «Епандорф», додавали 0,2 мл хлороформу, інкубували при кімнатній температурі пртягом 5 хв та відцентрифугували при 14000 об./хв протягом 15 хв. З відібраної водної фази шляхом преципітації 0,5 мл ізопропанолу отримували нерозчинну фракцію сумарної РНК, яку осаджували при 14000 об./хв протягом 15 хв. Осад промивали 70% охолодженим етанолом, підсушували і розчиняли у DEPC-обробленій воді. Отримані проби слугували матрицями для синтезу одноланцюгової кДНК з використанням набору реагентів (First Strand cDNA Synthesis Kit) фірми «Fermentas» (Литва) згідно з методикою виробника.

2.6.5. Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli*. Клітини трансформантів *E. coli* вирощувались у середовищі LB з ампіциліном в концентрації 100 мг/л (об'єм 1,5 мл) протягом 14-16 год та осаджувались центрифугуванням (10 тис. об./хв, 3 хв) у пластикових пробірках двічі для повного видалення залишків поживного середовища. Осад клітин ресуспендували в 0,15 мл ТЕ-буферу (рН 7,5) перемішуванням та додавали 0,15 мл 0,2 М розчину NaOH і 1% SDS, інкубували

при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після цього додавали 0,15 мл 2 М ацетату калію; акуратно перемішували та інкубували на льоді протягом 15 хв. Осад білків осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 20 хв (при кімнатній температурі) та відбирали супернатант (0,4 мл) у чисті пробірки. До супернатанту додавали 0,7 об'єму (0,3 мл) ізопропанолу, перемішували та центрифугували при 10 тис. об./хв протягом 20 хв при кімнатній температурі. Осад ДНК та РНК промивали 70% етанолом та після підсушування ресуспендували у 40 мкл стерильної дистильованої води або TE буферу. Розчин ДНК зберігати при -20°C. Для виділення плазмідної ДНК у препаративних кількостях використовували набір реагентів (midi-kit) фірми «Quiagen» (США) згідно методики виробника.

2.6.6. Конструювання векторів. Для конструювання рекомбінантних плазмід, необхідних для виконання роботи, використовували ряд методів, описаних в [322].

Метод розщеплення ДНК рестриктазами базується на здатності ендонуклеаз рестрикції класу II розщеплювати ДНК в певних специфічних сайтах. В даній роботі користувалися методикою описаною раніше [322], та інструкціями виробників ферментів: «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Promega» (США).

Для затуплення «липких» (комплементарних) кінців лінеаризованої ДНК векторів (з метою наступного лігування фрагментів ДНК з «тупими» кінцями) використовували великий фрагмент ДНК-полімерази I *E. coli* (фрагмент Кленова). У цьому методі використовують 5'–3' полімеразну активність фрагмента Кленова. При цьому відбувається добудова вкорочених 3'–кінців, утворених в результаті розщеплення ДНК ферментами рестрикції [322].

Для дефосфорилювання липких кінців ДНК лінеаризованого вектора, з метою запобігання самолігування, використовували лужну фосфатазу СІР виробництва «NEB» (США), та рекомендовані виробником умови реакції.

Лігування лінеаризованих фрагментів ДНК здійснювали за методикою, описаною раніше [322] з деякими змінами. При лігуванні використовували ДНК-лігазу бактеріофага Т4. Реакцію проводили в буфері, що був у комплекті з

фірмовим препаратом лігази («Promega» (США)) згідно з інструкціями виробника. Для виділення рекомбінантних плазмід лігаційну суміш після очистки осадженням етанолом, або очистки на колонці фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit) трансформували у клітини *E. coli* методом електропорації.

Лінеаризовані фрагменти ДНК для лігування отримували методом ПЛР (див. нижче) і наступної обробки рестриктазами (утворення липких кінців), або шляхом елюції фрагментів плазмід після обробки рестриктазами з агарозного гелю. Відповідний метод був описаний у [322]. З цією метою також використовували спеціальний кіт фірми «Quiagen».

Інші застосовані у роботі молекулярно-генетичні методи здійснювали згідно методик, описаних у [322].

2.6.7. Умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ПЛР у режимі реального часу. Для ампліфікації фрагментів ДНК використовували метод полімеразної ланцюгової реакції. Цей метод дає можливість, використовуючи специфічні олігонуклеотидні праймери, здатні гібридизуватись з визначеними ділянками матричної ДНК (плазмідної або геномної), ампліфікувати певні ділянки з аналітичними цілями чи для їх наступного клонування у складі плазмід. У реакціях використовували Taq-ДНК полімеразу виробництва фірм «Fermentas» (Литва) та «NEB» (США) та синтетичні олігонуклеотидні праймери фірми IDT Technologies (США); умови реакції – згідно з інструкціями виробника. Для проведення реакції використовували термоциклер фірми «Parker Elmer» (США).

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Матрицею в даній реакції слугувала одноланцюгова кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази (First Strand cDNA Synthesis Kit) фірми «Fermentas» (Литва). Дизайн олігонуклеотидних праймерів, комплементарних до 3'-ділянок генів, здійснювали за допомогою програми «TaqMan® probe design software».

У реакціях використовували набір реагентів «Platinum® SYBR® Green qPCR Super-mix-UDG» з флуоресцюючим барвником «SYBR® Green»,

виробництва «Invitrogen» (США). Реакції проводили на термоциклері ABI Prism 7000 фірми «Applied Biosystems» (США) з відповідним програмним забезпеченням. Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ($\Delta\Delta Ct$ метод). Обрахунки проводили за формулами:

$$\Delta Ct (\text{гена-мішені}) = Ct (\text{гена-мішені}) - Ct (\text{гена-калібратора/ACT1})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{гена-мішені}) - \Delta Ct (\text{базисного гена})$$

Відносний рівень експресії виражали в $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2.7. Конструювання делеційних мутантів та інших рекомбінантних штамів

2.7.1. Конструювання мутанта *H. polymorpha* з делецією гену *HpHXS1*.

Вектор, здатний делетувати більшу частину ORF *HpHXS1* було сконструйовано у два етапи як показано на Рис. 2.7.1, Додаток 1 На першому етапі фрагмент 1,2 т.п.н. геномної ДНК *H. polymorpha*, що містив послідовності з 3'-кінцевої ділянки *HXS1*, починаючи з нуклеотиду 1015 відповідної ORF і прилеглої 3'-фланкуючої ділянки розміром приблизно 0,3 т.п.н. був ампліфікований у ПЛР використовуючи як матрицю геномну ДНК штаму дикого типу *H. polymorpha*. Праймери для цих ПЛР, OL74 та OL75 (Табл. 2.7.1, Додаток 1), містили сайти рестрикції для ендонуклеаз PstI та HindIII, відповідно. Фрагмент було клоновано в оброблену PstI/HindIII плазмиду рYT1, що містила ген *ScLEU2* як селективний маркер з отриманням вектора рОН10. На наступному етапі фрагмент розміром 0,85 т.п.н., що містив 5'-послідовність *HXS1* був ампліфікований ПЛР з геномної ДНК з використанням праймерів OL72 та OL73, що містили сайти рестрикції для BamHI та XbaI, відповідно. Відповідний фрагмент було клоновано у оброблений BamHI/XbaI вектор рОН10 для створення рОН11. Остання плазміда була розщеплена за допомогою HindIII, вивільняючи фрагмент 3,9 т.п.н, що містив *ScLEU2*, фланкований 5'- та 3'-послідовностями *HXS1*, використаний для трансформації штаму NCYC495*leu1-1* шляхом електропорації. Декілька сотень прототрофних трансформантів було відібрано та проаналізовано за ознакою нездатності до росту на гексозах як джерелах вуглецю. Для підтвердження делеції гену *HXS1* з декількох клонів, які виявляли відповідний фенотип, було виділено

геномну ДНК та використано її як матрицю в ПЛР реакціях з двома парами олігонуклеотидних праймерів. Одна пара складалася із праймера OL72, комплементарного до послідовності з 5'-фланкуючого фрагменту, та праймеру OL75, який приєднується до послідовності у 3'-ділянці до ORF *HXS1*.

Таким чином, використовуючи геномну ДНК із штаму дикого типу було отримано фрагмент розміром 3,09 т.п.н., а використовуючи ДНК із штаму з потенційним нокаутом *HXS1*, чи із плазміди рОН11 отримано фрагмент розміром 3,90 т.п.н.. Інший набір праймерів містив цю ж 3'-фланкуючу послідовність праймеру OL75 та другий праймер СК15, комплементарний до послідовності у *ScLEU2*. Він не гібридизувався з геномною ДНК штаму дикого типу, але продукував фрагмент довжиною 1,3 т.п.н. при використанні геномної ДНК з штамів з потенційними нокаутами чи рОН11 як матриці.

Коректність інсерції *HXS1* делеційної касети додатково була підтверджена за допомогою Southern блотингу шляхом гібридизації HindIII-обробленої тотальної ДНК із штаму дикого типу та ряду потенційних штамів-нокаутів з *ScLEU2* фрагментом розміром 1,4 т.п.н., отриманим у ПЛР з використанням праймерів K22 та KD21, а також плазміди рYT1 як матриці (Рис. 2.7.1, Додаток 2). Один із підтверджених трансформантів із генотипом *hxs1Δ::ScLEU2 leu1-1*, був використаний у подальших дослідженнях як делеційний штам *Δhxs1*.

2.7.2. Конструювання мутанта *H. polymorpha* з делецією гену *HpHXT1*. Вектор рОН14 для делеції гену *H. polymorphaHXT1* був сконструйований у два етапи. Фрагмент розміром 0,67 т.п.н. був ампліфікований за допомогою ПЛР реакції з геномної ДНК *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* та включає 3'-фланкуючий фрагмент. Праймери, використані у цих реакціях, OL110 та OL111, містять сайти рестрикції PstI та HindIII, відповідно, для подальшого клонування отриманого фрагменту у плазмиду рYT1. Фрагмент 1,06 т.п.н. який включає 5'-ділянку до *HpHXT1* був ампліфікований з допомогою ПЛР з використанням праймерів OL108/OL109, що містять сайти для ендонуклеаз рестрикції BamHI та XbaI, відповідно, для клонування у рYT1-похідний вектор, отриманий на попередньому

етапі. Отриманий вектор рОН14 було використано як матрицю для ампліфікації всієї делеційної касети з парою праймерів OL108/OL111 (див Таблицю 3.1), як зображено на Рис. 2.7.2, Додаток 2.

Отримана делеційна касета для гену *HpHXT1* розміром 3,93 т.п.н. була використана для трансформації *H. Polymorpha* NCYC495 *leu1-1* шляхом електропорації. Селекція прототрофних трансформантів була проведена на мінімальному мінеральному середовищі з додаванням сахарози, оскільки у середовищі з глюкозою делеційні штами могли мати серйозний ростовий дефект.

З метою верифікації коректності делеції гену *HpHXT1* було ізольовано тотальну ДНК з кількох трансформантів, яка служила матрицею для ПЛР та Southern blotting аналізу. В ПЛР реакції було використано три пари праймерів: OL108 (комплементарний до 5'-фланкуючого фрагменту ORF *HpHXT1*), OL111 (комплементарний до 3'-фланкуючого фрагменту) та OL80 (комплементарний до 5'-фланкуючого фрагменту ORF *HpHXT1*, відсутнього на делеційній касеті) з OL111 та СК15 (останній є комплементарним до промоторного району *ScLEU2*, що походить з рYT1). З використанням геномної ДНК штаму дикого типу та пари праймерів OL108/OL111 отримано фрагмент розміром 3,0 т.п.н., тоді як при використанні ДНК штаму з делецією *hxt1* було отримано фрагмент розміром 3,93 т.п.н., що відповідає розміру делеційної касети у складі рОН14. Пара праймерів OL80/OL111 не гібридизувалася з ДНК із *Δhxt1*, але, у випадку використання геномної ДНК штаму дикого типу, генерувала фрагмент розміром 1,89 т.п.н. " навпаки, фрагмент розміром 1,27 т.п.н. був ампліфікований з використанням пари праймерів OL111/СК15 з ДНК, виділеної із мутанта *Δhxt1*, але не контрольної ДНК дикого типу (Рис. 2.7.2, Додаток 2). Коректність інтеграції делеційної касети в геном було підтверджено Саузерн-блот аналізом. Для цього аналізу було використано тотальну геномну ДНК виділену з трансформантів та оброблену PstI, а фрагмент *ScLEU2* з рYT1 розміром 1,4 т.п.н., ізольований у ПЛР з допомогою праймерів K22/KD21, використано як гібридизаційний зонд. У результаті, було відібрано один трансформант з генотипом *hxt1::ScLEU2leu1-1*, оброблена PstI/PstI

геномна ДНК якого виявляла один фрагмент довжиною 2,8 т.п.н., що відповідає один акт гомологічної рекомбінації делеційної касети (Рис. 2.7.2С, Додаток 2).

2.7.3. Конструювання штамів *H. polymorpha* з надекспресією *HpHXS1* *HpHXT1*, та *HpGCR1* та мутованих форм відповідних білків. Були сконструйовані плазмиди рОН15 та рОН16, які експресували гени *H. polymorpha* *HXS1* та *HXT1*, відповідно, під контролем промотора *ADH1* у складі вектора рВМ2974. *HXS1*-кодуючу ділянку було ампліфіковано як 1,92 т.п.н. HindIII-EcoRI фрагмент з використанням праймерів OG1/OG2; а *HXT1* – як 1,70 т.п.н. HindIII-SacI фланкований фрагмент з використанням праймерів OG5/OG6. Ці два фрагменти були клоновані у відповідні сайти рВМ2974. Сконструйовані вектори (рОН15, рОН16) та контрольні плазмиди рВМ3135, рВМ3362 (люб'язно надані Dr. M. Johnston (St. Louis, USA)), були трансформовані в штам *S. cerevisiae* EBY.VW4000 (Табл. 2.7.2, Додаток 3), який несе делеції усіх функціональних гексозних транспортерів, та нездатний рости на глюкозі чи фруктозі (люб'язно наданий Dr. E. Boles (Frankfurt University, Germany)). Трансформанти були відібрані як прототрофні за урацилом клони на чашках з етанолом, та були проаналізовані на здатність утилізувати гексози.

З метою встановлення функціональної ролі С-кінцевого домену білка Hxs1 було сконструювано його вкорочені форми, у яких відсутні його фрагменти довжиною 38 чи 95 амінокислотних залишків (див. також Рис. 3.1.1 та 3.1.2), які були експресовані під нативним промотором гена у мутанті $\Delta hxs1$. Алелі *HXS1A1*, *HXS1A2* та *HXS1-1A2* що кодують відповідні вкорочені форми Hxs1: Hxs1 Δ C38, Hxs1 Δ C95 та Hxs1^{R203K} Δ C95, були ампліфіковані за допомогою ПЛР з використанням пар праймерів OL72/OG3 (для *HXS1A2* та *HXS1-1A2*) та OL72/OG4 (для *HXS1A1*). Ампліфіковані фрагменти було оброблено рестриктазами BamHI та EcoRI та клоновано у склад вектора рPICZB (Invitrogen), обробленого BglII та EcoRI. Отримані плазмиди рОН17 (*HXS1A1*), рОН18 (*HXS1A2*), та рОН19 (*HXS1-1A2*) перед трансформацією в реципієнтний штам *hxs1A* були лінеаризовані з HindIII, та відібрані результуючі зеоцин-резистентні колонії.

Присутність фрагментів *HXS1Δ1*, *HXS1Δ2* та *HXS1-1Δ2* у геномі трансформантів було підтверджено ПЛР з використанням пар праймерів OL72/OG3 та OL72/OG4.

Алець *HpHXS1-1*, що кодує мутований ген із заміною R203K, був сконструйований наступним чином. Спочатку, два фрагменти *HXS1-1* були ампліфіковані у ПЛР з праймерами OL178 та OL179 (отриманий фрагмент включав 1,217 т.п.н. вище промоторної послідовності та 5'-частину ORF *HXS1*), та праймерами OL180 та OL181 (містять 3'-частину ORF та 194 п.н. нижче фланкуючої термінальної послідовності). Ці два фрагменти були використані в якості матриці у третій ПЛР з фланкуючими праймерами OL178 та OL181 для отримання повнорозмірного *HXS1-1* що містить комплементарні вставки праймерів OL179 та OL180 із цільовими нуклеотидними замінами (Табл. 2.7.1, Додаток 2). Результуючий *HXS1-1* алець було оброблено *Bam*HI та *Not*I і клоновано у вектор pGLG578, розрізаний тими ж ензимами. Присутність коректної заміни R203K у отриманому векторі рОН13 було підтверджено секвенуванням. рОН13 була лінеаризована за допомогою *Bam*HI перед трансформацією у *Δhxs1* реципієнтний штам методом електропорації та виділено генетицин-резистентні колонії. Коректність інтеграції алелю *HXS1-1* у геном трансформантів було підтверджено ПЛР з праймерами OL178 та OL181 (Табл. 2.7.1, Додаток 2).

Також було сконструйовано алець потенційного сенсора *Gcr1* з відповідною консервативною заміною R165K, що локалізується між його 4-им та 5-им трансмембранними доменами (див. Рис. 3.1.7), та досліджено ефекти його експресії. Відповідний алець, позначений як *HpGCR1-1*, був сконструйований наступним чином. Спочатку два фрагменти *GCR1* ORF (відкритої рамки зчитування) було ампліфіковано у ПЛР з використанням пари праймерів OL82 та OL83 (ПЛР продукт включав 1,53 т.п.н. промоторної послідовності та 5'-частину *GCR1* ORF), та пари праймерів OL84 та OL85 (ПЛР фрагмент містив 3'-частину ORF та 172 п.н. фланкуючої ділянки нижче термінальної послідовності). Ці два фрагменти були використані як матриця у ПЛР з праймерами OL82 та OL85 для отримання повнорозмірного конструктору *GCR1-1*, що містив вставки з OL83 та

OL84, що відповідають цільовій точковій мутації (Табл. 2.7.3, Додаток 2). Отриманий алель *GCR1-1* було оброблено *Bam*HI та *Not*I та клоновано у вектор pGLG578 [324], розщеплений цими ж ензимами. Присутність коректних нуклеотидних замін (відповідних R165K заміні в *HpGcr1*) у отриманому векторі pOH12 було верифіковано за допомогою секвенування. pOH12 було лінеаризовано *Bam*HI перед трансформацією у реципієнтний штам *Δgcr1*, та відібрано відповідні генетицин-резистентні колонії.

З метою оцінити, яким чином ефективність транспорту глюкози впливає на глюкозну (катаболітну) репресію у клітинах *Δgcr1*, гени *HpHXT1* та *HpGCR1* було надекспресувано під контролем конститутивного промотора у цього мутанта. Відповідні вектори експресії були сконструйовані наступним чином.

Рекомбінантні плазмідні рUC57- P_{GAPDH} -*GCR1*-*Zeo* та рUC57- P_{GAPDH} -*HXT1*-*Zeo* що несуть гени *H. polymorphaGCR1* та *HXT1* під контролем сильного конститутивного промотора гену гліцеральдегід-3-форфат дегідрогенази (*HpGAPDH*) було сконструйовано на базі рUC57 (Fermentas, Вільнюс, Литва). Промотор *HpGAPDH* (P_{GAPDH}) та ген *GCR1* було ампліфіковано за допомогою ПЛР з геномної ДНК штаму дикого типу *H. polymorpha*NCYC495 з використанням пар праймерів Ko125/Ko126 та Ko129/Ko130 (Табл. 2.7.4, Додаток 2).

Отримані ПЛР продукти були оброблені *Sal*I/*Bam*HI та *Bam*HI/*Xba*I, відповідно, та клоновані у рUC57 оброблену *Sal*I/*Xba*I. Отримана плазміда була позначена як рUC57- P_{GAPDH} -*GCR1*. Ген *ZeoR*, що забезпечує резистентність до антибіотика зеоцину був ампліфікований з плазміді p70 [325] з використанням праймерів Ko121/Ko122, оброблених та клонований у сайт *Hind*III плазміді рUC57- P_{GAPDH} -*GCR1*. Сконструйований вектор рUC57- P_{GAPDH} -*GCR1*-*Zeo* був лінеаризований за допомогою *Sma*I перед трансформацією у реципієнтні штами дикого типу та *Δgcr1*, та відібрано зеоцин-резистентні колонії.

Рекомбінантний вектор рUC57- P_{GAPDH} -*HXT1*-*Zeo* для надекспресії *HpHXT1* було сконструйовано подібним чином. Фрагмент ДНК, що містив P_{GAPDH} та ген *HXT1* з його термінаторною послідовністю було ампліфіковано ПЛР з геномної

ДНК *H. polymorpha* NCYC 495 з використанням пар праймерів Ko123/Ko124 та Ko127/Ko128 (Табл. 2.7.4, Додаток 6). ПЛР продукти, що відповідали P_{GAPDH} та гену *HXT1*, було оброблено EcoRI/SacI та SacI/XbaI, відповідно, та клоновано у порізаний EcoRI/XbaI pUC57. Отримана плазміда була названа pUC57- P_{GAPDH} -*HXT1*. Ген *ZeoR* було клоновано у SmaI-оброблену pUC57- P_{GAPDH} -*HXT1* як «затуплений» ПЛР-продукт, ампліфікований з плазміди p70 [325] з використанням праймерів Ko121 та Ko122. pUC57- P_{GAPDH} -*HXT1*-*Zeo* було лінеаризовано за допомогою BamHI перед трансформацією у штам дикого типу та реципієнтний штам $\Delta gcr1$, та відібрано зеоцин-резистентні колонії.

З метою гетерологічної регульованої експресії гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha* в гетерологічній системі *S. cerevisiae* були сконструйовані плазміди pID1 та pID2, які містили гени *HpGCR1* та *HpHXT1*, кон'юговані з GFP під контролем P_{MET25} . *GCR1* ORF було ампліфіковані як 1,626 т.п.н. XhoI-фланкований фрагмент з праймерами OG17/OG18; *HXT1* ORF – як 1,623 т.п.н. ClaI-фланкований фрагмент з праймерами OG19/OG20 (Табл. 2.7.4, Додаток 2). Отримані ПЛР фрагменти було клоновано у відповідні сайти інтегративного вектора pKF48, що несе ген *ScURA3* як селективний маркер [326], (люб'язно надано Dr. K. Flis, Institute of Biophysics and Biochemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw) для створення pID1 та pID2, які експресують *H. polymorpha* *HpGCR1* та *HpHXT1* ORFs, відповідно. Інтегративний вектор pKF48-1 було отримано шляхом видалення 714 bp XbaI-XbaI фрагменту, що містив *yEGFP* ORF з pKF48. В подальшому, *HpGCR1* та *HpHXT1* ORFs були клоновані у відповідні сайти pKF48-1. Сконструйовані pID1, pID2 та pID3 та pID4 та вихідні плазміди pKF48 та pKF48-1 були лінеаризовані з допомогою StuI та трансформовані в *hxt-null* штам *S. cerevisiae* EBY.VW4000 (Табл. 2.7.3, Додаток 2), з делеціями усіх генів транспортерів гексоз та відповідно нездатний утилізувати глюкозу, фруктозу та сахарозу як ростові субстрати [21]. Стабільні трансформанти були селекціоновані як прототрофи за урацилом на синтетичному агаризованому етанол-вмісному середовищі, проаналізовані стосовно їх здатності до утилізації гексоз та перевірені з допомогою флуоресцентної мікроскопії на

предмет локалізації рекомбінантних транспортерів, як описано нижче. Клітини штаму *H. polymorpha gcr1-2* [29], трансформовані pID1 та pID3 також були використані як контроль для аналізу росту на різних джерелах вуглецю.

2.7.4. Конструювання мутантів з делеціями по генах *HpMIG1* та *HpMIG1*.

Делеційні мутанти за генами *MIG1*, *MIG2*, та подвійний мутант *mig1mig2* було сконструйовано як описано нижче. Делеційна касета *HpMIG1* (ідентифікаційний номер послідовності у GenBank EF523343) була сконструйована починаючи із фрагменту довжиною 0,93 т.п.н., який містив послідовність 3'-фланкуючої ділянки *HpMIG1*, ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням геномної ДНК *H. polymorpha* як матриці і праймерів Mi12Cf та Mi12Cr, які містять сайти рестрикції для EcoRI і BamHI (Табл. 2.7.5, Додаток 2). 3'-фланкуючий фрагмент був лігований по місцях розрізу EcoRI/BamHI у плазмиду pBSKT [327]. Далі фрагмент довжиною 0,93 т.п.н., який містить 5'-фланкуючу область *HpMIG1*, ампліфікували за допомогою ПЛР з праймерами Mi12Nf і Mi12Nr (Табл. 2.7.5, Додаток 8), що включали сайти рестрикції для HindIII та NotI, відповідно. 5'-фланкуючий ПЛР фрагмент *HpMIG1* та BamHI/NotI оброблений *HpLEU2* фрагмент були клоновані у порізану BamHI/NotI плазмину pBSKT-3'*MIG1*, з утворенням таким чином делеційної касети для *HpMIG1* (плазміда p19-mig12::*HpLEU2*). Похідну плазмиду pOH7 сконструйовано заміною PstI-фрагмента *HpLEU2* на p19-mig12::*HpLEU2* PstI-фланкованим фрагментом, що містить *APH* ген, експресований під конститутивним промотором гліцеральдегід-3-фосфатази з плазмиду pGLG578 [324]. (Рис. 2.7.3, Додаток 2).

Штами $\Delta mig1$ і $\Delta mig1 leu1-1$ були виділені трансформацією реципієнтного штаму дикого типу NCYC495 *leu1-1* делеційними касетами для *HpMIG1* з p19-mig12::*HpLEU2* (EcoRI-HindIII фрагмент, що містить *HpLEU2*, фланкований *HpMIG1* з 5'- і 3'-послідовностями) і pOH7 (Eco32I/PaeI фрагмент pOH7, що містить *APH*, фланкований тими ж *HpMIG1* послідовностями), тим самим замінюючи область *HpMIG1* на *HpLEU2* чи *APH*. Прототрофні або стійкі до G418 трансформанти виділяли і аналізували як описано нижче.

Делеційна касета *HpMIG2* (ідентифікаційний номер послідовності у GenBank EF523344) була сконструйована таким чином: фрагмент довжиною 1,97 т.п.н., що містив послідовності 3'-фланкуючої ділянки *HpMIG2*, ампліфікували ПЛР, використовуючи геномну ДНК *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* як матрицю і праймери OL155 і OL156, що несли сайти рестрикції для HindIII (Табл. 3.2.1).

3'-фланкуючий фрагмент було лігвано у оброблену HindIII плазмиду рYT1 [328], що включала *ScLEU2* ген як селективний маркер з утворенням рYT1-3'*MIG2*. Далі фрагмент 1,39 т.п.н., що містив 5'-фланкуючу ділянку *HpMIG2* ампліфікували ПЛР з праймерами OL153 і OL154, що несли сайти рестрикції для BamHI і XbaI відповідно. 5'-фланкуючий ПЛР-фрагмент *HpMIG2* був клонований у оброблений BamHI/XbaI вектор рYT1-3'*MIG2* з утворенням рОН8, – вектора, що містить делеційну касету для *HpMIG2* (Рис. 2.7.3, Додаток 2)

Плазмиду рОН8 використовували як матрицю для ПЛР з праймерами OL153 і OL156, з утворенням фрагменту довжиною 5,56 т.п.н., що складається з *ScLEU2*, фланкованого 5'- і 3'-послідовностями *MIG2*. Делеційну касету трансформували в *NCYC495leu1-1* і відбирали прототрофні трансформанти.

Тотальна геномна ДНК, виділена з потенційних *Amig1* делеційних штамів (р19-mig12::*HpLEU2* і рОН7 трансформанти), була використана як матриця для ПЛР і Саузерн-блот аналізу. Пари праймерів OL54/OL55; OL54/OL57 і OL54/OL143 (Табл. 2.7.5, Додаток 2) були використані для визначення присутності відповідних делеційних касет у *Amig1* і *Amig1leu1-1* геномних ДНК. ПЛР аналіз показав присутність очікуваних смуг у тестованих штаммах: довжиною 0,45 т.п.н., утворена OL54/OL55, довжиною 2,24 т.п.н. (OL54/OL57) і відсутність смуги (OL54/OL143) у контрольному штамі *NCYC495leu1-1*. Смуга 2,91 т.п.н. (для *Amig1*) і смуга 3,9 т.п.н. (для *Amig1leu1-1*), генерована OL54/OL57, смуга 0,5 т.п.н. (OL54/OL143), були присутні у штамі-нокауті. Пара праймерів OL54/OL55 не давала смуг у штамів *Amig1* і *Amig1 leu1-1*.

Для ПЛР аналізу трансформантів *Amig2* були використані пари праймерів OL91/OL92, СК15/OL156 (Табл. 2.7.5, Додаток 2). Смуга 1,2 т.п.н., що відповідає

OL91/OL92 з геномної ДНК NCYC495*leu1-1*, була відсутня у делеційному штамі. Пара праймерів СК15/OL156 була використана для виявлення правильно орієнтованої хромосомної інтеграції *mig2::HrLEU2* фрагмента. Смуга 2,5 т.п.н. була виявлена у ПЛР для штаму $\Delta mig2$ і була відсутня у контрольному штамі NCYC495*leu1-1*.

Отриманий штам $\Delta mig1$ був використаний у всіх наступних біохімічних і фізіологічних експериментах. Штам $\Delta mig1 leu1-1$ був використаний для конструювання подвійного делеційного мутанта $\Delta mig1 \Delta mig2$. Для цього штами $\Delta mig1 leu1-1$ і $\Delta mig2$ були схрещені і диплоїдні гібриди відбирали на середовищі YNS у присутності G418 (1,0 г/л) без лейцину. Після споруляції подвійний делеційний мутант $\Delta mig1 \Delta mig2$ був відібраний серед потомства на тому ж середовищі і для нього було підтверджено присутність *HrMIG1* і *HrMIG2* делеційних касет, як детально описано вище для індивідуальних делеційних мутантів.

2.7.5. Конструювання мутантів з делеціями по генах *HrHAP4-A* та *HrHAP4-B*.

Делеційна касета *HrHAP4-A* була сконструйована у два етапи. Спочатку *HrHAP4-A* 5'-фланкуючий фрагмент 1,305 т.п.н., який закінчувався 3 нуклеотидами зліва від стартового кодона ATG був виділений за допомогою ПЛР-реакції, використовуючи праймери P9 (5'-TGTGGATCCTTCGAACACAAA GCCTAT-3') і P10 (5'-GGTTCTAGATCATGGAACCCATTGAAT-3') та геномну ДНК *H. polymorpha* як матрицю. ПЛР-продукт був клонований як *Bam*HI-*Xba*I фрагмент у плазмиду рYT1. Це дозволило отримати проміжну плазмиду рHAP4-A-5'. На другому етапі 3' ділянка *HrHAP4-A* довжиною 1,377 т.п.н., починаючи з 379 нуклеотиду *HAP4-A* ORF виділялась за допомогою ПЛР-реакції з праймерами P11 (5'-ТААСТgCAggTgTCCgACCTgAAAAAT-3') і P12 (5'-TGGAAGCTTT GAATCCATCGTATAACG-3'), та клонувалась як *Pst*I-*Hind*III фланкований фрагмент у плазмиду рHAP4-A-5', зі створенням при цьому плазмиди рHAP4-A::ScLEU2. Ця остання плазміда містить делеційну касету, на якій *HrHAP4-A* ділянка, яка кодує амінокислотну послідовність з 1 по 126, заміщається геном

ScLEU. Ця делеційна касета буда вирізана з *Bam*HI і *Hind*III та трансформована у реципієнтний штам NCYC495 *leu1-1*. Схема конструювання подана на Рис. 2.7.4, Додаток 2.

Делеційна касета *HpHAP4-B* була сконструйована аналогічним чином з використанням маркера позитивної селекції щодо резистентності до зеоцину [329]. Далі, подвійний нокаутний штам (*HpΔhap4-A HpΔhap4-B*) був отриманий трансформацією *HpΔhap4-A* з делеційної касети *HpHAP4-B*.

2.7.6. Клонування та конструювання мутанта з делецією гена *P. pastoris* *VPS15*. Внаслідок випадкової присутності ймовірного гомолога *ScVPS15* на векторі з банку генів, поряд із раніше клонованим геном *PEX2 P. pastoris* [330], стало можливим перевірити, чи є також *Vps15* важливим для селективної деградації пероксисом у метилотрофів. Повну послідовність *PpVPS15* було ідентифіковано та клоновано з банку генів *P. pastoris* методом покрокового ПЛР аналізу («chromosome walking»).

Зокрема, 3.4 т.п.н. неповної 5'-кінцевої послідовності ймовірного гену *PpVPS15* знаходилися на 130 п.н. нижче від термінального кодону *PEX2*. Для виділення відсутньої 3'-кінцевої порції *PpVPS15* гена, геномна бібліотека *P. pastoris* була піддана двом етапам покрокового ПЛР аналізу з використанням праймерів, комплементарних до присутніх ділянок гена і до вектора бібліотеки, як деталізовано на Рис. 2.7.5.А, Додаток 2. На кожному етапі ПЛР, праймер, комплементарний до 3'-фланкуючої послідовності гена та інший праймер, комплементарний до послідовності вектора рУМ8, на основі якого сконструйовано геномної бібліотеки *P. pastoris* [328] були використані у реакції ампліфікації разом із ДНК банку генів *P. pastoris* як матриці (примітка: підчас цієї експериментальної роботи послідовність геному *P.pastoris* була ще не відомою). Праймери, використані в цій роботі, представлені у Табл. 2.7.6, Додаток 2.

На першому етапі покрокової ПЛР (PCR#1), використовуючи праймери 8 і 10, отримали ДНК фрагмент довжиною 774 п.н., що містив 133 п.н. з рУТ6 і 507 п.н. додаткової 3'- послідовності *PpVPS15* (Рис. 2.7.5.А, Додаток 2). На другому

етапі ПЛР ампліфікації (PCR#2), використовуючи праймери 9 і 10, отримано ДНК фрагмент розміром 880 п.н., що містив 150 п.н. спільних із продуктом PCR#1, і 596 п.н. додаткової послідовності ДНК з *P. pastoris*, включаючи залишкові 158 п.н. *PpVPS15* ORF. Щоб уникнути можливих помилок ПЛР-ампліфікації, у кожному випадку секвенували щонайменше два незалежно-ампліфікованих фрагменти.

З метою встановлення ролі *PpVPS15* у процесі деградації пероксисом, був сконструйований делеційний мутантний штам *Δvps15*, як описано нижче. Для цього у плазміді pSO10 у три етапи було замінено амінокислотні залишки відкритої рамки зчитування *PpVPS15* з 1 по 760-ий на фрагмент, що містить *ARG4* ген *S. cerevisiae*. Перший етап полягав у клонуванні HindIII/SalI фрагмента довжиною 2,7 т.п.н. з pYM25 [331], що містив *ScARG4* у HindIII- і SalI-оброблений вектор pBluescript SKII з утворенням pOS5. На другому етапі, фрагмент 1035 п.н., що містив послідовність відразу вище від ATG старт кодону *PpVPS15* було ампліфіковано у ПЛР з використанням pYT6 як матриці. Праймери для цієї ПЛР (1 і 2 у Табл. 2.7.6, Додаток 2, зображені також на Рис. 2.7.5 А, Додаток 2) включали сайти рестрикції для BamHI і HindIII, відповідно. Для отримання pOS7, 5'-фланкуючий фрагмент був лігований у плазмиду pOS5, розщеплену рестриктазами BamHI та HindIII.

На третьому етапі, ПЛР-фрагмент розміром 1078 п.н., що містив послідовність з 3/ 'кінця *PpVPS15*, починаючи з нуклеотиду 2281 відповідної ORF, ампліфікували у ПЛР з використанням плазмиди pYT6 як матриці. Праймери для цієї ампліфікації (3 і 4 в Табл. 2.7.6, Додаток 11 та Рис. 2.7.5А, Додаток 2) включали сайти для SalI і KpnI, відповідно. Для отримання pOS10 ампліфікований фрагмент був лігований у pOS7, оброблену XhoI та KpnI. Розщеплення останнього вектора рестриктазами XbaI і XhoI призводило до вивільнення фрагмента розміром 4,7 т.п.н., що містив *ScARG4*, фланкований 5'- і 3'- послідовностями *PpVPS15*, який було трансформовано електропорацією у штам GS200 (*his4 arg4*) *P. pastoris* [328].

Прототрофні за аргініном трансформанти делеційною касетою відбирали на середовищі YND з гістидином і піддавали скринінгу для виявлення тих, у яких ген *PpVPS15* було делетовано (*Δvps15*), шляхом тестування на чутливість росту до підвищеної температури 37°C, – попередньо описаного фенотипу *Δvps15* мутанта *S. cerevisiae* [332]. Дійсно, було ідентифіковано декілька температуро-чутливих колоній. Для підтвердження делеції *PpVPS15* з відповідних трансформантів було виділено геномну ДНК і використано її як матрицю у ПЛР з двома наборами олігонуклеотидних праймерів (Табл. 2.7.6, Додаток 2, Рис. 2.7.5.А, Додаток 2). Перший набір містив праймери, один з яких був комплементарний до послідовностей в 3'-фланкуючій ділянці *PpVPS15* ORF, що були присутні в гені дикого типу *PpVPS15*, а інший зв'язувався з послідовністю гена у 5'-ділянці, відсутній у алелі *vps15* (праймери 5 і 3 в Таблиці 2.7.6, Додаток 2). Інший набір праймерів містив той самий описаний вище праймер до 3'-фланкуючої ділянки і другий праймер, який був комплементарним до послідовності в *ScARG4* (праймери 5 і 4 у Табл. 2.7.6, Додаток 2). *VPS15*-специфічний праймер ампліфікував фрагмент довжиною 1,722 т.п.н. з ДНК дикого типу, але не із ДНК, виділеної з *Δvps15*. Навпаки, *Δvps15*-специфічний праймер ампліфікував фрагмент розміром 980 п.н. з *Δvps15* ДНК, але не з ДНК дикого типу (Рис. 2.7.5, Додаток 2).

Для підтвердження унікального характеру інтеграції делеційної касети у локус *PpVPS15*, аналізували методом Саузерн-блотингу оброблену рестриктазами геномну ДНК зі штаму *Δvps15* для підрахунку інтегрованих у геном копій гена *ScARG4*. Ферменти рестрикції були обрані таким чином, щоб вони не розщеплювали ген *ScARG4*. ДНК фрагмент розміром 2,1 т.п.н., що містив ген *ScARG4*, був використаний як зонд для гібридизації. Як показано на Рис. 2.7.5 С, усі отримані у результаті обробки рестриктазами фрагменти виявляли тільки один *ScARG4*-вмісний фрагмент, що вказує на те, що тільки одна копія конструкту *Δvps15::ScARG4* була присутня у сконструйованому делеційному штамі.

2.7.7. Конструювання штамів *P. pastoris* з флуоресцентно-міченими пероксисомами. З метою флуоресцентного мічення пероксисом у різних

рекомбінантних штамів *P. pastoris* був сконструйований вектор pOPGP-1, здатний експресувати локалізовану до пероксисом мутовану (red-shifted) форму GFP (E-GFP) під контролем промотора гену *PEX8* (P_{PEX8}) *P. pastoris*. На першому етапі, P_{PEX8} експресуючий вектор був створений шляхом заміни фрагмента промотора *AOX1* гена (P_{AOX1}) у векторі експресії *P. pastoris* pHIL-A1 (Phillips Petroleum, Bartelsville, OK, USA) на ДНК фрагмент, що містив P_{PEX8} , отриманий з вектора pYT4 [328] після розщеплення рестриктазою BglII. З метою наступного клонування, липкі кінці BglII фрагмента були оброблені фрагментом Кленова, отриманим протеолітичним розщепленням ДНК-полімеразою I, а результуючий ДНК-фрагмент був вставлений у розщеплений SmaI- і EcoRV вектор pBS-SKII2 (Stratagene). З метою видалення EcoRI сайту у фрагменті P_{PEX8} отримана плазміда була розщеплена EcoRI рестриктазою, оброблена фрагментом Кленова і самолігована. Далі плазміда була використана в ПЛР для отримання P_{PEX8} фрагмента, що містив BamHI сайт pBS-SKII2 на його 5'-кінці та внесений EcoRI сайт на його 3'-кінці, використовуючи олігонуклеотиди 5'-AACAGCT ATGACCATG-3' і 5'-CAGGAATTCTAACAGGCACCTGAAGATA GGT-3'. ПЛР продукт обробляли рестриктазами BamHI і EcoRI і лігували в BglII- та EcoRI-розщеплену плазмиду pHIL-A1 для отримання вектора експресії pK312. Для створення модифікованого гена EGFP, що кодує продукт із пероксисомною локалізацією, було спочатку синтезовано два комплементарні олігонуклеотиди, які утворюють адаптерний фрагмент, що кодує останні дев'ять амінокислот і стоп-кодон білка Pex8 (включаючи PTS1 послідовність «AKL») із сайтом HindIII на 3'-кінці і Sall на 5'-кінці (5'-TCGACGCCCAATCAACCGCAAAGTTATAAACCGGTA-3' and 5'-AGCTTACCGGTTTATAACTTTGCGGTTGATTGGCG-3'), відповідно. Адаптер був вставлений у HindIII- і XhoI-розщеплену pEGFP (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), що привело до утворення химерного гена, що кодує EGFP, де останні дев'ять амінокислот Pex8 злиті в рамці з його карбоксильним кінцем (EGFP-PTS1). Наступна ПЛР реакція ампліфікувала EGFP-PTS1 конструкт з EcoRI сайтом 5' від EGFP та включала EcoRI сайт, розміщений на 3'-кінці злитого гену, використовуючи праймери

5'-CGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' та 5'-CAGAATTCGAAGC TTACCGGTTTATAACTTTGCGG-3'. Потім фрагмент EGFP-PTS1 був оброблений EcoRI і вставлений в унікальний сайт EcoRI плазмиди pK312 для отримання pOPGP-1.

Також створено вектор, який кодує химерний білок, що складається з 460 N-кінцевих амінокислот пероксину Pex2 *P. pastoris*, злитого з N-кінцем EGFP і експресованного під контролем P_{AOX1} . Pex2 є інтегральним мембранним білком в *P. pastoris* та інших організмах [330]. Для цього на першому етапі фрагмент NheI-HindIII довжиною 750 п.н., що містив ген EGFP з плазмиди pEGFP-C3 (Clontech) лігували в XbaI- and HindIII-розщеплену pUC18, щоб отримати pUC18-EGFP. На другому етапі, за допомогою ПЛР, використовуючи як праймери олігонуклетриди 5'-TCAGGATCCATGCCCAATAGGCTCATACC-3' та 5'-GACCATGGCACCAA CGAAAAAACCTGG-3' було отримано ДНК фрагмент, що кодує 1–460 амінокислоти білка Pex2. Цей фрагмент містив BamHI сайт на 5' кінці і NcoI сайт на 3' кінці. PEX2 фрагмент був розщеплений цими ферментами і вставлений по тих-же сайтах в pUC18-EGFP для отримання pUC18-PEX2-EGFP. На третьому етапі, відповідний вектор був розщеплений SmaI і XhoI, і фрагмент довжиною 2 т.п.н., що містив PEX2-EGFP злитий ген був лігований в PmlI- і XhoI-розщеплений вектор pPICZV (Invitrogen, Carlsbad, CA) з метою отримання pLC303. Останній вектор був лінеаризований в ділянці P_{AOX1} шляхом розщеплення PmeI перед трансформацією у *P. pastoris*.

2.7.8. Клонування та конструювання мутанта з делецією гена *P. pastoris* ATG28. Новий ген пексофагії у *P. pastoris* було клоновано методом функціональної комплементачії та селекції з аліловим спиртом, як деталізовано нижче. Комплементуюча плазміда була виділена після ретрансформації в *E. coli*. Було показано, що вона містить вставку геномної ДНК *P. pastoris* розміром приблизно 10,2 тис. п.н. Плазміда отримала назву pOS13. Ретрансформація pOS13 у вихідний мутант *atg28-52* повністю комплементувала фенотип мутанта. Судячи з її розміру, плазміда, ймовірно, охоплювала більше одного гена *P. pastoris*, тому

було сконструйовано кілька плазмід, що містять менші субфрагменти вставки геномної ДНК з рOS13. Фрагмент геномної ДНК розміром 4,55 т.п.н., що комплементував дефект пексофагії у *atg28-52* і імовірно містив ген *ATG28*, був секвенований на похідному рOS13 векторі рOS23.

Аналіз геномного фрагмента ДНК в рOS23 виявив три повних відкритих рамки зчитування (ORF), потенційно кодуєчих білки, що містили 194, 612 і 172 амінокислотних залишків. ORF#1 кодувала регуляторну субодиницю фосфатази типу В (кальциневрин), яка є висококонсервативною в дріжджах (більше 60% ідентичності). Передбачалося, що ORF#3 кодує консервативний гіпотетичний білок (більше 50% ідентичності до дріжджових гомологів) з доменом СinА з невідомою функцією. ORF#2 виявляла мало схожості до інших білків у базах даних (менше 22% ідентичності). Ділянку, що включає цю ORF, субклонували у вигляді ПЛР-фрагмента довжиною 2,27 т.п.н. з праймерами 5'-AGGAAT TCTTTTGATGAATTCAAGAG-3' (5'праймер) і 5'-AGGAATTCCACGTCAAAAAG TTGTAAG-3' (3'праймер) на плазміді рBLHIS, в результаті чого була отримана плазміда рOS33. Встановлено, що остання була здатна функціонально комплементувати мутант *atg28-52*, а отже несе послідовність гена *ATG28*. Дані нуклеотидної послідовності гена *ATG28* депоновано у GenBank (реєстраційний номер AY753207).

Штам з делетованим *ATG28* геном *P. pastoris* був сконструйований методом гомологічної рекомбінації делеційної касети у геном штаму дикого типу, використовуючи *ARG4* ген *S. cerevisiae* як селективний маркер. Для цього вектор рOS33 розрізали KpnI і самолігували, в результаті чого отримували плазмиду рOC1. Потім фрагмент EcoRI-EcoRI 2,3 т.п.н. плазмиди рGC112A, що містить ген *ScARG4*, лігували по сайту розщеплення MfeI рOC1, в результаті чого отримували плазмиду рOC2. Ця плазміда несе фрагмент геномної ДНК *P. pastoris*, в якому ген *ATG28* пошкоджений за допомогою *ScARG4*, починаючи з 61 п.н. вище стартового кодону трансляції *ATG28* гену, і закінчуючи нуклеотидом 1388 *ATG28* ORF, в результаті чого видаляються кодони *ATG28* для амінокислотних залишків від 1 до 462. Делеційну касету виділяли з рOC2 як 3,3 т.п.н. довгий фрагмент EcoRI і

трансформували шляхом електропорації у штам дикого типу GS200 (*his4 arg4*) (Табл. 2.7.7, Додаток 2). *ARG4 his4* трансформанти були ізольовані на YNB середовищі з глюкозою і гістидином, і в наступному аналізувались на порушення пексофагії методом візуалізації АОХ у колоніях. Були відібрані два штами, які демонстрували затримку інактивації АОХ після заміни середовища з метанол-вмісного на середовище, що містить глюкозу або етанол. Правильна інтеграція делеційної касети в геном і заміна ORF *ATG28* дикого типу у двох трансформантах була підтверджена методом ПЛР.

Для аналізу експресії *Atg28* були сконструйовані штами $\Delta atg28$ і *atg28-EGFP* з міченими BFP-PTS1 пероксисомами, за допомогою інтегративного вектора, що кодує ген резистентності до бластицидину і P_{AOX1} -BFP-PTS1, отриманого з pDM1 [295], розщепленого BglII і SalI і лігваного в сайт множинного клонування pPIC6-A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Потім отриманий вектор лінеаризували з використанням унікального сайту *PmeI* в промоторній ділянці *AOX1* для інтеграції в геном $\Delta atg28$ і $\Delta atg28$ (*Atg28-GFP*) штамів.

За допомогою флуоресцентної мікроскопії вивчали внутрішньоклітинну локалізацію химерного білка *Atg28-GFP*, експресованого під промотором *ATG28*. Штам, що експресує повнорозмірну *Atg28* зливу з *EGFP*, конструювали наступним чином: спочатку конструювали інтегративний вектор, який ніс ген, що кодує *EGFP*, під промотором *AOX1 P. pastoris*. Для цього плазмиду pPICZ-B (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) розрізали за допомогою *XbaI* / *SalI* і лігували з *NheI/XhoI*-флакованим фрагментом, що містить *EGFP* ORF, виділений з вектора pEGFP-C3 (Clontech Laboratories, Inc., Palo, CA, США). Потім отриманий вектор pOC3 розрізали за допомогою *BspHI* і *AfeI* для вивільнення фрагмента з промотором гена *AOX* і лігували з фрагментом, що включає промоторну ділянку і ORF *ATG28* без кодону термінації трансляції. Останній виділяли як *NcoI*/фланкований 2 т.п.н. ПЛР-продукт з праймерами OLC18 (5'-TTCCCATGGTCAGTTTGCGATACGGTTT-3') і OLC9 (5'-ATTAGCGCTCCCTCATCCTTATTACCTT-3') і з pOS23 як матрицею. Отриманий вектор pOC6 був лінеаризований по унікальному сайту *SapI* в ділянці промотора *ATG28* для інтеграції у геном мутанта $\Delta atg28$. Аналіз ізольованих трансформантів

показав, що злитий білок Atg28-EGFP, експресований під нативним промотором гена *ATG28*, функціонально комплементував дефект пексофагії у *Δatg28* мутанта.

Для конструювання штаму, що експресує як Atg28-CFP, так і YFP-Atg17, шляхом лігування ПЛР-ампліфікованої Atg17 вставки в рJCF100 з використанням *KpnI* і *XhoI* був отриманий інтегративний вектор, що кодує YFP-Atg17 [333]. Отриманий вектор лінеаризували з використанням унікального сайту *StuI* в локусі *HIS4* для інтеграції в геном PPY12. Крім того, конструювали вектор, що кодує Atg28-CFP, розщеплюючи рОС6 за допомогою *ScaI* і *Eco47III*, і лігували отриманий вкорочений фрагмент Atg28 з тупими кінцями в похідну від рPICZ плазмиду, у якій АОХ промотор видаляли і клонували CFP перед АОХ термінальною ділянкою. Отриманий вектор лінеаризували з використанням унікального сайту *PstI* в Atg28 для інтеграції в геном PPY12 *his4::YFP-Atg17-HIS4*. Кінцевим результатом такої інтеграції є у ворення двох суміжних алелів Atg28 в геномі, перший з яких знаходиться під контролем ендogenous промотору, а також кодує С-кінцевий CFP-таг, а другий – усічений безпромоторний фрагмент Atg28.

2.7.9. Клонування та конструювання мутантів з делецією гомологів *ATG26 P. pastoris* та *H. polymorpha*

2.7.9.1. Ідентифікація та функціональний аналіз *ATG26 P. pastoris*. Три плазмиди з банку генів *P. pastoris*, здатні функціонально комплементувати *pdg3* мутант, були виділені із відповідних трансформантів після ретрансформації в *E. coli*. Рестрикційний аналіз показав, що вони містили вставки геномної ДНК *P. pastoris* в діапазоні від 5 до 7 т.п.н. і всі мали спільний фрагмент ДНК. Також встановлено, що фрагмент BamHI-BamHI розміром 3,3 т.п.н. з геномної ДНК найменшої з плазмід, названої рОS2, частково доповнював дефект пексофагії мутанта *pdg3*. Цей фрагмент ДНК після субклонування на вектор рBluescript-HIS4 з утворенням вектора рОS4, був секвенований і виявлено, що він містить єдину ORF, яка кодує білок довжиною 1211 амінокислот.

Штам з делецією гена *ATG26 P. pastoris* виділяли методом гомологічної заміни гена, використовуючи ген *ARG4 S. cerevisiae* як маркерний. Коректна делеція нуклеотидів 64-2308 *PpPDG3* ORF була підтверджена ПЛР-аналізом (Рис. 2.7.6, Додаток 2).

2.7.9.2. Ідентифікація та функціональний аналіз *ATG26 H. polymorpha*. Для детального аналізу фізіологічної ролі *HpAtg26* у пексофагії нами був сконструйований відповідний делеційний штам. Делеційний вектор *pYT1-deltaHpATG26* був сконструйований у два етапи. Фрагмент розміром 1,57 т.п.н. був ампліфікований за допомогою ПЛР з геномної ДНК *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* і включав 3'-кодуючу ділянку 1,25 т.п.н. (Рис. 2.7.7, Додаток 2).

Праймери OL70 і OL71 (Табл. 2.7.8, Додаток 2), що містили сайти рестрикції *XbaI* і *VamHI*, відповідно, були використані в цій реакції для подальшого клонування отриманого фрагмента в плазмиду *pYT1*. Фрагмент розмірами 0,51 т.п.н., що містив 5'-метіонін-ініціюючий ATG кодон гена *HpATG26*, був ампліфікований за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OL68/OL69 (Табл. 2.7.8, Додаток 2), які містили сайти рестрикції *SphI* і *PstI*, відповідно, для клонування ампліфікованої 5'-ділянки гена в плазмиду, що була сконструйована на попередній стадії. Отриманий конструкт, *pYT1-deltaHpATG26*, використовували як матрицю для ПЛР-ампліфікації делеційної касети з парою праймерів OL68/OL71 (Табл. 2.7.8, Додаток 2). Делеційна касета для *HpATG26* розміром 4,28 т.п.н. (Рис. 2.7.7А, Додаток 2) була трансформована в *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* шляхом електропорації. Селекцію прототрофних трансформантів проводили в мінеральному середовищі без лейцину.

Коректна інтеграція делеційної касети в геном була підтверджена методом Саузерн-блотингу. Для аналізу використовували тотальну ДНК з окремих трансформантів, оброблених рестрикційним ферментом *VamHI*, і фрагмент гена *ScLEU2* як зонд, отриманий як ПЛР продукт з *pYT1* з парою праймерів K22/KD21 (Табл. 2.7.8, Додаток 2). У результаті було відібрано трансформант *ATG26 :: ScLEU2 leu1-1*, загальна ДНК якого генерувала сигнал, відповідний фрагменту

VamHI/VamHI розміром 7,5 т.п.н., який був передбачений при гомологічній інтеграції делеційної касети в геном (Рис. 2.7.7Б, Додаток 2).

2.7.10. Клонування та конструювання мутантів з делецією генів *PDG1/PEX36* у *P. pastoris* та *H. polymorpha*

2.7.10.1. Ідентифікація та функціональний аналіз *PDG1/PEX36 P. pastoris*.

Декілька незалежних комплементуючих плазмід з трансформантів мутанта *pdg1 P. pastoris* банком генів були отримані після ретрансформації у *E. coli*. Усі вони частково перекривались у ділянці фрагменту геномної ДНК, що містив невідому ORF, що кодує білок довжиною 363 амінокислотних залишки. Субфрагмент EcoRV довжиною 1,36 т.п.н. з найкоротшої реплікативної плазмиди з банку генів pOS1 був клонований в інтегративний вектор pBL-HIS [334] з утворенням вектора pOS6. Клонований фрагмент містив повну ORF з 105 нуклеотидами промоторної послідовності і 161 нуклеотидом термінатора. Показано, що pOS6 повністю комплементувала фенотип УФ-індукованого мутанта *pdg1*. Таким чином, було ідентифіковано ген, початково позначений *PDG1* [335] і пізніше перейменований на *PEX36* [218]. Секвенування геномної ДНК, виділеної з УФ-індукованого мутанта, виявило, що ген *PDG1* містив єдину точкову мутацію, що спричинила утворення " "стоп-кодону і " "вкороченої білка Pdg1 з всього 30 N-кінцевими амінокислотами. Дані нуклеотидної послідовності *PDG1/PEX36 P. pastoris* депоновано у базу даних GenBank під номером [CAU67701](#).

Штам делетований за геном *PDG1* був виділений методом гомологічної заміни (gene replacement), використовуючи ген *ARG4 S. cerevisiae* як селективний маркер. Для цього з pOS1 виділяли перший рестрикційний 3'-фрагмент BglII-BglII довжиною 1,95 т.п.н., і ApaI-SalI -фланкований 5'-фрагмент довжиною 0,5 т.п.н. за допомогою ПЛР з праймерів SO32 (5'-GGGCCCCGATCAATAGTTGTC-3') та SO33 (5'-GTTCGACATCAGCGTTTGCGAC-3'). і послідовно клонували у ApaI-XhoI і VamHI оброблену pOS5 [335]. Отримана плазміда pOS11 містить фрагмент геномної ДНК *P. pastoris*, у якому ген *PDG1* замінено на *ScARG4* з 33 по 268

амінокислотні залишки (Рис. 2.7.8, Додаток 2). Делеційна касета була виділена з pOS11 як *ApaI-SacII* фрагмент довжиною 3 т.п.н. і трансформована електропорацією у штаб дикого типу GS200 (*his4arg4*). Трансформанти *ARG4his4* були виділені на середовищі YNB з глюкозою і гістидином та в подальшому аналізовані на фенотипові дефекти, характерні для вихідного УФ-індукованого *pdg1* мутанта. Були відібрані два клони, що виявляли порушення росту на середовищі з метанолом, а також сповільненню інактивацію АOX при адаптації до глюкози. Коректна інтеграція делеційної касети у геном і заміна ORF *PDG1* дикого типу у відібраних трансформантів була підтверджена ПЛР аналізом і комплементарним аналізом з УФ-індукованим мутантом *pdg1*, що несе ауксотрофну мутацію *arg4*.

2.7.10.2. Ідентифікація та функціональний аналіз *PDG1 H. polymorpha*. Для встановлення функціональної спорідненості ідентифікованого потенційного гомолога *PDG1* з *H. polymorpha* був сконструйований відповідний делеційний штаб, як зображено на Рис. 2.7.9, Додаток 17. Перший крок полягав у ПЛР ампліфікації з геномної ДНК *H. polymorpha* "NCYC495 *leu1-1* і праймерів OL76 і OL77 (Табл. 2.7.9, Додаток 17), та клонуванні 5' ДНК-фрагменту промоторної області *HpPDG1* довжиною 0,77 т.п.н. у BamHI і XbaI вектор pYT1. (Рис. 2.7.9, Додаток 17).

Як другий крок, фрагмент довжиною 1,52 т.п.н., що містить С-кінцеву частину *HpPDG1* і термінатор гену був ампліфікований за допомогою ПЛР, використовуючи пару праймерів OL78/OL79 (Табл. 2.7.9, Додаток 18), які містять сайти рестрикції HindIII і PstI, відповідно, та клонований у попередній вектор. Отриманий конструкт, pYT1-delta*HpPDG1*, був використаний як матриця для ПЛР ампліфікації делеційної касети з парою праймерів OL76/OL79 (Табл. 2.7.9, Додаток 2). Геномна ДНК потенційного делеційного штабу була виділена і проаналізована за допомогою ПЛР з праймерами СК15 (*ScLEU2* специфічний) і OL79 (*HpPDG1*-специфічний), подібно до підходу, описаного вище для інших нокаутних алелів генів.

З метою перевірки гіпотези про функціональну спорідненість білків Pdg1 і Pex16, ми також сконструювали вектор, здатний до експресії *Y. lipolytica PEX16* під контролем AOX1 промотора *P. pastris*. Для цього були використані праймери OL172 (5'-AAAGAATTTCATGCCCCCGTGCTCGTAA-3') і OL173 (5'-ATCCTCTAGATTAGAGAGTAGAGGCGGTG-3') з геномною ДНК *Y. lipolytica* як матриці, що продукує фрагмент ПЛР довжиною 1,326 т.п.н., що містить повнорозмірний *PEX16* ORF *Y. lipolytica*. Цей фрагмент був згодом клонований у оброблений EcoRI-XbaI вектор pPICZ-B *P. pastoris* для розміщення *YlPEX16* під контролем P_{AOX1} *P. pastoris*. Отримана плазмідна, позначена як pOP1 була лінеаризована і трансформована у реципієнтний мутант *Apdg1 P. pastoris* з метою геномної інтеграції і була здатна функціонально комплементувати дефект метилотрофного росту.

2.7.11. Селекція та функціональний аналіз умовних мутантів *H. polymorpha* по гену *PEX6*. Для виділення умовних температуро-чутливих мутантів, клітини вихідного штаму *per5-C79 H. polymorpha* були підірвані у рідкому середовищі YPD та висіяні на чашки з YNM з 1% метанолом з розрахунку 5×10^7 клітин/чашку. Далі суспензію клітин мутагенізували за допомогою УФ впродовж 60 секунд. Після цього чашки інкубували 4-5 діб при 28°C чи 37°C і колонії реплікувались на чашки з YNM для ідентифікації мутантів з умовними температурними фенотипами при 28°C і 37°C, тобто з відновленою здатністю до використання метанолу при вищих або нижчих температурах.

Природа передбачених мутацій у вихідному *pex6* і похідному *cs* мутанті була встановлена шляхом виділенням відповідних алелей з геномною ДНК і їх секвенування. Для цього тотальні ДНК були виділені з *pex6* і *cs pex6* мутантів та служили як матриці у ПЛР з праймером PEX6-F: 5'-GCTGT CGTCAACAATAATG-3', специфічним для промоторної області гена *PEX6* і праймером PEX6-R: 5'-ATTTACCGGAAGTCGCTTG-3', специфічним до 3'-фланкуючої *PEX6* ген послідовності.

2.7.12. Конструювання продуцентів амінооксидази (АМО) *H. polymorpha*. Для селекції покращених продуцентів АМО у реплікативну плазмиду рУТЗ, що містить комплементуючий ген *ScLEU2* [328], був клонований ген *HpURA3* з плазмиди рBSK-URA [336]. Для цього ORF *HpURA3* з його промоторною ділянкою довжиною 241 п.н. виділяли з рBSK-URA3 як рестрикційний фрагмент *XbaI-XbaI* довжиною 1,8 т.п.н. В результаті лігування цього фрагмента в *XbaI*-лінеаризовану рУТЗ отримано плазмиду рУТЗ-URA3.

Далі, касету експресії P_{AOX} -АМО довжиною 4,9 т.п.н. ампліфікували з геному штаму NCYC495 *leu1.1 ura3::[P_{AOX}-АМО]₂* за допомогою ПЛР-реакції з праймерами OL52 (5'-TGTGGATCCTAGACTTATCCTGTTTG-3') і OL114 (5'-TGTGGATCCAAGATATCTTTGAGAT-3'). Як результат лігування цього *BamHI*-гідролізованого ПЛР-фрагмента у *BamHI*-лінеаризовану рУТЗ-URA3, отримано плазмиду рУТЗ-URA3-АМО.

На наступному етапі було сконструйовано вектор для надекспресії гена *HpАМО* під контролем P_{AOX} . Для цього рНІР4А-АМО обробляли ендонуклеазами *NotI* та *BamHI* і виділяли фрагмент довжиною 4,28 т.п.н. Після лігування цього фрагмента з *NotI/BamHI*-обробленим вектором рАДЕS ми отримали цільову плазмиду рАДЕS-АМО (див. Рис. 3.5.4). Далі було виділено трансформанти мутанта *adel H. polymorpha*з рАДЕS-АМО, які відновлювали прототрофність за аденіном і були стійкими до високих концентрацій генетицину, як надпродуценти АМО.

2.8. Методи детекції АОХ та клонування АТГ генів

2.8.1 Візуалізація активності АОХ у дріжджових колоніях при аналізі мутантних штамів. Нижче наведено часто експлуатований нами протокол для візуалізації активності АОХ в колоніях дріжджів, що загалом базується на раніше описаному методі [140], з певними модифікаціями. Цей протокол може бути застосований до усіх метилотрофних дріжджів.

1. Клітини дріжджів вирощують на YPD (1% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 1% глюкоза і 2% агар) чашках як невеликі округлі колонії (петчі) і інкубують протягом 1-2 дня при 30°C (37°C для *H. polymorpha*).
2. Клітини переносять методом відбитків-реплік на тверде середовище YNM (6,7 г/л YNB без амінокислот, 0,05% (w/v) дріжджовий екстракт, 1% (v/v) метанол і 2% агар) і інкубують протягом 24 год. З метою подальшого аналізу вихідних колоній, необхідно зберігати вихідну чашку (master plate) з середовищем YPD при 4°C.
3. Готується агаризована реакційна суміш на АОХ (100 mM К-фосфатний буфер, рН 7,5, 0,3% (w/v) агароза, 0,05% (w/v) хромоген о-діанізидин, 0,25% (w/v) цетилтриметиламоній бромід (СТАВ) як пермеабілізуючий агент, 1% (v/v) метанол і 3 Од./мл пероксидази хрому).

Для приготування суміші, перші три компоненти реакційної суміші коротко кип'ятять до повного розчинення агарози і хромогену. Потім додають СТАВ і розчин енергійно перемішують. При охолодженні до приблизно 40°C в суміш послідовно додають метанол і пероксидазу. В якості альтернативних компонентів реакційної суміші, 2,2'-азино-біс (3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) (ABTS) може бути використана як субстрат пероксидази (0,05%, w/v), а дигітонін як пермеабілізуючий агент (0,1%, w/v) замість о-діанізидину та СТАВ, обидва додаються після розчинення агарози [337].

Зауважимо, що ABTS не працює ефективно у поєднанні зі СТАВ як пермеабілізуючим агентом, тоді як комбінація о-діанізидину та дигітоніну є ефективною [140]. СТАВ, очевидно, є також дешевшим за дигітонін, і забезпечує краще проникнення реакційної суміші у випадках великої біомаси клітин на чашках.

4. 7-9 мл реакційної суміші для аналізу АОХ обережно наносяться на чашки, та витримуються 10-15 хв до затвердіння суміші при кімнатній температурі, після чого накриваються кришками та інкубуються середовищем догори протягом 1-2 год при 30°C. Петчі клітин із високою активністю АОХ при цьому набувають червоного (з о-діанізидином) або зеленого (з ABTS) забарвлення.

Pichia pastoris

Аналіз АОХ на чашках може бути використаний для селекції мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією. Мутації можуть бути індуковані за допомогою УФ-випромінювання або випадкового інсерційного мутагенезу (REMI), як описано в роботі [338]. Для ідентифікації мутантів *P. pastoris*, дефіцитних за індукованої глюкозою мікропексофагії або індукованої етанолом макропексофагії [268], або за обома процесами, слід дотримуватись протоколу, наведеного нижче:

1. Мутагенізовані клітини *P. pastoris* інкубуються на твердому середовищі YND (6,7 г/л yeast nitrogen base, YNB без амінокислот, 1% глюкоза та 2% агар) з розведенням, що забезпечує приблизно 200 колоній дріжджів на чашці, протягом 2-3 днів при 30°C.
2. Колонії переносяться методом реплік на тверде середовище YNM (6,7 г/л YNB без амінокислот, 0,05% (w/v) дріжджовий екстракт, 1% (v/v) метанол і 2% агар) та інкубуються протягом 24 год. Зберігати вихідну (master) чашку з YND середовищем при 4°C для подальшого аналізу колоній.
3. Колонії з YNM середовища реплікуються на YND і YNE тверді середовища (останнє з доданим 1% v/v етанолом замість глюкози). Відповідні чашки інкубуються через ніч при 30°C.

На YNM і YND чашки вноситься реакційна суміш на АОХ, як описано в параграфі 3.3.3.1 (кроки 3-4). Мутантні колонії з пошкодженою пексофагійною деградацією АОХ виявляють високу залишкову активність АОХ. Ці колонії збирають з вихідної чашки YND і повторюють кроки 1-4 для підтвердження виявленого фенотипу. На цьому етапі клітини немутагенізованого батьківського штаму дикого типу використовуються як негативний контроль. Схема та приклад експерименту з визначення АОХ на чашках, описаного у цьому підрозділі, показані на Рис. 3.3.5.

Hansenula polymorpha

У *H. polymorpha* мутанти з пошкодженою макропексофагією при адаптації до глюкози можуть бути отримані, загалом, як описано в попередньому параграфі,

за винятком того, що клітини інкубують на всіх середовищах при 37°C [337]. Крім цієї задачі, метод визначення АОХ на чашках може бути використаний для пошуку мутантів *H. polymorpha*, дефіцитних за глюкозною (катаболітною) репресією АОХ [29], [150]. Для цього можна використовувати методи негативної або позитивної селекції на основі УФ, хімічного або інсерційного мутагенезу [339].

1. У випадку негативної селекції, чашки із твердим середовищем YND з мутагенізованими клітинами *H. polymorpha*, висіяними із розведенням, що забезпечує ріст приблизно 200 колоній дріжджів на чашці, інкубують протягом 2-3 днів при 30°C. Для позитивної селекції, чашки з мутагенованими клітинами, висіяними із густиною приблизно у 10 разів вищою, ніж за негативної селекції, на середовище YNM з доданим аналогом глюкози, 2-деоксиглюкозою (2-ДГ) в концентрації 100-150 мг/л, інкубують як і при негативній селекції. 2-ДГ спричиняє репресійний вплив на пероксисомні ферменти, і таким чином клітини штаму дикого типу не ростуть у його присутності на чашках з метанолом.

2. Колонії переносять методом реплік на чашки з середовищем YND або YNB з додаванням іншого джерела вуглецю, напр. 1% v/v метанолу (YNDM), і інкубують протягом 24-36 год.

3. На чашки з YND чи YNDM вносять реакційну суміш АОХ, як описано у пункті 3.3.3.1 (кроки 3-4). Мутантні колонії з ушкодженою глюкозною репресією виявлятимуть високу активність АОХ. Ці колонії відбирають із вихідної чашки і повторюють кроки 1-4 для підтвердження виявленого фенотипу. На цьому етапі, клітини немутагенізованого батьківського штаму дикого типу повинні використовуватися як негативний контроль. Мутанти з високою АОХ активністю на чашках з YND виявляють так званий «конститутивний» фенотип, тобто не вимагають метанолу для індукції АОХ у присутності глюкози. Мутантні штами, що виявляють активність АОХ на середовищі YNDM належать до так званого «індуцибельного» фенотипу, тобто вони є дефіцитними за глюкозною репресією чи виявляють дерепресію синтезу АОХ тільки у випадку, коли присутній метанол як субстрат-індуктор.

2.8.2. Позитивна селекція для клонування *ATG* генів з використанням алілового спирту як селективного агента. Селекція на основі алілового спирту може бути використана для клонування *ATG* генів з геномних бібліотек дріжджів за допомогою функціональної комплементачії. Це, зокрема, стосується УФ- або хімічно індукованих мутантів, дефіцитних за пексофагією, для яких дефектні гени не можуть бути ідентифіковані іншими засобами. Нижче ми пропонуємо розроблений нами протокол, успішно використаний для *P. pastoris* [335], [340] з цією метою. Також було запропоновано принципово аналогічний протокол для *H. polymorpha* [341].

1. Клітини мутанта *P. pastoris*, дефіцитного по пексофагії, трансформують геномною бібліотекою *P. pastoris* (зазвичай використовують *his4* штам-реципієнт і реплікативну геномну бібліотеку на основі *HIS4* гена *S. cerevisiae* [334]). Клітини культивують на чашках з мінімальним середовищем YND (6,7 г/л YNB без амінокислот, 1% глюкоза і 2% агар) 3-4 дні при 30°C і відбирають прототрофні за гістидином трансформанти.

2. Колонії реплікують на чашки з YNM (6,7 г/л YNB без амінокислот, 0,05% дріжджовий екстракт, 1% метанол і 2% агар) та інкубують протягом 24-36 год. Необхідно зберігати вихідну (master) чашку з YND середовищем при 4°C для уникнення переросту колоній та для їх наступного аналізу.

3. Колонії з YNM середовища реплікують на тверді середовища YND і YNE (останнє із доданим 1% етанолом замість глюкози), що містять 0,1 мМ і 0,15 мМ аліловий спирт, відповідно. Чашки інкубують протягом 2-3 днів при 30°C.

Колонії, функціонально комплементовані до фенотипу дикого типу (тобто із відновленою пексофагією), деградуєть пероксисомну 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 мутант по пексофагії. Таким чином, вони здатні до відносно швидшого росту при індукції пексофагії у присутності алілового спирту. Кандидатів із найкращими ростовими характеристиками відбирають з вихідної чашки з YND середовищем і аналізують на фенотип відновлення пексофагії за

допомогою методу детекції АОХ на чашках, як описано в параграфі 3.3.3.2. (етапи 2-4). Схема відповідної селекції зображена на рис. Рис. 3.3.6.

2.9. Програмне забезпечення для *in silico* аналізу

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 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, алгоритм Multalin версії 5.4.1 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>).

2.10. Статистичний аналіз експериментальних даних

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи стандартні методи. Усі досліди повторювали тричі з трьома експериментальними паралелями у кожному варіанті. Точки графіків, наведених на рисунках, та точки ординат діаграм відповідають середньому значенню «М», розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Середню похибку «m» отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки «σ». На рисунках вона представлена біля точок вертикальною лінією, довжина якої відповідає величині «m». Порівняння двох мінливих величин здійснювали на підставі показника вірогідності різниці «t» (критерій Ст'юдента). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли величина «p» була меншою 0,05.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження ролі компонентів системи транспорту глюкози в механізмах глюкозного сигналювання та катаболітної регуляції в *H. polymorpha*

3.1.1. Ідентифікація та аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів *HXS1* та *HXT1* та їх порівняння з базами даних

Метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* були успішно використані в дослідженнях молекулярних механізмів біогенезу та деградації пероксидом, регуляція яких залежить від джерела карбону [2]. Також відомо що *H. polymorpha* є важливим видом дріжджів, що широко використовується в біотехнології як ефективна платформа для експресії гетерологічних білків що в основному регулюються репресованими глюкозою промоторами [3], [129]. Крім того, ці термотолерантні дріжджі нещодавно були запропоновані як перспективний організм для високо-температурної ко-ферментації основних цукрів гідролізатів лігноцелюлози, глюкози та ксилози [342]. Всебічне розуміння глюкозозалежних сигнальних шляхів у цих дріжджів є також необхідним для оптимізації платформи для експресії відповідних генів *H. polymorpha*, чи для конструювання штамів здатних до одночасної утилізації глюкози та інших цукрів з лігноцелюлози. Беручи до уваги наявність повної послідовності геному *H. polymorpha* [254] та розроблені методи молекулярної генетики [296], ці дріжджі можуть в подальшому служити зручною моделлю для з'ясування шляхів сенсингу глюкози у нижчих еукаріотів і зокрема у Кребтрі-негативних (нездатних до аеробної ферментації) дріжджів.

Перед початком цих досліджень нами було встановлено, що білок *H. polymorpha* Gcr1, який виявляє подібність до сенсорів глюкози, є необхідний для ефективного транспорту глюкози та глюкозної репресії, але не для механізмів пексофагії [29]. Беручи до уваги, що експресія генів метаболізму метанолу у *H. polymorpha* строго репресована у присутності гексоз, дисахаридів та етанолу, лише глюкозна репресія (та, у меншій мірі, репресія що регулюється фруктозою та

манозою) залежить від Gcr1. У Gcr1 також відсутня С-кінцева послідовність, типова для ряду сенсорів дріжджів, яка є необхідною для їх сигналювання [29]. Дослідження, спрямоване на встановлення механізму дії Gcr1, зокрема його ролі у транспорті гексоз у порівнянні із безпосередньо сенсингом, представлено у підрозділі 3.1.10.

Нами проведено скринінг повної геномної послідовності *H. polymorpha* з метою пошуку інших гомологів транспортерів гексоз, включно з такими що потенційно можуть мати функцію сенсорів. Нижче ми представляємо функціональний аналіз Hxs1, нового ортолога сенсорних білків *S. cerevisiae* Snf3 та Rgt2, які є нефункціональними як транспортери, та який є залучений у сигналюванні для індукції транскрипції ряду генів, зокрема кодуючого Hxt1, – першого функціонального транспортеру гексоз, ідентифікованого у *H. polymorpha* [25].

Білковий продукт гена *H. polymorpha* HXS1 (*HeXose Sensor*) (Contig 26, orf. 375, база даних геному *H. polymorpha* (<https://ssl.biomax.de/rheinbiotech>) [254] було ідентифіковано за допомогою аналітичної програми BLAST як найближчий внутрішньовидовий гомолог попередньо описаного нами у *H. polymorpha* Gcr1 [29]. Білок Hxs1 виявляє 44% ідентичності первинної амінокислотної послідовності з Gcr1 та 62% подібності з цим білком у ділянці 12-ти трансмембранних доменів (ТМ), характерних для всіх транспортерів гексоз з основної надродини фасилітаторів (Major Facilitator Superfamily, MFS) (Рис. 3.1.1А). Hxs1 містить 638 амінокислотних залишки на відміну від Gcr1 який складається з 541 амінокислотного залишку. Hxs1 володіє добре вираженими N-, та С-кінцевими послідовностями, довжиною у 67 та 109 амінокислотних залишки відповідно (Рис. 3.1.1А). Початкове порівняння з доступними базами даних та філогенетичний аналіз засвідчили, що Hxs1 належить до окремої підгрупи гексозних транспортерів, до якої також входять також усі інші відомі дріжджові транспортер-подібні сенсори, включно з *S. cerevisiae* Snf3 та Rgt2 (Рис. 3.1.1Б). Однак детальне порівняння Hxs1 з послідовностями найближчих гомологів свідчило, що цей білок, подібно до сенсора глюкози Hgt4 *C. albicans* [24], не містить так званого «домену сенсора глюкози» («glucose-sensor domain») в його С-

термінальній ділянці, який є характерним для Snf3, Rgt2 *S.cerevisiae* та Rag4 *K. lactis* та є важливим для їхніх сенсорних функцій [17] (Рис. 3.1.2).

Слід визначити той факт, що Hxs1 виявився ближчим гомологом, у порівнянні з Gcr1, до дріжджових нетранспортуючих сенсорів (54% та 53% ідентичності до Snf3 та Rgt2, відповідно, відносно 42% і 45% ідентичності, виявленої до ТМ-ділянки Gcr1). Таким чином, Hxs1 є більш тісно спорідненим до сенсорів глюкози з інших дріжджів, ніж до Gcr1, що переконливо свідчить про те, що відповідні гени *HXS1* та *GCR1* не виникли в результаті генної дуплікації у геномі *H. polymorpha*.

Дійсно, близькі гомологи Gcr1 були виявлені у ряду багатоклітинних грибів [30], [343]. Так, описані у літературі білок MSTA з *Aspergillus niger* (демонструє 74% ідентичності його послідовності до Gcr1) [344], та дріжджовий білок Gxs1 з *Candida intermedia* [345] (Рис. 3.1.1B), мають характеристики високоафінних симпортерів і здатні функціонально компенсувати дефект утилізації глюкози у *S. cerevisiae* hxt нуль штаму з делетованими власними транспортерами.

Нами також виявлено, що геном *H. polymorpha* містить також інші транспортер-подібні гени, чий передбачуваний білковий продукт загалом виявляють менше 30% подібності до Hxs1 та Gcr1. Одним із винятків є продукт гена, позначеного як *HXT1* (*HeX*ose *T*ransporter) (Contig 6, orf. 206). Hxt1 виявляє 37% та 34% ідентичності амінокислотної послідовності до Gcr1 та Hxs1, відповідно, але його подібність до функціональних транспортерів гексоз з інших дріжджів є значно вищою (наприклад, *HpHxt1* виявляє приблизно 60% ідентичності до Hxt3 *S. cerevisiae* та Rag1 *K. lactis*) (Рис. 3.1.3).

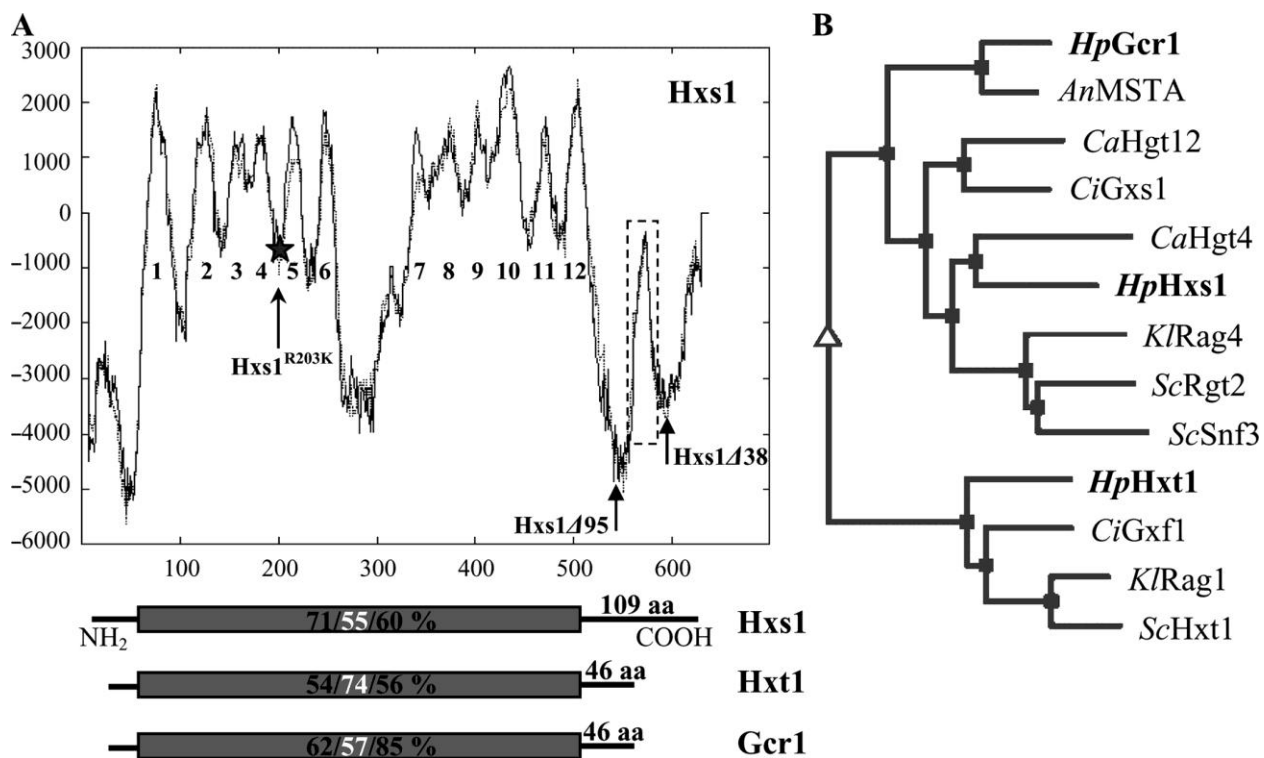


Рис. 3.1.1. Аналіз амінокислотної послідовності Hxs1. **(А)** Передбачена топологія Hxs1. Показники гідрофобності відкладено на осі Y, порядкове число амінокислотних залишків – на осі X. Пронумеровано дванадцять передбачених трансмембранних сегментів (ТМ 1-12). Схематично представлено структури трьох гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha*; позначено у відсотках подібності їх послідовностей до *ScSnf3/ScHxt1/AnMSTA*, відповідно. Залишок R203 в Hxs1 що, при заміні на залишок лізину конвертує Hxs1 у конститутивно-сигналюючу форму, позначено зірочкою. Вертикальні стрілки вказують на розмір сконструйованих форм Hxs1 з делетованими С-кінцевими ділянками. Обмежений пунктирною лінією сектор позначає С-кінцевий фрагмент Hxs1, подібний до «домена глюкозного сенсора». **(В)** Філогенетичне дерево, побудоване за ознакою подібності первинних послідовностей, що відображає імовірний еволюційний зв'язок білків *H. polymorpha* Hxs1, Hxt1 та Gcr1 з іншими транспортерами гексоз дріжджів і грибів. Для спрощення відображення результату зображено лише вибрані представники транспортерів грибів, чия функція досліджена експериментально. Корінь дерева позначено відкритим трикутником, корені окремих гілок дерева позначено суцільними квадратами. *HpHxs1*, *HpHxt1* and *HpGcr1* виділені жирним шрифтом. Абrevіатури для позначення видів-господарів: *An* – *Aspergillus niger*; *Ca* – *Candida albicans*; *Ci* – *Candida intermedia*; *Hp* – *Hansenula polymorpha*; *Kl* – *Kluyveromyces lactis*; *Sc* – *Saccharomyces cerevisiae*.


```

HpGcr1 1 -----VAGSEHGAG
HpHxs1 1 -----MSTEDRDHSPPLELRELSLQEPACQVEIRDYTTTDDY--DQAQPSVEDQKDKDQAE
ScSnf3 1 MDPNNSNSSSETLRQEQGFLDKALQVRKGIARRRNSNKHCHPEPDTTSRTTPDSQRQNSRQRSMMTSVFTPESTHDE
HpHxt1 1 -----MSNQQOSKQSDIGSVTPPEENNYDQA-HNKATLFE
ScHxt1 1 -----NSNPELISPOKNSNSNYEESGRSKAMNT-EGKIESPH-ENSESQV
KlRag1 1 -----MSNOYTESSAGSSETHSDDNTALKAGSRRDQKVEH-EDNDTEK

HpGcr1 12 FADV--NRIEPLTYRAYLKAFGAFGGILPGYLSYISGVAGNDYFIEHTGKVKHEDDDSPFVWSSQKSLTSLSA
HpHxs1 56 GAEL--ECQRNWSHMAVYVGLLMLNIGPILCYDTGLIMLLBNKYVKRTPFPNNSE-----FSASCSEHISMLSI
ScSnf3 81 NSILPSEPPQKQSNMSIQVGFVAVGGLFGYDTGLINSITSNYVNSHVLPNE--RS-----FPAQOMSILVPSLSI
HpHxt1 37 HQDISH-GRSMQGLGTCLLSLAPGGFVFGWDTGTISGFVNNPDPNRPQIQNBE-----ERYLSNRDQMLISLPI
ScHxt1 49 QPAAAPPYTGKGVYVTVSICVMVAPGGFIFGWDTOTISGFVACDPLRRPGMKKHQC-----SHYLSKRRGLIVSIPNI
KlRag1 47 TABELQQHPKRYIFVSLCCVMVARGGFVFGWDTGTISGFVACDPLRRFGQEKADG-----SHYLSNRDGLIVSIPNI

HpGcr1 90 STFFGAVCAEDLDMGRRR-TIIVTGCSIVYGVAAQVAS--TVALSNVGRVDAQVGVFVSSVWVYLSBSIPKRIKA
HpHxs1 127 STFVGSFAPVLSRVGRRRISIVASSTIMPSLGTLDQIVS-EGIPLQVGRVYSCFVGVMSAIIIPLYQAEVSPKWRGS
ScSnf3 153 STFFGALTAFFISSYGRNPTIFSTFTFISIGNSVCVA-CGITLIMRVISGQGTGASAVVFLYQASRHSRGA
HpHxt1 112 SCALGGLTLGRADSKGRKVGIMLT-MIVYIVGIVQIASITSVQFPFGRIIISGLAVGSSVLCMEFISLTKETIRGA
ScHxt1 125 SCALGGVLAKLGMVGRRIGLIVV-WVIVYIGIINQIASINKWYQYFGRIIISGLGVGGITVLSMLISEVASEHRT
KlRag1 123 SCAGGIVLSNIGRVRRRIGLITV-TIIVYIGIINQIASINKWYQYFGRIIISGLGVGGITVISEMLISETAPMHRGT

HpGcr1 168 IVSGYCFVYIIEELASVDYGT-EHRNDSGSYRIPIAQOLINAIIDANGLILPESPRYVYLKRFPRANVSRIRGO
HpHxs1 206 VISPYQWATWGLLSSAITQAT--RSIDARCYRIFIGQLINGVVLGGVYSLPESPRFVKKDRLDLALHASSFRSL
ScSnf3 232 LISTQWATWGLLVSSAVSQTI-FARNEASSYRIFIGQVYVSSFLALQVFPSPRYVYLKRLDEAKRISFTIRGV
HpHxt1 191 LVSSYGLNITLSEFPGYCTIVGYHNDDEENRRIPLGLCFAWALLIFGNTMPESPRYLTEKDRLEDAKESIAKANNV
ScHxt1 204 LVSCYQVMTLGLPEGYCTNNGT-KVNSNVEVWRVPLGLCFAWALFVIGMMFVPEPRYLVEAGRIDEARASLAKNKC
KlRag1 202 LVSCYGLMITFCIFPGYCTNYGT-KVNSNVEVWRVPLGLCFAWALFVIGMMFVPESEARLVEVTEQIEARKSLAKTKV

HpGcr1 247 PIISDTEBELARIVNHEYSVIPTTSYWC-SWACFTGLRRBSNLAETLQTSNMMQDWDVNEIYYEGTIFRQO
HpHxs1 285 PINKSLVEELTEIKASHDYEMSPPT-----SIMDCFRSSPSRASC-LRRMTGMLLCALOCCSCINEIFYYGVNYVVR
ScSnf3 311 PWSCHIEELVEIKATYDYSFSS-----NFIICFISSKSRKQ-TLRMFTGLAQCAFQSPSINIFYYGVNPFNK
HpHxt1 271 EIDSEFVERHAIILNSIEIEPCAGSR-SWGLPTGKPKI----RYRLFVGVILQSLQQLSGDNVFFYYGTIRKS
ScHxt1 283 EKHPIVLYELETREASVEMSAAGTA-----SWGLPTGKPKM----PRTMMGIMIQSLQQLSGDNVFFYYGTIVPCA
KlRag1 281 SIDDEVVKYELKIQSSIELEAWQNI-----SWGLITGKPKM----PRTLMGIMIQSLQQLSGDNVFFYYGTIRFS

HpGcr1 327 ICTIHNEPLSMITIVNVASTPLSFYITEKPRRADMVIGAGMVVCOFTVWIGITVDG-----DNQKTVSAMI
HpHxs1 359 AELIANSYLISPIYTVNVVPTIFGIPSEVELIGRRMILVAGSMVTSNPIYINAVG-VTT-----DSLINPKVMV
ScSnf3 385 TR-VNSYLVSPFIYAVVVFVPCLSFVVEFGRKRLVGGYITHTANFTVRIIV--CSI-----KIVNPKVMV
HpHxt1 342 VG-LDSPEFESINLESVNFASTIGSLVVDPRGRFPTLISGIGMAGLVIPHAL--TKIYLKREFGV--PNQSVEDAMI
ScHxt1 354 VG-LDSPEFESINLESVNFASTCCSLVVDPRGRNCLMAGVGMVGVYVYVRSVGVTRILMPCQQL--SRKAGNOMI
KlRag1 352 VG-LDSEFETSINLESVNFASTFFALMTVDFGRNCLLYGCGMVAVYVYVRSVGVTRILMPEDEPHPIISSKAGNOMI

HpGcr1 397 AFTCYVIFPFASWGFAMVILGRIEPLIRSRGVGLSASNNLNCQIAVIFPYMVDGEL--SNIGAVVFTWASLQGC
HpHxs1 427 APVCLDIAPFASTWGFAMVIVGEMYSSEVRCFAVALTANINWVNFACCFPIYVDGTGKHTALGTIFFLWGLSNFV
ScSnf3 453 AFTCLIAARSAWCGVNVVSAELYPLQVRSKTAICANANNVNFQCALIFPYIVDTSEHSSICARIFFLWGLSNAM
HpHxt1 419 FLSCLVIFFPATTWGFCEVTVVSETYPLRIRKQMGIAQSANWLGFLIAPPTPEI-----INAHHRANGVDFGCVVF
ScHxt1 431 VRAFPYIFCPATTWAPIAVVVISCEPLRVSKQSSASANNWCFLISPTPEI-----TGAINNYGVVFMGCVVF
KlRag1 431 VRAFPYIFCPATTWAPIAVVVISSEYPLRVKRAMAIASANNWCFLISPTPEI-----ISAHHTYGVVFMGCVVF

HpGcr1 475 CLDAIMLIPETKGLTLEEVVLEET-TPWISAKKPKPSTPRAEMGLAKDDKGVTHELENAHVESV-----
HpHxs1 507 SEVENAFYNYETKGLLLEEVDELFRVCKSARKSMYKPKHETQENESSPRHSESHANAVAMTLDLILVFNNVPSVHST
ScSnf3 533 SWIVVLTLYETKGLTLEEVLEEDYIKSSGVVSPKPKNDIRERLKFQYFPCORLEDGKNTFLAKRNFQDETRNDFRN
HpHxt1 493 SEFEVAFVPEPKGLTLEEVVQYIYTPGLAFMISFHKQCHDSTEK-----
ScHxt1 505 RYFVYVFPVPEPKGLSLEEVNENYASQVLPKKSARVYVSKRGADYNADLMHDDCFYNSIFERR-----
KlRag1 505 RFFVYVFPVPEPKGLTLEEVNENYSECVLPKSSVWVSSRRGAEYDVAECHDDREWYKAML-----

HpGcr1 -----
HpHxs1 587 DDESFFYPHLSSEYGPQFNYNY--NQSDRMGLISLVLGDDGAEVSHSHGQ-----
ScSnf3 613 TISGIDISPNQKEVHSIPRRVDIPSTRIIESPSSSSTVVPVPSLQDVPIQQTTEPAEIRTKYVDL // DLK 884
HpHxt1 -----
ScHxt1 -----
KlRag1 -----

```

Рис. 3.1.3. Порівняння амінокислотних послідовностей гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha*. Послідовності Hxs1, Gcr1 та Hxt1 порівнювали з послідовностями сенсора гексоз (*ScSnf3*) чи функціональними транспортерами (*ScHxt1*, *KlRag1*). Позначення генів наведені у легенді до Рис. 3.1.1.

Відповідно, Hxt1 потрапляє у філогенетичну групу (clade), до якої належать більшість відомих транспортерів глюкози з різних дріжджів (представлені ScHxt1 та KlRag1 на Рис. 3.1.1B). Отже, подібність амінокислотної послідовності вказує на Hxt1 як можливого кандидата на роль функціонального транспортера гексоз у *H. polymorpha*.

3.1.2. Конструювання штамів з делеціями у генах *HXS1* та *HXT1*, штаму *Δgcr1Δhxs1* з делеціями обох генів та аналіз їх фенотипів

Для з'ясування фізіологічних функцій двох ідентифікованих гомологів транспортерів гексоз *H. polymorpha*, нами сконструйовано відповідні *Δhxs1* та *Δhxt1*-нуль (делеційні) мутанти, як описано у розділі «Матеріали і Методи», та проведено їх детальний порівняльний аналіз, у тому числі із раніше описаним *Δgcr1* мутантом [29].

З метою дослідження ефективності транспорту глюкози клітини сконструйованих делеційних мутантів *Δhxs1* та *Δhxt1* були преінкубовані протягом 2 год у середовищі YNB з різними її концентраціями, відповідно 1,0, 0,1, чи 0,01%. Встановлено, що у клітинах *Δhxs1* та *Δhxt1*, адаптованих до 1% глюкози, низькоафінний транспорт глюкози був значно знижений, тоді як дефект високоафінного транспорту був менш виражений. При цьому транспорт глюкози був близьким до рівня штаму дикого типу, якщо клітини мутантів були інкубовані з 0,1% чи 0,01% глюкози (Рис. 3.1.4A). Розширений у часі аналіз завідчив індукцію низькоафінного транспорту в мутантних клітинах *Δhxs1*, преінкубованих у середовищі з 1% глюкози в періодичній культурі, але лише після значної затримки (Рис. 3.1.4B). Рівень транспорту глюкози значно не відрізнявся між клітинами *Δhxs1* та клітинами дикого типу, преінкубованих з гліцеролом чи метанолом. Ці результати свідчать на користь функціонування Hxt1 у *H. polymorpha* як низькоафінного глюкозного транспортера, індукція якого глюкозою опосередковується передбаченим нетранспортуєчим сенсором Hxs1. Цей висновок узгоджується із даними про подібність їх амінокислотних

послідовностей та їх функціональним аналізом у гетерологічній системі *S. cerevisiae* (див. нижче Рис. 3.1.9).

Також нами виявлено, що адаптовані до глюкози клітини $\Delta hxs1$ виявляли блок специфічного транспорту фруктози, який може бути детектований в клітинах дикого типу лише після інкубації з підвищеними концентраціями глюкози (Рис. 3.1.4С). Транспорт фруктози також був значно послаблений у клітинах $\Delta hxs1$, преінкубованих з фруктозою, навіть більш помітно, ніж глюкозний транспорт в адаптованих до глюкози клітинах (Рис. 3.1.4А, D). Отже, Hxs1 є також необхідним для фізіологічної регуляції транспорту фруктози.

Як високоафінний, так і низькоафінний транспорт глюкози чи фруктози був знижений після преінкубації клітин штаму $\Delta gcr1$, включеного для порівняльного аналізу, із цими цукрами (Рис. 3.1.4А, D). Це спостереження є важливими для відповіді на питання, чи залежить сигналювання катаболітної репресії від ефективності транспорту гексози, розглянуте нижче.

Також було проведено аналіз делеційних мутантів з метою дослідження ролі білків Hxs1 та Hxt1 у забезпеченні оптимального росту на середовищах із альтернативними джерелами карбону. При цьому неочікувано було виявлено, що кінетика росту штамів $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$ у середовищі з 1% глюкози не відрізнялась значно від такої у штаму дикого типу, за винятком помірного видовження лаг фази (Рис. 3.1.5). Тривалість лаг фази була ще довшою у обох мутантів за умови росту на середовищі з 5% глюкози, тоді як час подвоєння клітин в експоненціальній фазі росту був таким же, як і у штаму дикого типу. Отже, брак *HXS1* чи *HXT1* має досить обмежений ефект на утилізацію як глюкози так і фруктози, при цьому однак слід відзначити певне зниження часу поділу клітин *hxs1Δ* та *hxt1Δ* за умови росту в середовищі з 1% фруктози (Рис. 3.1.5). Слід зауважити, що затримка росту була більш вираженою у клітинах, вирощених на агаризованих середовищах із гексозами (див. Рис. 3.1.10). Ці дані свідчать, що Hxt1 не є основним транспортером гексоз у *H. polymorpha*, але є необхідним для ефективної адаптації до їх високих концентрацій.

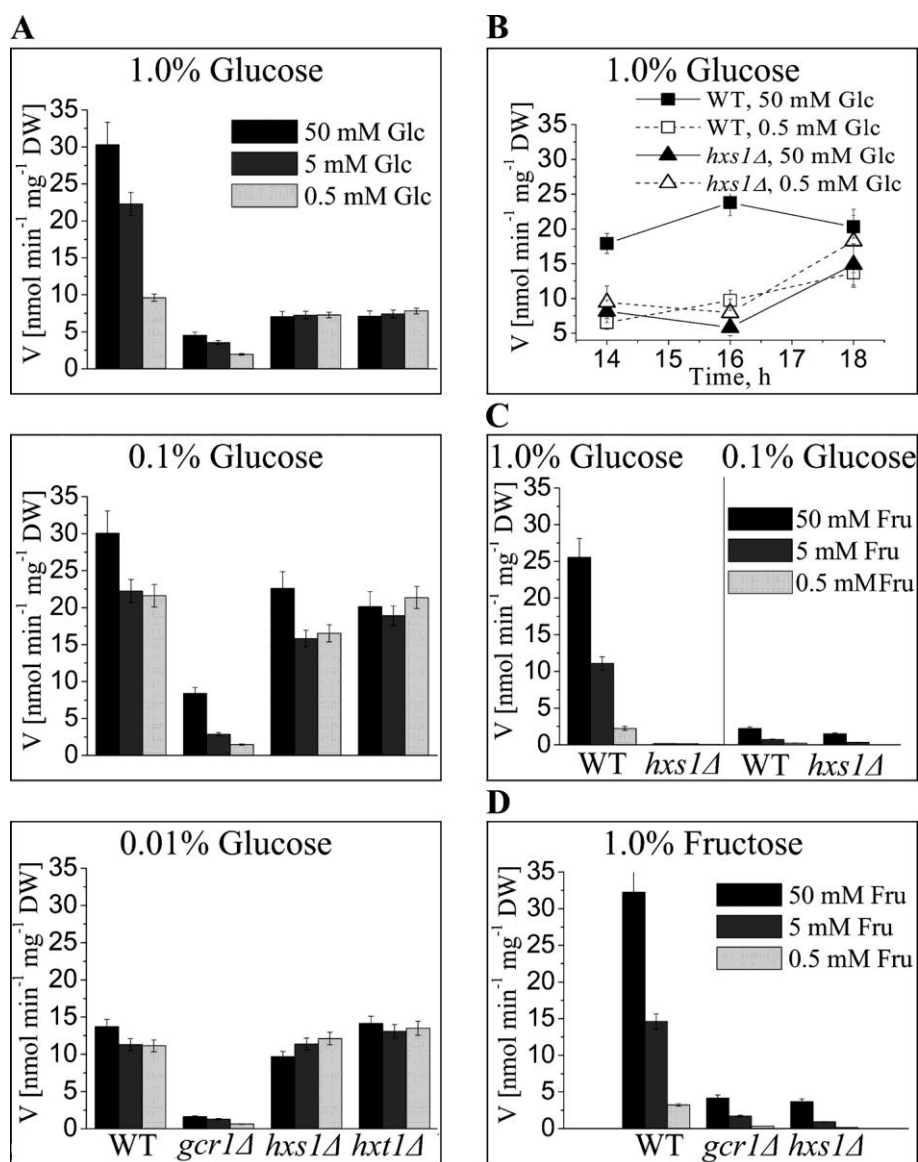


Рис. 3.1.4. Ефект мутацій *hxs1*, *hxt1* та *gcr1* на транспорт гексоз. **(А)** Визначення транспорту різних позаклітинних концентрацій глюкози у клітинах *H. polymorpha* після 2 год преінкубації у середовищі із зазначеними концентраціями глюкози (у %). Клітини вирощували до середини логарифмічної фази ($OD_{600} = 5,0$) у рідкому середовищі YPE та переносили до свіжого середовища YNB з вказаними концентраціями глюкози. **(В)** Кінетика зміни транспорту глюкози при перенесенні клітин з YPE до YNB з 1% глюкози. **(С)** Транспорт фруктози у клітинах, вирощених у YNB з низькою (0,1%) чи високою (1,0%) концентраціями глюкози. **(D)** Транспорт фруктози через 14 год після перенесення з YPE в YNB з 1% фруктози. V – рівень поглинання глюкози (фруктози), виражений у $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (нмоль \times хв⁻¹ \times мг⁻¹) сухої ваги. Різні концентрації глюкози чи фруктози (0,5, 5,0 та 50,0 мМ) були використані для аналізу транспорту. Glc – глюкоза, Fru – фруктоза.

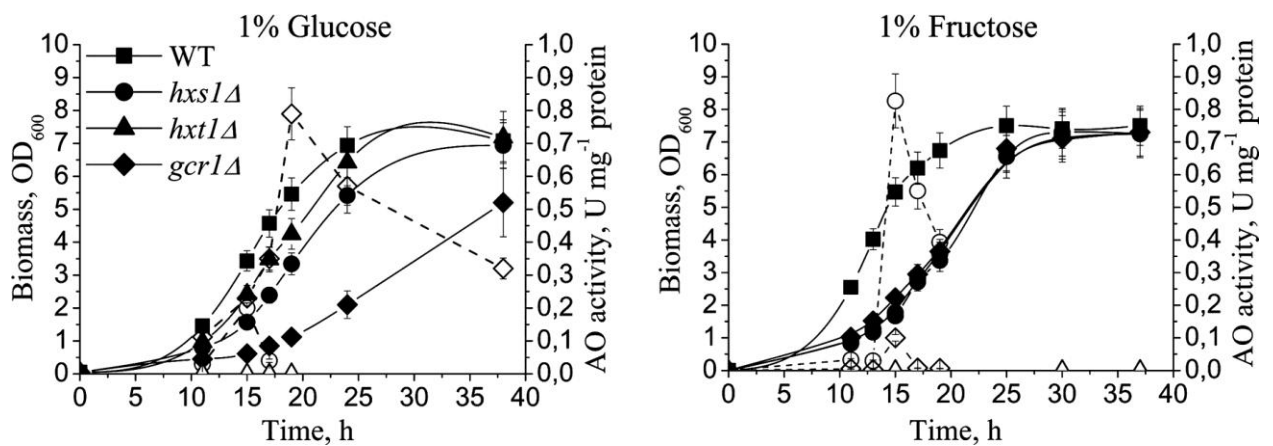


Рис. 3.1.5. Аналіз впливу делецій генів *HXS1* та *HXT1* на кінетику росту у середовищі із гексозами. Представлено кінетики росту та активності алкогольоксидази (АО) клітин штаму дикого типу та мутантів $\Delta hxs1$, $\Delta hxt1$, та $\Delta gcr1$ у середовищах із гексозами. Клітини кожного штаму були преінкубовані протягом 12 год. у середовищі YPS та перенесені до свіжого середовища YNB з 1% глюкози чи фруктози. Специфічна активність АО (відкриті символи) була визначена у безклітинних екстрактах, отриманих як описано в розділі «Матеріали і методи». Слід звернути увагу на тривалість лаг фази у $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$, а також на помірний транзйентний дефект катаболітної репресії АО у клітинах $\Delta hxs1$.

Було досліджене питання, чи впливає (часткове) зниження транспорту гексоз на катаболітну регуляцію у мутантів $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$. Помірний рівень білка пероксисомної алкогольоксидази (АО) та специфічна активність АО при рості у середовищі з глюкозою виявлялись у клітин $\Delta hxs1$, але не $\Delta hxt1$, лише в лаг та ранній експотенціальній фазах росту, після чого відповідні показники різко знижуються, що може свідчити про короткотерміновий (транзйентний) дефіцит глюкозної репресії у досліджуваних мутантів (Рис. 3.1.5 та 3.1.6А). Подібну картину спостерігали також на фруктозо-вмісному середовищі (Рис. 3.1.5), але дефект репресії у клітинах $\Delta hxs1$ був більш вираженим.

Відповідно до результатів дослідження методом ПЛР у реальному часі (qRT-PCR) експресії генів, що кодують АО (*MOX*) та репресибельну цитозольну мальтазу (*MAL1*), було виявлено їхню транзйентну дерепресію у клітинах $\Delta hxs1$ та $\Delta hxt1$, перенесених з середовища з етанолу на глюкозу.

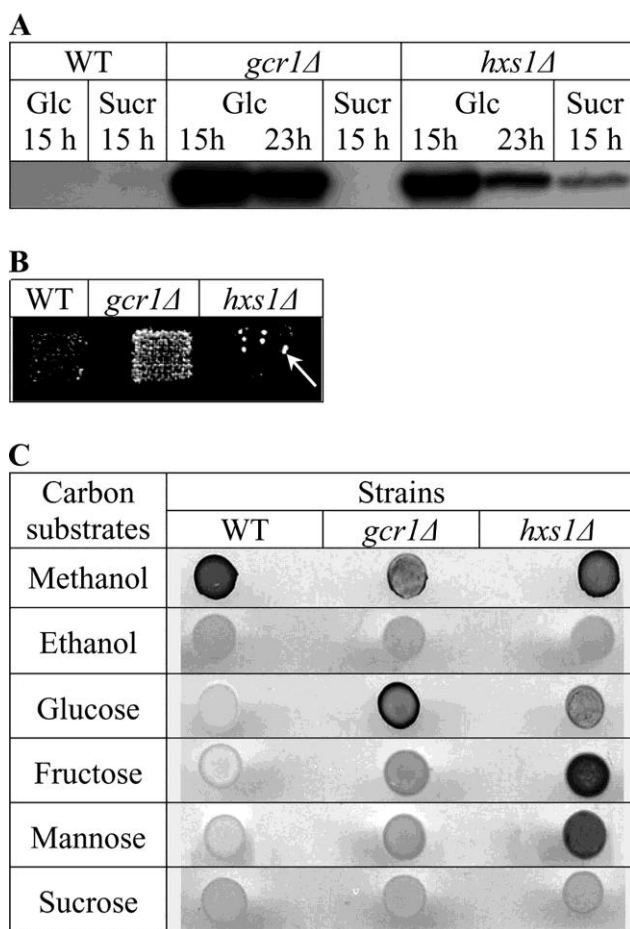


Рис. 3.1.6. Ефект мутацій *Δhxs1* та *Δhxt1* на катаболітну репресію, індуковану різними джерелами карбону. **(А)** Детекція білка АОХ методом Вестерн-блот у клітинах, інкубованих у середовищах з глюкозою (Glc) чи сахарозою (Sucr) (1%). Позначено час (у год) адаптації до субстратів. **(В)** Ріст мутантних клітин на твердому середовищі з 1% метанолом та 150 мг/л 2-ДГ. Спонтанні 2-ДГ-резистентні колонії позначено стрілкою. **(С)** Візуалізація активності АОХ у дріжджових колоніях, вирощених на різних джерелах карбону. Клітини перенесені методом реплік з багатого середовища YPS на тверді середовища YNB із вказаними джерелами карбону (усі 1%). Після інкубації протягом 24 год активність АОХ була візуалізована за допомогою реакційної суміші із пермеабілізуючим агентом.

Очевидно, що такий дефіцит фізіологічної репресії генів позитивно корелює з послабленням поглинання клітинами глюкози, оскільки він був значно менш виражений у клітинах *Δhxs1* відносно штаму *Δgcr1*. Відповідно, клітини *Δhxs1* не ростуть на чашках з метанолом за присутності 2-деоксиглюкози, аналога глюкози що не метаболізується в клітині але спричиняє репресію метилотрофного

метаболізму. Однак, спонтанні мутанти резистентні до 2-деоксиглюкози можуть виникати з підвищеною частотою на фоні мутації *hxs1Δ* (Рис. 3.1.6В).

Слід відзначити, що згідно показників питомої активності АО, репресія відповідного гена була більш пошкодженою у штамі *Δhxs1* при рості у середовищах із фруктозою та маннозою (Рис. 3.1.5 та 3.1.6С). З іншого боку, кінетики росту клітин *Δhxs1* та *Δgcr1* на фруктозі а також показники її транспорту були подібними (Рис. 3.1.4 та 3.1.5). Тому, хоча транспорт чи поглинання гексоз є важливим фактором, це не єдиний чинник, що визначає ефективність транзиторної репресії генів відповідним цукром, принаймні у випадку фруктози.

Встановлено, що репресія АО сахарозою у *Δhxs1* була лише незначно пошкодженою: ензиматична активність була нижче рівня детекції у клітинах *Δhxs1*, що росли на сахарозі і виявлялись лише слідові кількості білка АО (Рис. 3.1.6А, С). Як і можна було очікувати, етанол залишився сильним репресором синтезу АО у обох мутантів *Δhxs1* та *Δgcr1* (Рис. 3.1.6С).

Було також сконструювано та проаналізовано штамі з делеціями двох генів потенційних сенсорів *Δgcr1Δhxs1*, шляхом схрещування моноделеційних штамів з комплементарними ауксотрофними маркерами. Порівняльний аналіз засвідчив, що подвійний мутант, на відміну від вихідних штамів, виявляв більш виражений дефект глюкозної репресії АО, а також репресії спричиненої фруктозою та маннозою (Рис. 3.1.7). Для порівняння були використані похідні від *gcr1* мутанти ЕАО2 та ЕАО172, що характеризується конститутивною надекспресією АО у середовищі з глюкозою (див. більш детальний опис у Розділі 3.5). Отже, спостережений фенотип передбачає аддитивний або синергічний ефект мутацій *gcr1* та *hxs1*, що може включати кумулятивний дефіцит транспорту різних цукрів, подібно до ефекту «виключення ефектора» («effector exclusion»), а також дефекти сигналювання різними цукрами. Як видно з Рис. 3.1.8, на якому встановлено результати імунодетекції білка АО у клітинах, вирощених на середовищі з глюкозою, подвійний мутант *Δgcr1Δhxs1* дійсно виявляє кумулятивний ефект щодо конститутивного синтезу АО. Однак, детектований рівень АО не перевищував показники мутанта ЕАО172, виділений як надпродуцент гетерологічної секреторної глюкозооксидази в середовищі з глюкозою під промотором гена *МОХ* ([290], див. також Розділ 3.5)

3.1.3. Аналіз ефекту надекспресії генів *HXS1*, *GCR1* та *HXT1* у *S. cerevisiae* *hxt-null* мутанта, дефіцитного за транспортом гексоз

З метою з'ясувати, чи ідентифіковані у *H. polymorpha* гомологи транспортерів гексоз Hxs1 та Hxt1 є функціональними транспортерами, відповідні гени було надекспресувано під контролем промотора *ADHI* *S. cerevisiae* у дефіцитному за транспортерами гексоз (hexose transporter-less) мутанті *S. cerevisiae*, який не здатний до росту на відповідних субстратах (Таблиця 1.1.1)

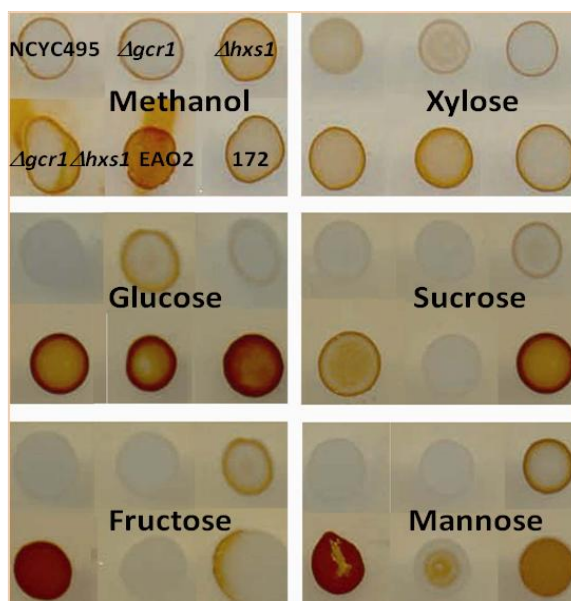


Рис. 3.1.7. Візуалізація пероксисомної алкогольоксидази у колоніях мутантів з дефектом глюкозної репресії. Клітини вказаних штамів вирощували на мінеральному середовищі YNB за наявності різних джерел карбону (всі 1%).

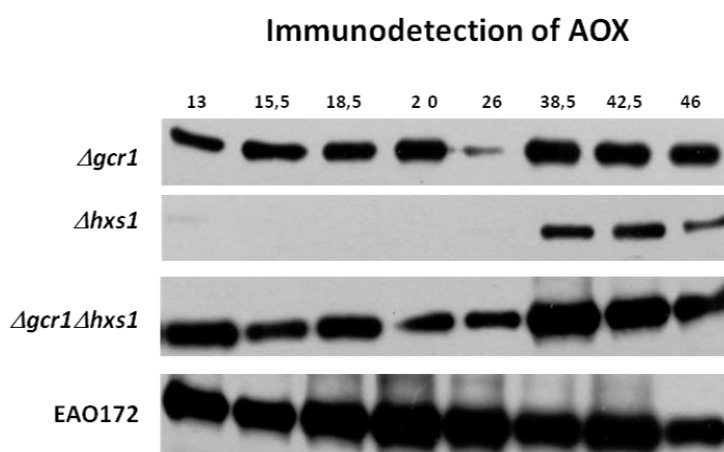


Рис. 3.1.8. Вестерн-блот аналіз рівня АО при рості клітин мутантів у середовищі з глюкозою. Час інкубації після перенесення клітин із багатого середовища YPS на середовище YNB з 1% глюкози виражено у год.

Для цього були сконструйовані плазміди рОН15 та рОН16, які експресували гени *H. polymorpha* *HXS1* та *HXT1*, відповідно, під контролем промотора *ADH1* (Табл. 1.1.2). Було спостережено, що тільки 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 *HXS1* не призводила до такого ефекту (Рис. 3.1.9). Отже, з урахуванням гомології послідовностей, було зроблено висновок, що Hxt1 є функціональним транспортером гексоз. І навпаки, як характерно і для інших дріжджових сенсорів цукрів, Hxs1 не є функціональним транспортером.













Strains	Carbon source	
	Glucose	Fructose
WT		
<i>hxt-null/pBM4523</i>		
<i>hxt-null/ScSnf31</i>		
<i>hxt-null/ScHxt1</i>		
<i>hxt-null/HpHxs1</i>		
<i>hxt-null/HpHxt1</i>		

Рис. 3.1.9. Функціональний аналіз гомологів гексозних транспортерів *H. polymorpha*, надекспресованих у *S. cerevisiae*. Штам дикого типу VW1A (Табл. 1.1.1) слугував контролем. *hxt*-нуль мутант *S. cerevisiae* був трансформований вихідним вектором рBM4523, або векторами, що експресують гени транспортерів гексоз *S. cerevisiae* та *H. polymorpha* під промотором *ScADH1*. Клітини трансформантів вирощували протягом 2 днів на агаризованому середовищі з різними концентраціями глюкози чи фруктози (наведено дані для середовища з 2% глюкози). Вектори, що експресували *ScHXT1* чи *HpHXT1* забезпечували функціональну комплементацию штаму-реципієнта.

3.1.4. 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, у яких відсутні його фрагменти

довжиною 38 чи 95 амінокислотних залишків (див. також Рис. 3.1.1 та 3.1.2), які були експресовані під нативним промотором гена у мутанті *Δhxs1*.

Встановлено що втрата щонайменше 38 С-термінальних амінокислотних залишків робить Hxs1 нефункціональним: вкорочений білок був нездатний функціонально комплементувати дефект росту *Δhxs1* на фруктозі (Рис. 3.1.10), та дефекту репресії АО на цьому субстраті. Відповідний фрагмент із 38-ми амінокислотних залишків не містить, але є сусіднім до ділянки Hxs1, що за гідروفобним профілем нагадує так званий «домен сенсора глюкози» інших дріжджових сенсорів (Рис. 3.1.1 та 3.1.2). Більше того, делеція 95 С-термінальних амінокислотних залишків у складі алелі, що містить конститутивно активовану форму Hxs1^{R203K} (див. нижче) робила її функціонально неактивною: трансформанти, що експресують Hxs1^{R203K}Δ95С не відрізнялись за фенотипом від реципієнтного штаму *Δhxs1* (Рис. 3.1.12). Отже, ці спостереження переконливо демонструють, що, подібно до класичних сенсорів глюкози у інших дріжджів, гідрофільний С-термінальний домен Hxs1 є строго необхідним для його функції.

3.1.5. Конструювання специфічних мутантних форм *HXS1* та *GCR1*, які конститутивно передають «глюкозний сигнал»

З використанням *ScSnf3*, *ScRgt2*, та *CaHgt4* попередньо встановлено, що заміна одного із консервативних амінокислотних залишків аргініну у центральній (коровій) ділянці сенсорів гексоз перетворює їх у конститутивно-активовані форми навіть за відсутності глюкози. З метою встановлення функціональної подібності було сконструйовано алелі Hxs1 та Gcr1 з відповідною заміною (R203K) (Рис. 3.1.1, 3.1.2), та експресовано під нативним промотором *HXS1* у *Δhxs1* мутанта.

Алель *HpHXS1-1*, що кодує мутований ген із заміною R203K, був сконструйований як описано у розділі «Матеріали і Методи». Спостережено, що Hxs1^{R203K} ефективно комплементує дефект росту на клітинах *Δhxs1* на агаризованому середовищі з фруктозою (Рис. 3.1.10), та відновлює нормальну фруктозну репресію синтезу АО. Однак, фенотип Hxs1^{R203K}-експресуючих

трансформантів відрізнявся від клітин дикого типу, оскільки вони стали більш резистентними до інгібітора дихання антимицину А у середовищі з високим вмістом глюкози (Рис. 3.1.10).

Media	Strains						
	WT	<i>hxs1Δ</i>	<i>hxs1Δ</i> / Hxs1 ^{R203K}	<i>hxs1Δ</i> / Hxs1ΔC38	<i>hxs1Δ</i> / Hxs1 ^{R203K} ΔC95	<i>hxs1Δ</i> / Hxs1ΔC95	
Methanol							
Fructose							
Glucose							
Glucose +antimycin A							

Рис. 3.1.10. 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 карбону, 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%, антимицин А – 6 мг/л.

Ми припускаємо, що цей фенотип спричинений конститутивною надекспресією Hxt1 чи інших гексозних транспортерів, що краще підтримують залежний від гліколізу ріст за умови часткового інгібування дихання. Таким чином, мутований Hxs1^{R203K} має ефект, подібний до інших дріжджових сенсорів глюкози, що несуть аналогічну мутацію у цій позиції.

На наступному етапі було сконструйовано алель потенційного сенсора Gcr1 з відповідною консервативною заміною R165K, що локалізується між його 4-им та 5-им трансмембранними доменами (Рис. 3.1.11), та досліджено ефекти його експресії. Відповідний алель, позначений як *HpGCR1-1*, був сконструйований як описано у розділі «Матеріали і Методи».

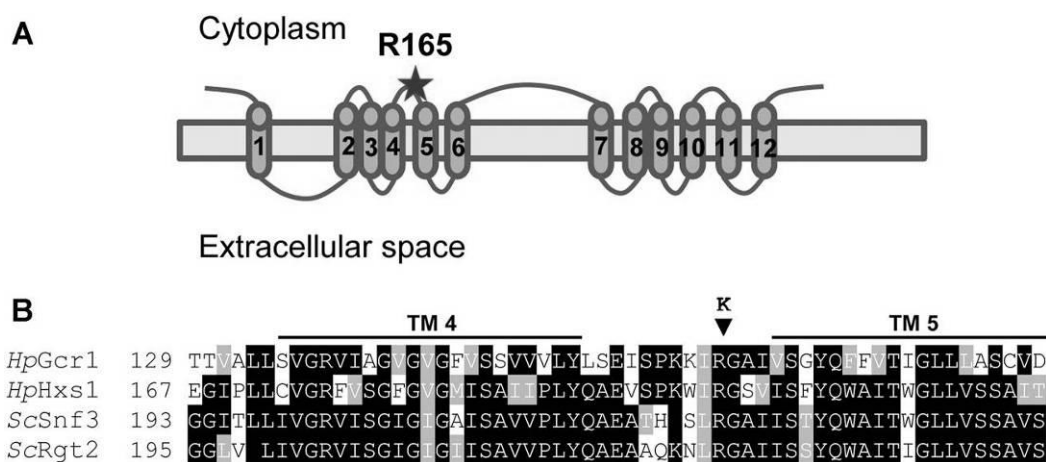


Рис. 3.1.11. Конструювання $Gcr1^{R165K}$ мутантного алелю. **(А)** – схематичне зображення трансмембранної структури $Gcr1$ та позиції консервативних для усіх транспортерів гексоз залишків, відповідників R165 $Gcr1$. **(В)** – Накладення двох трансмембранних сегментів *H. polymorpha* $Gcr1$ та $Hxs1$, та *S. cerevisiae* $Snf3$ та $Rgt2$. Позиція заміни консервативного залишку аргініну (R) на залишок лізину (K) відмічена стрілкою. Трансмембранні домени відзначені лініями та пронумеровані. Ідентичні амінокислотні залишки затінені чорним кольором, подібні – сірим.

Було спостережено, що синтез $HpGcr1^{R165K}$ під нативним промотором в клітинах $\Delta gcr1$ функціонально не компенсував дефект його росту на середовищі з глюкозою, що може свідчити, що ця конкретна точкова мутація призводить до втрати $HpGcr1$ функції транспортера. Як встановлено на Рис. 3.1.12А, реципієнтний штаб $\Delta gcr1$ виявляє більш виразну, порівняно з штамом дикого типу, затримку росту на таких моносахаридних субстратах як глюкоза, фруктоза, ксилоза, але також і на метанолі, і не виявляє помітної затримки росту на сахарозі та етанолі [29].

Несподіваним виявилось спостереження, що експресія $HpGcr1^{R165K}$ додатково значно погіршувала ріст реципієнтного штаму на усіх протестованих джерелах карбону, навіть на сахарозі та етанолі (Рис. 3.1.12А). Слід зазначити, що дослідження декількох індивідуальних трансформантів $HpGcr1^{R165K} gcr1\Delta$ виявило, що усі вони мали подібні фенотипові відмінності від клітин штабів як дикого типу, так і $\Delta gcr1$. Цей доволі простий ростовий тест свідчить, що заміна R165K перетворює $HpGcr1$ в аберантно-активовану сигналюючу форму, що викликало погіршення росту очевидно незалежне від доданого джерела карбону. Також слід

відзначити, що експресія *HpGcr1*^{R165K} не відновлювала нормальну катаболітну репресію пероксисомальної АО у середовищі з глюкозою у реципієнта $\Delta gcr1$ (Рис. 3.1.12В), таким чином вказуючи на важливість фізіологічного рівня транспорту глюкози у регуляції сигналу катаболітної репресії.

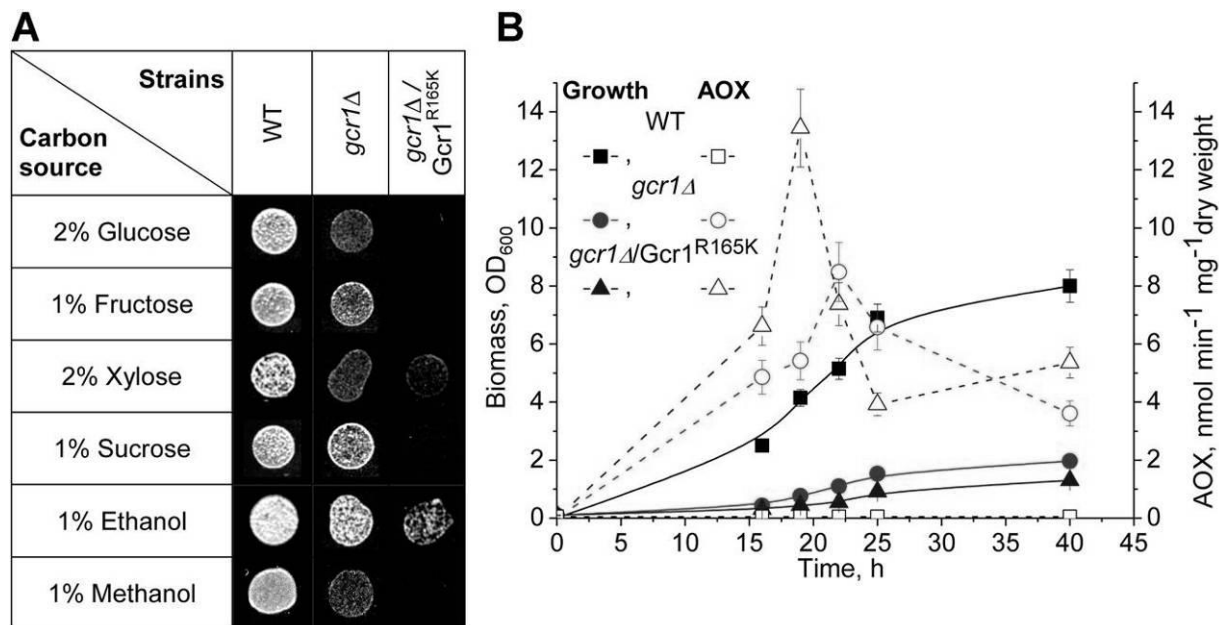


Рис. 3.1.12. Фізіологічні ефекти мутантного білка *HpGcr1*^{R165K}. **(А)** – Ріст -штаму $\Delta gcr1$, що експресує *HpGcr1*^{R165K}, на різних джерелах карбону. Клітини підросували у багатому рідкому середовищі YPS, засівали при рівних OD₆₀₀ на чашки з середовищем YNB з додаванням позначених джерел карбону та інкубували протягом 24 год, за виключенням клітин що росли на метанолі, які були інкубовані протягом 48 год. **(В)** – Кінетика росту та активності АО протягом культивування тестованих штамів у рідкому YNB з 1 % глюкози.

3.1.6. Аналіз експресії гомологів гексозних транспортерів та генів-мішеней глюкозної регуляції у мутантів *H. polymorpha*, з пошкодженими гексозними транспортерами чи сенсорами

Аналізи Northern Blot та Q-PCR показали, що експресія функціонального транспортера *Hxt1* у штаму дикого типу транзійтно індукується високими концентраціями глюкози, відповідно до його передбачуваної функції як низько афінного транспортера (Рис. 3.1.13А, В). При цьому рівень експресії *Hxt1* за різних концентрацій глюкози був значно знижений у $\Delta hxs1$ мутанта.

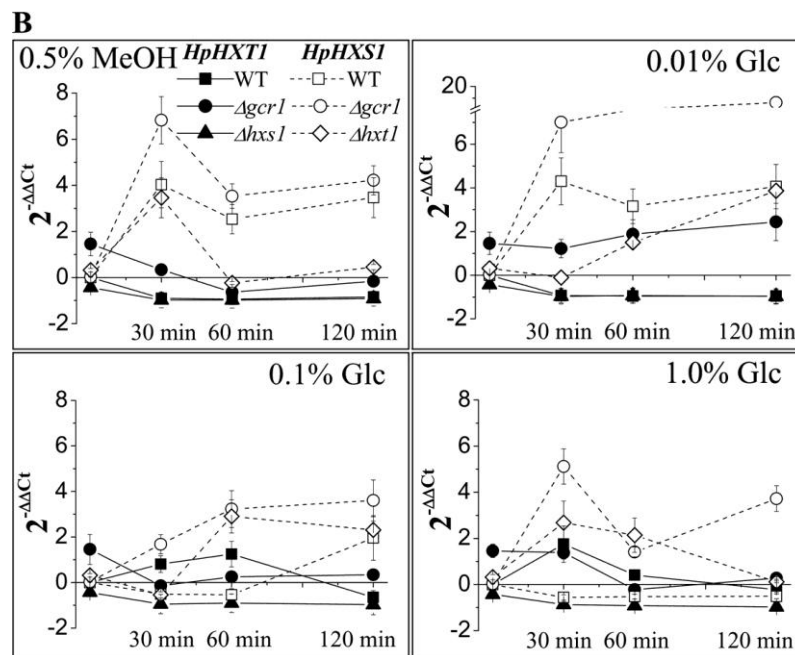
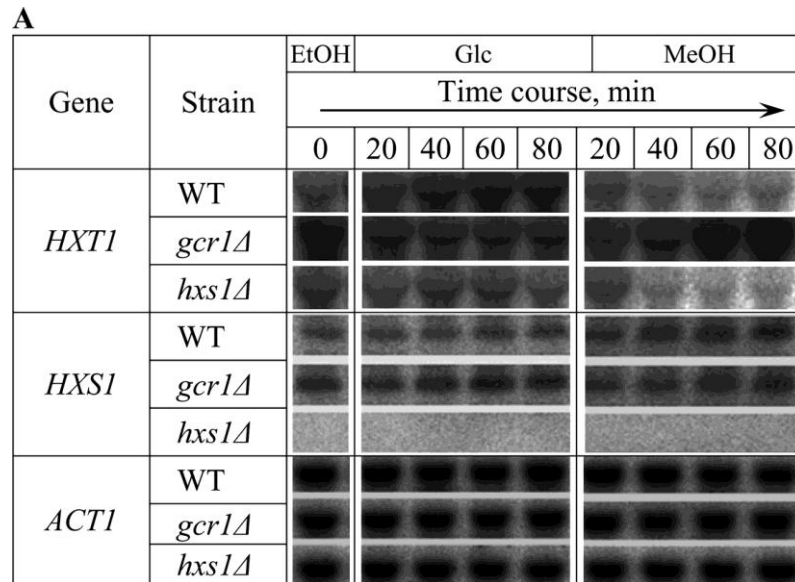


Рис. 3.1.13. Аналіз експресії генів *HXT1* і *HXS1* залежно від екзогенних чинників і впливу мутацій сенсорів. **(A)** Нозерн-блот аналіз. Клітини кожного штаму були преінкубовані протягом ночі у середовищі YPE (часова точка «0») та перенесені у середовище YNB з 1% глюкози чи 1% метанолу. У вказані проміжки часу після зміни середовища, клітини були зібрані для виділення мРНК та Нозерн-блот аналізу. Рівень експресії гена актину 1 (*ACT1*) слугував калібратором. Слід звернути увагу, що різні кількості мРНК було використано для аналізу різних генів: 1 мкг мРНК для аналізу *ACT1*, 10 мкг для *HXT1*, та 25 мкг для *HXS1*, які експресувалися на значно нижчому рівні. **(B)** *Hxs1* є необхідним для тимчасової індукції *HXT1* глюкозою, та є дерепресованим у середовищі з низькою концентрацією глюкози. Дані Q-PCR представляють результати трьох експериментів, виконаних, як описано в розділі «Матеріали і методи». Клітини, вирощені до логарифмічної фази на середовищі YPE, розведені до $OD_{600} = 5.0$ у

YNB з зазначеними джерелами карбону та додатково інкубовані протягом 0,5, 1 і 2 годин. Відносний рівень експресії генів вказаний на осі Y ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) було нормалізовано відносно їх вихідного експресії в клітинах, вирощених на YPE («0» на X- та Y-осях).

Одночасно, у клітинах штаму *Δgcr1* експресія гена *HXT1* була підвищена у середовищі з низьким вмістом глюкози або з метанолом. Мутація *Δhxs1*, введена у штаму *Δgcr1*, нівелювала надекспресію *HXT1*. Таким чином, індукція *Hxt1* глюкозою строго залежить від інтактного стану *Hxs1*, що також узгоджується з нашими даними стосовно транспорту глюкози у відповідних мутантів (Рис. 3.1.4), тоді як *Gcr1* має негативний контроль над експресією *HXT1* за наявності низьких концентрацій глюкози чи за її відсутності.

Рівень експресії *HXS1* в клітинах був дуже низьким та не залежав від джерел карбону, що відповідає його функції як білка-сенсора (Рис. 3.1.13А). Він також диференційно регулюється глюкозою: висока концентрація глюкози помірно репресує експресію *HXS1* у штаму дикого типу, тоді як така репресія частково знімається у *Δgcr1* та є лише транзійною у *Δhxt1* за присутності високих концентрацій глюкози, чи у штаму дикого типу за низьких концентрацій глюкози (Рис. 3.1.13В).

3.1.7. Вплив мутацій у гомологах транспортерів гексоз на пексофагію у *H. polymorpha*

Одним із наступних питань роботи було з'ясувати, чи рецептор *Hxs1* задіяний в іншому регульованому глюкозою процесі, а саме автофагійній деградації пероксисом (пексофагії). Виявилось, що у клітинах *Δhxs1* преінкубованих з метанолом, активність АОХ і рівень відповідного білка знижувалися при адаптації до глюкози чи етанолу з тією ж кінетикою, як і в штаму дикого типу (Рис. 3.1.14). Мутант *H. polymorpha tup1* з дефектами транскрипційної регуляції та пексофагії був використаний як позитивний контроль [152]. Отже, *Hxs1*, подібно до *Gcr1* (Рис. 3.1.14; [29]), не є необхідним для сигналювання глюкози для катаболітної інактивації (пексофагії).

3.1.8. Фенотипова характеристика потенційного трансцептора *H. polymorpha* Gcr1

Як уже згадувалося вище, нами попередньо встановлено, що імовірний транспортероподібний сенсор гексоз Gcr1 є необхідним для глюкозної репресії АОХ та інших генів метаболізму метанолу у *H. polymorpha* [29]. Було також встановлено, що делеція гена *HpGCR1* значно погіршує як високо- так і низько-афінний транспорт глюкози в клітинах [346].

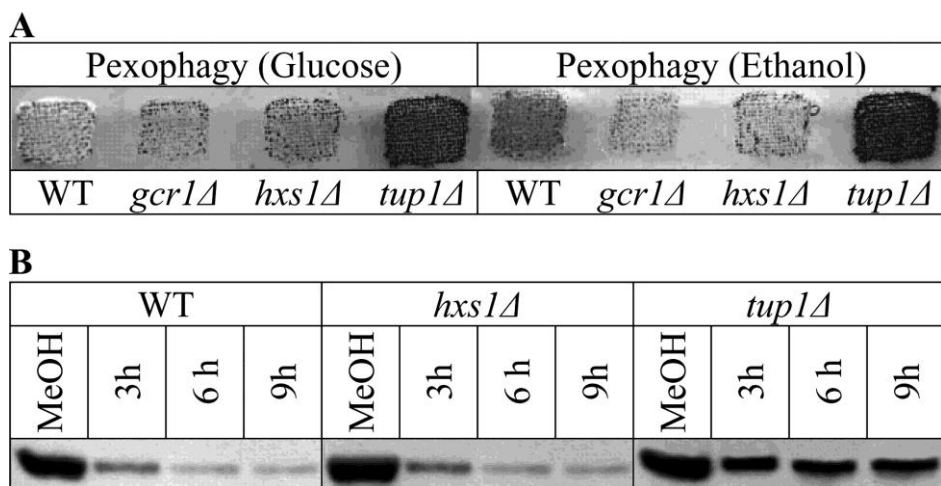


Рис. 3.1.14. Аналіз ролі сенсора Hxs1 у пексофагії. **(А)** Візуалізація активності АОХ в колоніях, вирощених на чашках з YNM з метанолом та перенесених на середовища з глюкозою чи етанолом (усі 1%) для індукції деградації пероксисом. Активність АОХ була візуалізована специфічною реакційною сумішшю з пермеабілізуючим агентом після 12 год інкубації. **(В)** Вестерн-блот детекція білка АОХ в клітинах, перенесених із метанолу до середовища з глюкозою. Часові точки вказують на тривалість адаптації до глюкози.

Більше того, Gcr1 виявився необхідним для репресії гена функціонального низькоафінного транспортера гексоз Hxt1 за відсутності глюкози [347] (див. також Таблицю 3.1.1 щодо інших фенотипових змін, пов'язаних з Gcr1). Слід також підкреслити, що на відміну від відомих нетранспортуючих рецепторів глюкози, включно з Hxs1, Gcr1 не володіє видовженим С-кінцевим цитозольним «хвостом», що містить домен «сенсора глюкози», необхідний для сигналювання [23].

Загалом, встановлені нами фенотипи *gcr1* мутантів засвідчили, що його білковий продукт може бути безпосередньо або опосередковано залучений як сенсор (чи рецептор) глюкози у сигнальних шляхах катаболітної репресії у *H. polymorpha* [29]. З іншого боку, Suppi *et al.* (2013) незаперечно

продемонстрували, що активність двох ферментів гексокінази та глюкокінази є важливою для глюкозної репресії у цих дріжджів. Ці дані вказують на катаболіт глюкозо-6-фосфат як справжній медіатор репресії у *H. polymorpha*. Слід зазначити, що внутрішньоклітинна концентрація глюкозо-6-фосфату у вирощених на середовищі з глюкозою клітинах мутанта *gcr1* була значно нижчою, ніж у штаму дикого типу, тоді як гексокіназна активність не відрізнялась [142]. Саме тому, важко розділити ефекти, пов'язані із зниженням рівня транспорту глюкози та рівня її катаболітів, таких як глюкозо-6-фосфат, на дефекти сигналювання глюкозної репресії. У цьому розділі ми надаємо нові свідчення на користь того, що *HpGcr1* може функціонувати як специфічний глюкозний трансцептор (тобто транспортує рецептор), а не звичайний транспортер гексоз, і бути першим прикладом такого підкласу рецепторів у дріжджів. Штами, вектори чи ПЛР праймери використані в цих дослідженнях перелічені в Таблицях 1.1.3 та 1.1.4.

3.1.8.1. *HpGCR1* може бути результатом як горизонтального трансферу гена з грибів, так і специфічного збереження архаїчного гена у геномі *H. polymorpha*

Ми припустили, що філогенетичне позиціонування *Gcr1* серед відомих транспортерів гексози може дати підказку щодо його функціональної спорідненості. Нещодавній пошук у базах даних та філогенетичний аналіз гомологів гексозних транспортерів із різних видів дріжджів та грибів несподівано виявили, що одна із підгруп транспортерів гексоз цвільових грибів є найближчими гомологами *Gcr1* (Рис. 3.1.15).

Декілька з них були попередньо експериментально охарактеризовані. Так, білок *MstA* з *Aspergillus niger* є функціональним високоафінним H^+ -залежним симпортером моносахаридів [344], який виявляє винятково високу ідентичність та подібність до *HpGcr1* (74% та 84%, відповідно). Для порівняння, подібність *HpGcr1* до нетранспортуєчих глюкозних серсорів дріжджів, таких як *Snf3* та *Rgt2* *S. cerevisiae*, є значно нижчою (43-45% ідентичності та 61-62% подібності). Теж саме стосується і до низькоафінного сенсора глюкози *HpHxs1* – 43% ідентичності та 61% подібності (див. Рис. 3.1.16 для порівняння).

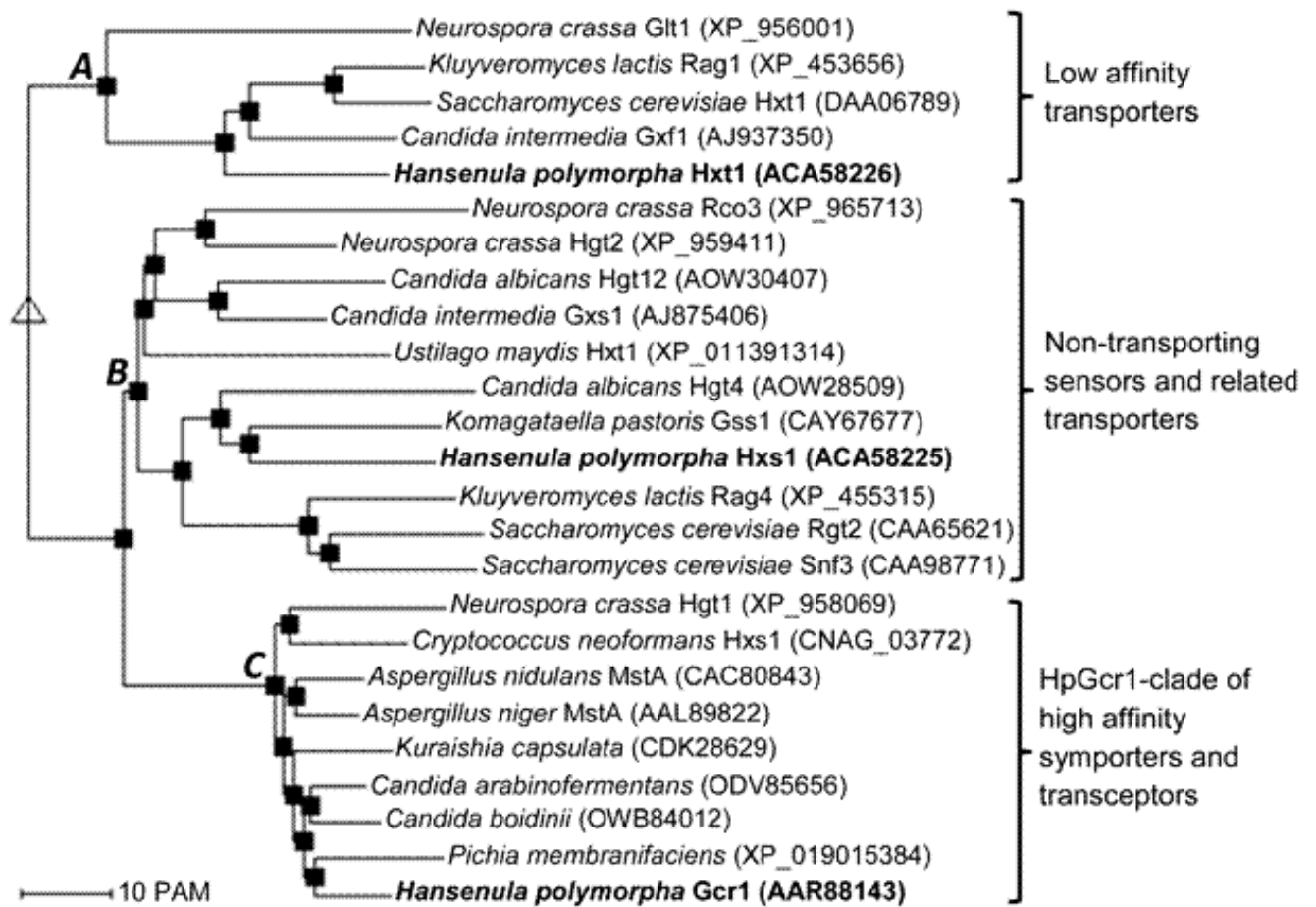


Рис. 3.1.15. Філогенетичне дерево на основі подібності первинних послідовностей амінокислот, що відображає передбачуваний еволюційний зв'язок *HpGcr1* з гомологами транспортерів гексоз дріжджів та грибів. Філогенетичне дерево було побудоване з використанням алгоритму ClustalW [348]. Для спрощення остаточного формату на рисунку зображені лише ті окремі представники потенційних еволюційних груп (clades) транспортерів гексоз, чії функції були досліджені й описані в літературі. Корінь дерева позначено як відкритий трикутник, а галуження гілок – як чорні квадрати. Три основні філогенетичні гілки транспортерів позначено як **A**, **B** та **C**. **A**-група складається з численних низько-афінних фасилітаторів (перенощиків) гексоз. **B**-група складається з нетранспортуючих сенсорів дріжджів та деяких пов'язаних із ними високо-афінними активними транспортерами. **C**-група містить *HpGcr1*, декілька високогомологічних транспортерів гексоз з невідомою функцією із близькоспоріднених до *H. polymorpha* видів дріжджів, та низку високоафінних симпортерів грибів.

Однак також виявилось, що нещодавно секвеновані геноми деяких найбільш тісно пов'язаних з *H. polymorpha* видів дріжджів з родини *Pichiaceae*, ряду *Saccharomycetales*, також містять у своєму геномі послідовності, що кодують потенційні Gcr1-подібні білки. Ці кілька прикладів представлені ще не охарактеризованими білковими продуктами *Candida arabinofementans* ODV85656.1 (78 % ідентичності та 88 % подібності), *Pichia membranifaciens* ODQ44271.1 (73 % ідентичності та 85 % подібності), *Kuraishia capsulata* ODV85656.1 (71 % ідентичності та 84 % подібності; фактично, два дуже подібні паралоги є суміжними на хромосомі у цього виду), та декілька гомологів у метилотрофа *Candida boidinii* (наприклад, OWB84012.1, з 78 % ідентичності та 86 % подібності). Слід зазначити, що ортолог *HpGcr1* є явно відсутній у геномі більш віддаленого в еволюційному плані від *H. polymorpha* виду метилотрофних дріжджів *Komagataella (Pichia) pastoris*.

Надзвичайно висока подібність послідовностей *HpGcr1* до *AnMstA* (Рис. 3.1.16) та до ряду інших подібних білків грибів з певною мірою вірогідності свідчить про горизонтальний трансфер генів (HGT) від одного із видів нитчастих грибів до предкового члена родини *Pichiaceae*. Альтернативно, *HpGcr1* міг виникнути як результат специфічної та дуже рідкісної події так званого «збереження архаїчного гена» (archaic gene retention) у *H. polymorpha* та у деяких близькоспоріднених видів. Слід зазначити, що усі транспортери гексоз виявляють високу подібність у ділянці 12-ти трансмембранних доменів. Тому наше філогенетичне моделювання не змогло дати остаточну відповідь на питання, яка з двох можливих подій є більш вірогідною (див. також розділ «Обговорення»).


```

HpGcr1 1 -----MAGESITGVAGTADVNRVEAEPTVRAAYLMCAFGAFG
AnMstA 1 -----MAEGFVDASRVEAEPTLRTYLMCAFAAFG
HpHxs1 1 MSTEARDHSPPLELRDLSIQEPAGCVEVRETYTIDYDQSAQPSDEDEKDKQAPDGAETECQRNWSSTMAVYVGLLMAITG
HpHxt1 1 -----VSNADQQSCKSITGSVTPPPENVYEDQHNKATLPEHQDISVCKSVMQYLTGTLICSLIAFG

HpGcr1 37 GILFGYDSGYISGVMGMDYETHEEFTGKVKHGDDSSFVYSSQKSLITSILSAGTFFGALCAGDLADMEGRRTIIVTGC
AnMstA 30 GILFGYDSGYISGVMGMDYETHEEFTGKVKHGDDSSFVYSSQKSLITSILSAGTFFGALCAGDLADMEGRRTIIVTGC
HpHxs1 81 GFLVGYDTGIIINGLIEPKYVKRTFP-----FNNAGGFASQSSITITSLSIGTFVGSLEAPVLSDRVGRRLSIVASST
HpHxt1 63 GFVFGNDIGTISGFVNPDEKNRFGQI----NGGGERYLSNVRTGLMISIFNISCALGSEITLGRADSKGRKVGIMLMTI

HpGcr1 117 IYSGVVALQVASITVALLSVGRVIAGVGVGFVSSVVLYLSEISPKKIRGAIVSGYQEFVTIGLLLASCVDYGTENR
AnMstA 110 WSIIVGVILQIASITVALLSVGRVIAGVGVGFVSSVVLYLSEISPKKIRGAIVSGYQEFVTIGLLLASCVDYGTENR
HpHxs1 154 IMSISGCTILOVVS-EGPLLCVGRFVSGFGVGMISAIIPLYQAEISPKKIRGSVTSFYQALITWGLLSSAITQITHSI
HpHxt1 139 VYIVGVIVQIASITVSWVQFFIGRIISGLAVGVSIVLCPMFIETSPKIRGALVSSYQLMITIGIFLLEYCTTYGTYHNY

HpGcr1 194 NDSGSYRIPIALQLIWAAILAVGLILLPESPRYVILKGGIFRAAVLSRIRGQPIDSDYICEELAEIVANHEYERSVIPT
AnMstA 187 LDSGSYRIPIGLQIAWAILLGGGLILLPESPRYFVKKGGIAKAAEVLARVGRQPCDSDYICEELAEIVANHEYEMQVIE
HpHxs1 232 DDARCYRIPIGLQIAWVVLGGVYSLLPESPRFVKKDRDDALHALSRFRRLPNDKSLVEELTEIKASHDYEMSGFPT
HpHxt1 218 DDSRQYRIPVGLCFAWALLIFGVTFPESPRYLTEKDRLEDAKRSIAKVNKVEIDSEETHEEAMITINSIETIROAGSA

HpGcr1 274 TSYVQSWAACFTGGLRFSNLRKTLTGTSQOMQQWGVNFIYVGTTFQQLGTIHNEFLISMITTIVNVASTPISFY
AnMstA 267 GGYVQSWMNCFRGSIFFSNLRRITVLTGSLQMQWGVNFIYVGTTFQSLGTIDDFFLISMITTIVNVASTPISFY
HpHxs1 312 -----SIMDCFRSSESR-ASOLRRITGMLLQALQCCSGNFIYVGVNIFVRAE-IANSMLISEITTYVNVVFTIPGI
HpHxt1 298 -----SWGELTCKPMI---FYRLVGVILQSLQQLSGDNIFYYGTTIEKSMG-LTDSSETSVLGVNFASTIGSL

HpGcr1 354 TTEKFGRRLLMNGARGMVVQCQFIVAVIGTV-----DGDNQKTVSAMIAFICYIFFFASTWGPWVVIETEPLE
AnMstA 347 TTEKFGRRLLMNGALGMVLCQFIVAVIGTV-----DGSNKHVAVSAISFICYIFFFASTWGPWVVIETEPLE
HpHxs1 385 SVEIINGRRLLLVGAGGMTVSNFVIAVAVG-V-----TTDSLIIANKVIVAFVCLFIAFFFASTWGPLAVVVVGMYSLS
HpHxt1 368 VVDFEGRRETLLGGELGMVAVCLVIFRAIATGKILYKGFVGVDPNCSVGDAMIFLSCYIFFFASTWGPCVIVVSEITPLR

HpGcr1 426 IIRSGVGLSTASNWLWNCIIIAVITPYMVDGDK--ENLGAKVFFIWGSLCCCLLYAIMLIPETKGLTLEQVDKMEET-T
AnMstA 419 IIRSGVALSTASNWLWNCIIIAVITPYMVDGDK--EDLAKVFFIWGSLCCAFVITYFLIPETKGLTLEQVDKMEET-T
HpHxs1 456 IIRKAVALLAANWLVNFIIRCCCTPYVDTGKHTALGTRKFFIWGSLNFMVAYFYVETKGLLLEVDLFRVCKS
HpHxt1 448 IIRKGMGIAQSANWLVGFIAFFTEITN-----ALHFAYGFVIFGCVVFSFIVVAFVETKGLTLEQVDQYIY-T

HpGcr1 503 EWTSAKWKPHSTFAEMGLAIDDKVVT-ETKEKASVESV-----
AnMstA 496 PRTSAKWTPHCTFFAEMGLTANAVL-E-KATAVHCEV-----
HpHxs1 536 ARKSMYKPHSTETQENEGSPRHSESHRAMAVATLDELNVNPNVPPSVHSTDDSESEFYHPLHSEYLGQPPEYNYTNQEDL
HpHxt1 521 EGLAFMTSPKIQHDSTEKV-----

HpGcr1 -----
AnMstA -----
HpHxs1 616 MGLIRSLGVGLDGTAEVSHHGQ
HpHxt1 -----

```

Рис. 3.1.16. Накладення амінокислотних послідовностей ймовірного трансцептора *HpGcr1*, нетранспортуючого сенсора *HpHxs1*, функціонального транспортера *HpHxt1*, та високоафінного симпортера глюкози гриба *AnMstA*. Хоча усі транспортери гексоз містять спільні консервативні домени, дане порівняння наочно демонструє, що *HpGcr1* виявляє вищу подібність первинної послідовності до білка грибів *AnMstA* (74% ідентичності та 84% подібності), ніж до своїх внутрішньовидових гомологів. Так, наприклад він є на 43% ідентичним та на 61% подібним до *HpHxs1*. Чорні сектори позначають ідентичні, а сірі сектори – подібні залишки.

Вищезгадані типи гомологів транспортерів гексоз таким чином формують декілька чітко відокремлених філогенетичних груп, що також відображають їх функціональну спорідненість. Як зображено на Рис. 3.1.15, одна гілка складається з низько афінних нергонезалежних переносників з дріжджів, інша – з «класичних» дріжджових нетранспортуючих сенсорів глюкози та окремих високоафінних симпортерів, тоді як специфічна гілка, до якої належить *HpGcr1*, складається із декількох неохарактеризованих білків дріжджів родини *Pichiaceae* та численних відомих (встановлено лише окремі послідовності) високоафінних транспортерів грибів, включно із двома потенційними трансцепторами (див. додаткові деталі у розділі «Обговорення»).

3.1.8.2. Конститутивна експресія *HpHXT1* у клітинах $\Delta gcr1$ відновлює глюкозну репресію

З метою оцінити, яким чином ефективність транспорту глюкози впливає на глюкозну (катаболітну) репресію у клітинах $\Delta gcr1$, гени *HpHXT1* та *HpGCR1* було надекспресувано під контролем конститутивного промотора у цього мутанта. Відповідні вектори експресії були сконструйовані як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Як показав RT-PCR аналіз, отриманий рівень експресії *HpHXT1* на середовищі з 1% глюкози був порівняно вищим, ніж у реципієнтного штаму $\Delta gcr1$ (Рис. 3.1.17А). Слід відзначити, що у самого $\Delta gcr1$ рівень експресії *HpHxt1* є нижчим від фізіологічного рівня у штаму дикого типу як наслідок змін у глюкозній транскрипційній регуляції [25], [347]. У той же час, $\Delta gcr1$ надпродукував транскрипт *HpHXT1* у середовищі з метанолом, у якому у штаму дикого типу виявлялись лише слідові кількості транскрипту (Рис. 3.1.17А). Аналіз у рідкому середовищі показав, що надекспресія *HpHXT1* лише частково комплементує дефіцит росту на глюкозі. А саме, штам $gcr1\Delta/P_{GAPDH}\text{-}HpHXT1$ демонстрував проміжні темпи росту на середовищі з 1% глюкози у порівнянні із штамом дикого типу та делеційним мутантом (Рис. 3.1.17В). У той же час, $gcr1\Delta/P_{GAPDH}\text{-}HpHXT1$ при рості на глюкозі виявляв нормальну репресію *MOX*, як

видно із даних щодо рівня експресії гена та ензиматичної активності алкогольоксидази (Рис. 3.1.17А, В). Очевидно, незважаючи на все ще обмежений ріст, *Gcr1*-незалежний надсинтез *HpHxt1* забезпечив достатнє збільшення внутрішньоклітинного пулу глюкози або її катаболітів для ефективної репресії АОХ.

3.1.8.3. Продуктивність транспорту глюкози та сповільнення метилотрофного росту не є взаємопов'язаними у мутанта *Δgcr1*

Раніше ми описали, що серед плеiotропних змін, викликаних делецією гена *HpGCR1*, є затримка індукції експресії гена *MOX* (алкогольоксидази) та, відповідно, пролонгація ростової адаптації чи lag фази у середовищі із метанолом [29], таким чином вказуючи на регуляторну роль *HpGcr1* за відсутності глюкози. Як і очікувалось, конститутивна надекспресія функціонального транспортера глюкози *HpHXT1* у мутанта *Δgcr1* не впливає цей фенотип (Рис. 3.1.17В).

3.1.8.4. *HpGcr1* внаслідок міслокалізації не відновлює ріст *hxt*-дефіцитного штаму *S. cerevisiae* на гексозах

Для подальшого з'ясування, чи *HpGcr1*, незалежно від його рецепторної функції, є функціональним транспортером гексоз, ми експресували відповідний ген під контролем регульованого промотора *S. cerevisiae* *MET25* (P_{MET25}) у мутанта *S. cerevisiae* з відсутніми усіма транспортерами гексоз, у *hxt*-нуль штаму [349], використовуючи при цьому *HpHXT1* як позитивний контроль. P_{MET25} походить від гена *MET25*, що кодує О-ацетилгомосерин сульфгідролазу [350]. Метою було також досягти регульованої експресії *HpGcr1* як кон'югату з *EGFP* ORF (кодує зелений флуоресцентний білок), для моніторингу його внутрішньоклітинної локалізації. Відповідні вектори були сконструйовані як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Залежно від екзогенної концентрації метіоніну, P_{MET25} забезпечує диференційні рівні експресії регульованого гена: висока концентрація метіоніну викликає репресію P_{MET25} , тоді як зниження рівня метіоніну вивільняють його

експресію [349]. Таку регульовану експресію було використано для можливого уникнення міслокалізації або токсичності чужорідного білка плазматичної мембрани при надекспресії, що часто спостерігається для транспортерів у *S. cerevisiae* [351], [352].

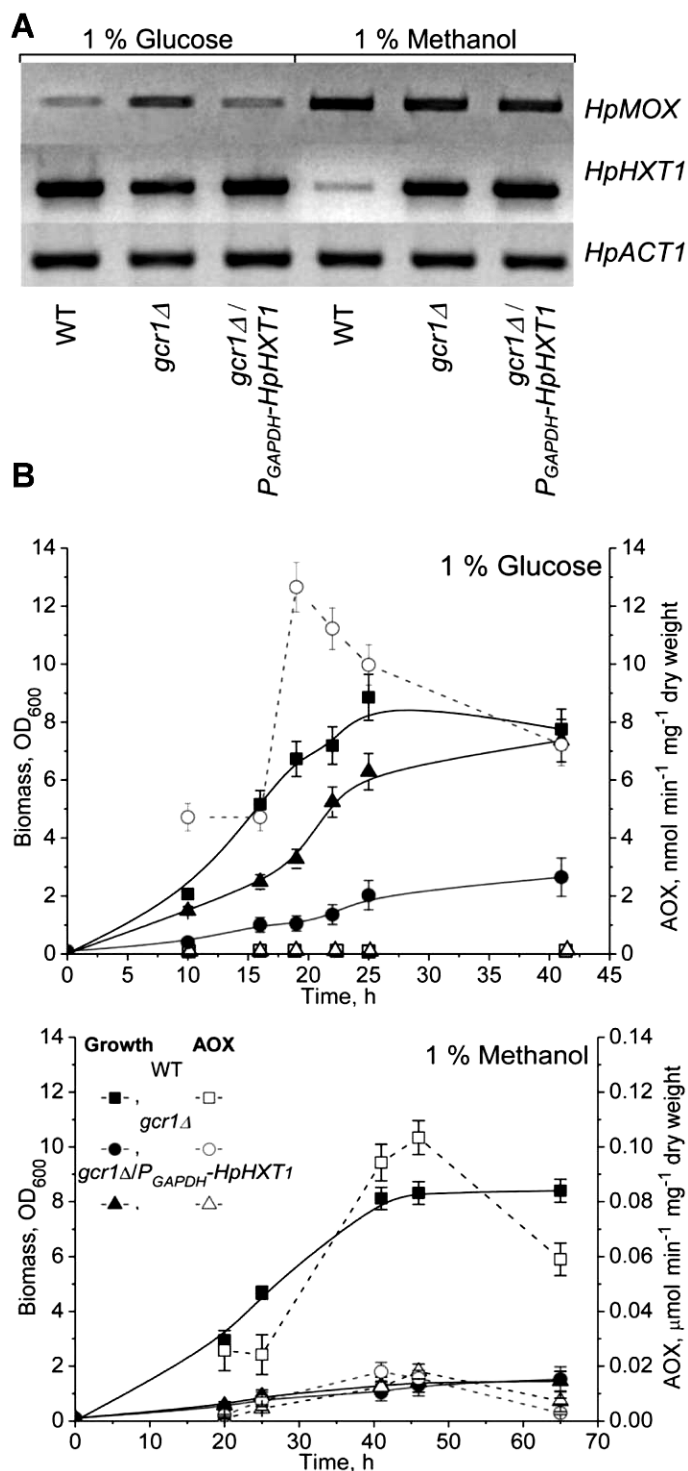


Рис. 3.1.17. Фізіологічний ефект надекспресії *HpxHT1* у мутанта $\Delta gcr1$. **(А)** експресія генів *HXT1* та *MOX* в клітинах *H. polymorpha* в середовищі з глюкозою чи метанолом. Клітини підрощували у середовищі YPE та переносили за рівних OD_{600} у середовище YNB з 1 % глюкози чи 1 % метанолу та додатково культивували протягом 2 год. кДНК було синтезовано з екстрагованої тотальної РНК та використано як матрицю у RT-PCR з парами праймерів ID3F/ID4R для гена *HpxHT1*, ID5F/D6R для гена *HpxMOX*, та ID1F/ID2R для гена *HpxACT1*, що був використаний як референтний. RT-PCR реакцію проводили як описано в розділі Матеріали та методи. **(В)** Кінетика росту та активності алкогольоксидази у штамів $\Delta gcr1$ та $\Delta gcr1/P_{GAPDH-HpxHT1}$, культивованих у мінеральному середовищі з глюкозою чи метанолом як джерелами карбону.

Експресія *HpxHT1*, функціональність якого була встановлена у *S. cerevisiae* при конститутивній надекспресії, але цього разу під регуляцією P_{MET25} , служила

позитивним контролем. Як і очікувалося, клітини *S. cerevisiae hxt-null* штаму, що експресують *HpHxt1* в безметіоніновому середовищі, були здатні до росту на глюкозі у мілімолярному діапазоні, але не за присутності 10 мг/л позаклітинного метіоніну (Рис. 3.1.18). При цьому метіонін у концентрації 5 мг/л забезпечував проміжний рівень росту.

На противагу, клітини *hxt-null* штаму, що несуть подібну транскрипційну касету але із *HpGCR1*, не виявляли жодного росту у середовищі з різними концентраціями глюкози, незалежно від наявності метіоніну (Рис. 3.1.18). Всі досліджувані штами при цьому росли за аналогічних умов на чашках з етанолом (Рис. 3.1.20). Слід відмітити, що експериментально охарактеризовані функціональні високоафінні транспортери глюкози з грибів, такі як *Trichoderma harzianum* Gtt1 [353] та *Aspergillus nidulans* HxtA [354], подібно до *HpGcr1*, не компенсували дефіцит росту на середовищах з гексозами в клітинах *hxt-null* штаму *S. cerevisiae*, тоді як споріднений до *HpGcr1* гомолог *A. niger* MstA, був функціональним у *S. cerevisiae* [344]. Аберантна локалізація та, як наслідок, деградація певних гетерологічних транспортерів гексоз у клітинах *S. cerevisiae* була у багатьох випадках причиною втрати їх функції транспортерів [351].

Тому, було вивчено локалізацію GFP-кон'югованих *HpGcr1* та *HpHxt1* у клітинах *hxt-null* штаму *S. cerevisiae*, вирощених на етанол-вмістному середовищі з метіоніном, чи без амінокислоти. Спостережено, що злитий білок *HpHxt1*-GFP був локалізований на плазматичній мембрані клітин, тоді як *HpGcr1*-GFP є головним чином цитозольним білком, подібно до вільного GFP, що був експресований під тим самим промотором (Рис. 3.1.18B). Таким чином, міслокалізація *HpGcr1* в клітинах *hxt-null* штаму *S. cerevisiae* виключила можливість його функціонального аналізу як транспортера глюкози, не заперечуючи при цьому, що відповідний білок може мати таку функцію у власному виді-господарі.

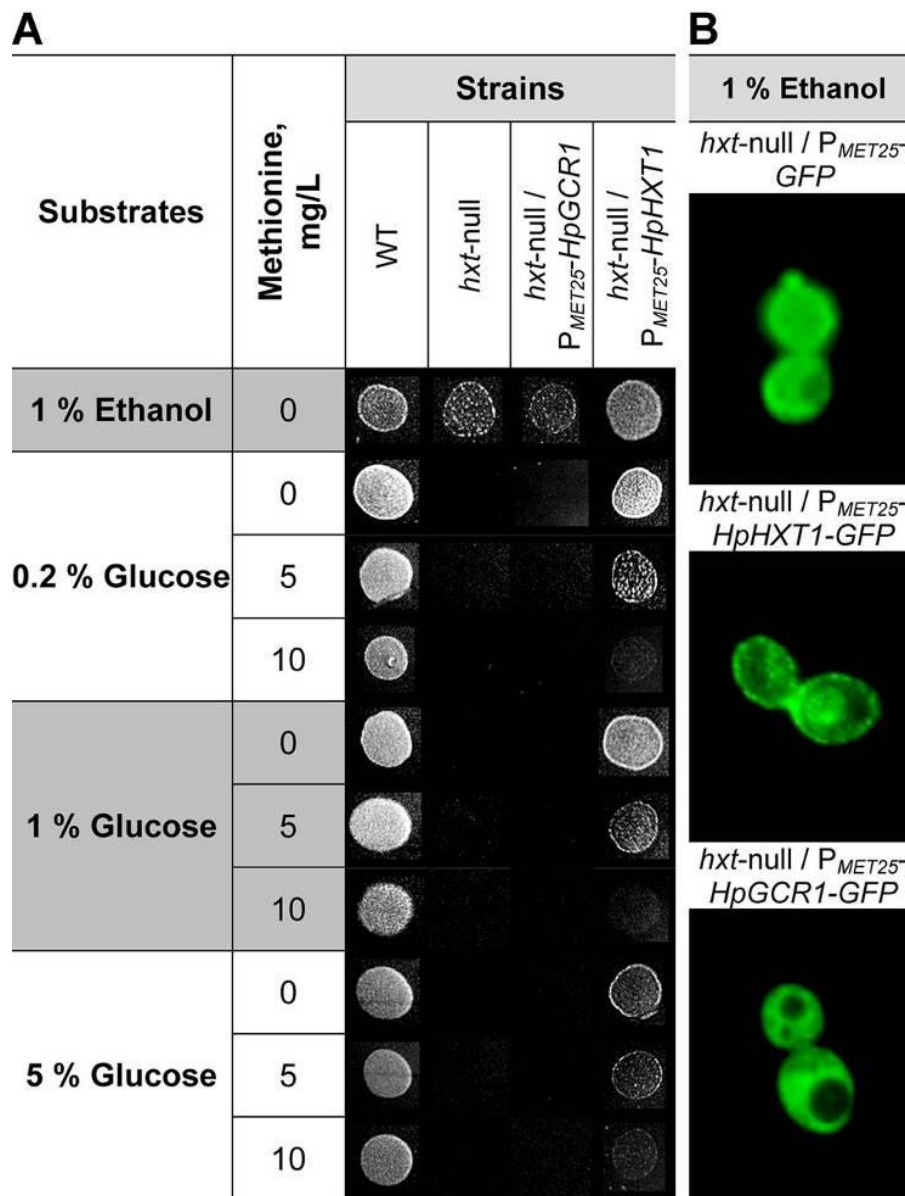


Рис. 3.1.18. Ефект регульованої надекспресії *HpGcr1* та *HpHxt1* в клітинах *hxt*-нуль штаму *S. cerevisiae* на утилізацію глюкози. **(А)** Клітини підрощували у середовищі YPE, переносили за рівних OD₆₀₀ на чашки з YNB з вказаними концентраціями глюкози та метіоніну та інкубували протягом 24 год.; контрольні клітини вирощували на етанол-вмісному середовищі та інкубували протягом 48 год. *HpHxt1* та *HpGcr1* були експресовані під *MET25* промотором що підлягав репресії метіоніном (див. деталі у тексті). **(В)** Внутрішньоклітинна локалізація химерних білків *HpGcr1-GFP* та *HpHxt1-GFP* у *hxt*-нуль мутанта *S. cerevisiae*. Клітини підрощували у YPE та переносили у середовище YNB з етанолом та метіоніном (100 мг/л), чи без нього, відповідно для репресії чи вивільнення експресії гетерологічних химерних генів під *MET25* промотором.

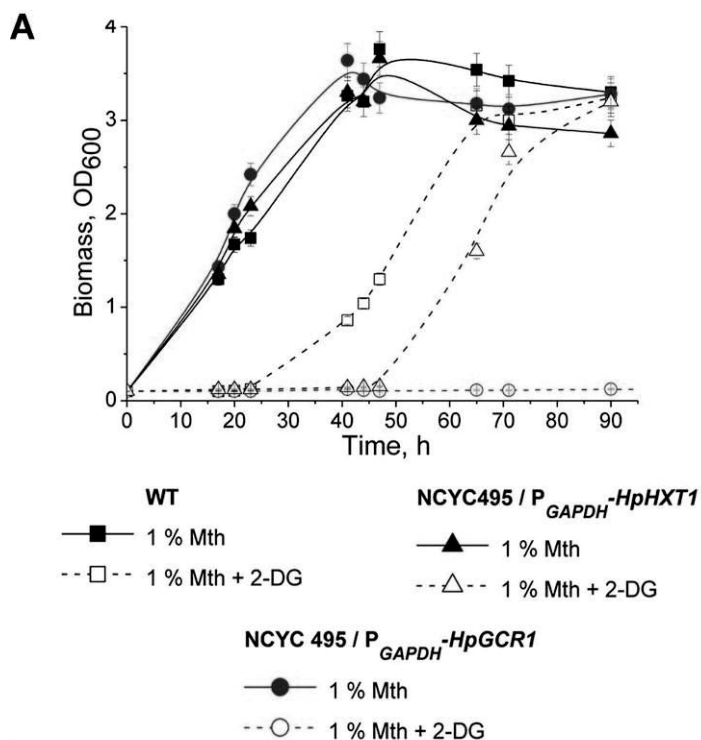
3.1.8.5. Надекспресія *Gcr1* підвищує чутливість клітин *H. polymorpha* до екзогенної 2-дезоксиглюкози

З метою додаткового аналізу можливості *HpGcr1* виконувати подвійну функцію як рецептора та функціонального транспортера, було досліджено чутливість штамів *H. polymorpha* з конститутивною надекспресією як *HpGCR1* так і *HpHXT1* до токсичного аналога глюкози 2-дезоксиглюкози (2-ДГ), який, як відомо, транспортується у дріжджову клітину за допомогою транспортерів глюкози [355]. Ми припустили, що надекспресія *HpGcr1*, якщо він є функціональним високоафінним транспортером, повинна збільшити чутливість таких клітин до 2-ДГ.

З використанням описаних вище векторів *pUC57-P_{GAPDH}-GCR1-Zeo* та *pUC57-P_{GAPDH}-HXT1-Zeo* на основі штаму дикого типу було створено панель штамів-надпродуцентів, що несуть різну кількість копій касет, що забезпечують експресію *HpGcr1* та *HpHxt1* під конститутивним промотором *GAPDH* *H. polymorpha* (*P_{GAPDH}*). Відповідні штами було проаналізовано на предмет відмінності в їх чутливості до зростаючих концентрацій 2-ДГ в рідкому метанол-вмістному мінеральному середовищі. Це середовище відібрали через дуже сильну концентраційну залежність транскрипції метилотрофних ензимів, і відповідно метилотрофного росту загалом, до репресивної дії 2-ДГ [129].

Було встановлено, що 0,3 мМ чи вищі концентрації 2-ДГ пригнічували ріст усіх протестованих штамів у середовищі з метанолом (Рис. 3.1.19А). При цьому штам дикого типу та рекомбінантний штам *NCYC495/P_{GAP}-HXT1* виявляли значне подовження лаг-фази. Порівнюючи з середовищем без 2-ДГ їхній ріст сповільнювався на 25 та 45 год, відповідно, відображаючи інтенсивність поглинання ними 2-ДГ. У той же час, штам *NCYC495/P_{GAP}-GCR1* виявив значно гострішу відповідь на дію 2-ДГ і не ріс за таких умов (Рис. 3.1.19А). Окрім того, було встановлено, що пероксисомна АOX залишалася репресованою 2-ДГ у штаму *NCYC495/P_{GAPDH}-GCR1* протягом значно довшого часу, порівняно з контрольним штамом дикого типу, що є очевидною причиною блокування метилотрофного росту (Рис. 3.1.19В). Таким чином, отримані дані свідчать на користь того, що

HpGcr1 притаманна функція високоафінного транспортера глюкози, надекспресія якого в організмі-господарі забезпечує ефективніше поглинання низьких кількостей позаклітинної 2-ДГ, порівняно з надекспресією низькоафінного транспортера *HpHxt1* [25].



B

Strain	2-DG, mM	Biomass, OD ₆₀₀	AOX, μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ dry weight
WT	0	2.25	0.110
	0.3	0.79	0.102
NCYC495 / P _{GAPDH} - <i>HpGCR1</i>	0	2.34	0.080
	0.3	0.206	0.015

Рис. 3.1.19. Вплив надекспресії *HpGcr1* та *HpHxt1* в клітинах *H. polymorpha* на чутливість до екзогенної 2-деоксиглюкози. **(А)** Кінетика росту штаму дикого типу та рекомбінантних штамів, що конститутивно продукують *HpGcr1* та *HpHxt1* під конститутивним промотором *GAPDH* у середовищі з 1% метанолом та 0,3 мМ 2-DG. **(В)** Показники росту біомаси та активності алкогольоксидази у штамі дикого типу та P_{GAPDH}-*HpGCR1* при інкубації у середовищі з метанолом та 2-DG. Клітини вирощували у середовищі YPE та перенесли у експериментальне середовище за рівних значень OD₆₀₀. Активність АОХ визначали на 20 год інкубації.

3.1.9. Обговорення

У цьому розділі експериментально охарактеризовано новий гомолог транспортерів гексоз з метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, названий *HXS1* (hexose sensor). *Hxs1* належить до окремого підкласу транспортероподібних білків, який містить усі відомі сьогодні ортологи дріжджових нетранспортуючих сенсорів глюкози, наприклад *S. cerevisiae* Snf3 та [19]–[21], *K. lactis* Rag4[23] та *C. albicans* Hgt4 [24], *Pichia (Komagataella) pastoris* Gss1 [26] (Рис. 3.1.1, 3.1.15). Подібно до інших Crabtree-негативних дріжджів, таких як *K. lactis*, *C. albicans* та *P. pastoris*, геном *H. polymorpha* містить лише один такий сенсор, тоді як у дріжджів роду

Saccharomyces, подібно до багатьох інших генів, відповідний ген зазнав дуплікації, та обидві копії були збережені після функціональної адаптації.

Крім очевидної подібності первинної послідовності, кілька експериментальних спостережень вказують на те, що Hxs1 виконує функцію сенсора гексоз: 1) відповідний ген експресується на помірно-низькому рівні, а рівень його експресії зростає за дефіциту глюкози, що є характерним для сенсорів; 2) Hxs1 не функціонує як транспортер у гетерологічній системі *S. cerevisiae*; 3) глюкозна індукція функціонального транспортера Hxt1 у *H. polymorpha* є строго Hxs1-залежною; 4) вкорочена форма білка Hxs1 без частини С-термінальної послідовності є не здатною до функціональної комплементации $\Delta hxs1$ мутанта; 5) заміна одного консервативного амінокислотного залишку (R203K) перетворює Hxs1 в конститутивно активовану форму, наслідком чого є надекспресія функціональних транспортерів гексоз.

Отже, можна зробити висновок, що у *H. polymorpha*, подібно до інших дріжджів, наявна ефективна система мембранного сенсингу глюкози для транскрипційної регуляції функціональних гексозних транспортерів у відповідь на доступність глюкози, що опосередковується нетранспортуючим рецептором. На даний момент залишається нез'ясованим, чи присутні молекулярні компоненти цього сигнального шляху є такими ж, як у *S. cerevisiae*, *K. lactis*, та *C. albicans*, тобто функціональними гомологами Yck1 кazeїн кiнази I, Mth1/Std1 та транскрипційного фактора Rgt1 [6], [7]. Відповідні гени, що кодують їх потенційні ортологи, присутні у геномі *H. polymorpha*. Також, наш аналіз промоторної ділянки гена *HpHXT1* виявив щонайменше шість потенційних консенсусних сайтів зв'язування для репресора ScRgt1 [40], що додатково вказує на консерватизм цього сенсор-залежного шляху у різних аскоміцетних дріжджів.

Слід зазначити, що хоча делеція гена *HXS1* не викликає значного зниження швидкості росту на гексозах у рідкому середовищі за виключенням продовження лаг-фази (Рис. 3.1.5), тим не менше цей дефект росту у мутанта $\Delta hxs1$ стає вираженим на твердому середовищі з гексозами після короткотривалої інкубації (Рис. 3.1.10). Ми також зауважили, що транз'єнтний дефект фруктозної репресії у

мутанта *Δhxs1* є помітним, тоді як ефект мутації на глюкозну репресію є незначним. Можливим поясненням такого «фруктозо-специфічного» фенотипу мутанта *Δhxs1*, що нагадує фенотип описаний для *S. albicans Δhgt4* [24], є різний вплив ефективності транспорту відповідної гексози на потужність сигналу катаболітної репресії. Дійсно, дефект в обох низько- та високо-афінному компонентах транспорту глюкози і дефект глюкозної репресії є набагато більш вираженими в мутанта *Δgcr1*, порівнюючи з мутантом *Δhxs1* (Рис. 3.1.4). Також, дефект росту на глюкозі та пошкодження репресії були посилені у подвійного мутанта *Δgcr1Δhxs1* (Рис. 3.1.7, 3.1.8). У згоді до запропонованої гіпотези, високо- та низько-афінний транспорт фруктози з клітинах *Δhxs1* є значно пошкодженими (приблизно 10-кратне зниження порівняно із штамом дикого типу), тоді як лише низько-афінний транспорт глюкози є частково порушеним у цього мутанта (Рис. 3.1.4. А, D). Попередньо групою професора Аламяє (Тарту, Естонія) було встановлено, що фосфорилування гексоз є необхідним для сигналювання катаболітної репресії у *H. polymorpha* [147], [149], [356]. Отже, внутрішньоклітинний рівень ефекторної гексози та її метаболітів, залежні від ефективності транспорту, можуть визначати силу низхідного сигналу репресії. Іншими словами, транспорт гексоз може бути головним лімітуючим фактором у регуляції катаболітної репресії в *H. polymorpha*.

Тим не менше, отримані нами дані свідчать, що механізм глюкозної репресії в *H. polymorpha* є більш комплексним і може також включати специфічний сенсинг гексоз. Наприклад, здатність до транспорту фруктози не відрізняється значно між мутантами *Δhxs1* і *Δgcr1*, однак спостерігаються відмінності за рівнем пошкодження транз'єнтної репресії (Рис. 3.1.4, 3.1.5). Можливо, різна участь ензимів фосфорилування гексоз, гексо- та глюкокіназ у відповідь на різні гексози може лежати в основі спостережених ефектів. Спираючись на наявні дані, нами запропоновано, що транспорт гексоз є важливим, але не єдиним фактором, що впливає на сигналювання катаболітної репресії у *H. polymorpha*.

У даній роботі також ідентифіковано перший функціональний транспортер гексоз у *H. polymorpha*, Hxt1 (Hexose transporter). Експериментальні дані свідчать

про його фізіологічну роль як низькоафінного транспортера, оскільки: 1) білок Hxt1 має високий рівень подібності до функціональних низькоафінних транспортерів з інших дріжджів; 2) його експресія в *H. polymorpha* індукується високими концентраціями глюкози; 3) при гетерологічній надекспресії, він підтримує ріст на глюкозі та фруктозі в мілімолярному діапазоні у штаму *S. cerevisiae*, дефіцитному за власними транспортерами; iv) мутант із делетованим геном *HXT1* демонструє помітне зниження низько- але не високо-афінного транспорту глюкози. Частковий дефект росту мутанта $\Delta hxt1$ на глюкозі чи фруктозі свідчить, що Hxt1 є не єдиним функціональним транспортером у цього виду (Рис. 3.1.5).

Тим не менше, делеційний мутант $\Delta hxt1$, подібно до $\Delta hxs1$, демонструє слабу тимчасову дерепресію репресибельних генів (*MOX* та *MAL1*) при перенесенні клітин у середовище з високою глюкозою, що дає змогу припустити, що цей транспортер є важливим для підтримання ефективного транспорту та регуляції транскрипції за таких умов. Цікавим є також спостереження, що експресія *HpHXT1* за певних умов залежить від Gcr1. Наприклад, Hxt1 є надекспресованим у мутанта $\Delta gcr1$ на середовищі з етанолом та метанолом (Рис. 3.1.13), що додатково ускладнює механізм взаємодії між системою транспорту гексоз та двома білками-сенсорами.

Подібні до транспортерів сенсори чи рецептори поживних речовин із залишковою чи нормальною транспортною активністю (трансцептори) відомі у різних мікроорганізмів [11]. У дріжджів, декілька транспортуючих трансцепторів (тобто активних переносчиків, що поєднують функції транспортера та рецептора) є залучені у механізм швидкої адаптації клітин до флуктуацій концентрацій таких важливих поживних речовин, як азот (Mer1,2 пермеаза амонію), та фосфат (Pho84, фосфатпермеаза) [357]. Добре відомим дріжджовим трансцептором є Gar1 – загальна пермеаза амінокислот, що транспортує основні амінокислоти та їх неметаболізовані аналоги, які викликають швидку активацію шляху РКА [358]. Однак, транспортуючі трансцептори саме для цукрів чи гексоз на даний час не

відомі у дріжджів, хоча деякі кандидати були запропоновані, наприклад у *Cryptococcus neoformans* та *Candida albicans* [359], [360].

Дріжджові нетранспортуючі сенсори глюкози, такі як *S. cerevisiae* Snf3 та Rgt2, еволюціонували як спеціалізовані рецептори шляхом набуття домену передачі сигналу у С-термінальній частині білка, та, незважаючи на збереження сайту зв'язування глюкози, втратили здатність імпортувати цукри всередину клітини [5], [20], [21].

Коли гомолог транспортерів гексоз *HpGcr1* було вперше ізольовано з геномної бібліотеки *H. polymorpha*, на основі його подібності до відомих на той час гомологів транспортерів вважалося, що він представляє собою специфічний позбавлений хвостової ділянки сенсор [29]. Однак пізніше, описаний у цій роботі «справжній» сенсор глюкози Hxs1, більш подібний до *S. cerevisiae* Snf3/Rgt2, було ідентифіковано та охарактеризовано у *H. polymorpha* [25] (див. також Табл. 3.1.1 щодо детального опису фенотипових особливостей мутантів *gcr1* та *hxs1*).

Тільки нещодавно, завдяки секвенуванню більшої кількості геномів грибів, стало очевидним, що *HpGcr1* демонструє вищу схожість первинної послідовності до високоафінних симпотерів нитчастих грибів з ряду *Eurotiales*, ніж до більшості відомих транспортерів гексоз дріжджів, за виключенням декількох нещодавно ідентифікованих білків з близькоспорідненої родини дріжджів *Pichiaceae*, ряд *Saccharomycetales*, наприклад *Candida boidinii* та *Kuraishia capsulata* (Рис. 3.1.15). Необхідно відзначити, що *H. polymorpha* належить до спеціалізованої групи дріжджів поза межами основних еволюційних гілок *Saccharomyces* і *Candida* (так званого СТГ клейд), що відділились відносно рано у процесі еволюції дріжджів після розділення *Peizomycotina* і *Saccharomycotina* [257] (див. також розділ 1.4.1 Огляду літератури).

У той же час нами виявлено, що геноми деяких інших видів дріжджів групи *Hansenula*, наприклад, *Dekkera (Bretanomyces) bruxellensis*, і більш віддалені метилотрофи *Komagataella (Pichia) pastoris*, не мають потенційних ортологів *HpGcr1*. У випадку *D. bruxellensis*, можливим поясненням може бути або неповне секвенування його складного поліплоїдного геному [361], або вторинна втрата ортолога *GCR1* внаслідок адаптації *D. bruxellensis* як Crabtree-позитивних дріжджів до ферментативного метаболізму [256].

**Фенотипи *gcr1* і *hxs1* мутантів *H. polymorpha* та прогнозовані функції
відповідних білків**

Гомологи транспортерів гексоз*	Функція та фенотип	Посилання
<i>HpHxt1</i> (Hexose Transport)	Низькоафінний транспортер глюкози, індукується високими концентраціями глюкози. Для індукції транскрипції потребує <i>HpHxs1</i>	<i>Stasyk et al., 2008</i>
	Потенційний транспортер-фасилітатор, здатний до комплементации дефіциту транспорту глюкози у штаму <i>hxt00 S. cerevisiae</i>	<i>Stasyk et al., 2008</i>
<i>HpHxs1</i> (Hexose Sensing)	Нетранспортує гомолог транспортерів гексоз, подібний до <i>ScSnf3</i> та <i>ScRgt2</i> . Нездатний комплементувати дефіцит транспорту глюкози у штаму <i>hxt00 S. cerevisiae</i>	<i>Stasyk et al., 2008</i>
	Експресується на низькому рівні та дерепресується за відсутності глюкози	<i>Stasyk et al., 2008</i>
	Позитивний регулятор експресії <i>HpHxt1</i> . Делеція викликає часткове блокування низькоафінного транспорту глюкози	<i>Stasyk et al., 2008</i>
	Делеція С-термінального хвоста призводить до втрати функції цього білка	<i>Stasyk et al., 2008</i>
	Заміна однієї амінокислоти R203K перетворює білок в конститутивно-активовану форму. Відповідний мутант є резистентним до антиміцину А	<i>Stasyk et al., 2008</i>
<i>HpGcr1</i>** (Glucose Catabolite Repression)	Гомолог високоафінних симпортерів глюкози та трансцепторів грибів і окремих видів дріжджів. Запропонований як специфічний транспортуєчий сенсор (трансцептор) глюкози	<i>Stasyk et al., 2004, 2018</i>
	Делеція чи точкова мутація <i>gcr1-2</i> (S85F) пошкоджує транспорт глюкози та глюкозну репресію пероксисомних ензимів	<i>Stasyk et al., 2004</i>
	Необхідний для транскрипційної регуляції <i>HpHxt1</i> та потенційного транспортера фруктози <i>HpFrt1</i> за відсутності глюкози	<i>Stasyk et al., 2012b</i>
	Подвійний мутант <i>gcr1Δhxs1Δ</i> все ще здатний до повільного росту на глюкозі, що може свідчити про функціонування у <i>H. polymorpha</i> інших транспортерів гексоз (ідентифіковано два кандидати)*	<i>Stasyk et al., 2012a</i>
	Дефект транспорту глюкози у мутанта <i>gcr1-2</i> (S85F) є менш вираженим у порівнянні з делеційним штамом <i>gcr1Δ</i>, однак дефект глюкозної репресії є більш вираженим у першого – ефект «набуття функції», характерний для сенсорів	<i>Stasyk et al., 2004</i>
	Мутанти <i>gcr1</i> виявляють видовжену лаг-фазу росту на метанолі та сповільнену індукцію пероксисомної алкогольоксидази за відсутності глюкози	<i>Stasyk et al., 2004, 2018</i>

Гомологи транспортерів гексоз*	Функція та фенотип	Посилання
	Заміна однієї амінокислоти R165K перетворює білок в аберантну сигналюючу форму, що погіршує ріст незалежно від наявного джерела карбону, імовірно активуючи РКА сигналювання	Stasyk et al., 2018
	Надекспресія <i>HpGcr1</i> в <i>H. polymorpha</i> викликає підвищену чутливість до позаклітинної 2-дезоксиглюкози, що свідчить про функціонування <i>HpGcr1</i> як транспортера	Stasyk et al., 2018
	Надекспресія <i>HpHxt1</i> у мутанта $\Delta gcr1$ відновлює ріст на глюкозі та глюкозну репресію, це свідчить про ключову роль транспорту глюкози у механізмах репресії	Stasyk et al., 2018

*Крім охарактеризованих у цій роботі, геном *H. polymorpha* містить принаймні один інший потенційний транспортер глюкози та два специфічних транспортери фруктози, про що свідчить подібність їх первинних послідовностей. Однак, функції цих генів не були експериментально досліджені.

** Фенотипи, що вказують на функцію сенсингу глюкози або трансцепторну функцію *HpGcr1*, виділені **жирним шрифтом**

Детальний філогенетичний аналіз не виявив чіткої переваги між двома варіантами походження гіпотетичного попередника дріжджового *HpGcr1*, а саме: специфічного збереження предкового гена у геномі після еволюційного розділення нитчастих грибів та дріжджів [362], чи внаслідок горизонтального перенесення гена (horizontal gene transfer, HGT) від грибного донора з ряду *Eurotiales* до дріжджів [363]. Слід зауважити, що такий невизначений характер філогенезу *HpGcr1* не відрізняється значно від пероксисомної алкогольоксидази (АОХ) *H. polymorpha*, яка, як відомо, належить до так званих «специфічно збережених предкових генів, SRAGs (specifically retained ancestral genes) [362], і була відповідно втрачена з геному *D. bruxellensis* [361]. Зауважимо також, що існує добре відомий приклад древньої події HGT у групі *H. polymorpha*, який стосується грибного кластеру генів, що кодують ферменти асиміляції нітратів [364]. Цей кластер є специфічним для *H. polymorpha*, *K. capsulata*, та *D. bruxellensis*, але не був знайдений у всіх інших дріжджів, включно з *K. pastoris* [257]. Отже, для кращого розуміння походження *HpGcr1* (SRAG versus HGT) є необхідним додаткове секвенування геномів цієї групи дріжджів.

Деякі з близьких грибних гомологів *HpGcr1* були експериментально охарактеризовані у системі *S. cerevisiae*, а їхня функціональність як транспортерів відрізнялась. Так, наприклад, *A. niger* MstA та *A. nidulans* HxtB були функціональні у *S. cerevisiae* [344], [365], тоді як дуже подібні *A. nidulans* HxtA and HxtD ні [354], [366]. Раніше повідомлялося, що при надекспресії, відсутність відповідного мембранного аналога АТФ-ази або міслокалізація з плазматичної мембрани часто викликають функціональну інактивацию гетерологічних транспортерів у *S. cerevisiae* [367]. І у нашому випадку ми не могли експериментально відповісти питання, чи є *HpGcr1* функціональним транспортером, оскільки було виявлено його міслокалізацію до цитозолу як за експресії під конститутивним промотором алкогольдегідрогенази *ADHI* (неопубліковані дані), так і контрольованої експресії під метіонін-регульованим *MET25* промотором у *S. cerevisiae* (Рис. 3.1.18В). Однак, коли *HpGcr1* був надекспресований у *H. polymorpha*, це призводило до підвищення чутливості клітин до токсичного аналога глюкози 2-ДГ (Рис. 3.1.19). Беручи також до уваги той факт, що делеційний мутант *gcr1* виявляє значне пошкодження транспорту глюкози [29], [346], сукупність даних свідчить на користь того, що *HpGcr1* є функціональним транспортером глюкози в *H. polymorpha*.

Як наведено вище, дефіцит *HpGcr1* викликає плейотропні ефекти в регуляції транскрипції, такі як порушення глюкозної катаболітної репресії та фізіологічної регуляції експресії генів транспортерів гексоз [29], [346], (Табл. 3.1.1). Також встановлено, що дефіцит транспорту глюкози та, як наслідок, зниження гліколітичного потоку (glycolytic flux) [29], [142] є головною причиною послаблення глюкозної репресії у мутанта *gcr1*, оскільки цей дефект може бути функціонально компенсований надекспресією низькоафінного функціонального транспортера *HpHxt1* [25]. Зокрема, підвищення експресії *HpHXT1* у $\Delta gcr1$ відновлювало ефективну репресію пероксисомної АOX, навіть за неповного відновлення швидкості росту на глюкозі до рівня штаму дикого типу (Рис. 3.1.17). Отже, цей результат ставить питання про те, чи бере *HpGcr1* безпосередню участь у сигналюванні катаболітної репресії у *H. polymorpha*. Дійсно, рівень глюкози у дріжджовій клітині може

відображатись та сприйматися генетичним апаратом опосередковано через концентрації її катаболітів. Як згадано вище, Suppi *et al.* (2013) запропонували ключову роль глюкозо-6-фосфату як потенційної «ефекторної» молекули у глюкозній репресії. Слід зазначити, що ми також повідомляли, що клітини $\Delta gcr1$ при рості на глюкозі характеризуються значним зниженням пулу гліколітичних інтермедіатів, включно з глюкозо-6-фосфатом та фруктозо-1,6-бісфосфатом [29], [142]. Отже, можна припустити, що дефіцит транспорту глюкози і результуюче зниження гліколітичних інтермедіатів, подібне до того, що спостерігається у мутанта $\Delta gcr1$, буде завжди призводити до щонайменше транз'єнтного пошкодження глюкозної репресії у *H. polymorpha*, ймовірно, через так зване «виключення ефектора» (effector exclusion), тобто падіння концентрації сигнальної молекули.

Тим не менше, ряд експериментальних доказів дозволяє зробити висновок, що *HpGcr1* є не звичайним транспортером, а новим типом гексозного рецептора дріжджів. Одним із відомих ключових підтверджень сенсорної функції є перетворення білка в конститутивно-активовану сигнальну форму внаслідок певних точкових замінів у послідовності. У цій роботі ми продемонстрували, що мутація *HpGcr1*^{R165K}, аналогічна до замінів, які конвертували декілька дріжджових *ScSnf3*-подібних сенсорів в конститутивно-сигналюючі форми, продукує «напівтоксичний» фенотип, чітко відмінний від фенотипів як $\Delta gcr1$, так і штаму дикого типу. Зокрема, *HpGcr1*^{R165K}, експресований у $\Delta gcr1$, додатково значно пригнічував ріст на різних вуглецевих субстратах, включаючи гексози і сахарозу (Рис. 3.1.12), а його фенотип нагадував фенотип мутантів із надактивованим сигнальним шляхом протеїнкінази А (РКА) [368]. Цей специфічний фенотип так званого «набуття функції (gain of function)» вказує на сигнальну функцію *HpGcr1* у регуляції транскрипції великого набору генів, пов'язаних з метаболізмом вуглеводнів у тому числі за відсутності глюкози, але також регульованим глюкозою за посередництвом *HpGcr1* як сенсора та транспортера.

Дійсно, у $\Delta gcr1$ та УФ-індукованого та *gcr1-2* (*Gcr1*^{S85F}) [29] мутантів індукція експресії пероксисомної АО та відповідно метилотрофний ріст є значно сповільненими відносно штаму дикого типу (Рис. 3.1.17). Ці мутації також

диференційно впливають на експресію *HpHxt1* та інших передбачених транспортерів гексоз у *H. polymorpha* [347]. У випадку, коли інактивуюча заміна однієї амінокислоти є введена у звичайний транспортер цукрів, фенотип $\Delta gcr1$, *HpGcr1*^{S85F} та *HpGcr1*^{R165K}-мутантів мав би бути ідентичним. Таким чином, *HpGcr1*, є залучений у сигналюванні, пов'язаному із транскрипційною регуляцією за відсутності глюкози. Відповідно до цієї функції, транскрипція самого гена *HpGCR1*, як було нами встановлено, індукується за відсутності глюкози та є значно підвищеною у точкового мутанта *gcr1-2* (*HpGcr1*^{S85F}), вказуючи на авторегуляцію гена у відповідь на наявність глюкози [142], [347].

Цікаво, що багато фенотипів, які ми спостерігали у *gcr1*-мутантів *H. polymorpha* (узагальнені в Таблиці 3.1.1), є аналогічними до нещодавно описаних для мутантів по високоафінному транспортеру гексоз *Hxt1* біотрофного базидіоміцету *Ustilago maydis* (*UmHxt1*) (Рис. 3.1.15) [27]. Наприклад, інтродукція мутації R164K (аналогічної до *HpGcr1*^{R165K}) в *UmHxt1* виключала транспортну функцію, але також зробила мутантний гриб цілком авірулентним на моделі кукурудзі, на відміну від семівірулентного фенотипу, продукованого штамом $\Delta hxt1$, що припускає трансцепторну (сенсорну) функцію для цього транспортера *U. maydis* [27]. Мутований *UmHxt1*^{R164K} також негативно впливав на експресію багатьох генів, залучених у метаболізм вуглеводнів, включаючи гени інших транспортерів гексоз. Подібно до *HpGcr1*^{R165K}, *UmHxt1*^{R164K} не був домінантним на фоні відповідного гена дикого типу, у той же час викликаючи аберантне сигналювання на фоні відповідного делеційного штаму, а також за відсутності глюкози. Відновлення транспорту глюкози за рахунок експресії допоміжних транспортерів не впливало на рецепторну функцію *UmHxt1* [27], за аналогією до збереження ушкодження метилотрофного росту у $gcr1\Delta/P_{GAPDH}\text{-}HpHXT1$ (Рис. 3.1.17В). Можна спекулювати, що перелічені вище аналогічні мутантні фенотипи у двох віддалених видів дріжджів свідчать про спільний низхідний сигнальний механізм для цього запропонованого нового типу трансцепторів гексоз дріжджів чи грибів, до яких можуть належати *HpGcr1*, *UmHxt1*, а також багато їх близьких гомологів з грибів та деяких дріжджів [28], [359]. У деяких

організмів, наприклад гриба *Neurospora crassa*, ці високоафінні трансцептори глюкози співіснують, подібно до *H. polymorpha*, з класичним низькоафінним нетранспортуючим сенсором, наприклад відповідно *NcHxt1* та *NcRco3* [28]. Питання, чи є РКА шлях залученим у опосередковане *HpGcr1*-подібними трансцепторами сигналювання, може бути предметом подальших досліджень.

Наприкінці слід зазначити, що, окрім транскрипційної регуляції, глюкоза також індукує катаболітну інактивацію репресибельних пероксисомних та інших ензимів, що включає деградацію пероксисом у вакуолях, – процес пексофагії (див. Розділ 1.3 Огляду літератури). У цій роботі ми продемонстрували, що *HpHxs1*, подібно до *HpGcr1* [25], [29], не є важливим для цього регуляторного шляху. Ці дані посилюють уявлення про те, що молекулярні ефектори пексофагії можуть у першу чергу залежати від сили гліколітичного потоку і, отже, енергетичного статусу клітин, а не від пов'язаного із мембранами сенсingu молекули-ефектора. Однак, певні форми GPCR-опосередкованого сигналювання для пексофагії не можна виключити [227].

3.1.10. Підсумки

У роботі ідентифіковано та функціонально охарактеризовано декілька нових гомологів транспортерів гексоз метилотрофних дріжджів *Hansenula (Ogataea) polymorpha*, які беруть участь у транспорті глюкози, сенсingu та сигналюванні для транскрипційної регуляції, чи в обох процесах. Встановлено, що ген *HpHXS1* (*HeXose Sensor*) кодує «класичний» нетранспортуючий сенсор глюкози, залучений у транскрипційну індукцію іншого ідентифікованого гена, що кодує низькоафінний транспортер гексоз *HpHXT1* (*HeXose Transporter*), у відповідь на їх присутність. Подібно до інших дріжджових сенсорів, заміна однієї консервативної амінокислоти в послідовності *Hxs1* (R203K) перетворює білок у конститутивно-активовану сигналюючу форму, а С-термінальний фрагмент білка *Hxs1* є важливим для його функції. *Hxs1* при цьому не є необхідним для глюкозної репресії чи пероксофагії.

Інший гомолог транспортерів гексоз у *H. polymorpha*, *HpGcr1*, був раніше ідентифікований як імовірний сенсор чи транспортер, необхідний для глюкозної репресії. Встановлено, що ортолог *HpGcr1* відсутній у геномах більшості дріжджів, за винятком кількох філогенетично пов'язаних із *H. polymorpha* видів, а іншими його найближчими гомологами є високоафінні симпортери глюкози чи ймовірні трансцептори з грибів, що свідчить про можливе походження *HpGcr1* шляхом горизонтального перенесення з грибів *Eurotiales*, або збереження специфічного архаїчного гена. Специфічна амінокислотна заміна *HpGcr1*^{R165K} конвертувала сенсор у форму, яка не відновлювала транспорт глюкози чи глюкозну репресію, але натомість додатково пошкоджувала ріст незалежно від наявного джерела карбону. Гетерологічна експресія *HpGcr1* в *hxt*-нуль штамі *S. cerevisiae* не відновлювала транспорт глюкози внаслідок міслокалізації білка. Однак надекспресія *HpGcr1* у *H. polymorpha* призводила до підвищення чутливості такого штаму до низьких концентрацій позаклітинної 2-дезоксиглюкози, що свідчить на користь здатності *HpGcr1* транспортувати глюкозу. Одночасно, Δ *gcr1* виявляв пошкодження транскрипційної індукції пероксисомної алкогольоксидази та метилотрофного росту. Надекспресія функціонального транспортера *HpHxt1* в Δ *gcr1* частково відновлювала ріст на глюкозі та повністю глюкозну репресію, але не впливала на порушений ріст на метанолі.

Сукупні результати досліджень свідчать, що у Crabtree-негативних дріжджів *H. polymorpha* 1) нетранспортуючий сенсор *Hxs1* опосередковує сигналювання у шляху індукції транскрипції гексозної; 2) *HpGcr1* представляє новий тип дріжджового трансцептора глюкози, що функціонує також за її відсутності; 3) ефективність поглинання гексоз є ключовим лімітуючим фактором забезпечення катаболітної репресії.

Результати, описані в Розділі 3.1, були опубліковані у 8 статтях і 1 патенті України на корисну модель № 73449 [3], [25], [30], [290], [319], [346], [347], [369], [370].

3.2. Молекулярно-генетичний та функціональний аналіз потенційних гомологів транскрипційних факторів *Mig1*, *Mig2* і *Hap4* у *H. polymorpha*

Припускалось, що молекулярний шлях катаболітної репресії глюкози у метилортрофних дріжджів може імітувати Snf1-Mig1 сигнальний шлях у *S. cerevisiae*. Його основними компонентами є субодиниця II гексокінази, Snf1 протеїнкіназа та репресор Mig1, що забезпечують зв'язування основного репресора Tup1-Ssn6 з промоторами репресибельних генів у присутності глюкози [9], [10], [55]. На користь цієї гіпотези свідчить той факт, що промотори генів алкогольоксидази [143] та мальтази [145] *H. polymorpha* репресувались глюкозою у системі *S. cerevisiae*, таким чином вказуючи, що ці промотори є об'єктом сигналювання глюкозної репресії організма-хазяїна. Таким чином, репресовані глюкозою гени С-1 метаболізму у *H. polymorpha* можуть бути мішенями Mig1/(Tup1-Ssn6)-опосередкованої транскрипційної репресії, аналогічної до пекарських дріжджів.

Окрім цього, як зазначалось у Розділі 1.3, у *H. polymorpha* відбуваються два пов'язані, але морфологічно відмінні автофагійні механізми: селективна макропексофагія, яка запускається чи заміною джерела карбону (наприклад, метанолу на глюкозу чи етанол) [197], [371], або холодовим шоком (cold shock) [372], та неселективна мікроавтофагія – індукується при голодуванні за нітрогеном, та забезпечує деградацію білків (bulk protein turnover) та органел шляхом загальної автофагії [341]. Більшість дріжджових *ATG* генів, залучених у пексофагію, є консервативними в еукаріот і також контролюють загальну автофагію. Ті з них, котрі є специфічними лише для пексофагії, часто є також специфічними для певних організмів [373]. Останні включають у *H. polymorpha* *ATG11* та *ATG25* [219], *ATG26* (наші результати), і *TUP1* [152]. Таким чином, *HpTup1* був першим відомим представником транскрипційних репресорів, залучених у пексофагію. Оскільки макропексофагія, на противагу мікроавтофагії, індукованій голодуванням за нітрогеном, є нечутливою до циклогексекміду (СНХ) (не залежить від синтезу білка *de novo*), функція *HpTup1* у пексофагії пропонувалась як опосередкована [152].

Нашою метою був пошук ортологів окремих генів головного шляху репресії *S. cerevisiae* у геномі *H. polymorpha* та експериментальна перевірка їх важливості для катаболітної експресії та пексофагії.

3.2.1. Аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів *MIG1* і *MIG2* та порівняння з базами даних

Пошук у базі даних геному *H. polymorpha* CBS4732 [254] виявив наявність двох гіпотетичних гомологів *ScMig1* C₂H₂-репресора транскрипції з «цинковим пальцем» (zinc finger transcriptional repressor) [374]. Варто зазначити, що дещо пізніше дуже подібна послідовність штаму NCYC495, використаного у цьому проєкті, також стала загальнодоступною (<http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>). Схожі результати були отримані після аналізу баз даних геному із використанням повно розмірної послідовності *ScMig1*, чи його N-кінцевого ДНК-зв'язуючого домену «цинкових пальців», що є високо-консервативним у всіх відомих дріжджових *Mig1* гомологів [375]–[378], або повнорозмірної послідовності спорідненого білка *Mig2* у *S.cerevisiae* [379].

Як і очікувалось, два ідентифіковані у *H. polymorpha* *Mig* гомологи, позначені як *HpMig1* та *HpMig2*, виявили обмежену загальну гомологію до *Mig* білків інших дріжджів: наприклад, 26% ідентичності та 41% подібності до *ScMig1*, 32% ідентичності та 43% схожості до *Mig1* *C. albicans* [377], 34% ідентичності та 45% схожості до *Mig1* *Schwanniomyces occidentalis* [378]. Однак, у ділянці N-кінцевого ZnF домену «цинкового пальця», схожість була високою: 80% та 76% ідентичності до *ScMig1* для *HpMig1* і *HpMig2* відповідно (Рис. 3.2.1А).

Встановлено, що *HpMig1* і *HpMig2* відрізняються за довжиною (480 і 402 амінокислотних залишки відповідно) та є на 33% ідентичними і на 44% схожими один до одного. Обидва білки *H. polymorpha* виявляють менш ніж 69% ідентичності у своїх ZnF доменах до *ScMig2*, і менше 66% до спорідненого *Yer028c* (чи *Mig3*) *S. cerevisiae* [380]. При цьому, 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 [381].

аббревіатура назв видів: *Hp* – *Hansenula polymorpha*; *Sc* – *Saccharomyces cerevisiae*; *Ca* – *Candida albicans*; *Km* – *Kluyveromyces marxianus*; *Kl* – *Kluyveromyces lactis*; *So* – *Schwanniomyces occidentalis*; *An* – *Aspergillus nidulans*; *Nc* – *Neurospora crassa*. Ідентифікаційні номери бази даних GenPept для послідовностей використаних білків: *ScMig1* – P27705; *ScMig2* – P53035; *CaMig1* – Q9Y7G2; *KmMig1* – P52288; *KlMig1* – P50898; *SoMig1* – CAD10675; *AnCreA* – AAR02858; *NcCre1* – O59958.

3.2.2. Конструювання делеційних штамів у генах *MIG1*, *MIG2*, подвійного мутанта *mig1mig2* та аналіз їхніх фенотипів

Делеційні мутанти за генами *MIG1*, *MIG2*, та подвійний мутант *mig1mig2* було сконструйовано як описано у розділі «Матеріали і Методи».

3.2.3. Аналіз впливу мутацій *mig1* і *mig2* на механізми катаболітної регуляції у *H. polymorpha*

Ми зауважили, що мутанти $\Delta mig1$ і $\Delta mig2$ не відрізняються від штаму дикого типу за швидкістю росту на твердих агаризованих середовищах, доповнених різними джерелами карбону: глюкозою, сахарозою, етанолом і метанолом, тоді як подвійний делеційний мутант демонстрував сповільнення росту на цукрових (гліколітичних) субстратах (Рис. 3.2.2). Однак мутанти $\Delta mig1$ та $\Delta mig1\Delta mig2$ могли також рости на чашках з метанолом у присутності 2-дезоксиглюкози, що свідчить про щонайменше часткове порушення глюкозної репресії. Мутант *Atup1* *H. polymorpha*, у якого процес репресії не порушений [151], був люб'язно наданий проф. М. Венхаузом і використаний як контроль.

Детальний аналіз кінетики росту у рідких культурах підтвердив, що мутанти *mig1/2* демонструють швидкість росту аналогічну до штаму дикому типу на метанолі і етанолі. При рості на субстратах-цукрах lag фаза у $\Delta mig1$ і подвійному делеційному $\Delta mig1\Delta mig2$ мутантах була продовженою, але її зростання не впливало на характер експоненційної фази росту (Рис. 3.2.2В). Це спостереження допускає, що *HpMig1* and *HpMig2* можуть бути залучені у транзйентну транскрипційну відповідь при адаптації до глюкози.

A

Субстрат	1% Mth			1% Mth +2DOG			1% Glc			0,1% Glc			1% Sucr			0,1%Sucr			1% Eth			0,2% Eth		
	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01	1.0	0.1	0.01			
WT																								
$\Delta mig1$																								
$\Delta mig2$																								
$\Delta mig1 \Delta mig2$																								
$\Delta tup1$																								

B

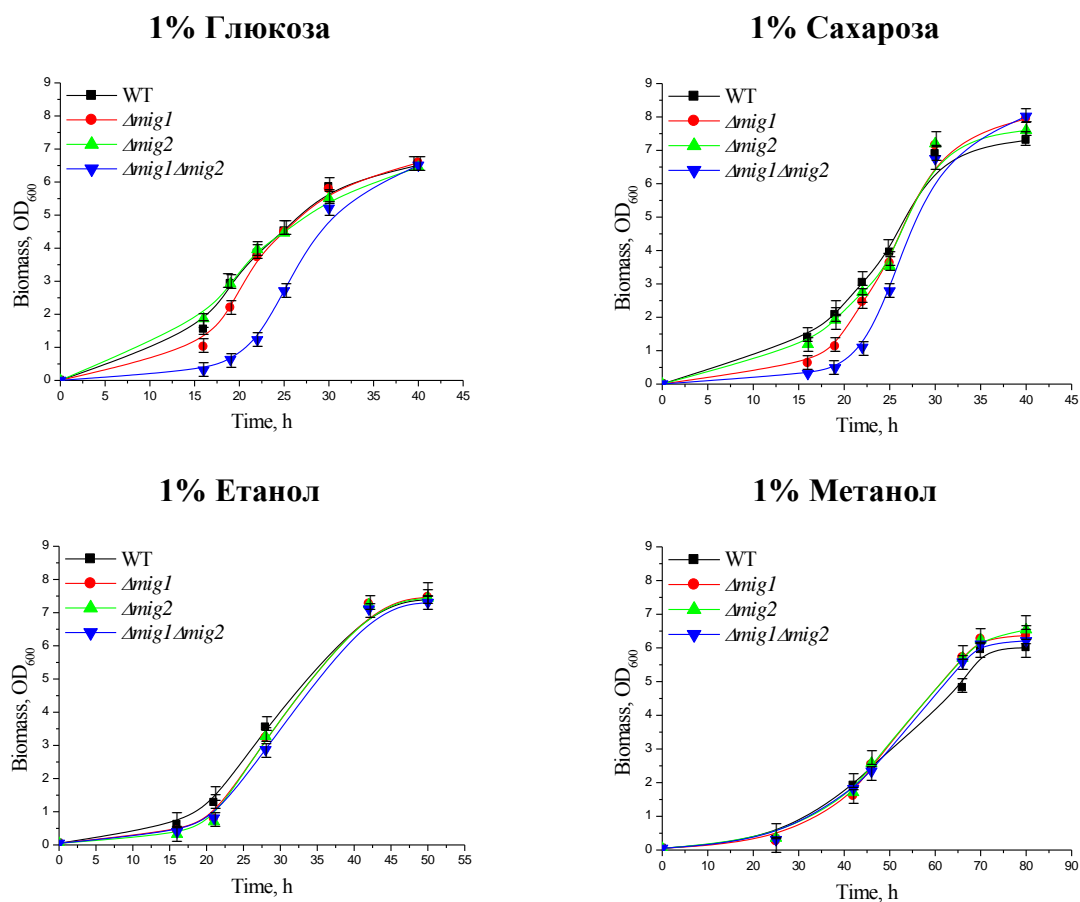


Рис. 3.2.2. Ростиві характеристики мутантів *mig1/2* *H. polymorpha* на різних джерелах карбону. **(A)** Рівні об'єми вирощеної у середовищі YPS клітинної суспензії були нанесені у трьох розведеннях на агаризовані середовища. Скорочення назв субстратів: Mth – метанол, Glc – глюкоза, Sucr – сахароза, Eth – етанол. Клітини інкубували впродовж одного дня на субстратах-цукрах, два дні на метанолі чи етанолі і три дні на 2-ДГ(DOG)-вмісному середовищі **(B)** кінетики росту у рідкій культурі. Клітини вказаних штамів переносились з YPS на мінеральні середовища з різними джерелами карбону. OD₆₀₀ визначали у визначених часових точках після перенесення.

Для подальшого з'ясування функції *HpMig1*, *HpMig2* і *HpTup1* у механізмі репресії було визначено рівні білка пероксисомної АОХ за різних умов. Спостерігалось достатньо помірне порушення репресії АОХ для мутантів $\Delta mig1$, $\Delta mig1\Delta mig2$ і $\Delta tup1$, інкубованих з низькою (0,1%) чи високою (1%) концентраціями глюкози (Рис. 3.2.3). Описаний вище мутант $\Delta gcr1$, який характеризується значним пошкодженням глюкозної репресії, виступав як позитивний контроль. Цікаво, 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 (Рис. 3.2.3). Цей факт вказує на те, що певні компоненти індукції транскрипції активуються для синтезу АОХ за таких умов і таким чином можна пояснити здатність мутантів рости на метанолі за наявності 2-ДГ (Рис. 3.2.2).

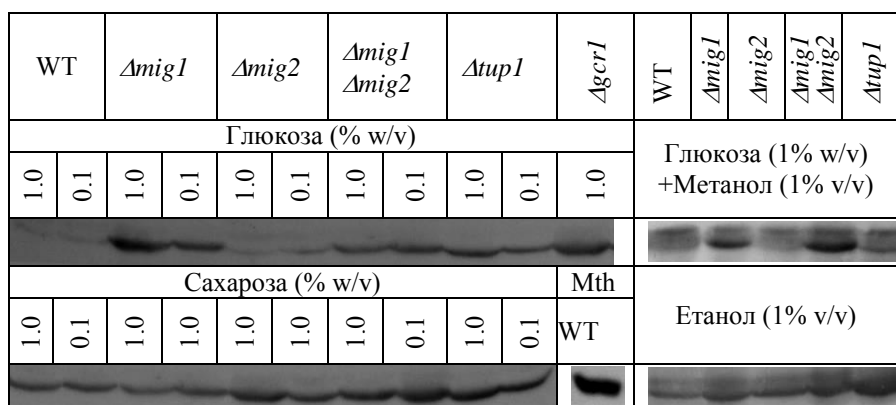


Рис. 3.2.3. Аналіз рівня АОХ при інкубації штамів дикого типу *H. polymorpha* і мутантних штамів на різних джерелах карбону. Клітини вказаних штамів були перенесені з багатого середовища YPS на мінеральні середовища з різними джерелами карбону (концентрації є зазначені), та інкубовані 6 годин. В лунки ПААГ вносили по 100 мкг ТХО екстрактів культур, вирощених на середовищі з глюкозою, сахарозою та етанолом штамів $\Delta mig1$, $\Delta mig2$, $\Delta mig1\Delta mig2$, $\Delta tup1$ та по 10 мкг екстрактів культури штаму $\Delta gcr1$, вирощеного на середовищі з глюкозою. По 50 мкг культури клітин, вирощених на суміші метанолу та глюкози, вносились на доріжку. 5 мкг культури клітин штаму дикого типу, вирощеного на середовищі з метанолом, (WT – дикий тип, Mth – метанол), вносили в лунки ПААГ, і використовували як порівняльний контроль. АОХ візуалізували методом Вестерн-блотингу зі специфічними анти-АОХ антитілами.

При цьому рівень білка АОХ у подвійного мутанта $\Delta mig1 \Delta mig2$ на суміші обох джерел карбону був значно нижчим, порівняно з клітинами $\Delta gcr1$, вирощеними на глюкозі, чи клітинами дикого типу, вирощеними на метанолі (Рис. 3.2.3). Аналогічно, синтез АОХ у $\Delta mig1$, $\Delta mig2$, а також у подвійного мутанта $\Delta mig1 \Delta mig2$ і клітинах $\Delta tup1$ був незначно дерепресований у середовищі з сахарозою чи етанолом (Рис. 3.2.3), підтверджуючи обмежене чи непряме залучення аналізованих генів у шлях репресії у *H. polymorpha*. Ми також виключили деградацію пероксисом як фактор, що може впливати на рівень білка АОХ у клітинах мутантів, вирощених на мультикарбонних субстратах, оскільки пексофагія є блокованою (*tup1*), або порушеною (*mig*) у цих штамів (див. нижче).

Раніше було продемонстровано, що репресор транскрипції *Tup1* *H. polymorpha* є необхідним для макропексофагії у цих дріжджів [152]. Логічним кроком було в'яснити, чи передбачувані партнери *HpTup1* у регуляції транскрипції, *HpMig1* and *HpMig2*, також впливають на цей процес. Детальний аналіз кінетики пексофагії за допомогою моніторингу рівня білка АОХ виявив, що швидкість його деградації була сповільненою у клітинах *mig* мутантів, вирощених у середовищі з метанолом та перенесених у середовище з глюкозою чи етанолом (Рис. 3.2.4А).

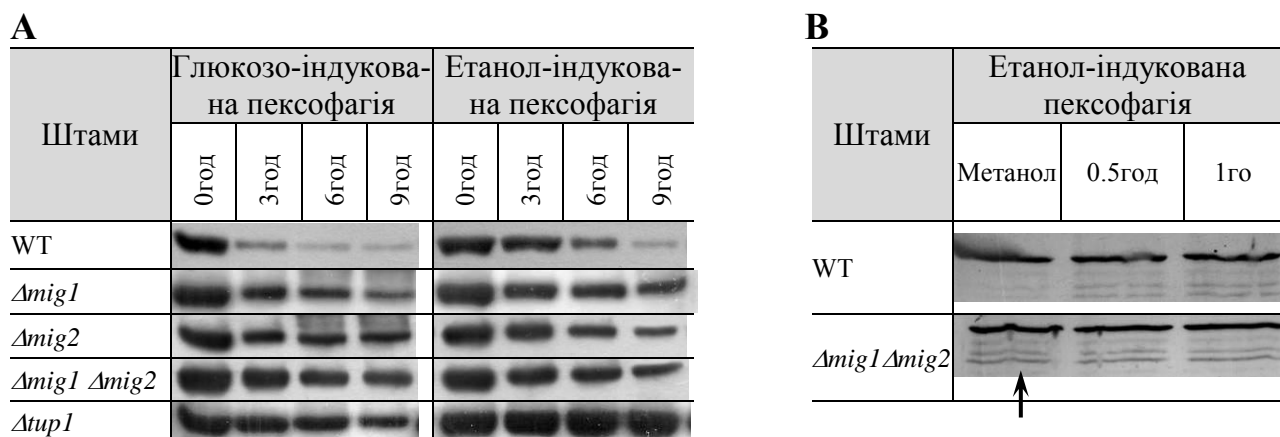


Рис. 3.2.4. Кінетичний аналіз пексофагії у *mig* мутантів. Індуковані метанолом клітини переносили у середовище з глюкозою або етанолом для індукції пексофагії. Білок АОХ детектували за допомогою Вестерн-блот аналізу зі специфічними антитілами у вказані моменти часу. **(А)** Кінетика деградації АОХ, індукована глюкозою чи етанолом. **(В)** 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 $\Delta mig1 \Delta mig2$.

Варто при цьому зауважити, що за допомогою Вестерн-блот аналізу продемонстровано, що у вирощених на метанолі клітин $\Delta mig1\Delta mig2$, спостерігались білкові смуги, які відповідали надлишковій деградації АОХ і були відсутні у штаму дикого типу (Рис. 3.2.4Б). Ці дані свідчать, що пексофагія не є повністю заблокованою у $\Delta mig1\Delta mig2$. Електронно-мікроскопічне та імуноцитологічне дослідження вирощених на метанолі і перенесених у середовище з етанолом клітин $\Delta mig1\Delta mig2$ (проведене у співпраці з групою проф. М. Veenhuis) виявило, що пероксисоми справді зазнають деградації і білок АОХ може бути виявлений у просвітах вакуоль (Рис. 3.2.5В).

Неочікуваним виявилось те, що у той час як у контрольного штаму дикого типу органели деградували стандартним шляхом макропексофагії, у клітинах $\Delta mig1\Delta mig2$ типове для цього процесу оточення подвійними мембранами органел, що підлягають деградації, спостерігалась вкрай рідко (Рис. 3.2.5Б). Натомість численною та помітною була поява вип'ячувань вакуоль, які оточували кластери пероксисом, і є морфологічно характерними для мікропексофагії (Рис. 3.2.5А).

3.2.4. Конструювання делеційних штамів за генами *HAP4-A*, *HAP4-B*, подвійного делеційного мутанта та аналіз їхніх фенотипів

Як детально описано у розділі 1.1, тоді як пекарські дріжджі *S. cerevisiae* є в основному ферментуючим видом, більшість інших дріжджів здатні і до дихання, і до бродіння залежно від умов навколишнього середовища та не ферментують за аеробних умов (є Crabtree-негативними). У *S. cerevisiae* експресія більшості генів контролюється приблизно 200-ма ієрархічно підпорядкованими транскрипційними факторами. Такі глобальні регулятори модулюють експресію генів відповідно до зовнішніх стимулів, діючи або безпосередньо на промотори регульованих генів, або через інші білки-трансактиватори.

Одним із таких ключових регуляторів є *Hap4*, транскрипційний активатор *HAP* комплексу [383], який контролює переключення процесів дихання та бродіння, приєднуючись до ССААТ послідовностей у промоторах генів-мішеней [384], [385].

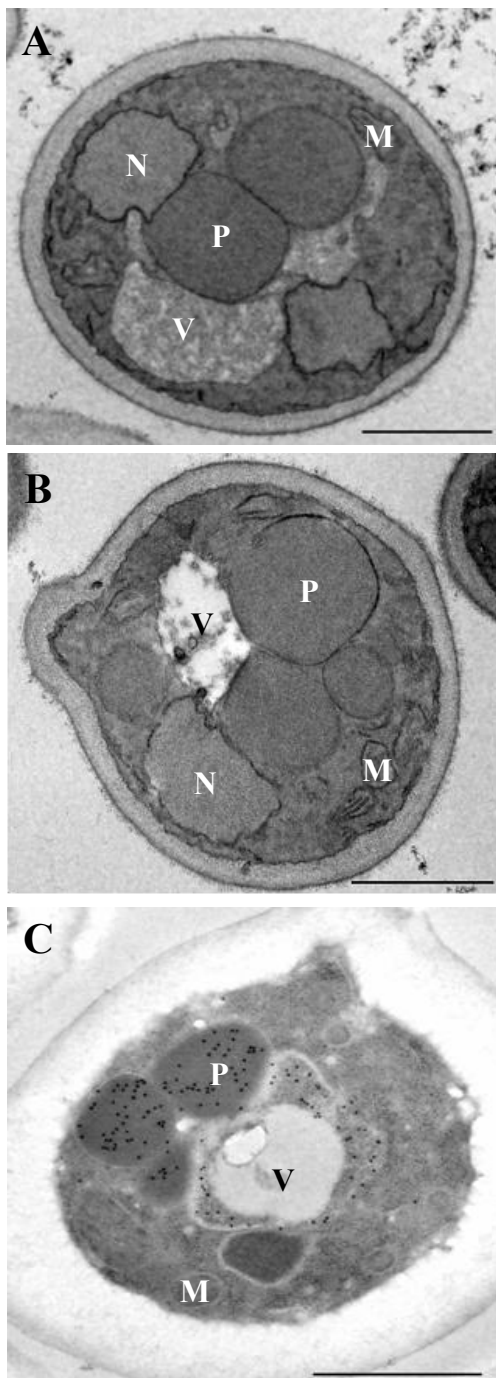


Рис. 3.2.5. Електронномікроскопічне дослідження морфологічних характеристик процесу пексофагії у $\Delta mig1\Delta mig2$ мутанта *H. polymorpha*. Клітини $\Delta mig1\Delta mig2$, вирощені на метанолі, були перенесені на 1 год у середовище з етанолом для індукції макропексофагії. **(А)** Позначені стрілками пероксисоми, оточені мембранними виступами вакуоль, вказують на активацію мікроавтофагії. **(В)** Стрілка вказує на пероксисому, оточену додатковими шарами мембран, замикання яких є незавершеним. **(С)** 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, **В** – вакуоля, **Р** – пероксисома, **Н** – ядро. Масштабна лінійка відповідає 1 мкм.

Незважаючи на те, що корові ДНК-зв'язуючі компоненти цього комплексу, Нар2, Нар3 і Нар5, є висококонсервативними в еукаріотів [386], це не стосується білка Нар4, який початково був ідентифікований лише у *S. cerevisiae* та *K. lactis*. Ґрунтуючись на короткій консервативній 16 амінокислотній N-кінцевій ділянці, названій N-Нар4, були ідентифіковані гіпотетичні ортологи Нар4 у інших видів аскоміцетів, та розділені на два підкласи [387], [388]. Було виявлено, що білки Нар4 з видів, філогенетично більш віддалених від *S. cerevisiae*, містять додатковий ДНК-

зв'язуючий мотив, названий основною «лейциновою застібкою» (leucine zipper, b-Zip) [329]. b-Zips є спільними для цих білків та родини транскрипційних факторів, представленими у *S. cerevisiae* білком Yap1, який містить також характерний, так званий цистеїн-багатий мотив (cysteine rich motif, CRM).

Аналіз геному *H. polymorpha* виявив, що ці дріжджі також мають два типи Nap4 гомологів (з чи без b-Zip ділянки). Їх схематичне представлення подане на Рис. 3.2.6. Раніше Проф. М. Bolotin-Fukuhara зі співавторами було продемонстровано, що HpNap4-A *H. polymorpha*, який містить тільки N-Nap4 ділянку, є функціонально схожий до аналога *S. cerevisiae* (ScNap4): він відновлював у гетерологічному хазяїні *S. cerevisiae* $\Delta hap4$ ріст на глюконеогенетичних субстратах, був здатний взаємодіяти з білками NAP комплексу та індукувати експресію мішені ScNap4 – *CYC1* [389].

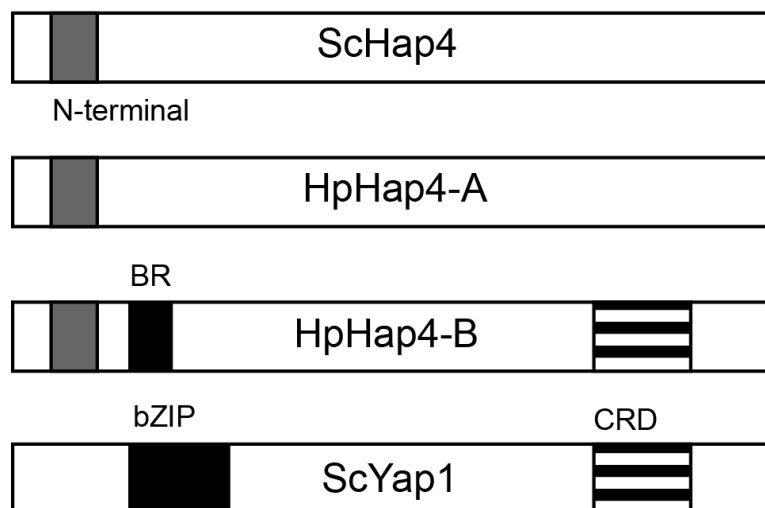


Рис. 3.2.6. Схематичне зображення Nap4 і Yap1. Білки Nap4 і Yap1 *S. cerevisiae* і два гомологи HpNap4-A та HpNap4-B *H. polymorpha* подані схематично один відносно одного. Основні ділянки позначені сірим кольором (N-Nap4), чорним (bZip чи BR ділянка; де BR – ДНК- зв'язуюча частина bZip ділянки), і смугастим (CRD чи cysteine rich domain (цистеїн-багатий домен)), див. основний текст.

Пізніше було встановлено, що інший гомолог HpNap4-B, який містить додатковий b-Zip мотив, може лише частково комплементувати дефекти *S. cerevisiae* $\Delta hap4$ [329]. Порівняння послідовності Nap4 гомологів на Рис. 3.2.7 демонструє, що N-Nap4 ДНК-зв'язуюча ділянка є строго консервативною у різних видів дріжджів.

комплементувати дефекти *S.cerevisiae* $\Delta hap4$ [329]. Порівняння послідовності *Hap4* гомологів на Рис. 3.2.7 демонструє, що N-*Hap4* ДНК-зв'язуюча ділянка є строго консервативною у різних видів дріжджів.

Для подальшого з'ясування фізіологічних функцій і відмінностей між двома типами *Hap4*-подібних білків *H. polymorpha*, на основі штаму дикого типу NCYC495 *leu1-1* були сконструйовані делеційні мутанти по відповідних генах, як описано у розділі «Матеріали і Методи». Зокрема вивчали роль відповідних білків у регуляції утилізації різних джерел карбону і катаболітній репресії.

Спочатку було проаналізовано, яким чином делеція двох гомологів *HAP4* у *H. polymorpha* впливає на ріст на глюконеогенетичних (дихальних) субстратах у порівнянні із гліколітичними субстратами карбону. Виявлено, що делеційним мутантам не притаманний жодний виражений фенотип щодо росту на різних джерелах карбону, включаючи ті, що вимагали реакцій глюконеогенезу для їхнього використання (Рис. 3.2.8).

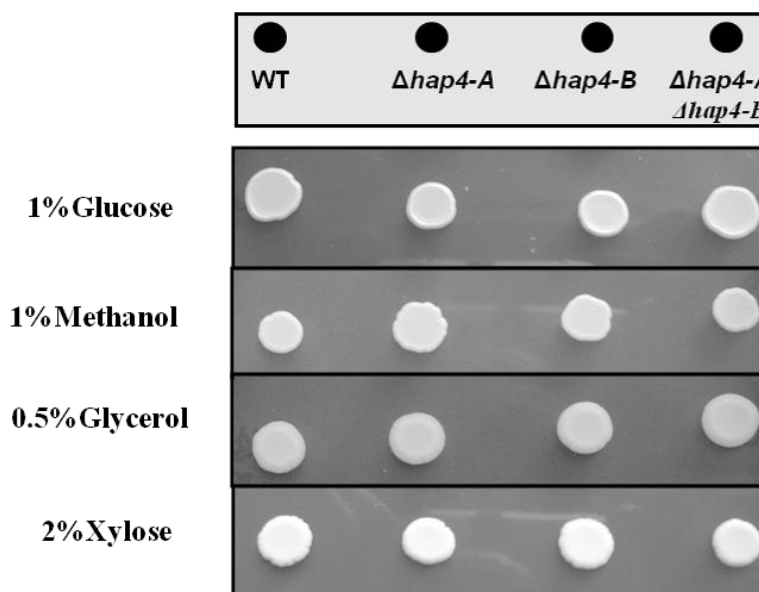


Рис. 3.2.8. Аналіз росту мутантів $\Delta hap4-A$, $\Delta hap4-B$ і подвійного нокаутного штаму *H. polymorpha* на агаризованих середовищах з доданими альтернативних джерел карбону. Клітини попередньо вирощували у YPS рідкому середовищі і потім розсівали у рівній густині на чашки з визначеними джерелами карбону.

Таким чином, на противагу *S. cerevisiae*, у *H. polymorpha*, очевидно, ні мутації *hap4-A*, ні *hap4-B* не впливали на регуляцію глюконеогенезу, а отже на

нормальний ріст на метанолі, гліцеролі чи етанолі. Подібно до штаму дикого типу вони росли також на цукрах глюкозі, сахарозі і ксилозі. Цей результат передбачає суттєві відмінності функцій гомологів *Hap4* різних видів дріжджів, зокрема у факультативних проти облігатних аеробів.

Також було досліджено питання, як делеції *HAP4-A* чи *HAP4-B* впливають на резистентність клітин до інгібування дихання. Було показано, що ріст штаму $\Delta hap4-A$ чи подвійного мутанта пошкоджується антимицином А, відомим інгібітором перенесення електронів від хінону до цитохрому *b* у мітохондріях. Контрольний штам дикого типу, а також $\Delta hap4-B$ нормально росли за таких умов. Крім цього, мутант $\Delta hap4-B$ і подвійний делеційний штам були більш чутливими до пероксиду гідрогену, тоді як штам $\Delta hap4-A$ ріс подібно до контрольного штаму. Таким чином, отримані результати чітко вказують на різні функції двох гомологів *Hap4*, один з яких пов'язаний з карбоновим та енергетичним метаболізмом, а інший залучений у регуляцію оксидативного стресу.

При цьому неочікувано виявилось, що мутація *hap4-A* очевидно приводить до пошкодження глюкозної катаболітної репресії і забезпечує помітний ріст на метанолі за наявності 2-дезоксиглюкози (Рис. 3.2.9).

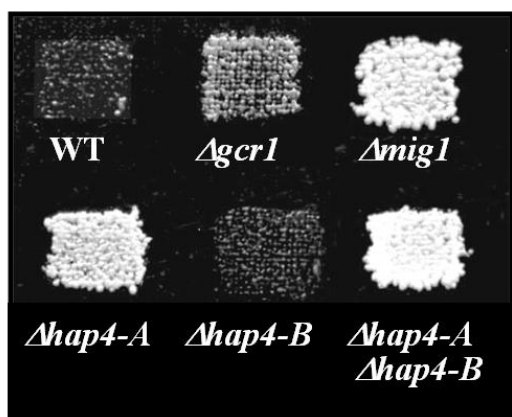


Рис. 3.2.9. Мутація *hap4-A* викликає пошкодження глюкозної репресії. Клітини попередньо вирощували на агаризованому середовищі YPS і переносили методом реплік на середовище YNB з 1% метанолом і 150 г/л 2-ДГ. Фотографії були зроблені після двох днів інкубації. Зверніть увагу, що мутант *gcr1* проявляє за цих умов відносно слабший ріст внаслідок дефекту утилізації метанолу як джерела карбону (див. також розділ 3.1.).

Для встановлення механізму участі *HAP4-A* у цьому процесі необхідні додаткові дослідження. Варто зауважити, що відносно повільніший ріст $\Delta gcr1$

порівняно з $\Delta mig1$ і $\Delta hap4$ -А та подвійним мутантом $hap4$ на середовищі з 2-ДГ, очевидно обумовлений специфічним порушенням використання метанолу у $\Delta gcr1$ (див. також розділ 3.1 вище). При цьому не спостерігалось жодних явних порушень пексофагії у проаналізованих $hap4$ мутантів.

3.2.5. Обговорення

У цьому розділі викладено результати дослідження ролі раніше неохарактеризованих транскрипційних репресорів *H. polymorpha*, гомологічних до білків Mig1 і Hap4 *S. cerevisiae*, у катаболітній регуляції і утилізації джерел карбону.

Продемонстровано, що шлях транскрипційної репресії пероксисомної АОХ у цих дріжджів лише частково залежить від двох гомологів Mig1, незалежно від ефекторного джерела вуглецю (глюкоза, сахароза чи етанол). Однак, додавання індуктора метанолу підвищує рівень білка АОХ у подвійного мутанта $\Delta mig1 \Delta mig2$, інкубованого з глюкозою (Рис. 3.2.4), вказуючи на так званий «індукований» (залежний від присутності індуктора АОХ метанолу) фенотип цього мутанта [390].

У *S. cerevisiae* Mig1 в присутності глюкози сприяє зв'язуванню основного комплексу репресорів Tup1-Ssn6 до промоторів генів-мішеней [47], [391]. При цьому Tup1 є залучений у плейотропні функції через взаємодію із численними специфічними для кожного функціонально-пов'язаного набору генів ДНК-зв'язуючими білками [392], тоді як Mig1-залежна регуляція є більш специфічною із вужчим набором генів-мішеней, що включають також репресовані глюкозою [393]. Таким чином, наші результати узгоджуються з попереднім спостереженням, що $HpTup1$ не є необхідним для репресії глюкозою пероксисомних ферментів [151]. Таким чином можна припустити, що функціонування класичного для *S. cerevisiae* шляху з Mig1/2-опосередкованим Tup1-Ssn6 зв'язуванням з репресованими промоторами є у *H. polymorpha* малоімовірним. Тим не менше, надлишкову функцію цих репресорів не можна виключити і ефект поєднання всіх трьох мутацій в одному штамі видається цікавим для подальшого вивчення.

Альтернативним поясненням є участь у шляху репресії інших невідомого(их) поки репресора(ів). Необхідно також дослідити, чи проаналізовані мутації впливають на регуляцію інших глюкозо-репресибельних генів у *H. polymorpha*, наприклад мальтази, регуляція якої вважалась Mig-залежною [394].

Дані про те, що мікропексофагія в *H. polymorpha* [219] і *P. pastoris* [198] чутлива до циклогексеміду, свідчать про те, що вона залежить від синтезу білка *de novo*, і, відповідно, регуляції транскрипції. Як уже згадувалося, спектр плейотропних функцій Tup1 у дріжджів був раніше розширений до регуляції макропексофагії [152].

Наші результати свідчать, що ефект делеції Tup1 на пексофагію у *H. polymorpha* не імітується делеціями гомологів *HpMig1/2*. У мутанта *tup1* макропексофагія повністю заблокована, тоді як мікропексофагія відбувається подібно до штаму дикого типу у відповідь на голодування по нітрогену, але не при перенесенні клітин на альтернативне джерело карбону [152]. Незважаючи на те, що макропексофагія є порушеною у делеційного штаму *mig1Δmig2*, мікропексофагія, є очевидно конститутивно індукованою. Цей фенотип нагадує спостережений у мутанта *Δatg25 H. polymorpha*, що також виявляє конститутивну мікроавтофагію на фоні блокування макропексофагії [219]. Ця очевидна схожість фенотипів мутантів *Δmig1Δmig2* і *Δatg25* вказує на те, що синтез певних специфічних для макропексофагії компонентів може бути пригніченим за відсутності репресорів Mig1/2. Отже, репресори Mig1/2 можуть бути позитивними регуляторами макропексофагії. Щодо контролю мікропексофагії, Mig1/2 і Tup1 мають відмінні ролі залежно від умов навколишнього середовища: Mig білки можуть бути негативними регулятором мікропексофагії, тоді як Tup1, очевидно, діє як позитивний регулятор. Ймовірна гіпотетична модель, яка пояснює таку регуляцію, представлена на Рис. 3.2.10. Для з'ясування деталей встановлених нами ефектів необхідні подальші дослідження.

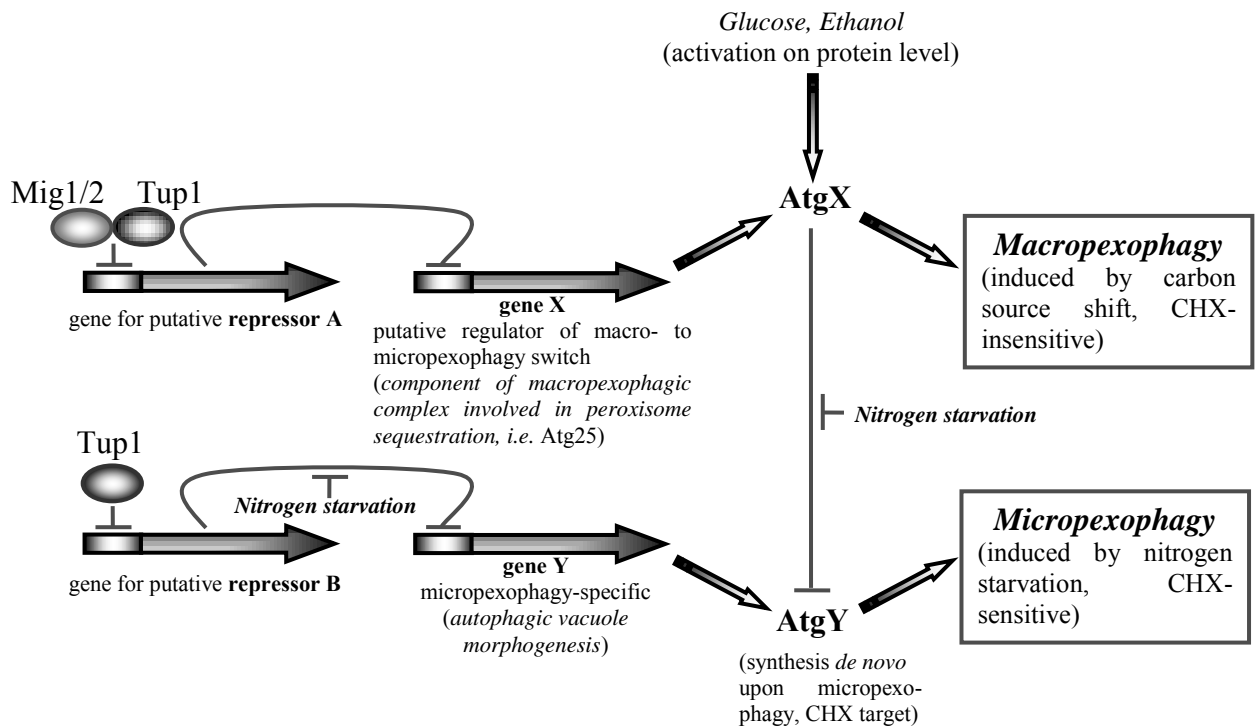


Рис. 3.2.10. Гіпотетична модель залучення *HpMig*- і *HpTup1*-опосередкованої транскрипційної регуляції у пексофагію у *H. polymorpha*. Припускається, що певні компоненти специфічного для макропексофагії апарату (як *HpAtg25*) можуть бути негативними регуляторами мікропексофагії. *Mig1/2* і *Tup1* є непрямыми позитивними регуляторами таких гіпотетичних білків (*AtgX*), які активуються посттрансляційно ефекторами макропексофагії, глюкозою та етанолом, й інгібують гіпотетичний компонент мікропексофагії *AtgY*. Рівень *AtgX* у відсутність чи *Mig1/2* чи *Tup1* знижується. Голодування по нітрогену викликає позитивну регуляцію *AtgY*, індуюючи його експресію і репресуючи макропексофагію на рівні білка. У відсутність *Tup1*, але не *Mig1/2*, мікропексофагія відбувається тільки при голодуванні за нітрогеном. Ми припускаємо, що *AtgY* може бути залучений у розвиток мікроавтофагійних вакуоль. CHX – циклогексемід.

Нами також встановлено, що два ідентифікованих у геномі *H. polymorpha* імовірні паралоги транскрипційного репресора *Hap4*, позначені як *HpHap4-A* і *HpHap4-B*, мають не взаємодоповнюючі (redundant), а радше спеціальні функції. Зокрема вивчення фенотипів сконструйованих нами делеційних мутантів *H. polymorpha* виявило, що $\Delta hap4-A$ був гіперчутливий до антиміцину А і SHAM – інгібіторів різних компонентів дихального ланцюга. Мутація $\Delta hap4-B$ не впливала

на ці процеси, але викликала гіперчутливість до оксидативного стресу, спричиненого H_2O_2 . Таким чином, *HpNar4-A* є функціональним відповідником *ScNar4*, оскільки є необхідним для процесів дихання і окисного фосфорилування. На противагу, *HpNar4-B* виявляє функціональну спорідненість до *ScYap1*, залученого у відповідь на оксидативний стрес, що добре узгоджується з його здатністю функціонально замінювати *ScYAP1* [329]. Також встановлено, що делеція двох *HAP4* гомологів у *H. polymorpha* не впливала на ріст на глюконогенетичних субстратах. Таким чином, отримані результати вказують на дивергентні функції гомологів *Nar4* у різних видів дріжджів, зокрема у факультативних та облігатних аеробів. Слід також відзначити, що *Δhap4-A* мутація викликала резистентність до 2-дезоксиглюкози при рості у середовищі з метанолом, вказуючи на участь *HpNar4-A* (але не *HpNar4-B*) репресора в механізмі глюкозної репресії у цих дріжджів. Встановлення молекулярної ролі *Nar4-A* у цьому процесі потребує подальших експериментальних досліджень. Також показано, що жоден із *Nar4* гомологів *H. polymorpha* не бере участі в механізмі пексофагії.

3.2.6. Підсумки

У пекарських дріжджів транскрипційні репресори *ScMig1* і *ScMig2*, разом із загальним репресором *ScTur1* беруть участь у основному шляху глюкозної репресії транскрипції генів. У цій дисертаційній роботі нами вперше встановлено, що пошкодження гомологів цих репресорів у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* незначно впливає на індуковану цукрами чи етанолом катаболітну репресію пероксисомних ферментів. Також виявлено, що у клітинах подвійного делеційного мутанта *H. polymorpha Δmig1Δmig2* спостерігається пошкодження макропексофагії, тоді як мікропексофагія стає домінантним механізмом автофагійної деградації. Отримана нами дані підтверджують, що гомологи елементів основного шляху репресії *S. cerevisiae* мають у *H. polymorpha* плейотропні та спеціалізовані функції. Таким чином, механізми передачі сигналу

глюкози у катаболітній репресії суттєво відрізняється у пекарських і метилотрофних дріжджів.

У геномі *H. polymorpha*, використовуючи гомологію консервативних ДНК-зв'язуючих доменів, ідентифіковано два гіпотетичні гени-ортологи, які кодують білок Nap4 *S. cerevisiae*, залучений у транскрипційну регуляцію метаболічного балансу між бродінням і диханням, названих *HpNap4-A* і *HpNap4-B*. Аналіз сконструйованих делеційних мутантів за цими генами підтвердив, що *HpNAP4-A* бере участь у контролі балансу дихання/бродіння, тоді як *HpNAP4-B* залучений у відповідь на оксидативний стрес. Окрім цього, *HpNAP4-A* є залученим до глюкозної репресії, але не індукованої глюкозою пексофагії. Ці дані підтверджують, що функція Nap4-подібних транскрипційних регуляторів у Кребтрі-негативних дріжджів, зокрема *H. polymorpha*, є відмінною від встановленої для відповідника Nap4 *S. cerevisiae*.

Результати розділу 3.2 опубліковані у 2 статтях [153], [395].

3.3. Ідентифікація і аналіз молекулярних компонентів селективної деградації перекисом (пексофагії) у метилотрофних дріжджів

Метанол-індуковані пероксисоми в метилотрофних дріжджів зазнають активної деградації при зміні умов культивування, наприклад, при перенесенні клітин на глюкозу чи етанол, коли органели стають зайвими для фізіологічного росту. У дріжджів *H. polymorpha*, регульована карбоновими субстратами деградація пероксисом є швидким і селективним процесом, за основним механізмом, подібним до макроавтофагії, описаної для клітин ссавців [396]. Слід зазначити, що для споріднених метилотрофних дріжджів *P. pastoris* характерні два типи селективної деградації пероксисом, які залежать від субстрату-індуктора, але можуть також відбуватись одночасно в певних умовах. Перенесення клітин *P. pastoris* з метанолу на етанол призводить до деградації індивідуальних пероксисом за механізмом макропексофагії, подібним до того, що спостерігається

у *H. polymorpha*. У свою чергу, індукція глюкозою призводить до деградації цілих кластерів пероксисом після їх поглинання виступами вакуоль – процесу за механізмом аналогічного до мікроавтофагії у клітинах ссавців [198], [397]. Численні мутанти *H. polymorpha* і *P. pastoris* з пошкодженою деградацією пероксисом були ізольовані і охарактеризовані у декількох лабораторіях [337], [397], [398]. Цей розділ присвячений опису експериментальної роботи, спрямованої на ідентифікацію, фенотиповий аналіз, молекулярне клонування і встановлення функціональної ролі декількох раніше невідомих генів, залучених у процес пексофагії у метилотрофних дріжджів, головним чином в *P. pastoris*.

3.3.1 Клонування і функціональний аналіз гена *VPS15* дріжджів *P. pastoris* і його білкового продукту

Один із мутантів *H. polymorpha* з пошкодженою деградацією пероксисом *pdd1*, ідентифікований групою проф. Мартіна Венхауза (Університет м. Гронінгена, Нідерланди), характеризувався порушеннями ранньої стадії макропексофагії, а саме оточення органел аутофагосомними мембранами [399]. Білковий продукт гену *HpPDD1* виявляв високу подібність до амінокислотної послідовності *Vps34 S. cerevisiae*, – білка, необхідного для сортирування білків до вакуоль [400] та ендоцитозу [401]. Також було відомо, що у *S. cerevisiae* функціонування *ScVps34* залежить від активації кіназою *ScVps15* [402], [403].

Внаслідок випадкової наявності ймовірного гомолога *ScVPS15* на векторі з банку генів поряд із раніше клонованим геном *PEX2 P. pastoris* [330], стало можливим перевірити, чи є також *Vps15* важливим для селективної деградації пероксисом у метилотрофів. Повну послідовність *PpVPS15* було ідентифіковано та клоновано з банку генів *P. pastoris* методом покрокового ПЛР аналізу («chromosome walking») як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Встановлено, що секвенована повна відкрита рамка зчитування гена *VPS15* становить 4023 п.н. і відповідно кодує поліпептид, що складається з 1340 амінокислот. Передбачувана первинна послідовність *PpVps15* виявляла 32% ідентичності та 50% подібності до *ScVps15* [332], а також 29% ідентичності та 49%

подібності до гомолога *VPS15* людини, білка p150 [404]. Порівняння імовірних первинних послідовностей трьох білків виявило три консервативні фрагменти (Рис. 3.3.1). Так N-кінцевий район кожного білка (амінокислоти 27–305 у *PpVps15*) містить каталітичний домен, спільний для родини серин/треонінових кіназ (Рис. 3.3.1А; [405]). Залишок лізину у цьому ділянці (*PpK149*) є консервативним серед всіх відомих серин/треонінових кіназ, тоді як залишок аспарагінової кислоти (*PpD147*) і лізину (*PpK54*) є частиною ймовірного АТФ-зв'язуючого сайту(сайтів), а також є консервативними як в серин/треонінових, так і в тирозинових кіназах [405]. Заміна будь-якого із трьох амінокислотних залишків *ScVps15* призводила до зниження ферментативної активності і неправильного сортування низки вакуолярних ферментів [406]. Крім того, консервативний залишок гліцину в другому положенні *PpVps15* може слугувати сайтом міристилювання, як це відбувається в *ScVps15*.

Другий консервативний район (а/к 540–670 *PpVps15*) містить потенційний трансмембранний домен (у *PpVps15* залишки 587–605, Рис. 3.3.1 В) і, як припускається, відіграє важливу роль у каталітичній функції та коректній внутрішньоклітинній локалізації *Vps15*. І, нарешті, С-кінцевий фрагмент, що містить 30 амінокислот, виявляє високий ступінь консерватизму (Рис. 3.3.1 С). Цей район включає потенційний сайт фосфорилування, необхідний для функціонування *ScVps15* при підвищеній температурі [406]. Отже, високий ступінь консерватизму первинної структури, і, зокрема, специфічних функціональних доменів, свідчать про те, що клонований ген є структурним гомологом *ScVPS15* у *P. pastoris*.

З метою встановлення ролі *PpVPS15* у процесі деградації пероксисом, був сконструйований делеційний мутантний штам *Δvps15*, як описано у розділі «Матеріали і Методи». Прототрофні за аргініном трансформанти делеційною касетою відбирали на середовищі YND з гістидином і піддавали скринінгу для виявлення тих, у яких ген *PpVPS15* було делетовано (*Δvps15*), шляхом тестування на чутливість росту до підвищеної температури 37°C, – попередньо описаного фенотипу *Δvps15* мутанта *S. cerevisiae* [332]. Дійсно, було ідентифіковано декілька температуро-чутливих колоній.

Для підтвердження делеції *PpVPS15* з відповідних трансформантів було виділено геномну ДНК і використано її як матрицю у ПЛР з двома наборами олігонуклеотидних праймерів (Табл. 3.3.1, Рис. 3.3.1А) та Саузерн-блот аналізу, як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Встановлено, що ріст клітин *Δvps15* на агаризованому середовищі з метанолом був ідентичний до штаму дикого типу, що вказує на те, що *PpVps15* не є необхідним для біогенезу цих органел. З метою аналізу ефективності пексофагії, колонії *Δvps15* були перенесені на метанол-вмісне середовище YNM та інкубовані протягом 1,5 днів для індукції АОХ. Потім колонії були перенесені методом реплік на чашки з YND або YNE, що містили 1% (w/v) глюкози або 1% (v/v) етанолу, відповідно, для індукції деградації пероксисом. Після інкубації протягом 8 і 12 год, відповідно, у колоніях детектували активність АОХ шляхом нанесення на поверхню чашок реакційної сумішшю для визначення активності АОХ з дигітоніном як пермеабілізуючим агентом [337]. Було виявлено, що, на відміну від контрольного штаму дикого типу, клітини *Δvps15* демонстрували високу залишкову активність АОХ після перенесення на глюкозо- або етанол-вмісні середовища. Отже, цей попередній аналіз засвідчив, що, як і припускалось, *PpVPS15* ген є дійсно необхідним як для мікро-, так і макропексофагії.

Ці результати були додатково підтверджені в лабораторії партнера проекту, – професора М. Венхауза (M. Veenhuis, Університет Гронінгена, Нідерланди) шляхом визначення залишкової активності АОХ в безклітинних екстрактах клітин *Δvps15*, а також методом Вестерн-блот аналізу вмісту білка АОХ у клітинах, перенесених на субстрати – індуктори пексофагії. Електронно-мікроскопічне дослідження також не виявило у мутанта морфологічних ознак, характерних для раннього етапу деградації пероксисом у штаму дикого типу, як за наявності глюкози (мікропексофагії), так і етанолу (макропексофагія) (Рис. 3.3.2).

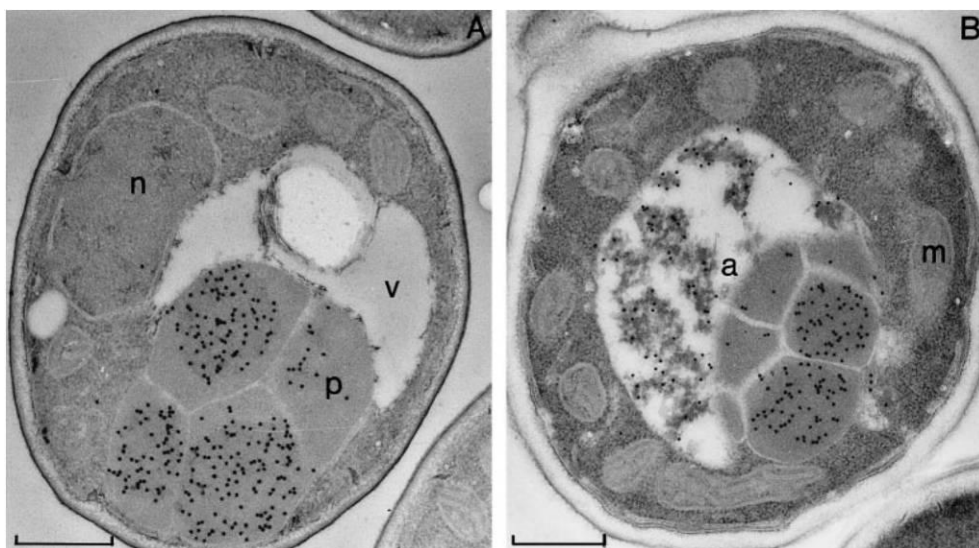


Рис. 3.3.2. Імуноцитохімічний аналіз локалізації АОХ у мутанта *Δvps15 P. pastoris* (А) або штаму дикого типу (WT) (В). Зразки відбирали після 2 год інкубації індукованих метанолом клітин з етанолом. У *Δvps15* мутанта сигнал мічення АОХ обмежений пероксисомами (А). Проте, у клітинах штаму дикого типу (WT) білок АОХ спостерігається як у пероксисомах, так і у вакуолях/аутофагосомах (В). Скорочення: а – аутофагосома; m – мітохондрія; n – ядро; p – пероксисома. Масштабний відрізок – 0,5 мкм.

3.3.2. 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 вкрай необхідним. Зелений флуоресцентний білок (GFP), що походить з біolumінесцентної медузи *Aequorea victoria*, виявився найбільш придатним рекомбінантним білком для цієї мети. Варто відзначити, що цей підхід для мічення пероксисом у дріжджів, був паралельно розроблений та впроваджений у декількох лабораторіях, зокерма і автором цієї дисертаційної праці.

Як описано у Розділі 1.2, білки пероксисом синтезуються на вільних полісомах і посттрансляційно доставляються до органел, що забезпечується присутністю у відповідних білків трьох відомих типів послідовностей доставки до пероксисом (peroxisomal targeting signals, PTS), консервативними для усіх еукаріотів – два для білків матриксу органел і третій для білків пероксисомних мембран або пероксинів [407]. Першим і найбільш розповсюдженим сигналом

PTS1 для пероксисомних білків є С-кінцева трипептидна послідовність «SKL» або її похідні варіанти [408], [409]. Другий сигнал, PTS2, є відносно менш поширеним і має консенсусну послідовність «RLX5H/QL», що розташовується поблизу N-кінця матриксних білків [410]. Сигнальною послідовністю для білків пероксисомної мембрани (targeting sequence for peroxisomal membrane proteins, PMPs) є внутрішня 20-амінокислотна послідовність, складена з гідрофільних амінокислот. Ці дані були використані нами для конструювання штамів *P. pastoris* з флуоресцентно (GFP)-міченими пероксисомами з використанням рекомбінантних форм GFP, кон'югованих з різними типами PTS.

Так був сконструйований вектор pOPGP-1, здатний експресувати локалізовану до пероксисом мутовану (red-shifted) форму GFP (E-GFP) під контролем промотора гену *PEX8* (P_{PEX8}) *P. pastoris* як описано у розділі «Матеріали і Методи». Також створено вектор, який кодує химерний білок, що складається з 460 N-кінцевих амінокислот пероксину Pex2 *P. pastoris*, злитого з N-кінцем EGFP і експресованного під контролем P_{AOX1} . Pex2 є інтегральним мембранним білком в *P. pastoris* та інших організмах [330] (див. «Матеріали і Методи»). І нарешті, вектор PTS2-EGFP, pTW65, що експресує химерний білок під контролем промотора ацил-СоА синтетази *P. pastoris*; був отриманий як дарунок від доктора С. Субрамані (Університет Каліфорнії, Сан-Дієго, Каліфорнія, США), і був раніше описаний в Elgersma et al (1998).

Отримані химерні GFP-конструкти були використані для аналізу нововиділених мутантів *P. pastoris*, дефіцитних за біогенезом пероксисом, тимчасово названих pexA, pexB і pexC [335]. Аналіз ефективності шляху сортигу PTS1 показав, що в EGFP-PTS1-експресуючих метанол-індукованих клітинах штаму дикого типу виявляється щільний кластер сильно-флуоресцентних пероксисом (Рис. 3.3.3А). Проте у всіх *pex* мутантів спостерігалася флуоресценція усєї цитоплазми (Рис. 3.3.3. D, G, J, та M), що свідчить про те, що цей шлях блоковано, і EGFP-PTS1 стає міс локалізованим внаслідок відповідних мутацій.

Дослідження функціонування PTS2 шляху проводили за допомогою аналізу внутріклітинної локалізації химерного білка PTS2-EGFP [411]. Флуоресцентна

мікроскопія PTS2-EGFP- експресуючих олеат-індукованих клітин кожного з *rex* мутантів виявила дифузну цитоплазматичну флуоресценцію, типову для PTS2-дефектних *rex* мутантів (Рис. 3.3.3, E, H, K, та N; [411]). Отже, як PTS1- так і PTS2-шляхи імпорту матриксних білків пероксисом виявились дефектними у нових генетичних групах *rex* мутантних.

Для вивчення функціонування mPTS шляху, химерний білок Rex2-EGFP експресували у кожному із аналізованих *rex* мутантів. Методом флуоресцентної мікроскопії в метанол-індукованих клітинах дикого типу була виявлена локалізація білка Rex2-EGFP в ділянці пероксисомних мембран, яка нагадувала яскраві кільця, що оточували ортанели (Рис. 3.3.3 C). В клітинах *rexA*, *rexC*, та контрольному *rex1* штаммах, вищеописана нормальна пероксисомно-мембранна флуоресценція не спостерігалася. Проте, більшість клітин містили одну або дві яскраві флуоресціюючі точкові структури (Рис. 3.3.3 F, L, and O). Такий патерн є типовим для пероксисомних залишків або «тіней», – імпорт-некомпетентних щодо матриксних білків везикулярних структур, які спостерігаються для більшості *rex* мутантів [412]. Це спостереження показало, що проаналізовані мутанти мають пероксисомні «тіні» і, що білок Rex2-EGFP власне розпізнає ці залишки. В *rexV* клітинах, флуоресценція також була локалізована у точкових структурах, але інтенсивність сигналу була значно нижчою, ніж в інших *rex* мутантів, цитоплазматична флуоресценція також була низької інтенсивності (Рис. 3.3.3.I).

Пояснення цього спостереження може полягати в тому, що *rexV* мутант є також частково дефектним по таргетингу PMPs, або кількість пероксисомних ремнантів є надто малою для того, щоб умістити весь Rex2-EGFP білок, присутній у цих клітинах. Загалом проведене вивчення клітин штаму дикого типу і мутантів довело, що нами успішно створено рекомбінатні конструкти для флуоресцентного мічення *in vivo* пероксисом у дріжджів.

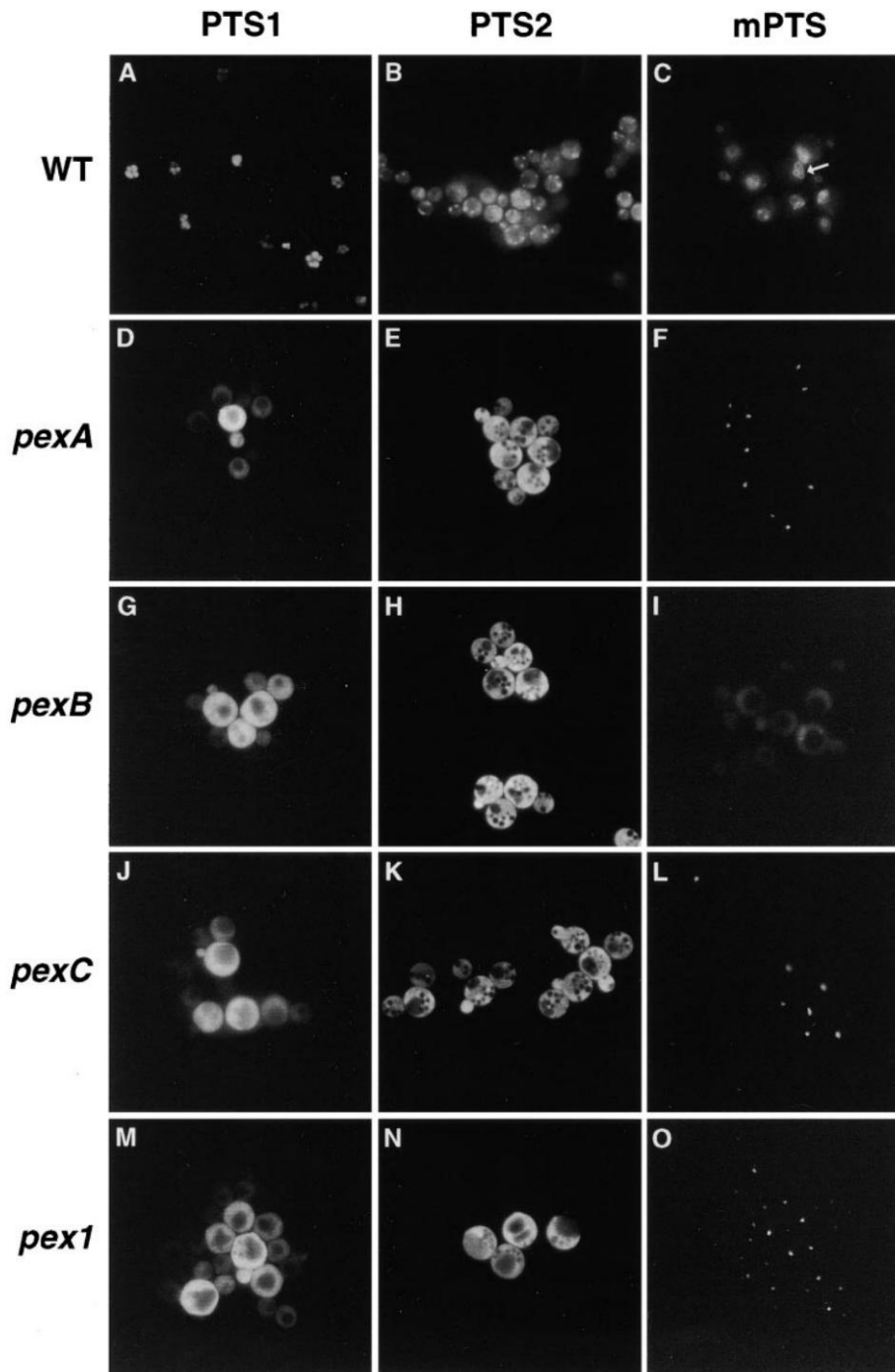


Рис. 3.3.3. Субклітинна локалізація пероксисомних EGFP-PTS1, PTS2-EGFP, і mPTS-EGFP у нових *pex* мутантів *P. pastoris*. (A, D, G, J, M) – при експресії EGFP-PTS1 та індукції метанолом видно кластери флуоресцентних пероксисом у клітинах дикого типу (A), у порівнянні з цитозольною флуоресценцією у мутантів *pexA* (D), *pexB* (G), *pexC* (J), *pex1* (M). (B, E, H, K, N) – при експресії PTS2-EGFP за індукції олеатом клітини штаму дикого типу (B) виявляли точкову (пунктатну) флуоресценцію, хоча і менш виражений, ніж у (A), у порівнянні із дифузним цитозольним сигналом у мутантів *pexA* (E), *pexB* (H), *pexC* (K), and *pex1* (N). (C, F, I, L, O) – при експресії mPTS-EGFP у метанол-індукованих клітинах штаму дикого типу спостерігали флуоресценцію пероксисомних мембран, що нагадує

кільця (С). Стрілкою відзначена клітина з чотирма такими кільцями. У клітинах мутантів *rexA* (F), *rexC* (L), і *rexI* (O) виявлено флуоресценцію, локалізовану у пероксисомних залишках, тоді як у *rexB* (I) спостерігається як цитозольна, так і пероксисомна локалізація флуоресцентного сигналу.

Такий підхід дає змогу аналізувати біогенез пероксисом і порушення сортиру білків, а також може бути застосований для подальшого спостереження за допомогою флуоресцентної мікроскопії долі органел в умовах селективної деградації пероксисом (див. Розділ 3.3.4 щодо відповідних прикладів, зокрема в рамках дослідження *pdg1* мутанта *P. pastoris*, дефіцитного за біогенезом та деградацією пероксисом).

3.3.3. Розробка методів моніторингу активності алкогольоксидази (АОХ) та пексофагії на чашках Петрі та клонування *ATG* генів у метилотрофних дріжджів

Як описано у Розділі 1.2, пероксисоми є спеціальними органелами, які містять певний набір оксидаз і пероксид-деградуючі ферментів, та беруть участь у різноманітних катаболічних і біосинтетичних процесах [413]. Доведено, що методи аналізу пероксисомних ферментів на чашках у дріжджах є зручним підходом для швидкого моніторингу стану пероксисом: біогенезу органел, репресії або деградації. Особливо це стосується поширених метилотрофних дріжджів (таких як *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *P. methanolica* та *C. boidinii*). Як уже згадувалося вище, проліферація пероксисом у клітинах цих видів потужно індукується під впливом метанолу або олеату, але строго репресується у клітинах, вирощених на таких джерелах карбону як гексози (глюкоза, фруктоза), дисахариди (сахароза, мальтоза) і етанол [29], [276].

Пероксисомна алкоголь- (або метанол)-оксидаза (АОХ) є унікальним ферментом метилотрофів, що, за індукції метанолом, складає велику частину загального клітинного білка і тому використовується як зручний маркер пероксисомної активності. Коли дріжджові клітини, вирощені на субстратах, що індукують проліферацію пероксисом, переносять у рідке культуральне

середовище, або роблять їх відбиток (реплікують) на чашку з твердим агаризованим середовищем із доданою глюкозою (а також етанолом у метилотрофів), відбувається швидка деградація пероксисом (пексофагія) у вакуолях ([414], [415], див. також Розділ 1.3). Для моніторингу пексофагії в колоніях дріжджів успішно використовувалися методи визначення АОХ й амінооксидази *in situ* [337], [416], [417]. У цьому підрозділі роботі представлено адаптовані чи вдосконалені нами методи для визначення периксисомної АОХ на чашках, та наведені приклади їх використання у відборі мутантів дріжджів, зокрема з пошкодженою пексофагією. Окрім того, ми описуємо розроблений метод позитивної селекції для клонування генів пексофагії (*ATG*) на основі субстрату АОХ, алілового спирту шляхом функціональної комплементачії в дріжджових колоніях [416].

3.3.3.1. Аналіз активності АОХ на чашках при відборі дріжджових мутантів з дефектною пексофагією або катаболітною репресією

Використаний у роботі протокол для візуалізації активності АОХ в колоніях дріжджів, загалом базується на раніше описаному [418], з певними модифікаціями. Цей протокол може бути застосований до різних метилотрофних дріжджів і є наведений у розділі «Матеріали і Методи».

Pichia pastoris

Аналіз АОХ на чашках може бути використаний для селекції мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією. Мутації можуть бути індуковані за допомогою УФ-випромінювання або випадкового інсерційного мутагенезу (REMI), як описано в роботі [338]. Для ідентифікації мутантів *P. pastoris*, дефіцитних за індукованої глюкозою мікропексофагії або індукованої етанолом макропексофагії [415], або за обома процесами, слід дотримуватись протоколу, наведеного у розділі «Матеріали і Методи». Схема та приклад експерименту з визначення АОХ на чашках, описаного у цьому підрозділі, показані на Рис. 3.3.4.

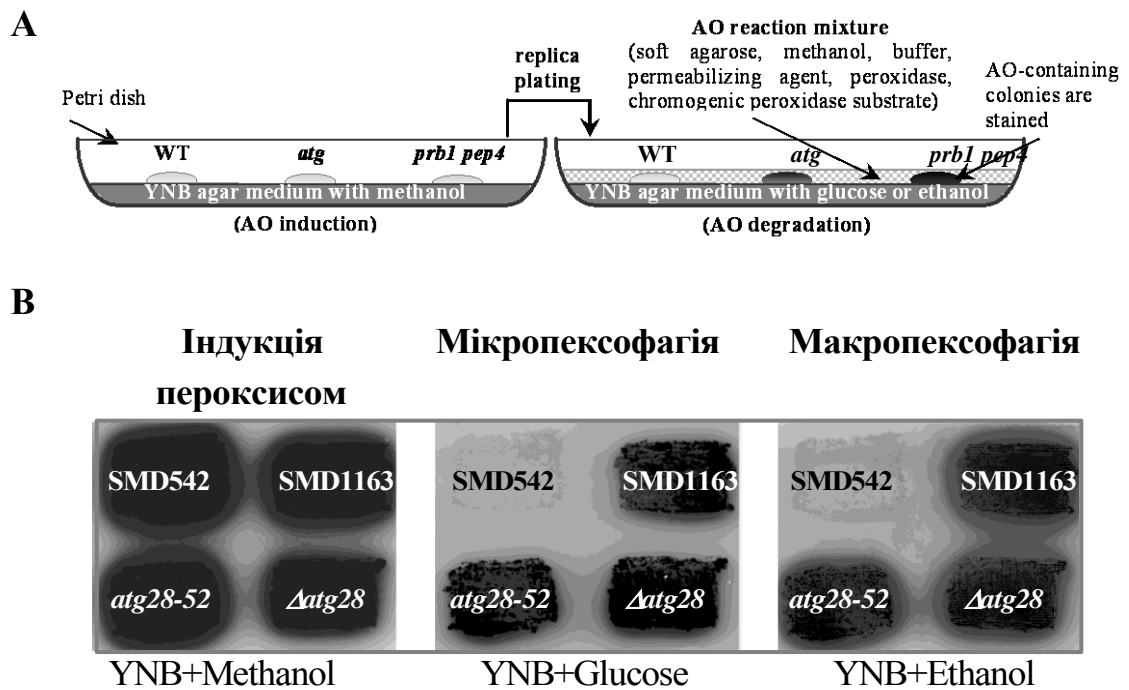


Рис. 3.3.4. Метод візуалізації активності АОХ в колоніях дріжджів на чашках (А) Схема візуалізації АОХ для виділення мутантів *P. pastoris* з дефіцитною пексофагією. WT, штам дикого типу; *atg*-мутант, дефектний за автофагією (пексофагією); *prb1 pep4*, мутант дефіцитний за вакуолярними протеазами, який служить позитивним контролем пошкодження пексофагії. (Б) Приклад якісного аналізу АОХ колоніях УФ-індукованого *atg28-52* і сконструйованого Δ *atg28* делеційним мутантами за умов індукції пексофагії [419]. Клітини підрощені протягом двох днів на мінеральному агаризованому середовищі з метанолом для індукції пероксисом і пероксисомної АОХ, для індукції пексофагії переносили методом реплік на YND (з 1% глюкозою) або YNE (1% етанолом). Після інкубації протягом 14 годин, активність АОХ візуалізували шляхом нанесення на чашки реакційної суміші для визначення активності АОХ. Штам дикого типу SMD542, а також протеазо-дефіцитний мутант SMD1163 (*pep4 prb1*, з пошкодженою селективною і неселективною автофагією) були обрані як негативний, та позитивний контролю, відповідно.

Hansenula polymorpha

У *H. polymorpha* мутанти з пошкодженою макропексофагією при адаптації до глюкози можуть бути отримані, загалом, як описано в попередньому параграфі, за винятком того, що клітини інкубують на всіх середовищах при 37°C [337]. Крім цієї задачі, метод визначення АОХ на чашках може бути використаний для пошуку мутантів *H. polymorpha*, дефіцитних за глюкозною (катаболітною)

репресією АОХ [29], [150]. Для цього можна використовувати методи негативної або позитивної селекції на основі УФ, хімічного або інсерційного мутагенезу [339]. Протокол селекції та аналізу мутантів з пошкодженою пексофагією наведено у розділі «Матеріали і Методи».

3.3.3.2. Позитивна селекція для клонування *ATG* генів з використанням алілового спирту як селективного агента

Селекція на основі алілового спирту може бути використана для клонування *ATG* генів з геномних бібліотек дріжджів за допомогою функціональної комплементачії. Це, зокрема, стосується УФ- або хімічно індукованих мутантів, дефіцитних за пексофагією, для яких дефектні гени не можуть бути ідентифіковані іншими засобами. Протокол розроблений нами для *P. pastoris* з цією метою наведено у розділі «Матеріали і Методи» [208], [416], [419]. Також було запропоновано подібний протокол для *H. polymorpha* [341]. Схема відповідної селекції зображена на Рис. Рис. 3.3.5.

Зазвичай, скринінг із аліловим спиртом забезпечує приблизно 100-кратне збагачення пулу колоній щодо клонів із відновленою пексофагією. І нарешті, функціонально комплементовані колонії з вихідної чашки YND з підтвердженням відновленим рівнем пексофагії використовуються для виділення тотальної ДНК, з її подальшою ретрансформацією в *E. coli* та ідентифікацією комплементуючої плазмиди, згідно стандартних процедур [322].

3.3.4. Виділення колекції мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією (*pdg*) та їх фенотиповий та генетичний аналіз

Як детально описано у попередньому підрозділі, на моделі дріжджів *P. pastoris* нами опрацьовано метод селекції мутантів з пошкодженою деградацією пероксисом (*pdg* – **p**eroxisome **d**egradation defective) на основі безпосереднього аналізу колоній на активність пероксисомної АОХ, яка, як відомо, підлягає протеолітичній деградації у складі пероксисом після додавання глюкози або етанолу до клітин, вирощених на середовищі із метанолом.

Після УФ-мутагенезу, підрощені на метанолі колонії були перенесені методом реплік на середовища з доданими 2% глюкозою або 2% етанолом, і інкубовані за цих умов протягом 8-10 год, після чого візуалізували активність АОХ на чашках, наносячи на колонії реакційну суміш для АОХ з доданим дигітоніном (1 мг/мл) як пермебіалізуючим агентом. Колонії, що демонстрували відносно вищу залишкову активність АОХ, двічі перевіряли на цей фенотип і відбирали підтверджені для подальшого дослідження. Схема відповідної селекції зображена на Рис. 3.3.6.

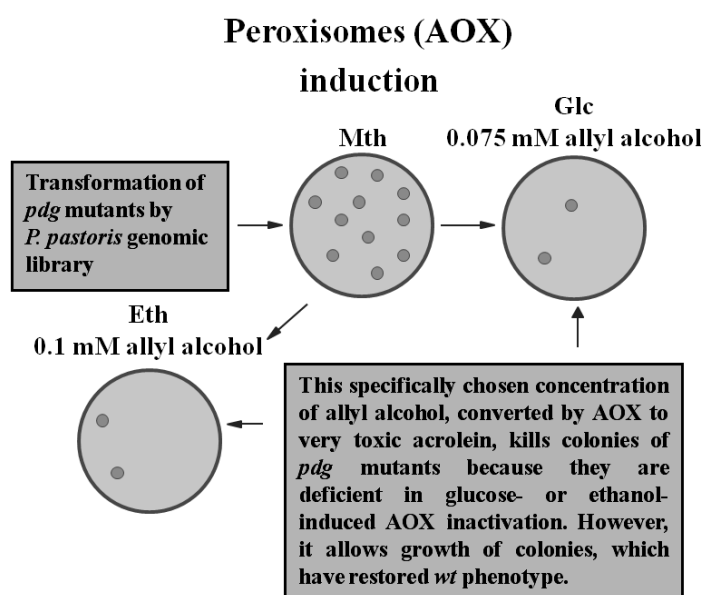


Рис. 3.3.5. Схема клонування *ATG* генів, використовуючи селекцію на основі алілового спирту.

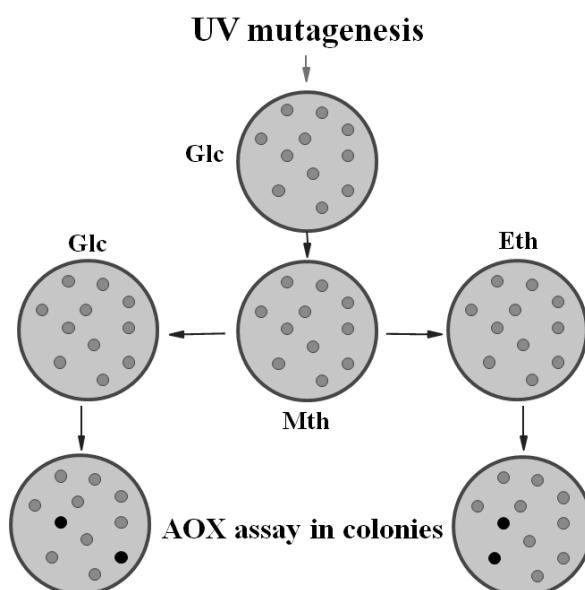


Рис. 3.3.6. Схема процедури селекції, використаної при виділенні *pdg* мутантів. Пояснення в основному тексті та розділі «Матеріали і Методи».

Виділені потенційні мутанти далі були проаналізовані у рідких культурах для підтвердження *Pdg*- фенотипу і використані для генетичного аналізу, зокрема тестів на домінування та комплементацию (dominance and complementation analysis). Генетичний аналіз 10-ти індивідуальних мутантів виявив шість різних груп комплементации (генів), позначених як *PDG1-PDG6*. Відповідні мутанти характеризувалися помітними дефектами у швидкості інактивації АOX при адаптації до глюкози чи етанолу [416].

3.3.5. Клонування та функціональний аналіз генів *PDG2/ATG28* та *PDG3/ATG26*, задіяних у деградації пероксисом

Як свідчення механічного та генетичного взаємозв'язку різних сигнальних шляхів, що регулюють автофагію, більшість ідентифікованих генів мікропексофагії в метилотрофних дріжджах – це гомологи чи ортологи генів, які беруть участь у загальних шляхах аутофагії та *Cvt* у пекарських дріжджах *S. cerevisiae* [2], [191], [415], [420], [421]. Тому у нашому генетичному комплементацийному аналізі ми приділяли увагу у першу чергу тим мутантам, які не виявляли сильного дефекту загальної автофагії, згідно тесту з флоксином В [422].

У межах оригінальної колекції мутантів *P. pastoris*, виділених нами за допомогою УФ-мутагенезу та моніторингу пексофагії на чашках, як описано вище, було визначено кілька груп комплементации (передбачуваних генів), які одночасно не мали помітного дефекту у загальній автофагії.

Отже, наші дослідження були зосереджені на виявленні селективних компонентів пексофагійного механізму, вивченні їх видоспецефічності та молекулярної функції кожного компонента. Далі ми наводимо характеристику *ATG28*, раніше невідомого гена, що кодує компонент пексофагового механізму, який вважався видо- і шляхоспецифічним у *P. pastoris*.

3.3.5.1. Молекулярне клонування гена *PDG2/ATG28* і фенотиповий аналіз *atg28* мутантів

3.3.5.1.1. Виділення і аналіз послідовності *ATG28* гена *P. pastoris*

Колекцію УФ-індукованих мутантів *P. pastoris* з дефектною пексофагією виділяли, як описано вище, з використанням скринінгу колоній на чашках на залишкову активність пероксисомної АОХ після зміни метанол-вмісного середовища на глюкозо- або етаноловмісне [419]. У результаті скринінгу мутантів з пошкодженою пексофагією було виявлено два алельних мутанти, дефектних за геном *ATG28* [340]. Спочатку відповідна група комплементачії була позначена як *PDG2*. Після прийняття нової номенклатури для споріднених із автофагією генів (*ATG*) [420], пошкоджений ген був перейменований у *ATG28* [423].

Як виявив генетичний тест, виділені *atg28* мутанти були рецесивним і моногенними. Обидва алельні мутанти демонстрували подібний фенотип, а саме високу залишкову активність АОХ, як маркера пероксисом, при тривалій експозиції до глюкози чи етанолу метанол-індукованих клітин. Один із мутантів, *atg28-52*, використовували для подальшого аналізу. Дефект пексофагії в *atg28-52* був підтверджений електронно-мікроскопічним дослідженням, зокрема було виявлено інтактні пероксисоми після тривалої адаптації до глюкози або етанолу. Для усунення можливих вторинних мутацій у *atg28-52*, проводили три раунди зворотного схрещування проти штаму дикого типу перед клонуванням гена.

Ген *ATG28* клонували з геномної бібліотеки *P. pastoris* за допомогою функціональної комплементачії *atg28-52 his4* мутанта. При відборі для комплементачії використовували модифікацію методу на основі стійкості до алілового спирту як субстрату АОХ [423]. Колонії, вирощені на метанолі, переносили на етанол-вмісне середовище, і додавали 0,15 мМ алілового спирту. З колекції прототрофних трансформантів було виділено один, який виявляв відновлений рівень пексофагії, характерний для штаму дикого типу. Комплементуюча плазмідна була виділена після ретрансформації в *E. coli*. Також встановлено, що вона містить вставку геномної ДНК *P. pastoris* розміром приблизно 10,2 тис. п.н. Плазмідна отримала назву рOS13. Ретрансформація рOS13 у

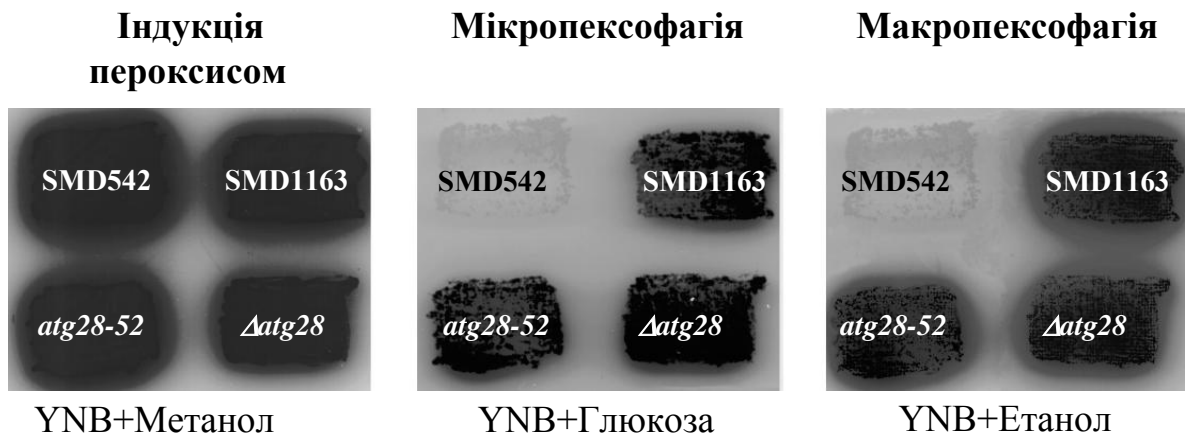
вихідний мутант *atg28-52* повністю комплементувала фенотип мутанта. Ген *ATG28* було ідентифіковано у складі pOS13 як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Виявилося, що ген *ATG28* кодує білок завдовжки 612 амінокислотних залишків (Рис. 3.3.7А), що виявляє незначну гомологію до інших білків із баз даних. Відсутність передбачуваних консервативних доменів у послідовності *Atg28* перешкодила аналізу його можливої функції у пексофагії, базуючись на подібності до відомих білків із визначеною функцією. Проте, *Atg28* виявляє дві передбачувані ділянки суперспіралізованих (coiled-coil) доменів (а/к 214-255 і 259-300). Остання ділянка перекривається з передбачуваним мотивом лейцинової застібки (leucine-zipper) (Рис. 3.3.7). Пошук у базі даних із фрагментом *Atg28*, що містить цей мотив, виявив кілька білків дріжджів, які демонструють значну ступінь подібності в цій ділянці (Рис. 3.3.7В). Вони включають гіпотетичні білки *Candida albicans* CaO19.13356 (610 а/к, GenBank accession no. [EAL04283](#)), *Debaryomyces hansenii* (713 а/к, GenBank accession no. [CAG85344](#)), та *H. polymorpha* (458 а/к, ORF#741, contig 47, *H. polymorpha* genome database). Тим не менше, загальна схожість чотирьох білків була нижче 20%. Не виявлено *Atg28*-подібних білків при аналізі повних геномів пекарських дріжджів *S. cerevisiae* або дріжджів *Schizosaccharomyces pombe*.

3.3.5.1.2. Конструювання делеційного мутанта по гену *ATG28* та аналіз фенотипу *atg28* мутантів

Штам з делетованим *ATG28* геном *P. pastoris* був сконструйований методом гомологічної рекомбінації делеційної касети у геном штаму дикого типу, як описано у розділі «Матеріала і Методи». Встановлено, що вихідний УФ-індукований мутант *atg28-52* і сконструйований делеційний мутант Δ *atg28* демонстрували ідентичні мутантні фенотипи. Обидва штами виявляли порушення глюкозо-індукованої мікропексофагії та етанол-індукованої макропексофагії. На відміну від штаму дикого типу, але подібно до штаму SMD1163, дефіцитного за вакуолярними протеазами, колонії *atg28* виявляли високу залишкову активність АОХ після адаптації клітин, вирощених на метанолі, до цих субстратів (Рис. 3.3.8 А).

A



B

**Мікропексофагія
у штамів-диплоїдів**

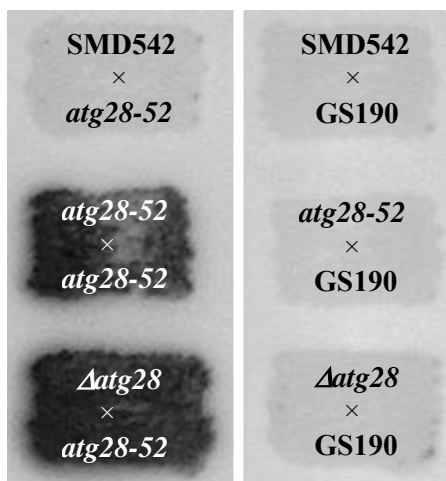


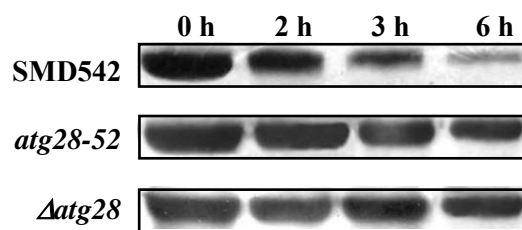
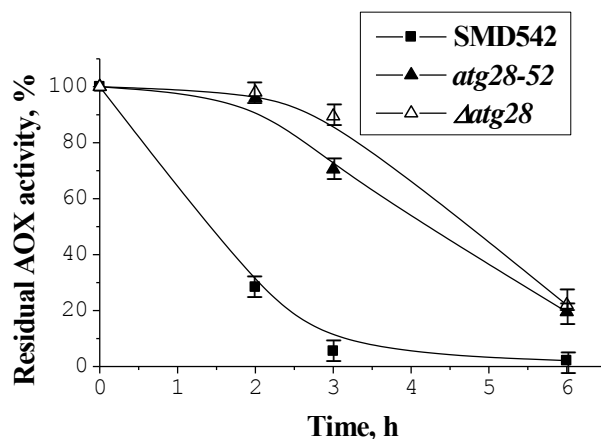
Рис. 3.3.8. Детекція АОХ у колоніях *atg28* мутантів при індукції пексофагії. **(А)** Для індукції пероксисом і пероксисомної АОХ клітини вирощували протягом двох діб на мінеральному агаровому середовищі з метанолом (1%) та реплікували на середовища, що індукують пексофагію (з 1% глюкозою чи 1% етанолом). Після 14 год інкубації активність АОХ візуалізували шляхом нанесення відповідної реакційної суміші з пермеабілізуючим агентом. Штам дикого типу SMD542 і мутант SMD1163 з делетованими вакуолярними протеазами служили негативним та позитивним контролями, відповідно. **(В)** Фенотиповий аналіз диплоїдних гібридів. Експериментальна процедура та середовища для індукції мікро- і макропексофагії були такими, як у **(А)**. Штами GS115 і GS190 служили контролями дикого типу.

Щоб підтвердити, що *atg28-52* і *Δatg28* є мутантними алелями одного і того ж гена, були сконструйовані і проаналізовані диплоїдні штами. Як і мутація *atg28-52*, мутація *Δatg28* виявилася рецесивною (Рис. 3.3.8.В). Штам гетероалельного диплоїда (*atg28-52*×*Δatg28*) демонстрував той же мутантний фенотип стосовно пексофагії, як і штамп гомоалельного диплоїда (*atg28-52*×*atg28-52*). Підсумовуючи, отримані результати чітко вказують, що обидві мутації пошкоджують один і той же ген.

Дефект пексофагії у *atg28* мутантів був підтверджений у більш детальних біохімічних дослідженнях. Подібно до результатів аналізів активності АОХ у колоніях, залишкова активність АОХ та рівні білка АОХ у безклітинних екстрактах з клітин, адаптованих до глюкози (Рис. 3.3.9, зверху) або етанолу (Рис. 3.3.9, знизу) були вищі у *atg28* мутантів, порівняно зі штамом дикого типу. Важливо підкреслити, що швидкість інактивації/деградації АОХ в клітинах штаму дикого типу при адаптації до етанолу була повільнішою у порівнянні із клітинами, адаптованими до глюкози, в усіх наших експериментах. Крім того, певна невідповідність між активністю АОХ і рівнем білка при адаптації до етанолу може бути спричинена модифікацією і інактивацією АОХ ацетальдегідом, проміжним продуктом метаболізму етанолу [424].

Однак, наступний структурний аналіз клітин *Δatg28* при індукції пексофагії виявив, що деградація пероксисом у мутанта не була повністю заблокована. Для такого аналізу були сконструйовані штами *Δatg28* і *Δatg28* з міченими P_{АОХ1}BFP-PTS1 пероксисомами (Atg28-GFP, див. нижче), як описано у розділі Матеріали та Методи [234]. При додаванні глюкози або етанолу до метанол-індукованих клітин *Δatg28*, у яких пероксисоми були флуоресцентно мічені, спостерігали, що у невеликої частини клітин пероксисоми зазнають деградації (Рис. 3.3.10). Важливо, що цей процес був значно повільнішим у мутанта, ніж у штаму дикого типу, і пероксисоми залишалися присутніми у деяких клітинах *Δatg28* на пізніх часових точках. Цей фенотип є подібний до того, що спостерігається у деяких інших *atg* мутантів у *P. pastoris*, які також виявляють «частковий» (leaky) фенотип [425], [426]. Таким чином, Atg28 виявився важливим, але не критично необхідним для пексофагії.

Мікропексофагія



Макропексофагія

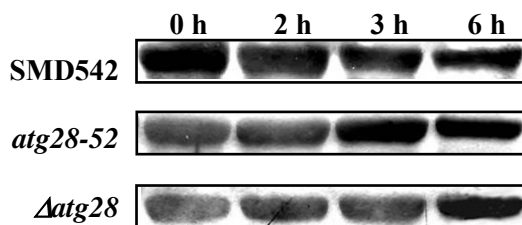
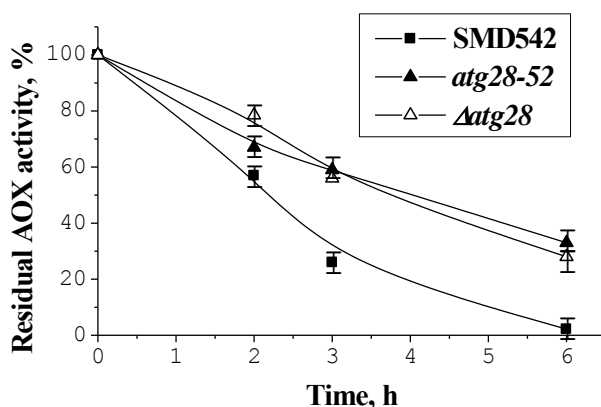


Рис. 3.3.9. Аналіз кінетики активності та білка АОХ за умов індукції пексофагії у *atg28* мутантів. Наведено дані одного із декількох подібних експериментів. Активність АОХ та кількість відповідного білка визначали у безклітинних екстрактах штаму дикого типу (SMD542) і *atg28* мутантів після додавання глюкози (1%, мікропексофагія) або етанолу (1%, макропексофагія) до індуктованих метанолом клітин. Активність АОХ виражали у відсотках від початкової активності в метанол-індукованих клітинах (100%). Початкова специфічна активність АОХ (часова точка 0 год) для штаму SMD542 становила 2,2 Од./мг білка, *atg28-52*: 1,9 Од./мг білка і Δ *atg28*: 2,0 Од./мг білка. Для Вестерн-блот-аналізу використовували однакову кількість загального білка для всіх штамів у кожній часовій точці експерименту.

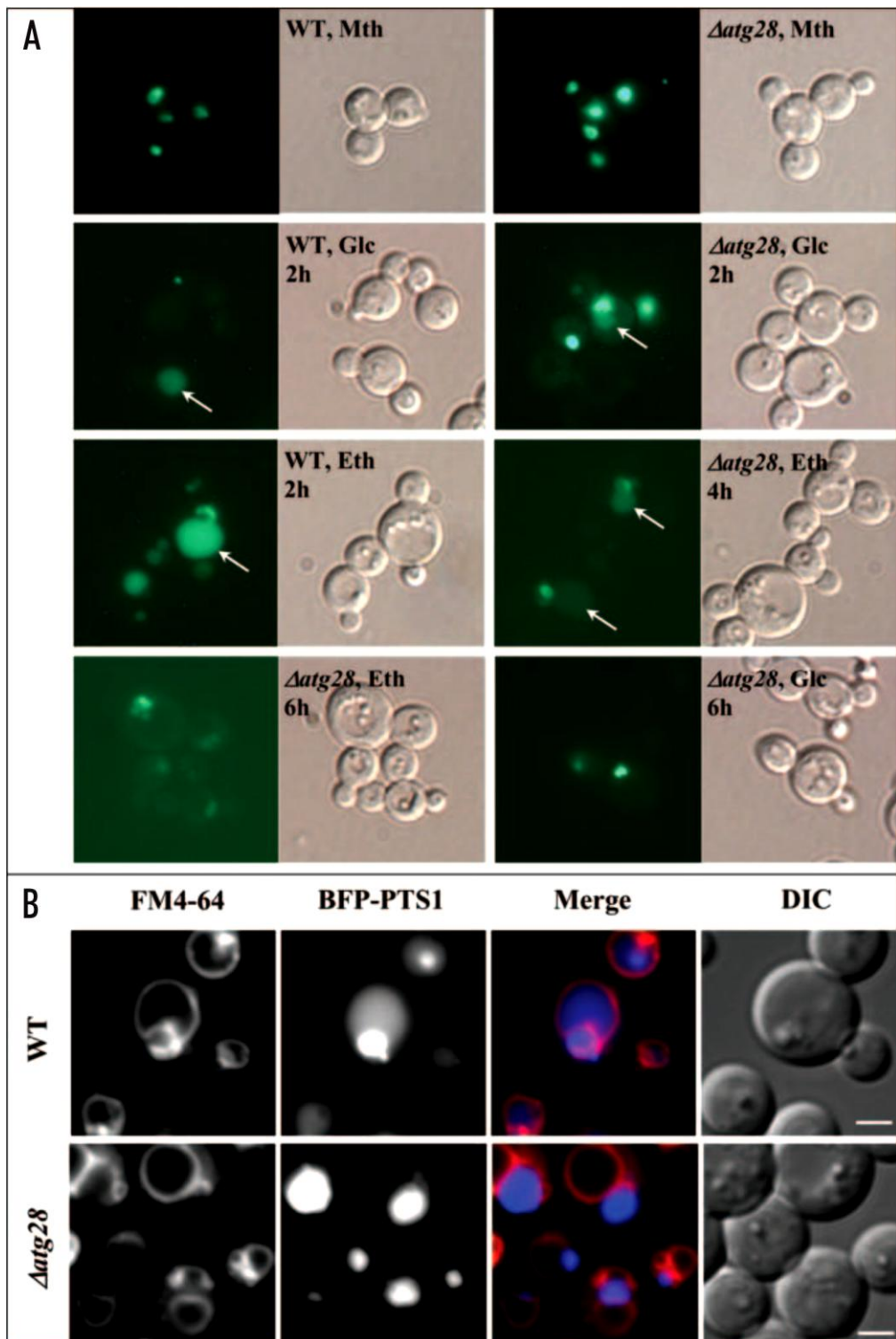


Рис. 3.3.10. Флуоресцентна мікроскопія динаміки пексофагії. **(А)** Зображення клітин штаму дикого типу [WT, GS115 (GFP-PTS1)] і $\Delta atg28$ (GFP-PTS1) з флуоресцентно-міченими пероксисомами показані зліва, зображення тих же клітин у видимому світлі – справа. Mth – метанол (індукція протягом 14 год); Glc – глюкоза; Eth – етанол. Вказані часові точки адаптації до глюкози або етанолу. Стрілки вказують на GFP у вакуолях, що підтверджує активний процес пексофагії. **(Б)** Флуоресцентні зображення клітин штамів дикого типу (DMM1) і $\Delta atg28$ (SJCF588), що експресують BFP-PTS1. Клітини вирощували в середовищі з метанолом

протягом ночі, переносили на середовище YND з 2% глюкози і фарбували FM 4-64 (для маркування вакуоль) протягом 4 год. Масштабний відрізок відповідає 1 мкм.

Для визначення стадії мікропексофагії, на якій діє Atg28, були використані клітини *Δatg28* з BFP-PTS1 міченими пероксисомами і вакуолярними мембранами, міченими барвником FM4-64 (див. «Матеріали і Методи»). Встановлено, що мікропексофагія є порушена в *Δatg28* на стадії ізоляції (sequestration) пероксисом вакуолярними вип'яченнями (protrusions), характерними для мікропексофагії (Рис. 3.3.10В). Це відповідає середній або пізній стадії (1b або 1c) мікропексофагії згідно (226). Дані експерименти були проведені у співпраці з групою проф. С. Субрамані (S. Subramani) з Каліфорнійського Університету Сан-Дієго, Каліфорнія, США.

Електронно-мікроскопічний аналіз *Δatg28* клітин виявив інтактні пероксисоми після 3 годин інкубації з глюкозою і 6 годин інкубації з етанолом (Рис. 3.3.11). У ці часові проміжки клітини штаму дикого типу були повністю позбавлені пероксисом, за винятком кількох невеликих органел.

Таким чином, мікропексофагія виявилася порушеною у *Δatg28* мутанта на пізній стадії пексофагії під час фази ізоляції кластерів пероксисом або злиття з вакуолею. Що стосується індукованої етанолом макропексофагії, дефіцит ATG28 порушує її на стадії після утворення додаткових автофагійних мембран, що оточують індивідуальні пероксисоми [212]. Відомо, що хоч пексофагія бере участь у регулюванні гомеостазу пероксисом навіть у клітинах, вирощених за умов їх індукції, оскільки пошкоджені органели підлягають вакуолярній деградації [154], нами не виявлено пошкодження росту *Δatg28* клітин у метанол-вмісному середовищі. Також структурні дослідження не виявили видимих змін у морфології вакуоль у *atg28*-мутантів у порівнянні зі штамом дикого типу.

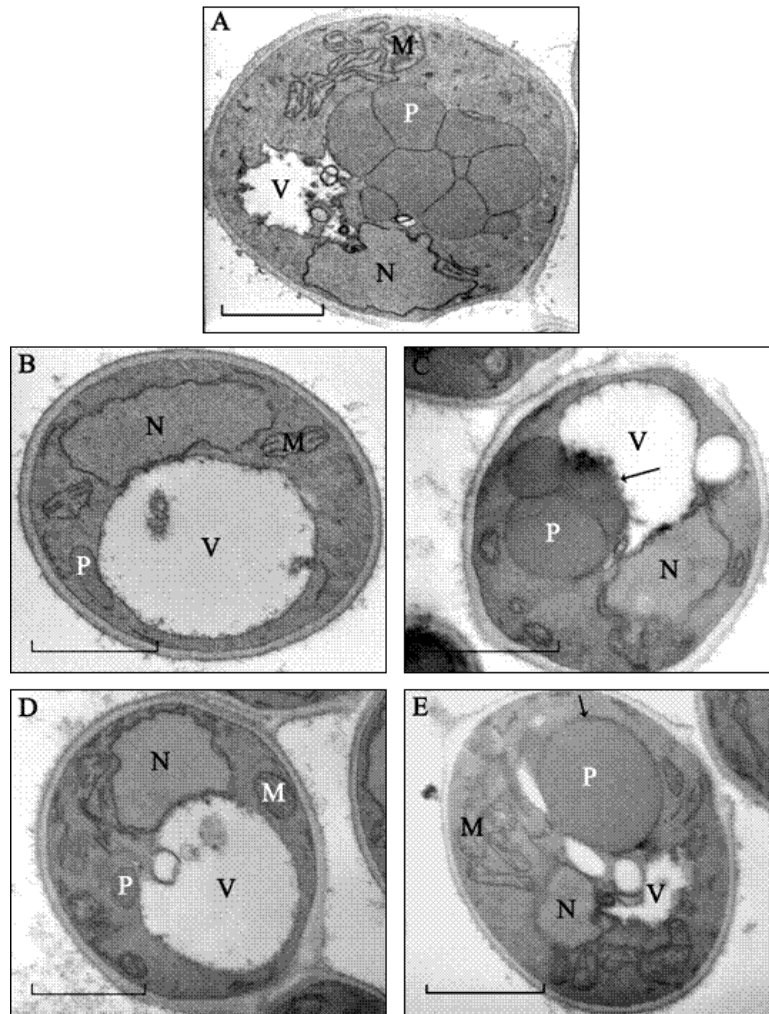


Рис. 3.3.11. Електронно-мікроскопічний аналіз морфології пексофагії. **(А)** Метанол-індуковані клітини штаму дикого типу SMD542; **(В)** SMD542, після 3 год адаптації до глюкози; **(С)** $\Delta atg28$, після 3 год адаптації до глюкози; **(D)** SMD542, після 6 год адаптації до етанолу; **(Е)** $\Delta atg28$, після 6 год адаптації до етанолу. Стрілками показані: в **(С)** деградація пероксисом; в **(Е)** додаткові мембрани, що утворюються навколо пероксисом. Р – пероксисома, V – вакуоля, N – ядро, М – мітохондрія. Відрізок – 1 мкм.

Було також розглянуте питання, чи впливає нестача *ATG28* на процес загальної автофагії, індукованої голодуванням за нітрогеном. Згідно з тестом з флоксином-В (див. «Матеріали і Методи»), цей процес не був пошкоджений у *atg28* мутантів (Рис. 3.3.12А).

Дослідження життєздатності клітин у часовій динаміці також підтвердило висновок, що клітини $\Delta atg28$ зберігали життєздатність у дефіцитному за нітрогеном середовищі набагато довше, відносно клітин штаму SMD1163(*per4*

prb1), дефіцитного за усіма автофагійними шляхами (Рис. 3.3.12В). Однак, не можна було виключити частковий або «leaky» дефект загальної автофагії.

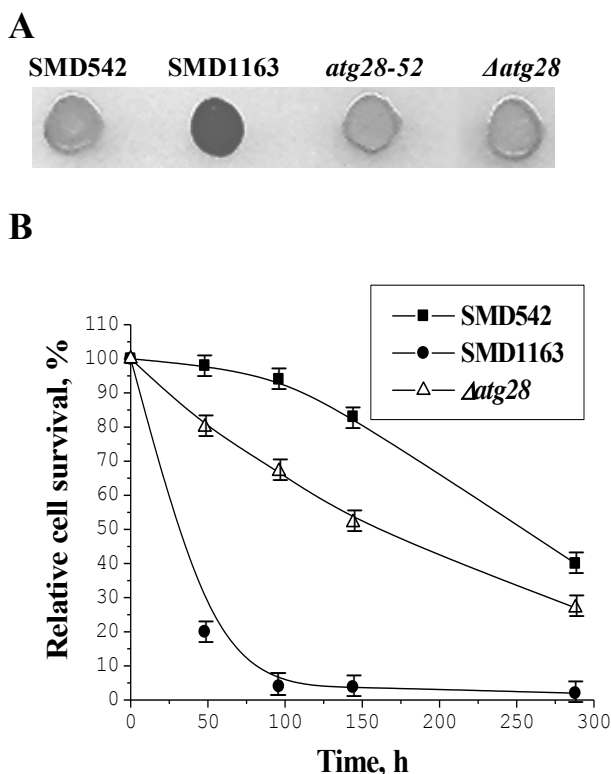


Рис. 3.3.12. Аналіз процесу загальної автофагії у Δ *atg28* мутанта. **(А)** Аналіз життєздатності клітин за умов індукції загальної автофагії. Клітини переносили із багатого середовища YPD на чашки YNB-N без джерела нітрогену з 1% глюкозою і 20 мг/л флоксину-В, та інкубували 5 днів. Клітини з дефіцитом загальної автофагії (SMD1163) виявляють швидку втрату життєздатності і забарвлюються у червоний колір, тоді як клітини, здатні до загальної автофагії, залишаються незабарвленими (WT). **(В)** Тест на життєздатність у рідкому середовищі без нітрогену. Клітини дикого типу (SMD542), мутантів SMD1163 і Δ *atg28* вирощували на багатому середовищі YPD і переносили на свіже середовище YNB–N. У вказані часові проміжки рівні об’єми культури висівали на чашки з YPD. Через 4 дні підраховували кількість колоній, що представляють життєздатні клітини, як відсоток від вихідної кількості колоній.

3.3.5.1.3. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації Atg28

За допомогою флуоресцентної мікроскопії вивчали внутрішньоклітинну локалізацію химерного білка Atg28-GFP, експресованого під власним промотором гену *ATG28*. Конструювання вектора pOC6 та штамів, що синтезують Atg28-GFP,

описано у розділі «Матеріали і Методи». Аналіз трансформантів відповідним вектором показав, що злитий білок Atg28-EGFP, експресований під нативним промотором гена *ATG28*, функціонально комплементував мутант *Δatg28*. Виявилось, що білок Atg28-GFP характеризується дуже низьким рівнем експресії при усіх досліджуваних умовах та складною локалізацією. У більшості метанол-індукованих клітин Atg28-GFP білок був локалізований у цитозолі (Рис. 3.3.13А (I)). Проте в деяких клітинах злитий білок також був локалізований до точкових структур невідомої природи у безпосередній близькості до вакуолей або пов'язаних із вакуолярною мембраною (Рис. 3.3.13А (II)). В окремих випадках Atg28-GFP можна було спостерігати локалізованим в вакуолярному матриксі (Рис. 3.3.13А (III)).

Після індукції мікро- або макропексофагії шляхом перенесення клітин з метанол-вмісного середовища на середовище з глюкозою або етанолом, відповідно, ми не спостерігали значного збільшення рівня експресії Atg28-GFP. Проте під час пексофагії спостерігали збільшення кількості точкових Atg28-GFP-мічених структур, асоційованих із вакуолярними мембранами чи пероксисомами (Рис. 3.3.13В).

Раніше було виявлено, що, подібно до Atg28, один білок автофагії Atg24 та Atg17 наявні у перивакуолярних (проксимальних до вакуолей) структурах PAS (preautophagosomal structures) за індукції мікропексофагії [205]. Як описано у розділі «Матеріали і Методи», було сконструйовано штаб, що коекспресує Atg28-GFP та YFP-Atg17. Встановлено, що Atg28 пунктати колокалізувалися з Atg17 (Рис. 3.3.13С), який був використаний як маркер для PAS [205]. Окрім пексофагії, Atg28 може бути залучений до інших фізіологічних функцій.

Спостережено, що мутанти *atg28* є більш чутливими до підвищеного рН відносно клітин штаму дикого типу (Рис. 3.3.14). Відомо, що відповідь на цей стрес вимагає вакуолярної функції. Проте, ця функція очевидно не вимагає функціонального автофагійного механізму, оскільки у протеазо-дефіцитного штаму SMD1163 стійкість до підвищеного рН не порушена (Рис. 3.3.14).

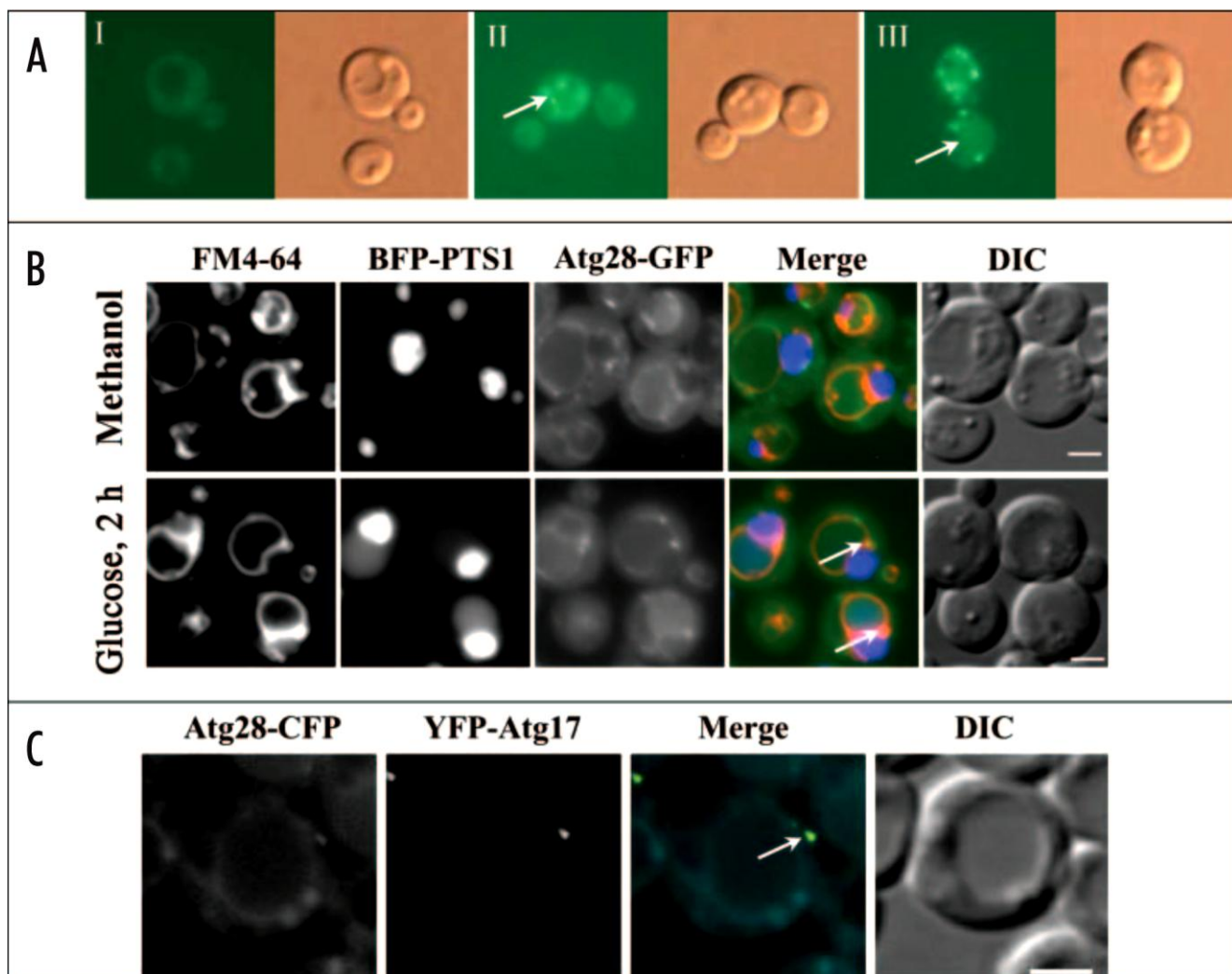


Рис. 3.3.13. Внутріклішньотинна локалізація Atg28. **(А)** Флуоресцентні зображення клітин, вирощених на метанолі, що експресують злитий білок Atg28-GFP. Atg28-GFP-вмісні асоційовані із вакуолями точкові структури і вакуолярна локалізація Atg28-GFP позначені стрілками. **(В)** Флуоресцентне зображення клітин штаму *atg28* (Atg28-GFP), що експресує P_{AOX} -BFP-PTS1. Клітини фотографували після перенесення із середовища YNB з 0,5% метанолом на середовище YNB з 2% глюкозою та 2 год інкубації. У кожному випадку клітини зафарбовували FM 4-64 для маркування вакуолей. **(С)** Клітини штаму SJCF585, що коекспресують Atg28-CFP і YFP-Atg17. Клітини вирощували в середовищі YNB з 0,5% метанолом протягом ночі. Стрілка вказує на сайт PAS – місце колокалізації Atg28 і Atg17.

Штами	рН 6,5			рН 7,0			рН 7,5			рН 8,0		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
SMD542	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
SMD1163	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>atg28-52</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Δ <i>atg28</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Рис. 3.3.14. Порівняльний аналіз чутливості до підвищеного рівня рН. Чутливість до підвищеного рН аналізували в клітинах, підрощених на середовищі YPD і висіяних при різних розведеннях (10⁻¹ відповідає 1 OD₅₉₀) на чашки з YPD середовищем, з доданими буферами для підтримання обраних рівнів рН. Клітини інкубували протягом 2 днів на чашках при рН 6,5 і 7,0, і протягом 3 днів при рН 7,5 і 8,0.

Цікаво, що SMD1163 навпаки виявляє підвищену стійкість до стресу, викликаного підвищеним рН, відносно штаму дикого типу. Очевидною причиною може бути місортинг відповідних вакуолярних протеаз за таких умов у штаму дикого типу, який понижує життєздатність клітин.

3.3.5.1.4. Ідентифікація нового білка Atg35 як взаємодіючого партнера Atg28 у *P. pastoris*

Серед 34 відомих на момент виконання роботи білків, задіяних у автофагії (Atg білки), 17 були ідентифіковані як компоненти основного автофагічного механізму (core autophagic machinery), і необхідні для усіх Atg шляхів, а 17 були специфічними для певних шляхів чи видів дріжджів. Виникло запитання, яким чином основний автофагійний апарат механічно взаємодіє з пексофагією або Cvt-специфічними компонентами для забезпечення селективної доставки різних об'єктів у вакуолі. Також було відомо, що специфічний для пексофагії набір білків у *P. pastoris* включав пероксисомний рецептор Atg30, його адаптори Atg11 і фосфатидилінозитол 3-фосфатний зв'язуючий білок Atg17, Atg24, а також виявлені нами Atg28 та стеролглюкозилтрансферазу Atg26 (див. нижче). Також, взаємодія Atg30 з функціонально активованими Atg11 і Atg17 стабілізує специфічний для пексофагії PAS у *P. pastoris* [213], [214]. Нами встановлено, що Atg17 взаємодіє і колокалізується з Atg28, який, імовірно, є основним

автофагійним білком (core autophagic protein), частково необхідним для всіх Atg шляхів але, особливо, для мікропексофагії, таким чином, забезпечуючи безпосередній зв'язок між пексофагією і основними компонентами PAS у *P. pastoris* [213], [423]. Також запропоновано, що Atg28 може бути пов'язаний з аналогами білків *S. cerevisiae*, Atg29 і Atg31, які обидва взаємодіють з Atg17, і, разом з Atg1 і Atg13, стабілізують PAS у *S. cerevisiae* [233]. Проте, інформація стосовно інших можливих білків-партнерів, що взаємодіють з Atg28, була відсутня.

З метою пошуку таких партнерів нами була використана дріжджова двогібридна система (yeast two-hybrid (YTH) library screen). Було проведено скринінг YTH бібліотеки геномної ДНК *P. pastoris* (сконструйованої В. Назарком, див. [225] у клітинах *S. cerevisiae* з PpAtg28 як затравкою (bait). Аналіз послідовності двох позитивних клонів виявив С-кінцевий фрагмент гіпотетичного білка, CAУ67399 (а.а. 204-463) (пізніше названий Atg35), і N-кінцевий фрагмент гомолога Rdi1, CAУ67682 (а/к 1-96) (Рис. 3.3.15 А).

Atg35 складається з 463 а.а. і має два прогнозовані функціональні домени: RING-finger (а/к 5-47) і PHD-палець (а/к 88-128) (Рис. 3.3.15 В). Найближчими передбачуваними ортологами Atg35 виявились гіпотетичні білки з *Pichia stipitis* (PICST_60919) і *Pichia guilliermondii* (PGUG_03993). Пошук по базі даних білків також показав, що, ймовірно, дріжджі з родини *Saccharomycetales* мають або один великий білок Atg28 або два менших білка, Atg29 і Atg31 [213]. Аналіз геномів також виявив, що відповідні види містять або повнорозмірний Atg35-подібний варіант білка з N-кінцевими RING і PHD-доменами відносно коротший білок Asr1 (Рис. 3.3.15 С).

Наприклад, *C. albicans*, *D. hansenii*, *P. pastoris* та *H. polymorpha* мають пару білків Atg28 і Atg35, але *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *Ashbya gossypii* і *K. lactis* мають Atg29, Atg31 і Asr1 у своїх геномах. Білки Asr1 і Atg35 володіють С-кінцевим сигналом ядерної локалізації, але Asr1 білки не мають внутрішнього фрагмента розмірами приблизно 260 а.к. Таким чином, Atg35 міг коеволюціонувати з Atg28 в

дріжджах, і два білки Atg28 і Asr1 можуть бути функціональними але взаємовиключними аналогами.

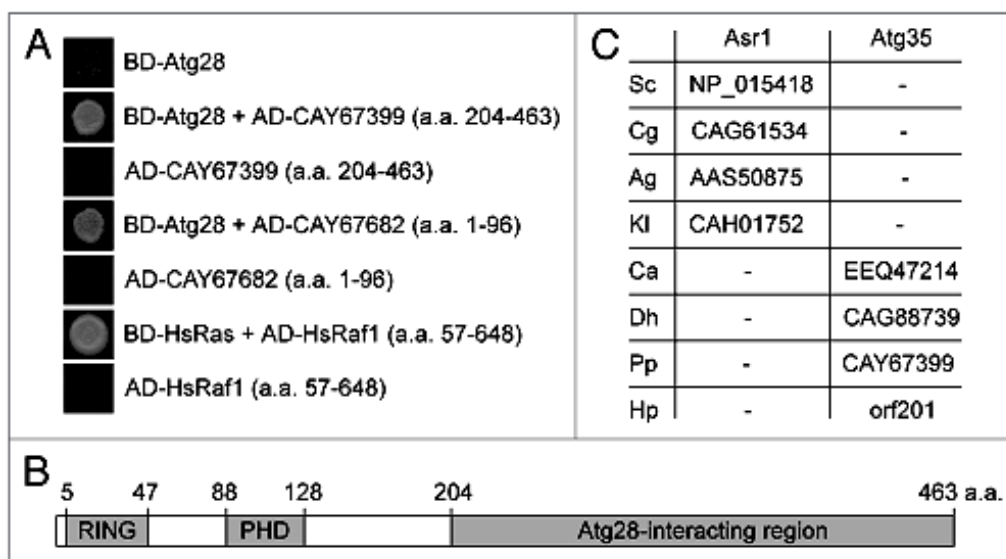


Рис. 3.3.15. Ідентифікація Atg35 як взаємодіючого партнера з білком Atg28 *P. pastoris*. **(A)** Atg28 взаємодіяв з С-кінцевою частиною Atg35 (сAY67399) і N кінцем гомолога Rdi1 (сAY67682) у скринінгу Y2H бібліотеки. Клітини *S. cerevisiae*, що коекспресували людський Ras і вкорочену форма білка Raf1, які взаємодіють один з одним, служили позитивним контролем. **(B)** Прогнозована структура білка Atg35 *P. pastoris*. Atg35 має два консервативні домени, RING-finger і PHD-finger. Також показана ділянка Atg28, що взаємодіє з Atg35 за даними Y2H аналізу. **(C)** Atg35 ймовірно ко-еволюціонував з Atg28 у дріжджах. *Saccharomycetales* мають або комбінацію з (i) Atg29, Atg31 і Asr1 або (ii) Atg28 і Atg35. Представлено ідентифікаційні номери білків Asr1 і Atg35 з різних видів. Скорочення назв організмів: Sc, *S. cerevisiae*; Cg, *C. glabrata*; Ag, *A. gossypii*; Kl, *K. lactis*; Ca, *C. albicans*; Dh, *D. hansenii*; Pp, *P. pastoris* і Hp, *H. polymorpha*

Наступний біохімічний та мікроскопічний аналіз відповідного делеційного мутанта підтвердив, що Atg35 є специфічним для мікропексофагії білком, який є важливим, але не строго необхідним (essential), для ефективного формування МІРА (мікропексофагічного апарату), і не потрібний для загальної адтофагії та конститутивного CVT шляху [225]. Цікаво, що хоча у мутанта $\Delta atg28$ було повністю заблоковане формування МІРА, мутанти $\Delta atg28$ і $\Delta atg35$ демонстрували нормальне утворення пексофагосом в умовах макропексофагії. Отже, Atg28 і Atg35 є специфічно необхідними для утворення МІРА під час мікропексофагії [225].

3.3.5.2. Молекулярне клонування гена *PDG3/ATG26* і фенотиповий аналіз *atg26* мутантів

Еукаріоти, включаючи дріжджі, містять різні форми стеролів, що беруть участь у багатьох клітинних функціях. Встановлено, що ергостерол, найбільш поширений дріжджовий стерол, та його попередники є важливими для рецептор-опосередкованого ендоцитозу та піноцитозу, а також гомотипового злитті вакуолярних мембран [427], [428]. Однак фізіологічна роль підгрупи стеролів, – стерол глюкозидів (SG), залишалася невідомою [429], [430].

Наша група разом із групою Проф. Я. Сакаї (Y. Sakai, Університет Кіото, Японія) незалежно виділили та ідентифікували мутанти *P. pastoris*, дефіцитні до пексофагії, які не містили каталітичного продукту стеролглюкозилтрансферази, – ергостерол глюкозиду (Рис. 3.3.16) [207], [208].

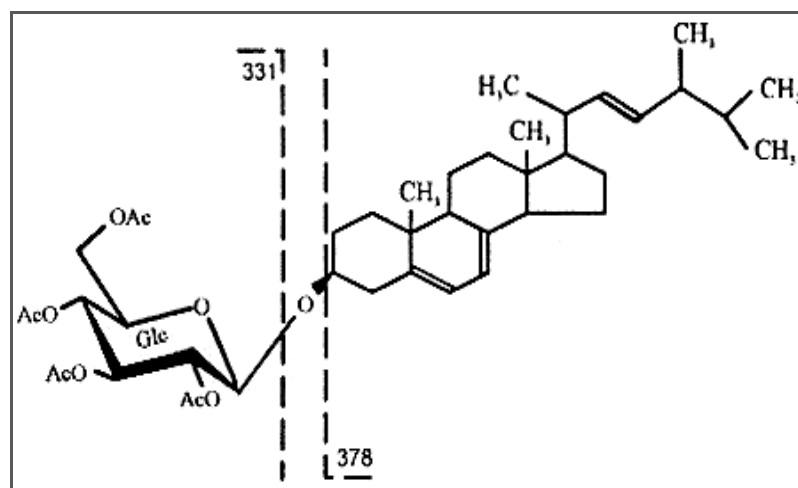


Рис. 3.3.16. Структура ацетильованого ергостеролглюкозиду. Сполуку виділяли із рекомбінантного штаму *S. cerevisiae*, що експресував стерол глюкозилтрансферазу (Pd_g3/Atg26) з метилотрофних дріжджів *P. pastoris* [429]. Ця сполука, фізіологічна важливість якої раніше не була відома, є особливо необхідною для пексофагії у *P. pastoris* (див. основний текст).

Це робить Atg26 цілком унікальним серед відомих білків пексофагії, оскільки для цього Atg білка відома специфічна метаболічна функція. Встановлено, що відповідний ген *P. pastoris* *ATG26* (*UGT51/PAZ4/PDG3*) окрім пексофагії є необхідним для ряду інших залежних від вакуолей процесів [208]. Оскільки гомологи Atg26 є єдиними ферменти у клітинах дріжджів з

каталітичною активністю стеролглюкозилтрансфераз, делеції або пошкодження відповідних генів повністю виключають синтез глікозильованих стеролів, зокрема ергостеролглюкозиду (SG) (Рис. 3.3.16) [429].

3.3.5.2.1. Клонування та аналіз послідовності *ATG26* гена *P. pastoris*

Колекція УФ-індукованих мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією була виділена як описано вище за допомогою аналізу на залишкову активність пероксисомної АОХ після перенесення мутагенізованих колоній з метанолу на глюкозу або етанол. Подібно до описаного вище *ATG28* гена, ген *PDG3/ATG26* (обидві назви гена *PDG3* і *ATG26* і назви мутантів можуть використовуватися в залежності від контексту у цьому розділі) був виділений з геномної бібліотеки за допомогою функціональної комплементачії мутанта *pdg3*, шляхом селекції на основі алілового спирту [319], як описано у розділі «Матеріали і Методи». Його білковий продукт виявився високогомологічним до UDP-глюкозилтрансфераз дріжджів (у *S. cerevisiae* кодованої геном *UGT51*) і містив специфічні для них РН, GRAM і каталітичні домани, як встановлено на Рис. 3.3.3.17. Пізніше ген був позначений як *ATG26* відповідно до загальної класифікації відомих *ATG* генів [420].

3.3.5.2.2. Конструювання делеційного мутанта *pdg3/atg26* та фенотиповий аналіз *atg26* мутантів

Штам з делецією гена *ATG26* *P. pastoris* конструювали як описано у Матеріалах та Методах. Диплоїди, отримані у результаті схрещування вихідного мутанта *pdg3* зі сконструйованим делеційним штамом, виявляли мутантний фенотип, що підтверджує, що УФ-індукований та сконструйований делеційний мутанти мають пошкоджений один і той же ген. Подальші дослідження показали, що вихідний мутант *pdg3-14* і делеційний штам проявляли, по суті, ідентичний мутантний фенотип.

ScUGT51 1 -----MPITOMISASDSEAGPKPSISLWDDKPSDEPETS PRHHRLSFLSLK-----FKRWGRGSMSSLSMGSSEOO
 PpPdc3p 1 MSQLRPRDSSAGKSSSPRTDRNPEISIDVNSKGGSDGMI---SGLVPGIAPAKEDETAEDDIDCGRLITSKSLAM---
 HpPdc3p 1 MS-----GDESTEPECDSMTIESQSLSFLEPEDEQRQRKDSGLQSQSL-----TKRHFAFSPHRLITISIRHSPHK
 YlPdc3p 1 ---MVPQTDWRSSISIKTRRTVMKSKHPRFP PRQSRLLQPCRRRRLQPPRLILIQAPIHP SRHCTQSRITHRHSRSPRR

ScUGT51 66 ELQDSPNEARSDDDENGYNNMDAD---DLAKSKYMMKS IAGLLTTASVYAGMNAQEMNVLSQ-----
 PpPdc3p 75 -----LTTASVYAGVSOLDDAIESSALDEPIPVVPEEDAES
 HpPdc3p 66 PRPKSESRVPVPKLHSLPPQRLASPERDKPSIEGISKSFVSLTAAVYAGFQDLEGEDQQVSPDDVSAGESEDQADES
 YlPdc3p 77 CLTLCLRLSVTLTLLTKP---ADAARLNRYAYTPTIEDLFLITQPSTQTS-----

ScUGT51 126 VDSEESDSDSFOENIGRNEVKSKEKMLKTKSHPEIPRLDKPKPTLFDL-----SITREKLSKDA
 PpPdc3p 113 VMSESTVGVW---TVRDTDSSEQI-----NPEIDGLVALKPKQOHTLSKPELSVWRKRCSQLSLAGSSSGSTRNSFTLDA
 HpPdc3p 146 SDEOEDDDCQDRTFYATDPSPTELTINENTPLPEPEPPERTLRKARSFEFSVVK-----RLSEMEMO
 YlPdc3p 124 -----EVARREKNTENDVNSQHDSVFAAYEKCHGGAMPPEHQSNKTEYFQO-

GRAM

ScUGT51 186 VA-----KLEORFOLDDEOPFLMDFAWLLKDWLVQGHIFITDGHFLFFAYLPEKMPRSVKMSGMLNDR---TKLIRS
 PpPdc3p 186 NETTRAVKLCCKLKTTFDLSDDDDFWMDYFCMLLHEWELQGHYITTSYLLMFAFLPKEDSTVIMSGALSIRSSTIMRFS
 HpPdc3p 210 LAQKRALALSNKLRITFDLSDTQVETSDYFCMLQGVLLQGHLYITDGHILFFAFLPKMQGSSKSGALITKSYPSIREH
 YlPdc3p 169 -----KLRGFALNDVDEQLDADYBVMLLQVLLQGHLYITDGHMQLSYLPRQONANIFSGILVKARKRSLREG

PH

ScUGT51 255 TRVYCVLAKNHLFESVYTSSTELYFFVLIIDLREVDQDETQKHJ---LNGSAIKIPIKIYITESTFKRMADSEFSAESWVNAI
 PpPdc3p 266 WRRQAVLKGNYFRVWASTERYFPLMIDLRFLKVEL---SNPNLEENKPTVVKLITEARTHYFQADSLDNARSWVTDL
 HpPdc3p 290 -RRQAVLQMTFSWYSNSTDLYFHLVIDLSTALRAEILQSSSTKONPSKPVVIRITVSRQHWGLADNLASARSWVSSL
 YlPdc3p 238 TRVYCVLAKNDSFVYVDPSTVYFVAGTIDISEALAAELCDDDEGDVTE---EESRIRVMPKKSVLKADSGSAAHEVVKAL

ScUGT51 332 RKECFADONSENNISLKIPIPWITIEDDOPVWVKALTLRLEALESSQTYAIDDFMFWMDGSGSOVKESL-----
 PpPdc3p 343 RKHIFTAMSGGHVIL-KWPLEMILDLSIETLFEASQILKLVLESEESYAIDDYVDFP-----NN-
 HpPdc3p 369 RKHIFASRNKGDQVAT-KLPLQWVVDLELTSVIGVTKMLRIRKVTESAVTEAIDDYVDFP-----SR-
 YlPdc3p 315 QRETRRANQGDTRVIV-IPDQNVWDREKTKLFEFATVURTSSWVESNTVYAVDWDITRCKFGDDVLRKLTENGVEISGG

ScUGT51 403 -----GFLAILORSGV
 PpPdc3p 404 -----GQVLSISROSM
 HpPdc3p 430 -----GKAVDDIEKVI
 YlPdc3p 394 NFSPRQSQLAVGHKHVTEVVDSTLLHASGHHHFPHSAHHESDGKSNKSHTSRSHTPRMLTPQVTEGQPHDRDEKRD

ScUGT51 415 NDIYYD-----IPAKRSKSSFGKETPAIVEQKMGEDSRYLNVPTSAPVPSSENGKKSFRFR
 PpPdc3p 416 KALGIE-----ITDSDSSESDSDVSGSETNGRSTHRSRLSRLSVLTIIPRGIGSIYKP
 HpPdc3p 442 HDAGM-----I-----SEGTSSEDEEOGVDMMLKSSIE--LKKKPSMVOTSSKSNV
 YlPdc3p 474 SKVPRLLPKFLRRFKDKVDDKCDKPTLVPSPKSRASSRRNSAFGSDRPNLASURTSSTLFP SAPPVTCG SQPTTPGVHA

ScUGT51 470 FRERSNSWFRRAKPLED---SQVEDVEEIKDAANDIDSSVHSTIHIHDOEDSCQOTVAWRKPSHLKNFAE-----
 PpPdc3p 471 IKSSASGIIIGAIIKPKQ---SATRPFSSVETVWPNDMDSELKQDHAGAPKDS-E PSTKPSN-----WQAKLVQGF
 HpPdc3p 490 PVIRMDPEADDFSQEQE---SAESSKPVSDDEIVSADDMQELKQKQQLANADKENHDKVSRANSRRTWSTRLVQGLT
 YlPdc3p 554 PGSSTPGGSGYGTITPGTPASADSVSLAGTPGWAAPVGDIDGLNGNMPAGIAAFLKPKKSSGGATSSGAAAGATPGCAA

ScUGT51 537 -----
 PpPdc3p 542 SITSSISOSM-----
 HpPdc3p 568 AIT---QGW-----
 YlPdc3p 634 APGSTGNSSPGTPGGLGGP GAVGAGGPGVWGGAE SAPAGTVPQQSHHAGISVVAPHDPAAAAAADAAAPFTRGPGSGIP

ScUGT51 537 -----MIAAKPIHYRNK-FIPFORDDITLKEETEVS-A
 PpPdc3p 552 -----LEASPM-HYNNQLFIERGEDPYPVWIKREEREVA
 HpPdc3p 574 -----MSPSPMAHEDERYAWLRGEDSWFVKDAEQRKAA
 YlPdc3p 714 EIQQDSDSDDDHWHGHI GAEVDEDPQDTFKKKNKRFSTLSKVSDMASGSTRVWGRHTRERLGGDDKHVASAWITEK

GRAM

ScUGT51 569 MRRFRVHRKFNKESLISVYTYVIRM-VVYQKTYVSDTYCFRSLPGSMVYMLPLVDVETCYKRGFRFGYFVWV
 PpPdc3p 585 CSRFRKHSIPDSEELASVYFCHPORN-IVYQKTYLGTCHCYRSLPGSMVYMLPLVDVETCYKRGFRFGYFVWV
 HpPdc3p 608 TERFRKHSIPDGEKLIATVHAYLVKQ-IVYQKTYLGSNEMCFRSLPGSMVYMLPLVDVETCYKRGFRFGYFVWV
 YlPdc3p 794 MRRFRKRALGTBEELIASVYHCHDRGGITVYQKTYVSDTYCFRSLPGSMVYMLPLVDVETCYKRGFRFGYFVWV

```

3c UGT51 648 QIIGHEELFFETFSREVARDODDERILLKLLDNIYASSA-----EGSNISSASLGGVQHNPDSKMLDPEDMIN-AEGR
PpPdq3p 664 QIIRHEELFFETFSRNESRODCQLFLLKQLDFTNSHKNNAHSEQKRKRNDISIK---LADSVQ-LADARLSEYDTRIEZDIQR
HpPdq3p 667 QIIGHEELFFETFSRDQ&RODCDFMILKQDQMFKNGSTDSPPRASEGSSDESCLM&ES&TSL&S&ARL&EYDTRIEHDA&LGL
YlPdq3p 873 THGQREDEFFETFS&S&SHROD&EV&MLRQLLII&PHIMDDIKS-----DQXML&S&ARL&EYDTRIE&K&E&ANV

3c UGT51 719 EWFLLMIDNPHXKIS---INENKSKNFGLLTI&SRGDSQPYISL&K&LL&KEGHQ&V&I&I&TH&SE&F&D&E&S&H&GI&Q&E&E&IA&GM
PpPdq3p 740 EWFLLMIDNQYSTSE---IF&SK&R&K&NF&GLLTI&SRGDSQPYISL&K&LL&A&E&H&K&K&I&I&V&TH&SE&F&D&E&S&Y&GI&D&T&IA&GM
HpPdq3p 767 DQPLIIEDEHPLTKDK---QEELK&SE&F&D&LLTI&SRGDSQPYISL&K&LL&K&E&GHQ&V&I&I&V&TH&SE&F&D&E&K&H&GI&E&S&A&S&IA&GD
YlPdq3p 939 E&E&P&H&I&E&GN&L&S&V&L&P&GL&T&E&Q&S&K&M&L&E&D&LLTI&SRGDSQPYISL&K&LL&E&E&GHQ&V&I&I&V&TH&SE&F&D&E&E&Y&GI&D&E&K&E&S&A&GD

3c UGT51 796 P&E&L&L&S&L&A&E&E&E&S&K&K&K&L&E&E&S&K&F&R&G&D&I&D&L&L&Q&I&S&O&E&C&I&R&K&F&D&L&I&E&S&P&S&A&M&G&I&H&I&D&E&L&Q&I&P&Y&T&R&A&F&I&M&P&O&T&E&I
PpPdq3p 817 P&E&L&L&S&L&A&E&E&E&S&I&S&G&L&L&E&K&E&F&I&G&O&I&E&L&L&Q&S&O&E&C&I&D&A&---D&O&L&I&E&S&P&S&A&M&G&I&H&I&D&E&L&Q&I&P&Y&T&R&A&F&I&M&P&O&T&E&I
HpPdq3p 844 P&E&L&L&M&L&M&T&H&P&T&D&Y&N&F&I&N&E&K&K&F&R&O&I&D&L&L&Q&I&S&O&K&C&I&D&T&---D&O&L&I&E&S&P&S&I&G&I&H&I&D&E&L&Q&I&P&Y&T&R&A&F&I&M&P&O&T&E&I
YlPdq3p 1019 P&E&L&L&K&I&A&D&E&G&W&F&S&S&E&L&R&D&S&K&F&R&G&D&I&E&L&L&A&S&O&E&C&I&G&S&---D&O&L&I&E&S&P&S&A&M&G&I&H&I&D&E&L&Q&I&P&Y&T&R&A&F&I&M&P&O&T&E&I

UDPGT

3c UGT51 876 R&A&X&P&H&F&V&P&D&O&K&G&G&K&Y&L&T&H&I&F&E&N&V&W&K&G&I&S&G&O&N&K&O&E&V&E&T&L&E&L&E&K&T&L&E&L&L&Q&O&M&N&P&F&L&Y&N&S&P&T&I&F&P&S&I&D&F&S&E
PpPdq3p 895 R&A&X&P&H&F&V&P&D&O&K&E&G&G&K&Y&L&T&H&I&F&E&N&V&W&K&G&I&S&G&V&N&K&O&E&Q&L&S&L&E&K&T&L&E&L&L&Q&O&M&N&P&F&L&Y&N&S&P&T&V&F&P&S&M&D&F&P&H
HpPdq3p 922 R&A&X&P&H&F&V&P&D&O&K&G&G&K&Y&L&T&H&I&F&E&N&V&W&K&G&I&S&G&O&N&K&O&E&V&E&T&L&E&L&E&K&T&L&E&L&L&Q&O&M&N&P&F&L&Y&N&S&P&T&V&F&P&S&M&D&F&S&E
YlPdq3p 1097 R&A&X&P&H&F&V&P&D&O&K&G&G&K&Y&L&T&Y&G&M&F&D&M&V&W&K&G&I&S&G&O&N&E&O&E&K&T&L&E&L&E&P&T&L&D&H&D&O&M&N&P&F&L&Y&N&S&E&S&L&P&E&P&O&D&F&P&I

3c UGT51 956 D&V&E&V&T&G&Y&O&F&L&D&E&G&S&T&F&K&---P&E&A&L&Q&E&F&I&S&D&A&R&S&K&K&L&V&Y&I&G&F&G&S&I&V&O&S&M&A&K&E&S&E&A&V&E&A&V&D&A&D&O&R&C&I&L&N&K&G&O&S&D&R&L&G
PpPdq3p 975 D&V&E&V&T&G&Y&O&F&L&D&E&G&E&A&D&S&E&L&P&E&K&P&L&E&F&E&M&E&K&T&D&G&K&K&L&V&Y&I&G&F&G&S&I&V&O&S&D&E&K&Q&L&E&A&V&I&E&A&V&L&S&D&O&R&C&I&L&N&K&G&O&S&D&R&L&G
HpPdq3p 1002 D&V&E&V&T&G&Y&O&F&L&D&E&S&E&T&---K&O&P&E&V&L&K&F&E&I&E&C&A&R&K&D&G&K&K&V&Y&I&G&F&G&S&I&V&O&S&K&E&S&E&L&T&Q&A&V&D&A&V&L&D&O&R&C&I&L&N&K&G&O&S&D&R&L&G
YlPdq3p 1177 D&V&E&V&T&G&Y&O&F&L&D&E&G&K&D&---E&T&E&D&O&K&L&E&F&E&M&E&K&A&R&D&G&K&K&L&V&Y&I&G&F&G&S&I&V&O&S&D&E&T&A&L&D&K&S&O&E&S&V&L&D&A&D&O&R&C&I&L&N&K&G&O&S&D&R&L&G

3c UGT51 1034 D&K&S&K&K&T&E&D&L&E&R&Y&L&L&K&I&G&N&O&P&H&D&L&F&P&Q&I&D&S&O&N&H&G&G&S&G&T&T&G&A&S&L&R&A&G&L&E&T&I&K&P&F&F&G&D&Q&F&F&A&G&R&O&E&D&I&G&G&I&S&L&K&L
PpPdq3p 1055 K&Q&L&E&V&---E&A&E&L&E&E&I&E&Y&K&S&E&N&O&P&H&D&L&F&K&I&D&S&O&N&H&G&G&S&G&T&T&G&A&S&L&R&A&G&I&E&T&I&K&P&F&F&G&D&Q&F&F&A&G&R&O&E&D&I&G&G&I&G&L&K&L
HpPdq3p 1080 T&M&E&I&---E&A&V&L&E&P&H&Y&R&A&G&S&O&P&H&D&L&F&P&Q&I&D&S&O&N&H&G&G&S&G&T&T&G&A&S&L&R&E&G&O&P&T&I&K&P&F&F&G&D&Q&F&F&A&G&R&O&E&D&I&G&G&G&S&L&K&L
YlPdq3p 1256 K&K&D&K&E&P&E&P&L&E&E&L&Q&I&T&K&E&P&H&D&L&F&P&Q&I&D&S&O&N&H&G&G&S&G&T&T&G&A&S&L&R&A&G&L&E&T&I&K&P&F&F&G&D&Q&F&F&A&G&R&O&E&D&I&G&A&G&I&H&L&K&L

3c UGT51 1114 N&A&Q&I&A&D&A&L&K&Q&A&T&T&K&I&K&O&R&E&G&L&K&K&K&I&S&K&E&D&G&K&O&A&I&S&A&Y&N&E&E&Y&A&R&S&O&T&L&E&R&W&T&P&K&K&E&M&O&S&A&T&K&L&T&P&A&P&T&T&E
PpPdq3p 1123 N&K&K&L&S&K&A&K&E&V&T&T&T&R&I&E&K&K&E&G&K&Q&I&Q&E&R&G&G&S&A&I&R&C&Y&O&E&E&Y&A&K&---L&S&K&S&N&Q&K&Y&O&---D&M&Q&S&E&D&I&S&D&S&V&S
HpPdq3p 1158 N&Y&K&L&A&R&A&L&K&E&V&T&T&R&I&E&K&K&L&G&A&R&I&S&E&T&G&Q&A&I&E&T&Y&N&E&E&Y&A&R&S&---L&S&I&S&N&Q&K&Q&S&V&O&K&S&D&E&F&D&D&K&E&E&V&E
YlPdq3p 1236 N&V&S&Q&F&S&K&A&L&O&E&A&T&H&E&P&R&I&E&S&A&A&G&G&O&I&E&S&E&N&G&I&S&A&I&Q&A&Y&R&D&L&Y&A&R&S&---L&V&Q&K&S&G&Y&T&P&T&S&D&K&E&E&T&O&T&L&V&O&I&E&R

3c UGT51 1194 G&W&T&M&I&-----
PpPdq3p 1206 G&S&O&F&E&V&-----
HpPdq3p 1226 G&S&O&L&L&O&-----
YlPdq3p 1414 Q&M&Q&D&E&E&K&H&N&L

```

Рис. 3.3.17. Порівняння *P. pastoris* Atg26 (Pdg3) з білками-ортологами з дріжджів *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* та *Y. lipolytica*. Позначено передбачений РН-домен (а/к 247-348) GRAM (а/к 585-647) та УДФ-глюкозилтрансферазний домен (а/к 1091-1133).

Встановлено, що дефіцит Atg26/Pdg3/Ugt51 у *P. pastoris* впливає як на глюкозо-, так і на етанол-індуковану деградацію АОХ, тобто мікро- і макропексофагію (Рис. 3.3.18). Також було виявлено, що мікропексофагія у *atg26* мутанта є заблокованою на стадії гомотипового злиття вакуолярних мембран навколо кластерів пероксисом, а білок АОХ залишається обмеженим люменом пероксисом, як встановлено методами електронної мікроскопії та імуноцитохімії

(Рис. 3.3.18 В). При експозиції до етанолу утворення багатошарових ізолюючих пероксисоми мембран затримувалося, хоч і не було повністю заблокованим, але пероксисоми залишалися інтактними протягом аналізу у мутантів. Це дані свідчать, що у *P. pastoris* каталітичний продукт Atg26 SG бере участь у процесі макропексофагії, але не є при цьому, на відміну від мікропексофагії, строго необхідним.

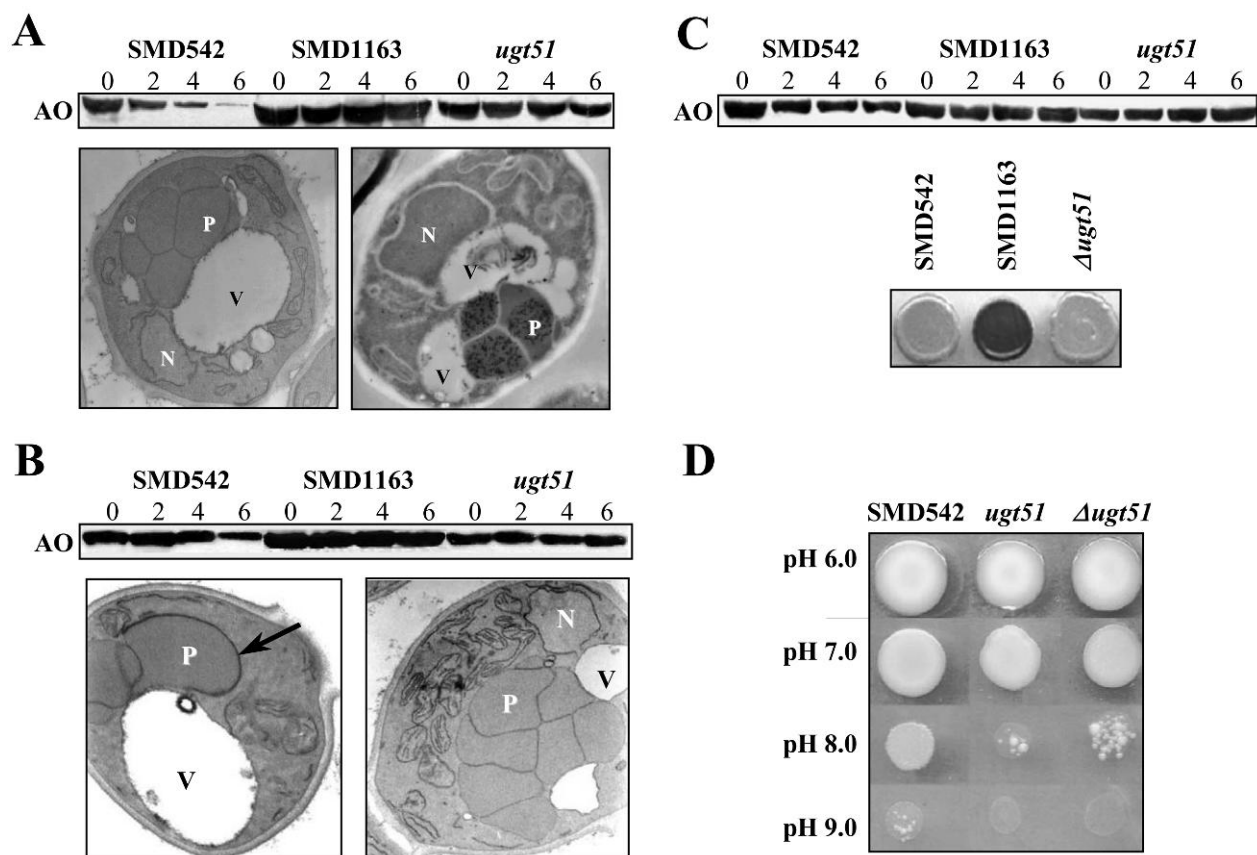


Рис. 3.3.18. Аналіз дефектів пексофагії та вторинних фенотипів *atg26/ugt51* мутантів *P. pastoris*. **(А)** Морфологія клітин *atg26/ugt51* мутанта через 3 год. після перенесення з метанолу на глюкозу (ліворуч). Імуноцитохімічна візуалізація АОХ після 1 год. адаптації до глюкози (праворуч); Р – пероксисома, V – вакуоля, N – ядро. Вище встановлено динаміку білка АОХ у клітинах штаму дикого типу (SMD542), протеазо-дефіцитного мутанта (SMD1163) і *ugt51*. **(В)** Морфологія клітин SMD542 через 1 год адаптації до етанолу. Додаткові автофагійні мембрани показані стрілкою (зліва); морфологія клітин *ugt51* через три години адаптації до етанолу; динаміка білка АОХ аналогічно до **(А)**. **(С)** Динаміка білка АОХ після індукції загальної автофагії при голодуванні за нітрогеном та забарвлення клітин флоксином В після 2 діб голодування. **(D)** Порівняльний аналіз чутливості клітин до підвищеного рН. Клітини інкубували на чашках з YPD із зазначеними показниками рН протягом 4 діб.

Як зазначено вище, флоксин-В забарвлює у темно-фіолетовий колір клітини мутантів з пошкодженою загальною автофагією на безазотному середовищі (408). Згідно з відповідним тестом, процес загальної автофагії не зазнав впливу у *atg26* мутантів, порівняно з контрольним протеазо-дефіцитним штамом (Рис. 3.3.18 В).

Тим не менше, деградація пероксисомного АОХ була дещо сповільненою у *atg26* штамів порівняно зі штамом дикого типу при голодуванні за нітрогеном (Рис. 3.3.18 С). Таким чином, *PpAtg26* не є строго необхідним для процесу загальної автофагії. Відомо, що важливі для автофагійних процесів вакуолі є також залучені до інших споріднених функцій, таких як стійкість до стресу у відповідь на підвищену температуру або зміни позаклітинного рН [431]. Ми виявили, що *atg26* мутанти *P. pastoris* є більш чутливими до підвищеного рН відносно штаму дикого типу (Рис. 3.3.3.18D), тоді як відповідь до підвищеної температури не зазнавала змін. Це спостереження передбачає, що *PpAtg26* і його каталітичний продукт SG відіграють роль в іншій окрім автофагії функції вакуоль. Однак самі вакуолі у *atg26* мутантів не виявляли будь-яких видимих морфологічних змін відносно штаму дикого типу. Раніше було встановлено, що SG накопичується в *P. pastoris* у відповідь на стресові умови, такі як тепловий шок або надлишок етанолу [430].

Дійсно, *atg26* мутанти також виявились більш чутливими до підвищених концентрацій етанолу відносно штаму дикого типу.

Поліклональні кролячі антитіла, отримані нами проти С-кінцевого фрагмента білка *Atg26 P. pastoris*, розмірами 195 амінокислотних залишків, були використані для вивчення, яким чином джерела карбону впливають на регуляцію його синтезу. Продемонстровано, що *Atg26* білок з передбаченим розміром приблизно 134 кДа присутній у безклітинних екстрактах з клітин штаму дикого типу, що росли на метанолі та глюкозі. Кількість білкового продукту була відносно вищою у метанол-індукованих клітинах (Рис. 3.3.19).

У той же час, *Atg26* не детектувався в екстрактах УФ-індукованого мутанта *pdg3-14* і сконструйованого делеційного штаму *Δatg26*. Це свідчить про те, що мутація у вихідного мутанта *pdg3-14* призводить до відсутності щонайменше *Atg26* з С-кінцевою ділянкою з каталітичним доменом (Рис. 3.3.19). Однак слід

відзначити труднощі з оптимізацією процедури екстракції для вивчення регуляції Pdg3. Виявилось, що цей, імовірно пов'язаний мембранами білок, є дуже нестабільним *in vitro*.

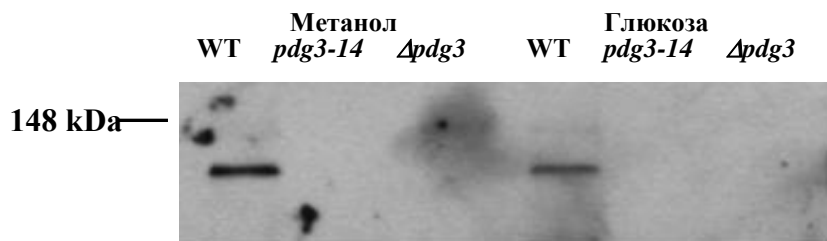


Рис. 3.3.19. Вестерн-блот аналіз експресії Atg26 при рості на різних джерелах карбону.

Також було розглянуте питання, як цитозольні репресибельні ферменти, формальдегіддегідрогеназа (FLD) і гетерологічна β-галактозидаза (β-Gal), експресована під P_{AOX} інактивуються при переведенні клітин із метанол- до глюкозо-вмісного середовища. Було продемонстровано, що кінетика активностей FLD і β-Gal у клітинах штаму дикого типу значно відрізняється від відповідних показників для пероксисомних AOX та каталази (CAT) (дані представлені лише для AOX і β-Gal, експресованих під ідентичним промотором, Рис. 3.3.20). Очікувано виявилось, що інактивація(деградація) β-Gal (а також FLD) глюкозою є вакуолезалежною, оскільки є блокованою у безпротеазного мутанта SMD1163. Крім того, залишковий рівень білка β-Gal у штаму дикого типу був вищим, порівняно з AOX, що свідчить, що пексофагія є швидшим та ефективнішим процесом, ніж degradaція цитозольних білків (Рис. 3.3.20). Також, індукована глюкозою degradaція гетерологічного білка β-Gal, який очевидно не має епітопів для селективного розпізнавання автофагійним механізмом *P. pastoris*, передбачає, що цей процес є загалом неселективним (bulk turnover), у якому дефіцит SG також впливає на вакуолярну функцію.

Важливо також відзначити, що аналогічний мутант у алкан-утилізуючих дріжджів *Y. lipolytica*, виділений Т. Назарком в ІБК НАН України, демонстрував нормальну degradaцію пероксисом, але виявляв порушення в утилізації алканів з

короткою довжиною ланцюга [208]. Високий рівень консерватизму у амінокислотній послідовності між декількома ділянками гомологів Ugt51p у *P. pastoris* і *Y. lipolytica* (57% ідентичності та 71% подібності) переконливо свідчить про те, що ці білки є функціональними ортологами (див. Рис. 3.3.17).

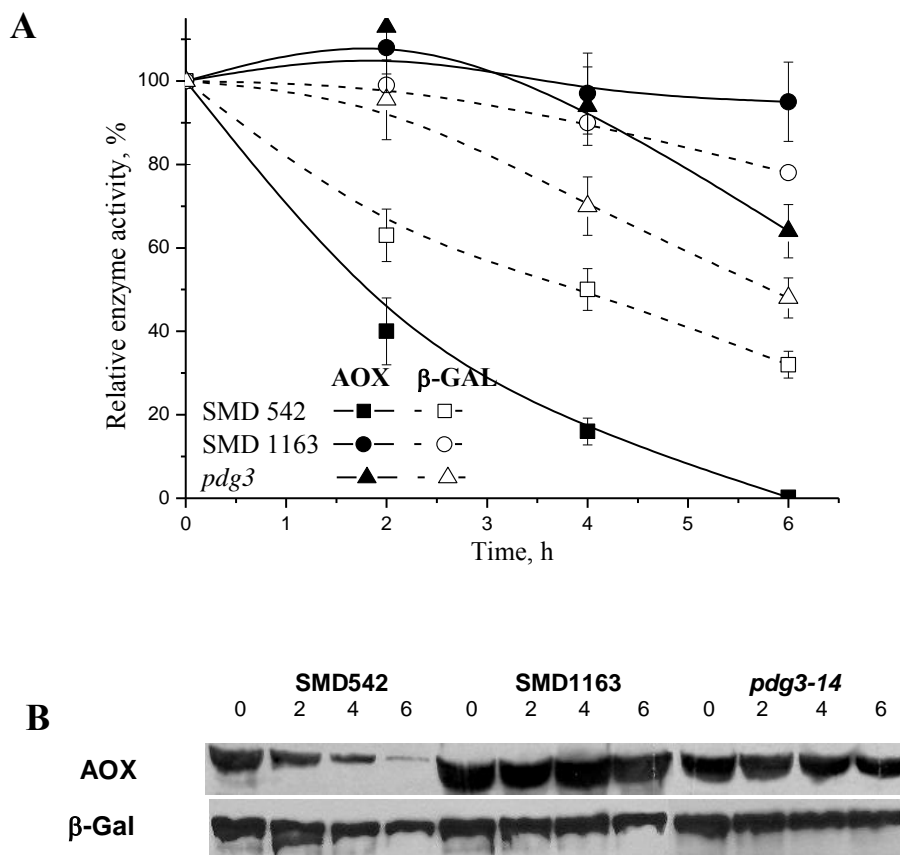


Рис. 3.3.20. Аналіз динаміки цитозольних ферментів у *atg26* мутанта за умов індукції мікропексофагії **(А)** Кінетика питомих активностей пероксисомної АОХ і цитозольної β -Gal у штамі дикого типу, SMD542, УФ-індукованого мутанта *pdg3-14* і безпротеазного мутанта SMD1163 при адаптації до глюкози. **(В)** Часозалежний Вестерн-блот аналіз деградації білків АОХ і β -Gal.

Відповідно, нами були сконструйовані вектори, що експресують гени *ATG26* *P. pastoris* і *Y. lipolytica*, щоб дослідити можливу міжвидову комплементацию. Було встановлено, що ген *P. pastoris* лише частково комплементує дефект росту *atg26* мутанта *Y. lipolytica* на декан-дефіцитному середовищі, тоді як експресія гена *Y. lipolytica* у *atg26* мутанта *P. pastoris* не відновлює дефект пексофагії.

Таким чином, наші дані свідчать про те, що функція стеролглюкозилтрансфераз у пексофагії не є консервативною серед різних видів дріжджів. Для вирішення питання чи функція білків Atg26 в пексофагії зберігається у інших метилотрофах, був проведений відповідний аналіз у *H. polymorpha* (див. наступний параграф).

3.3.5.3. Виділення і характеристика мутанта *H. polymorpha*, дефіцитного за гомологом Atg26

3.3.5.3.1. *In silico* аналіз амінокислотної послідовності *H. polymorpha* Atg26

Використовуючи програму BLAST, у геномній базі даних *H. polymorpha* (<http://ssl.biomax.de/rheinbiotech>) було виявлено ген *HpATG26*, що є найближчим гомологом гена *PpATG26* [208]. Передбачений білковий продукт цього гена складається з 1241 амінокислотних залишків і демонструє 46% ідентичності і 65% подібності з амінокислотою послідовністю *PpAtg26*. Аналогічно до *PpAtg26*, *HpAtg26* містить каталітичний домен, локалізований в С-кінцевій ділянці білка, і GRAM і PH домени в N-кінцевій частині (Рис. 3.3.17).

3.3.5.3.2. Конструювання делеційного мутанта по *HpATG26* гену та аналіз його фенотипу

Для детального аналізу фізіологічної ролі *HpAtg26* у пексофагії нами був сконструйований відповідний делеційний штам як описано у розділі «Матеріали і Методи». Спочатку мутант аналізували на предмет залишкової активності АОХ при індукції пексофагії, візуалізуючи активність ферменту у колоніях дріжджів [319]. Як встановлено на Рис. 3.3.21, після перенесення вирощених на метанолі клітин на середовище з глюкозою або етанолом, петчі клітин дикого типу NCYC495 *leu1-1* мали білий колір, що вказує на повну деградацію АОХ за механізмом макропексофагії.

На противагу, мутантні клітини $\Delta atg26$ зафарбовувалися у темний фіолетовий колір хромогенного субстрату, що відповідає рівню залишкової активності АОХ, і що вказує на порушення пексофагії. Пошкодження деградації

АОХ у $\Delta atg26$ також було підтверджено імуноблот-аналізом з використанням специфічних анти-АОХ антитіл (Рис. 3.3.21В).

Як видно з Рис. 3.3.21, імунореактивна смуга, що відповідає АОХ, повністю зникала для штаму дикого типу після 9 годин адаптації до глюкози або етанолу, тоді як у делеційного мутанта білок АОХ зберігався. Таким чином, «leaky» фенотип $\Delta atg26$ мутанта *H. polymorpha* свідчить, що, подібно до *P. pastoris*, *HpAtg26* є частково але не абсолютно необхідним для макропексофагії у цього виду.

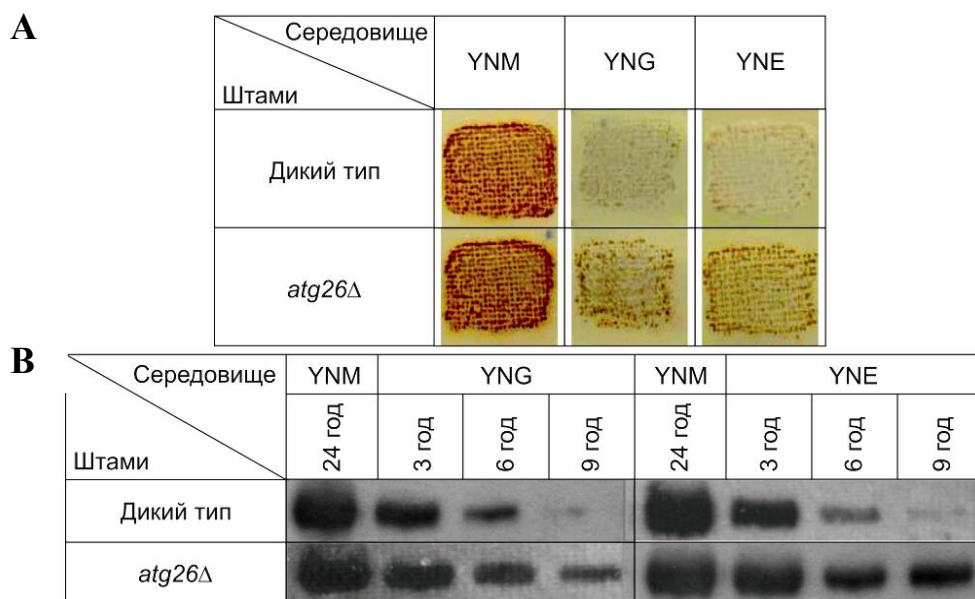


Рис. 3.3.21. Аналіз фенотипу мутантного штаму $\Delta atg26$ *H. polymorpha*. **(А)** Візуалізація АОХ активності в колоніях дріжджів, вирощених на метанолі та перенесених на глюкозо- (YNG) або етанол-вмісне (YNE) середовища (концентрація субстрату карбону 1%). **(В)** Кінетичний аналіз пексофагії. Клітини тих же штамів вирощували у рідкому середовищі з метанолом і переносили на YNG або YNE для індукції пексофагії. Зразки відбирали у зазначені часові точки після перенесення з метанолу. Безклітинні екстракти нанесли у кількостях, що відповідають рівним об'ємам культури і аналізували рівень білка АОХ за допомогою Вестерн-блот аналізу.

3.3.6. Селекція етанол-неутилізуючих мутантів *H. polymorpha* та аналіз процесів катаболітної регуляції

Цілий ряд мутантних штамів з порушеною глюкозною регуляцією були виділені і досліджені у *H. polymorpha*, що дозволяє розшифрувати деякі із залучених механізмів, але подібне не стосується катаболітної регуляції

індукованої етанолом. Етанол, подібно до глюкози, спричиняє катаболічну репресію синтезу пероксисом (а отже і пероксисомних метилотрофних ферментів), а також макропексофагію у цих дріжджів. Проте, як саме молекулярний сигнал етанолу транслюється ці глобальні ефекти і яким чином він пов'язаний із метаболізмом етанолу залишається невідомим. Нами здійснена спроба ізолювати мутанти, що не утилізують етанол, та дослідити вплив відповідних мутацій на етанольну катаболітну репресію і пексофагію.

3.3.6.1. Виділення мутантів *H. polymorpha*, що не утилізують етанол

Штам дикого типу *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* був підданий УФ-мутагенезу, як описано в [335], із приблизно 1% рівнем виживання клітин, після чого клітини висівали на середовище YND з глюкозою у розведенні, що забезпечує ріст декількох сотень мутагенізованих колоній на чашку. Після декількох днів інкубації отримані колонії реплікували на середовище YNE з 1% етанолом. Кілька клонів були ідентифіковані з понад 10 тис. проаналізованих колоній, як нездатні утилізувати етанол як єдине джерело карбону. З них для подальшого аналізу відбирали лише ті, що були здатні рости на середовищі з метанолом. Диплоїди, отримані шляхом схрещування Eth⁻ зі штамом дикого типу та між собою, виявились здатними утилізувати етанол, таким чином виділені мутації були рецесивними та стосувались різних генів. Два мутанти, позначені як 2Eth⁻ та 3Eth⁻ були відібрані для подальшого аналізу (однак пізніше 3Eth⁻ мутант виявився недостатньо стабільним і був відкинутий).

Як альтернативний підхід до селекції етанол-неутилізуючих мутантів була використана відома позитивна селекція на мінеральному середовищі YNB із гліцеролом та фторацетатом (FA) [432]. Штами, стійкі до цього антиметаболіта, зазвичай виявляють мутації у ферменті катаболізму етанолу ацетил-КоА-синтетазі, який перетворює ацетат в ацетил-КоА. Виявилось, що усі виділені у результаті такої селекції мутанти, що не утилізували етанол, належать до однієї групи комплементатії, позначеної нами як FA^R (фторацетат резистентні).

3.3.6.2. Аналіз фенотипу мутантів *H. polymorpha*, не здатних утилізувати етанол

Далі, виділені Eth⁻-мутанти були проаналізовані на предмет росту на агаризованому середовищі з додаванням альтернативних джерел карбону. Результати цього тесту підсумовані у таблиці 3.3.4

Таблиця 3.3.4.

Аналіз росту мутантів *H. polymorpha*, нездатних утилізувати етанол на різних джерелах карбону

Субстрат / штам	Етанол	Метанол	Глюкоза	Гліцерол	Гліцерол + FA	Ацетат	Сукцинат	Етанол + Метанол
2Eth ⁻	-	+	+	+	-	+	+	-
3Eth ⁻	-	+	+	+	-	-	+	-
13-FA ^R	-	+	+	+	+	-	+	-
WT	+	+	+	+	-	+	+	+

Отже, усі виділені мутанти виявляли специфічний щодо утилізації етанолу фенотип і були здатні до росту на глюкозі, гліцеролі або метанолі. Крім того, як можна було очікувати, FA^R-мутанти також не могли утилізувати ацетат, але були здатні до росту на сукцинаті, таким чином підтверджуючи, що відповідні генетичні мутації порушували метаболічну стадію після біосинтезу ацетату. Один із FA^R мутантів був використаний для подальшого фенотипового аналізу. Виявилось, що один із мутантів, виділених методом негативної селекції, а саме 2Eth⁻, не утилізував етанол, але добре ріс на чашках з додаванням ацетату або сукцинату, що свідчить про те, що відповідна мутація вплинула на стадію до утворення ацетату, тобто стадію синтезу ацетальдегіду алкогольдегідрогеназою, або конверсії останнього в ацетат ацетальдегіддегідрогеназою. Слід також зазначити, що усі проаналізовані мутанти не росли також і на суміші метанолу з етанолом, що свідчить про те, що етанольна репресія не порушена відповідними мутаціями. Візуалізація активності АОХ також виявила, що усі мутантні колонії були АОХ-негативними на суміші двох спиртів.

Далі ми звернулися до питання, чи впливають досліджувані мутації на активовану етанолом інактивацію АОХ, іншими словами пексофагію. Як встановлено на Рис. 3.3.22, мутанти Eth⁻ і FA^R суттєво не відрізнялися від батьківського штаму щодо кінетики активності АОХ при адаптації до етанолу. Хоча ці попередні дані не були обгрунтовані більш детальним аналізом, вони попередньо свідчать, що метаболізм етанолу не є необхідним для сигналювання як катаболітної (транскрипційної) репресії, так і катаболітної інактивації (пексофагії). Отже, специфічні молекулярні рецептори для етанолу, які передають сигнал від цього ефектора, все ще чекають ідентифікації.

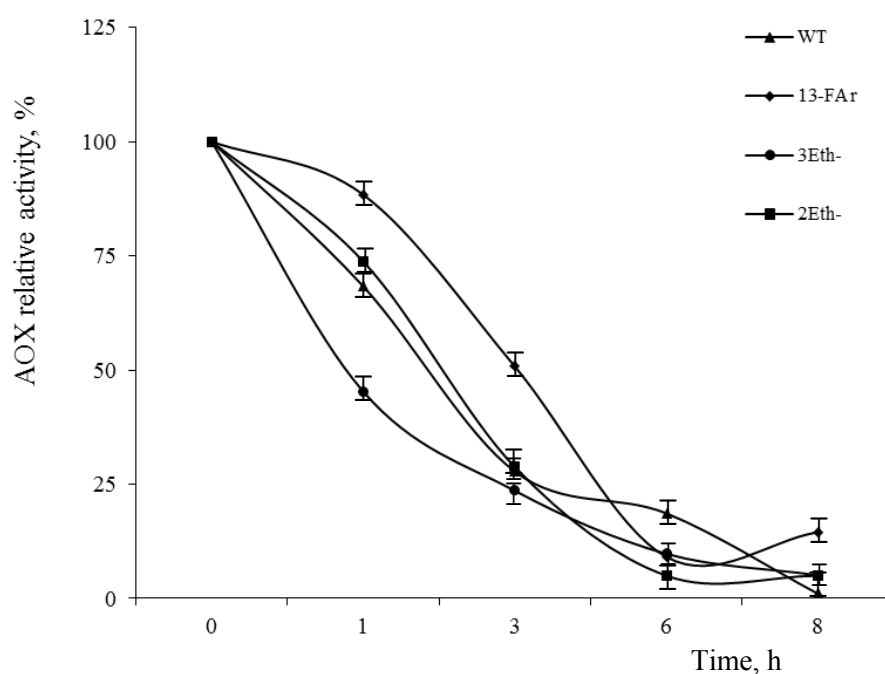


Рис. 3.3.22. Аналіз етанольної катаболітної інактивації у виділених Eth⁻ мутантів. Встановлено кінетику інактивації АОХ у клітинах мутантних *H. polymorpha*, не здатних утилізувати етанол, вирощених на метанолі та перенесених у середовище з 1% етанолом.

Слід зазначити, що наші неодноразові спроби клонувати пошкоджений ген у 2Eth⁻ -мутанта шляхом функціональної комплементачії з геномною бібліотекою *H. polymorpha* виявились невдалими. Причиною може бути або винятково великий розмір пошкодженого гена, або рідкісний випадок двох незалежних, але генетично-пов'язаних, мутацій в окремих сусідніх генах. Проте, зворотне

схрещування (backcrossing) зі штамом дикого типу та аналіз численного спорового потомства не підтвердили останнє припущення, оскільки усі результуючі Eth⁻ колонії були по суті ідентичні до вихідного 2Eth⁻ мутанта.

2Eth⁻-мутант, проте, виявився важливим для біотехнологічного використання, зокрема для конструювання ефективних продуцентів біопаливного етанолу з цукрів у *H. polymorpha* [342]. Це було зумовлено або нездатністю мутанта повторно використовувати (реутилізувати) етанол у процесі ферментації, або і внаслідок додаткового підвищення продукції етанолу мутантом під час напіваеробної ферментації [433]. З метою аналізу причини нездатності мутантів використовувати етанол, було проаналізовано спектр активностей алкогіль- (ADH) та альдегіддегідрогеназ (ALD) у мутанта у порівнянні зі штамом дикого типу. Виявилось, що мутант відрізнявся у приблизно 6 разів вищою загальною активністю ADH, але одночасно зникненням щонайменше двох присутніх у клітинах штаму дикого типу ізоформ ADH (аналіз проведено к.б.н. Г. Гайдою, ІБК НАНУ) [433]. У той же час сумарна ALD активність була значно меншою у 2Eth⁻ [433]. Таким чином, цей біохімічний аналіз показав, що 2Eth⁻ мутація виявляє складний плейотропний ефект на активності дегідрогеназ, що потенційно беруть участь у катаболізмі етанолу і можливо стосується неідентифікованого транскрипційного фактора.

3.3.7. Обговорення

Серед мішеней автофагійних процесів у клітинах дріжджів є пероксисоми, – органели, що містять ферменти-оксидази та каталази (детальніше див. Розділ 1.3). Метою експериментального дослідження, описаного у розділі 3.3, було встановити та охарактеризувати нові молекулярні компоненти, що контролюють, як клітини селективно мітять, доставляють і перетравлюють внутрішньоклітинні білки та органели у процесах автофагії у відповідь на метаболічні потреби клітини та зовнішні стимули. Базовою експериментальною моделлю у наших дослідженнях були дріжджі *P. pastoris*. Унікальною особливістю *P. pastoris* є існування двох морфологічно-відмінних типів пероксисомної деградації мікро- і

макропексофагії, у залежності від ефекторного вуглецевого субстрату (глюкози або етанолу, відповідно). Окрім цього, як і в багатьох інших видів, голодування за нітрогеном викликає у них неселективну (загальну) автофагію.

Ми ідентифікували декілька нових генів пексофагії за допомогою функціональної комплементачії виділених та охарактеризованих УФ-індукованих мутантів, а саме, *PDG2* (*ATG28*) та *PDG3* (*UGT51/ATG26*), та методом дріжджового дво-гібридного скринінгу ген *ATG35*, а також з допомогою прямого клонування ген *VPS15*. *ATG26*, *ATG28* та *ATG35* в основному беруть участь у селективній пексофагії, але не в загальній автофагії. Один із ідентифікованих нових генів, *PDG1/PEX36*, був охарактеризований як необхідний для механізмів біогенезу пероксисом і, ймовірно опосередковано, для пексофагії, і буде описаний у наступному розділі.

Зокрема нами клоновано та функціонально охарактеризовано передбачуваний гомолог гену *VPS15* (vacuolar protein sorting) у *P. pastoris*. Обґрунтування цієї роботи почалося зі спостереження групою професора М. Венхауса з Університету Гронінгена, Нідерланди, що ген *H. polymorpha PDD1*, необхідний для селективної деградації пероксисом ц цих дріжджів, є гомологом *S. cerevisiae VPS34* [416]. Також було відомо, що Vps34 є необхідним для правильного сортування вакуолярних протеаз і ендоцитозу у *S. cerevisiae* [400], [401], [434], і що його активація залежить від кінази ScVps15 [402]. Фосфорильований ScVps34 релокалізується до неідентифікованих внутрішньоклітинних мембран, де два білки утворюють комплекс. Така асоціація призводить до фосфорилування ScVps34 молекул фосфатидил інозиту (PtdIns) у ліпідному бішарі. Вважається що локалізовані ділянки PtdIns-3-P у мембранах надалі рекрутують чи активують інші ефекторні чи білкові молекули, важливі для вакуолярного сортигу чи ендоцитозу [435]. Виходячи з цього було висунуте припущення, що гомолог *P. pastoris Vps15* (як активатор Vps34) також може бути важливим і для процесу пексофагії.

Як уже згадувалося, у клітинах *P. pastoris* пероксисоми деградують за механізмом макроавтофагії при адаптації до етанолу і мікроавтофагії при

адаптації до глюкози. Обидва механізми залежать від комплексу генів, задіяних у механізмі загальної неселективної автофагії. Наявність двох відмінних шляхів підтверджується існуванням мутантів *P. pastoris*, які є дефектних за лише за мікроавтофагією, але здатних деградувати органели за допомогою макроавтофагії [197], [415].

У наших експериментах делеція *PpVPS15* призводила до раннього блокування пероксисомної деградації перед початком поглинання органел вакуолями як при мікро- так і макропексофагії. Цей фенотип є практично аналогічним до описаного для штаму *H. polymorpha pdd1 ($\Delta vps34$)* [399], що вказує на те, що, як і в вакуолярному сортигу, продукти цих генів функціонують спільно у пексофагії. Подібно до відповідних мутантів пекарських дріжджів, *H. polymorpha $\Delta vps34$* та *P. pastoris $\Delta vps15$* мутанти є чутливими до підвищених температури. Крім цього, штам *H. polymorpha $\Delta vps34$* є дефектним у сортигу вакуолярної протеази карбоксипептидази Y [399].

Отже, виходячи із консерватизму функціональних доменів та подібності мутантних фенотипів, гени *VPS34* та *VPS15* *H. polymorpha* та *P. pastoris* є функціональними гомологами відповідників у *S. cerevisiae*.

Просте пояснення дефектів пероксисомної деградації, які спостерігаються у *$\Delta vps15$* та *$\Delta vps34$* штамів метилотрофів, полягають у тому, що ці мутанти мають редуковану вакуолярну протеолітичну активність унаслідок дефектів їх вакуолярного сортигу. Однак у такому випадку відповідні мутанти мали б виявляти акумуляцію пероксисом у вакуолях, подібно до мутантів, дефіцитних за вакуолярними протеазами [198], [202]. Більш задовільним поясненням, яке узгоджується з нашими спостереженнями на *P. pastoris $\Delta vps15$* , полягає у тому, що комплекс Vps15/Vps34 шляхом фосфорилування молекул PtdIns бере участь у міченні органел для доставки у вакуолі. Таким чином, наші дані вказують на те, що Vps34/Vps15 фосфатидилінозитол 3-кіназний комплекс відіграє роль у кожному з численних шляхів доставки до вакуоль, включаючи загальну автофагію. Схематичне зображення цих передбачуваних функцій наведено на Рис. 3.3.23.

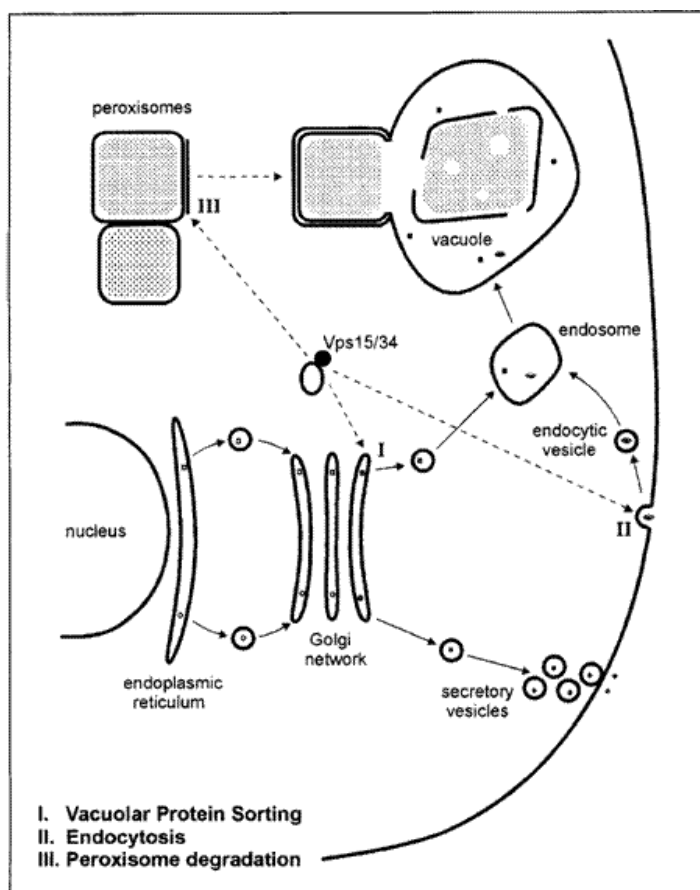


Рис. 3.3.23. Схематичне зображення функцій Vps34/Vps15 PI3K-комплексу у дріжджів. Компоненти цього комплексу відіграють важливу роль у сортигу розчинних вакуолярних білків з комплексу Гольджі до ранніх ендосом (I), залученні до шляху ендоцитозу (II) і необхідності у селективній пексофагії (III). Запропоновано, що мішенями активності PI3K комплексу є певні внутрішньоклітинні мембрани, що забезпечують утворення везикулярних структур, які транспортують білки до ендосоми (I, II) або ініціюють процес секвестрації органел під час мікро- і макропексофагії (III).

У цьому розділі ми також описуємо ідентифікацію нового гена пексофагії у *P. pastoris* ATG28, і фенотипового дослідження відповідних мутантів. Слід підкреслити, що успішна ідентифікація цього та інших нових генів стала можливою після ретельної адаптації методу селекції на основі алілового спирту для *rex* мутантів з пошкодженим біогенезом пероксисом для селекції шляхом збагачення функціонально-комплементованих банком генів УФ-індукованих мутантів по пексофагії (див підрозділ 3.3.2 та [319]). Іншим дослідницьким групам без такого інструменту довелось використовувати лише випадковий

інсерційний мутагенез у селекції *atg* мутантів. По-друге, після перших раундів генетичного аналізу виділених нами пексофагійних мутантних кандидатів (*pdg*-мутанти), ми вирішили детально дослідити лише ті з них, які не виявляли або мали легкі дефекти загальної автофагії (як можна було судити за тестом із флоксином-В на чашках Петрі) [422], і таким чином зосередитись на генетичних елементах, які забезпечують селективне маркування мішеней (органел) і їхню доставку під час пексофагії. *PpATG28* був одним із таких генів.

Ми виявили, що *Atg28* насамперед бере участь у селективній пексофагії, індукованій альтернативними джерелами карбону, але не у загальній автофагії, індукованої голодуванням за нітрогеном. Слід зазначити, однак, що пізніше при глибшому та більш детальному аналізі [225] було відмічено, що *Atg 28* все ще відіграє певну роль у загальній автофагії. Авторами встановлено, що *Atg28* є допоміжним компонентом основного механізму автофагії і є частково необхідним для усіх АТГ шляхів у *P. pastoris*. Він фізично взаємодіє з *Atg17* і є важливим для мікропексофагії, зокрема для формування специфічної мембранної структури МІРА [225]. Мікропексофагія, як виявилось, є пошкодженою у *atg28* мутанта на пізній стадії пексофагії, тобто під час повної секвестрації та/чи гомотипової фази злиття та поглинання пероксисом вакуолями. Макропексофагія у мутанта пошкоджувалась на стадії після формування додаткових індивідуальних автофагійних багаточарових мембран, що оточують індивідуальні пероксисоми (Рис. 3.3.11).

Ідентифікація *ATG28* також представляла особливий інтерес, оскільки продукт його з низьким ступенем гомології до інших відомих білків дріжджів спочатку вважався унікальним для *P. pastoris*. У структурі *Atg28* однак був детектований супер-спіралізований (coiled-coil) домен, що перекривається з передбачуваним мотивом лейцинової застібки (leucine zipper motif) (Рис. 3.3.7). Цей мотив виявився функціонально важливим, оскільки модифікований *Atg28*, що не містить його лише частково комплементував *Latg28* мутант. Цей coiled-coil район в *Atg28* може бути необхідним для його олігомеризації чи білок-білкових взаємодіях [436]. Отже, можна передбачити, що *Atg28* бере участь у формуванні одного або більше білкових комплексів, специфічних для пексофагії.

Було ідентифіковано декілька білкових продуктів з інших дріжджів, які містять передбачувані coiled-coil домени зі значною гомологією до відповідної ділянки Atg28 (Рис. 3.3.7В). На даний момент неможливо передбачити, чи гомологія у цьому специфічному сегменті вказує на функціональну спорідненість цих білків. Щоб відповісти на це питання, дослідження у цьому напрямку може включати функціональний аналіз потенційного гомолога *PpAtg28* з *H. polymorpha*. Також було висловлено припущення, що білок *Asr1* може бути функціональним аналогом *Atg28* у певних видів дріжджів [225].

Різними групами дослідників встановлено, що механізми пексофагії та загальної автофагії у дріжджах мають спільні елементи [2], [191], [415], [421]. Однак до нашої роботи у *P. pastoris* було відомо лише декілька генів, які були специфічними для пексофагії, але не для загальної автофагії. Так *P. pastoris GSA1/PFK1* кодує альфа-субодиницю фосфофруктокінази, яка має функцію у глюкозному сигналюванні для мікропексофагії, незалежно від її ферментативної функції у гліколізі, і не впливає на індуковану етанолом макропексофагію [222]. На жаль, поки невідомо, яким чином фосфофруктокіназа механічно бере участь у передачі сигналу для мікропексофагії. Гени, які, як відомо, впливають на обидва механізми пексофагії у *P. pastoris*, але не на загальну автофагію включали *PpATG26 (UGT51/PAZ4/PDG3)* [207], [208], та *PpATG11 (GSA9/PAZ6)* [226], [234]. Нами запропоновано, що існування *ATG11*, *ATG26* (див. нижче), а також до деякої міри *ATG28*, у *P. pastoris* свідчить що мікро- і макропексофагія використовують набір спільних для обох механізмів елементів, відмінних від тих, що необхідні для загального неселективної автофагії, і що вони найбільш ймовірно, забезпечують селективність для розпізнавання мішеней під час пексофагії.

Комплексна внутрішньоклітинна локалізація химерного білка *Atg28-GFP* виявила, що функція *Atg28* у пексофагії може включати його рекрутинг із цитозолу до перивакуолярного компартменту та його взаємодію із вакуолярними мембранами і, можливо, пероксисомами (Рис. 3.3.13). Такий комплексний внутрішньоклітинний розподіл є подібним до *Atg11* в *S. cerevisiae* і *P. pastoris* та *Atg24* в *P. pastoris* [205], [234]. Наші попередні дані свідчать про те, що деякі *Atg28*-вмісні перивакуолярні

тілбця відповідають PAS, де Atg28 виявився колокалізованим з білком *P. pastoris* Atg17. Ці припущення були підтверджені у подальших дослідженнях [225].

Цікавим є спостереження, що мутації в *PpATG26* [208] і *PpATG28* (Рис. 3.3.14) викликають підвищену у порівнянні із штамом дикого типу чутливість до високих значень рН. Однак незрозуміло, чи пов'язана ця особливість з функціональною роллю цих генів у пексофагії. Неочікувано, мутант *P. pastoris*, дефіцитний за основними вакуолярними протеїназами А і В, виявляв більш високу стійкість до цього стресу. Не можна виключати, що чутливість до підвищеного рН у *P. pastoris* в основному обумовлена токсичним ефектом неправильного сортирування вакуолярних протеаз у відповідь на рН стрес [437], і що дефіцит як *PpATG26* так і *PpATG28* опосередковано впливає на цю відповідь.

Для ідентифікації білків, які взаємодіють з Atg28, була зконструйована геномна бібліотека *P. pastoris* для дріжджового дигібридного аналізу (YTH скринінг). Ми використали функціональний фрагмент *PpAtg28* як «затравку» (bait) та ідентифікували раніше невідомий білок Atg35, який, як і його взаємодіючий партнер Atg28, є специфічно необхідним для мікропексофагії [225]. Як делеція, так і надекспресія гена *ATG35* специфічно інгібували формування МІРА, але не формування пексофагосом під час макропексофагії. Таким чином, дослідження Atg28 та Atg35 дало перші молекулярно-генетичні дані про специфіку молекулярних механізмів формування МІРА і автофагосом.

Інший ген, виділений нами шляхом селекції на основі алілового спирту з банку генів *P. pastoris*, був названий *PDG3* і пізніше класифікований як *ATG26*, кодує консервативний білок з чітко визначеною ферментативною активністю, а саме UDP-глюкозилтрансферази, продуктом якої є мембрано-зв'язаний ергостеролглюкозид (SG). Колеги з групи Y. Sakai (Японія) продемонстрували, що мембрани мутанта *atg26 P. pastoris* не містять SG [207]. Нами встановлено, що білок Atg26 є необхідний для обох типів пексофагії у *P. pastoris*, але не для загальної автофагії. Після індукції пексофагії було виявлено, що Atg26 знаходиться у безпосередній близькості до вакуолярної мембрани і пов'язаний з новою мембраною структурою (МІРА), необхідною для процесів мікропексофагії [207]. Нами

встановлено, що пексофагія є порушена у мутанта *atg26* на стадії формування та злиття додаткових мембран, що оточують пероксисоми. Було також встановлено, що SG акумулюється у *P. pastoris* в умовах стресу, таких як тепловий шок або надлишок етанолу [430]. Це свідчить що *PpAtg26* може бути необхідним для певних інших функцій, окрім пексофагії. Дійсно, наш мутант *atg26* виявився більш чутливим до підвищених рН та концентрацій етанолу у порівнянні із штамом дикого типу [208].

Участь *Atg26 P. pastoris* в пексофагії може пояснюватися відносно високим вмістом SG у цього виду відносно інших дріжджів, напр. *S. cerevisiae* [429]. Оскільки була виявлена мембрано-асоційована локалізація *PpAtg26* [207], контент SG певних мембран може впливати на різні типи процесів злиття мембран, включаючи пексофагію. Не відомо, чи стеролглюкозилтрансфераза або SG є залучені у пексофагію у *S. cerevisiae*, проте пошук генів, що беруть участь у гомотиповому злитті вакуоль у *S. cerevisiae*, не виявив *ScUGT51/ATG26* [428]. Хоча стеролова композиція мембран у алкан-засвоюючих *Y. lipolytica* залишається не встановленою, стеролглюкозилтрансфераза не бере участь у пексофагії у цього виду [208]. Ми також виявили, що мутант *H. polymorpha*, дефіцитний за *ATG26*, виявився частково дефіцитним за пексофагією. Цей висновок підтверджує гіпотезу про те, що функція *Atg26* в пексофагії може бути спеціалізованою адаптацією метилотрофів, пов'язаною із винятковим розміром і чисельністю пероксисом при індукції метанолом у цих видів. Ця думка була підтверджена у подальших дослідженнях, які свідчать, що *ATG26 P. pastoris* лише частково необхідний для макропексофагії пероксисом, індукованих олеатом або метиламіном, які є численними, але набагато меншими за розміром порівняно із метанол-індукованими органелами [209]. На завершення, ми також продемонстрували, що *PpAtg26* лише частково усуває дефіцит росту на декані у *atg26* мутанта *Y. lipolytica*, тоді як експресія гена *Y. lipolytica* у мутанта *P. pastoris* не відновлює дефект пексофагії [208]. Таким чином, необхідні подальші дослідження для з'ясування взаємозв'язку між вмістом SG, розміром органел та функцією *Atg26* у різних мембрано-залежних процесах у різних груп дріжджів.

Наведена нижче схема, відтворена з [415], зображує різні стадії процесу мікропексофагії у *P. pastoris* та її етапи, на яких найбільш імовірно беруть участь ідентифіковані нами нові білки пексофагії (Рис. 3.3.24).

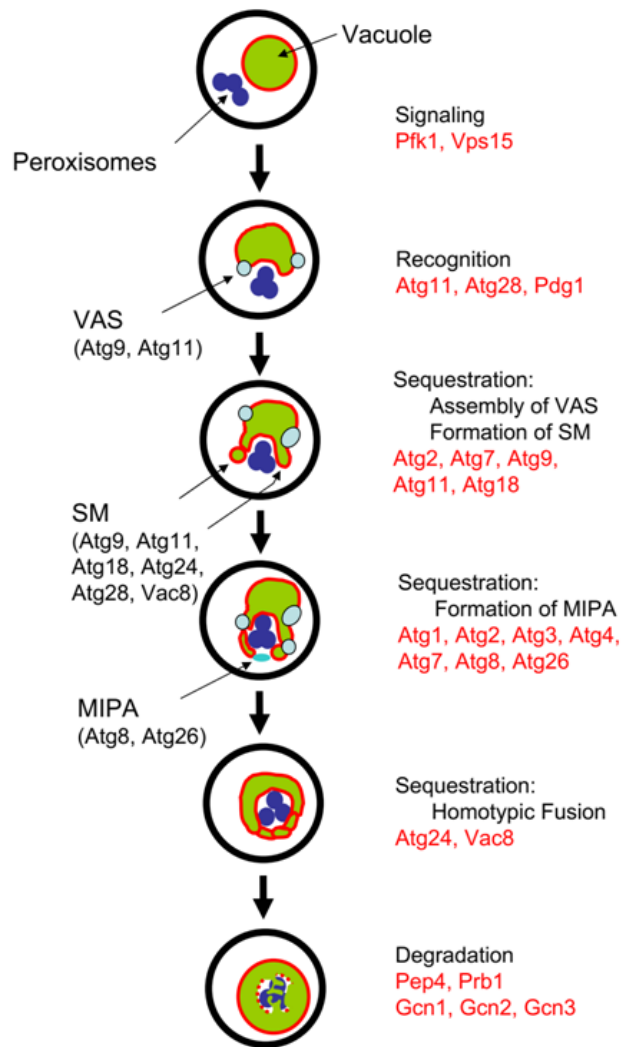


Рис. 3.3.24. Схематична модель індукованої глюкозою мікропексофагії у *P. pastoris*. Глюкозний сигнал ініціює серію подій, імовірно опосередкованих *PpPfk1* та *PpVps15*, що веде до вигинання мембран вакуоль та формування секвеструючих мембран (SM), які розпізнають кластери пероксисом. Ці мембрани містять *PpAtg9* та *PpAtg18*, функції яких невідомі, *PpAtg11* та *PpAtg28* що можуть взаємодіяти з білками пероксисомних мембран (такими як *PpPdg1/Pex36*), та *PpAtg24* та *PpVac8*, які є необхідні для злиття цих секвеструючих мембран. Відповідні мембрани, імовірно походять із суміжних із вакуолями структур (VAS), які містять *PpAtg9* та *PpAtg11*. *PpAtg2*, *PpAtg7*, *PpAtg9*, *PpAtg11*, та *PpAtg18* залучені у формування комплексу VAS та форматування SM. Додатково до SM та VAS, утворюється інша мембранна структура, яка називається мікропексофагійним мембранним апаратом (MIPA). *PpAtg1*, *PpAtg2*, *PpAtg3*, *PpAtg4*, та *PpAtg7* є необхідними для формування MIPA, яка також містить *PpAtg8* та *PpAtg26*. MIPA розташовується між відгалуженнями SM, які, імовірно, сприяють позиціонуванню SM для злиття мембран. Після злиття SM та MIPA, пероксисоми інкорпорується у вакуолі для деградації гідролітичними ензимами, такими як *PpPep4* та *PpPrb1*.

3.3.8. Підсумки

Автофагійна деградація пероксисом, чи пексофагія, є одним із високоселективних автофагійних процесів. Молекулярні механізми, що забезпечують таку селективність, були практично невідомими на момент початку нашого дослідження. На основі метилотрофних дріжджів *P. pastoris* як зручної модельної системи ми ідентифікували декілька нових генів, заучених у пексофагію, а саме *VPS15*, *ATG26* та *ATG28*. Для клонування генів за допомогою функціональної комплементачії було розроблено ефективну адаптацію методу на основі алілового спирту. Також продукт нового гена *ATG35* був ідентифікований у дріжджовій двогібридній системі як взаємодіючий партнер *Atg28*. Продемонстровано, що продукти генів *ATG26*, *ATG28* та *ATG35* є залучені у першу чергу у пексофагійних подіях, які регулюються заміною джерел карбону, але не у неселективній загальній аутофагії, що регулюється голодуванням за нітрогеном. Їх функціональна спеціалізація та внутрішньоклітинна локалізація засвідчили, що ці компоненти забезпечують розпізнавання автофагійними механізмами та доставку пероксисом до вакуоль (лізосом) процесії пексофагії. Ми також встановили що функція *Atg26* є консервативною у *H. polymorpha*. Слід підкреслити, що базова характеристика цих нових генів є необхідним, але початковим кроком для кращого розуміння процесів пексофагії у дріжджів.

Результати Розділу 3.3. опубліковані у 8 статтях, 1 патенті США #US8071298 [129], [208], [225], [319], [335], [415], [416], [423], [433], [438]–[441].

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

3.4.1. Молекулярне клонування гена *PDG1/PEX36* *P. pastoris* і фенотиповий аналіз мутантів *pdg1/pex36*

3.4.1.1. Виділення УФ-індукованого *pdg1* мутанта *P. pastoris* і відповідного гена та його характеристика

Як описано у попередніх розділах, нами виділено колекцію УФ-індукованих мутантів *P. pastoris* з дефектами селективної деградації пероксисом або пексофагії.

Для цієї негативної селекції ми використовували скринінг колоній на чашках Петрі для оцінювання залишкової активності АОХ після перенесення мутагенізованих колоній з середовища з метанолом на глюкозо- чи етанол-вмісні середовища [319]. Один з виділених мутантів, названий *pdg1* (*peroxisome degradation*), характеризувався дуже специфічним фенотипом, а саме повільнішою деградацією АОХ у відповідь на додавання глюкози або етанолу, але одночасно значним порушенням росту на середовищі з метанолом. Після декількох циклів зворотнього схрещування штаму дикого типу і фенотипового аналізу ми підтвердили, що цей фенотип обумовлений моногенною мутацією – в усіх отриманих у підсумку рекомбінантних колоній успадковувались обидва мутантні фенотипи. Ми припустили, що відповідний Atg білок, може фізично чи регуляторно об'єднувати біогенез пероксисом і їх деградацію, що пізніше було показано на прикладі декількох інших білків (див. розділ 1.3).

Відповідний ген *PDG1 P. pastoris* (пізніше перейменований у *PEX36*, [218] був виділений з геномної бібліотеки шляхом функціональної комплементачії УФ-індукованого *pdg1* мутанта. Для комплементачійного відбору було використано частковий дефект росту вихідного *pdg1* мутанта на агаризованому середовищі з метанолом. Були отримані декілька прототрофних трансформантів з відновленим фенотипом дикого штаму щодо метилотрофного росту і пексофагії, та шляхом ретрансформації у *E. coli* виділено відповідні плазміди. Ген *PDG1/PEX36* було ідентифіковано, як описано у розділі «Матеріали і Методи» (слід зазначити, що в окермих випадках у цьому розділі буде використано оригінальну назву гена). Також, секвенування мутованого *PDG1* гена, виділеного ПЛР із геномної ДНК вихідного УФ-індукованого мутанта виявило, що ген містить єдину нуклеотидну заміну, що утворює новий стоп-кодон та продукує вкорочену версію білка Pdg1 із всього 30 N-кінцевими амінокислотами (Рис. 3.4.1). Дані нуклеотидної послідовності *PDG1/PEX36 P. pastoris* наявні у базі даних GenBank під номером CAU67701.

Виявилось, що білковому продукту Pdg1 (Рис. 3.4.1) притаманна незначна подібність до білків із баз даних, включаючи усі відомі на час його ідентифікації пероксини (білки біогенезу пероксисом). Однак, певні потенційні гомологи могли бути ідентифіковані у споріднених метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, а також у *D. hansenii* і *C. albicans*, але не у *S. cerevisiae*.

-237 aggaaatggataggttgacagcagttccaggagatggctcaattcactgttaaaacctccgcttgtcgctagttctoga
 -158 gagcgcactccagctggtgctcttctgatgtggagcgtttcccttctcttctgatatacaaaaaaatgatcgcgaaac
 -79 gtcatacaaaacccatcccttccctccctctcacattatccattattctctactcacataaattgggtacattgtccaa

1 ATG TCT AAC CTG GAG AAG CAA ATA AGG CTG AAA AAT CTT CTG GAA TCA CTG AAT GGC TCC
 1 **M S N L E K Q I R L K N L L E S L N G S**
 61 AAA TCA CAG GCT GAT TTG AAG AAA GAG **TCG** CAA ACG CTG ATC GAC ATA TTC AAG CAG ACC
 21 **K S Q A D L K K E S Q T L I D I F K Q T**
 121 CGT CAA AAG ATG ATC CAT GAT CAA CAG AGC AAC TTA CAT CCA GTC ACA TCA ATA CAA GGC
 41 **R Q K M I H D Q Q S N L H P V T S I Q G**
 181 AAG AAA CTC TTG AAC CTG CGA AAA GCT CTC CAG AAT CAT CAA AAA CAT CGT GAT AAC ATC
 61 **K K L L N L R K A L Q N H Q K H R D N I**
 241 AAA GTG GTC AAA ACT AAC GCT GAG CCG GTC TCA ACT CAC GAT CAA ACA GTT GAT TCC AAC
 81 **K V V K T N A E P V S T H D Q T V D S N**
 301 AGC GAT TCG TCT TCA AGT GAG ACT CTA ATA GAC ACT TCA ACT TCA TCC TCT TTT GAC AAT
 101 **S D S S S S E T L I D T S T S S S F D N**
 361 ATA AAA CGA TGG TTA CAT GAG ACT AAC TCC AAT GAA TCA CAA TCC AAG GGT AGA CCA TCA
 121 **I K R W L H E T N S N E S Q S K G R P S**
 421 GAA TAC ACG CAT GTG AAC AGC CCC GAT TCT GGA GTC TCT AGT AAG TCT GGC CAG TTA TCG
 141 **E Y T H V N S P D S G V S S K S G Q L S**
 481 ATG TTG ACT CAA GAT TCC AAC CAG ATT TTA TTG CTA ATT AAA CAG CTG ACT GCA AAG TAT
 161 **M L T Q D S N Q I L L L I K Q L T A K Y**
 541 AAT ATG CTG GAA TCA TTT TTC ATC AAC TCT TTT GAG CAA CTA ATT GCT CTT TTT GAT AAT
 181 **N M L E S F F I N S F E Q L I A L F D N**
 601 TTC TAC TTT TTG TCA TCG TTG ATT GGA TTC AAC ACT TCG AAC TCA AAT AGC AAA ATT ACG
 201 **F Y F L S S L I G F N T S N S N S K I T**
 661 AGG TTA TTG AGA AAC TTC ATC AAG CAA GCT TCG AAG ATA TGG TTA GTC ATT ATT TTC CTT
 221 **R L L R N F I K Q A S K I W L V I I F L**
 721 ACC GTC AAG AAT TTG TTC ATT CGC ATG ATA AAA CTC AAT AGA ACT GAG AAG AAA GTG AAA
 241 **T V K N L F I R M I K L N R T E K K V K**
 781 CTG GAA AGA GAC ATT TTA ATG TCA AGA TCT CCC AAT TCT TCC ATT CAG TAT GAA TAT GAT
 261 **L E R D I L M S R S P N S S I Q Y E Y D**
 841 GCT ATG CTG CTC ACA ATC CGA ACA TCC AAA ATA TCC ACC TTC TTG GAA ATG CTT GGA AAT
 281 **A M L L T I R T S K I S T F L E M L G N**
 901 GTT AAT GAA TTT GCA TTT TAC TTG ATC CAA GTT ATG AAC TGG AAG GTT TCC AAA AAG GTC
 301 **V N E F A F Y L I Q V M N W K V S K K V**
 961 AAG AAT ATA CTA GCA GGA ATC TCA TGG ATA ATG AGC ATC TAC CGG ATG AGC AAA GAT GAG
 321 **K N I L A G I S W I M S I Y R M S K D E**
 1021 ATC CAA GAA ACA AAT CCG TCA ATA AAT AAT GGG TTA AAA TCA TCC GAT GAT ATT ATC GAT
 341 **I Q E T N P S I N N G L K S S D D I I D**
 1081 GAA TAC GCT TAA
 361 **E Y A ***

1093 agtacgaaactatTTTTTcaaaaggttaatacattacaacttggacgcaccatttttctactccaagctcagtcataaagg
 1172 catcagatgtaggctctcttccaagtaattccttgagattatctagctcctctcttgatccacctctggcaagaatgat
 1251 atcacggtacttgataccttgagctgtactcattggatcagctttgaaaaaggtgtaataaatgtcactggcaaacact

Рис. 3.4.1. Нуклеотидна і амінокислотна послідовності гена *PDG1/PEX36* *P. pastoris*. Кодон TCG, мутований у УФ-індукованому *pdg1*-мутанті до стоп-кодона підкреслено і виділено заливкою.

Порівняння відповідних послідовностей представлено на Рис. 3.4.2. Нижче у цьому розділі ми наводимо дін про те, що ідентифікований у *H. polymorpha* білок із низьким ступенем гомології до *PpPdg1* також впливає на метилотрофний ріст і, є таким чином його імовірним функціональним гомологом.

```

DhPdg1 1 -----MV-----ENTTTSTVKSSDK
CaPdg1 1 -----MVTTTTIQENIDLIQKVNLK-----HTSIDPNPDSRQ
HpPdg1 1 -----
PpPdg1 1 MSNLEKQIRLKNLLESLNGSKSQADLKKESQTLIDIFIFKQTRQKMIHDQSNLHEVTSIQG

DhPdg1 15 KEIIDNILKLAHQEQKRGNKSITQEKLNNLSNFVSTYQLKQEDQSKGNYDKYKKEYPAPI
CaPdg1 32 QEIINNLLLLLAQEQQKGNTSITSDKLDKLTSLLAQQQQQKLQSRSQPLSTPTKAKLP-
HpPdg1 1 -----MSNLHYGPKLRQLLKLES--DRDRGPSAGNERLSKLAFLGLLV
PpPdg1 61 KKLLNLRKALQNHQKHRDNIKVVKTNAEPVSTHDQTVDSNSDSSSSETLIDTSTSSSFDN

DhPdg1 75 VKPPYSPLFSKFS-----VKSPKAVIKTNPNRK-----LPFQYTF
CaPdg1 91 PKPKYPSVFNKFDINKSSHNN----RQERGQSPVKKPKSGSKPNNNNKPIKYYRPNTFSL
HpPdg1 43 VKNAKQRRRSSTSLSSSPTLYSPTQRSRANSGTLAGSRFALRTRPQ-----RSWQEKY
PpPdg1 121 IKRWLHETNSNESQSKGRPSEYTHVNSPDSGVSSKSGQLSMLTQDSNQILLLLIKQLTAKY

DhPdg1 110 KNIEKVLIEIETLANILDNLHLFSRF-----PMFPARIVDLLKQTNKLWVVILIF
CaPdg1 147 KKIEFMFVNIENLANLLDNLHLLSNL-----PMFPQELNRFLKQTNKIWVLILVF
HpPdg1 97 NSFETGLLANLESMVSLFDNFTMFQNIL--SKSRFASKF-RGVETLLKNLSKVYFVILI
PpPdg1 181 NMLESFFINSFEQLIALFDNFYFLSSLIGFNTSNSNSKITRLLRNFIKQASKIWLVILFL

DhPdg1 161 LIRKSISQLLNVIRKERKVNIELSILNLNKNSKLLINKDDNGDNNIFRYEKVLKDLQF
CaPdg1 198 LIRKTISQLLNVIRKIRKVNIEVDLLNSTTTTKNKTGINFINEDLN--KKYKKVLKDLRF
HpPdg1 154 NLKNLIVKLIKNLTRIVELEAEMLSRNGKNVLLPEAA-----SQEREKLVFLYT
PpPdg1 241 TVKNLFIRMIKLNRTEKVKLERDILMSRSPNSSIQY-----EYDAMLLTIRT

DhPdg1 221 DKMMLVLELIGNFLDMGFNLIELYG-IPVPEWFMSLLNAASMGMTIYRMNKDEYIDDDI
CaPdg1 256 DKMMLILELIGNFLDLTFNLIELYG-IALPDWIMSLLNFASMAMTIYRMNKDEYVDDDI
HpPdg1 205 EKFRTYLELIGYANELVLDLTLVYSKIRLPKLVERLVSLVSWI-GVYRLSKDEAEEARTE
PpPdg1 289 SKISTFLEMLGNVNEFAFYLIQVMNW-KVSKKVKNILAGISWIMSIYRMSKDEIQETNPS

DhPdg1 280 TEDLI-----
CaPdg1 315 TDDLI-----
HpPdg1 265 KQIAAMQKQYL-----
PpPdg1 348 INNGLKSSDDIIDEYA

```

Рис. 3.4.2. Накладання Pdg1/Pex36 *P. pastoris* і його найближчих передбачуваних гомологів, ідентифікованих у геномах метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, а також у *D. hansenii* і *C. albicans*.

Встановлено, що Pdg1 також містить два потенційні трансмембранні домени, що свідчить про можливість взаємодії цього білка із певними мембранами (Рис. 3.4.3.).

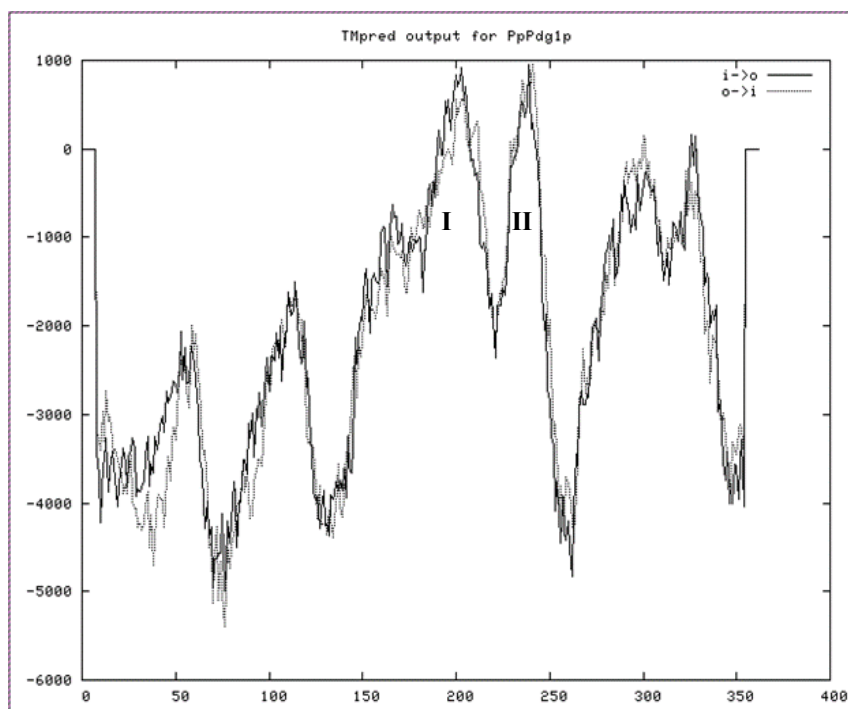


Рис. 3.4.3. Прогнозована топологія PpPdg1. Принаймі два потенційні трансмембранні домени (а/к 194-212 і 233-250 пронумеровані I та II, відповідно) вказують на те, що Pdg1 може бути асоційованим із клітинними мембранами.

3.4.1.2. Конструювання делеційного штаму *pdg1 P. pastoris* і його характеристика

Штам *P. pastoris*, делетований по гену *PDG1* був виділений за допомогою гомологічної рекомбінації сконструйованої делеційної касети у геном (gene replacement), як описано у розділі «Матеріали і Методи».

Сконструйований мутант $\Delta pdg1$, аналогічно до УФ-індукованого, виявляв дефект індукованої глюкозою мікропексофагії та індукованої етанолом макропексофагії при аналізі активності АОХ у дріжджових колоніях (Рис. 3.4.4А), і одночасно частковий «leaky» дефект росту у середовищі з метанолом (Рис. 3.4.4С).

Одночасно, як показано на Рис. 3.4.4В, клітини мутанта *pdg1* не виявляли видимого порушення загальної автофагії, тобто були менш чутливими до голодування за нітрогеном порівняно зі штамом SMD1163, дефіцитним за вакуолярними протеазами і чутливим до такого голодування (з цієї причини клітини SMD1163 набувають м'якно-фіолетового забарвлення у флоксиніновому тесті). Рис. 3.4.4В демонструє, що ріст мутантів *pdg1* на агаризованому середовищі з метанолом є сповільненим відносно штаму дикого типу.

Ми провели більш детальний аналіз кінетики росту мутантів *pdg1* у рідких середовищах, що вимагають функціональних пероксисом для проліферації. Як видно з Рис. 3.4.5, ріст мутанта *pdg1* у мінеральному середовищі з метанолом є сповільненим і характеризується значно видовженою лаг-фазою. Однак, у середовищі в олеатом дефект росту є незначним. Як можна побачити, обидва УФ-індукований і делеційний *pdg1* мутанти виявляють практично ідентичний фенотип.

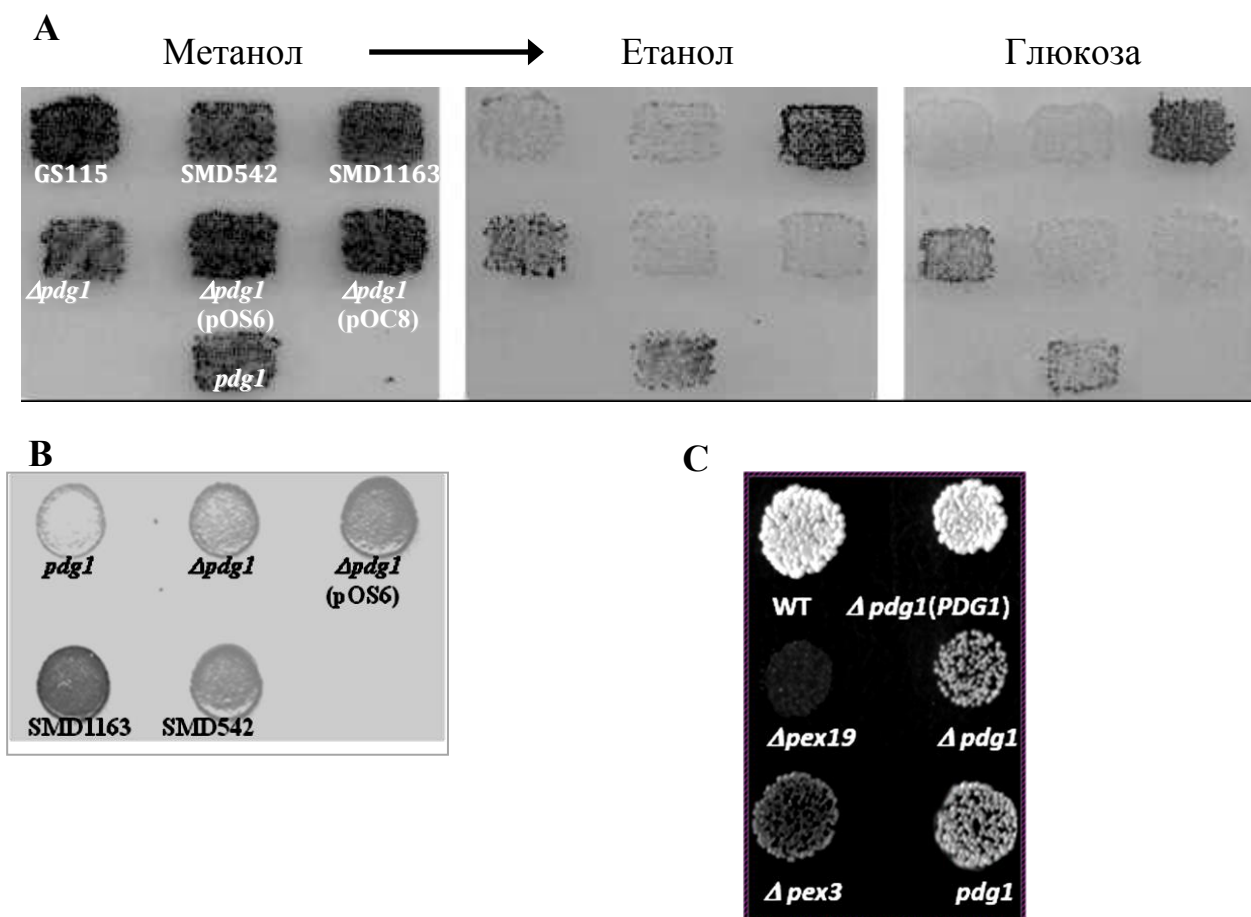


Рис. 3.4.4. Аналіз фенотипу мутанта $\Delta pdg1$. (A) Візуалізація активності AOX за індукції мікро- (глюкозою) чи макро- (етанолом) пероксофагії. GS115, SMD542 – штами дикого типу, SMD1163 – мутант із пошкодженими вакуолярними протеазами, $\Delta pdg1$ (pOS6), $\Delta pdg1$ (pOS8) – комплементовані до дикого типу мутанти. (B) Аналіз загальної автофагії з флоксिमом-В у дефіцитному за нітрогеном середовищі. (C) 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.

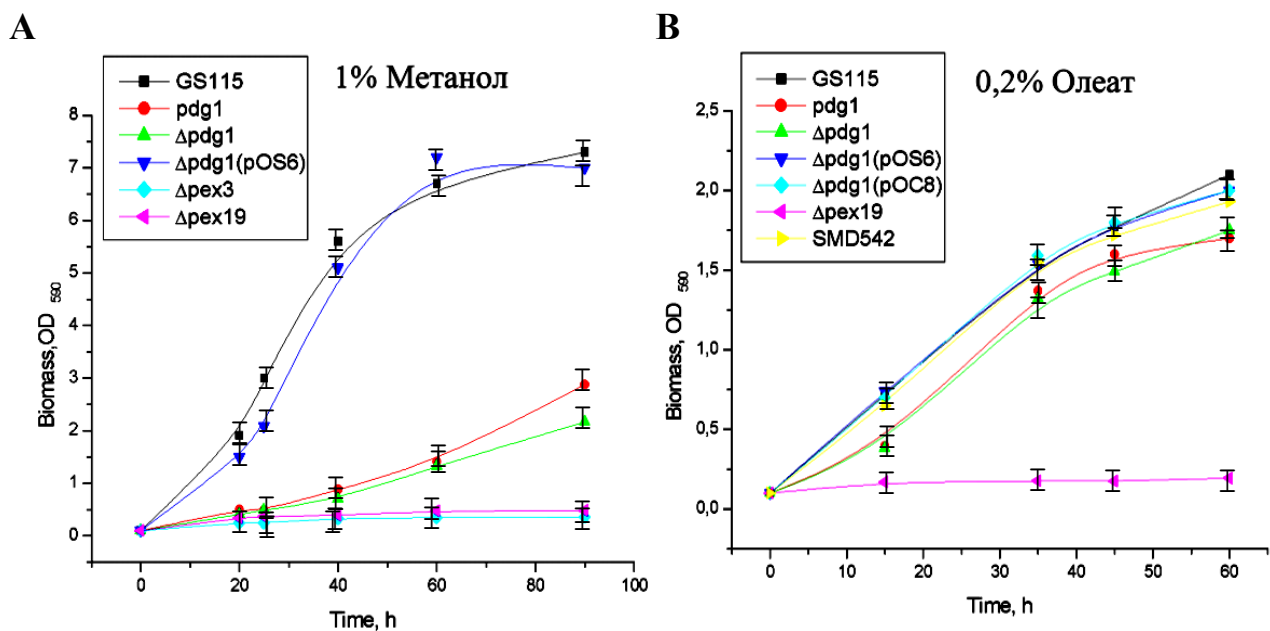


Рис. 3.4.5. Аналіз росту *pdg1* мутантів на індукуючих пероксисоми субстратах – метанолі (A) та олеаті (B), у порівнянні зі штамми дикого типу і *rex* мутантами. Слід зазначити, що $\Delta pdg1(pOS6)$ і $\Delta pdg1(pOC8)$ представляють мутанти *pdg1*, функціонально комплементовані векторами, що несуть дикую копію гена *PDG1*.

Ми також провели детальний кінетичний аналіз рівня білка та активності АОХ при індукції двох типів пексофагії. Отримані дані підтвердили, що $\Delta pdg1$ виявляє сповільнену кінетику рівня білка та інактивації АОХ, порівняно з штамом дикого типу, значено більш чітко виражену у випадку мікропексофагії, викликаній глюкозою, і менш вираженою при етанол-індукованій макропексофагії (Рис. 3.4.6).

Попередній мікроскопічний аналіз *in vivo* у сконструйованих клітинах $\Delta pdg1$ з флуоресцентно-міченими пероксисомами (див. підрозділ 3.4.2) також вказував, що процес макропексофагії у мутанта пошкоджений (Рис. 3.4.7). Як показано на цьому рисунку, пероксисоми залишалися інтактними і не з'являлись у просторі вакуоль впродовж декількох годин після індукції мікропексофагії. Таким чином, ідентифікований ген *PDG1* класифікувався нами як такий, що бере участь у обох різнонаправлених процесах біогенезу та деградації пероксисом.

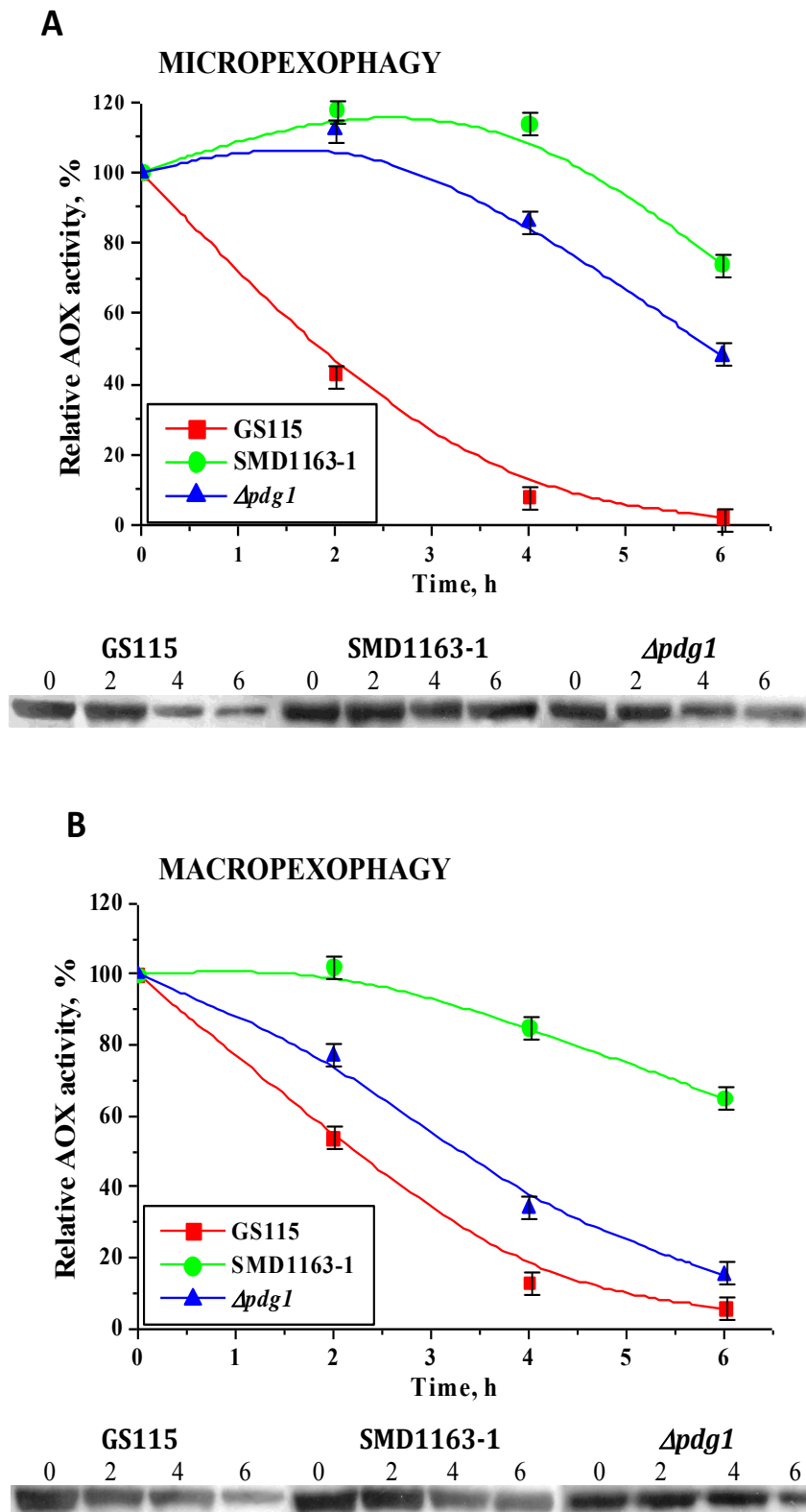


Рис. 3.4.6. Кінетика рівня білка та активності АОХ у $\Delta pdg1$, порівняно до дикого типу (GS115) і безпротеазним мутантом SMD1163, за індукції мікро- (A), та макро- (B) пексофагії.

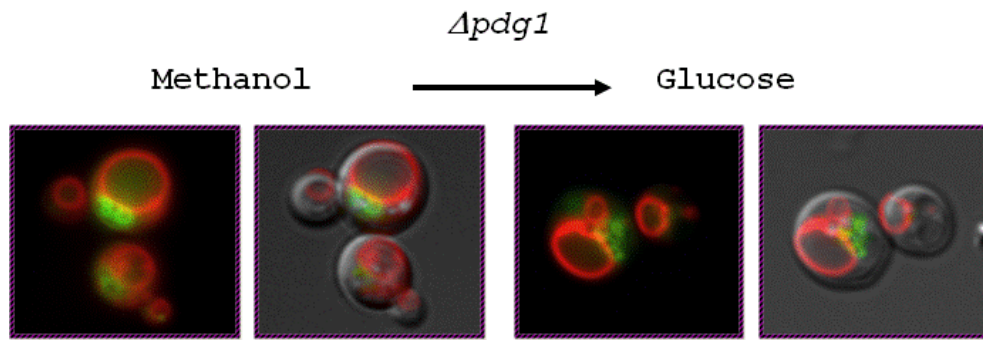


Рис. 3.4.7. Флуоресцентна мікроскопія клітин *pdg1*, що зазнають мікропексофагії. GFP-мічені (mPTS-GFP) пероксисоми у мутанті залишаються інтактними дві години після додавання глюкози. Вакуолі були мічені FM4-64.

3.4.1.3. Аналіз фізіологічних функцій Pdg1 та його внутрішньоклітинної локалізації.

Для з'ясування питання, яким чином білок Pdg1 може впливати на біогенез пероксисом і метилотрофний ріст, було сконструювано штами, що експресують GFP, кон'югований з різними типами сигналів доставки до пероксисом, використовуючи вектори, описані у розділі 3.3.2 і [335]. Спостережено, що при рості *pdg1* клітин у культурі з метанолом, усі три форми GFP, кон'юговані чи з PTS1, PTS2, або з PMP (білки пероксисомної мембрани), були розподілені не так як у клітин штаму дикого типу і міслокалізовані (Рис. 3.4.8). Отже, функція Pdg1 є потрібною для функціонування усіх відомих типів сигналів доставки до пероксисом. Цікаво, що морфологічно-помітні пероксисоми, мічені кон'югатами GFP, з'являлись у клітинах *Δpdg1* тільки після 4-5 годин індукції метанолом, тоді як для штаму дикого типу впродовж однієї години. Це спостереження вказує на важливу роль Pdg1 у процесі біогенезу пероксисом.

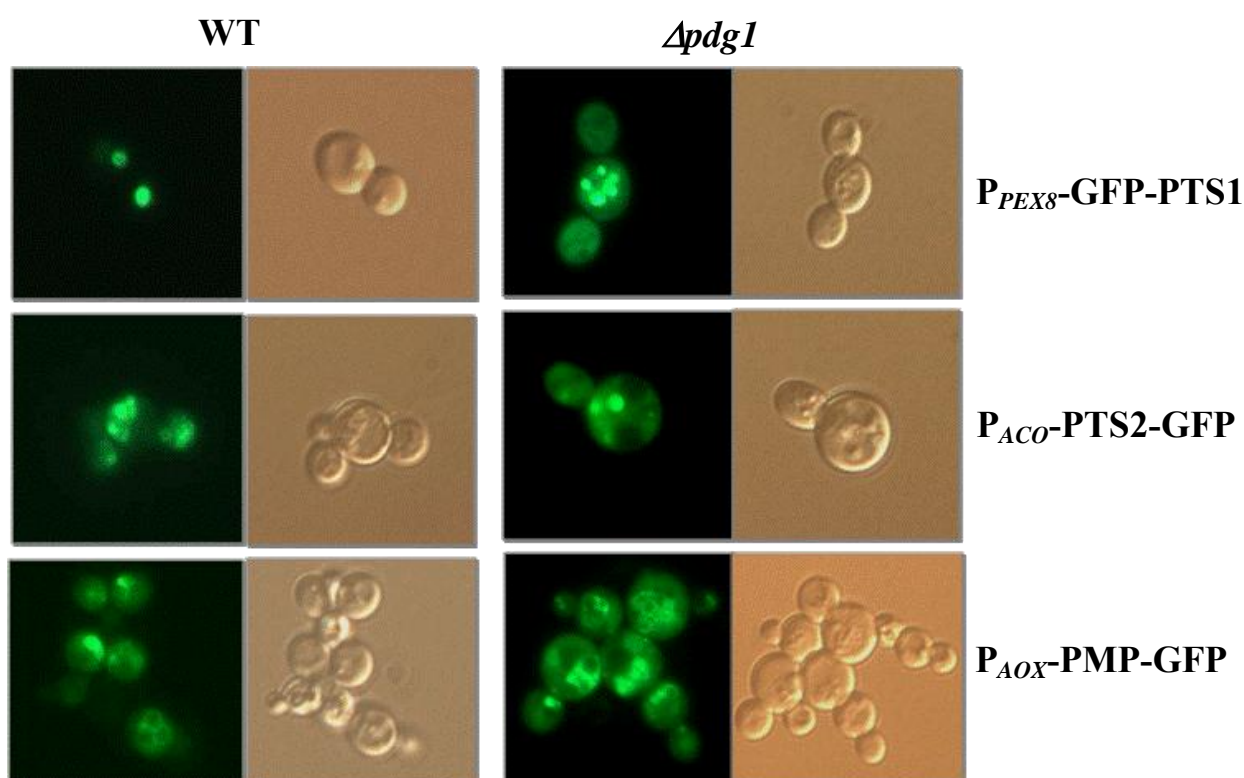


Рис. 3.4.8. Аналіз локалізації різних форм кон'югатів GFP з сигналами доставки до пероксисом (деталі див. у розділі 3.3.2). Флуоресцентно-мічені клітини штаму дикого типу (WT) та *Δpdg1* мутанта інкубували у середовищі з метанолом протягом 6 годин.

На наступному етапі було проведено біохімічну оцінку внутрішньоклітинної локалізацію Pdg1. З цією метою були отримані за допомогою стандартної процедури специфічні до N-кінцевих послідовностей Pdg1 поліклональні кролячі антитіла, оскільки усі фрагменти Pdg1, що містили потенційні трансмембранні домени, виявились токсичними при експресії в клітинах *E. coli*. Ми встановили, що відповідні антитіла селективно впізнають химерні форми Pdg1, кон'юговані з His6-tag для афінної очистки, чи кон'юговані з різними формами GFP, а також нативний білок Pdg1, і не продукують сигналу з екстрактами, виділеними з мутанта *Δpdg1* (Рис. 3.4.9).

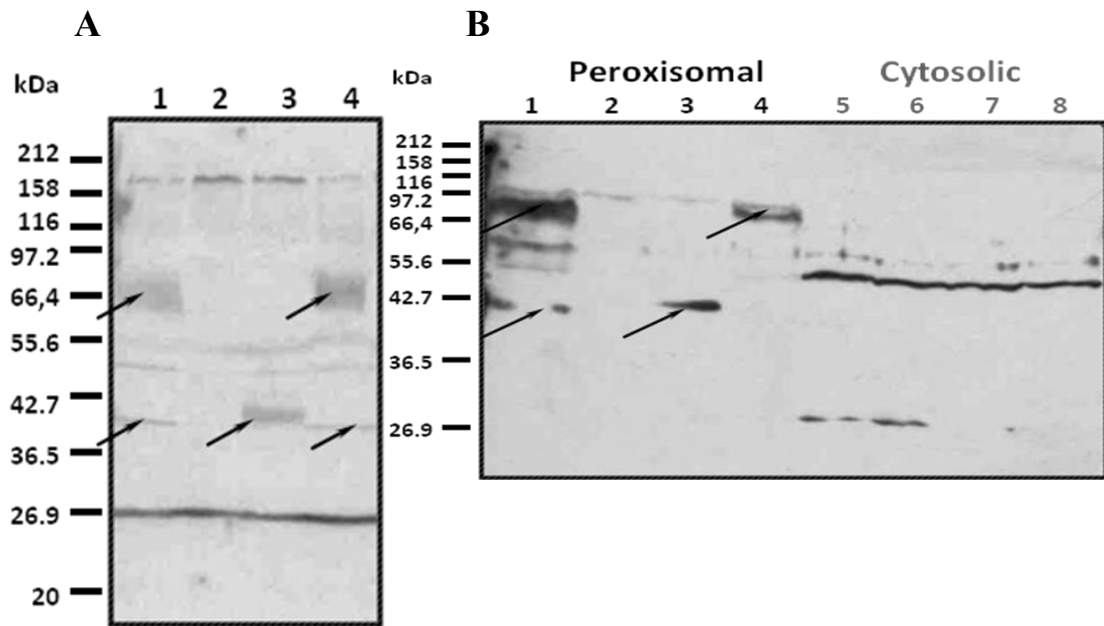


Рис. 3.4.9. Візуалізація за допомогою імуноблот-аналізу Pdg1, Pdg1-HIS-tag і Pdg1-GFP-HIS-tag кон'югатів, експресованих під нативним промотором *PDG1* у клітинах, індукованих у середовищі з метанолом. **(А)** Детекція різних форм Pdg1 зі специфічними поліклональними антитілами. 1 – GS115 (Pdg1-GFP-His6), 2 – $\Delta pdg1$, 3 – $\Delta pdg1$ (Pdg1-His6), 4 – $\Delta pex3$ (Pdg1-GFP-His6). Розмір різних кон'югатів Pdg1 є наступним: нативний Pdg1 – 39.9 кДа, Pdg1-His6 – 40.8 кДа, Pdg1-GFP-His6 – 68.2 кДа. **(В)** Візуалізація Pdg1 і його кон'югатів з антитілами у фракції органел і цитозольному супернатанті: 1, 5 – GS115 (Pdg1-GFP-His6), 2, 6 – $\Delta pdg1$, 3, 7 – $\Delta pdg1$ (Pdg1-His6), 4, 8 – $\Delta pex3$ (Pdg1-GFP-His6).

В експериментах з клітинного фракціонування у градієнті сахарози білок Pdg1 і його похідні форми спостерігались лише у пероксисомній фракції органел, а не у фракції розчинних цитозольних білків (Рис. 3.4.9). Отже, Pdg1 є імовірно раніше невідомим асоційованим із пероксисомами білком. Окрім цього, функціонально-неактивний Pdg1-GFP, експресований під нативним промотором у штаму дикого типу, індукувався метанолом та локалізувався до пероксисом, тоді як у $\Delta pdg1$ мутанта – до везикулярних структур, що імовірно є неправильно зформованими прекурсорами органел (Рис. 3.4.10).

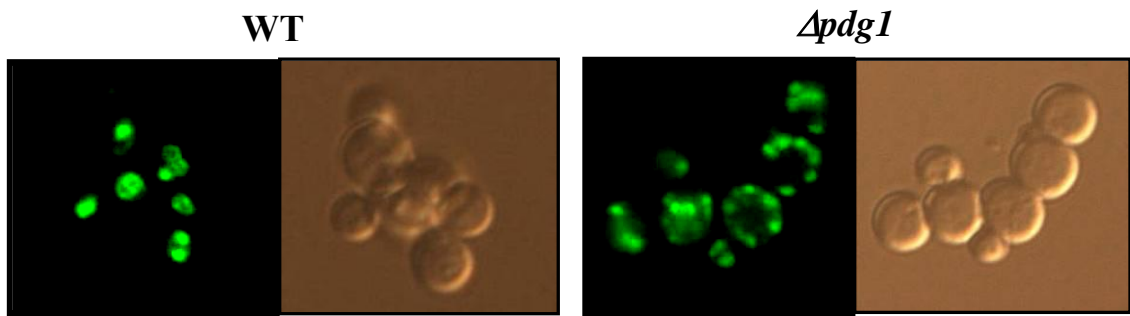


Рис. 3.4.10. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації Pdg1-GFP. Флуоресцентні фотографії клітин штаму дикого типу і мутанта *Δpdg1*, індукованих метанолом протягом 4 год. Pdg1-GFP локалізується до мембран пероксисом, відтворюючи локалізацію PMP-GFP (Рис 3.4.8).

Також спостережено, що навіть у середовищі з метанолом флуоресцентний сигнал Pdg1-GFP, експресованого під нативним промотором, є порівняно слабким, що свідчить про низький рівень його експресії. У різних *rex* мутантів химерний білок був міслокалізований до цитозолю та ремнантів пероксисом, підтверджуючи таким чином фізіологічну пероксисомну локалізацію. Так, у метанол-індукованих клітинах мутанта *rex8* флуоресценція Pdg1-GFP була локалізована у точкових структурах неправильної форми, – ймовірно, пероксисомних «тінях» (Рис. 3.3.11). Відомо, що Rex8 бере участь в імпорті PTS1- і PTS2-вмісних матриксних білків пероксисом, але не у PMP-шляху для мембранних білків [335]. Локалізація Pdg1-GFP є також, ймовірно, Rex3-залежною. У метанол-індукованих клітинах делеційного мутанта *rex3* флуоресценція Pdg1-GFP завжди була локалізована не більш, ніж до одного на клітину точкового тільця сферичної форми – ймовірно, препероксисоми. Але, на противагу до *rex8* мутанта, частина флуоресценції у *rex3* була міслокалізована до цитозолю (Рис. 3.3.11).

Така специфічна Pdg1 локалізація узгоджується з роллю Rex3 у пероксисомальному таргетингу мембранних білків-пероксинів у PMP-залежному шляху на ранній стадії біогенезу пероксисом. Таким чином, ми зробили висновок, що Pdg1 найбільш ймовірно належить до PMPs.

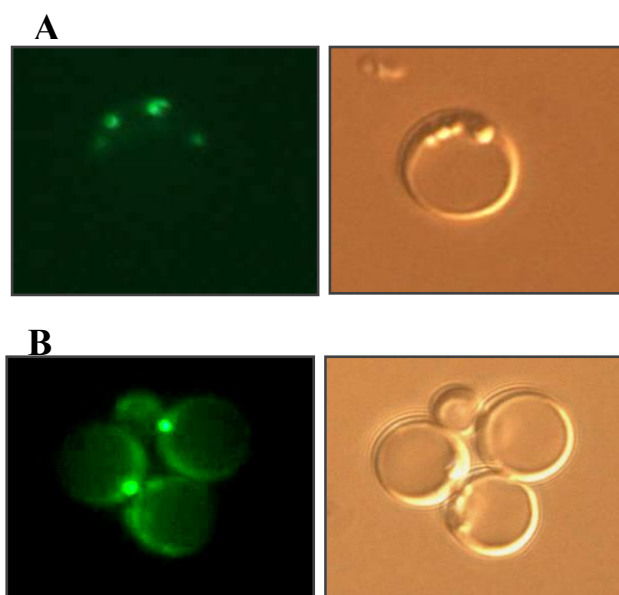


Рис. 3.4.11. Експресія Pdg1-GFP химерного білка у клітинах *rpx* мутантів, дефектних за біогенезом та імпортом матриксних і мембранних білків пероксисом. **(А)** У метанол-індукованих клітинах $\Delta rex8$ флуоресценція Pdg1-GFP локалізована у декількох точкових структурах неправильної форми. **(В)** У метанол-індукованих клітинах $\Delta rex3$ флуоресценція Pdg1-GFP завжди локалізована не більше ніж в одному сферичному тільці на клітину, а частина флуоресценції перорозподілена до цитозолю.

Слід зазначити, що пероксисомна мембранна локалізація Pdg1 була остаточно доведена ко-експресуючи в одному штамі Pdg1-GFP із BFP-PTS1 (blue fluorescent protein – блакитний флуоресцентний білок), які колокалізувались (Рис. 3.4.12). Пізніше у експериментах по клітинному фракціонуванню нашими партнерами з групи S. Subramani було остаточно доведено, що Pdg1 фізично зв'язується із пероксисомними мембранами [218]. Додатково, у дріжджовій двогібридній системі було встановлено, що Pdg1 фізично взаємодіє з Rex19, одним із ключових пероксинів, що забезпечують доставку РМР при біогенезі органел [218].

Нашою наступною ціллю було оцінити, які частини або фрагменти послідовності Pdg1 функціонально важливі для різних процесів, і чи за допомогою конструювання мутантних вкорочених форм Pdg1 можна розділити його функції у біогенезі і деградації пероксисом. Для цього було сконструйовано декілька відповідних форм, кон'югованих з GFP для моніторингу

внутрішньоклітинної локалізації, і експресованих під конститутивним промотором GAP, схематичне зображення яких є наведено на Рис. 3.4.13.

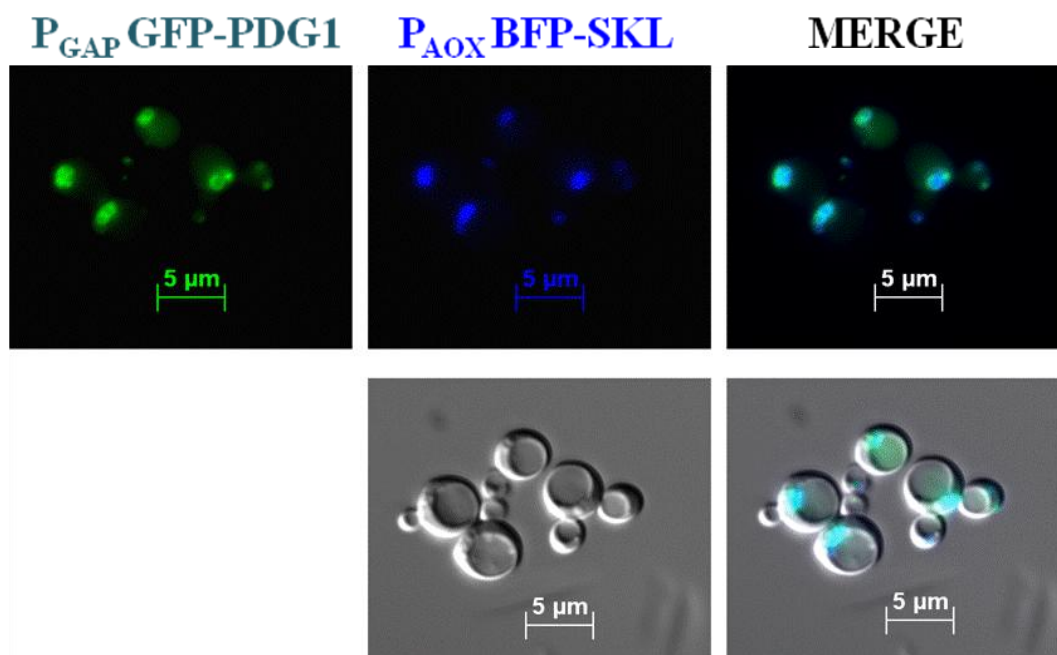


Рис. 3.4.12. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації Pdg1. Флуоресцентні зображення клітин штаму дикого типу, що коекспресують кон'югати Pdg1-GFP і BFP-PTS1. Очевидною є колокалізація у клітинах обох сигналів (див. панель MERGE – накладання).

Було зауважено, що тільки ті вкорочені форми Pdg1, що містили два прогнозовані трансмембранні домени з потенційною Rex19-зв'язуючою послідовністю, були здатні до функціональної комплементції *Apdg1* мутанта, забезпечуючи відновлення метилотрофного росту (тобто біогенезу пероксисом) і глюкозо- чи етанол-індукованої пексофагії (див. Рис. 3.4.13 і 3.4.14). Ці дані вказують, що N-кінцева послідовність Pdg1 не є суттєво необхідною для його функції, оскільки химерний Pdg1-GFP білок, що втратив 87 N-кінцевих амінокислот, був функціонально активним (відповідає вектору pOC12, Рис. 3.4.13). Наші попередні результати виявили, що дві вкорочені форми, що втрачали 33 чи 17 C-кінцевих амінокислот (вектори pOC15 і pOC16, відповідно) були здатні до функціональної комплементції дефекту росту на середовищі з метанолом, але тільки до позірної часткової комплементції дефекту пексофагії, як можна судити з моніторингу АОХ на чашках (Рис. 3.4.14), таким чином роз'єднуючи дві спряжені функції.

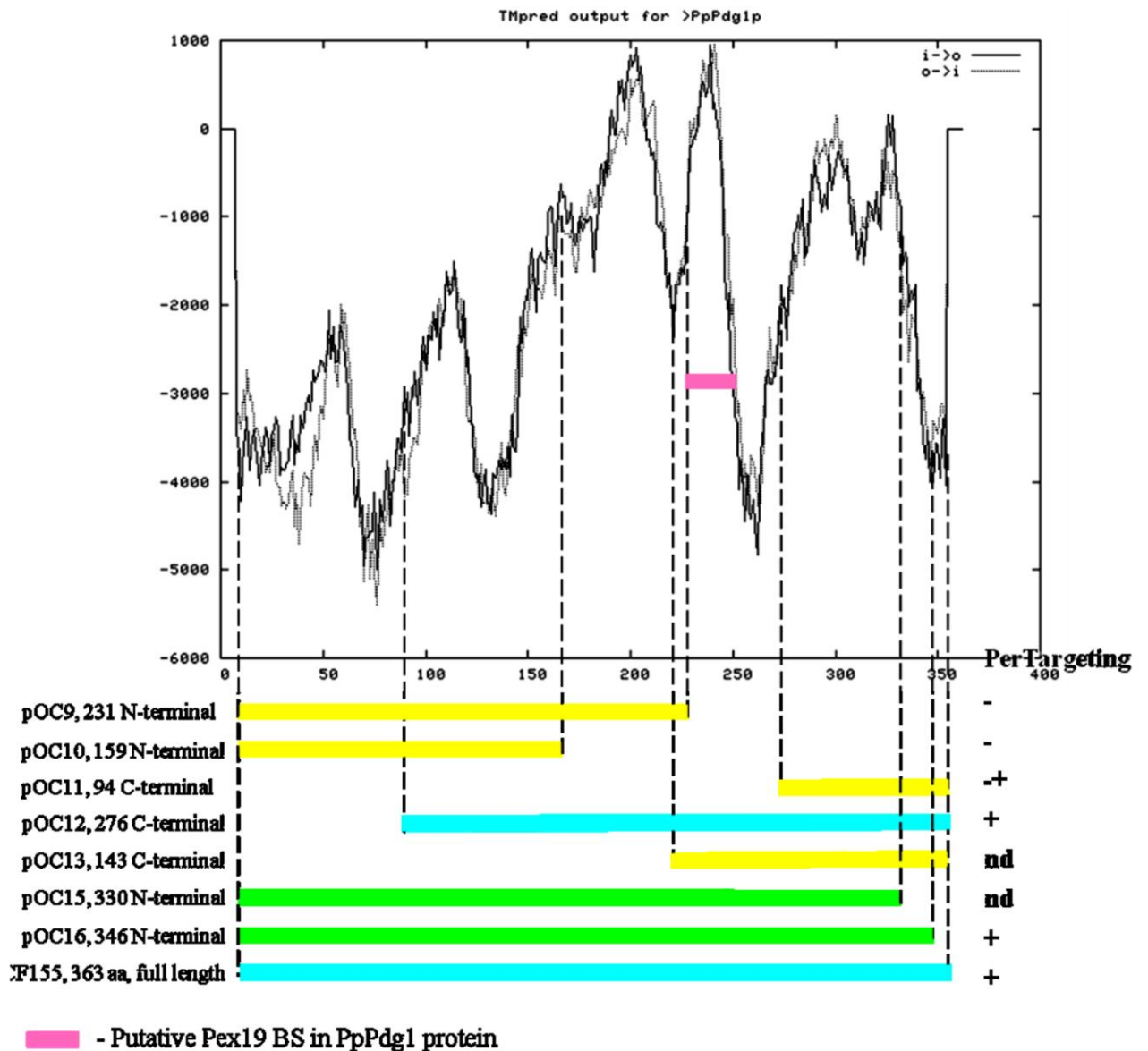


Рис. 3.4.13. Схематичне зображення сконструйованих вкорочених GFP-кон'югованих форм Pdg1 та їх функціональні характеристики. Жовтим кольором позначено вкорочені форми GFP-Pdg1, які не здатні функціонально комплентувати дефекти метилотрофного росту та пексофагії *Δpdg1* мутанта (див. також Рис. 3.4.14); синім – форми, здатні комплементувати *Δpdg1* до дикого типу; зеленим – форми, здатні відновлювати ріст на метанолі, але не пексофагію. Справа наведено дані внутрішньоклітинної локалізації відповідних форм. Позначено також імовірний Pex19-зв'язуючий домен.

Тому ми припустили, що С-кінцеві амінокислоти Pdg1, що містять короткий домен, схожий до короткої послідовності білка Atg7 (Рис. 3.4.15), можуть бути специфічно важливим для його ролі у пексофагії. Це припущення, однак, має бути підтвержене у додаткових експериментах.

Ми також вивчали, як сам Pdg1 та окремі інші пероксини деградують у клітинах *P. pastoris*, у яких індуковано пексофагію. У порівняльному аналізі моніторили рівні білка АОХ, Pdg1, а також пероксинів Pex3 і Pex14 у клітинах *P. pastoris*, перенесених із середовища з метанолом на середовища з глюкозою чи етанолом. В аналізі були використані клітини дикого штаму GS115, протеазо-дефіцитного мутанта SMD1163, $\Delta pdg1$ і $pdg1$, що надекспресує *PDG1* під GAP промотором. Як видно з Рис. 3.4.16, Pdg1, очевидно, сам не зазнає пексофагійної деградації у складі пероксисом, і швидше за все рециклізується з пероксисомних мембран при пексофагії (ця ідея пізніше була підтверджена флуоресцентно-мікроскопічним дослідженням з GFP-міченим Pdg1).

Наші дані також вперше вказали на те, що інший важливий пероксин Pex14 деградував незалежно від наявності вакуолярних протеаз (тобто, навіть у протеазо-дефіцитного SMD 1163 штаму), і цей процес, ймовірно, є залежним від протеасом, що у майбутньому можна перевірити, використовуючи відомі специфічні протеасомні інгібітори. І навпаки, Pex3 не деградував у безпротеазного мутанта. Як видно з Рис. 3.4.16, вихідні рівні Pex14 і Pex3 у $\Delta pdg1$ є порівняно із штамом дикого типу низькими, що узгоджується із спостереженим послабленим чи порушеним у нього біогенезом пероксисом. Також деградація Pex14 у штаму дикого типу є, очевидно у певній мірі швидшою, ніж для Pex3, що узгоджується з його екстравакуолярною деградацією. Пексофагія у $pdg1/pJCF155$ (експресує *PDG1* кон'югат під GAP промотором) є, очевидно, не повністю комплементована (див. рівні АОХ), але цей фенотип може бути пов'язаний із поки незрозумілим ефектом надекспресії Pdg1 (див. також «Обговорення» нижче). В цілому, наші дані вказують на те, що видалення Pex14 (видно навіть на 3 год) з пероксисомної мембрани у *P. pastoris* може бути передумовою подальшої ефективної пексофагії, і може пояснити, чому цей процес є порушеним у $\Delta pdg1$ мутанта.

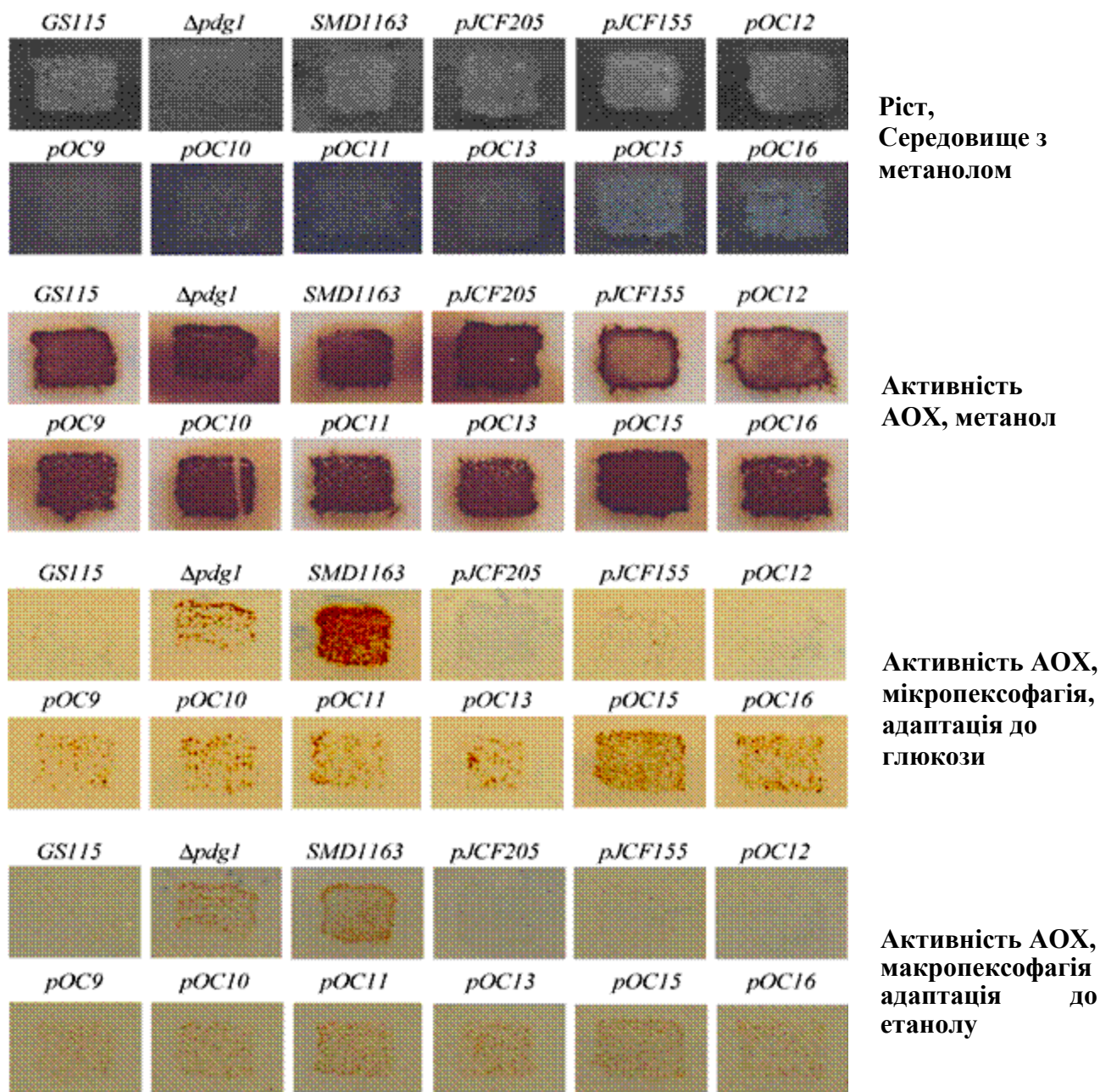


Рис. 3.4.14. Фенотиповий аналіз $\Delta pdg1$ трансформантів, що експресують різні форми GFP-Pdg1 вкорочених кон'югатів (деталі на. Рис. 3.4.13). Експресію кожного білка визначеного розміру було підтверджено Вестерн-блот аналізом з анти-Pdg1 чи анти-GFP антитілами. Слід відзначити, що форми Pdg1, які не містять коротких С-кінцевих фрагментів (pOC15 і pOC16), очевидно відновлюють ріст на середовищі з метанолом (верхня панель), але не пексофагію, індуковану глюкозою, у порівнянні з повнорозмірним білком з вектора pJCF155.

```

PpAtg7  1  ---LTKVKQESSEIAEKKFQ  EFENGLSEFSEDESEWLN
ScAtg7  1  -LYLEEISGLSVIKQEVER  LGNDVFEWEDDESDEIA
PpPdg1  1  SWIMSIYRMSKDEIQETNP  SINNGLKSDDIIDEYA
SpAtg7  1  ---VEELCGLREVQALGE  IAGTMEEWISDKESVLL

```

Рис. 3.4.15. Накладання фрагменту 33-ох С-кінцевих амінокислотних залишків Pdg1 з С-кінцевими т ділянками дріжджових Atg7 білків з *P. pastoris*, *S. cerevisiae* і *S. pombe*.

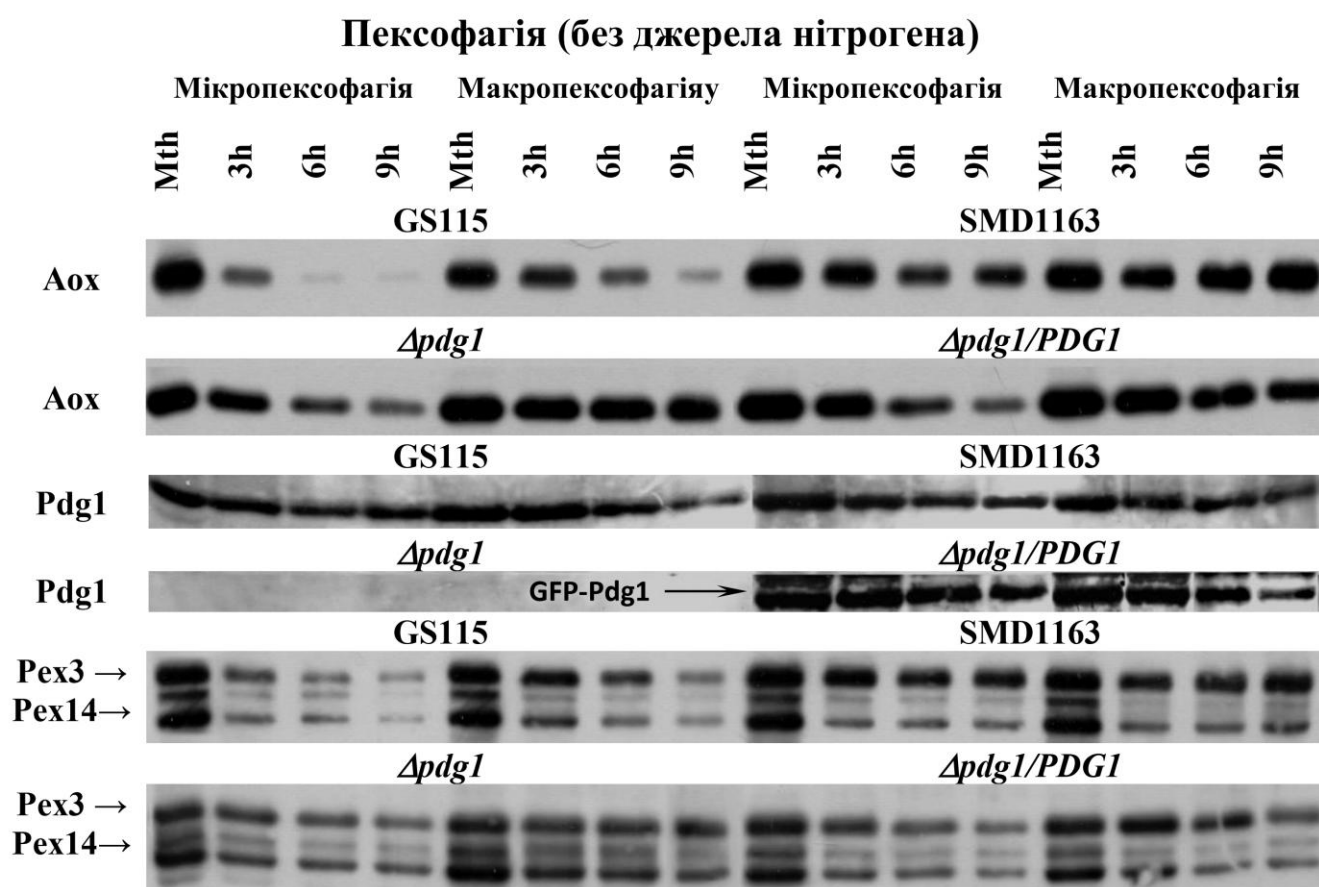


Рис. 3.4.16. Моніторинг долі пероксинів Pdg1, Pex3 і Pex14 при мікро- і макропексофагії у *P. pastoris*. Клітини були індуковані у середовищі з метанолом і перенесені у середовище YNB з 1.0% глюкозою або 1% етанолом без джерела нітрогена для запуску пексофагії. Рівні об'єми (кількості білку) ТСА екстрактів наносились для GS115 (дикий тип), *Δpdg1*, надпродуцента білка *Δpdg1/PDG1*, і протеазо-дефіцитного штаму SMD1163 (*prb1pep4*).

3.4.1.4. Ідентифікація і характеристика гомолога Pdg1 у *H. polymorpha*

Далі було поставлене питання, чи є функціональним гомологом PpPdg1 Pdg1-подібний білок, присутній у геномі філогентично-споріднених метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* (див. Рис. 3.4.2), і чи інтерферує він із механізмом пексофагії? Ідентифікований потенційний гомолог, позначений як HpPdg1, виявляв обмежену гомологією первинної послідовності до PpPdg1, виражену лише в області передбачених трансмембранних доменів (Рис. 3.4.2). Крім цього, HpPdg1 є значно коротшим – 276 амінокислотних залишків проти 363 у PpPdg1.

Для встановлення функціональної спорідненості ідентифікованого білка *H. polymorpha* був сконструйований відповідний делеційний штам, як описано у розділі «Матеріали і Методи». Подальший фенотиповий аналіз показав, що $\Delta pdg1$ мутант *H. polymorpha* виявляє сповільнений ріст на середовищі з метанолом (Рис. 3.4.17), що вказує на можливе порушення біогенезу пероксисом.

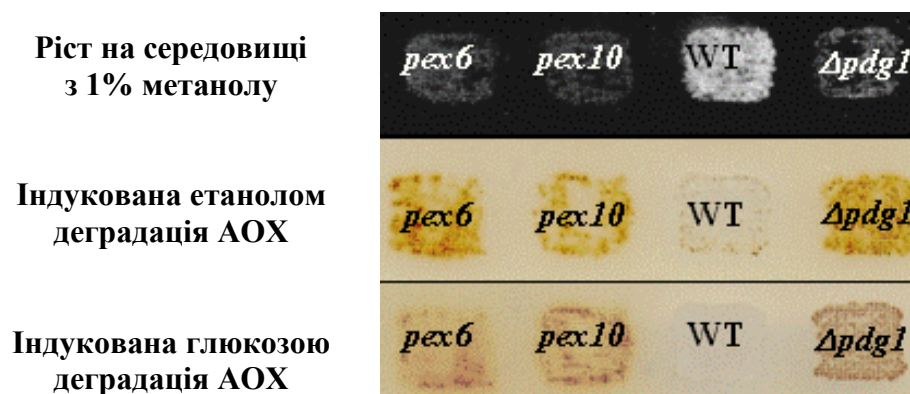


Рис. 3.4.17. Аналіз фенотипу сконструйованого $\Delta pdg1$ мутанта *H. polymorpha*. Клітини $\Delta pdg1$, штаму дикого типу (WT), та двох *pex* мутантів, нездатних до росту на середовищі з метанолом, були репліковані з індукційного середовища YNB з 1% метанолом на чашки, які містили етанол і глюкозу, для запуску макропексофагії. Активність АОХ була візуалізована як описано у розділі 3.3.

Також, за результатами аналізу глюкозо- чи етанол-індукованої макропексофагії у колоніях дріжджів, мутант $\Delta pdg1$ виявляє їх пошкодження у порівнянні зі штамом дикого типу. Але, оскільки, на противагу до *P. pastoris*,

АОХ у *H. polymorpha* є повністю активною навіть коли міслокалізована у цитозоль, і така міслокалізація може викликати «псевдофенотип», що нагадує пошкодження пексофагії. Так, як показано на Рис. 3.4.17, подібно до мутанта $\Delta pdg1$ метанол-індуковані клітини *rex6* і *rex10* мутантів *H. polymorpha* при адаптації до глюкози чи етанолу демонстрували високу залишкову активність АОХ. Однак, ця залишкова активність виникає внаслідокз цитозольної міслокалізації АОХ у позбавлених пероксисом *rex* мутантів, а не дефекту пексофагії. Таким чином, фенотип мутанта $\Delta pdg1$ *H. polymorpha* також може бути результатом подвійної локалізації АОХ. При цьому додатковий порівняльний аналіз $\Delta pdg1$ *H. polymorpha* з описаними вище у Розділах 3.1 та 3.2 мутантами $\Delta gcr1$, $\Delta hxs1$, $\Delta mig1$ і $\Delta mig2$, дефіцитними за різними механізмами транскрипційної регуляції глюкозою, та описаним у Розділі 3.3 делеційним мутантом по гену *ATG26* *H. polymorpha*, виявив, що дефект індукованої глюкозою макропексофагії у $\Delta pdg1$ є більш виражений, ніж у $\Delta mig1$ та $\Delta atg26$, які характеризуються частковими дефектами макропексофагії (Рис. 3.4.18).

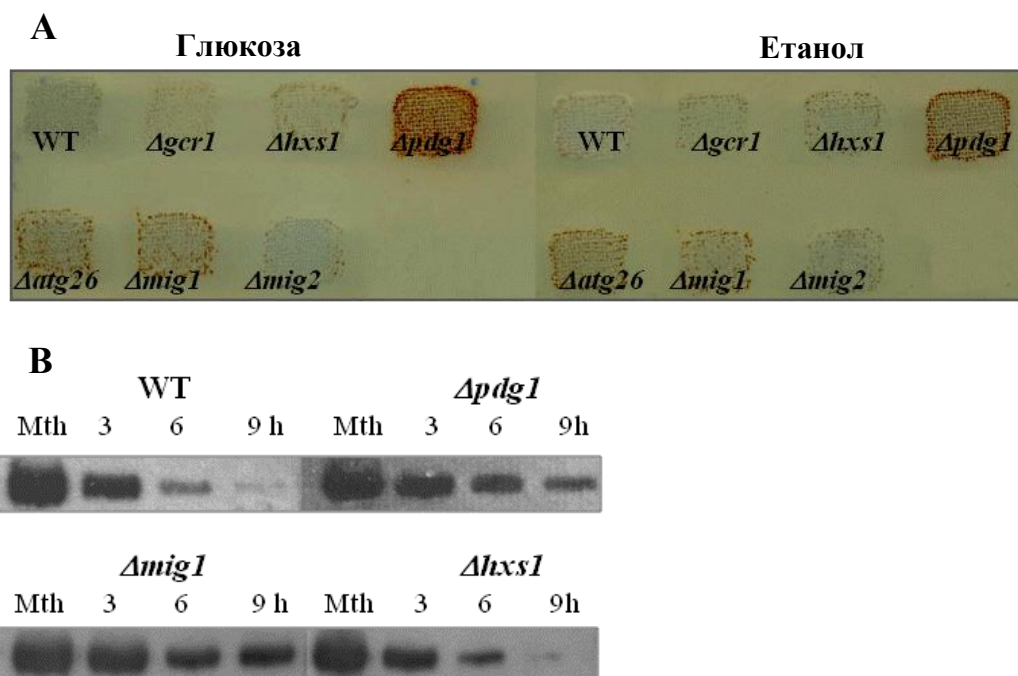


Рис. 3.4.18. Порівняльний аналіз деградації АОХ у сконструйованого мутанта $\Delta pdg1$ з іншими регуляторними мутантами *H. polymorpha*. **(А)** Аналіз активності АОХ на чашках **(В)** Вестерн-блот аналіз білка АОХ у безклітинних екстрактах за умов індукції макропексофагії глюкозою.

Таким чином, беручи до уваги фенотип мутантів *rex* щодо деградації АОХ, тільки додатковий мікроскопічний структурний аналіз може роз'яснити природу позірною дефекту пексофагії у *Δpdg1 H. polymorpha* (див. також «Обговорення» нижче). Беручи до уваги вищевказані результати, цікавим було питання, чи здатен ген *PDG1 P. pastoris* функціонально комплементувати *Δpdg1* мутант *H. polymorpha*. З цією метою відповідний мутант був трансформований вектором pJCF155 *P. pastoris*, який містить функціональну 5'-кінцевий ділянку гена *PpPDG1*, кон'югованого з геном GFP, під контролем *GAP* промотора. Відбір трансформантів лінеаризованою pJCF155 проводився у середовищі з підвищеною концентрацією метанолу, до якої *Δpdg1 H. polymorpha* є чутливим. Отримані трансформанти тестували на стабільність за допомогою декількох циклів перенесення із чашок з метанолом на середовище з глюкозою. Потім присутність гена *PpPDG1* у тотальна геномна ДНК підтверджувалась ПЛР із специфічними праймерами. Ефективність росту на метанолі було додатково проаналізована у рідкому середовищі. Показано, що трансформанти *Δpdg1/pJCF155* володіють проміжним фенотипом відносно штаму дикого типу та реципієнтного штаму *Δpdg1* щодо утилізації метанолу та дефекту пексофагії (Рис. 3.4.19).

Таке часткове відновлення росту на метанолі та пексофагії при надекспресії *PpPdg1* узгоджується із частковим відновленням здатності до біогенезу пероксисом, та релокалізацію до них більшої частини АОХ. Цей результат попередньо свідчить на користь того, що два білки *Pdg1* у *P. pastoris* і *H. polymorpha* є функціональними аналогами або ортологами (див. також «Обговорення» у кінці розділу).

3.4.1.5. Пошук функціональних гомологів *PpPdg1* у неметилотрофних дріжджів

Порівнюючи послідовності *Pdg1 P. pastoris* з наявними базами даних, також було ідентифіковано Ycl056с *S. cerevisiae*, білок з невідомою функцією з дуже обмеженою гомологією до *Pdg1* у С-кінцевій області (Рис. 3.4.20). Подібно до *HpPdg1*, Ycl056с є значно коротшим, ніж *PpPdg1* (144 амінокислотних залишки проти 363), але при цьому два білки володіють схожою топологією в області передбачених трансмембранних доменів (Рис. 3.4.21). Така структурна схожість привела до припущення, що Ycl056с потенційно може бути функціональним гомологом *Pdg1* у *S. cerevisiae*.

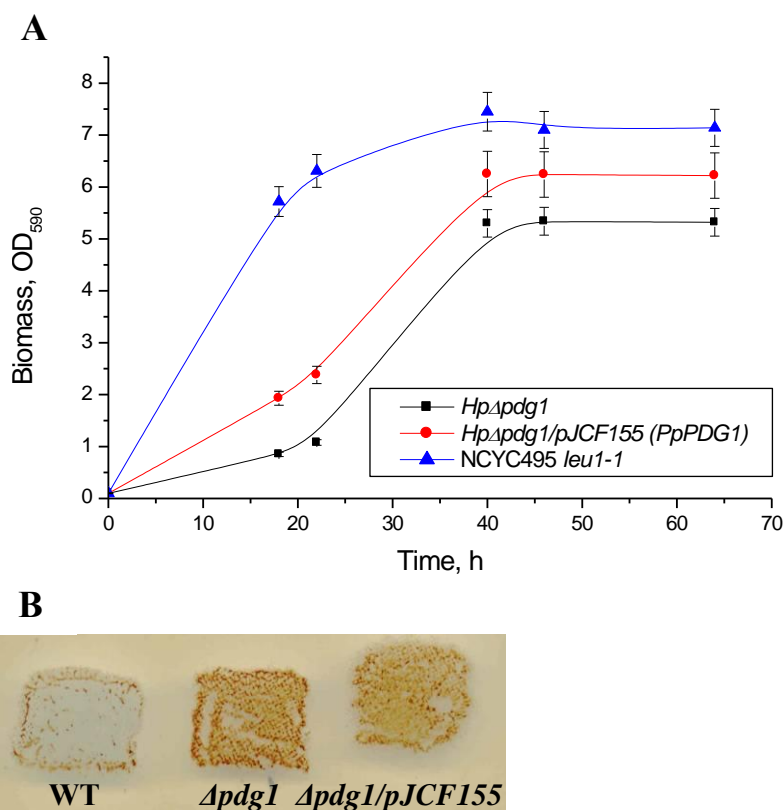


Рис. 3.4.19. Аналіз міжвидової комплементачії *PDG1* генів. **(А)** Аналіз кінетики росту у мінеральному середовищі з 1% метанолом мутанта *Δpdg1 H. polymorpha* і штаму *Δpdg1/pJCF155*, що надекспресує *PpPDG1*. **(В)** Моніторинг пексофагії методом візуалізації активності АОХ у колоніях після реплікації відповідних штамів із середовища з метанолом на середовище з глюкозою.

```

ScYcl056c 1 -----
PpPdgl 1 MSNLEKQIRLKNLLES LN GSKSQADLKKESQTLIDIFKQTRQKMIHDQQSNLHPVTSIQGKKLLNLRKAL
HpPdgl 1 -----

ScYcl056c 1 -----
PpPdgl 71 QNHQKHRDNIKVVKTNAEPVSTHDQTVDSNSDS SSETLIDTSTSSSFDNIK WLHETNSNESQSKGRPS
HpPdgl 1 -----MSNLHYGPKLRQLLKLKLS--DRDRGPSAGNERISKLAFLGLLVVKNKQRRRSSTS LSSSPT

ScYcl056c 1 -----MVSKKNTAE SAKDIWENIWSGVSSLLDFAVLE-
PpPdgl 141 EYTHVNSPDSGVSSKSGQLSMITQDSNQILLIKQITAKYNMLESFFINSEQIALFDNFYFLSSLIGF
HpPdgl 63 LYSPTQSRANSGLLAGSRFARTRPC-----RSWQEKYNSFETGLANLESMVSLFDNFTMQNILL--

ScYcl056c 35 NLGVVNDKI--YVSGLLR---KWL CYSCISVVKCVWKLKLC---VKFKIDQRLDGEGLVKKDKLI
PpPdgl 211 NTSNSNSKTRLRNRNFIKQASKWLVIIIFLTVKNLEIRMIKLNRTKVKLERDILMSRSPNSSTIQY---
HpPdgl 125 SKSRFASKF-RGVETLLKNLSKVYFVILINIKNLVVKLIKLNKLRIVELEAEMLSRNGKNVLLPEAAS

ScYcl056c 96 NFKKK---YNEHIRHITAAL--LQDLSYLMVLIYPGTRLFKRLSNITLCRIIV-----
PpPdgl 278 EYDAMLTIRTSKISTFLEMIGNVNEFAFYLIQVMNW-KVSKKVKNIAGISWIMSIYRMSKDEIQETNP
HpPdgl 194 QEREKLVFLKYTEFRTYLELIGYANELVLDLTLVYSKIRLPKLVRLVSLVSWIIGVYRLSKDEAEEART

ScYcl056c -----
PpPdgl 347 SINNGLKSSDDIIDEYA
HpPdgl 264 EKQIAAMQQYI-----

```

Рис. 3.4.20. Накладання послідовностей *PpPdgl*, *HpPdgl* і гіпотетичного гомолога *Ycl056c* з *S. cerevisiae*.

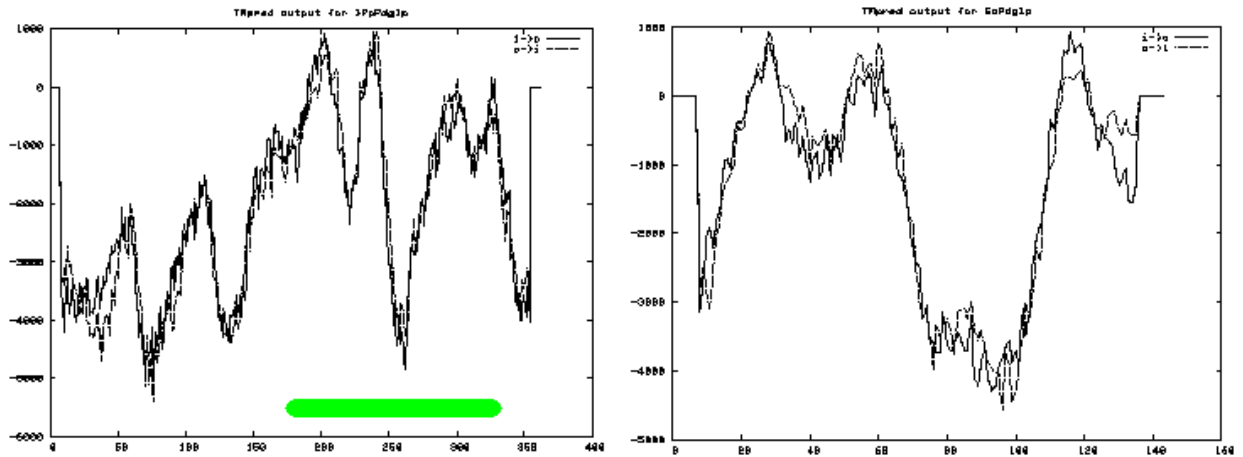


Рис. 3.4.21. Порівняння прогнозованих топологій *PpPdg1* і білка *Yc1056c* *S. cerevisiae*. Область *PpPdg1*, що відповідає повнорозмірному *Yc1056c*, підкреслена лінією.

Для експериментальної перевірки цієї гіпотези було сконструювано вектор, що експресує *Yc1056c* у мутанта *Δpdg1 P. pastoris* і показано, що дійсно *Yc1056c* при надекспресії може частково функціонально компенсувати дефіцит метилотрофного росту. На підтвердження цих даних, *Yc1056c S. cerevisiae* був пізніше ідентифікований як новий пероксин *Pex34*, який фізично взаємодіє з *Pex11*, *Pex25* і *Pex27* у поділі пероксисом у пекарських дріжджів, контролюючи їх чисельність [442].

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 гена 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 подібні але взаємовиключні функції у біогенезі пероксисом.

Для перевірки цієї гіпотези нами було сконструювано вектор, здатний до експресії *Y. lipolytica PEX16* під контролем P_{AOX} у *P. pastoris*, як описано у розділі «Матеріали і Методи». Отримана вектор *pOP1* був лінеаризований для інтеграції геном і трансформований у реципієнтний мутант *Δpdg1 P. pastoris*. Встановлено, що

гетерологічний *PEX16* *Y. lipolytica* функціонально комплементував дефект росту $\Delta pdg1$ *P. pastoris* у агаризованому чи рідкому середовищі з метанолом (Рис. 3.4.22).

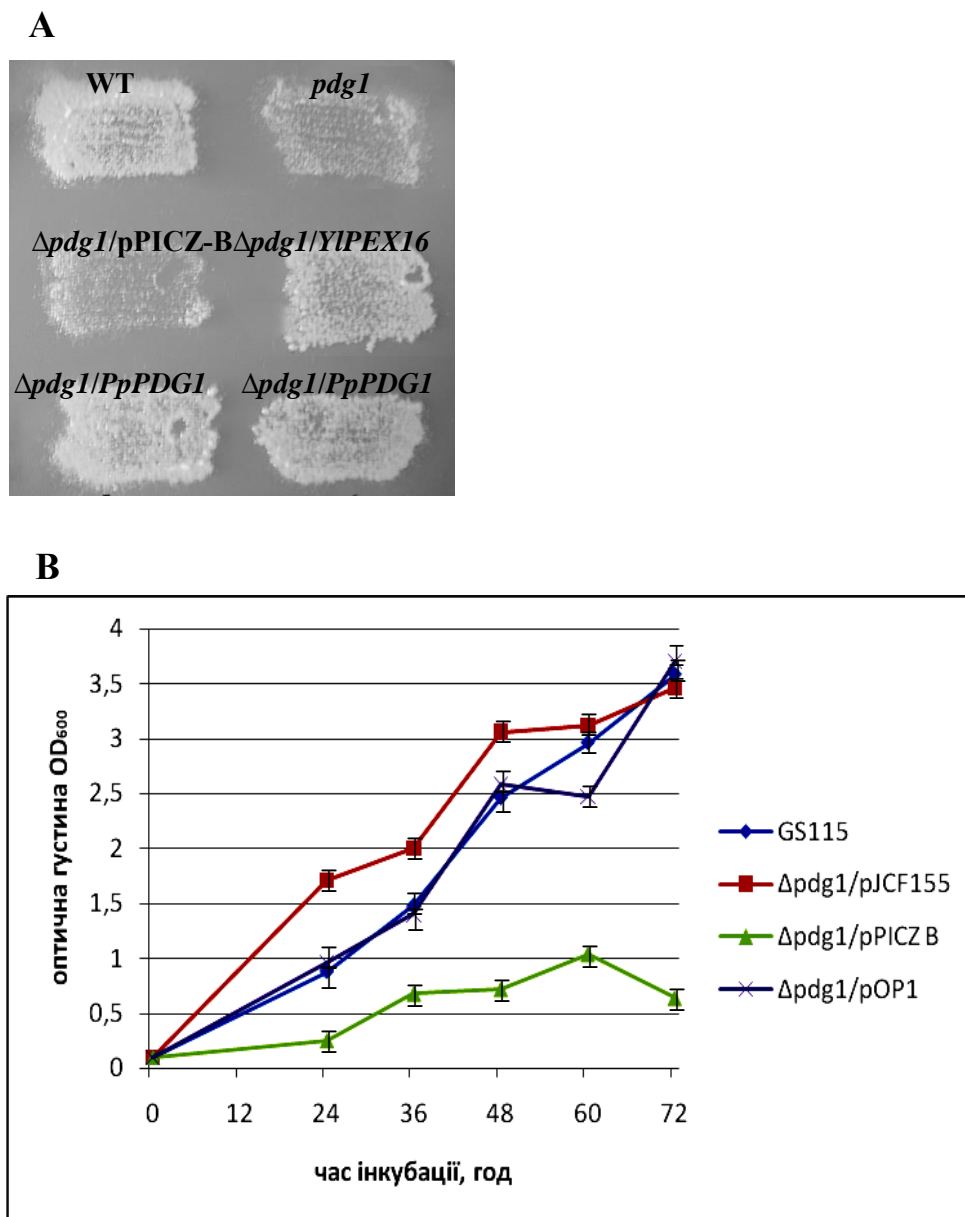


Рис. 3.4.22. Аналіз функціональної комплементування *YlPEX16* $\Delta pdg1$ *P. pastoris*. **(A)** Ріст на агаризованому мінеральному середовищі YNB з 1% метанолом. Проаналізовано штами: *P. pastoris* GS115, штам дикого типу, $\Delta pdg1$, $\Delta pdg1/pPICZ-B$ (порожній вектор), $\Delta pdg1/pOP1$ ($P_{AOX}YlPEX16$), $\Delta pdg1/pJCF155$ (*PpPDG1*), $\Delta pdg1/pOS6$ (*PpPDG1*). **(B)** Ріст тих самих штамів, що й на **(A)** у рідкому середовищі з метанолом.

Додатково було показано, що *PpPDG1* здатен відновлювати біогенез пероксисом у фібробластах людини, що несуть мутований *HsPEX16* [218]. Оскільки функції Pex34, Pex16, та Pdg1 виявились відмінними та

видоспецифічними, останньому білку було вирішено присвоїти статус нового пероксина, названого Pex36 [218]. Необхідні додаткові дослідження для встановлення молекулярної ролі Pex36 у процесі пексофагії.

3.4.2. Виділення й аналіз умовних мутантів *H. polymorpha*, дефіцитних за біогенезом пероксисом

Вивчення взаємозв'язку між біогенезом і деградацією пероксисом для ідентифікації гіпотетичних спільних для обох механізмів генетичних елементів становить значний фундаментальний інтерес [2], [443]. Незважаючи на їх протилежну напрямленість, ранні дослідження продемонстрували можливість існування таких факторів, наприклад пероксину Pex14 *H. polymorpha* [216]. Окрім ряду інших пероксинів, імпорту пероксисомних матриксних білків вимагає дії двох так званих AAA АТФ-аз, Pex1 and Pex6. Вони утворюють комплекс і мутації, що на нього впливають є найбільш поширеною причиною пов'язаного із дефіцитом пероксисом синдрому Зельвегера (Zellweger) у людей [161], [444]. Завданням описаних нижче експериментів було встановити, чи може пероксин Pex6 *H. polymorpha* бути залучений у регуляцію процесу пексофагії. Слід зазначити, що хоча наші дослідження з використанням температуро-чутливого мутанта *pex6* не дали однозначної відповіді, пізніші дослідження інших груп дійсно підтвердили, що дві AAA АТФ-ази регулюють пексофагію [445], [446].

3.4.2.1. Виділення і характеристика холодочутливого мутанта *pex6* *H. polymorpha*

Висловлено припущення, що роль пероксину Pex6 у селективній пексофагії можна дослідити на моделі температурочутливого до росту на метанолі (кондиційного) мутанта, отриманого на основі мутаного штаму *pex6*, нездатного до біогенезу пероксисом та метилотрофного росту. Селекцію температурочутливих ревертантів проводили як описано у розділі «Матеріали і Методи». Виявилось, що стабільні ревертанти можуть бути виділені з одного із УФ-індукованих *pex6* мутантів, а саме *per5-C79 leu1.1* [337], з високою частотою

1×10^{-6} . Однак, серед декількох сотень УФ-індукованих ревертантів ідентифіковано лише один з умовним (cs) фенотипом з відновленим ростом на середовищі з метанолом при 37°C (пермісивна температура) і значно сповільненим ростом при 28°C (рестриктивна температура) (Рис. 3.4.23).

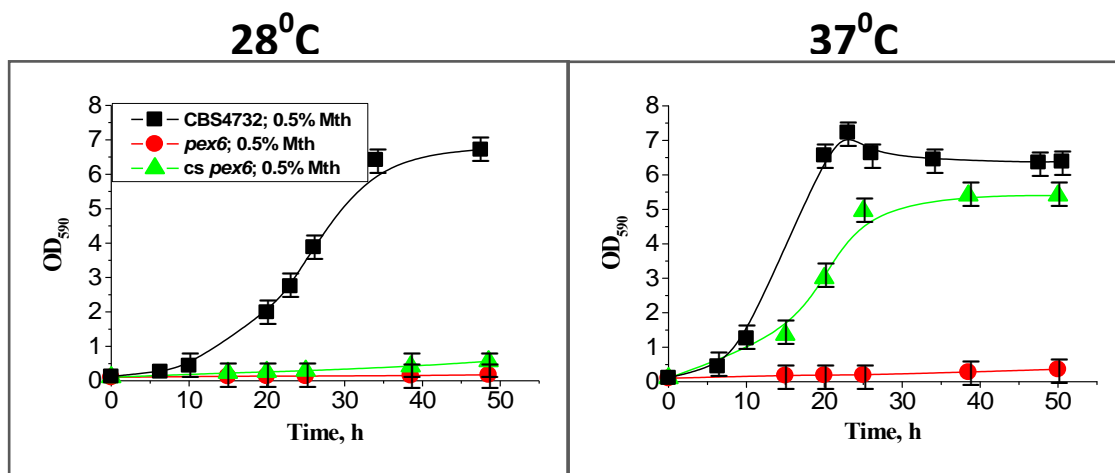


Рис. 3.4.23. Кінетика росту штаму дикого типу *H. polymorpha*, вихідного мутанта *rex6* похідного від нього *cs rex6* у мінеральному середовищі YNM з 0,5% метанолом.

Ідентифікований *cs rex6* мутант мав фенотип холодової чутливості тільки на середовищі з метанолом, але не на середовищі з глюкозою чи гліцеролом. З метою встановити, чи часткове відновлення метилотрофного росту при пермісивній температурі супроводжується відновленням біогенезом пероксисом у клітинах *cs rex6* мутанта, був проведений електронно-мікроскопічний аналіз (Рис. 3.4.24).

Несподівано виявилось, що пероксисоми присутні у клітинах *cs rex6* індукованих метанолом при обох температурах: відновлені морфологічно нормальні пероксисоми при пермісивній температурі і, видозмінені збільшені у розмірі органели при рестриктивній для нього температурі (Рис. 3.4.24). Слід зазначити, що вихідний *rex6* мутант є повністю позбавлений пероксисом і виявляє лише пероксисомні залишки або так звані «тіні» [183]. Крім того, експерименти з клітинного фракціонування показали, що пероксисомно-цитозольний розподіл ні АОХ, ні пероксисомної каталази не є суттєво відмінними при пермісивній чи рестриктивній температурах.

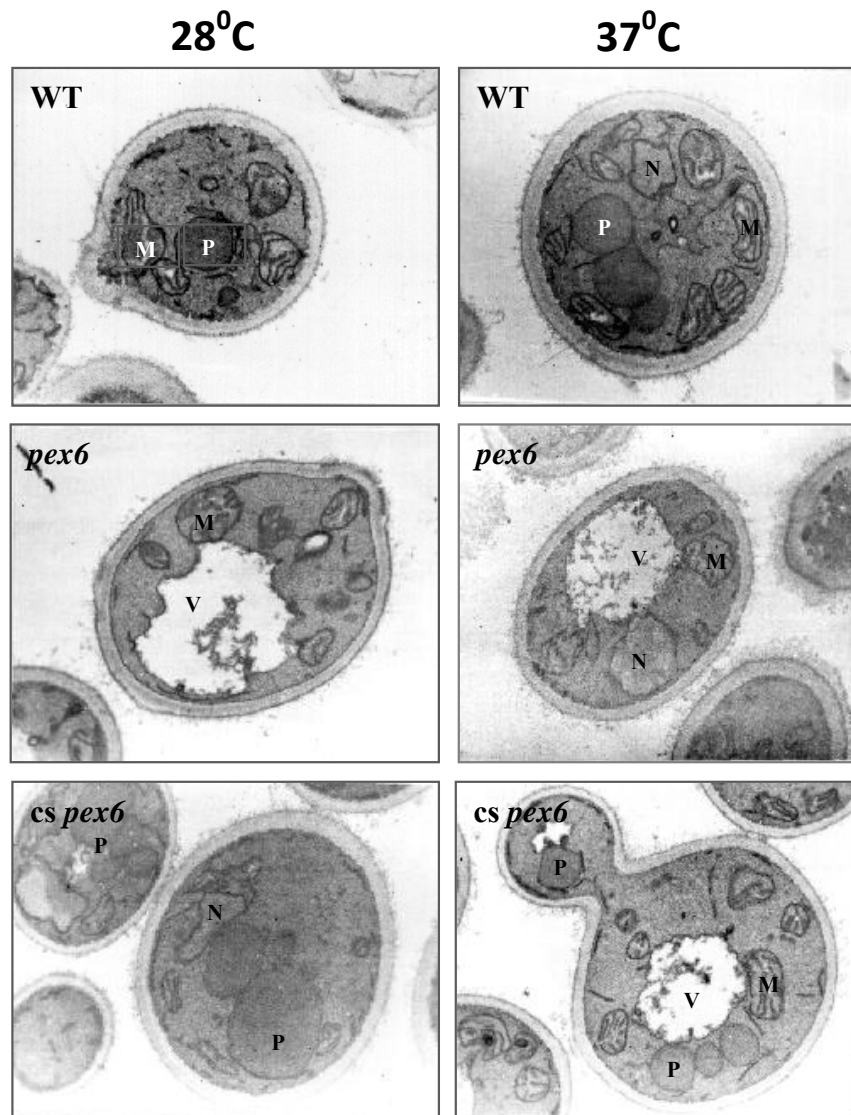


Рис. 3.4.24. Електронно-мікроскопічні зображення штаму дикого типу, *rex6* і його похідного *cs rex6* мутанта *H. polymorpha*. Клітини інкубували в середовищі YNM з 1% метанолом впродовж 12 год при 28°C чи 37°C. Позначення: М – мітохондрія; N – ядро; Р – пероксисома; V – вакуоля.

Біохімічний аналіз пексофагії в умовного *cs rex6* мутанта при пермісивній та рестриктивній температурах не виявив суттєвої різниці відносно штаму дикого штаму для клітин преінкубованих при 28°C, але виявив незначне сповільнення швидкості інактивації АОХ у клітин, преінкубованих при 37°C (Рис. 3.4.25).

3.4.2.2. Генетичний аналіз та ідентифікація *PEX6* мутацій

З метою встановлення молекулярної природи досліджуваних мутацій був проведений генетичний аналіз. Виявилось, що відповідна *cs* мутація є пов'язаною із

локусом *PEX6* гена. Мутант *cs pex6* схрещували з штамом дикого типу і отримане потомство диплоїдного гібридного штаму аналізували на Pex^- фенотип. З декількох тисяч індивідуальних колоній лише одна була ідентифікована як нездатна рости на середовищі з метанолом при обох температурах – 28°C і 37°C. У всіх інших випадках колонії демонстрували батьківські фенотипи штаму дикого типу або *cs*-умовного мутанта, що передбачає косегрегацію вихідної і вторинної мутації.

Природа передбачених мутацій у вихідному *pex6* і похідному *cs* мутанті була встановлена шляхом виділенням відповідних алелей з геномної ДНК і їх секвенування як описано у розділі «Матеріали і Методи».

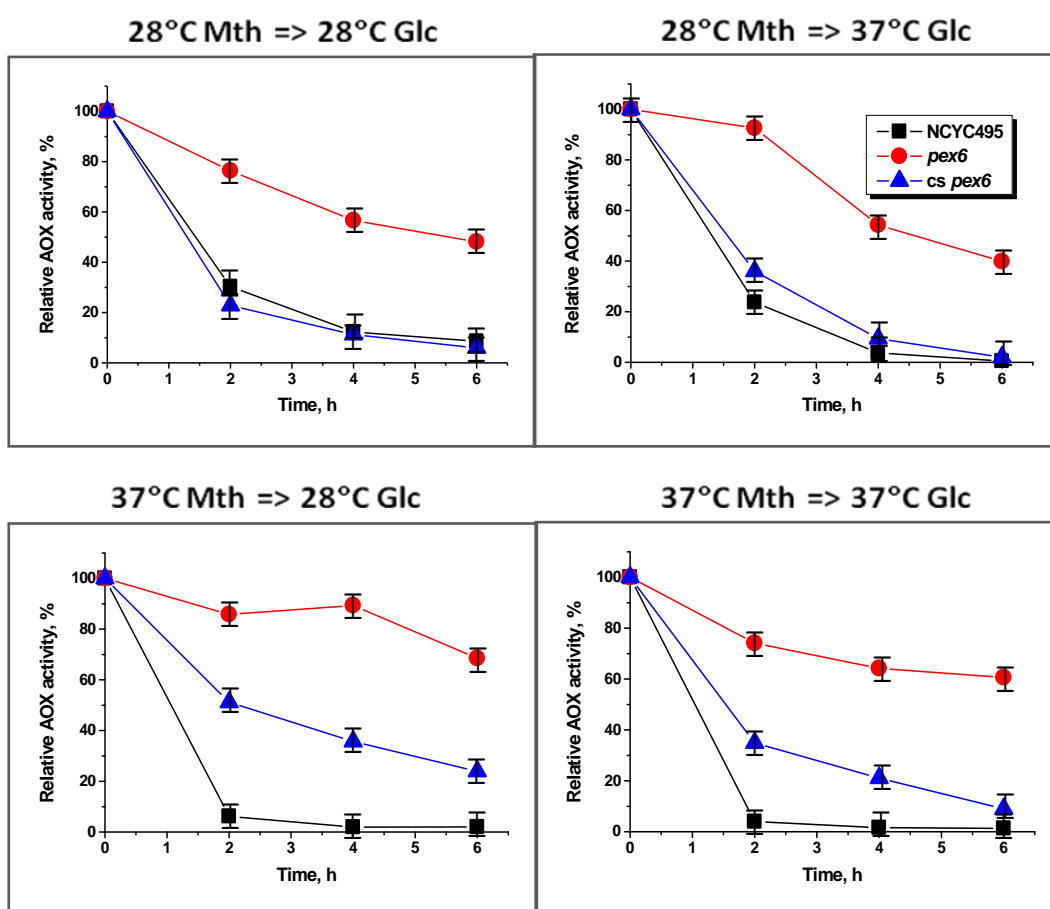


Рис. 3.4.25. Аналіз процесу пексофагії у вихідного та *cs pex6* мутантів *H. polymorpha*. Показано кінетику інактивації пероксисомної АОХ при перенесенні метанол-індукованих при 28°C або 37°C клітин штаму дикого типу, *pex6* і *cs pex6* мутантів на середовище з глюкозою, та інкубованих при 28°C чи 37°C, рестриктивній і пермісивній температурах, відповідно.

Секвенування фрагментів геномної ДНК довжиною 3,6 т.п.н., що включали ген *PEX6*, виявило міссенс мутацію у алеля гена *rex6* (G2210A), що веде до заміни амінокислоти G737E у білку *Pex6* (Рис. 3.4.26). Вторинна внутрішньогенна мутація для алеля *cs rex6* була ідентифікована як заміна A2998G, що веде до заміни амінокислоти R1000G (Рис. 3.4.26).

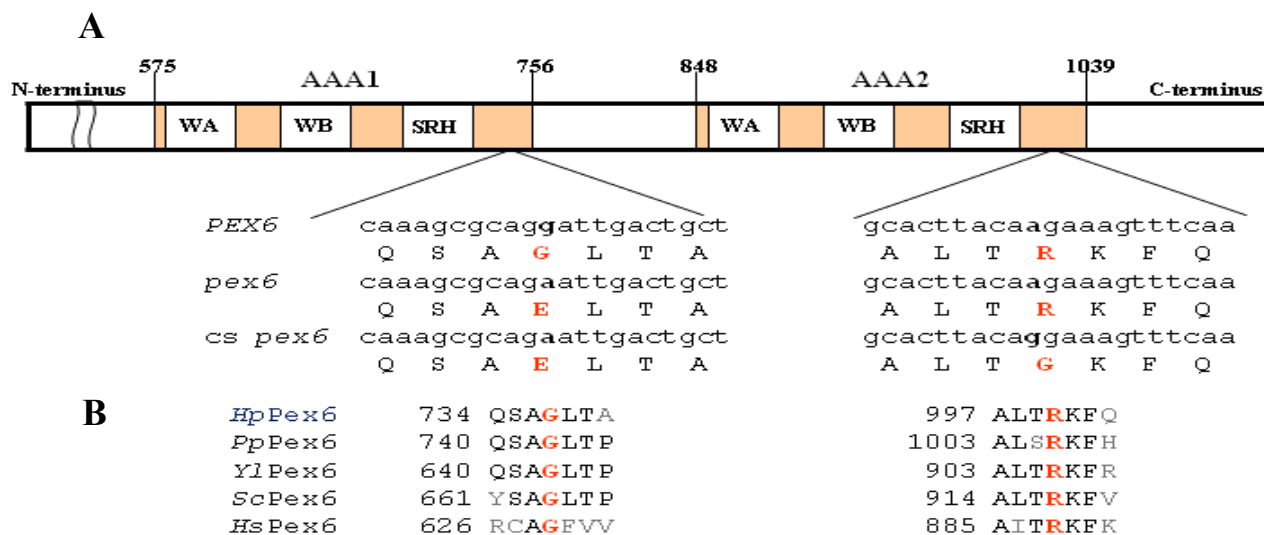


Рис. 3.4.26. Схематичне зображення ідентифікованих мутацій у гені *PEX6* *H. polymorpha* (A) Позначено два нуклеотид-зв'язуючі домени AAA1 і AAA2, характерні для AAA родини АТФ-аз Walker A та B (WA, WB), і SRH мотив. Мутовані нуклеотиди і амінокислотні залишки показано жирним шрифтом. (B) Накладання фрагментів дріжджового і людського білків *Pex6* та *Pex1*, що включають мутовані з залишки (виділено жирним шрифтом).

Залишок гліцину G737, мутований у вихідного *rex6* штаму є консервативним у дріжджових і людських *Pex6* білках і знаходиться у С-кінцевій частині першого AAA модуля *Pex6*, специфічного для цього класу білків (Рис. 3.4.26А). Крім цього, відповідний залишок є консервативним у першому AAA модулі *Pex1* *H. polymorpha* і людини, – взаємодіючому партнері *Pex6* при імпорті матриксних білків пероксисом (Рис. 3.4.30 В). Ці дані вказують на функціональну важливість залишку гліцину у цьому положенні у *Pex6* і *Pex1* як у нижчих, так і вищих еукаріотів. У свою чергу, залишок аргініну R1000 мутований лише у *cs rex6*, знаходиться у другому AAA модулі *Pex6* і є консервативним

тільки для дріжджових і людських гомологів *Pex6*, але не *Pex1* (Рис. 3.4.26 В). Це передбачає специфічну для білків *Pex6* функціональну важливість цього залишку.

Неочікувано виявилось, що виявлені *PEX6* мутації не є просто рецесивними. Обидва *pex6* і *cs pex6* штами не могли бути функціонально комплементовані при трансформації реплікативною плазмідною рУТ3-*PEX6*, що несе копію *PEX6* гена дикого типу, виділену з геномної бібліотеки *H. polymorpha* [399] (Рис. 3.4.27). Схожий дефіцит росту на середовищі з метанолом також спостерігався у гібридних диплоїдних штамів, отриманих у результаті схрещування *pex6* чи *cs pex6* мутантів зі штамом дикого типу. Диплоїди, що несли мутантні алелі гена з *pex6* і *cs pex6*, виявляли «leaky» або *cs* фенотип. Однак при цьому плазміда рУТ3-*PEX6* повністю комплементувала контрольний мутант з делетованим *PEX6* геном (Рис. 3.4.27). Таким чином, заміна G737E призводить до часткового домінантно-негативного фенотипу, очевидно більш вираженого при 28°C.

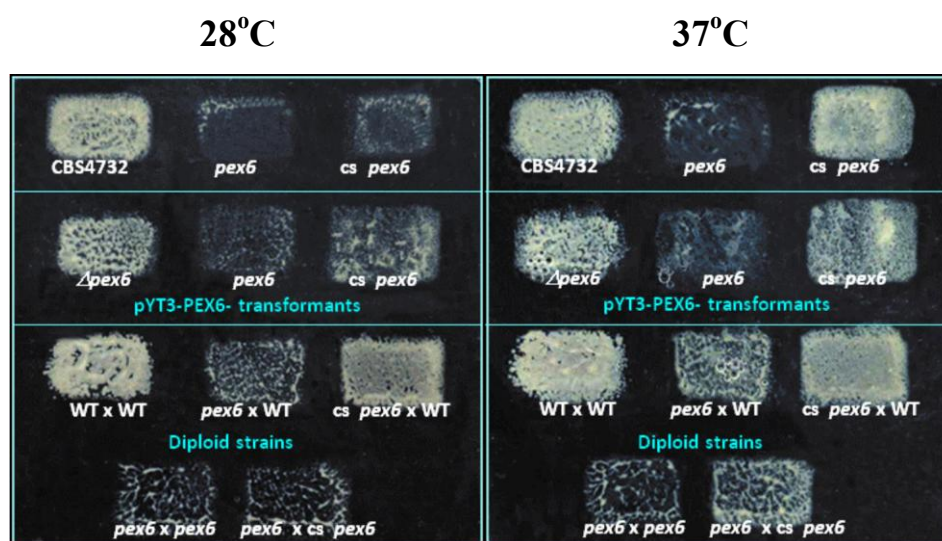


Рис. 3.4.27. Аналіз фенотипів, викликаних ідентифікованими мутаціями *PEX6* гена *H. polymorpha*. Показано ріст гаплоїдних штамів, трансформантів рУТ3-*PEX6* і диплоїдів на чашках з метанолом при різних температурах. Слід зауважити, що ідентифікована вихідна *pex6* (G737E) мутація веде до домінантно-негативного фенотипу.

Для з'ясування фенотипу, який вторинна мутація R1000G викликає незалежно від первинної G737E, *cs pex6* мутант був трансформований двома лінійними фрагментами гена *PEX6* штаму дикого типу, ізольованого з плазміди

pYT3-PEX6 за допомогою ферментів рестриктаз. Фрагмент AatII довжиною 2,080 т.п.н. містив частину ORF *PEX6* з сайтом міссенс мутації G2210A у *rex6*. Інший фрагмент ClaI довжиною 2,199 т.п.н. містив С-кінцеву частину *PEX6* з сайтами обох мутацій присутніх у *cs rex6* (G2210A, та A2998G) (Рис. 3.4.28А). Трансформація кожним із цих фрагментів методом електропорації мутантів *rex6* і *cs rex6* призводила до повного відновлення росту на метанолі при 28°C та 37°C. Усі виділені трансформанти при цьому були стабільними щодо метилотрофного росту, що підтверджує гомологічну рекомбінацію фрагментів дикого гена у локусі *PEX6*. Трансформанти *cs rex6* було проаналізовано щодо кінетику росту у рідкому середовищі з метанолом (на Рис.3.4.28В представлені дані для двох випадкових клонів). Показано, що штами, трансформовані ClaI-фрагментом, демонструють кінетику росту штаму дикого типу при обох температурах, 28 та 37°C, тобто мають комплементовані обидві міссенс-мутації. Трансформанти AatII-фрагментом виявляли незначну затримку росту при 28°C. Отже, комплементация заміни G737E у *cs rex6* відновлює його здатність до утилізації метанолу при рестриктивній температурі. Отримані результати також вказують, що заміна R1000G самостійно не впливає на метилотрофний ріст і біогенез пероксисом при 37°C і лише в незначній мірі при 28°C.

3.4.3. Обговорення

У цьому розділі ми описуємо ідентифікацію нового пероксину Pdg1/Pex36 у метилотрофів *P. pastoris* і *H. polymorpha*, залученого у регуляцію гомеостазу пероксисом. Цей білок є консервативним серед споріднених до *P. pastoris* дріжджів, зокрема з родів *Komagataella*, *Ogataea* і *Candida* (див. філогенетичне дерево на Рис. 1.11 у Розділі 1.4), але відсутній у видів, що містять пероксин Pex16. Незважаючи на відсутність значної гомології первинної послідовності, Pdg1/Pex36 та Pex16 виявляють певну подібність вторинної структури. Нами виявлено, що експресія Pex16 з *Y. lipolytica*, (а також Pex16 з *H. sapiens*) та Pex34 з *S. cerevisiae* [218] частково комплементувала дефект біогенезу пероксисом у клітинах Δ *pex36* *P. pastoris*. Варто відзначити, що нашими партнерами з групи С.

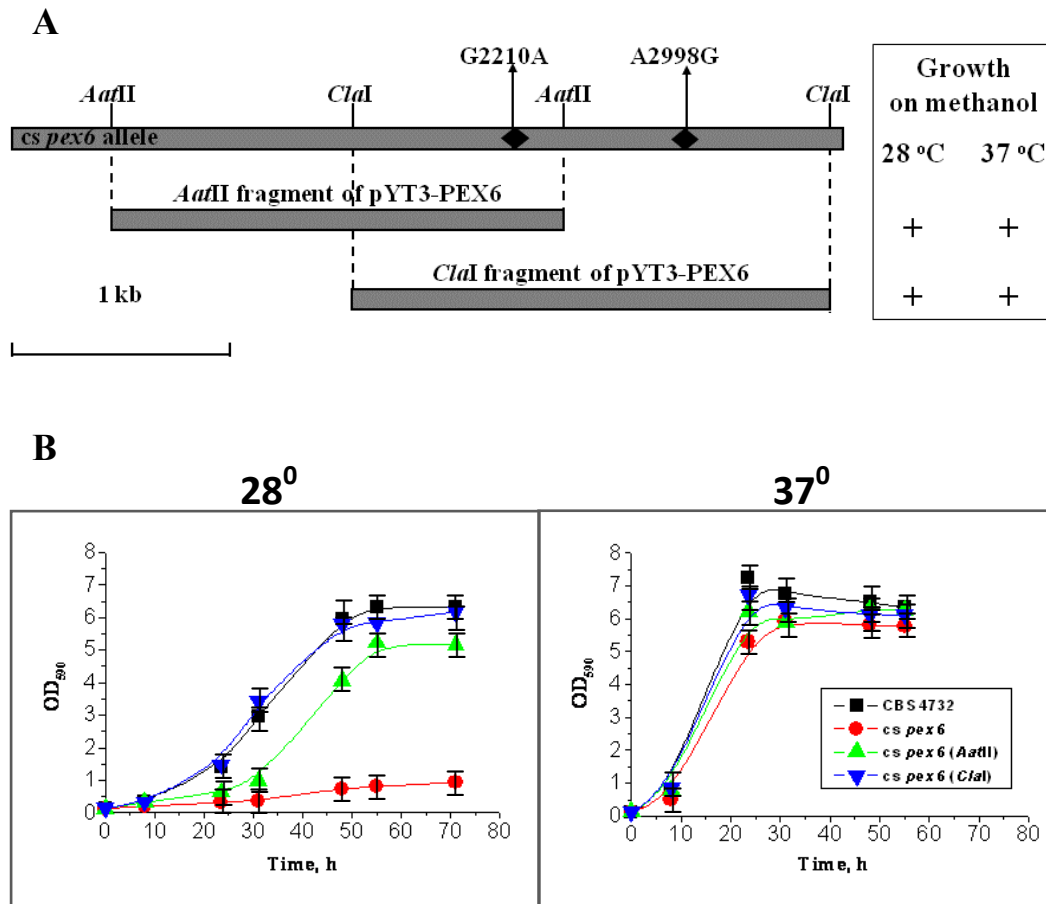


Рис. 3.4.28. Аналіз індивідуальних ефектів ідентифікованих *PEX6* мутацій. **(А)** Схема виділення рестрикційних фрагментів *AatII* і *ClaI* гена *PEX6* *H. polymorpha*, що були використані для комплементції *pex6* і *cs pex6* мутантів. Відкрита рамка зчитування *PEX6* показана сірим кольором. Вказано сайти внутрішньогенних нуклеотидних замін, ідентифіковані у *pex6* і *cs pex6* мутантів. **(В)** Кінетика росту штамів дикого типу, *cs pex6* мутанта і *cs pex6*, трансформованого лінійними *AatII* чи *ClaI* фрагментами дикого алелю *PEX6* гена у середовищі з метанолом при 28°C і 37°C.

Субрамані з університету Сан-Дієго (США) було продемонстровано, що експресія білка *PpPex36* у дефіцитних за *PEX16* геном та біогенезом пероксисом людських фібробластах GM06231, веде до появи нових імпорт-компетентних пероксисом, що вказує на те, що *PpPex36* є функціональним аналогом *PEX16* у багатоклітинних організмів. Також було виявлено, що *Pex25* і *Pex36* мають надлишкові (redundant) функції у *P. pastoris*, так як надекспресія *Pex25* частково нівелювала пероксисомний дефект у *Δpex36*, а подвійна делеція генів *PEX25* та *PEX36* була синтетично летальною для біогенезу пероксисом. Важливо, що

надекспресія жодного із запропонованих функціональних гомологів Pex36 (*ScPex34*, *YlPex16*, і *HsPEX16*) у *P. pastoris* не могла комплементувати подвійний дефіцит *PEX25* і *PEX36*, підтверджуючи таким чином, що Pex36 має додаткову(і) функцію(ї), які, очевидно, не повністю присутні у кожному із потенційних функціональних гомологів. Беручи до уваги також відсутність відповідної гомології послідовностей, ці відмінності дали підстави до нещодавнього перейменування гена, початково описаного як *PDG1* [415], як нового гена пероксину *PEX36* [218].

Як було спостережено на початковій стадії селекції мутантів по пексофагії, клітини *Δpdg1/pex36* характеризуються дефектом росту у середовищі з метанолом, яке вимагає ефективної індукції пероксисом. Так у рідкому середовищі ріст культури мутанта затримується на більш ніж 20 годин, порівняно із клітинами штаму дикого типу. Ми припустили, що оскільки розмір пероксисом і їх кількість є аберантними у клітин *Δpex36*, ці зміни можуть також впливати на пексофагію. Цікавим і водночас парадоксальним було спостереження, що делеція гена *PEX36*, подібно до делеції інших генів пероксинів, таких як *PEX1*, *PEX6*, додатково індукує пексофагію за умов, які стимулюють їх активну проліферацію [218]. Однак, як саме механістично Pex36 впливає на пексофагію залишається незрозумілим, оскільки широкий спектр інших пероксинів, зокрема Pex14 та Pex3 є змінений у клітинах *Δpex36*. Однак не можна виключати, що Pex36 має безпосередній вплив на регуляцію пексофагії, опосередкований його С-кінцевою ділянкою, яку ми запропонували як функціонально важливий (Рис. 3.4.13-15). Додатковим фактором, що ускладнює аналіз цього фенотипу може бути частковий перерозподіл пероксисомної АОХ до цитозолу у *pex36* мутанта, що запобігає її ефективній деградації. Дослідження ролі Pex36 у біогенезі пероксисом та пексофагії на момент підготовки дисертаційної праці продовжуються. Зокрема запропоновано, що функція двох пероксинів Pex25 і Pex36 полягає у забезпеченні ефективної взаємодії між Pex3 та Pex19 – двох пероксинів, критичних для транспорту РМР до мембран пероксисом [218].

Слід також зазначити, що у біохімічних експериментах ми виявили (Рис. 3.4.16), і пізніше підтвердили за допомогою флуоресцентної мікроскопії, що Pdg1/Pex36 і частина Pex3 уникають автофагійної деградації, очевидно шляхом їх перенесення з пероксисомної мембрани до декількох везикул невідомої природи, що присутні по меншій мірі до 8 год адаптації до глюкози. Спочатку ці везикули є колокалізовані з вакуолярними мембранами а пізніше у цитозолі. Наскільки нам відомо, такий перерозподіл РМР при пексофагії раніше не був показаний ні для одного виду дріжджів і може мати сильний фізіологічний зміст. Ми припустили, що при пексофагії деякі РМР можуть вибірково видалятися з «автофагійних» пероксисом і зберігатись для формування препероксисомних везикул, які можуть бути пізніше швидко перетворені до функціональних пероксисом наприклад після нового циклу індукції метанолом. Таким чином, запропонований механізм може служити певним видом короткотермінової клітинної пам'яті. Як альтернатива, ці Pdg1-Pex3-вмісні везикулярні структури можуть бути довго-живучими, успадковуватися при поділі клітин навіть при рості на субстратах-репресорах, таких як глюкоза, і брати участь у ранніх стадіях біогенезу пероксисом. З цього приводу, у наступних дослідженнях може бути цікавим з'ясувати, чи Pdg1-Pex3-вмісні тільця колокалізуються з ER при завершенні пексофагії. У випадку підтвердження, такий механізм може бути прикладом досі невідомого селективного ретроградного транспорту РМР з пероксисом до ER при пексофагії.

У цьому розділі ми також описали ідентифікацію нової міссенс мутації у гені *PEX6 H. polymorpha*, що призводить до пошкодження біогенезу пероксисом і метилотрофного росту та домінантно-негативного фенотипу. Відповідна мутація спричиняє заміну амінокислоти у першому AAA модулі Pex6 (G737E). Ми також продемонстрували, що ця мутація може бути ревертованою до умовного (кондиційного) cs фенотипу шляхом введення вторинної внутрігенної мутації у другому AAA модулі Pex6 (R1000G). Обидва змінені амінокислотних залишки є консервативними у Pex6 дріжджів. Обидва мутовані амінокислотні залишки розташовані на С-кінцях AAA модулів, але поза відомими функціонально-важливими ділянками основних мотивів Walker A, Walker B і С-кінцевими

Sensor 1 і Sensor 2 [447]. Наскільки нам відомо, мутації у відповідних сегментах не були ідентифіковані чи сконструйовані для інших вивчених АТФаз, включаючи людські Pex1 і Pex6. С-кінці у ААА модулях мають структуру спіралей та імовірно беруть участь у специфічних конформаційних змінах функціональних доментів [448]. Цікаво, що в той час як мутація G737E блокує функцію *HpPex6*, заміна R1000G не має значного ефекту, коли присутня окремо. Фенотипи, викликані відповідними мутаціями, узагальнено на Рис. 3.4.33.

З даних щодо просторової структури кристалічних ААА білків відомо, що два модулі ААА є незалежними доменами [449].





Strain	Protein	Peroxisomes	Growth at Mth	t, °C
WT		normal	normal	37, 28
<i>Δpex6</i>	protein absent	remnants	absent	37, 28
<i>pex6</i>		remnants	absent	37, 28
<i>cs pex6</i>		normal enlarged	normal weak	37 28
<i>cs pex6 (AatII)</i>		n.d.	normal	37, 28

Рис. 3.4.29. Схематичне зображення ефектів встановлених мутацій гена *PEX6* *H. polymorpha*.

Ми припускаємо, що комплементарний ефект заміни R1000G на фоні G737E вказує на взаємозв'язок між двома Pex6 ААА модулями інтра- чи інтермолекулярного характеру. Не можна виключити, що ці мутації впливають також на взаємодію Pex6 з Pex1, необхідну для біогенезу пероксисом. Домінантно-негативний характер мутації G737E свідчить про те, що присутність такого мутованого Pex6 в клітинах порушує функціонування пероксисом навіть за присутності додаткової копії білка дикого типу.

Ми неочікувано встановили за допомогою електронної та флуоресцентної мікроскопії, що деєкт метилотрофного росту у *cs pex6* штамі при рестриктивній

температурі не обумовлений видимим дефектом у формуванні пероксисом. Але спостережені морфологічно відновлені пероксисоми виявились функціонально неспроможними при рестриктивній температурі, що допускає комплексну і ще недооцінену роль *Pex6* у біогенезі цих органел.

Оскільки мутантні клітини *cs pex6* демонстрували близьку до норми кінетику інактивації пероксисомної АOX при рестриктивній та пермісивній температурах, ми зробили висновок, що *Pex6*, очевидно, не залучений безпосередньо у регуляцію пексофагії. Цей висновок узгоджується з нормальною деградацією «тіней» пероксисом у мутанта, делетованого по *PEX6* гену [450]. Однак, нещодавні дослідження, що *Pex6* все-таки відіграє неочікувану роль негативного регулятора пексофагії [446], [451].

Слід зазначити, що вивчення точкових мутацій у гені *PEX6* може пролити додаткове світло на його роль у біогенезі пероксисом людини. Мутації у людському гомолозі *PEX6* (*HsPEX6*) є другою основною причиною після *HsPEX1* захворювань, пов'язаних із пошкодженням біогенезу пероксисом (peroxisome biogenesis disorder – PBD, групи CG4 і CG6 відповідно) [444], [452]. Міссенс а також кондиційні (*ts* та *cs*) мутації у *HsPEX6* та *HsPEX1* спричиняють легкі форми PBD, такі як неонатальна адренолейкодистрофія та дитяча хвороба Рефсума [161], [453], [454]. Також варто зазначити, що більшість ідентифікованих точкових мутацій у *HsPEX6* і *HsPEX1* фактично пошкоджують взаємодію їхніх білкових продуктів і, додатково, можуть регулювати пексофагію [446], [455]. Розуміння природи деяких патологій, асоційованих з порушенням біогенезу пероксисом, започаткували розвиток нових фармакологічних підходів для лікування пацієнтів з легкими формами PBD [456]. Таким чином, розпочаті нами дослідження з мутантними формами відповідних пероксисомних АТФаз можуть служити хорошою базою для моделювання і перевірки ефектів мутацій, раніше встановлених у пацієнтів з PBD, та пошуків нових методів терапії.

3.4.4. Підсумки

У цьому розділі ми описали ідентифікований нами новий білок Pdg1/Pex36 у *P. pastoris* і *H. polymorpha*, як новий мембранний білок пероксисом (peroxisomal membrane protein, PMP), який виявляє певну функціональну гомологію до пероксину людини HsPex16 та Pex34 *S. cerevisiae*. Дефекти, спричинені *pex36* мутаціями, можуть бути функціонально комплементовані надекспресією Pex16 *Y. lipolytica* або Pex34 *S. cerevisiae*. У *P. pastoris*, Pex36 не є білком строго необхідним для проліферації пероксисом, але мутації у відповідному гені блокують їх біогенез, якщо поєднані з мутаціями у гені *PEX25*. Клітини мутанта *pex36* характеризуються частковим дефектом росту у середовищі з метанолом внаслідок порушення транспорту до пероксисом PTS1-, PTS2- та mPTS-залежних білків. Спостережена роль Pex36 у пексофагії може бути як прямою, так і опосередкованою, внаслідок багаточисельних пертурбацій у спектрі PMP білків, викликаних дефіцитом Pex36. Ми також припускаємо, що у *P. pastoris* Pex36 є об'єктом раніше невідомого ретроградного транспорту PMP білків до ER.

У другій частині цього розділу описано експерименти, метою яких було з'ясувати, чи функція двох взаємодіючих AAA АТФ-аз, Pex1 and Pex6, є необхідною окрім біогенезу пероксисом також для регуляції їх деградації. Мутації у відповідних генах людини є однією із основних причин спадкових захворювань, пов'язаних з порушенням біогенезу пероксисомом. За допомогою УФ-мутагенезу мутанта *pex6* *H. polymorpha*, був виділений умовний чутливий до холоду ревертант з відновленою здатністю до росту на середовищі з метанолом при 37⁰С, але не при 28⁰С. Секвенування вихідної алелі *pex6* виявило точкову мутацію у першому AAA модулі гена *PEX6*, що веде до заміщення консервативного амінокислотного залишку G737E. Додаткова внутрігенна мутація, ідентифікована у похідному холодочутливому алелі *pex6* веде до заміни у другому AAA домені R1000G. Проте електронно-мікроскопічний аналіз виявив відновлення пероксисом у метанол-індукованих клітинах *cs pex6* при як при пермісивній, так і рестриктивній температурах. Якщо відокремлена від вихідної G737E, вторинна мутація R1000G не впливає на метилотрофний ріст. Обидві мутації імовірно

впливають на внутрішньо- чи міжмолекулярні взаємодії двох ААА доменів АТФаз. Нами не встановлено безпосереднього впливу аналізованих мутацій на процес пексофагії.

Результати цього розділу 3.4. опубліковані у 6 статтях і 1 огляді [218], [319], [340], [415], [438], [440], [457].

3.5. Біотехнологічне застосування мутантних штамів дріжджів з порушенням глюкозної регуляції і гомеостазу пероксисом

3.5.1. Розробка системи мультикопійної інтеграції векторів у геном *H. polymorpha* на основі власних та гетерологічних генетичних маркерів

Термотолерантні метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha* є зручною платформою для ефективної продукції багатьох гетерологічних білків (див. Розділ 1.4.3). Однією з переваг системи експресії *H. polymorpha* є використання сильного і регульованого джерелами карбону промотора гена алкогольоксидази (P_{AOX}), який забезпечує високий рівень транскрипції у вирощених на метанолі клітинах, але повністю пригнічується на таких джерелах Карбону як глюкоза, дисахариди або етанол.

Однак, незважаючи на потужність P_{AOX} , продукція багатьох гетерологічних білків лімітується на рівні транскрипції, часто через наявність обмеженої кількості копій касет експресії у геномі продуцента. Існуючі системи селекції мультикопійних інтегрантів зазвичай базуються на використанні генів, які забезпечують стійкість до антибіотиків, що супроводжується рядом недоліків, наприклад таких, як висока вартість цих селективних агентів для лабораторного використання і ризик неконтрольованого перенесення відповідних генів у навколишнє середовище.

У цьому розділі ми описуємо успішне використання як нових альтернативних маркерів для селекції мультикопійних трансформантів таких

дріжджових генів як *FLD1* *H. polymorpha*, що кодує метилотрофний фермент формальдегіддегідрогеназу, та гену *ADE1* *P. pastoris*.

3.5.1.1. Клонування та використання біосинтетичного гена *ADE1* *P. pastoris* як селективного маркера для мультикопійної інтеграції у *H. polymorpha*

Для відбору мультикопійних інтегрантів на основі відновлення прототрофності за аденіном був сконструйований вектор, що містив ген *ADE1* дріжджів *P. pastoris* під власним промотором різної довжини в 55, 145 і 500 п.н. (форми вектора pADE-S, M, та L відповідно; Рис. 3.5.1). Гетерологічний маркер з мезофільних метилотрофних дріжджів, а не власний ген, був обраний для розробки нової платформи мультикопійної інтеграції з кількох причин. По-перше, гетерологічний ген дає змогу уникнути гомологічної рекомбінації по нативному локусу *ADE1* *H. polymorpha*; по-друге, існує ряд прикладів необхідності декількох копій гетерологічного гена для забезпечення повного відновлення прототрофності у господаря (наприклад, ген *LEU2* *S. cerevisiae* для *H. polymorpha*). Як додатковий засіб для оцінки кількості інтегрованих в геном копій вектора, вони додатково несли ген резистентності до антибіотика генетицину (G418) під слабким конститутивним промотором (P_{GAP}) [324].

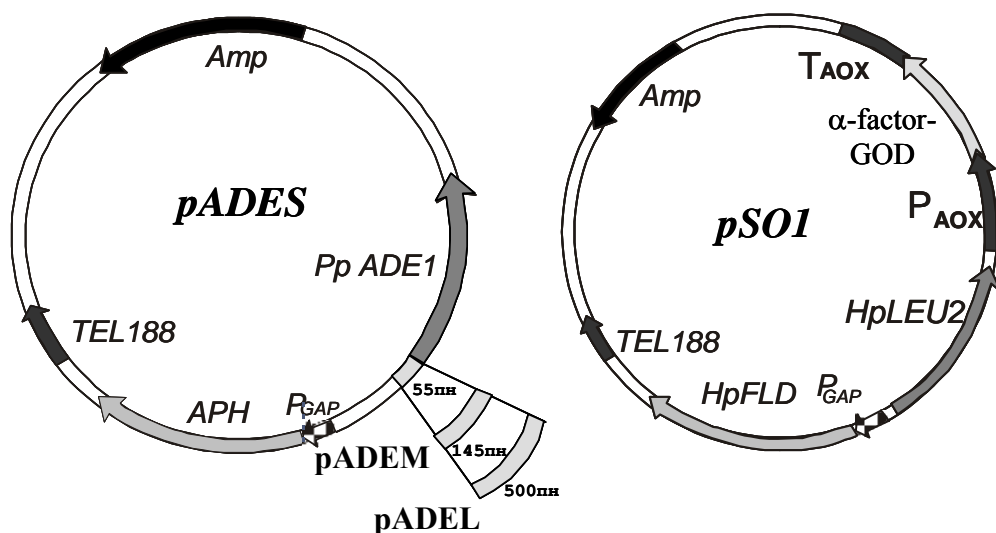


Рис. 3.5.1. Схеми векторів pADES (M, L) і pSO1. Скорочення: TEL188 – ARS-елементдріжджів *H. polymorpha*, який забезпечує мультикопійну інтеграцію в області теломерних ділянок хромосом, *APH* – ген резистентності до антибіотика генетицину (G418), експресований під слабким (вкороченим) промотором P_{GAP} , *HpFLD* – ген формальдегіддегідрогенази *H. polymorpha*, *HpLEU2* – ген бета-

ізопропілмалатдегідрогенази *H. polymorpha*, *GOD* – рекомбінантний ген секреторної глюкозооксидази з *Aspergillus niger*.

Ці три сконструйовані вектори, які відрізнялися за розміром промотора, що регулює експресію *ADE1*, трансформували в ауксотрофний за аденіном штам *H. polymorpha* (CBS4732 *ade1*) шляхом електропорації. Отримані трансформанти відбирали за ознакою відновлення прототрофності та аналізували на резистентність до G418.

Показано, що *PpADE1* під найкоротшим промотором 55 п.н. (вектор *pADES*) був найбільш ефективним у забезпеченні мультикопійної інтеграції. Прототрофні за аденіном трансформанти *pADES* виявлялися із частотою в три рази меншою відносно векторів *pADEM* і *pADEL*, що дозволило припустити, що більша кількість копій *pADES* необхідна для забезпечення функціональної комплементации реципієнта *ade1* (Табл. 3.5.1)

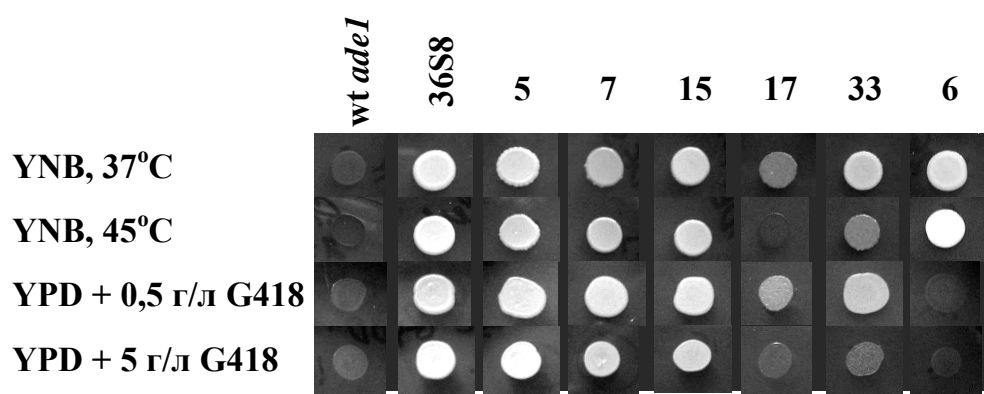
При трансформації вектора *pADES* було отримано два умовних фенотипічні класи трансформантів: і) штами з відновленою прототрофністю при 37⁰С (оптимум для *H. polymorpha*), а також при підвищеній температурі 45⁰С, які водночас проявляли стійкість до високих концентрацій G418 (до 5 г/л) (Рис. 3.5.2А, трансформанти №5, 7, 15); та ii) штами з відновленою прототрофністю при 37⁰С, але з проміжним фенотипом при 45⁰С – ці штами були резистентні тільки до низьких концентрацій G418 (Рис. 3.5.2, трансформанти №17, 33). Також спостерігалася невелика кількість (1%) ревертантів за ауксотрофністю до аденіну – ці штами добре росли на мінімальному середовищі і при більш високій температурі, але не витримували навіть мінімальних концентрацій G418 (Рис. 3.5.2, штам № 6). Як позитивний контроль в цих експериментах ми використовували раніше отриманий прототрофний штам, стійкий до високих концентрацій G418 (Рис. 3.5.2, 36S8). Далі було встановлено, що здатність рости при високих концентраціях G418 і при 45⁰С в трансформантах *pADES* позитивно корелює з кількістю копій вектора, інтегрованих в геном. Аналіз методом гібридизації Саузерн-блоттінгом показав, що штами, стійкі до 5 г/л G418, містили щонайменше 10 копій інтегрованої плазмиди *pADES* (Рис. 3.5.2В).

Характеристика векторів *H. polymorpha*, які містять ген *PpADE1* як селективний маркер

Вектори	Довжина промотора, п.н.	Кількість трансформантів на 1 мкг ДНК	Відсоток забарвлених в червоний колір колоній	Відсоток генетицин-резистентних колоній*
pADEL	500	$0,9-1,1 \times 10^4$	5	2
pADEM	145	$6-8 \times 10^3$	9	4
pADES	54	$1,8-2,3 \times 10^1$	60	37

* збагачене YPD середовище з 5 г/л G418

A



B

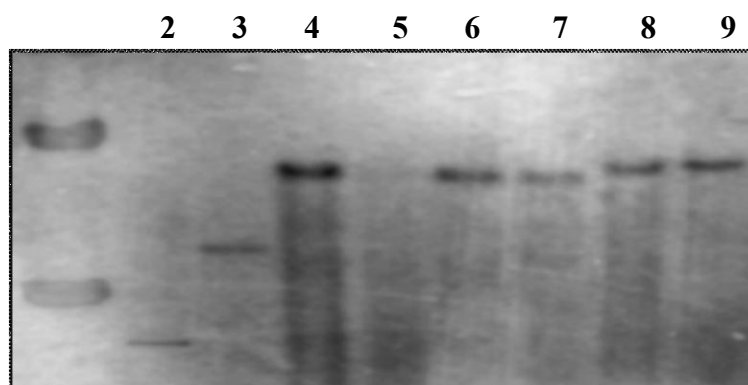


Рис. 3.5.2. Аналіз pADES трансформантів *ade1* мутанта *H. polymorpha*. **(A)** Аналіз росту трансформантів вектором pADES, відібраних за відновленням прототрофності по аденіну на агаризованому мінімальному YND середовищі при підвищеній температурі (45°C) і в присутності антибіотика G418. **(B)** Саузерн-блот аналіз кількості копій інтегрованої касети: 1 – вектор pADES; 2 – геномна ДНК *P. pastoris*; 3 – геномна ДНК *H. polymorpha*; 4-9 – геномна ДНК трансформантів pADES *H. polymorpha* (№ 5, 17, 7, 15, 33, 41).

Біохімічний аналіз трансформантів, однак, не дав переконливих доказів того, що продукт гена *PpADE1* виявляє температурну чутливість при експресії у *H. polymorpha*. Більш імовірно, що підвищена температура викликає підвищену потребу у внутрішньоклітинному аденіні для різних анаболічних процесів, включаючи синтез ДНК.

3.5.1.2. Клонування та використання гена *FLD1* формальдегіддегідрогенази *H. polymorpha* як селективного маркера для мультикопійної трансформації

Як альтернативний підхід, ми вперше запропонували використання катаболітного гену формальдегіддегідрогенази (FLD) як маркера стійкості до підвищених концентрацій екзогенного формальдегіду. Було встановлено, що рівень експресії *HpFLD1* позитивно корелює з кількістю копій касети експресії. Для цього були сконструйовані вектори *pHpFLD* і *pHpFLD2*, похідні *pYT1* і *pKO7* [290], що містили, відповідно, одну або дві тандемно розміщені копії касети експресії *HpFLD1* з нативними промоторними та термінаторними послідовностями, як описано в [458]. Було з'ясовано, що трансформанти вектором з двома копіями гена *FLD1* демонстрували пропорційно вищу ензиматичну активність формальдегіддегідрогенази і були стійкими до екзогенного формальдегіду в межах концентрацій до 15 мМ.

Оскільки промотор *HpFLD1* є хоч і регульованим глюкозою але досить потужним, ми припустили, що його заміна на послаблений конститутивний буде забезпечуватиме кращу ефективність селекції, зокрема дозволить селекцію мультикопійних інтегрантів при нижчих концентраціях екзогенного формальдегіду. З цією метою нами був сконструйований вектор *pSO1*, що містив ген *FLD1 H. polymorpha*, клонований під контролем послабленого (вкороченого) конститутивного промотора P_{GAP} [324], а також ген секреторної глюкозооксидази (GOD) гриба *Aspergillus niger* під промотором P_{AOX} , як рекомбінантну репортерну активність (Рис. 3.5.1). Було виявлено, що випадково обрані трансформанти вектором *pSO1* здатні рости на мінімальному середовищі з глюкозою та

екзогенним формальдегідом до 6 мМ, тоді як реципієнтний штам не був здатен до росту або значно уповільнював свій ріст вже за 2-3 мМ екзогенного формальдегіду (Рис. 3.5.3).

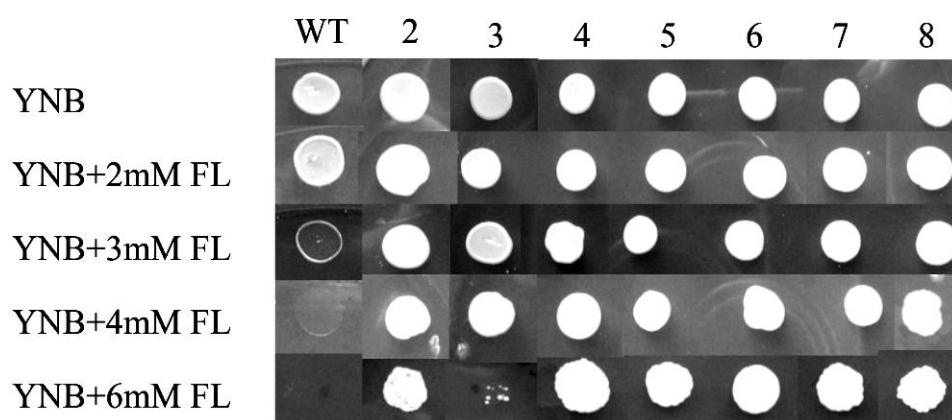


Рис. 3.5.3. Аналіз трансформантів pSO1 на стійкість до екзогенного формальдегіду (FL) на чашках з мінеральним середовищем YND та різними концентраціями екзогенного FL.

Далі у відібраних pSO1 трансформантів аналізували ензиматичні активності FLD та GOD у безклітинних екстрактах і культуральній рідині клітин, вирощених у середовищі з гліцерином. Більшість трансформантів виявляли 2-3-кратне збільшення активності FLD відносно вихідного штаму, яке корелювало із рівнем внутрішньоклітинної та секреторної GOD. Також методом Саузерн-блоттингу показано, що для забезпечення резистентності до 5мМ екзогенного формальдегіду необхідно принаймні 5 інтегрованих копій гена *HpFLD1*, експресованого під послабленим промотором GAP (див. далі в наступному підрозділі).

3.5.2. Використання нових методів мультикопійної інтеграції для конструювання поліпшених продуцентів амінооксидази (АМО) у *H. polymorpha*

Дріжджові амінооксидази (АМО) були запропоновані для використання в біоаналітичних пристроях з метою моніторингу алкіламінів, наприклад потенційно канцерогенного диметиламіну (ДМА) в біологічних рідинах. Пероксисомна АМО *H. polymorpha* була ідентифікована у групі проф. М. Гончара (ІБК НАН України) як ензим, що відповідає біоаналітичним вимогам з

урахуванням селективності та специфічності до субстрату, термостабільності та здатності до гадекспресії у дріжджових клітинах. Ми використали новостворені схеми мультикопійної інтеграції для конструювання стабільних штамів-надпродуцентів АМО у *H. polymorpha*.

Попередньо описаний продуцент АМО в *H. polymorpha* був виділений за допомогою інтеграції двох копій лінеаризованої плазмиди рНІР4А-АМО, що містила власний ген АМО під контролем P_{AOX} . Відповідний продуцент демонстрував приблизно вдвічі вищий рівент активності АМО у порівнянні з ізогенним штамом дикого типу [459]/ Ми вирішили поліпшити цей продуцент АМО шляхом введення додаткових копій касети експресії P_{AOX} -АМО з використанням доступних мутацій *leu1.1* і *ura3*. Для досягнення мети у реплікативну плазмиду рҮТЗ, що містить один комплементуючий ген *ScLEU2* [460], був сконований ген *HpURA3* з плазмиди рBSK-URA [336], як описано у розділі «Матеріали і Методи». Отримана у результаті плазмиди рҮТЗ-URA3-АМО (Рис. 3.5.4) була використана у подальших дослідженнях. Також було сконструйовано вектор, що містить касету P_{AOX} -АМО та ген *PpADE1* з вищеописаного вектора рADES (Рис. 3.5.1), як описано у Матеріалах та Методах. Далі було досліджено, як додаткова трансформація з рҮТЗ-URA3-АМО або рADES-АМО вплине на синтез АМО у штаму дикого типу. Було встановлено, що при культивуванні в середовищі з метанолом і сульфатом амонію трансформанти продукували в середньому $200 \text{ нмоль/хв}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ білка, що в 20 разів перевищує продуктивність штаму дикого типу при індукції метиламіном, при чому трансформанти рADES-АМО переважали за продуктивністю трансформантів рҮТЗ-URA3-АМО приблизно у 2 рази. Більш ефективний синтез білка АМО в трансформантів рADES-АМО також був підтверджений методом Вестерн-блот аналізу (Рис. 3.5.5). Саузерн дот-блот аналіз додатково показав, що кращі продуценти містили у геномі більше 10 копій касети експресії з рADES-АМО.

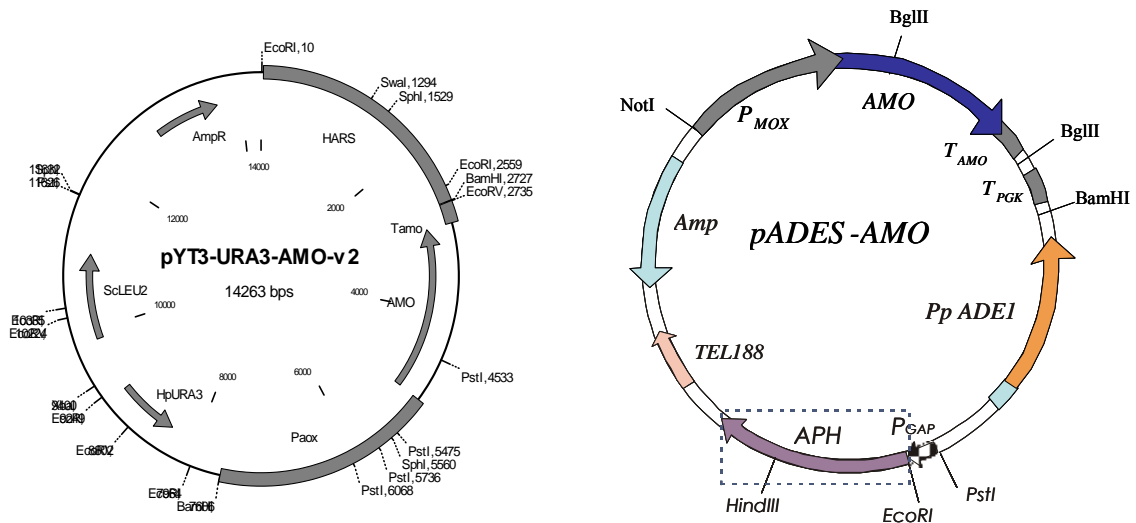


Рис. 3.5.4. Схематичне зображення сконструйованих векторів експресії рYT3-URA3-AMO і рADES-AMO. *Tel188* – ARS-елемент дріжджів *H. polymorpha*, що забезпечує мультикопійну плазмідну інтеграцію в теломерну ділянку хромосом; *APH* – ген резистентності до генетицину (G418), експресований під модифікованим промотором GAP.

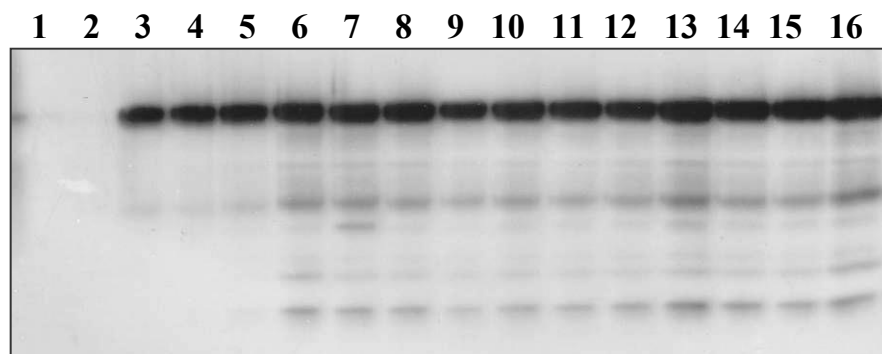


Рис. 3.5.5. Вестерн-блот детекція білка АМО в безклітинних екстрактах трансформантів рADES-AMO. Вказані штами *H. polymorpha* вирощували протягом 24 годин у мінеральному середовищі YNB з метанолом і сульфатом амонію: 1 – CBS4732 *ade1*; 2 – NCYC495 *ade11.1 leu1.1 ura3* – штам-реципієнт; 3 – NCYC495 *ade11.1 leu1.1 ura3*/рYT3-URA3-AMO; 4 – NCYC495 *leu1.1 ura3*::[P_{AOX}-AMO]₂/рYT3-URA3; 5 – NCYC495 *leu1.1 ura3*::[P_{AOX}-AMO]₂/рYT3-URA3-AMO; 6-16 – CBS4732 (*ade1*)/рADES-AMO, прототрофні трансформанти, стійкі до підвищених концентрацій генетицину.

Таким чином, ці попередні дослідження підтвердили, що розроблені нами селективні маркери *HpFLD* та *PpADE1* можуть бути використані для ефективної селекції мультикопійних трансформантів – надпродуцентів гетерологічних білків.

3.5.3. Виділення надпродуцентів гетерологічних ферментів на основі мутантів *H. polymorpha*, дефектних за глюкозною регуляцією, та розробка нових методів мультикопійної інтеграції векторів

Як згадується у розділі Вступ, серед досліджених мікробних штамів-господарів для продукції рекомбінантних білків метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* і *P. pastoris* мають сприятливе поєднання ряду специфічних характеристик [3]. Однак слід відзначити, що в великомасштабних ферментаційних процесах синтез білків під контролем промотора гена АОХ вимагає суворого контролю рівня легкозаймистого метанолу та інтенсивної аерації через високу потребу в кисні для алкогольоксидазної (АОХ) реакції і, як наслідок, додаткових витрат на охолодження.

На відміну від свого аналога у *P. pastoris*, P_{AOX} *H. polymorpha* не строго потребує метанолу для максимальної індукції, і значної дерепресії P_{AOX} можна досягнути обмеженим постачанням гліцерину, ксилози чи навіть глюкози [461]. У цьому підрозділі ми описуємо використання мутантів з пошкодженою глюкозною репресією P_{AOX} , як альтернативи до традиційної платформи експресії *H. polymorpha*. У кількох роботах ми охарактеризували ген глюкозної катаболітної репресії *H. polymorpha GCR1*, що кодує потенційний глюкозний трансцептор [29], [30], [150]. *gcr1*-Мутації викликають конститутивну (метанол-незалежну) експресію пероксисомної АОХ у середовищі з глюкозою, при цьому вона залишається повністю репресованою етанолом або сахарозою. Ми також виділили *gcr1*-похідні мутанти ЕАО (*Elevated Alcohol Oxidase*) з підвищеною у 3–5 разів конститутивною активністю АОХ (до 7 Од./мг білка) в клітинах, культивованих у середовищі з глюкозою, яка також є в декілька разів вищою відносно активності АОХ у штаму дикого типу у середовищі з метанолом [462].

Виходячи з наведених характеристик, ми запропонували, що штами ЕАО можуть служити альтернативними штамми-господарями для експресії чужорідних генів під контролем P_{AOX} в *H. polymorpha* на субстратах-цукрах, що не вимагає використання метанолу. Для перевірки потенціалу штамів ЕАО як платформи експресії, ми обрали три модельних білки з різною клітинною локалізацією: секреторну глюкозооксидазу (GOD) *A. niger*, секреторний людський міні-інсулін (MPI – mini pro-insulin), і внутрішньоклітинний мембрано-асоційований поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg – hepatitis B small surface antigen) [261], [304], [463]. Однією з причин такого вибору було також те, що всі ці білки були раніше з різним успіхом експресовані в *H. polymorpha* [261], [304], [463]. Іншою причиною було те, що для експресії цих білків можна використовувати різні режими ферментації [286]. Фактично, індустриальне виробництво HBsAg є одним із небагатьох процесів, які передбачають подачу метанолу для живлення продуцента *H. polymorpha*, оскільки вважалось, що продуктивність синтезу HBsAg забезпечується інтенсивною проліферацією клітинних мембран, у тому числі пероксисомних [461], [464]. Слід зазначити, що у мутантних штаммах з пошкодженою глюкозною репресією пероксисоми конститутивно надсинтезуються у глюкозному середовищі без метанолу [29], [462].

На прикладі трьох модельних рекомбінантних білків ми продемонстрували, що їх експресія в ЕАО мутантах може ефективно регулюватися джерелами Карбону: індукуватися метанолом, глюкозою або ксилозою і репресуватись дисахаридами або етанолом. Таким чином, запропонована нами платформа експресії зберігає регульований характер P_{AOX} , використовує дешеві і нетоксичні джерела Карбону для нарощування біомаси продуцента та індукції гетерологічного білка, і не потребує метанолу для індукції.

3.5.3.1. Характеризація мутантів *H. polymorpha* як штамів-господарів для продукції рекомбінантних білків

Мутантний штам *H. polymorpha* ЕАО2, використаний нами як господар для експресії рекомбінантних білків, був виділений як *leu1-1* ауксотрофний похідний

раніше отриманого штаму ЕАО *leu10* [465], [466], як описано в [462]. Виявлено, що мутант ЕАО2 містить щонайменше одну вторинну мутацію, що підвищує конститутивний синтез АОХ у середовищі з глюкозою приблизно у три рази відносно батьківського штаму *gcr1-2* [29]. Також встановлено, що дефект репресії глюкозою в ЕАО2 практично повністю комплементується при трансформації плазмідом рOS22, яка містить ген *GCR1* дикого типу [29]. При цьому секвенування послідовності мутантного алеля *GCR1*, виділеного з геному ЕАО2, виявило тільки оригінальну одонуклеотидну заміну, ідентичну до мутанта *gcr1-2* C254T, [29]. Таким чином, вторинна мутація в ЕАО2 не знаходиться в *GCR1* ORF. Відповідна мутація також не торкається P_{AOX} , оскільки експресія гетерологічних генів під контролем P_{AOX} дикого типу в ЕАО2 у середовищі з глюкозою є підвищеною відносно вихідного мутанта *gcr1-2*. Таким чином, вторинна мутація в ЕАО2 впливає на глюкозну репресію специфічно у поєднанні з мутацією *gcr1-2*. Вторинна мутація виявилась стабільною, з частотою реверсії до вихідного *gcr1-2* фенотипу нижче 1×10^{-6} .

Встановлено, що, подібно до мутантного штаму *gcr1-2* [29], мутант ЕАО2 виявляв дефект репресії АОХ тільки у відповідь на глюкозу, але не сахарозу або етанол (Рис. 3.5.6).

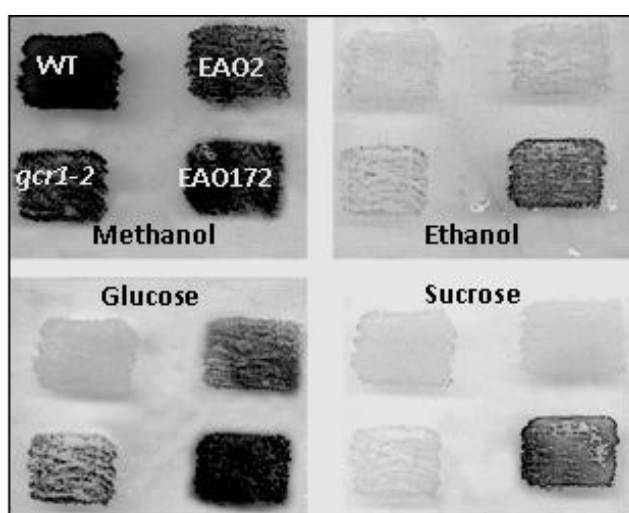


Рис. 3.5.6. Візуалізація активності АОХ в клітинах мутантів ЕАО, вирощених на різних джерелах Карбону. Клітини вирощували на середовищі YPS, реплікували на мінеральне середовище YNB із зазначаними джерелами Карбону (усі 1%), інкубували протягом 24 годин і візуалізували активність АОХ, як описано в Розділі 3.3.

В іншого мутанта, використаного у цьому дослідженні, ЕАО172, який був отриманий шляхом УФ-мутагенезу ЕАО2, як надпродуцент *GOD A. niger* [462], індукована етанолом і сахарозою репресія АОХ була частково порушена (Рис. 3.5.6). Додаткова мутація в ЕАО172 підвищувала активність АОХ в середовищі з глюкозою приблизно у два рази відносно ЕАО2, і це зростання, а також дефекти репресії етанолом чи сахарозою не могли бути відновлені геном дикого типу *GCR1*.

3.5.3.2. Секреторна експресія глюкозооксидази *A. niger* у дефектного за глюкозною репресією мутанта *H. polymorpha*

Для експресії секретованої форми *A. niger* GOD як моделі рекомбінантного ферменту під контролем P_{AOX} була сконструйована плазмідна рОН1 (Рис. 3.5.7), як описано у розділі «Матеріали і Методи». рОН1 трансформували в ЕАО2 і ізогенний штаб дикого типу та відбирали стабільні прототрофні трансформанти шляхом багаторазових перенесень з середовища YPS на селективне мінеральне середовище YNS. Кілька сотень трансформантів аналізували на активність GO безпосередньо в колоніях, вирощених на чашках з метанолом, і кожен проявляв подібний рівень секретованої GO.

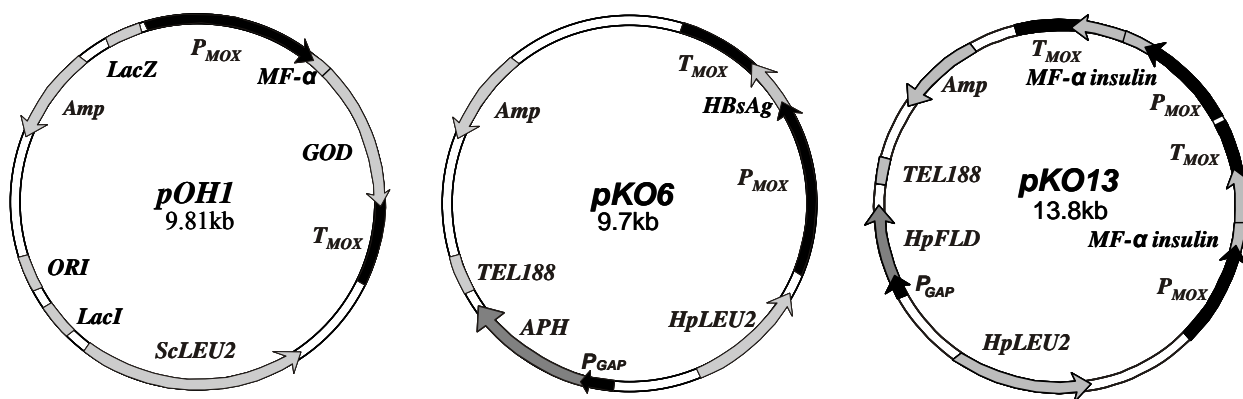


Рис. 3.5.7. Схематичне зображення векторів для експресії рекомбінантних білків у *H. polymorpha*. Вектори створювали для регульованої джерелами Карбону експресії під контролем P_{AOX} секреторної GOD (рОН1), внутрішньоклітинного HBsAg (рKO6), і секреторного міні-проінсуліну (MPI) (рKO13).

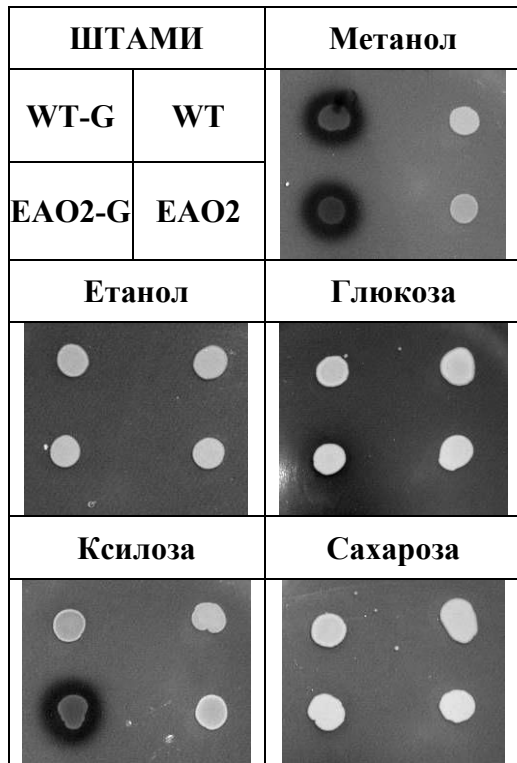
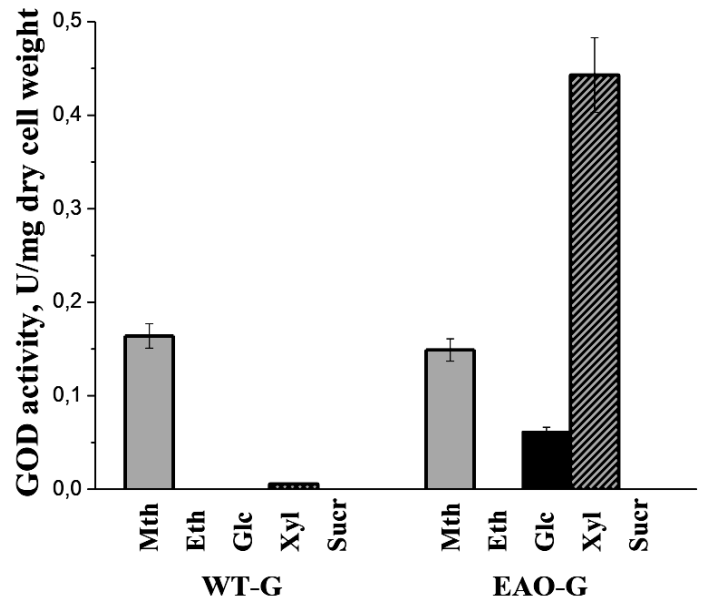
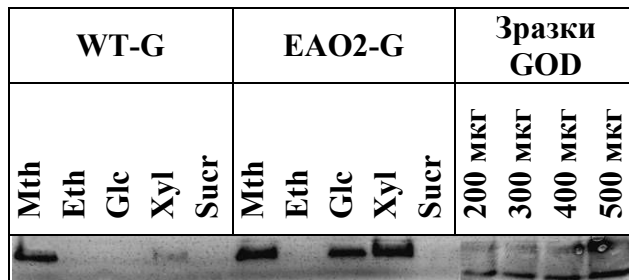
A**С****В**

Рис. 3.5.8. Регуляція синтезу GOD джерелами карбону у мутантів *H. polymorpha*. **(А)** Аналіз активності GOD у колоніях, вирощених на різних субстратах. WT, ЕАО2 – реципієнтні штами; WT-G, ЕАО2-G- продуценти GO. **(В)** Візуалізація ферментативної активності GOD у поліакриламідному гелі після інкубації WT-G і ЕАО2-G протягом 20 год з різними джерелами Карбону. В лунки внесено рівні об'єми супернатанту культур. **(С)** Питома активність GOD у культуральному середовищі (виражена як Од/мг сухої маси клітин) після інкубації клітин WT-G і ЕАО2-G в середовищі YNB з різними джерелами Карбону протягом 20 год. Концентрації метанолу (Mth) і етанолу (Eth) становили 1% (v/v); концентрації глюкози (Glc), ксилози (Xyl) і сахарози (Sucr) становили 2% (w/v).

Один репрезентативний GO-продукуючий клон з кожного штаму був обраний для подальшого аналізу і був позначений як WT-G і EAO2-G, відповідно. Як і очікувалося, WT-G продукував GOD лише на чашках з метанолом, тоді як EAO2-G продукував GOD також на середовищі з глюкозою, що відповідає дефекту глюкозної репресії PAOX у цьому штаму. GOD синтез в обох штаммах репресувався у присутності сахарози або етанолу (Рис. 3.5.8А). Крім того, синтез GOD був помітно виражений у штаму EAO2-G, культивованому на середовищі з ксилозою, – пентозі, що є слабким корепресором у штаму *H. polymorpha* дикого типу (452).

Ці спостереження були підтверджені візуалізацією протеїну GOD методом PAGE і визначенням її питомої активності у культуральному середовищі (Рис. 3.5.8В,С). Згідно з попередніми повідомленнями [304], GOD виявлялась на поліакриламідних гелях як індивідуальна смуга розміром приблизно 86 кДа (Рис. 3.5.8В) [285]. При цьому внутрішньоклітинний рівень GOD у вирощених на глюкозі клітинах штаму EAO2-G становив приблизно 10% від загальносинтезованої GOD, таке ж співвідношення спостерігалось у вирощених на метанолі клітинах дикого типу [304]. Також встановлено, що рівень синтезу GOD у EAO2-G був вищим у середовищі з ксилозою, відносно глюкозного (Рис. 3.5.8 В). Цього слід було очікувати, оскільки GOD перетворює позаклітинну глюкозу в глюконову кислоту, яка не утилізується *H. polymorpha*, і токсичний пероксид гідрогену, що, очевидно, призводить до виснаження субстрату, підкислення середовища і може викликати часткову інактивацію GOD [462]. На відміну від цього, ксилоза не є субстратом для GOD [467]. Підсумовуючи, отримані результати показали, що синтез GOD в EAO2-G є ефективним при відсутності метанолу і строго регулюється джерелами карбону.

3.5.3.3. Експресія поверхневого антигена вірусу гепатиту В (HbsAg) у мутантного штаму EAO2

Для експресії HBsAg у штаму EAO2 *H. polymorpha* під контролем P_{AOX} була сконструйована плазміда рКО6 (Рис. 3.5.8), як описано у «Матеріалах і Методах». рКО6 трансформували у EAO2 і відбирали прототрофні трансформанти. З метою

стабілізації (інтеграції у геном) вектора були проведені три раунди перенесень з неселективного багатого середовища YPS на селективне мінімальне середовище YNS з сахарозою. Далі клітини висівали на чашки YPS, що містили 1 г/л G418. Як було описано раніше, рівень експресії HBsAg у *H. polymorpha* є загалом пропорційний кількості копій інтегрованих касет експресії [463]. Тому серед трансформантів відбирали резистентні до максимальних концентрацій G418 для ідентифікації ймовірних мультикопійних інтегрантів. Декілька репрезентативних клонів, позначених як EAO2-H, були більш детально проаналізовані.

Встановлено, що ці штами відрізняються за максимальним рівнем експресії HBsAg, що позитивно корелював з кількістю копій касети експресії та їх резистентністю до G418 (Таблиця 3.5.1., Рис. 3.5.9). Кількість інтегрованих копій рКО6 в трансформантах аналізували за допомогою кількісного Саузерн-блотингу (Рис. 3.5.9 В).

Виявилось, що найкращий штам-продуцент EAO2-H25 несе 4-5 копій тандемно інтегрованого вектора. Дослідження впливу складу середовища та джерел карбону на експресію HBsAg показало, що сахароза та етанол повністю репресують його синтез в EAO2-H25. Метанол або глюкоза забезпечували подібні рівні синтезу антигену, тоді як ксилоза виявилась найкращим субстратом для синтезу HBsAg (Таблиця 3.5.1, Рис. 3.5.10 А).

Регуляцію експресії HBsAg джерелами карбону в EAO2-H25 додатково вивчали у рідкій культурі в колбах (shake-flask). При цьому було оптимізовано процедуру екстракції HBsAg. Оскільки ліпофільні псевдовірусні частинки HBsAg мають тенденцію зв'язуватися з клітинними мембранами [461], їх виділення залежить від складу використовуваного буфера. Було проаналізовано різні композиції таких буферів, включно з раніше опублікованими [463], [468], і виявлено, що 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,5) з 5 мМ ЕДТА, 0,5 М NaCl, 0,5 % Triton X 100 і 1 мМ PMSF, є найбільш ефективним.

Дані кількісного імуноферментного аналізу (ELISA), специфічного для псевдовірусних частинок HBsAg, засвідчили, що псевдовірусні гомополімерні частинки формувались на усіх досліджених нерепресуючих джерелах карбону [261], [461].

Взаємозв'язок між кількістю копій інтегрованих касет експресії, відносною швидкістю росту/тривалістю лаг-фази та виходом HBsAg у продуцентів ЕАО2

Штами	Число інтегрованих касет експресії	Приріст біомаси, OD ₆₀₀ /год та тривалість лаг-фази, год			Продукція HBsAg, %*
		Метанол	Глюкоза	Ксилоза	
ЕАО2	0	0,044/30	0,348/10	0,076/70	0
Н31	1	0,043/30	0,282/10	0,075/70	0,17
Н30	2	0,031/65	0,278/15	0,058/100	0,31
Н25	5	0,030/65	0,276/30	0,030/120	0,75

*Виражено у відсотках від кількості загального білка в клітинах, вирощених в мінеральному (YNB) середовищі з 1% ксилози, 0,25% метиламіну і 0,1% дріжджового екстракту в колбі за умов струшування на шейкері.

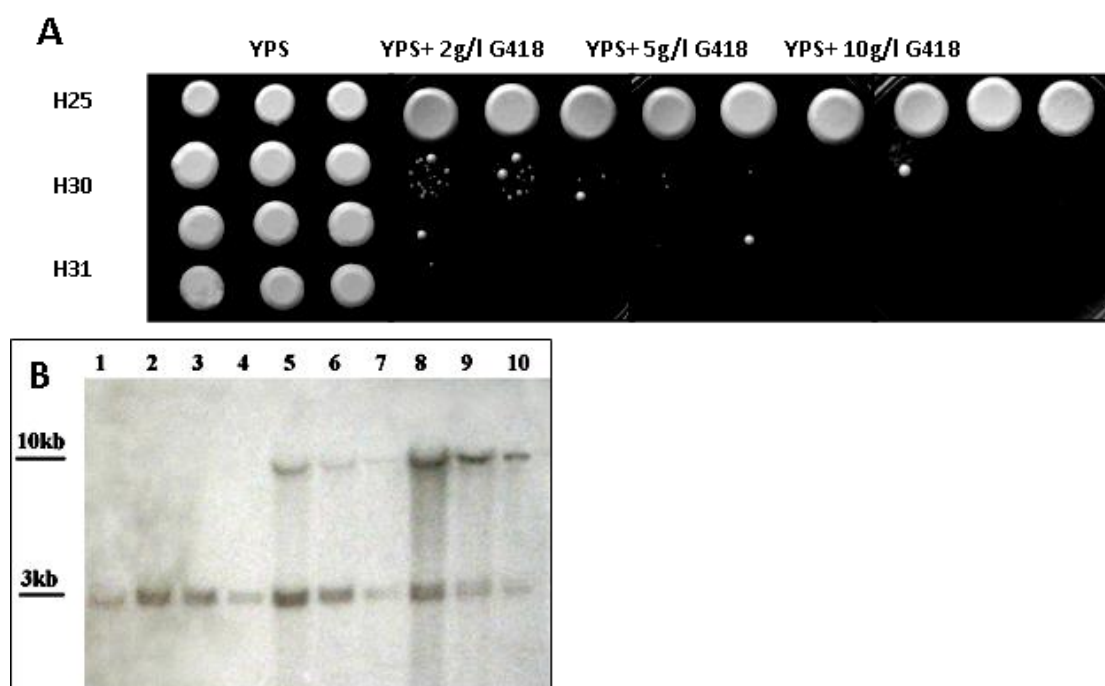


Рис. 3.5.9. Аналіз продуцентів HBsAg. **(А)** Стійкість до різних концентрацій G418 в трансформантів ЕАО2-Н, вирощених на чашках з YPS з серійними розведеннями (зліва направо: нанесено 3 мкл клітин з OD₆₀₀ 1, 0,5 і 0,1 відповідно). **(В)** Саузерн-блот-аналіз кількості копій касети HBsAg з рКО6. Доріжка 1: ЕАО2 *leu1-1*, нанесено 12 мкг ДНК; 2-4: ЕАО2-Н31; 5-7: ЕАО2-Н30; 8-10: ЕАО2-Н25, – для продуцентів нанесено відповідно 12, 6, і 2 мкг ДНК.

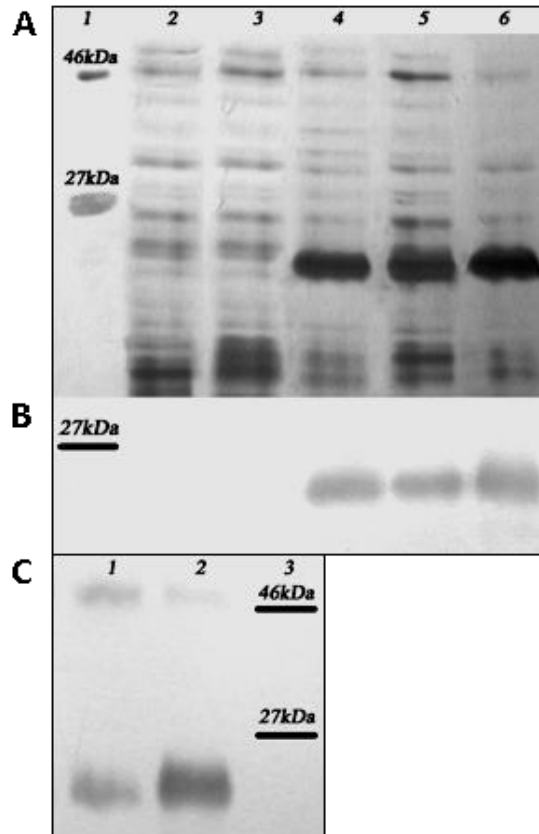


Рис. 3.5.10. Аналіз експресії HBsAg у штаму EAO2-H25, інкубованому з різними джерелами карбону. **(А)** SDS-PAGE безклітинних екстрактів, отриманих з EAO2-H25 (забарвлення сріблом). Доріжки: 1 – маркери молекулярної маси білків; 2 – екстракт реципієнтного штаму EAO2, інкубованого з метанолом; 3-6 – екстракти EAO2-H25, вирощених на сахарозі (3), метанолі (4), глюкозі (5) і ксилозі (6). Нанесено 40 мкг клітинного лізату. **(В)** Вестерн-блот-аналіз білка HBsAg (з поліклональними анти-HBsAg антитілами) в EAO2-H25, інкубованому з різними джерелами карбону (доріжки відповідають А). **(С)** Вестерн-блот-гібридизація HBsAg в безклітинних екстрактах штаму EAO2-H25, інкубованих у лабораторному біореакторі за присутності ксилози в середовищі. Доріжки: 1, 2 – екстракти після 100 і 140 годин інкубації відповідно (нанесено 12 мкг загального білка); 3 – маркери молекулярної маси білків.

Вестерн-блотинг HBsAg-позитивних безклітинних екстрактів виявив основну смугу очікуваного розміру 24 кДа і мінорну смугу 48 кДа (що відповідає мономеру і димеру HBsAg, відповідно, [463] (Рис. 3.5.10 В, С).

Для оптимізації умов ферментації клітини продуцента підросували в колбах на 500 мл, що містили 100 мл середовища YPS при 37°C. Через 24 години,

коли OD_{600} досягав приблизно 17 одиниць, клітини осаджували центрифугуванням і переносили в 25 мл індукційного середовища (0,5% YNB без джерела Нітрогену, 0,1% дріжджового екстракту, 0,25% метиламіну, 1% джерела Карбону, з початковою OD_{600} 20. Через кожні 24 години після перенесення до середовища додавали 1 мл поживного середовища 5% YNB, 0,5% метиламіну, 2% дріжджового екстракту та джерело карбону, що відповідає кінцевій концентрації 1%. Після 140 год індукції, коли OD_{600} досягав приблизно 40 одиниць, клітини відбирали для аналізу HBsAg.

Встановлено, що метиламін був найкращим джерелом Нітрогену з декількох проаналізованих сполук (наприклад, аспарагіну, сечовини), який забезпечував збільшення виходу HBsAg відносно стандартного джерела Нітрогену сульфату амонію приблизно на 30-40%. Такий позитивний ефект C-1 сполуки метиламіну може бути результатом декількох факторів. Зокрема, він забезпечує додаткову індукцію експресії P_{AOX} у мутантних продуцентів HBsAg, вирощених на глюкозі або ксилозі. Крім цього, клітини EAO2-H25 ростуть повільніше у присутності метиламіну порівняно із сульфатом амонію, що може сприяти перерозподілу клітинного метаболізму на користь синтезу рекомбінантного білка, а не біомаси. Подібний ефект було раніше показано для HBsAg-продукуючого штаму *P. pastoris* Mut^S (з повільною утилізацією метанолу), який перевершував штам дикого типу щодо продукції HBsAg у формі частинок [468], [469]. Такий же фізіологічний ефект може мати місце при індукції продуцента ксилозою як джерелом Карбону, оскільки рівень синтезу AOX з цим субстратом в EAO2 є нижчим, ніж у середовищі з глюкозою [462], але рівень експресії HBsA є вищим (Рис. 3.5.10 В). Ми також встановили, що на питому швидкість росту і, особливо, тривалість лаг-фази штамів EAO2-H на нерепресуючих джерелах карбону негативно впливала кількість копій касети HBsAg і, відповідно, більш високий рівень синтезу цільового білка. Це спостереження свідчить, що надекспресія HBsAg є токсичною для штаму-господаря (Табл. 3.5.1).

Продукцію HBsAg в EAO2-H25 у середовищі з ксилозою також аналізували в умовах масштабування до fed-batch ферментера. У цих експериментах клітини

були попередньо вирощені у середовищі YPS і перенесені на середовище з 1% ксилози і метиламіну як джерелом нітрогену для індукції синтезу HBsAg. Початкова OD₆₀₀ в індукційному середовищі становила 45 одиниць; поживними додатком були 3 мл 40% ксилози кожні 24 год; об'єм культури зберігали сталим заміною випаровуваної рідини на 0,5% метиламіну, 2% дріжджового екстракту (приблизно 10 мл) кожні 24 год; клітини інкубували при максимальній аерації (1 л подачі кисню на хв). Клітини відбирали після 100 і 140 год ферментації. За нашими підрахунками за таких умов HBsAg становив до 2,5% загальноклітинного білка (Рис. 3.5.10 С).

3.5.3.4. Продукція секретованого міні-проінсуліну людини (MPI) в мутантів ЕАО

Наступним рекомбінантним білком, регуляцію продукції якого вивчали у ЕОА2 мутантів, був секреторний людський міні-проінсулін (MPI). Проінсулін вважається «складним» білком для експресії в дріжджах внаслідок його неефективного внутрішньоклітинного процесінгу і низької стабільності в позаклітинному середовищі [470]. Як і у випадку HBsAg, було показано, що збільшення кількості копій касети експресії має вирішальне значення для зростання виходу продукту у дріжджів [471].

рКО13, вектор для секреторної експресії MPI під P_{АОХ} в *H. polymorpha* (Рис. 3.5.8), був сконструйований, як описано у розділі «Матеріали і Методи». рКО13 містить дві тандемно ліговані касети експресії MPI та ген *FLD1* *H. polymorpha* під контролем вкороченого конститутивного промотора *GAP* [324], [472], використаний нами як селективний маркер для мультикопійної інтеграції векторів (див. Розділ 3.5.1 вище). Мультикопійні інтегранти вектором рКО13 були ідентифіковані як клони, стійкі до екзогенного формальдегіду (Рис. 3.5.11А). Кількість копій вектора в трансформантів, резистентних до 5 мМ формальдегіду, становила приблизно 5 (Рис. 3.5.11В). Проте, це число відрізнялося для різних штамів-реципієнтів, які використовувалися в нашому дослідженні, у залежності від їх початкової чутливості до формальдегіду.

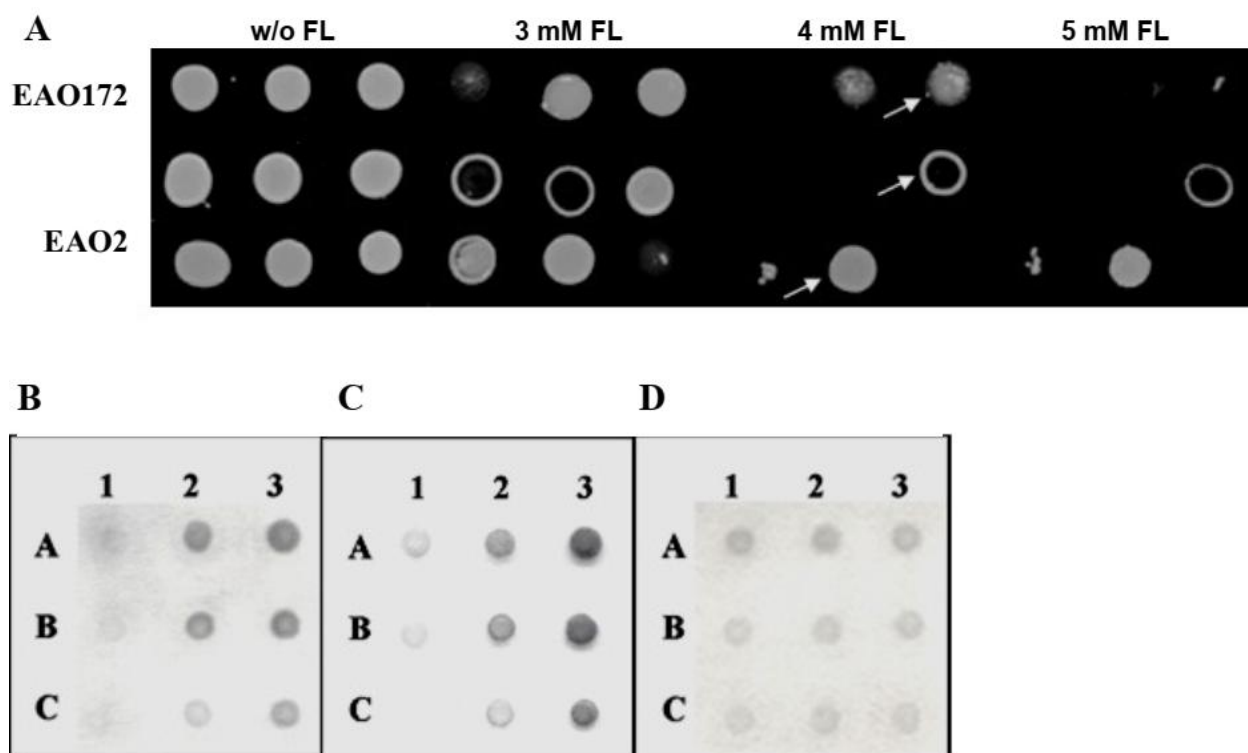


Рис. 3.5.11. Селекція та аналіз продуцентів МРІ. **(А)** Відбір трансформантів з рКО13 за резистентністю до екзогенного формальдегіду. Концентрації формальдегіду (FL), використані в аналізі, вказані зверху. Стрілки вказують на трансформантів, використаних для наступного аналізу продукції МРІ (WT-МРІ і ЕАО172-МРІ, див. Основний текст). **(В)** Саузерн дот-блот геномної ДНК МРІ-продуцентів, із касетою експресії проінсуліну, виділеної як ПЛР продукт (див. «Матеріали і Методи») як зондом. **1** – NCYC 495; **2** – WT-МРІ; **3** – ЕАО172-МРІ; **А** – 3,0 мкг; **В** – 2,0 мкг; **С** – 1,0 мкг ДНК на краплю. **(С)** Саузерн дот-блот геномних ДНК МРІ-продуцентів, із фрагментом ДНК гена *LEU2 H. polymorpha* як зондом. Порядок штамів і кількість нанесеної ДНК як в **(А)**. **(D)** Саузерн дот-блот геномної ДНК МРІ-продуцентів, фрагментом ДНК гена *ADE1 H. polymorpha* як зондом (наявний в одній копії у всіх штамів). Порядок штамів і кількість нанесеної ДНК як в **(А)**.

Для моніторингу продукції секреторного МРІ штами-продуценти підрощували у середовищі YPS протягом 24 годин, осаджували і ресуспендували з початковим OD600 12 у 60 мл синтетичного середовища YNB з різними джерелами карбону (0,5% метанолу, або 1% глюкози, або 2% ксилози). Культивування проводили в 300 мл колбах при 28°C (експериментально

визначена оптимальна температура для забезпечення максимальної стабільності секретованого МРІ). рН середовища доводили до 6,3 за допомогою 0,05 М амоній-фосфатного буфера і підтримували на сталому рівні шляхом додавання H_3PO_4 або NH_3 . Джерела арбону додавали спершу після початкової 24-годинної ферментації, потім повторювали підживлення кожні 12 годин. Готували поживну суміш з такими кінцевими концентраціями субстратів: 0,25% метанолу, 0,4% глюкози, 0,4% ксилози. У кожній часовій точці відбирали аліквоту культурального середовища об'ємом 1 мл і клітини осаджували центрифугуванням. До супернатанту додавали PMSF у кінцевій концентрації 1 мМ для інактивації протеаз і зразки зберігали при -20°C . Біомасу клітин контролювали протягом всього часу культивування; вона досягала приблизно 35-40 OD_{600} після 100-120 годин у залежності від джерела Карбону.

Встановлено, що у декількох EA02 pKO13 трансформантів, вирощених на глюкозі або ксилозі, інсулін секретувався в середовище неефективно порівняно з метанол-індукованими клітинами. Тому для подальших досліджень регуляції експресії інсуліну був використаний інший штам-реципієнт з пошкодженою глюкозною репресією, а саме EAO172. Цей мутант спочатку був відібраний як похідний EAO2-G, який надсекретував GOD у середовищі з глюкозою та ксилозою [462]. Очевидно, EAO172 містив додаткову мутацію(ї), які частково пошкоджували репресію P_{AOX} сахарозою та етанолом (Рис. 3.5.6), і, ймовірно, також покращували секрецію білків.

Показано, що клітини pKO13 трансформантів EAO172, резистентні до екзогенного формальдегіду, були здатні виділяти значні кількості МРІ при вирощуванні на глюкозі або ксилозі в мінеральному середовищі за умов періодичного підживлення подачі (Рис. 3.5.12 А). Ми відібрали найкращого пняродуцента МРІ, що містив до 6 копій касети експресії (позначений як EAO172-MPI), для подальшого аналізу. МРІ був коректно процесований у цього продуцента, що підтверджено Вестерн-блот аналізом культурального середовища EAO172-MPI (Рис. 3.5.12 В). Певна кількість МРІ у вирощеного з глюкозою продуцента WT-MPI з 3-ма інтегрованими касетами експресії імовірно

обумовлена дерепресією P_{AOX} внаслідок швидшого вичерпання глюкози порівняно з EAO172-MPI (Рис. 3.5.12 А). Визначений рівень синтезу MPI в метанол-індукованому WT-MPI і в EAO172-MPI, індукованому метанолом, глюкозою або ксилозою, був приблизно однаковим і на жаль досить незначним, в межах 50-100 мг на літр культурального середовища.

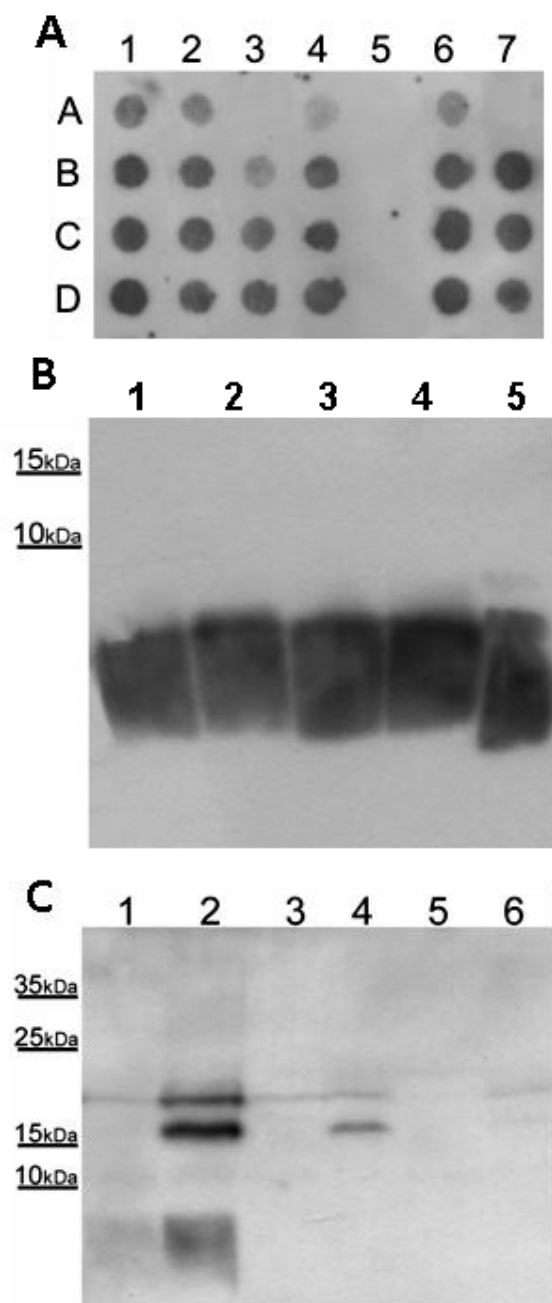


Рис. 3.5.12. Аналіз регуляції синтезу MPI, його процесінгу і секреції у штамів-продуцентів. **(А)** Імунодот-блот культуральних середовищ YNB з різними джерелами Карбону; 10 мкл на кожен лунку. Час росту: **A** – 24 години, **B** – 48, **C** – 68, **D** – 78 годин. 1 – WT-MPI, вирощений на метанолі (YNM); 2 – EAO172-MPI, YNM; 3 – WT-MPI, вирощений на глюкозі (YND); 4 – EAO172-MPI, YND; 5 – WT-MPI, вирощений на ксилозі (YNX); 6 – EAO172-MPI, YNX; 7 – стандартні розведення інсуліну (**A** – 0 мкг, **B** – 0,5 мкг, **C** – 0,25 мкг, **D** – 0,125 мкг). **(В)** Вестерн-блот аналіз MPI в культуральних середовищах після 68 годин інкубації (як на доріжці **C** у **(А)**). В кожен лунку наносили 21 мкг культурального супернатанту; 1 – WT-MPI, YNM, 2 – EAO172-MPI, YNM, 3 – EAO172-MPI, YND, 4 – EAO172-MPI, YNX, 5 – 1 мкг стандарту інсуліну. **(С)** Вестерн-блот екстрактів клітин, інкубованих протягом 68 годин з різними джерелами Карбону (як на доріжці **C** у **(А)**). 120 мкг загального білка нанесено в кожен лунку 1 – WT-MPI, YNM; 2 – EAO172-MPI, YNM; 3 – WT-MPI, YND; 4 – EAO172-MPI, YND; 5 – WT-MPI, YNX; 6 – EAO172-MPI, YNX.

Цікаво, що кількість непроцесованого або несекретованого MPI у безклітинних екстрактах EAO172-MPI була нижчою у клітинах, вирощених з глюкозою та ксилозою, ніж у інкубованих з метанолом (Рис. 3.5.12С). Незрозуміло, однак, чи цей факт свідчить про більш ефективний процесінг MPI

Kex2 пептидазою [470] і кращу секрецію, чи про швидшу внутрішньоклітинну деградацію МРІ в клітинах, вирощених на субстратах-цукрах. Ефективність продукції МРІ у вирощеному у лабораторному біореакторі на глюкозі та ксилізі ЕАО172-МРІ була, по суті, такою ж, як і у випадку ферментації у колбах. Таким чином необхідні подальші дослідження для підвищення продуктивності синтезу МРІ у *H. polymorpha*.

3.5.4. Конструювання стабільного надпродуцента HBsAg другого покоління в *H. polymorpha* за допомогою мультикопійної інтеграції і дефекту біогенезу пероксисом

Інтеграція множинних копій касет експресії в геном господаря досить часто є важливим кроком для конструювання надійних продуцентів. Множинна інтеграція може бути досягнута шляхом інтеграції клонованого гену чи касети експресії на кластер рибосомної ДНК, конструювання конкатамерів касет експресії або випадковим чином, і її ефективність критично залежить від використаного маркера селекції [473].

Гени резистентності до генетицину (G418) та гігromіцину В можуть бути використані як ефективні домінуючі селективні маркери, що дозволяють відбирати трансформантів з числом інтегрованих копій від 1 до 50, що корелює зі збільшенням концентрації антибіотика [295], [324]. Недоліком цих методів є екологічна небезпека горизонтального перенесення генів резистентності до антибіотиків, яку важко контролювати. Як альтернатива, в схемах селекції можуть бути використані деякі біосинтетичні гени. Наприклад, ген *ScURA3* експресується на низькому рівні в *H. polymorpha*, і для забезпечення прототрофності за урацилом необхідна мультикопійна інтеграція цього гена. Той же принцип застосовується і в цьому випадку частково дефектного *LEU2* *H. polymorpha* з делетованою частиною його промоторної ділянки [474].

Також можуть бути застосовані гени, що забезпечують стійкість до деяких екзогенних факторів, як, наприклад, ген формальдегіддегідрогенази дріжджів до екзогенного формальдегіду (див. вище, [290], [334]). Однак для *P. pastoris* метод

був успішним лише для реципієнтних штамів, делетованих за геном *FLD1*. Для *H. polymorpha* цей метод дозволяв селекцію трансформантів, що максимально містили до 5 інтегрованих касет експресії [290]. Отже, для досягнення максимального виходу деяких рекомбінантних білків очевидно необхідна комбінація декількох методів селекції для інтеграції максимального числа касет експресії.

У ході нашої роботи ми зауважили, що деякі з доступних методів не є ефективними для штамів, що походять з генетичної лінії NCYC495 *H. polymorpha*, наприклад, тих, які несуть дефекти катаболітної репресії. Селекція мультикопійних інтегрантів на основі резистентності до генетицину і формальдегіду дозволила виділення трансформантів, що містили близько 5-7 інтегрованих касет експресії. У цьому розділі ми описуємо нову комбінацію методів, що використовують маркер *ScURA3* і нещодавно розроблену нами систему на основі гена *ADE1* *P. pastoris* під вкороченим промотором для більш ефективного відбору мультикопійних інтегрантів. Цей підхід був застосований для конструювання рекомбінантних штамів *H. polymorpha*, що продукують HBsAg. Ми також перевірили, чи пероксисомальні мембрани дійсно важливі для забезпечення продуктивності синтезу HBsAg, як було раніше запропоновано [461].

3.5.4.1. Виділення покращеного продуцента HBsAg, шляхом поєднання двох методів селекції мультикопійних трансформантів

Описаний вище HBsAg-продуцент на основі ЕАО2 мутантного штаму *H. polymorpha* ЕАО-Н-25, з дефekten глюकोзної катаболітної репресії, продемонстрував досить високу продуктивність (приблизно 25 мг HBsAg/г білка); однак, він містив лише від чотирьох до п'яти копій інтегрованої касети експресії у своєму геномі [290]. Враховуючи попередній досвід, було висловлено припущення, що синтез HBsAg можна поліпшити шляхом додаткового збільшення кількості касет експресії HBsAg в геномі господаря [463]. Тим не менше, нам не вдалося істотно збільшити кількість копій інтегрованих касет у

мутантів, похідних від NCYC495, використовуючи селекцію за резистентністю до генетицину або за прототрофністю по лейцину із *ScLEU2* як маркерним геном.

Тому для конструювання більш ефективного продуцента HBsAg у *H. polymorpha* ми вирішили об'єднати два комплементарних методи селекції мультикопійних трансформантів: описаний вище на основі гена *PpADE1*, контрольованого вкороченим до 54 п.н. промотором (*PpADE-S*) і раніше описаний іншими метод на основі гена *ScURA3* [324].

Для конструювання вектора ауксотрофний за урацилом мутант *H. polymorpha* RB11ura3, дефектний за орітидин-5'-фосфат декарбоксилазою [475], слугував джерелом мутованого гена *URA3* *H. polymorpha*. Штам GS115 *P. pastoris* [269] і BY4742 *S. cerevisiae* [476] використовувалися для виділення генів *PpADE1* і *ScURA3*, відповідно. Конструювання відповідних векторів, схеми яких представлено на Рис. 3.5.13, описане у розділі «Матеріали і Методи».

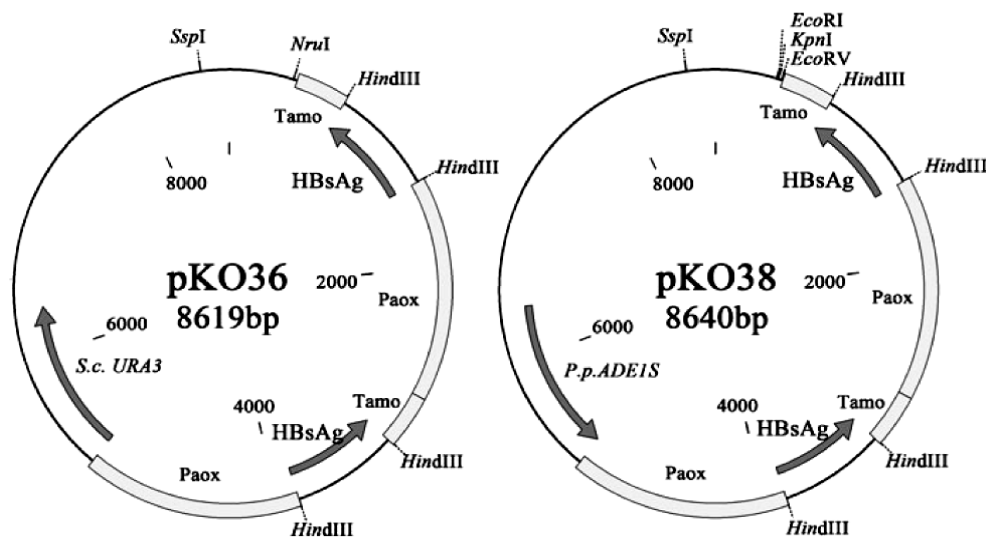


Рис. 3.5.13. Схематичне зображення векторів рКО36 і рКО38 *H. polymorpha* для мультикопійної інтеграції

Для трансформації штаму ЕАО2 $\Delta ade1$, рКО38 попередньо лінеаризували. Відбір трансформантів проводили на мінімальному середовищі з сахарозою (YNS). Трансформанти стабілізували шляхом декількох раундів перенесення та інкубації із селективного середовища на неселективне. Близько 15 стабільних трансформантів проаналізували на предмет продуктивності синтезу HBsAg у

культурах в колбах, як описано вище, і найкращий клон було обрано для подальшої оптимізації.

Оскільки з невідомої причини ми зазнали невдачі в конструюванні *ura3*-делеційного мутанта *H. polymorpha*, ми виділили мутований *URA3* ген *H. polymorpha* зі стабільного, часто використовуваного іншими групами штаму RB11 *ura3* [475] та використали цей фрагмент для трансформації EAO2-N15 шляхом електропорації. Селекцію проводили на мінімальному середовищі з сахарозою (YNS), урацилом і 5-фтороротовою кислотою. Після стабілізації, EAO2-N15 *ura3* був відібраний як нездатний до росту без урацилу і резистентний до 5-фтороротової кислоти.

Інший вектор pKO36 лінеаризували перед трансформацією, селекцію проводили як для мутанта EAO2 $\Delta ade1$, за винятком того, що, як селективне, використовували середовище без урацилу. Близько 15 стабільних прототрофних трансформантів далі аналізували на продуктивність HBsAg в культурі у колбах, як описано в [290]. Найкращий продуцент, позначений як EAO2-N90, був відібраний для подальшої роботи.

Таким чином, використовуючи поетапну трансформацію векторами pKO38 (на основі *ScURA3*) і pKO36 (на основі *PpADE1*), ми виділили продуценти EAO2-N15 і EAO2-N90, загальний опис яких наведено в Таблиці 3.5.3.

Таблиця 3.5.3.

Опис виділених штамів-продуцентів HBsAg

Штами	Вектор(и)	Маркер селекції	Приблизна кількість інтегрованих векторів	Кількість копій касет експресії HBsAg	Приблизна продуктивність HBsAg, мг/г білка	Описано в:
EAO2-N25	pKO6	Резистентність до G418	4-5	4-5	14	<i>Krasovska et al., 2007</i>
EAO2-N15	pKO38	<i>PpADE1-S</i>	12-13	24-26	33	<i>Krasovska et al., 2013</i>
EAO2-N90	pKO38 pKO36	<i>PpADE1-S</i> <i>ScURA3</i>	24-26	50-55	62	<i>Krasovska et al., 2013</i>

Порівнювали продуктивність описаного вище ЕАО2-Н25 [290] і нових продуцентів ЕАО2-Н15 і ЕАО2-Н90, усі похідні від того ж дефектного за глюкозною репресією реципієнта ЕАО2. Продукцію HBsAg досліджували в середовищі з ксилозою з використанням метиламіну як джерела Нітрогену, який був визначений нами як оптимальний для синтезу HBsAg [290].

Порівняльний аналіз синтезу HBsAg трьома вищезгаданими штамми виявив, що рівень експресії HBsAg позитивно корелював із кількістю копій касети експресії в кожному штамі. Штам ЕАО2-Н15, відібраний з допомогою системи селекції на основі *PpADES*, продукував у 2,4 рази більше HBsAg, ніж раніше отриманий найкращий продуцент ЕАО2-Н25 (Рис. 3.5.14).

Додаткова трансформація і селекція на основі гена *ScURA3* дали змогу виділити покращений продуцент ЕАО2-Н90, який синтезує HBsAg у таких умовах до 6,2% від загальноклітинного білка (в 4,4 рази більше, ніж штам ЕАО2-Н25). Саузерн дот-блот підтвердив, що штам ЕАО2-Н25 містить 4-5 копій інтегрованого вектора, що підтвердило попередні дані, тоді як ЕАО2-Н15 і ЕАО2-Н90 12-13 і 28-30 копій, відповідно (Рис.3.5.15).

3.5.4.2. Вплив делеції гена *PEX3* на продуктивність синтезу HBsAg у штамів з дефектом глюкозної репресії

Як повідомлялося раніше, в *H. polymorpha* та інших дріжджів рекомбінантний HBsAg був виявлений у вигляді псевдовірусних білкових капсидів, асоційованих з мембранами [261], [461]. Також було висловлено припущення, що мембрани пероксисом можуть брати участь у стабілізації HBsAg [461]. Отже, промислова продукція HBsAg у *H. polymorpha* включає стадію індукції метанолом для забезпечення проліферації пероксисом.

У ЕАО мутантів пероксисоми конститутивно надпродукуються в середовищі з глюкозою або ксилозою (див. Розділ 3.5.1). Щоб перевірити, чи пероксисоми дійсно забезпечують максимальну продукцію HBsAg, ми сконструювали похідний мутант

ЕАО2-Н15 *H. polymorpha* з делетованим геном *PEX3* (необхідний для ранніх стадій біогенезу пероксисом [237], як описано у розділі «Матеріали і Методи».

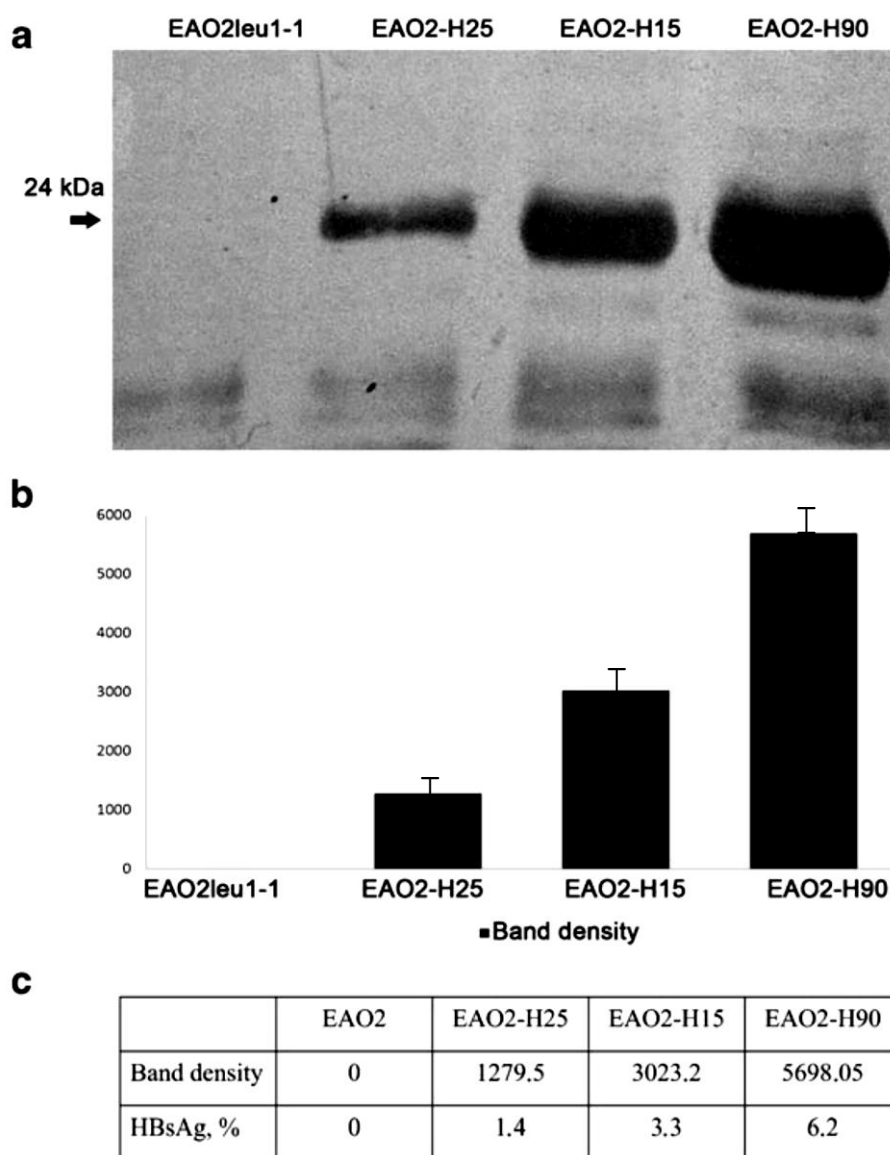


Рис. 3.5.14. Аналіз експресії HBsAg у поліпшених продуцентів. **(А)** Вестерн-блот-аналіз HBsAg в ЕАО2-Н25, ЕАО2-Н15 і ЕАО2-Н90, інкубованих в середовищі з ксилозою, протягом 142 годин; на смугу нанесено ТХО – екстракти з 10 од. OD_{600} клітин **(В)** Денситометрична оцінка продукції HBsAg-відповідної смуги (відповідає **(А)**). **(С)** Продуктивність HBsAg (% від загального клітинного білка), визначена відповідно до розрахованої інтенсивності смуги і раніше виявленої продуктивності штаму ЕАО2-Н25.

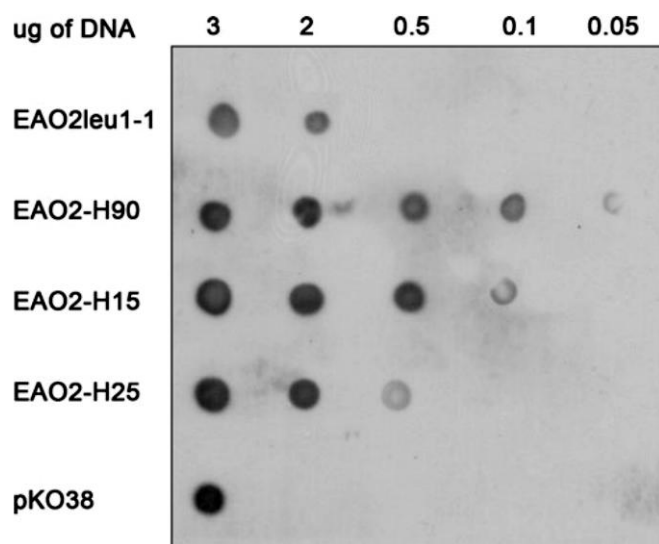


Рис. 3.5.15. Кількість копій касети експресії у продуцентів HBsAg. Саузерн дот-блот геномних ДНК HBsAg-продуцентів досліджували шляхом гібридизації із фрагментом P_{AOX} , отриманим з рКО36. Штам дикого типу EAO2 *leu1-1* містить одну копію цього фрагмента ДНК, тому кількість касет експресії у HBsAg-продуруючих штаммах можна оцінити шляхом порівняння інтенсивності плям гібридизації (dot density). Для штамів EAO2-H15 і EAO2-H90 кожен вектор (рКО36 і рКО38) містив дві касети експресії і тільки один селективний маркер, тому для оцінки кількості інтегрованих векторів показник інтенсивності ділили навпіл (числові дані представлені в Таблиці 3.5.3)

Хоча EAO2-H15 несе меншу кількість копій касети експресії HBsAg, інтегрованих в геном, було виявлено, що ним значно легше маніпулювати для трансформації, ніж з висококопійнішим інтегрантом EAO2-H90 (очевидно внаслідок токсичності надпродукції HBsAg), і тому саме він був обраний як штам-господар для введення делеції гена *PEX3*.

Продукцію HBsAg порівнювали у штамів EAO2-H15 і $\Delta pex3$ EAO2-H15, культивованих у середовищі з ксилозою та глюкозою. Експеримент проводили в культурах колб за умов струшування на шейкері (shake-flask cultures), де спостерігалось деяке зниження експресії на 142 годину індукції через досягання клітинами стаціонарної фази і часткового лізису клітин, що корелювало з кривими росту.

Встановлено, що, всупереч початковій гіпотезі про роль пероксисомних мембран у забезпеченні сайту інкорпорації HBsAg та його стабільності, делеція

PEX3 призвела до значного (у 1,5 рази в середовищі з глюкозою і 2-2,5 разів у середовищі з ксилозою) збільшення виходу HBsAg (Рис. 3.5.16). Більше того, ми виявили, що штам *Δpex3*ЕАО2-Н15 (містить 12-13 копій касет експресії) накопичив на 30% більше HBsAg порівняно з продуцентом ЕАО2-Н90, який містить до 25 копій.

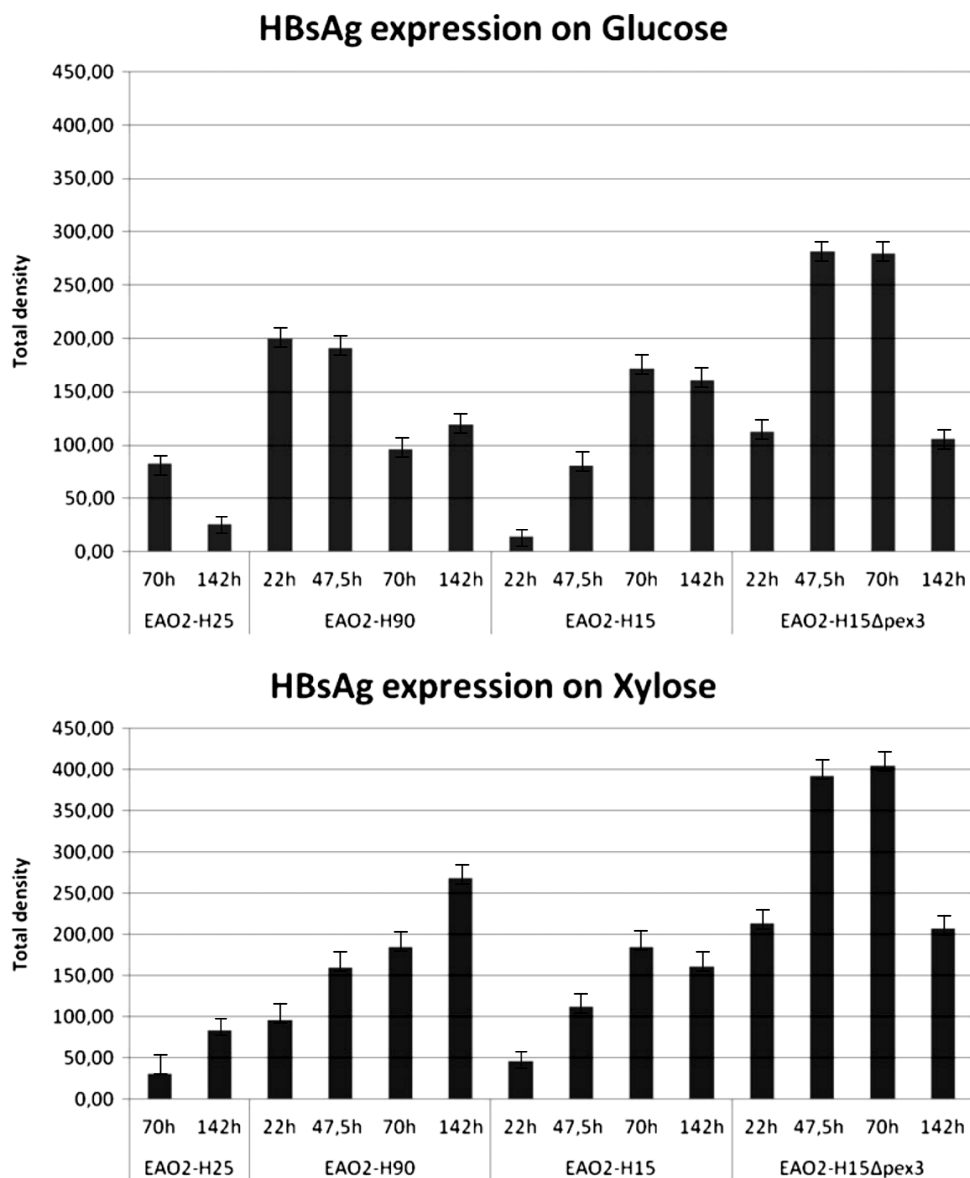


Рис. 3.5.16. Порівняльний аналіз продукції HBsAg кращими виділеними продуцентами у середовищах з ксилозою і глюкозою за результатами денситометричного аналізу смуг Вестерн-блотингу. На одну доріжку наносили 0,5 OD₆₀₀ ТХО-екстрактів. Наведено результати типового повторюваного експерименту.

Встановлено, що кількість HBsAg в штамі *Δrex3* EAO2-H15 досягає приблизно 8-9% загального клітинного білка. Ми виявили, що позитивний вплив мутації *Δrex3* на вихід HBsAg не був пов'язаний зі змінами в швидкості росту мутантного продуцента, обумовленими мутацією *Δrex3* в середовищі з глюкозою.

У рамках цього проекту ми також зауважили, що мутації *rex*, пригнічують здатність утилізувати ксилозу: мутант EAO2 *rex3* ріс на чашках з ксилозою достовірно повільніше відносно ізогенного реципієнтного штаму. Ми додатково проаналізували ріст *rex* мутантів у середовищі з ксилозою, незалежно від мутаційного фону EAO або *gcr1*.

Як видно з Рис. 3.5.17, мутанти *rex6* і *rex10* *H. polymorpha* характеризуються зповільненим ростом, а саме, видовженою лаг-фазою, у рідкому середовищі з 2% ксилози, що може вказувати на раніше невідому функцію пероксисом в утилізації пентоз (Рис. 3.5.17).

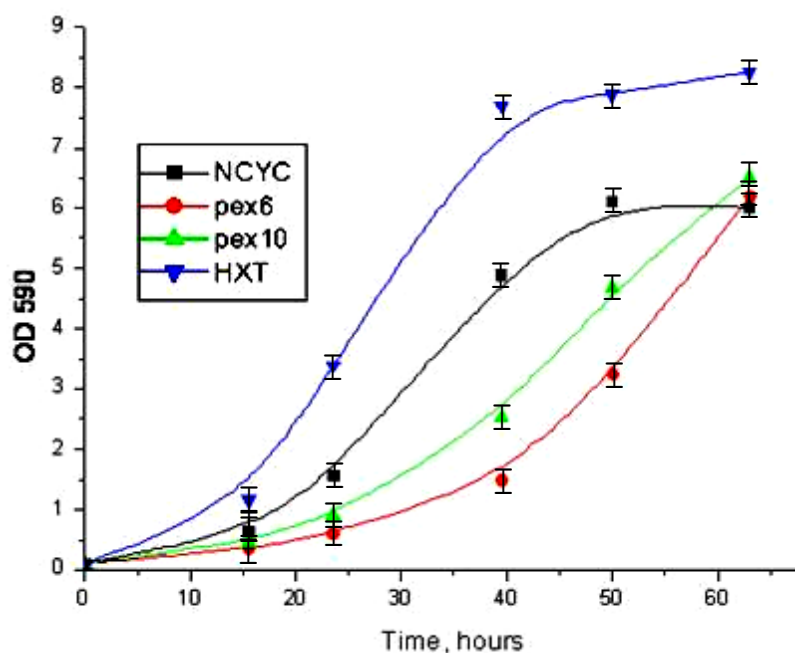


Рис. 3.5.17. Аналіз впливу *rex* мутацій на утилізацію ксилози. Криві росту штаму *H. polymorpha* дикого типу (NCYC), мутантів з пошкодженим біогенезом пероксисом (*rex6* і *rex10*), і мутантного штаму *gcr1*, що надекспресує *HpHXT1* під конститутивним GAP промотором (HXT) в мінеральному середовищі з 2% ксилози. Наведено дані типового експерименту після декількох повторів.

Отже, можна припустити, що певні ферменти з пероксисомною локалізацією частково (оскільки деякі мутації не блокують цілком утилізацію ксилози) залучені в метаболізм ксилоли [482]. Ця ідея була підтверджена після аналізу мутантів, дефектних за, або надекспресуючих пероксисомні транскетолазу і трансальдолазу. Однак ці експерименти виявили, що пероксисоми більш важливі для напівааеробної ферментації ксилози, ніж для фізіологічного аеробного росту.

Додатково слід зазначити, що надекспресія функціонального транспортера гексоз *H. polymorpha* *HXT1* на фоні делеції ймовірного трансцептора *HpGCR1* призводила до позірної кращої утилізації ксилози у рідкій культурі відносно штаму дикого типу (Рис. 3.5.17). Проте, це лише попереднє спостереження, яке має бути перевірене у поєднанні з іншими мутаціями *H. polymorpha*, відмінними від *gcr1*, який має складний плейотропний фенотип (див. Розділ 3.1).

3.5.5. Обговорення результатів

У цьому розділі ми описуємо розробку нових маркерів селекції мультикопійних інтегрнтів у *H. polymorpha* для більш ефективної продукції рекомбінантних білків, а також використання мутантів *H. polymorpha*, дефектних за глюкозною репресією біогенезу пероксисом, як нових штамів – продуцентів.

Використовуючи розроблену нами систему селекції на основі гена *ADE1* *P. pastoris* під власним вкороченим промотором, ми сконструювали поліпшені продуценти пероксисомної АМО *H. polymorpha* для біоаналітичних цілей. Синтез АМО у кращих продуцентів перевищував показники штаму дикого типу приблизно на порядок. У цій векторній системі паралельно використовувалися два маркери селекції (*PpADE1* і *APH* – маркер резистентності до генетицину) і, по суті, показали функціональну надлишковість. Це свідчить про те, що потенційно можна покладатися на лише один ауксотрофний маркер *PpADE1* для відбору мультикопійних трансформантів без необхідності інтегрування потенційно небезпечних маркерів стійкості до антибіотиків у геном продуцента. Залишається з'ясувати, чи можуть мутанти *H. polymorpha* з конститутивним надсинтезом

пероксисом в глюкозному середовищі (ЕАО, див. Розділ 3.1) бути кращими продуцентами цього пероксисомного ферменту.

Зазначені штами ЕАО, похідні мутанта *gcr1-2*, описані в Розділі 3.1, не потребують метанолу для індукції P_{AOX} , що є перевагою порівняно із традиційною платформою експресії на основі штамів дикого типу, оскільки дозволяє уникнути декількох вищезгаданих пов'язаних із метанолом проблем за умов великомасштабної ферментації. Оскільки вторинні мутації в мутантних господарів ЕАО, які істотно збільшували експресію P_{AOX} на глюкозі, проявляються тільки на тлі мутації *gcr1* [29], ми не змогли функціонально комплементувати їх для встановлення молекулярної природи.

Описана нами система на основі ЕАО-мутантних штамів також може бути кориснішою, аніж система на основі конститутивних промоторів, оскільки вона зберігає регульований характер P_{AOX} , а саме його репресію дисахаридами або етанолом. Ця особливість дає змогу ефективно розділяти фази росту біомаси та індукції експресії білка у ферментаційних каскадах з двома джерелами карбону. Це може мати особливе значення для синтезу рекомбінантних білків, які є токсичними для свого штаму-господаря при надпродукції, наприклад HBsAg. У дріжджів HBsAg ефективно утворює псевдовірусні ліпофільні частинки, які включаються в клітинні мембрани, включаючи мітохондріальні [461], [464].

Таким чином, з мутантами по глюкозній репресії як штамми-господарями, можливо ефективно нарощувати біомасу клітин у середовищі з сахарозою, а потім індукувати експресію HBsAg при переході на глюкозу або ксилозу. За умов оптимізованого складу середовища у невеликому лабораторному ферментері, HBsAg складав 2% від загального клітинного білка у штаму, який містив відносно низьку кількість касет експресії. Ксилоза, репресія якою P_{AOX} у наших мутантних штаммах є також пошкодженою, може бути кращим субстратом, якщо потрібен повільніший ріст під час фази індукції, за аналогією з продукцією деяких білків у штамів *P. pastoris* Mut^S [477].

Ми також продемонстрували, що мутантні штами ЕАО можуть бути використані для безметанольної продукції секреторних білків. Для них зазвичай

використовують режим «одне джерело Карбону» у *H. polymorpha*, який включає його виснаження і дерепресію промотора. Як приклад можна навести рекомбінантний гірудин (дерепресія гліцеролом, P_{AOX}) або фітазу (дерепресія глюкозою, P_{FMD}) [296], [478]. Однак, як продемонстровано в наших експериментах з продуцентами GOD і MPI, можна також успішно застосувати режим «два джерела карбону». Ми встановили, що під час росту біомаси на сахарозі та подальшому пересенні на глюкозу або ксилозу, експресія GOD та MPI ефективно індукується, і клітини легко адаптуються до внесених джерел Карбону в періодичній культурі. Також ми встановили, що GO і MPI, злиті зі сигнальною послідовністю MFα *S. cerevisiae*, були коректно процесовані і ефективно секретувалися в ЕАО мутантних господарях, вирощених на глюкозі або ксилозі. У випадку, ми зауважили, що незначний вихід цього рекомбінантного білка зумовлений у першу чергу наступними факторами: його неефективним внутрішньоклітинним процесингом і низькою протеолітичною стабільністю секретованого продукту. Генна інженерія, збільшення кількості копій касет експресії, введення мутацій для полегшення внутрішньоклітинної стабілізації/секреції MPI, модифікований склад середовища для підвищення позаклітинної стабільності MPI є перспективними підходами для конструювання більш ефективного надпродуцента MPI в *H. polymorpha*. Схожі до описаних вище гетерологічних продуктів результати були отримані для ЕАО продуцентів рекомбінантної секреторної аргінази людини [290].

Ми також вперше описуємо використання гена формальдегіддегідрогенази (*FLD1*) *H. polymorpha* [472] для селекції резистентних до формальдегіду трансформантів зі збільшеною кількістю інтегрованих у геном векторів. Слід зазначити, що подібна система була незалежно розроблена для *P. pastoris* [479]. Однак, у нашій системі ген *FLD1* був поміщений під послаблений конститутивний *GAP* промотор, що дозволило проводити селекцію при порівняно низьких концентраціях леткого формальдегіду і не потребувало введення мутації *fld1* в реципієнтні штами. Така селекційна платформа може бути застосована, коли використання генів стійкості до антибіотиків викликає застереження. Слід

зазначити, що експресія гетерологічного *FLD1 P. pastoris* (який містить інтрон у своїй послідовності) у *H. polymorpha* була невдалою з невідомих для нас причин.

Хоча і досить рідко, зустрічаються повідомлення про інтеграцію до 100 копій трансформуючих ДНК-векторів у геном *H. polymorpha*, зокрема, для штаму RB11, отриманого з лінії CBS4732 [463], [480], або штаму DL-1 [324], який нині класифікується як сестринський вид *Ogataea parapolyomorpha* [481]. Таке надзвичайно високе число копій у деяких випадках дійсно потрібне для досягнення максимальної продукції певних рекомбінантних білків [286]. Ми протестували низку найбільш успішних мультикопійних систем інтеграції, але з невідомих наразі причин виявили їх обмежену ефективність для штамів, отриманих з генетичної лінії *H. polymorpha* NCYC495 (Розділ 3.5.1, [290]). Тим не менше, ми цілеспрямовано розглядали NCYC495-похідні мутанти з дефектом катаболітної репресії, як перспективні кандидати для експресії низки гетерологічних білків, включаючи HBsAg. Для досягнення бажаного виходу HBsAg необхідно було отримати максимальну кількість інтегрованих у геном копій вектора.

Тому ми поетапно поєднали два альтернативні способи мультикопійної інтеграційної селекції і спробували виділити стабільні штам-продуценти, що містять близько 50 касет експресії (відповідно до 24-26 копій векторів) у своєму геномі. Використання маркерного гена *ScURA3* раніше було описано для штамів DL1 і CBS4732 *H. polymorpha*, але не для похідних NCYC495. Ми виявили, що *ScURA3* забезпечує селекцію до 15 інтегрованих копій вектора у цій генетичній лінії. З іншого боку, ми побачили, що селекція на основі гену *PpADE1* під контролем його вкороченого до 54 п.н. промотора дозволила виділяти трансформанти, що несуть до 15 копій гена *PpADES*. Цей метод також є дуже зручним для попередньої оцінки числа інтегрованих векторних копій за забарвленням окремих колоній на багатому середовищі. Колонії з червоним забарвленням свідчать про залишкову аденінову залежність внаслідок накопичення інтермедіатів біосинтезу аденіну, і можуть бути просто виключені з подальшого аналізу. Цей метод також був успішно застосований для виділення

надпродуцентів аргінази людини в мутантів ЕАО. Можна припустити, що метод на основі *PpADE1-S* можна поширювати і на інші генетичні лінії *H. polymorpha* (CBS4732, DL1), а також інші види дріжджів, включаючи *S. cerevisiae*.

Ми також виділили кілька нових штамів-реципієнтів, необхідних для використання запропонованих схем відбору трансформантів. Вони включали стабільні *ade1*, *ura3* або подвійні ауксотрофні мутанти лінії NCYC495, а також їхні похідні, дефектні за глюкозною репресією. Запропонована схема може бути використана для відбору трансформантів, що містять різні кількості копій інтегрованих векторів – 10-15, якщо використовується тільки одна схема селекції, і до 30 – при комбінації двох маркерів відбору. Цей підхід також може бути потенційно використаний для одночасної експресії двох різних гетерологічних білків в одному штамі, наприклад, як у випадку S- та L- форм HBsAg [463]. Як наслідок, застосування запропонованої схеми відбору на основі двох ауксотрофних маркерних генів дозволило виділити продуцент ЕАО2-Н90 *H. polymorpha* з виходом HBsAg до 6% загального клітинного білка в оптимізованих умовах періодичної культури

Раніше було припущено, що продукція HBsAg у *H. polymorpha* потребує спеціального підживлення метанолом, оскільки передбачалося, що утворення псевдовірусних частинок, що стабілізують HBsAg, вимагає інтенсивної проліферації мембран пероксисом [461], [464]. Щоб перевірити цю гіпотезу, ми ввели мутацію, що порушує біогенез пероксисом у продуцента (делеція гена *HpPEX3*, див. Розділ 1.2 для більш детальної інформації про його функції). Неочікувано для нас, дефект утворення пероксисом не викликав жодного зниження продуктивності HBsAg, а, навпаки, відбулося її зростання як у середовищі з глюкозою, так і з ксилозою. Таким чином, відповідний продуцент дозволив досягти значного підвищення виходу HBsAg (8-9% від загального клітинного білка), і одночасно замінити токсичний метанол у процесі ферментації на ксилозу або глюкозу, що робить масштабне виробництво безпечним і економічно вигідним. Причина такого збільшення синтезу HBsAg внаслідок мутації *Δpex3* ще не відома, оскільки функція пероксисом при рості на

субстратах-цукрах вважається зайвою (але див. також Розділ 3.4 про можливу роль пероксисом в утилізації ксилози). Проте ми припускаємо, що дефіцитні за пероксисомами клітини можуть скеровувати більше мембранних компонентів для підтримки вірусоподібних частинок HBsAg, які у штаму-господаря, дефектному за глюкозною репресією, імовірно використовуються для надпродукції пероксисомних мембран. Як альтернатива, надпродукція пероксисом може мати ще невідомі згубні ефекти на фізіологію продуцента.

Таким чином, запропонована нами модифікована платформа експресії *H. polymorpha* на основ мутантів, дефективних за глюкозною репресією, збільшує діапазон доступних варіантів штамів і промоторів і може слугувати альтернативою традиційній системі, особливо під час ферментації з двома джерелами Карбону. Використання нетоксичних і легкодоступних цукрових субстратів для росту клітин та індукції P_{AOX} (напр. сахарози і глюкози, відповідно) у поєднанні зі зменшеною важливістю аерації, є перспективною хорошою передумовою для економічної ефективності такої платформи.

3.5.6. Підсумки

Потреба у метанолі для максимальної індукції експресії генів під P_{AOX} за умов великомасштабної ферментації є істотним недоліком, оскільки ця сполука є токсичною, легкозаймистою, забезпечує повільну швидкість росту і вимагає посиленої затратної фінансово аерації. Ми виділили ЕАО (*Elevated Alcohol Oxidase*) мутанти *H. polymorpha*, дефектні за глюкозною репресією P_{AOX} внаслідок порушення гена *HpGCR1*, що кодує потенційний глюкозний трансцептор (див. Розділ 3.1), та інших неідентифікованих вторинних мутацій. Мутанти виявляли виражені дефекти регуляції P_{AOX} тільки гексозами і ксилозою, але не дисахаридами або етанолом. На основі одного з таких мутантних штамів-господарів ми розробили модифіковану платформу експресії з двома джерелами Карбону, яка використовує зручні субстрати-цукри для росту (сахароза) та індукції експресії рекомбінантного білка (глюкоза або ксилоза). Ми продемонстрували ефективну, регульовану за допомогою Карбонових джерел

експресію трьох рекомбінантних білків: секреторної глюкозооксидази з гриба *A. niger*, секреторного міні про-інсуліну людини і внутрішньоклітинного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в цих мутантних штаммах-господарях. Модифікована платформа експресії зберігає регуляторну природу P_{AOX} і є зручною альтернативою традиційній системі.

Розроблено нову платформу для мультикопійної інтеграції векторів в геном *H. polymorpha*, що базується на маркерних генах дріжджів (*ADE1 P. pastoris* і *FLD1 H. polymorpha*) і не використовує потенційно небезпечні гени резистентності до антибіотиків. Запропоновані підходи можуть бути використані для конструювання ефективних продуцентів рекомбінантних білків, що містять контрольовану кількість касет експресії, стабільно інтегрованих в їхні геноми. Використовуючи систему селекції на основі гена *ADE1 P. pastoris*, ми успішно сконструювали більш ефективні продуценти пероксисомної АМО в *H. polymorpha* для біоаналітичних цілей.

Для виділення ефективних надпродуцентів HBsAg в *H. polymorpha* були використані два методи мультикопійної інтеграції. Послідовне використання гена *URA3 S. cerevisiae* і розробленого нами методу на основі гена *ADE1 P. pastoris* як маркерів селекції дозволило отримати стабільні трансформанти, що містять до 30 інтегрованих касет з геном HBsAg. Делеція гена *PEX3*, що кодує пероксин, залучений на ранній стадії утворення пероксисом, істотно збільшує продукцію HBsAg в ЕАО-господарів порівняно із батьківським штамом. Максимальна продуктивність HBsAg у штаму *Δpex3* ЕАО становила близько 8-9% загального клітинного білка.

Результати, описані в Розділі 3.5., були опубліковані в 6 статтях, 1 огляді та 1 патенті [3], [290], [291], [370], [458], [482]–[484].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальні результати, описані у даній дисертаційній роботі, проливають нове світло на механізми, за допомогою яких так-звані «неконвенційні» дріжджі, у даному випадку метилотрофи, регулюють метаболізм, транскрипцію та гомеостаз органел у відповідь на присутність альтернативних джерел Карбону, зокрема цукрів та етанолу. Перед початком цієї роботи у 90-их роках існували лише обмежені біохімічні та генетичні дані щодо деяких аспектів генетичного контролю вуглецевої катаболітної регуляції, і більшість з них були отримані на єдиній експериментальній моделі пекарських дріжджів *S. cerevisiae*. Ця закономірність логічно впливає з важливості цього виду дріжджів для різноманітних біотехнологій а також того факту, що ці дріжджі були першим еукаріотичним організмом, для якого була встановлена повна послідовність геному у 1996-му році [485]. Однак, слід підкреслити добре відомий факт, що метаболізм *S. cerevisiae* є специфічно адаптованим до ефективною ферментації цукрів за аеробних умов (так-званий Кребтрі ефект-позитивний статус) [4]. Відповідно, їх генетичний апарат був допасований до цієї адаптації шляхом довготривалої еволюційної селекції, що відбулась після дуплікації геному у філогенетичній лінії, що веде до *S. cerevisiae* [486], [487]. Таким чином, навіть беручи до уваги, що глюкоза є «фаворитним» джерелом карбону для усіх дріжджів, її сенсинг та пов'язаний сигнальний механізм у *Saccharomyces* можуть швидше виявитись власне «неконвенційними», чи більш спеціалізованими, у порівнянні з фактичною більшістю інших Кребтрі-негативних дріжджів, здатних до ферментації глюкози лише за анаеробних чи семі-анаеробних умов.

У цьому відношенні метилотрофні дріжджі, такі як використані у цій роботі *H. polymorpha* та *P. pastoris*, є інформативними та зручними моделями для вивчення молекулярних компонентів генетичного контролю карбонової катаболітної регуляції. Відповідні механізми можуть бути вивченими на цих моделях на рівнях як транскрипційної регуляції, тобто індукції чи репресії експресії генів, так і посттранляційному, скажімо глюкозної інактивації окремих

білків чи деградації цілих органел, прикладами якої є пексофагія чи мітофагія, включаючи також механізми сенсингу глюкози та передачі до мішеней регуляторного сигналу. Слід також підкреслити, що, з іншої сторони, метилотрофні дріжджі також є продуктом довготривалої еволюційної специфікації і також можуть виявляти специфічні для них особливості механізмів глюкозної регуляції.

Дана дисертаційна робота, не претендуючи на вичерпне дослідження усіх аспектів катаболітної регуляції у клітині дріжджів, тим не менше вперше описує ряд раніше невідомих елементів і висвітлює декілька цікавих прикладів щодо відмінностей генетичного контролю гомеостазу органел у відповідь на зміни екзогенних карбонових субстратів між метилотрофними дріжджами та традиційною моделлю *S. cerevisiae*.

Одним із прикладів є *H. polymorpha* Gcr1 транспортер-подібний білок, який, як ми припускаємо, може бути першим відомим прикладом глюкозного трансцептора (транспортуючого рецептора) у дріжджів. *HpGcr1* був початково ідентифікований як необхідний для глюкозної репресії пероксисомної алкогольоксидази, а відповідний мутант виявляв дефект транспорту глюкози [29]. Таким чином комплексний фенотип мутанта підкреслив питання необхідності розділення ролі сенсингу та транспорту глюкози у підтриманні довготривалого сигналу глюкозної репресії. Виявилось, що експресія самого гена *HpGCR1* підлягає глюкозній репресії, тобто має місце феномен авторегуляції. Окрім цього, введення специфічної «мутації сенсорів» Gcr1^{R203K} призводить до аберантного конститутивного сигналювання, а мутант $\Delta gcr1$ виявляє пошкоджений ріст у середовищі з метанолом (див. Табл. 3.1.1 щодо інших фенотипових ознак, пов'язаних із *gcr1* мутаціями). Нами висловлене припущення, що цей трансцептор може сигналювати про «відсутність глюкози» у середовищі без цього ростового субстрату, та транз'єнтно, тобто тимчасово, про «присутність глюкози» у середовищі з глюкозою. Ми також припускаємо, що другий «модифікований» тип сигналу є спряжений із транспортом глюкози, що здійснюється *HpGcr1*. Важливо відзначити, що хоча Gcr1-залежне сигналювання є важливим для швидкої

адаптації до глюкози, інші дані, отримані в експерименті з надекспресією *HpHXT1* підтримують пропозицію від групи проф. Т. Аламяе (університет Тарту, Естонія), згідно якої для підтримання довготривалого сигналу глюкозної репресії є необхідним фізіологічний рівень транспорту глюкози.

Інтригуючим фактом виявилась відсутність близьких гомологів *HpGcr1* у геномах більшості видів дріжджів, для яких вони встановлені та публічно доступні, за виключенням декількох нещодавно описаних видів, філогенетично близьких до *H. polymorpha*. У той же час, нещодавно описані численні високоафінні симпортери глюкози з грибів, зокрема порядку *Eurotiales*, виявили неочікувано високий рівень гомології до *HpGcr1*. У результаті детального філогенетичного аналізу, здійснення якого було ускладнене внаслідок відносно високої консервативності послідовностей усіх транспортерів гексоз, нам не вдалось отримати переконливу відповідь на запитання про еволюційне походження *HpGcr1* – шляхом специфічної селекції архаїчного гену у геномі *H. polymorpha* чи «нещодавнього» горизонтального переносу гену від грибів порядку *Eurotiales*. Теперішня робоча гіпотеза про те, що інтрогресія архаїчного предка гену *GCR1* відбулась у філогенетичній лінії, що веде до *H. polymorpha* мільйони років тому, але після розділення *Pezizomycotina* та *Saccharomycotina* [257], а також після відділення підлінії, що веде до *P. pastoris* (виду, що не містить *Gcr1*-подібного білка), повинна бути додатково проаналізована у майбутніх дослідженнях. Іншим питанням, яке повинно бути у них поставлене є чому *Gcr1* виявився настільки важливим для фізіології *H. polymorpha*? Скажімо, один із філогенетично близьких до метилорофів видів, *Dekkera bruxellensis* імовірно втратив свій *Gcr1*-подібний білок впродовж адаптації цього виду до умов аеробної ферментації, до речі опосередкованої відмінним, ніж *Saccharomyces* у еволюційним механізмом [488]. На жаль, нам не вдалось ефективно експресувати *HpGCR1* у гетерологічній системі *S. cerevisiae* з метою безпосередньої відповіді на запитання, чи є *HpGcr1* функціональним як транспортер гексоз. Однак, спостережені ефекти його надекспресії у власному хазяїні, тобто *H. polymorpha*, підтримують таку гіпотезу. З метою її підтвердження статусу *HpGcr1* як

трансцептора, наступним логічним кроком було б конструювання штаму *H. polymorpha*, позбавленому усіх можливих транспортерів гексоз та перевірка показників транспорту гексоз при надеспресії *HpGcr1* у такому штамі. З цією метою необхідно насамперед виділити та проаналізувати нокаутний мутант по гену *H. polymorpha HXT2* [347], також на основі описаного у цій роботі подвійного мутанта *gcr1hxs1*. Наш попередній аналіз ідентифікував також інші гени потенційних транспортерів гексоз у геномі *H. polymorpha*, однак усі вони виявляли певні точкові мутації у відомих консервативних доменах, що ставить під сумнів їх функціональність як транспортерів власне гексоз (неопубліковані дані). Запропоновані майбутні дослідження можуть бути також корисними з точки зору конструювання штаму Кребтрі-негативного хазяїна у дріжджів для функціональної характеристики рекомбінантних транспортерів гексоз з дріжджів не-сахароміцетів, або з точки зору покращення здатності до транспорту різних цукрів у штамів *H. polymorpha*, що використовуються для ферментації глюкози та ксилози.

Важливо, що багато фенотипових ознак мутантів *gcr1* вказують, що у сигналювання *HpGcr1* залучений РКА сигнальний каскад. Ця гіпотеза повинна бути перевірена шляхом ізолювання супресивних мутантів, наприклад шляхом випадкового інтегративного мутагенезу) на основі мутанта *gcr1(R165K)*, та ідентифікації відповідних пошкоджених генів. Ще іншою можливістю продовження роботи може бути перевірка чи котрийсь із найближчих *HpGcr1* гомологів із філаментних грибів може виконувати функції трансцептора глюкози у їх власних видах. Нещодавно опубліковані результати досліджень у базидіоміцета *Ustilago maydis* підтримують таку версію [27].

Нами також ідентифіковано у геномі *H. polymorpha* так званий «класичний» нетранспортуючий сенсор глюкози *Hxs1* (*HeXose Sensor*), що є необхідним для транскрипційної індукції у відповідь на гексози ще одного ідентифікованого нами гену, що кодує функціональний низькоафінний транспортер *Hxt1* (*HeXoseTransporter*). Вказуючи означення «класичний», ми підкреслюємо його структурну (напр. видовжений С-кінцевий цитоплазматичний «хвіст») та

функціональну (індукція регулярних транспортерів) подібність до добре відомих *S. cerevisiae* Snf3 та Rgt2-подібних сенсорів глюкози. Виходячи із сучасного знання, можна впевнено стверджувати, що усі дріжджі-аскомицети містять у своєму геномі такий сенсор, а деякі мають декілька спеціалізованих паралогів, що є наслідком генної дуплікації. Важлива функція *HpHxs1* полягає у сенсингу зовнішньоклітинних концентрацій глюкози і відповідному швидкому підлаштуванні клітинного репертуару функціональних транспортерів глюкози, згідно з їх афінністю до субстрату. Відомо, що для перенесення сигналу відповідні сенсори мають безпосередньо зв'язувати глюкозу, що стимулює конформаційні зміни молекули сенсора та активацію подальшого сигнального каскаду, який у *S. cerevisiae* включає катезініназу *Yck1*, білки *Mth1/Std1* транскрипційний фактор *Rgt1* [6], [489]. У метилотрофів, включаючи *H. polymorpha*, необхідно в'яснити, чи відповідні елементи також задіяні у передачі сигналу глюкози. Попередній аналіз на предмет присутності потенційних ортологів відповідних генів у геномі *H. polymorpha*, а також щодо присутності сайтів зв'язування для *Rgt1* у промоторі гену *HpHXT1* підтримують цю гіпотезу [25].

Наведені у даній роботі також свідчать, що *HpHxs1* не є безпосередньо задіяний у сигналюванні для глюкозної репресії. «Не безпосередньо» означає, що імовірно у всіх мутантів *H. polymorpha* із значним пошкодженням транспорту глюкози буде спостерігатись деяке пошкодження транз'єнтної чи навіть довготривалої глюкозної репресії (і відповідного сигналювання) внаслідок так званого ефекту «виключення ефектора». Отримані нами у *H. polymorpha* дані у комплексі свідчать, що такий ефект може мати місце оскільки «сила сигналу глюкозної репресії залежить від ефективності транспорту», і також, можливо, від рівноважної концентрації певних катаболітів глюкози, таких як глюкозо-6-фосфату та фруктозо-1,6-бісфосфату [29], [356], більш, ніж від сигнальної функції певних мембранних рецепторів, таких як *Gcr1* та *Hxs1*. Іншими словами, транспорт гексоз може бути основним та лімітуючим фактором для сигналювання для катаболітної репресії. На підтримку такого погляду слід зазначити, що усі

ізолювані нами шляхом Ф-мутагенезу оригінальні мутанти *H. polymorpha*, що виявляли дефекти глюкозної репресії, також характеризувались пошкодженням у різній ступені ростом у середовищі із глюкозою [150] та неопубліковані результати). Однак, наші дані по *Gcr1*, які повинні бути в подальшому підтвержені та розвинуті, свідчать, що такий сенсор може бути задіяний у трізієнтному сигналюванні глюкозної репресії. Ми, таким чином, пропонуємо, що транспорт гексоз є важливою, але не єдиною причиною, що впливає на тимчасове або «швидке» сигналювання глюкозної репресії у *H. polymorpha* [25], [30].

Важливо. Що нами також встановлено що *HpHxs1*, подібно до *HpGcr1*, не є необхідним для пексофагії [25], [29] тобто процесу карбонової катаболітно\інактивації. Це спостереження підтримує концепцію, згідно якої молекулярні триггерри (чи пускові сигнали) індукованої глюкозою пексофагії можуть головно залежати від гліколітиного метаболізму, а отже, і енергетичного статусу клітин, залежного також від транспорту джерела карбону та енергії [191], [221], а не мембранного сенсингу молекул гексоз як еффекторів сигналювання [96].

Підсумовуючи, результати щодо мутантів дріжджів із пошкодженням сенсингом глюкози, описані у даній роботі, свідчать, що і) єдиний нетранспортуючий сенсор *HpHxs1* бере участь у «класичному» механізмі сигналювання для транскрипційної індукції, ii) еволюційно унікальний для дріжджів *HpGcr1* потенційно може бути представником раніше невідомого типу сенсора глюкози – трансцептора, який відіграє сигнальну роль також за відсутності глюкози; iii) рівень транспорту глюкози є лімітуючим, але не єдиним, фактором для підтримання сигналу репресії у *H. polymorpha*.

У наступній частині даної дисертаційної роботи нами проаналізовано функціональну роль імовірних гомологів транскрипційних репресорів *S. cerevisiae* *Mig1/2* у *H. polymorpha* в механізмах вуглецевої катаболітної регуляції. Нами виявлено, що нокаут двох ідентифікованих гомологів *MIG1*- та *MIG2*-подібних генів лише частково пошкоджує катаболітну репресію пероксисомної алкогольоксидази (АОХ) цукрами чи етанолом. Однак, за присутності метанолу

відповідний дефект стає більш вираженим, особливо у подвійного мутанта $\Delta mig1 \Delta mig2$ (Рис. 3.2.3).

У *S. cerevisiae*, Mig1 у відповідь на присутність глюкози стимулює приєднання комплексу білків генерального репресора Tup1-Ssn6 до промоторів генів. Що репресуються глюкозою. ScMig1 (разом із своїм паралогом ScMig2) має більш селективну чи специфічну функцію у транскрипційній регуляції (для огляду: [392]), тоді як Tup1-Ssn6 має ширший спектр генів-мішеней. Таким чином, наші результати свідчать, що, щонайменше для АОХ, оперування класичного регуляторного шляху *S. cerevisiae* з Mig1/2-опосередкованим приєднанням Tup1-Ssn6 до промоторів регульованих генів є малоімовірним або не основним у *H. polymorpha*. Отже. Необхідні подальші дослідження спрямовані на встановлення ролі ідентифікованих *H. polymorpha* Mig1/2 гомологів в регуляції інших репресибельних генів, наприклад гену мальтази, регуляція якого була запропонована як залежна Mig-репресорів [394].

Інтригуючим було повідомлення від групи проф. М. Венхауза (Marten Veenhuis) з університету м. Грьонінген, Нідерланди, що дефіцит *HpTup1* – партнера Mig1/2 білків у репресії, призводив до пошкодження індукованої глюкозою чи етанолом макропексофагії у *H. polymorpha* [152]. Нами ж було спостережено, що фенотип скоструйованого *H. polymorpha mig1mig2* подвійного делеційного мутанта характеризується домінантною роллю мікропексофагії як типу деградації пероксисом [153]. Наші дані також вказують, що фенотипи мутантів *H. polymorpha tup1* та подвійного *mig1mig2* щодо пексофагії не є ідентичними, оскільки у останнього, подібно до відомого мутанта *H. polymorpha atg25* [219], відбувається конститутивна мікропексофагія на фоні блоку макропексофагії (див. також Розділ 1.3. щодо функціональних типів пексофагії у метилотрофів). Нами відповідно висловлене припущення, що синтез певних специфічних для макропексофагії компонентів, є пригніченим за відсутності Mig1/2 репресорів і, таким чином, ці репресори можуть бути позитивними регуляторами макропексофагії у *H. polymorpha*. Додаткові дослідження є очевидно необхідними для перевірки цієї гіпотези. Загалом отримані дані

свідчать, що гомологи основного шляху глюкозної репресії (білки Mig і Tup1) мають відмінні від *S. cerevisiae* та специфічні функції у *H. polymorpha*. Слід підкреслити, що необхідні додаткові дослідження на інших дріжджових моделях, перш ніж формулювати висновки, наскільки широко розповсюдженою є така різниця у механізмі передачі сигналу вуглецевої катаболітної репресії між *Saccharomycetaceae* та іншими групами дріжджів.

У цій роботі також описано ідентифікацію імовірних ортологів транскрипційного фактора *Har4* *S. cerevisiae* у *H. polymorpha*, на основі подібності коротких послідовностей їх ДНК-зв'язуючих доменів. Відповідна робота була виконана у співпраці із лабораторією Проф. Болотін-Фукухара (Орсей, Франція). Виявилось, що геном *H. polymorpha* містить два *HAR4*-подібні гени, що кодують білки названі відповідно *HpHar4-A* та *HpHar4-B*, де останній також містить додатковий функціональний домен *b-Zip* мотиву, подібний до відмінного транскрипційного фактора *ScYap1*. У пекарських дріжджів єдиний фактор транскрипції *Har4* є задіяний в основному у регуляції балансу між ферментацією та диханням, тоді як у *H. polymorpha* два паралоги *Har4* білка мають не взаємодоповнюючі а радше спеціалізовані функції. Делеції відповідних генів виявили, що *HpHar4-A*, подібно до *ScHar4*, бере участь у контролі окислювального та ферментативного метаболізму, тоді як *HpHar4-B* є задіяний, подібно до *ScYap1* у регуляції відповіді на оксидативний стрес.

Додатково і досить неочікувано, *HpHar4-A* (але не *HpHar4-B*) виявився залученим у глюкозну репресію: мутація *Δhar4-A* викликала резистентний до 2-дезоксиглюкози ріст у середовищі з метанолом. Яким саме чином *HpHar4-A* бере участь у глюкозній репресії повинно бути експериментально встановлено у наступних дослідженнях. Також нами встановлено, що жоден із *H. polymorpha* *Har4* паралогів не бере участі у пексофагії або у регуляції росту на глюконеогенетичних субстратах. Таким чином усі отримані дані свідчать, що функція *Har4*-подібних транскрипційних регуляторів у Кребтрі-негативних дріжджів *H. polymorpha* є досить відмінною від відомої досі у *S. cerevisiae*.

Автофагійна деградація пероксисом, чи пексофагія, є одним із високоселективних автофагійних процесів, молекулярні механізми якого, особливо ті, що забезпечують селективність, були маловідомими на момент початку виконання цієї дисертаційної роботи. На основі метилотрофних дріжджів *P. pastoris*, унікальної моделі що виявляє два морфологічно-відмінних та залежних від специфічного субстрату-індуктора типи пексофагії, ми ідентифікували декілька раніше невідомих генів пексофагії. Серед них: *VPS15* (раніше відомий лише як ген, що бере участь у сортируванні білків до вакуоль), *ATG26* та *ATG28* (два останніх були клоновані шляхом функціональної комплементачії УФ-індукованих мутантів з виділеної нами колекції). Для клонування генів нами було успішно адаптовано та доопрацьовано метод, що базується на використанні алілового спирту як селективного агента. У продовження цих досліджень, продукт нового гена пексофагії *ATG35* був ідентифікований як *Atg28*-взаємодіючий партнер у дріжджовій двогибридній системі (В. Назарко та А.А. Сибірний). Було продемонстровано, що продукти генів *VPS15*, *ATG26*, *ATG28* та *ATG35* є задіяними на різних стадіях процесу пексофагії, як коротко деталізовано нижче. Потрібно підкреслити, що наші дані надають початковий, але необхідний базис для наступної детальної характеристики цих нових генів та їх білкових продуктів з метою розшифрування молекулярних механізмів пексофагії.

PpVps15 було ідентифіковано дякуючи випадку у складі однієї із ізольованих раніше плазмід у групі проф. Джеймса Крегга (тоді в Орегонському інституті вищих студій, США), як сусіднього до одного із нових *PEX* генів біогенезу пероксисом. Ідея роботи надійшла від групи проф. М. Венхауза (Гронінген, Нідерланди) після ідентифікації ними гену пексофагії *PDD1* у *H. polymorpha* як гомологічного до *S. cerevisiae VPS34* [399]. *S. cerevisiae Vps15* був відомий як активатор *ScVps34* [402], [403], відповідний консервативний комплекс був знайдений у інших видів дріжджів і, таким чином, міг бути прогнозований і для метилотрофів [434]. Наслідком пошкодження одного із *ScVPS34* чи *ScVPS15* генів є комплексний фенотип, що включає температуро-

чутливий ріст, дефекти осморегуляції, ендоцитозу, сегрегації вакуоль та міссортинг вакуолярних гідролаз [401]. Наші дані свідчать на підтримку гіпотези, що подібний до *S. cerevisiae* Vps15/Vps34 (серин/треонін/фосфатидилінозитол кіназний) білковий комплекс є задіяним у регуляції селективної деградації пероксисом у *P. pastoris*. Його функції у таких різноманітних процесах як ендоцитоз, сортинг вакуолярних білків та пексофагія підкреслюють важливість фосфорилбованого фосфатидилінозитулу (PtdIns-3-P) у різних пов'язаних із мембранами клітинних процесах.

Нами встановлено, що *PpVps15* є необхідним для початкового а не пізнішого, пов'язаного із міссортингом протеаз, етапу деградації пероксисом у обидвох процесах мікро- та макропексофагії. Резонним поясненням цього спостереження є роль PtdIns-3-P фосфорильованого комплексом Vps15/Vps34 у міченні пероксисом для доставки у автофагійні вакуолі, як схематично зображено на Рис. 3.3.26.

У цій роботі ми також описуємо ідентифікацію раніше невідомого гену пексофагії, названого *P. pastoris ATG28*, що був клонований шляхом функціональної комплементачії банком генів *P. pastoris* одного із ізольованих нами мутантів, що належав до комплементачійної групи *pdg2* (*peroxisome degradation*). Важливо відзначити, що успішне виконання цього фрагменту роботи відбулась завдяки вдалій адаптації селекції на основі алілового спирту, розробленої для відбору *perx* мутантів (*peroxisome biogenesis*) для клонування та збагачення *ATG* генів (див. підрозділ 3.3.2, а також [25]). Без такого методу, інші дослідницькі групи не могли завершити генетичне вивчення точкових *atg* мутантів та вдались до методів інтегративного мутагенезу для селекції генів пексофагії. По друге, під час клонування генів пексофагії нами було звернуто особливу увагу на ті виділені *pdg* мутанти з нашої колекції, що не виявляли явних дефектів у загальній неселективній автофагії, індукованій голодуванням за джерелом азоту. Таким чином, ми зконцентрувались на характеристизації потенційно специфічних для селективної пексофагії генів. Слід зазначити, що пізніше [225] встановили, що *P. pastoris Atg28* є суміжним до корового (основного) механізму

автофагії елементом, який не є строго необхідним для різних пов'язаних АТГ шляхів (загальної автофагії, пексофагії, та CVT шляху). Зокрема у процесі мікропексофагії Atg28 виявився необхідним для формування так-званого мікропексофагійного апарату (МІРА) [225]. Нами також виявлено, що індукована етанолом макропексофагія у *atg28* мутанта є пошкодженою на стадії, що слідує після формування автофагійних мембран, що оточують індивідуальні пероксисоми.

Ідентифікація гену *ATG28* становила особливий інтерес ще й тому, що цей ген початково виглядав як унікальний для *P. pastoris*. У процесі виконання роботи та розширення баз даних геномів ми ідентифікували імовірні *ATG28* гомологи у інших дріжджів, що виявляли обмежену подібність у сегменті функціонально-важливих coiled-coil доменів, включаючи відповідник у *H. polymorpha*. Необхідно експериментально перевірити, чи потенційний *PpAtg28* гомолог у *H. polymorpha* є також задіяний у пексофагії. Було також запропоновано, що у *S. cerevisiae* та ряду інших видів білок Asr1 є функціональним відповідником Atg28 (29). Нами також запропоновано, що coiled-coil домен Atg28 (Рис. 3.3.8 В) є задіяним у формуванні поки невідомих білкових комплексів, важливих для пексофагії. Дійсно, у подальших дослідженнях нам вдалось ідентифікувати одного із взаємодіючих із *PpAtg28* партнерів, раніше невідомий білок Atg35, методом дріжджового двохгібридного аналізу (two-hybrid assay), як специфічно необхідний для індукованої глюкозою мікропексофагії (29). І делеція і надекспресія гену *ATG35* *P. pastoris* специфічно пошкоджували формування структури МІРА, але не специфічних для макропексофагії пексофагосом but. Таким чином, існування Atg35 стало безпосереднім генетичним доказом відмінностей молекулярних механізмів, відповідальних за формування мембранних структур, відповідальних за різні типи пексофагії у *P. pastoris*.

Спостережена нами комплексна внутрішньоклітинна локалізація химерного білка Atg28-GFP (Рис. 3.3.14) з високою імовірністю свідчить про те, що функція Atg28 у пексофагії може полягати у його залученні до специфічної перивакуолярної структури та її взаємодії з вакуолярними мембранами і ,

можливо, пероксисомами. Отримані у співпраці із групою проф. С.Субрамані (Університет Сан-Дієго, США) дані також свідчать, що деякі із Atg28-вмісних мембранних структур відповідають PAS (preautophagosomal structure), на яких Atg28 солокалізується із білком *P. pastoris* Atg17, – припущення, що знайшло підтвердження у наступних дослідженнях (29).

На противагу, інший новий ген пексофагії у *P. pastoris*, *ATG26*, клонований нами методом функціональної комплементачії *pdg3* мутанта за ознакою резистентності до алілового спирту, виявився консервативним у дріжджів. Відповідний білок-фермент має чітко визначену ензиматичну активність УДФ-глюкозилтрансферази, продуктом якої є специфічний для мембран грибів ергостеролглюкозид (SG). Нами продемонстровано, що УДФ-глюкозилтрансферазна активність, а отже вміст ергостеролглюкозиду, у певних клітинних мембранах є специфічно необхідними для обох типів селективної пексофагії у *P. pastoris*, але не для загальної автофагії. Групою проф. Сакаї (Університет Кіото, Японія), яка незалежно виділила відповідний ген, було показано, що під час індукції мікропексофагії Atg26 локалізується до вакуолярних мембран, асоційованих зі структурою МІРА [207]. Несподівано, макропексофагія виявилась пошкодженою у *atg26* мутантів на етапі формування додаткових шарів мембран, що оточують індивідуальні пероксисоми. Нами висловлено гіпотезу, що ці додаткові мембрани формуються *de novo* шляхом об'єднання, для чого потрібним є високий SG.

Також було встановлено, що окрім пошкодженої пексофагії *atg26* мутант виявляв дефект у стійкості до підвищеного рН та підвищених концентрацій етанолу у порівнянні зі штамом дикого типу [208]. Згідно із цими спостереженнями, SG імовірно акумулюється у клітинах *P. pastoris* за стресових умов. Таких як шок рН або надлишок етанолу [430]. Таким чином, дефіцит SG у клітині імовірно впливає на декілька мембранних процесів, залежних від вакуоль, включаючи пексофагію.

Цікавим з цього приводу є той факт, що *P. pastoris* характеризується відносно високим порівнюючи з іншими видами дріжджів, напр. *S. cerevisiae*,

рівнем SG [429]. У той же час невідомо, чи стеролглюкозилтрансфераза та SG є необхідними для пексофагії у *S. cerevisiae*. Разом з тим, було показано, що делеція гену *ATG26* не впливала на пексофагію у алкан-утилізуючих дріжджів рехорфагу *Y. lipolytica* [208], але відповідний мутант метилотрофів *H. polymorpha* виявляв частково пошкоджену деградацію пероксисом [439]. Таким чином, подальші дослідження є необхідними для встановлення взаємозв'язку між клітинним рівнем SG та його важливістю для різних асоційованих із мембранами процесів у різних видів дріжджів. Функціональна важливість *Atg26* для пексофагії у метилотрофів може бути виявом адаптації цього процесу до значних розмірів органел та їх активної проліферації при індукції метанолом. Цікаво, що ця ідея знайшла своє підтвердження у наступних дослідженнях [209], які виявили, що *PpAtg26* є лише частково необхідним для макропексофагії олеат- чи метаноламін-індукованих пероксисом, які є хоча багаточисельними, але значно меншими за розміром відносно метанол-індукованих органел.

У Розділі 3.4 ми описуємо новий білок-пероксин *Pdg1/Pex36* у *P. pastoris* та *H. polymorpha* як білок пероксисомних мембран (PMP), який виявляє лише обмежену функціональну подібність до білків *Pex16* людини та *S. cerevisiae* *Pex34*. *PpPEX36* було клоновано подібно до вище охарактеризованих *ATG* генів шляхом функціональної комплементатії мутанта *pdg1*, який виявляв часткові але помітно виражені дефекти у процесах біогенезу пероксисом (та відповідно метилотрофного росту) та їх деградації [129].

PpPex36 виявився не строго необхідним для проліферації пероксисом, але, у комбінації із пошкодженням іншого подібного пероксину із комплементарною функцією, *Pex25*, мутації *Pex36* призводять до повного блоку біогенезу пероксисом у *P. pastoris* [218]. Також спостережено, що клітини з іннактивованим *Pex36* виявляють дефекти у пероксисомному таргетингу PTS1-, PTS2- та mPTS-залежних білків та містять органели зменшеного розміру та із видозміненою морфологією. Нами також запропоновано, що білок *S. cerevisiae* із невідомою функцією *Ycl056c* (ідентифікований пізніше як *Pex34* [442]), є потенційним структурним гомологом *PpPex36*. І дійсно, пізніше було показано, часткові дефекти біогенезу пероксисом

та метилотрофного росту у клітинах *P. pastoris pex36* можуть бути функціонально комплементовані при надекспресії *Y. lipolytica Pex16* (Stasyk et al., unpublished), *Pex16* з *H. sapiens* або *Pex34 S. cerevisiae* [218]. Також запропоновано, що *Pex36* та *Pex16* можуть мати подібні функції у механізмі біогенезу пероксисом, оскільки було спостережено, що відповідник *PpPex36* знаходиться у геномах декількох споріднених із *P. pastoris Saccharomycetaceae* дріжджів з родів *Komagataella*, *Ogataea* та *Candida*, але є цілковито відсутній у тих видів, де ідентифікується пероксин *Pex16* (напр. *Y. lipolytica*), а також у вищих еукаріотів. Важливо відзначити, що у групі проф. С. Субрамані було нещодавно продемонстровано, що продукція *PpPEX36* у клітинах людських фібробластів GM06231 з дефектним геном *PEX16* призводила до відновлення імпорту-компетентних пероксисом, що свідчить на користь твердження, що *PpPex36* є консервативним функціональним відповідником продукту гену *PEX16* багатоклітинних організмів. Однак, оверекспресія жодного із запропонованих функціональних гомологів *PpPex36*, а саме *ScPex34*, *YlPex16*, та *HsPEX16* не комплементувала дефекти подвійного мутанта по генах *PEX25* та *PEX36* у *P. pastoris*, таким чином вказуючи, що *Pex36* має додаткові спеціалізовані функції, які відсутні у кожного запропонованого індивідуального функціонального гомолога. Беручи до уваги відсутність адекватної гомології первинної амінокислотної послідовності, ці відмінності привели до надання нового імені оригінально виділеному нами гену *PDG1* [268], як нового пероксина *PEX36* [218].

Спостережена нами участь ново-ідентифікованого пероксину *Pex36* у пексофагії може бути прямою чи опосередкованою, внаслідок численних змін у спектрі пероксисомних мембранних білків (PMPs). Нами висунуто гіпотезу, згідно із якою, оскільки розмір та кількість пероксисом є зміненими у клітинах мутанта *Δpex36*, це специфічним чином інтерферує із процесом макропексофагії. Пізніше ще один цікавий факт було встановлено, що делеція *PEX36* гену помірно індукує пексофагію за умов індукції проліферації органел [218]. Важливо відзначити, що подібний феномен був нещодавно описаний також для інших пероксинів, напр. *Pex1* та *Pex6*, які таким чином виявились негативними регуляторними факторами для

пексофагії [446]. Однак, яким власне чином Pex36 впливає на автофагію залишається невиясненим, у першу чергу тому, що локалізація та кількість багатьох пероксинів є зміненою у клітинах $\Delta pex36$. Також висловлено ідею про безпосередню участь білка Pex36 у механізмі пексофагії, що опосередковується його С-кінцевим доменом, ідентифікованим нами як функціонально важливий при аналізі функціональної комплементції труктованими формами PpPex36 (Рис. 3.4.14). Альтернативною опцією може розглядатись ефект делеції PEX36 у вигляді часткової міслокалізації пероксисомної ензиматично-активної АОХ, що у свою чергу перешкоджає її фізіологічній деградації за умов індукції пексофагії. На підтримку цієї гіпотези, у сконструйованого та охарактеризованого нами мутанта *H. polymorpha* з пошкодженим потенційним гомологом Pex36, дефект біогенезу пероксисом був менш вираженим, тоді як дефект пексофагії був добре помітним. Слід зазначити, що у клітинах *H. polymorpha* міслокалізована АОХ, на відміну від *P. pastoris*, залешається здебільшого активною [490]. Для глибшого розуміння ролі Pex36 у пексофагії дві вище наведені гіпотези повинні бути додатково експериментально проаналізовані.

Додатково, на основі отриманих даних нами запропоновано, що *P. pastoris* Pex36 може бути об'єктом раніше невідомого механізму ретроградного транспорту мембранних білків (PMPs) від пероксисом до ендоплазматичного ретикулуму (peroxisome-to-ER transport). Зокрема, у біохімічних експериментах (Рис. 3.4.17) нами встановлено, і пізніше підтверджено за допомогою флуоресцентної мікроскопії, що Pex36 і, частково PMP Pex3 не підлягають автофагійній деградації у складі пероксисом, оскільки переносяться з пероксисомних мембран до мембранних везикул невідомої природи, які є присутніми у клітинах *P. pastoris* щонайменше впродовж 8-ми годин після індукції мікропексофагії глюкозою. Такі везикули спочатку колокалізуються із вакуолярними мембранами, а пізніше з цитозольними структурами, імовірно ER. Згідно з даними літератури, відповідна реалокція PMP під час пексофагії не була відома чи раніше експериментально встановлена і відповідний механізм може бути фізіологічно важливим. Ми припускаємо, що під час пексофагії, деякі PMPs можуть підлягати «порятунку» та селективному видаленню з пероксисомних мембран з метою формування пре-

пероксисомних везикул, які пізніше можуть бути швидко реутилізовані клітинами у випадку, коли новий раунд швидкої індукції проліферації пероксисом є необхідним за умов швидких змін наявних джерел Карбону. У цьому аспекті було б цікавим подальше дослідження долі спостережених Pex36-Pex3-вмісних тілець, і чи вони дійсно остаточно колокалізуються із ER на завершальному етапі пексофагії. Якщо так, тоді відповідні спостереження свідчили б на користь існування селективного ретроградного (зворотнього) транспорту важливих білків або їх комплексів від пероксисом до ER при пексофагії.

У цій дисертаційній роботі ми також описуємо результати експериментальної роботи оригінально спрямованої на встановлення можливої ролі двох взаємодіючих консервативних білків-пероксинів АТФ-аз (AAA ATPases) Pex1 та Pex6 у регуляції автофагії. Обґрунтуванням цих експериментів було раніше спостереження про вилучення білка РМР Pex14 із пероксисомних мембран як маркера та умови їх наступної деградації [216]. Важливо також відзначити, що мутації, які пошкоджують гени *PEX1* та *PEX6* людей є однією із найбільш поширених причин так-званих синдромів, пов'язаних із біогенезом пероксисом (peroxisome biogenesis disorders, PBD).

За допомогою вторинного УФ-мутагенезу одного із *H. polymorpha pex6* УФ-індукованих мутантів нам вдалось ізолювати єдиний кондиційний холодочутливий мутант *cs pex6*, що характеризується відновленим ростом на метанолі при 37⁰С (пермісивній температурі), але не при 28⁰С (рестриктивній температурі). Нами було також ідентифіковано дві точкові мутації у *PEX6* гені, що викликали відповідні фенотипи. Точкова заміна консервативного амінокислотного залишку у першому трансмембранному модулі Pex6 білка (G737E) виявилась відповідальною за фенотип вихідного *pex6* алелю, тоді як додаткова інтрагенна амінокислотна заміна R1000G у другому AAA-модулі білка викликала похідний температуро-чутливий фенотип (Рис. 3.4.33). Нами також встановлено, що вторинна мутація R1000G функціонально виявлялась лише на фоні першої G737E, оскільки окремо не впливала на метилотрофний ріст. Відповідно, нами запропоновано, що ця вторинна мутація імовірно пошкоджує інтра- або інтермолекулярні взаємодії двох AAA доменів білка

Pex6 protein, або навіть міжбілкову взаємодію Pex6/Pex1, яка є необхідною для біогенезу пероксисом. Було б цікаво проаналізувати, чи деякі подібні до описаних нами мутацій є причиною відомих випадків хвороби у пацієнтів із PBD. У цьому плані, потрібно зазначити, що більшість міссенс мутацій у генах людини *HsPEX6* та *HsPEX1* фактично пошкоджують взаємодію їх білкових продуктів [444], [491]. До речі досить неочікувано електронно-мікроскопічний аналіз виявив морфологічно-видимі пероксисоми у клітинах мутанта *cspe6b* за обидвох пермісивної та рестриктивної температур. Таким чином, органели у штама-мутанта виявилися дефективними за однією із їхніх фізіологічних функцій при рестриктивній температурі, вказуючи на комплексну та не до кінця зрозумілу роль пероксину Pex6 у їх біогенезі.

Важливо відзначити, що процес пексофагії у досліджуваного *cspe6b* мутанта не зазнав помітних пошкоджень при рестриктивній та пермісивній температурах, що відповідає відсутності або негативній ролі Pex6 у пексофагії. При цьому у наступних дослідженнях інших авторів було показано, що людський білок Pex6 імовірно дійсно відіграє неочікувану роль як негативний регулятор пексофагії [451]. Було навіть запропоновано, що значний відсоток випадків PBD внаслідок *PEX6* мутацій насправді є наслідком конститутивно-підвищеної пексофагії, а не дефектів біогенезу пероксисом *per se* [446]. Нами зроблено висновок, щомутанти дріжджів, зокерма по гену *PEX6*, включаючи відповідники відомих мутацій у людини, можуть бути зручною інформативною моделлю для досліджень процесів гомеостазу пероксисом.

У заключному Розділі 3.5. ми описуємо виділення та використання мутантів *H. polymorpha* з пошкодженою глюкозною репресією, означених як ЕАО (*Elevated Alcohol Oxidase*), як платформи для продукції гетерологічних білків. Дефект глюкозної катаболітної репресії промотора гену алкогольоксидази (P_{AOX}), під контролем якого здійснюється експресія декількох модельних білків у відповідних мутантів, спричинений пошкодженням *HpGCR1* гену, що кодує потенційний странсцептор глюкози (див. Розділ 3.1), а також вторинними поки мутаціями, які поки не вдалось ідентифікувати. ЕАО мутанти виявляли

виражений дефект регуляції P_{AOX} лише гексозами (а також ксилозою), але не дисахаридами чи етанолом.

З ЕАО мутантами як штамми-господарями нами було розроблено модифіковану платформу експресії білків, яка використовує зручні субстрати-цукри для нарощування біомаси (сахароза) та індукції процесу експресії цільового білкового продукту (глюкоза або ксилоза). Слід зазначити, що необхідність використання метанолу для максимальної індукції P_{AOX} при масштабному виробництві вважається значним недоліком, оскільки ця сполука є токсичною та легкозаймистою, а також вимагає значної аерації. З ЕАО штамми-продуцентами нами продемонстровано ефективну регульовану дешевими вуглецевими субстратами експресію трьох відмінних за характеристиками рекомбінантних білків: секретованої глюкозооксидази гриба *A. niger*, секретованого мініпроінсуліну людини та внутрішньоклітинного поверхневого антигену вірусу гепатиту-В (HBsAg).

Також, з метою ефективного підвищення продуктивності синтезу рекомбінантних білків було розроблено нові підходи до мультикопійної інтеграції векторів експресії у геном *H. polymorph*. Нова платформа базувалась на селективних маркерних генах дріжджів, гетерологічному *ADE1 P. pastoris* та власному гені *FLD1 H. polymorpha*, та не включала потенційно екологічно небезпечні гени стійкості до антибіотиків. При цьому слід зауважити, що найбільш ефективною серед перевірених нами в рамках цієї роботи комбінацією селективних маркерів для мультикопійної інтеграції виявилась основана на *P. pastoris ADE1* гені під власним вкороченим промотором і відомому раніше гетерологічному *S. cerevisiae URA3* гені. Зокрема, послідовне використання двох зазначених маркерів селекції дозволило виділити стабільні надпродуцент HBsAg, геном якого містив біля 30 інтегрованих касет експресії.

Цікаво, що делеція гену *PEX3*, яка повністю виключає біогенез пероксисом, неочікувано призвела до суттєвого підвищення синтезу HBsAg в продуцента ЕАО (до 8% загального клітинного білка). Таким чином, ці дані ставлять питання про реальну природу внутрішньоклітинних мембран дріжджових продуцентів, до яких асоціюються гідрофобні псевдовірусні частинки HbsAg, які очевидно не пов'язані

із пероксисомами. Нами також встановлено, що пентоза ксилоза, яка на відміну від штаму дикого типу не репресує до певної міри промотор P_{AOX} у мутантних штамів-продуцентів, може бути кращим субстратом для ефективної експресії. Ця пентоза забезпечує повільніший ріст, який впродовж фази індукції ферментації може надавати переваги для синтезу певних рекомбінантних білків за аналогією із штамми $Mut^S P. pastoris$ [477]. Нещодавно було запропоноване нове пояснення цього ефекту ксилози як ростового субстрату, пов'язане із інгібуванням процесу відповіді на місфолдинг білків (unfolded protein response, UPR) за певних умов, коли фізіологічний рівень росту біомаси не досягається завдяки певним умовам культивування, чи специфічним мутаціям у геномі штама-продуцента [492].

Таким чином, нами розроблено модифіковану платформу експресії білків, що базується на мутантах із пошкодженою глюкозною репресією, яка зберігає переваги регульованого вуглецевими P_{AOX} без потреби метанолу для його індукції, і таким чином може виступати зручною альтернативою до класичної платформи експресії у *H. polymorpha*. Слід підкреслити, що запропонована система дозволяє ефективно розділення фаз росту біомаси та індукції експресії білкового продукту у так-званому двохфазовому ферментаційному каскаді. Така особливість є важливою для синтезу деяких рекомбінантного білків, що є токсичними для організму-господаря за умов надекспресії, скажімо HBsAg.

Підсумовуючи, у роботі показано, що мутанти з пошкодженою фізіологічною катаболітною регуляцією карбоновими субстратами, або зі зміненим гомеостазом пероксисом можуть слугувати альтернативною платформою для експресії рекомбінантних білків, а також інших біотехнологічних процесів, таких як ферментація сумішей карбонових субстратів. Відповідні мутантні моделі можуть також бути використані для розшифрування молекулярних механізмів, задіяних у певних спадкових синдромах людини, зокрема PBD, злоякісного переродження клітин, глюкозної регуляції загалом та інших, які можливо не можуть зараз бути передбаченими. Ми вважаємо, таким чином, що ця дисертаційна робота послугує однією із корисних опорних цеглин, що підтримують поступальний ріст будівлі нашого знання.

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 цієї 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] S. Shashkova, N. Welkenhuysen, and S. Hohmann, "Molecular communication: Crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways," *Curr Genet*, vol. 15, no. 4. 2015, p. fov026.
- [2] A. A. Sibirny, "Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities.," *FEMS Yeast Res*, vol. 16, no. 4, p. fow038, Jun. 2016.
- [3] O. Stasyk, "Methylotrophic yeasts as producers of recombinant proteins," in *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, 2017.
- [4] T. Pfeiffer and A. Morley, "An evolutionary perspective on the Crabtree effect," *Front. Mol. Biosci*, vol. 1, Oct. 2014.
- [5] F. Rolland, J. Winderickx, and J. M. Thevelein, "Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast," *FEMS Yeast Res*, vol. 2, no. 2, pp. 183–201, 2002.
- [6] A. Kaniak, Z. Xue, D. Macool, J.-H. H. Kim, and M. Johnston, "Regulatory Network Connecting Two Glucose Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*," *Eukaryot. Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 221–31, Feb. 2004.
- [7] M. Johnston and J.-H. Kim, "Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. Soc. Trans*, vol. 33, no. Pt 1, pp. 247–52, Feb. 2005.
- [8] K. Hedbacker and M. Carlson, "SNF1/AMPK pathways in yeast," *Front. Biosci*, vol. 13, pp. 2408–20, Jan. 2009.
- [9] Ö. Kayikci and J. Nielsen, "Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res*, vol. 15, no. 6, p. fov068, Sep. 2015.
- [10] P. Coccetti, R. Nicastro, and F. Tripodi, "Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microb. Cell*, vol. 5, no. 11, pp. 482–494, Nov. 2018.
- [11] J. M. M. Thevelein *et al*, "Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast," *Biochem. Soc. Trans*, vol. 33, no. 0300-5127,

- pp. 253–256, Feb. 2005.
- [12] M. Conrad, J. Schothorst, H. N. Kankipati, G. Van Zeebroeck, M. Rubio-Teixeira, and J. M. Thevelein, “Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Microbiology Reviews*. 2014.
- [13] M. P. Ashe, S. K. De Long, and A. B. Sachs, “Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 833–48, Mar. 2000.
- [14] L. G. M. M. Boender *et al*, “Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1813, no. 12, pp. 2133–44, Dec. 2011.
- [15] Y. Chen and J. Nielsen, “Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks,” *BioMed Research International*, vol. 24, no. 6. 2013, pp. 965–972.
- [16] Z. Dai, Y. Liu, J. Guo, L. Huang, and X. Zhang, “Yeast synthetic biology for high-value metabolites, *BioMed Research International*,” vol. 15, no. 1. 2015.
- [17] S. Ozcan and M. Johnston, “Function and regulation of yeast hexose transporters,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, vol. 63, no. 3, pp. 554–69, Sep. 1999.
- [18] J. Horák, “Regulations of sugar transporters: insights from yeast,” *Current Genetics*, vol. 59, no. 1–2, pp. 1–31, 01-May-2013.
- [19] E. Boles and C. P. Hollenberg, “The molecular genetics of hexose transport in yeasts,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 21, no. 1. pp. 85–111, 1997.
- [20] S. Özcan, J. Dover, and M. Johnston, “Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *EMBO J*, vol. 17, no. 9, pp. 2566–2573, 1998.
- [21] R. Wiczorke, S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg, and E. Boles, “Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEBS Lett*, vol. 464, no. 3, pp.

- 123–128, Dec. 1999.
- [22] S. Ozcan *et al*, “Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, vol. 93, no. 22, pp. 12428–12432, Oct. 1996.
- [23] S. Betina, P. Goffrini, I. Ferrero, and M. Wésolowski-Louvel, “RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*,” *Genetics*, vol. 158, no. 2, pp. 541–548, 2001.
- [24] V. Brown, J. A. Sexton, and M. Johnston, “A Glucose Sensor in *Candida albicans*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 5, no. 10, pp. 1726–1737, Oct. 2006.
- [25] O. G. Stasyk, M. M. Maidan, O. V. Stasyk, P. Van Dijck, J. M. Thevelein, and A. A. Sibirny, “Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 7, no. 4, 2008.
- [26] A. S. Polupanov, V. Y. Nazarko, and A. A. Sibirny, “Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression,” *Int. J. Biochem. Cell Biol*, vol. 44, no. 11, pp. 1906–1918, Nov. 2012.
- [27] D. Schuler *et al*, “Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*,” *New Phytol*, vol. 206, no. 3, pp. 1086–1100, May 2015.
- [28] B. Wang, J. Li, J. Gao, P. Cai, X. Han, and C. Tian, “Identification and characterization of the glucose dual-affinity transport system in *Neurospora crassa*: Pleiotropic roles in nutrient transport, signaling, and carbon catabolite repression,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, 2017.
- [29] O. V. Stasyk, O. G. Stasyk, J. Komduur, M. Veenhuis, J. M. Cregg, and A. A. Sibirny, “A Hexose Transporter Homologue Controls Glucose Repression in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*,” *J. Biol. Chem*, vol. 279, no. 9, 2004.

- [30] O. G. Stasyk *et al*, “Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1,” *Int. J. Biochem. Cell Biol*, vol. 103, pp. 25–34, Oct. 2018.
- [31] S. Özcan and S. Ozcan, “Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose,” *J. Biol. Chem*, vol. 277, no. 49, pp. 46993–7, Dec. 2002.
- [32] J. L. Galazzo and J. E. Bailey, “Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*,” *Enzyme Microb. Technol*, vol. 12, no. 3, pp. 162–172, Mar. 1990.
- [33] M. C. Schmidt *et al*, “Grl1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 19, no. 7, pp. 4561–71, Jul. 1999.
- [34] H. Moriya and M. Johnston, “Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I,” *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 101, no. 6, pp. 1572–1577, Feb. 2004.
- [35] S. Pasula, S. Chakraborty, J. H. Choi, and J.-H. H. Kim, “Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast,” *BMC Cell Biol*, vol. 11, no. 1, p. 17, Mar. 2010.
- [36] C. Snowdon and M. Johnston, “A novel role for yeast casein kinases in glucose sensing and signaling,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 21, pp. 3369–3375, Nov. 2016.
- [37] K. M. Flick *et al*, “Grr1-dependent Inactivation of Mth1 Mediates Glucose-induced Dissociation of Rgt1 from HXT Gene Promoters,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. 8, pp. 3230–41, Aug. 2003.
- [38] N. Spielewoy, K. Flick, T. I. Kalashnikova, J. R. Walker, and C. Wittenberg, “Regulation and Recognition of SCFGrr1 Targets in the Glucose and Amino Acid Signaling Pathways,” *Mol. Cell. Biol*, 2004.
- [39] J.-H. H. Kim and M. Johnston, “Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1

- to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 36, pp. 26144–26149, Sep. 2006.
- [40] A. Palomino, P. Herrero, and F. Moreno, “Fpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 5, pp. 1427–38, Mar. 2006.
- [41] A. Roy, Y.-B. B. Kim, K. H. Cho, and J.-H. H. Kim, “Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 9, pp. 2878–2885, Sep. 2014.
- [42] J. A. Polish, J.-H. H. Kim, and M. Johnston, “How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose,” *Genetics*, vol. 169, no. 2, pp. 583–594, Feb. 2005.
- [43] O. Vincent, R. Townley, S. Kuchin, and M. Carlson, “Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism,” *Genes Dev.*, vol. 15, no. 9, pp. 1104–1114, May 2001.
- [44] J. Lakshmanan, A. L. Mosley, S. Özcan, and S. Ozcan, “Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1,” *Curr. Genet.*, vol. 44, no. 1, pp. 19–25, Oct. 2003.
- [45] K. Simpson-Lavy, T. Xu, M. Johnston, and M. Kupiec, “The Std1 Activator of the Snf1/AMPK Kinase Controls Glucose Response in Yeast by a Regulated Protein Aggregation,” *Mol. Cell.*, vol. 68, no. 6, pp. 1120-1133.e3, Dec. 2017.
- [46] K. Simpson-Lavy and M. Kupiec, “A reversible liquid drop aggregation controls glucose response in yeast,” *Curr Genet* vol. 64, no. 4. 2018, pp. 785–788.
- [47] J. M. Gancedo, “Yeast carbon catabolite repression,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 2, pp. 334–61, Jun. 1998.
- [48] F. Moreno, D. Ahuatzi, A. Riera, C. A. Palomino, and P. Herrero, “Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 33, no. Pt 1, pp. 265–8, Feb. 2005.
- [49] P. Herrero, C. Martínez-Campa, and F. Moreno, “The hexokinase 2 protein

- participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEBS Lett*, vol. 434, no. 1–2, pp. 71–6, Aug. 1998.
- [50] F. Randez-Gil, P. Sanz, K.-D. Entian, and J. A. Prieto, “Carbon Source-Dependent Phosphorylation of Hexokinase PII and Its Role in the Glucose-Signaling Response in Yeast,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 18, no. 5, pp. 2940–2948, 1998.
- [51] F. Randez-Gil, P. Herrero, P. Sanz, J. A. Prieto, and F. Moreno, “Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEBS Lett*, vol. 425, no. 3, pp. 475–8, Apr. 1998.
- [52] A. Rodríguez, T. De La Cera, P. Herrero, and F. Moreno, “The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochem. J*, vol. 355, no. Pt 3, pp. 625–31, May 2001.
- [53] D. Ahuatzzi, P. Herrero, T. de la Cera, and F. Moreno, “The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent,” *J. Biol. Chem*, vol. 279, no. 14, pp. 14440–6, Apr. 2004.
- [54] D. Ahuatzzi, A. Riera, R. Peláez, P. Herrero, and F. Moreno, “Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution,” *J. Biol. Chem*, vol. 282, no. 7, pp. 4485–4493, Feb. 2007.
- [55] M. Papamichos-Chronakis, T. Gligoris, and D. Tzamarias, “The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor,” *EMBO Rep*, vol. 5, no. 4, pp. 368–72, Apr. 2004.
- [56] X. Lin, A.-Q. Q. Yu, C.-Y. Y. Zhang, L. Pi, X.-W. W. Bai, and D.-G. G. Xiao, “Functional analysis of the global repressor Tup1 for maltose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Different roles of the functional domains,” *Microb. Cell Fact*, vol. 16, no. 1, p. 194, Nov. 2017.
- [57] T. M. Kriegel, A. B. Vojtek, D. Clifton, D. G. Fraenkel, and J. Rush, “In Vivo Phosphorylation Site of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*,”

Biochemistry, 1994.

- [58] P. Fernández-García *et al*, “Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling,” *J. Biol. Chem*, vol. 287, no. 50, pp. 42151–42164, Dec. 2012.
- [59] R. Peláez, P. Herrero, and F. Moreno, “Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm-1)-dependent pathway,” *J. Biol. Chem*, vol. 284, no. 31, pp. 20548–55, Jul. 2009.
- [60] M. Vega, A. Riera, A. Fernández-Cid, P. Herrero, and F. Moreno, “Hexokinase 2 Is an Intracellular Glucose Sensor of Yeast Cells That Maintains the Structure and Activity of Mig1 Protein Repressor Complex,” *J. Biol. Chem*, vol. 291, no. 14, pp. 7267–85, Apr. 2016.
- [61] E. M. Rubenstein *et al*, “Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase,” *J. Biol. Chem*, vol. 283, no. 1, pp. 222–30, Jan. 2008.
- [62] J. Tu and M. Carlson, “REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*,” *EMBO J*, vol. 14, no. 23, pp. 5939–46, Dec. 1995.
- [63] S. Shashkova, A. J. M. Wollman, M. C. Leake, and S. Hohmann, “The yeast Mig1 transcriptional repressor is dephosphorylated by glucose-dependent and -independent mechanisms,” *FEMS Microbiol. Lett*, vol. 364, no. 14, Aug. 2017.
- [64] P. Sanz, G. R. Alms, T. A. Haystead, and M. Carlson, “Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 20, no. 4, pp. 1321–8, Feb. 2000.
- [65] V. Hubscher *et al*, “The Hsp70 homolog Ssb and the 14-3-3 protein Bmh1 jointly regulate transcription of glucose repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. 12, pp. 5629–45, Jul. 2016.
- [66] D. Petranovic, K. Tyo, G. N. Vemuri, and J. Nielsen, “Prospects of yeast systems biology for human health: Integrating lipid, protein and energy metabolism,”

- FEMS Yeast Res*, vol. 10, no. 8, pp. 1046–1059, Dec. 2010.
- [67] K. I. Mitchelhill *et al*, “Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase,” *J. Biol. Chem*, vol. 269, no. 4, pp. 2361–2364, 1994.
- [68] K. Ashrafi, S. S. Lin, J. K. Manchester, and J. I. Gordon, “Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*,” *Genes Dev*, vol. 14, no. 15, pp. 1872–1885, Aug. 2000.
- [69] Z. Wang, W. A. Wilson, M. A. Fujino, and P. J. Roach, “Antagonistic Controls of Autophagy and Glycogen Accumulation by Snf1p, the Yeast Homolog of AMP-Activated Protein Kinase, and the Cyclin-Dependent Kinase Pho85p,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 21, no. 17, pp. 5742–52, Sep. 2001.
- [70] P. Sanz, R. Viana, and M. A. Garcia-Gimeno, “AMPK in Yeast: The SNF1 (Sucrose Non-fermenting 1) Protein Kinase Complex,” in *Experientia supplementum (2012)*, vol. 107, 2016, pp. 353–374.
- [71] N. Zhang and L. Cao, “Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity,” *Curr Genet*, vol. 63, no. 5. 2017, pp. 839–843.
- [72] J. L. Celenza and M. Carlson, “A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase,” *Science*, vol. 233, no. 4769, pp. 1175–80, Sep. 1986.
- [73] R. Usaite, M. C. Jewett, A. P. Oliveira, J. R. Yates, L. Olsson, and J. Nielsen, “Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator,” *Mol. Syst. Biol*, vol. 5, p. 319, Nov. 2009.
- [74] S. Kuchin, I. Treich, and M. Carlson, “A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, vol. 97, no. 14, pp. 7916–20, Jul. 2000.
- [75] R. R. McCartney and M. C. Schmidt, “Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a

- distinct step mediated by the Snf4 subunit,” *J. Biol. Chem*, vol. 276, no. 39, pp. 36460–6, Sep. 2001.
- [76] S.-P. Hong, F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling, and M. Carlson, “Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases,” *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 100, no. 15, pp. 8839–8843, Jul. 2003.
- [77] K. Ludin, R. Jiang, and M. Carlson, “Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 95, no. 11, pp. 6245–50, May 1998.
- [78] K. Elbing, R. R. McCartney, and M. C. Schmidt, “Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochem. J*, 2006.
- [79] S. Tappa, S. Mangat, R. McCartney, and M. C. Schmidt, “PP1 phosphatase-binding motif in Reg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is required for interaction with both the PP1 phosphatase Glc7 and the Snf1 protein kinase,” *Cell. Signal*, vol. 22, no. 7, pp. 1013–21, Jul. 2010.
- [80] F. V. Mayer *et al*, “ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase,” *Cell Metab*, vol. 14, no. 5, pp. 707–14, Nov. 2011.
- [81] D. Castermans *et al*, “Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast,” *Cell Res*, vol. 22, no. 6, pp. 1058–77, Jun. 2012.
- [82] A. Ruiz, Y. Liu, X. Xu, and M. Carlson, “Heterotrimer-independent regulation of activation-loop phosphorylation of Snf1 protein kinase involves two protein phosphatases,” *Proc. Natl. Acad. Sci*, vol. 109, no. 22, pp. 8652–7, May 2012.
- [83] A. Ruiz, X. Xu, and M. Carlson, “Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem*, vol. 288, no. 43, pp. 31052–8, Oct. 2013.

- [84] B. Xiao *et al*, “Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP,” *Nature*, vol. 472, no. 7342, pp. 230–233, Apr. 2011.
- [85] A. Rahner, M. Hiesinger, and H. J. Schüller, “Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol. Microbiol*, vol. 34, no. 1, pp. 146–56, Oct. 1999.
- [86] E. T. Young, K. M. Dombek, C. Tachibana, and T. Ideker, “Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8,” *J. Biol. Chem*, vol. 278, no. 28, pp. 26146–58, Jul. 2003.
- [87] C. Tachibana, R. Biddick, G. L. Law, and E. T. Young, “A poised initiation complex is activated by SNF1,” *J. Biol. Chem*, vol. 282, no. 52, pp. 37308–15, Dec. 2007.
- [88] N. Welkenhuysen *et al*, “Single-cell study links metabolism with nutrient signaling and reveals sources of variability,” *BMC Syst. Biol*, vol. 11, no. 1, p. 59, Jun. 2017.
- [89] N. Maqani, R. D. Fine, M. Shahid, M. Li, E. Enriquez-Hesles, and J. S. Smith, “Spontaneous mutations in CYC8 and MIG1 suppress the short chronological lifespan of budding yeast lacking SNF1/AMPK,” *Microb. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 233–248, Feb. 2018.
- [90] K. A. Braun, K. M. Dombek, and E. T. Young, “Snf1-Dependent Transcription Confers Glucose-Induced Decay upon the mRNA Product,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 36, no. 4, pp. 628–644, Feb. 2016.
- [91] J. M. Thevelein and J. H. de Winde, “Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol Microbiol*, vol. 33, no. 5. 1999, pp. 904–18.
- [92] J. M. Thevelein, “Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast,” *Arch. Microbiol*, vol. 138, no. 1, pp. 64–7, May 1984.
- [93] Y. Wang *et al*, “Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast,” *PLoS Biol*, vol. 2, no. 5, p. E128, May 2004.

- [94] G. M. Santangelo, "Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 1, pp. 253–282, Mar. 2006.
- [95] J. Thevelein, "Nutrient sensing through the plasma membrane of eukaryotic cells, Cirencester, UK, 25-29 September, 2004," in *FEMS Yeast Research*, 2004, vol. 5, no. 3, pp. 303–305.
- [96] F. Steyfkens, Z. Zhang, G. Van Zeebroeck, and J. M. Thevelein, "Multiple transceptors for macro- and micro-nutrients control diverse cellular properties through the PKA pathway in yeast: A paradigm for the rapidly expanding world of eukaryotic nutrient transceptors up to those in human cells," *Front Pharmacol.*, vol. 9, p. 191, Mar. 2018.
- [97] C. W. Yun, H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto, and H. Kumagai, "G-protein coupled receptor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997.
- [98] Y. Xue, M. Batlle, and J. P. Hirsch, "GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G(α) subunit and functions in a Ras-independent pathway," *EMBO J.*, vol. 17, no. 7, pp. 1996–2007, Apr. 1998.
- [99] L. Kraakman *et al.*, "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose," *Mol. Microbiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 1002–12, Jun. 1999.
- [100] K. Lemaire, S. Van De Velde, P. Van Dijck, and J. M. Thevelein, "Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell.*, vol. 16, no. 2, pp. 293–9, Oct. 2004.
- [101] K. Matsumoto, I. Uno, Y. Oshima, and T. Ishikawa, "Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 7, pp. 2355–9, Apr. 1982.

- [102] T. Peeters *et al*, “Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras,” *Nat. Commun*, vol. 103, no. 35, Aug. 2006.
- [103] C. W. Yun, H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto, and H. Kumagai, “Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 252, no. 1, pp. 29–33, Nov. 1998.
- [104] T. Toda, S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, and M. Wigler, “Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase,” *Cell*, vol. 50, no. 2, pp. 277–87, Jul. 1987.
- [105] J. R. Broach, “Nutritional control of growth and development in yeast,” *Genetics*, vol. 192, no. 1, 2012, pp. 73–105.
- [106] T. Toda *et al*, “In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase,” *Cell*, vol. 40, no. 1, pp. 27–36, Jan. 1985.
- [107] F. Rolland, J. H. De Winde, K. Lemaire, E. Boles, J. M. Thevelein, and J. Winderickx, “Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process,” *Mol. Microbiol*, vol. 38, no. 2, pp. 348–358, Oct. 2000.
- [108] S. Colombo, D. Ronchetti, J. M. Thevelein, J. Winderickx, and E. Martegani, “Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem*, vol. 279, no. 45, pp. 46715–46722, Nov. 2004.
- [109] P. Ma, S. Wera, P. Van Dijck, and J. M. Thevelein, “The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 91–104, Jan. 1999.
- [110] R. Dechant, M. Binda, S. S. Lee, S. Pelet, J. Winderickx, and M. Peter, “Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-

- ATPase,” *EMBO J*, vol. 29, no. 15, pp. 2515–26, Aug. 2010.
- [111] K. Peeters *et al*, “Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras,” *Nat. Commun*, vol. 8, no. 1, p. 922, Dec. 2017.
- [112] J.-H. H. Kim, A. Roy, D. Jouandot, and K. H. Cho, “The glucose signaling network in yeast,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*, vol. 1830, no. 11, pp. 5204–5210, Nov. 2013.
- [113] J.-H. H. Kim, V. Brachet, H. Moriya, and M. Johnston, “Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Eukaryot Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 167–173, Jan. 2006.
- [114] J. O. Westholm, N. Nordberg, E. Murén, A. Ameer, J. Komorowski, and H. Ronne, “Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3,” *BMC Genomics*, vol. 9, no. 1, p. 601, Dec. 2008.
- [115] L. F. Bisson, Q. Fan, and G. A. Walker, “Sugar and glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 892, 2016, pp. 125–168.
- [116] L. Tomás-Cobos and P. Sanz, “Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene,” *Biochem. J*, vol. 368, no. Pt 2, pp. 657–63, Dec. 2002.
- [117] S. Pasula, D. Jouandot, and J. H. Kim, “Biochemical evidence for glucose-independent induction of HXT expression in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEBS Lett*, 2007.
- [118] E. J. Hubbard, R. Jiang, and M. Carlson, “Dosage-dependent modulation of glucose repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 14, no. 3, pp. 1972–8, Mar. 1994.
- [119] S. Kuchin, V. K. Vyas, E. Kanter, S. P. Hong, and M. Carlson, “Std1p (Msn3p) positively regulates the Snf1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, 2003.
- [120] K. J. Simpson-Lavy and M. Johnston, “SUMOylation regulates the SNF1 protein

- kinase,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, vol. 110, no. 43, pp. 17432–7, Oct. 2013.
- [121] N. Gadura, L. C. Robinson, and C. A. Michels, “Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1,2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease,” *Genetics*, vol. 172, no. 3, pp. 1427–1439, Mar. 2006.
- [122] K. Mbonyi *et al*, “Glucose-Induced Hyperaccumulation of Cyclic AMP and Defective Glucose Repression in Yeast Strains with Reduced Activity of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 10, no. 9, pp. 4518–23, Sep. 1990.
- [123] L. Barrett, M. Orlova, M. Maziarz, and S. Kuchin, “Protein kinase a contributes to the negative control of SNF1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 119–28, Feb. 2012.
- [124] K. A. Braun *et al*, “Phosphoproteomic analysis identifies proteins involved in transcription-coupled mRNA decay as targets of Snf1 signaling,” *Sci. Signal*, vol. 7, no. 333, pp. ra64–ra64, Jul. 2014.
- [125] K. Hedbacker, R. Townley, and M. Carlson, “Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Regulates the Subcellular Localization of Snf1-Sip1 Protein Kinase,” *Society*, vol. 24, no. 5, pp. 1836–43, Mar. 2004.
- [126] S. Suppi, T. Michelson, K. Viigand, and T. Alamäe, “Repression vs. activation of MOX, FMD, MPP1 and MAL1 promoters by sugars in *Hansenula polymorpha*: The outcome depends on cell’s ability to phosphorylate sugar,” *FEMS Yeast Res*, vol. 13, no. 2, pp. 219–232, Mar. 2013.
- [127] T. Peeters, M. Versele, and J. M. Thevelein, “Directly from Gα to protein kinase A: the kelch repeat protein bypass of adenylate cyclase,” *Trends in Biochemical Sciences*. 2007.
- [128] S. Dashko, N. Zhou, C. Compagno, J. Piškur, and J. Piskur, *FEMS Yeast Res.*, vol. 14, no. 6. 2014, pp. 826–832.
- [129] F. S. Hartner *et al*, “Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts,”

- Microb. Cell Fact*, vol. 5, no. 1, p. 39, Dec. 2006.
- [130] R. Prielhofer *et al*, “*Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level,” *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 167, Mar. 2015.
- [131] G. P. Lin-Cereghino *et al*, “Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 26, no. 3, pp. 883–97, Feb. 2006.
- [132] X. Wang *et al*, “PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of AOX1 promoter in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *Biotechnol. Lett*, vol. 38, no. 2, pp. 291–8, Feb. 2016.
- [133] L. Shi *et al*, “Transcriptome analysis of $\Delta mig1\Delta mig2$ mutant reveals their roles in methanol catabolism, peroxisome biogenesis and autophagy in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *Genes and Genomics*, vol. 40, no. 4, pp. 399–412, Apr. 2018.
- [134] P. Zhang, W. Zhang, X. Zhou, P. Bai, J. M. Cregg, and Y. Zhang, “Catabolite Repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy,” *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 76, no. 18, pp. 6108–18, Sep. 2010.
- [135] A. S. Polupanov and A. A. Sibirny, “Cytoplasmic extension peptide of *Pichia pastoris* glucose sensor Gss1 is not compulsory for glucose signalling,” *Cell Biol. Int*, vol. 38, no. 2, pp. 172–8, Feb. 2014.
- [136] R. Roggenkamp, Z. Janowicz, B. Stanikowski, and C. P. Hollenberg, “Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *MGG Mol. Gen. Genet*, vol. 194, no. 3, pp. 489–493, 1984.
- [137] R. Roggenkamp, “Constitutive appearance of peroxisomes in a regulatory mutant of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *Mol. Gen. Genet*, vol. 213, no. 2–3, pp. 535–40, Aug. 1988.

- [138] G. Parpinello, E. Berardi, and R. Strabbioli, "A regulatory mutant of *Hansenula polymorpha* exhibiting methanol utilization metabolism and peroxisome proliferation in glucose," *J. Bacteriol*, vol. 180, no. 11, pp. 2958–67, Jun. 1998.
- [139] A. A. Sibirny, V. I. Titorenko, B. D. Efremov, and I. I. Tolstorukov, "Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus*," *Yeast*, vol. 3, no. 4, pp. 233–241, Dec. 1987.
- [140] A. A. Sibirny, V. I. Titorenko, M. V. Gonchar, V. M. Ubiyovk, G. P. Ksheminskaya, and O. P. Vitvitskaya, "Genetic control of methanol utilization in yeasts," *J Basic Microbiol*, vol. 28, no. 5. 1988, pp. 293–319.
- [141] T. Alamäe and J. Simisker, "Isolation and preliminary characterization of *Pichia pinus* mutants insensitive to glucose repression," *Yeast*, vol. 10, no. 11, pp. 1459–1466, Nov. 1994.
- [142] O. V. Stasyk, A. V. Petryshyn, and A. A. Sybirny, "Impairment of glucose uptake as a possible cause of catabolite repression deficiency in mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*," *Folia Microbiol. Off. J. Inst. Microbiol. Acad. Sci. Czech Repub*, vol. 39, no. 6, pp. 545–546, Nov. 1994.
- [143] G. G. Pereira and C. P. Hollenberg, "Conserved regulation of the *Hansenula polymorpha* MOX promoter in *Saccharomyces cerevisiae* reveals insights in the transcriptional activation by Adr1p," *Eur. J. Biochem*, 1996.
- [144] C. Dusny and A. Schmid, "The MOX promoter in *Hansenula polymorpha* is ultrasensitive to glucose-mediated carbon catabolite repression," *FEMS Yeast Res*, vol. 16, no. 6, p. fow067, Sep. 2016.
- [145] T. Alamäe, P. Pärn, K. Viigand, and H. Karp, "Regulation of the *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res*, vol. 4, no. 2 SPEC.ISS, pp. 165–173, Nov. 2003.
- [146] T. Alamäe and L. Liiv, "Glucose repression of maltase and methanol-oxidizing enzymes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and study

- of regulatory mutants,” *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 43, no. 5, pp. 443–52, 1998.
- [147] T. Kramarenko, H. Karp, A. Järviste, and T. Alamäe, “Sugar repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* studied by using hexokinase-negative, glucokinase-negative and double kinase-negative mutants,” *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 45, no. 6, pp. 521–9, 2000.
- [148] S. Laht *et al.*, “Cloning and characterization of glucokinase from a methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: Different effects on glucose repression in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*,” *Gene*, vol. 296, no. 1–2, pp. 195–203, Aug. 2002.
- [149] H. Karp, A. Järviste, T. M. Kriegel, and T. Alamäe, “Cloning and biochemical characterization of hexokinase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *Curr. Genet*, vol. 44, no. 5, pp. 268–276, Dec. 2003.
- [150] O. V. Stasyk, G. P. Ksheminskaya, A. R. Kulachkovskii, and A. A. Sibirnyi, “Mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* with impaired catabolite repression,” *Microbiology*, vol. 66, no. 6, pp. 631–636, 1997.
- [151] M. A. Oliveira, V. Genu, A. P. T. Salmazo, D. M. Carraro, and G. A. G. Pereira, “The transcription factor Snf1p is involved in a Tup1p-independent manner in the glucose regulation of the major methanol metabolism genes of *Hansenula polymorpha*,” *Genet. Mol. Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 521–528, Dec. 2003.
- [152] A. N. Leão-Helder, A. M. Krikken, M. G. J. J. Lunenborg, J. A. K. W. K. W. Kiel, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “*Hansenula polymorpha* Tup1p is important for peroxisome degradation,” *FEMS Yeast Res*, vol. 4, no. 8, pp. 789–94, Sep. 2004.
- [153] O. G. Stasyk, T. van Zutphen, H. Ah Kang, O. V. Stasyk, M. Veenhuis, and A. A. Sibirnyi, “The role of *Hansenula polymorpha* *MIG1* homologues in catabolite repression and pexophagy,” *FEMS Yeast Res*, vol. 7, no. 7, pp. 1103–1113, Oct. 2007.

- [154] R. Deb and S. Nagotu, “Versatility of peroxisomes: An evolving concept,” *Tissue Cell*, vol. 49, no. 2 Pt B, pp. 209–226, Apr. 2017.
- [155] R. Erdmann, “Assembly, maintenance and dynamics of peroxisomes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1863, no. 5, pp. 787–789, May 2016.
- [156] T. Gabaldón, “Peroxisome diversity and evolution,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci*, vol. 365, no. 1541, pp. 765–773, Mar. 2010.
- [157] C. L. Walker, L. C. D. Pomatto, D. N. Tripathi, and K. J. A. Davies, “Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes,” *Physiol. Rev*, vol. 98, no. 1, pp. 89–115, Jan. 2018.
- [158] A. Neuhaus, C. Eggeling, R. Erdmann, and W. Schliebs, “Why do peroxisomes associate with the cytoskeleton?,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 5, pp. 1019–26, May 2016.
- [159] Y.-T. Kao, K. L. Gonzalez, and B. Bartel, “Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants,” *Plant Physiol*, vol. 176, no. 1, pp. 162–177, Jan. 2018.
- [160] T. Gabaldón, B. Snel, F. van Zimmeren, W. Hemrika, H. Tabak, and M. A. Huynen, “Origin and evolution of the peroxisomal proteome,” *Biol. Direct*, vol. 1, no. 1, p. 8, Mar. 2006.
- [161] H. R. Waterham, S. Ferdinandusse, and R. J. A. Wanders, “Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1863, no. 5, pp. 922–933, May 2016.
- [162] D. Speijer, “Oxygen radicals shaping evolution: why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it: FADH₂/NADH flux ratios determining mitochondrial radical formation were crucial for the eukaryotic invention of peroxisomes and catabolic tissue differentiation,” *Bioessays*, vol. 33, no. 2, pp. 88–94, Feb. 2011.
- [163] D. N. Tripathi and C. L. Walker, “The peroxisome as a cell signaling organelle,” *Curr. Opin. Cell Biol*, vol. 39, pp. 109–112, Apr. 2016.

- [164] M. Fransen and C. Lismont, “Redox Signaling from and to Peroxisomes: Progress, Challenges, and Prospects,” *Antioxid. Redox Signal*, vol. 30, no. 1, pp. 95–112, Jan. 2019.
- [165] D.-H. Cho, Y. S. Kim, D. S. Jo, S.-K. Choe, and E.-K. Jo, “Pexophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Health and Diseases,” *Mol. Cells*, vol. 41, no. 1, pp. 55–64, Jan. 2018.
- [166] I. G. Castro, M. Schuldiner, and E. Zalckvar, “Mind the Organelle Gap – Peroxisome Contact Sites in Disease,” *Trends Biochem. Sci*, vol. 43, no. 3, pp. 199–210, Mar. 2018.
- [167] N. M. Deori, A. Kale, P. K. Maurya, and S. Nagotu, “Peroxisomes: role in cellular ageing and age related disorders,” *Biogerontology*, vol. 19, no. 5, pp. 303–324, Oct. 2018.
- [168] C. M. Cipolla and I. J. Lodhi, “Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases,” *Trends Endocrinol. Metab*, vol. 28, no. 4, pp. 297–308, Apr. 2017.
- [169] X. Gào and B. Schöttker, “Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 31, pp. 51888–51906, Aug. 2017.
- [170] A. Sugiura, S. Mattie, J. Prudent, and H. M. McBride, “Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes,” *Nature*, vol. 542, no. 7640, pp. 251–254, Feb. 2017.
- [171] H. F. Tabak, I. Braakman, and A. van der Zand, “Peroxisome Formation and Maintenance Are Dependent on the Endoplasmic Reticulum,” *Annu. Rev. Biochem*, vol. 82, no. 1, pp. 723–744, Jun. 2013.
- [172] G. J. Haan *et al*, “*Hansenula polymorpha* Pex3p Is a Peripheral Component of the Peroxisomal Membrane,” *J. Biol. Chem*, vol. 277, no. 29, pp. 26609–26617, Jul. 2002.
- [173] G. Agrawal and S. Subramani, “Emerging role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis,” *Front. Physiol*, vol. 4, p. 286, Oct. 2013.

- [174] D. Speijer, “Evolution of peroxisomes illustrates symbiogenesis,” *BioEssays*, vol. 39, no. 9, p. 1700050, Sep. 2017.
- [175] I. J. van der Klei, H. Yurimoto, Y. Sakai, and M. Veenhuis, “The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1763, no. 12, pp. 1453–1462, Dec. 2006.
- [176] C. W. T. van Roermund, H. R. Waterham, L. Ijlst, and R. J. A. Wanders, “Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Cell. Mol. Life Sci*, vol. 60, no. 9, pp. 1838–1851, Sep. 2003.
- [177] M. Kunze, I. Pracharoenwattana, S. M. Smith, and A. Hartig, “A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1763, no. 12, pp. 1441–52, Dec. 2006.
- [178] P. Kabran, T. Rossignol, C. Gaillardin, J.-M. Nicaud, and C. Neuvéglise, “Alternative splicing regulates targeting of malate dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*,” *DNA Res*, vol. 19, no. 3, pp. 231–44, Jun. 2012.
- [179] T. Ohdate and Y. Inoue, “Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1821, no. 9, pp. 1295–305, Sep. 2012.
- [180] T. Stehlik, B. Sandrock, J. Ast, and J. Freitag, “Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles,” *Curr. Opin. Microbiol*, vol. 22, pp. 8–14, Dec. 2014.
- [181] I. J. van der Klei, W. Harder, and M. Veenhuis, “Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: a review,” *Yeast*, vol. 7, no. 3, pp. 195–209, Apr. 1991.
- [182] S. Nagotu, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “*Divide et Impera* : The Dictum of Peroxisomes,” *Traffic*, vol. 11, no. 2, pp. 175–184, Feb. 2010.
- [183] W. Yuan, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “The birth of yeast peroxisomes,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 5, pp. 902–10, May 2016.
- [184] L. Emmanouilidis, M. Gopalswamy, D. M. Passon, M. Wilmanns, and M. Sattler, “Structural biology of the import pathways of peroxisomal matrix proteins,”

- Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1863, no. 5, pp. 804–813, May 2016.
- [185] C. Ma, G. Agrawal, and S. Subramani, “Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis,” *J. Cell Biol*, vol. 193, no. 1, pp. 7–16, Apr. 2011.
- [186] A. L. Anding and E. H. Baehrecke, “Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles,” *Dev. Cell*, vol. 41, no. 1, pp. 10–22, Apr. 2017.
- [187] S. Wesselborg and B. Stork, “Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks,” *Cell. Mol. Life Sci*, vol. 72, no. 24, pp. 4721–57, Dec. 2015.
- [188] M. Umekawa and D. J. Klionsky, “The Cytoplasm-to-Vacuole Targeting Pathway: A Historical Perspective,” *Int. J. Cell Biol*, vol. 2012, p. 142634, 2012.
- [189] K. Zientara-Rytter, K. Ozeki, T. Y. Nazarko, and S. Subramani, “Pex3 and Atg37 compete to regulate the interaction between the pexophagy receptor, Atg30, and the Hrr25 kinase,” *Autophagy*, vol. 14, no. 3, pp. 368–384, Mar. 2018.
- [190] K. B. Law *et al*, “The peroxisomal AAA ATPase complex prevents pexophagy and development of peroxisome biogenesis disorders,” *Autophagy*, vol. 13, no. 5, pp. 868–884, May 2017.
- [191] M. Oku and Y. Sakai, “Pexophagy in yeasts,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1863, no. 5, pp. 992–998, May 2016.
- [192] K. Kawaguchi, H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai, “Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e25257, Sep. 2011.
- [193] A. Roetzer, N. Gratz, P. Kovarik, and C. Schüller, “Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis,” *Cell. Microbiol*, vol. 12, no. 2, pp. 199–216, Feb. 2010.
- [194] M. Asakura *et al*, “Atg26-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*,” *Plant Cell*, vol. 21, no. 4, pp. 1291–304, Apr. 2009.

- [195] S. Manivannan, R. de Boer, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, "Luminal peroxisomal protein aggregates are removed by concerted fission and autophagy events," *Autophagy*, vol. 9, no. 7, pp. 1044–1056, Jul. 2013.
- [196] C. Bormann and H. Sahm, "Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii*," *Arch. Microbiol*, vol. 117, no. 1, pp. 67–72, Apr. 1978.
- [197] D. L. Tuttle, A. S. Lewin, and W. A. Dunn, "Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts," *Eur. J. Cell Biol*, vol. 60, no. 2, pp. 283–90, Apr. 1993.
- [198] D. L. Tuttle and W. A. Dunn, "Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *J. Cell Sci*, vol. 108 (Pt 1), pp. 25–35, Jan. 1995.
- [199] M. U. Hutchins, M. Veenhuis, and D. J. Klionsky, "Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway," *J. Cell Sci*, vol. 112 (Pt 22), pp. 4079–87, Nov. 1999.
- [200] A. R. Bellu and J. A. K. W. Kiel, "Selective degradation of peroxisomes in yeasts," *Microsc. Res. Tech*, vol. 61, no. 2, pp. 161–170, Jun. 2003.
- [201] H. Mukaiyama *et al*, "Modification of a Ubiquitin-like Protein Paz2 Conducted Micropexophagy through Formation of a Novel Membrane Structure," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 58–70, Jan. 2004.
- [202] H. L. Chiang, R. Schekman, and S. Hamamoto, "Selective uptake of cytosolic, peroxisomal, and plasma membrane proteins into the yeast lysosome for degradation," *J. Biol. Chem*, vol. 271, no. 17, pp. 9934–41, Apr. 1996.
- [203] T. van Zutphen, I. J. van der Klei, and J. A. K. W. Kiel, "Chapter 14 Pexophagy in *Hansenula polymorpha*," in *Methods in enzymology*, vol. 451, 2008, pp. 197–215.
- [204] R. Manjithaya, S. Jain, J.-C. Farré, and S. Subramani, "A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways," *J. Cell Biol*, vol. 189, no. 2, pp. 303–10, Apr. 2010.
- [205] Y. Ano *et al*, "A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics

- during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 2, pp. 446–57, Feb. 2005.
- [206] J.-C. Farré, R. Krick, S. Subramani, and M. Thumm, “Turnover of organelles by autophagy in yeast,” *Curr. Opin. Cell Biol*, vol. 21, no. 4, pp. 522–30, Aug. 2009.
- [207] M. Oku *et al*, “Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain,” *EMBO J*, vol. 22, no. 13, pp. 3231–41, Jul. 2003.
- [208] O. V Stasyk *et al*, “Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*,” *Cell Biol. Int*, vol. 27, no. 11, pp. 947–52, 2003.
- [209] T. Y. Nazarko, A. S. Polupanov, R. R. Manjithaya, S. Subramani, and A. A. Sibirny, “The Requirement of Sterol Glucoside for Pexophagy in Yeast Is Dependent on the Species and Nature of Peroxisome Inducers,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 106–118, Jan. 2007.
- [210] T. Y. Nazarko, J.-C. Farré, A. S. Polupanov, A. A. Sibirny, and S. Subramani, “Autophagy-related pathways and specific role of sterol glucoside in yeasts,” *Autophagy*, vol. 3, no. 3, pp. 263–5.
- [211] S. Yamashita, M. Oku, Y. Wasada, Y. Ano, and Y. Sakai, “PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy,” *J. Cell Biol*, vol. 173, no. 5, pp. 709–17, Jun. 2006.
- [212] O. V Stasyk *et al*, “Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *Autophagy*, vol. 2, no. 1, pp. 30–8.
- [213] T. Y. Nazarko, J.-C. Farré, and S. Subramani, “Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. 17, pp. 3828–39, Sep. 2009.
- [214] J.-C. Farré, R. Manjithaya, R. D. Mathewson, and S. Subramani, “PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy,” *Dev. Cell*, vol. 14, no. 3, pp.

365–76, Mar. 2008.

- [215] S. F. Burnett, J.-C. Farré, T. Y. Nazarko, and S. Subramani, “Peroxisomal Pex3 activates selective autophagy of peroxisomes via interaction with the pexophagy receptor Atg30,” *J. Biol. Chem*, vol. 290, no. 13, pp. 8623–31, Mar. 2015.
- [216] A. R. Bellu, M. Komori, I. J. van der Klei, J. A. K. W. Kiel, and M. Veenhuis, “Peroxisome Biogenesis and Selective Degradation Converge at Pex14p,” *J. Biol. Chem*, vol. 276, no. 48, pp. 44570–44574, Nov. 2001.
- [217] T. Y. Nazarko *et al*, “Peroxisomal Atg37 binds Atg30 or palmitoyl-CoA to regulate phagophore formation during pexophagy,” *J. Cell Biol*, vol. 204, no. 4, pp. 541–557, Feb. 2014.
- [218] J.-C. Farré *et al*, “A New Yeast Peroxin, Pex36, a Functional Homolog of Mammalian PEX16, Functions in the ER-to-Peroxisome Traffic of Peroxisomal Membrane Proteins,” *J. Mol. Biol*, vol. 429, no. 23, pp. 3743–3762, Nov. 2017.
- [219] I. Monastyrska, J. A. K. W. Kiel, A. M. Krikken, J. A. Komduur, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “The *Hansenula polymorpha* ATG25 gene encodes a novel coiled-coil protein that is required for macropexophagy,” *Autophagy*, vol. 1, no. 2, pp. 92–100, Jul. 2005.
- [220] Y. Sakai, M. Oku, I. J. van der Klei, and J. A. K. W. Kiel, “Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*, vol. 1763, no. 12, pp. 1767–1775, Dec. 2006.
- [221] Y. Ano, T. Hattori, N. Kato, and Y. Sakai, “Intracellular ATP correlates with mode of pexophagy in *Pichia pastoris*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol. 69, no. 8, pp. 1527–33, Aug. 2005.
- [222] W. Yuan, D. L. Tuttle, Y. J. Shi, G. S. Ralph, and W. A. Dunn, “Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase,” *J. Cell Sci*, vol. 110 (Pt 1, pp. 1935–45, Aug. 1997.
- [223] M. R. Fry, J. M. Thomson, A. J. Tomasini, and W. A. Dunn, “Early and late molecular events of glucose-induced pexophagy in *Pichia pastoris* require Vac8,”

- Autophagy*, vol. 2, no. 4, pp. 280–8.
- [224] M. Oku, T. Nishimura, T. Hattori, Y. Ano, S. Yamashita, and Y. Sakai, “Role of Vac8 in formation of the vacuolar sequestering membrane during micropexophagy,” *Autophagy*, vol. 2, no. 4, pp. 272–9.
- [225] V. Y. Nazarko *et al*, “Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*,” *Autophagy*, vol. 7, no. 4, pp. 375–85, Apr. 2011.
- [226] H. Mukaiyama *et al*, “Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy,” *Genes Cells*, vol. 7, no. 1, pp. 75–90, Jan. 2002.
- [227] V. Y. Nazarko, J. M. Thevelein, and A. A. Sibirny, “G-protein-coupled receptor Gpr1 and G-protein Gpa2 of cAMP-dependent signaling pathway are involved in glucose-induced pexophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Cell Biol. Int*, vol. 32, no. 5, pp. 502–504, May 2008.
- [228] V. Y. Nazarko, K. O. Futej, J. M. Thevelein, and A. A. Sibirny, “Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *Autophagy*, vol. 4, no. 3, pp. 381–4, Apr. 2008.
- [229] O. V. Stasyk, M. M. Maidan, O. G. V. Stasyk, P. Van Dijck, J. M. Thevelein, and A. A. Sibirny, “Identification of Hexose Transporter-Like Sensor *HXS1* and Functional Hexose Transporter *HXT1* in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 735–746, Apr. 2008.
- [230] K. Mao, K. Wang, M. Zhao, T. Xu, and D. J. Klionsky, “Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Cell Biol*, vol. 193, no. 4, pp. 755–67, May 2011.
- [231] K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi, “The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation,” *EMBO J*, vol. 20, no. 21, pp.

- 5971–81, Nov. 2001.
- [232] K. Suzuki, Y. Kubota, T. Sekito, and Y. Ohsumi, “Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization,” *Genes Cells*, vol. 12, no. 2, pp. 209–18, Feb. 2007.
- [233] T. Kawamata, Y. Kamada, Y. Kabeya, T. Sekito, and Y. Ohsumi, “Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 2039–2050, May 2008.
- [234] J. Kim *et al*, “Evt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole,” *J. Cell Biol*, vol. 153, no. 2, pp. 381–96, Apr. 2001.
- [235] T. Kanki and D. J. Klionsky, “Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism,” *J. Biol. Chem*, vol. 283, no. 47, pp. 32386–32393, Nov. 2008.
- [236] T. Y. Nazarko, “Atg37 regulates the assembly of the pexophagic receptor protein complex,” *Autophagy*, vol. 10, no. 7, pp. 1348–1349, Jul. 2014.
- [237] A. R. Bellu, F. A. Salomons, J. A. K. W. Kiel, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “Removal of Pex3p Is an Important Initial Stage in Selective Peroxisome Degradation in *Hansenula polymorpha*,” *J. Biol. Chem*, vol. 277, no. 45, pp. 42875–42880, Nov. 2002.
- [238] C. Tanaka *et al*, “Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins,” *J. Cell Biol*, vol. 207, no. 1, pp. 91–105, Oct. 2014.
- [239] T. Pfaffenwimmer *et al*, “Hrr25 kinase promotes selective autophagy by phosphorylating the cargo receptor Atg19,” *EMBO Rep*, vol. 15, no. 8, pp. 862–70, Aug. 2014.
- [240] S. Thoms and R. Erdmann, “Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation,” *FEBS J*, vol. 272, no. 20, pp. 5169–5181, Oct. 2005.
- [241] K. Mao, X. Liu, Y. Feng, and D. J. Klionsky, “The progression of peroxisomal degradation through autophagy requires peroxisomal division,” *Autophagy*, vol.

- 10, no. 4, pp. 652–61, Apr. 2014.
- [242] A. M. Motley, G. P. Ward, and E. H. Hettema, “Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p,” *J. Cell Sci*, vol. 121, no. Pt 10, pp. 1633–40, May 2008.
- [243] S. Nagotu, A. M. Krikken, M. Otzen, J. A. K. W. Kiel, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “Peroxisome Fission in *Hansenula polymorpha* Requires Mdv1 and Fis1, Two Proteins Also Involved in Mitochondrial Fission,” *Traffic*, vol. 9, no. 9, pp. 1471–1484, Sep. 2008.
- [244] M. Mattiazzi Ušaj *et al*, “Genome-Wide Localization Study of Yeast Pex11 Identifies Peroxisome–Mitochondria Interactions through the ERMES Complex,” *J. Mol. Biol*, vol. 427, no. 11, pp. 2072–2087, Jun. 2015.
- [245] N. Tamura, M. Oku, and Y. Sakai, “Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*,” *J. Cell Sci*, vol. 123, Dec. 2010.
- [246] J. A. Efe, R. J. Botelho, and S. D. Emr, “Atg18 regulates organelle morphology and Fab1 kinase activity independent of its membrane recruitment by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 11, pp. 4232–44, Nov. 2007.
- [247] N. Tamura, M. Oku, M. Ito, N. N. Noda, F. Inagaki, and Y. Sakai, “Atg18 phosphoregulation controls organellar dynamics by modulating its phosphoinositide-binding activity,” *J. Cell Biol*, vol. 202, no. 4, pp. 685–98, Aug. 2013.
- [248] Y. Ichimura *et al*, “A ubiquitin-like system mediates protein lipidation,” *Nature*, vol. 408, no. 6811, pp. 488–492, Nov. 2000.
- [249] B. Dujon, “Yeast evolutionary genomics,” *Nat. Rev. Genet*, vol. 11, no. 7, pp. 512–524, Jul. 2010.
- [250] C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout, *The yeasts : a taxonomic study*. Elsevier Science, 2011.

- [251] B. Dujon *et al*, “Genome evolution in yeasts,” *Nature*, vol. 430, no. 6995, pp. 35–44, Jul. 2004.
- [252] D. Mattanovich *et al*, “Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*,” *Microb. Cell Fact*, vol. 8, no. 1, p. 29, Jun. 2009.
- [253] A. Küberl *et al*, “High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435,” *J. Biotechnol*, vol. 154, no. 4, pp. 312–320, Jul. 2011.
- [254] M. Ramezani-Rad *et al*, “The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis,” *FEMS Yeast Res*, vol. 4, no. 2 SPEC.ISS, pp. 207–215, Nov. 2003.
- [255] C. D. Curtin, A. R. Borneman, P. J. Chambers, and I. S. Pretorius, “De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499,” vol. 7, no. 3, p. e33840, Mar. 2012.
- [256] J. Piškur *et al*, “The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties,” *Int. J. Food Microbiol*, vol. 157, no. 2, pp. 202–209, Jul. 2012.
- [257] L. Morales *et al*, “Complete DNA sequence of *Kuraishia capsulata* illustrates novel genomic features among budding yeasts (*Saccharomycotina*),” *Genome Biol. Evol*, vol. 5, no. 12, pp. 2524–2539, Dec. 2013.
- [258] L. Morales and B. Dujon, “Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, vol. 76, no. 4, pp. 721–39, Dec. 2012.
- [259] N. Brito, J. Avila, M. D. Perez, C. Gonzalez, and J. M. Siverio, “The genes YNI1 and YNR1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase respectively in the yeast *Hansenula polymorpha*, are clustered and co-ordinately regulated,” *Biochem. J*, vol. 317 (Pt 1, pp. 89–95, Jul. 1996.
- [260] D. A. Fitzpatrick, M. E. Logue, J. E. Stajich, and G. Butler, “A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene

- analysis,” *BMC Evol. Biol*, vol. 6, no. 1, p. 99, Nov. 2006.
- [261] G. Gellissen, *Production of recombinant proteins : novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH, 2005.
- [262] Y. Yamada, M. Matsuda, K. Maeda, and K. Mikata, “The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*),” *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol. 59, no. 3, pp. 439–44, Mar. 1995.
- [263] C. P. Kurtzman, “Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, vol. 36, no. 11, pp. 1435–8, Nov. 2009.
- [264] L. Sturmberger *et al*, “Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence,” *J. Biotechnol*, vol. 235, pp. 121–31, Oct. 2016.
- [265] B. Gasser *et al*, “*Pichia pastoris* : protein production host and model organism for biomedical research,” *Future Microbiol*, vol. 8, no. 2, pp. 191–208, Feb. 2013.
- [266] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab, “Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 98, no. 12, pp. 5301–17, Jun. 2014.
- [267] S. C. Spohner, H. Müller, H. Quitmann, and P. Czermak, “Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*,” *J. Biotechnol*, vol. 202, pp. 118–134, May 2015.
- [268] W. A. Dunn *et al*, “Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes,” *Autophagy*, vol. 1, no. 2, pp. 75–83, Jul. 2005.
- [269] J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler, and K. R. Madden, “*Pichia pastoris* as a host system for transformations,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 5, no. 12, pp. 3376–85, Dec. 1985.
- [270] C. Ilgen, J. Lin-Cereghino, and J. M. Cregg, “*Pichia pastoris*,” in *Production of Recombinant Proteins*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

- KGaA, 2005, pp. 143–162.
- [271] T. R. Gemmill and R. B. Trimble, “Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1426, no. 2, pp. 227–37, Jan. 1999.
- [272] Y. Yamada, K. Maeda, and K. Mikata, “The Phylogenetic Relationships of the Hat-shaped Ascospore-forming, Nitrate-assimilating *Pichia* Species, Formerly Classified in the Genus *Hansenula* Sydow et Sydow, Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): The Proposals of Three New Genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol. 58, no. 7, pp. 1245–1257, Jan. 1994.
- [273] S.-O. Suh and J. J. Zhou, “Methylotrophic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov.,” vol. 10, no. 5, 2010.
- [274] G. Gellissen, *Hansenula polymorpha : biology and applications*. Wiley-VCH, 2002.
- [275] G. Kunze, H. A. Kang, and G. Gellissen, “*Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): Biology and applications,” in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 2009, pp. 47–64.
- [276] A. N. Leão and J. A. K. W. Kiel, “Peroxisome homeostasis in *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 4, no. 2, pp. 131–9, Nov. 2003.
- [277] M. Mack, M. Wannemacher, B. Hobl, P. Pietschmann, and B. Hock, “Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*,” *Protein Expr. Purif*, vol. 66, no. 2, pp. 165–71, Aug. 2009.
- [278] A. Emmerstorfer, T. Wriessnegger, M. Hirz, and H. Pichler, “Overexpression of membrane proteins from higher eukaryotes in yeasts,” *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 98, no. 18, pp. 7671–7698, Sep. 2014.
- [279] M. A. Meehl and T. A. Stadheim, “Biopharmaceutical discovery and production in yeast,” *Curr. Opin. Biotechnol*, vol. 30, pp. 120–7, Dec. 2014.

- [280] O. Spadiut, S. Capone, F. Krainer, A. Glieder, and C. Herwig, “Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments,” vol. 32, no. 1, pp. 54–60, Jan. 2014.
- [281] R. A. J. Darby, S. P. Cartwright, M. V Dilworth, and R. M. Bill, “Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review),” *Methods Mol. Biol.*, vol. 866, pp. 11–23, 2012.
- [282] J. L. Corchero *et al*, “Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 140–53, Mar. 2013.
- [283] H. A. Kang, J. H. Sohn, E. S. Choi, B. H. Chung, M. H. Yu, and S. K. Rhee, “Glycosylation of human alpha 1-antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts,” *Yeast*, vol. 14, no. 4, pp. 371–81, Mar. 1998.
- [284] G. Gellissen, “Heterologous protein production in methylotrophic yeasts,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 6, pp. 741–50, Dec. 2000.
- [285] M. W. Kim *et al*, “Characterization of N-linked oligosaccharides assembled on secretory recombinant glucose oxidase and cell wall mannoproteins from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *Glycobiology*, vol. 14, no. 3, pp. 243–51, Mar. 2004.
- [286] G. Gellissen *et al*, “New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, no. 11, 2005, pp. 1079–1096.
- [287] H. Kim, S. J. Yoo, and H. A. Kang, “Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 15, no. 1, p. n/a-n/a, Aug. 2014.
- [288] N. V. Ravin *et al*, “Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1,” *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 837, Nov. 2013.
- [289] D. Mattanovich, P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer, and D. Porro,

- Recombinant Protein Production in Yeasts,” in *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), vol. 824, 2012, pp. 329–358.
- [290] O. S. Krasovska *et al*, –Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenulapolyomorpha* mutants deficient in catabolite repression,” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 97, no. 4, pp. 858–870, 2007.
- [291] O. S. Krasovska, O. V. Stasyk, and A. A. Sibirny, –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*, vol. 97, no. 23, pp. 9969–9979, Dec. 2013.
- [292] G. Steinborn, E. Böer, A. Scholz, K. Tag, G. Kunze, and G. Gellissen, –Application of a wide-range yeast vector (CoMed) system to recombinant protein production in dimorphic *Arxula adenivorans*, methylotrophic *Hansenula polymorpha* and other yeasts,” *Microb. Cell Fact*, vol. 5, p. 33, Nov. 2006.
- [293] W. Qian *et al*, –Improved gene disruption method and Cre-loxP mutant system for multiple gene disruptions in *Hansenula polymorpha*,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 79, no. 3, pp. 253–9, Dec. 2009.
- [294] R. Aw and K. M. Polizzi, –Can too many copies spoil the broth?,” *Microb. Cell Fact*, vol. 12, no. 1, p. 128, Dec. 2013.
- [295] H. a Kang *et al*, –Development of expression systems for the production of recombinant human serum albumin using the *MOX* promoter in *Hansenula polymorpha* DL-1,” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 76, no. 2, pp. 175–185, Sep. 2001.
- [296] H. A. Kang and G. Gellissen, –*Hansenula polymorpha*,” in *Production of Recombinant Proteins*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 111–142.
- [297] C. Liu, X. Yang, Y. Yao, W. Huang, W. Sun, and Y. Ma, –Diverse expression levels of two codon-optimized genes that encode human papilloma virus type 16 major protein L1 in *Hansenula polymorpha*,” *Biotechnol. Lett*, vol. 36, no. 5, pp.

937–45, May 2014.

- [298] D.-B. Oh *et al*, “Glycoengineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for the production of glycoproteins with trimannosyl core N-glycan by blocking core oligosaccharide assembly,” *Biotechnol. J*, vol. 3, no. 5, pp. 659–68, May 2008.
- [299] J. Klabunde, S. Kleebank, M. Piontek, C. P. Hollenberg, S. Hellwig, and A. Degelmann, “Increase of calnexin gene dosage boosts the secretion of heterologous proteins by *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 7, no. 7, pp. 1168–80, Oct. 2007.
- [300] E. Eilert, T. Rolf, A. Heumaier, C. P. Hollenberg, M. Piontek, and M. Suckow, “Improved processing of secretory proteins in *Hansenula polymorpha* by sequence variation near the processing site of the alpha mating factor prepro sequence,” *J. Biotechnol*, vol. 167, no. 2, pp. 94–100, Aug. 2013.
- [301] A. F. Mayer *et al*, “An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*,” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 63, no. 3, pp. 373–81, May 1999.
- [302] C. Stöckmann *et al*, “Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment,” *Microb. Cell Fact*, vol. 8, no. 1, p. 22, Apr. 2009.
- [303] H. Bredell, J. J. Smith, W. A. Prins, J. F. Görgens, and W. H. van Zyl, “Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 16, no. 2, p. fow001, Mar. 2016.
- [304] M. Hodgkins, D. Mead, D. J. Ballance, A. Goodey, and P. Sudbery, “Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as a reporter gene to isolate regulatory mutations,” *Yeast*, vol. 9, no. 6, pp. 625–35, Jun. 1993.
- [305] G. Gellissen *et al*, “Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst: coexpression of the spinach glycolate oxidase (GO) and the *S. cerevisiae* catalase

- T (CTT1) gene,” *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 46, no. 1, pp. 46–54, Aug. 1996.
- [306] L. Gidijala, R. A. L. Bovenberg, P. Klaassen, I. J. van der Klei, M. Veenhuis, and J. A. K. W. Kiel, “Production of functionally active *Penicillium chrysogenum* isopenicillin N synthase in the yeast *Hansenula polymorpha*,” *BMC Biotechnol*, vol. 8, no. 1, p. 29, Mar. 2008.
- [307] M. Moussa *et al*, “Expression of recombinant staphylokinase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *BMC Biotechnol*, vol. 12, no. 1, p. 96, Dec. 2012.
- [308] A. Degelmann *et al*, “Strain and process development for the production of human cytokines in *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 2, no. 3, pp. 349–61, Aug. 2002.
- [309] E. Böer, G. Steinborn, A. Matros, H.-P. Mock, G. Gellissen, and G. Kunze, “Production of interleukin-6 in *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* by applying the wide-range yeast vector (CoMed) system to simultaneous comparative assessment,” *FEMS Yeast Res*, vol. 7, no. 7, pp. 1181–7, Oct. 2007.
- [310] J.-H. Heo, V. Ananin, H.-A. Kang, S. K. Rhee, and C. H. Kim, “Feeding strategies for the enhanced production of recombinant human serum albumin in the fed-batch cultivation of *Hansenula polymorpha*,” *Process Biochem*, vol. 43, no. 9, pp. 918–924, Sep. 2008.
- [311] H.-S. Seo *et al*, “Analysis and characterization of hepatitis B vaccine particles synthesized from *Hansenula polymorpha*,” *Vaccine*, vol. 26, no. 33, pp. 4138–44, Aug. 2008.
- [312] J. Petre, T. Rutgers, and P. Hauser, “Properties of a recombinant yeast-derived hepatitis B surface antigen containing S, preS2 and preS1 antigenic domains,” *Arch. Virol. Suppl*, vol. 4, pp. 137–41, 1992.
- [313] C. Liu *et al*, “Production of Recombinant Human Papillomavirus Type 52 L1

- Protein in *Hansenula polymorpha* Formed Virus-Like Particles,” *J. Microbiol. Biotechnol*, vol. 25, no. 6, pp. 936–940, Jun. 2015.
- [314] A. Sibirny, K. Dmytruk, O. Kurylenko, J. Ruchala, and O. Ishchuk, “Development of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as efficient ethanol producer,” in *Yeast Diversity in Human Welfare*, 2017, pp. 257–282.
- [315] A. Y. Voronovsky, O. B. Ryabova, O. V Verba, O. P. Ishchuk, K. V Dmytruk, and A. A. Sibirny, “Expression of xylA genes encoding xylose isomerases from *Escherichia coli* and *Streptomyces coelicolor* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 5, no. 11, pp. 1055–62, Nov. 2005.
- [316] O. V. Dmytruk, A. Y. Voronovsky, C. A. Abbas, K. V. Dmytruk, O. P. Ishchuk, and A. A. Sibirny, “Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Yeast Res*, vol. 8, no. 1, pp. 165–173, 2008.
- [317] O. P. Ishchuk, A. Y. Voronovsky, C. A. Abbas, and A. A. Sibirny, “Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance,” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 104, no. 5, pp. 911–919, 2009.
- [318] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent,” *J. Biol. Chem*, vol. 193, no. 1, pp. 265–75, Nov. 1951.
- [319] O. V. Stasyk, T. Y. Nazarko, and A. A. Sibirny, “Chapter 16 Methods of Plate Pexophagy Monitoring and Positive Selection for *ATG* Gene Cloning in Yeasts,” in *Methods in enzymology*, vol. 451, 2008, pp. 229–239.
- [320] J. M. Cregg, K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill, and C. A. Stillman, “Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*,” *Mol. Cell. Biol*, vol. 9, no. 3, pp. 1316–23, Mar. 1989.
- [321] H. Karp and T. AlamÃoe, “Glucose transport in a methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *FEMS Microbiol. Lett*, vol. 166, no. 2, pp. 267–273,

Sep. 1998.

- [322] J. Sambrook and D. W. Russel, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, vol. 2. 2001.
- [323] K. N. Faber, P. Haima, W. Harder, M. Veenhuis, and G. Ab, "Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*," *Curr. Genet*, vol. 25, no. 4, pp. 305–310, Apr. 1994.
- [324] J. H. Sohn *et al*, "A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 51, no. 6, pp. 800–807, Jun. 1999.
- [325] O. P. Ishchuk, C. a Abbas, and A. a Sibirny, "Heterologous expression of *Saccharomyces cerevisiae* MPR1 gene confers tolerance to ethanol and L: -azetidine-2-carboxylic acid in *Hansenula polymorpha*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, vol. 37, no. 2, pp. 213–8, 2010.
- [326] T. Bocer *et al*, "The mammalian ABC transporter ABCA1 induces lipid-dependent drug sensitivity in yeast," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1821, no. 3, pp. 373–380, 2012.
- [327] F. Lombó, K. Siems, A. F. Braña, C. Méndez, K. Bindseil, and J. A. Salas, "Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin," *J. Bacteriol*, vol. 179, no. 10, pp. 3354–7, May 1997.
- [328] H. Liu, X. Tan, K. A. Russell, M. Veenhuis, and J. M. Cregg, "PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import," *J. Biol. Chem*, vol. 270, no. 18, pp. 10940–51, May 1995.
- [329] K. Sybirna, N. Petryk, Y.-F. Y.-F. Zhou, A. Sibirny, and M. Bolotin-Fukuhara, "A novel *Hansenula polymorpha* transcriptional factor HpHAP4-B, able to functionally replace the *S. cerevisiae* HAP4 gene, contains an additional bZip motif," *Yeast*, vol. 27, no. 11, Nov. 2010.

- [330]H. R. Waterham, Y. de Vries, K. A. Russel, W. Xie, M. Veenhuis, and J. M. Cregg, "The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 2527–36, May 1996.
- [331]J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–80, Nov. 1994.
- [332]P. K. Herman, J. H. Stack, and S. D. Emr, "A genetic and structural analysis of the yeast Vps15 protein kinase: evidence for a direct role of Vps15p in vacuolar protein delivery," *EMBO J.*, vol. 10, no. 13, pp. 4049–60, Dec. 1991.
- [333]J.-C. Farre, K. Shirahama-Noda, L. Zhang, K. Booher, and S. Subramani, "Localization of Proteins and Organelles Using Fluorescence Microscopy," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 389, 2007, pp. 239–249.
- [334]G. P. Lin Cereghino *et al.*, "New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*," *Gene*, vol. 263, no. 1–2, pp. 159–69, Jan. 2001.
- [335]M. A. Johnson *et al.*, "Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*," *Genetics*, vol. 151, no. 4, pp. 1379–91, Apr. 1999.
- [336]A. Merckelbach, S. Gödecke, Z. A. Janowicz, and C. P. Hollenberg, "Cloning and sequencing of the *ura3* locus of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and its use for the generation of a deletion by gene replacement," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 2–3, pp. 361–4, Nov. 1993.
- [337]V. I. Titorenko, I. Keizer, W. Harder, and M. Veenhuis, "Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 2, pp. 357–63,

Jan. 1995.

- [338] L. A. Schroder, B. S. Glick, and W. A. Dunn, "Identification of pexophagy genes by restriction enzyme-mediated integration," *Methods Mol. Biol.*, vol. 389, pp. 203–18, 2007.
- [339] R. Van Dijk *et al.*, "Tagging *Hansenula polymorpha* genes by random integration of linear DNA fragments (RALF)," *Mol. Genet. Genomics*, vol. 266, no. 4, pp. 646–656, Dec. 2001.
- [340] O. Stasyk, V. Nazarko, O. Pochapinsky, T. Nazarko, M. Veenhuis, and A. Sibirny, "Identification of intragenic mutations in the gene that affect peroxisome biogenesis and methylotrophic growth," *FEMS Yeast Res*, vol. 4, no. 2, pp. 141–147, Nov. 2003.
- [341] J. A. Komduur, A. N. Leão, I. Monastyrska, M. Veenhuis, and J. A. K. W. Kiel, "Old yellow enzyme confers resistance of *Hansenula polymorpha* towards allyl alcohol," *Curr. Genet*, vol. 41, no. 6, pp. 401–6, Sep. 2002.
- [342] K. V. Dmytruk, O. O. Kurylenko, J. Ruchala, C. A. Abbas, and A. A. Sibirny, "Genetic Improvement of Conventional and Nonconventional Yeasts for the Production of First- and Second-Generation Ethanol," in *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–38.
- [343] A. Saloheimo, J. Rauta, O. V Stasyk, A. A. Sibirny, M. Penttilä, and L. Ruohonen, "Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2007.
- [344] P. A. vanKuyk, J. A. Diderich, A. P. MacCabe, O. Hererro, G. J. G. Ruijter, and J. Visser, "*Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH," *Biochem. J*, vol. 379, no. 2, pp. 375–383, Apr. 2004.
- [345] M. J. Leandro, P. Gonçalves, and I. Spencer-Martins, "Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia* : first molecular

- characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter,” *Biochem. J*, vol. 395, no. 3, pp. 543–549, May 2006.
- [346] O. G. Stasyk, I. O. Denega, N. I. Klymyshyn, N. O. Sybirna, and O. V. Stasyk, “Peculiarities of hexose transport and catabolite repression regulation by hexose sensors *HpGcr1* and *HpHxs1* in the yeast *Hansenula polymorpha*,” *Stud. Biol*, vol. 6, no. 2, pp. 33–44, 2012.
- [347] O. G. Stasyk, I. O. Denega, N. O. Sybirna, and O. V. Stasyk, “Expression of genes of putative hexose transporters in the yeast *Hansenula polymorpha* are differentially regulated by glucose sensors *Hxs1* and *Gcr1*,” *Stud. Biol*, vol. 6, no. 3, pp. 39–54, 2012.
- [348] F. Corpet, “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering,” *Nucleic Acids Res*, vol. 16, no. 22, pp. 10881–90, Nov. 1988.
- [349] S. P. Solow, J. Sengbusch, and M. W. Laird, “Heterologous protein production from the inducible MET25 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnol. Prog*, vol. 21, no. 2, pp. 617–620, 2005.
- [350] P. Kerjan, H. Cherest, and Y. Surdin-Kerjan, “Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene,” *Nucleic Acids Res*, vol. 14, no. 20, pp. 7861–71, Oct. 1986.
- [351] R. Wiczorke, S. Dlugai, S. Krampe, and E. Boles, “Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system,” *Cell. Physiol. Biochem*, vol. 13, no. 3, pp. 123–134, 2003.
- [352] H. Flegelova, R. Haguenaer-Tsapis, and H. Sychrova, “Heterologous expression of mammalian Na/H antiporters in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj*, vol. 1760, no. 3, pp. 504–516, 2006.
- [353] J. Delgado-Jarana, M. Á. Moreno-Mateos, and T. Benítez, “Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: Role of *gtt1*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 708–717, 2003.
- [354] H. Wei, K. Vienken, R. Weber, S. Bunting, N. Requena, and R. Fischer, “A

- putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 41, no. 2, pp. 148–156, 2004.
- [355] A. Roy, A. D. Dement, K. H. Cho, and J. H. Kim, “Assessing glucose uptake through the yeast hexose transporter 1 (Hxt1),” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, 2015.
- [356] S. Suppi, T. Michelson, K. Viigand, and T. Alamäe, “Repression vs. activation of *MOX*, *FMD*, *MPP1* and *MAL1* promoters by sugars in *Hansenula polymorpha*: the outcome depends on cell’s ability to phosphorylate sugar,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 219–232, Mar. 2013.
- [357] J. M. Thevelein and K. Voordeckers, “Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 26, no. 11. pp. 2407–2414, 2009.
- [358] M. C. V Donaton *et al.*, “The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 911–929, 2003.
- [359] T. B. Liu, Y. Wang, G. M. Baker, H. Fahmy, L. Jiang, and C. Xue, “The Glucose Sensor-Like Protein Hxs1 Is a High-Affinity Glucose Transporter and Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013.
- [360] L. Kraidlova, S. Schrevens, H. Tournu, G. Van Zeebroeck, H. Sychrova, and P. Van Dijck, “Characterization of the *Candida albicans* Amino Acid Permease Family: Gap2 Is the Only General Amino Acid Permease and Gap4 Is an S-Adenosylmethionine (SAM) Transporter Required for SAM- Induced Morphogenesis,” *mSphere*, vol. 1, no. 6, pp. e00284-16, 2016.
- [361] C. D. Curtin and I. S. Pretorius, “Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*,” *FEMS Yeast Research*, vol. 14, no. 7. pp. 997–1005, 2014.
- [362] G. Morel *et al.*, “Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts,” *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015.

- [363] T. A. Richards, G. Leonard, D. M. Soanes, and N. J. Talbot, "Gene transfer into the fungi," *Fungal Biology Reviews*, vol. 25, no. 2, pp. 98–110, 2011.
- [364] J. M. Siverio, "Assimilation of nitrate by yeasts," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 3, pp. 277–284, 2002.
- [365] J. V. Forment, M. Flipphi, L. Ventura, R. González, D. Ramón, and A. P. MacCabe, "High-affinity glucose transport in *Aspergillus nidulans* is mediated by the products of two related but differentially expressed genes," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, 2014.
- [366] T. F. Dos Reis *et al.*, "Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, 2013.
- [367] E. Lamping *et al.*, "Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*," *Eukaryot. Cell*, vol. 6, no. 7, pp. 1150–1165, 2007.
- [368] L. Hlavatá, L. Nachin, P. Ježek, and T. Nyström, "Elevated Ras/protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes," *Aging Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 148–157, 2008.
- [369] A. Saloheimo, J. Rauta, O. V. Stasyk, A. A. Sibirny, M. Penttilä, and L. Ruohonen, "Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 74, no. 5, pp. 1041–1052, Mar. 2007.
- [370] О. Красовська, А. Сибірний, and О. Стасик, "Спосіб одержання поверхневого антигену вірусу гепатиту в за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Hansenula polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією — UA 73449," 73449, 2012.
- [371] M. Veenhuis, A. Douma, W. Harder, and M. Osumi, "Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes," *Arch. Microbiol.*, vol. 134, no. 3, pp. 193–203, Jun.

1983.

- [372] J. A. Komduur, A. R. Bellu, K. Knoop, I. J. van der Klei, and M. Veenhuis, "Cold-inducible selective degradation of peroxisomes in *Hansenula polymorpha*," *FEMS Yeast Res*, vol. 5, no. 3, pp. 281–5, Dec. 2004.
- [373] W. H. Meijer, I. J. van der Klei, M. Veenhuis, and J. A. K. W. Kiel, "ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes," *Autophagy*, vol. 3, no. 2, pp. 106–16, 2007.
- [374] J. O. Nehlin and H. Ronne, "Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins," *EMBO J*, vol. 9, no. 9, pp. 2891–8, Sep. 1990.
- [375] J. Ostling, M. Carlberg, and H. Ronne, "Functional domains in the Mig1 repressor," *Mol. Cell. Biol*, vol. 16, no. 3, pp. 753–61, Mar. 1996.
- [376] J. P. Cassart, J. Ostling, H. Ronne, and J. Vandenhaute, "Comparative analysis in three fungi reveals structurally and functionally conserved regions in the Mig1 repressor," *Mol. Gen. Genet*, vol. 255, no. 1, pp. 9–18, Jun. 1997.
- [377] O. Zaragoza, C. Rodríguez, and C. Gancedo, "Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression," *J. Bacteriol*, vol. 182, no. 2, pp. 320–6, Jan. 2000.
- [378] T. A. Carmona, P. Barrado, A. Jiménez, and M. Fernández Lobato, "Molecular and functional analysis of a MIG1 homologue from the yeast *Schwanniomyces occidentalis*," *Yeast*, vol. 19, no. 5, pp. 459–65, Mar. 2002.
- [379] L. L. Lutfiyya and M. Johnston, "Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression," *Mol. Cell. Biol*, vol. 16, no. 9, pp. 4790–7, Sep. 1996.
- [380] L. L. Lutfiyya, V. R. Iyer, J. DeRisi, M. J. DeVit, P. O. Brown, and M. Johnston, "Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 150, no. 4, pp. 1377–91, Dec. 1998.

- [381] H. Ronne, "Glucose repression in fungi," *Trends in Genetics*, vol. 11, no. 1, 1995, pp. 12–17.
- [382] M. A. Treitel, S. Kuchin, and M. Carlson, "Snf1 Protein Kinase Regulates Phosphorylation of the Mig1 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 6273–80, Nov. 1998.
- [383] J. T. Olesen and L. Guarente, "The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex," *Genes Dev.*, vol. 4, no. 10, pp. 1714–29, Oct. 1990.
- [384] J. Blom, M. J. De Mattos, and L. A. Grivell, "Redirection of the respiratory fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 5, pp. 1970–3, May 2000.
- [385] R. Lascaris, J. Piwowarski, H. van der Spek, J. Teixeira de Mattos, L. Grivell, and J. Blom, "Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes," *Microbiology*, vol. 150, no. Pt 4, pp. 929–34, Apr. 2004.
- [386] A. A. Brakhage *et al.*, "HAP-Like CCAAT-Binding Complexes in Filamentous Fungi: Implications for Biotechnology," *Fungal Genet. Biol.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 243–252, Jul. 1999.
- [387] D. Bourgarel, C. C. Nguyen, and M. Bolotin-Fukuhara, "HAP4, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1205–15, Feb. 1999.
- [388] K. Sybirna, B. Guiard, Y. F. Li, W. G. Bao, M. Bolotin-Fukuhara, and A. Delahodde, "A new *Hansenula polymorpha* HAP4 homologue which contains only the N-terminal conserved domain of the protein is fully functional in *Saccharomyces cerevisiae*," *Curr. Genet.*, vol. 47, no. 3, pp. 172–81, Mar. 2005.

- [389] S. L. Forsburg and L. Guarente, “Communication Between Mitochondria and the Nucleus in Regulation of Cytochrome Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 153–180, Nov. 1989.
- [390] A. R. Kulackovsky, O. V Stasyk, H. P. Ksheminska, L. R. Fayura, O. M. Moroz, and A. A. Sibirny, “Nutrition and ultrastructure of the mutants of methylotrophic yeasts defective in biogenesis and degradation of peroxisomes,” *Food Technol. Biotechnol.*, 1998.
- [391] J. Ostling, H. Ronne, J. Östling, and H. Ronne, “Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 252, no. 1, pp. 162–168, Feb. 1998.
- [392] T. M. Malavé and S. Y. R. Dent, “Transcriptional repression by Tup1–Ssn6 This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal’s usual peer review process,” *Biochem. Cell Biol.*, vol. 84, no. 4, pp. 437–443, Aug. 2006.
- [393] A. M. Murad *et al.*, “Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1,” *Mol. Microbiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 981–93, Nov. 2001.
- [394] T. Alamäe, P. Pärn, K. Viigand, and H. Karp, “Regulation of the *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter in *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 4, no. 2 SPEC.ISS, pp. 165–173, 2003.
- [395] N. Petryk *et al.*, “Functional Study of the Hap4-Like Genes Suggests That the Key Regulators of Carbon Metabolism HAP4 and Oxidative Stress Response YAP1 in Yeast Diverged from a Common Ancestor,” *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e112263, Dec. 2014.
- [396] J. A. K. W. Kiel, J. A. Komduur, I. J. van der Klei, and M. Veenhuis, “Macropexophagy in *Hansenula polymorpha*: facts and views,” *FEBS Lett.*, vol. 549, no. 1–3, pp. 1–6, Aug. 2003.

- [397] Y. Sakai, A. Koller, L. K. Rangell, G. A. Keller, and S. Subramani, "Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates," *J. Cell Biol*, vol. 141, no. 3, pp. 625–36, May 1998.
- [398] O. V. Stasyk, O. G. Stasyk, M. M. Maidan, J. M. Thevelein, J. M. Cregg, and A. A. Sibirny, "The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* exhibits a unique molecular mechanism for glucose sensing and repression," in *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 2005, vol. 77, no. 2, p. 37.
- [399] J. A. Kiel, K. B. Rechinger, I. J. van der Klei, F. A. Salomons, V. I. Titorenko, and M. Veenhuis, "The *Hansenula polymorpha* PDD1 gene product, essential for the selective degradation of peroxisomes, is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps34p," *Yeast*, vol. 15, no. 9, pp. 741–54, Jun. 1999.
- [400] P. K. Herman and S. D. Emr, "Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol*, vol. 10, no. 12, pp. 6742–54, Dec. 1990.
- [401] A. L. Munn and H. Riezman, "Endocytosis is required for the growth of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes," *J. Cell Biol*, vol. 127, no. 2, pp. 373–86, Oct. 1994.
- [402] J. H. Stack, D. B. DeWald, K. Takegawa, and S. D. Emr, "Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast," *J. Cell Biol*, vol. 129, no. 2, pp. 321–34, Apr. 1995.
- [403] J. H. Stack, B. Horazdovsky, and S. D. Emr, "Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, vol. 11, no. 1, pp. 1–33, Nov. 1995.
- [404] C. Panaretou, J. Domin, S. Cockcroft, and M. D. Waterfield, "Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins

- 3-kinase complex,” *J. Biol. Chem*, vol. 272, no. 4, pp. 2477–85, Jan. 1997.
- [405] S. K. Hanks, A. M. Quinn, and T. Hunter, “The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains,” *Science*, vol. 241, no. 4861, pp. 42–52, Jul. 1988.
- [406] P. K. Herman, J. H. Stack, J. A. DeModena, and S. D. Emr, “A novel protein kinase homolog essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole,” *Cell*, vol. 64, no. 2, pp. 425–37, Jan. 1991.
- [407] H. R. Waterham and J. M. Cregg, “Peroxisome biogenesis,” *BioEssays*, vol. 19, no. 1, pp. 57–66, Jan. 1997.
- [408] M. J. de Hoop and G. Ab, “Import of proteins into peroxisomes and other microbodies,” *Biochem. J*, vol. 286 (Pt 3), pp. 657–69, Sep. 1992.
- [409] S. Subramani, “Protein Import into Peroxisomes and Biogenesis of the Organelle,” *Annu. Rev. Cell Biol*, vol. 9, no. 1, pp. 445–478, Nov. 1993.
- [410] J. R. Glover, D. W. Andrews, S. Subramani, and R. A. Rachubinski, “Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo,” *J. Biol. Chem*, vol. 269, no. 10, pp. 7558–63, Mar. 1994.
- [411] Y. Elgersma, M. Elgersma-Hooisma, T. Wenzel, J. M. McCaffery, M. G. Farquhar, and S. Subramani, “A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*,” *J. Cell Biol*, vol. 140, no. 4, pp. 807–20, Feb. 1998.
- [412] S. J. Gould, J. E. Kalish, J. C. Morrell, J. Bjorkman, A. J. Urquhart, and D. I. Crane, “Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor,” *J. Cell Biol*, vol. 135, no. 1, pp. 85–95, Oct. 1996.
- [413] H. van den Bosch, R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders, and J. M. Tager, “Biochemistry of Peroxisomes,” *Annu. Rev. Biochem*, vol. 61, no. 1, pp. 157–197, Jun. 1992.
- [414] M. Veenhuis, K. B. Zwart, and W. Harder, “Biogenesis and turnover of

- peroxisomes involved in the concurrent oxidation of methanol and methylamine in *Hansenula polymorpha*,” *Arch. Microbiol*, vol. 129, no. 1, pp. 35–41, Mar. 1981.
- [415] W. A. Dunn *et al*, *Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes*, vol. 1, no. 2. 2005, pp. 75–83.
- [416] O. V. Stasyk *et al*, “A *Pichia pastoris* VPS15 homologue is required in selective peroxisome autophagy,” *Curr. Genet*, vol. 36, no. 5, pp. 262–9, Nov. 1999.
- [417] T. Y. Nazarko, M. J. Mala, and A. A. Sibirny, “Development of the plate assay screening procedure for isolation of the mutants deficient in inactivation of peroxisomal enzymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*,” *Biopolym. Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 135–138, Mar. 2002.
- [418] A. A. Sibirnyĭ and V. I. Titorenko, “[A method of quantitative determination of alcohol oxidase and catalase in yeast colonies],” *Ukr. biokhimicheskii zhurnal*, vol. 58, no. 5, pp. 65–8, 1988.
- [419] O. V. Stasyk *et al*, “Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*,” *Autophagy*, vol. 2, no. 1, pp. 30–8, 2006.
- [420] D. J. Klionsky *et al*, “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 4, pp. 539–45, Oct. 2003.
- [421] J.-C. Farré and S. Subramani, “Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process,” *Trends Cell Biol*, vol. 14, no. 9, pp. 515–23, Sep. 2004.
- [422] M. Tsukada and Y. Ohsumi, “Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEBS Lett*, vol. 333, no. 1–2, pp. 169–74, Oct. 1993.
- [423] O. V. Stasyk *et al*, “Atg28, a Novel Coiled-Coil Protein Involved in Autophagic Degradation of Peroxisomes in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*,” *Autophagy*, vol. 2, no. 1, Jan. 2006.
- [424] I. J. van der Klei, W. Harder, and M. Veenhuis, “Selective inactivation of alcohol

- oxidase in two peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*,” *Yeast*, vol. 7, no. 8, pp. 813–21, Nov. 1991.
- [425] P. E. Stromhaug and D. J. Klionsky, “Approaching the molecular mechanism of autophagy,” *Traffic*, vol. 2, no. 8, pp. 524–31, Aug. 2001.
- [426] J. Guan *et al*, “Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 12, pp. 3821–38, Dec. 2001.
- [427] A. Heese-Peck, H. Pichler, B. Zanolari, R. Watanabe, G. Daum, and H. Riezman, “Multiple functions of sterols in yeast endocytosis,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 8, pp. 2664–80, Aug. 2002.
- [428] E. S. Seeley, M. Kato, N. Margolis, W. Wickner, and G. Eitzen, “Genomic Analysis of Homotypic Vacuole Fusion,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 782–794, Mar. 2002.
- [429] D. Warnecke *et al*, “Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*,” *J. Biol. Chem*, vol. 274, no. 19, pp. 13048–59, May 1999.
- [430] T. Sakaki, U. Zähringer, D. C. Warnecke, A. Fahl, W. Knogge, and E. Heinz, “Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress,” *Yeast*, vol. 18, no. 8, pp. 679–695, Jun. 2001.
- [431] M. Thumm, “Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy,” *Microsc. Res. Tech*, vol. 51, no. 6, pp. 563–572, Dec. 2000.
- [432] A. R. Kulachkovsky, O. M. Moroz, and A. A. Sibirny, “Impairment of Peroxisome Degradation in *Pichia methanolica* Mutants Defective in Acetyl-CoA Synthetase or Isocitrate Lyase,” *Yeast*, vol. 13, no. 11, pp. 1043–1052, Sep. 1997.
- [433] O. P. Ishchuk *et al*, “Overexpression of pyruvate decarboxylase in the yeast *Hansenula polymorpha* results in increased ethanol yield in high-temperature

- fermentation of xylose,” in *FEMS Yeast Research*, 2008, vol. 8, no. 7, pp. 1164–1174.
- [434] J. H. Stack, P. K. Herman, P. V. Schu, and S. D. Emr, “A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole,” *EMBO J*, vol. 12, no. 5, pp. 2195–204, May 1993.
- [435] P. De Camilli, S. D. Emr, P. S. McPherson, and P. Novick, “Phosphoinositides as regulators in membrane traffic,” *Science*, vol. 271, no. 5255, pp. 1533–9, Mar. 1996.
- [436] P. Burkhard, J. Stetefeld, and S. V. Strelkov, “Coiled coils: a highly versatile protein folding motif,” *Trends Cell Biol*, vol. 11, no. 2, pp. 82–8, Feb. 2001.
- [437] D. J. Klionsky, “The molecular machinery of autophagy: unanswered questions,” *J Cell Sci*, vol. 118, pp. 7–18, Jan. 2005.
- [438] Kulachkovsky A, Stasyk O, Ksheminska G, Fayura L, Moroz O, and Sibitny A, “Nutrition and ultrastructure of the mutants of methylotrophic yeasts defective in biogenesis and degradation of peroxisomes,” *Food technol. biotechnol*, vol. 36, no. 1, pp. 19–26, 1998.
- [439] O. G. Stasyk and O. V. Stasyk, “Selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* requires sterolglucosyltransferase ATG26,” *Stud. Biol*, vol. 5, no. 2, pp. 93–104, Jun. 2011.
- [440] O. B. Стасик and A. A. Сибірний, “Механізми біогенезу та деградації пероксисом у дріжджів,” *Вісник Наукового товариства ім. Т.Г. Шевченка*, vol. 10, pp. 271–283, 2003.
- [441] C. Abbas, A. A. Sibirny, A. Voronovsky, O. Stasyk, O. P. Ishchuk, and O. B. Ryabova, “(12) United States Patent,” 2011.
- [442] R. J. Tower, A. Fagarasanu, J. D. Aitchison, and R. A. Rachubinski, “The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast,” *Mol Biol Cell*, vol. 22, no. 10, May

2011.

- [443] V. I. Titorenko and R. A. Rachubinski, "The life cycle of the peroxisome," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 357–368, May 2001.
- [444] B. V. Geisbrecht, C. S. Collins, B. E. Reuber, and S. J. Gould, "Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 15, pp. 8630–5, Jul. 1998.
- [445] I. Grimm, R. Erdmann, and W. Girzalsky, "Role of AAA(+)-proteins in peroxisome biogenesis and function," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 5, pp. 828–37, May 2016.
- [446] T. Y. Nazarko, "Pexophagy is responsible for 65% of cases of peroxisome biogenesis disorders," *Autophagy*, vol. 13, no. 5, pp. 991–994, May 2017.
- [447] A. F. Neuwald, L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin, "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes," *Genome Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 27–43, Jan. 1999.
- [448] T. Ogura and A. J. Wilkinson, "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function," *Genes Cells*, vol. 6, no. 7, pp. 575–97, Jul. 2001.
- [449] C. U. Lenzen, D. Steinmann, S. W. Whiteheart, and W. I. Weis, "Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein," *Cell*, vol. 94, no. 4, pp. 525–36, Aug. 1998.
- [450] M. Veenhuis *et al.*, "Peroxisomal remnants in peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*," *FEBS Lett.*, vol. 383, no. 1–2, pp. 114–118, Mar. 1996.
- [451] J. M. Nuttall, A. M. Motley, and E. H. Hettema, "Deficiency of the exportomer components Pex1, Pex6, and Pex15 causes enhanced pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*," *Autophagy*, vol. 10, no. 5, pp. 835–845, May 2014.
- [452] N. Matsumoto *et al.*, "The peroxin Pex6p gene is impaired in peroxisomal biogenesis disorders of complementation group 6," *J. Hum. Genet.*, vol. 46, no. 5,

- pp. 273–277, Apr. 2001.
- [453] Z. Zhang *et al*, “Genomic structure and identification of 11 novel mutations of the PEX6 (peroxisome assembly factor-2) gene in patients with peroxisome biogenesis disorders,” *Hum. Mutat*, vol. 13, no. 6, pp. 487–496, 1999.
- [454] C. Walter *et al*, “Disorders of Peroxisome Biogenesis Due to Mutations in PEX1: Phenotypes and PEX1 Protein Levels,” *Am. J. Hum. Genet*, vol. 69, no. 1, pp. 35–48, Jul. 2001.
- [455] S. TAMURA *et al*, “Phenotype–genotype relationships in peroxisome biogenesis disorders of PEX1-defective complementation group 1 are defined by Pex1p–Pex6p interaction,” *Biochem. J*, vol. 357, no. 2, p. 417, Jul. 2001.
- [456] H. Wei, S. Kemp, M. C. McGuinness, A. B. Moser, and K. D. Smith, “Pharmacological induction of peroxisomes in peroxisome biogenesis disorders,” *Ann. Neurol*, vol. 47, no. 3, pp. 286–96, Mar. 2000.
- [457] V. Y. Nazarko, O. D. Pochapinsky, T. Y. Nazarko, O. V Stasyk, and A. A. Sibirny, “Isolation and characterization of cold sensitive pex6 mutant of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*.”
- [458] O. M. Demkiv *et al*, “Construction of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strains over-producing formaldehyde dehydrogenase,” *Biopolym. Cell*, vol. 21, no. 6, pp. 525–530, Nov. 2005.
- [459] G. J. Haan, R. van Dijk, J. A. K. W. Kiel, and M. Veenhuis, “Characterization of the *Hansenula polymorpha* PUR7 gene and its use as selectable marker for targeted chromosomal integration,” *FEMS Yeast Res*, vol. 2, no. 1, pp. 17–24, Mar. 2002.
- [460] X. Tan, H. R. Waterham, M. Veenhuis, and J. M. Cregg, “The *Hansenula polymorpha* PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation,” *J. Cell Biol*, vol. 128, no. 3, pp. 307–19, Feb. 1995.
- [461] S. Schaefer *et al*, “Recombinant hepatitis B Vaccines – Disease Characterization and Vaccine Production,” in *Hansenula polymorpha*, Weinheim, FRG: Wiley-

VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 175–210.

- [462] О. Г. Стасик, О. В. Стасик, and А. А. Сибірний, “Регуляція вуглецевими субстратами промотору гена алкогольоксидази у мутантів дріжджів *Hansenula polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією,” *Біополімери і клітина*, vol. 18, no. 2, pp. 155–160, 2002.
- [463] Z. A. Janowicz *et al*, “Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*,” *Yeast*, vol. 7, no. 5, pp. 431–43, Jul. 1991.
- [464] P. Brocke *et al*, “Recombinant Hepatitis B Vaccines: Disease Characterization and Vaccine Production,” in *Production of Recombinant Proteins*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 319–359.
- [465] M. V Gonchar, M. M. Maidan, O. M. Moroz, J. R. Woodward, and A. A. Sibirny, “Microbial O₂- and H₂O₂-electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements,” *Biosens. Bioelectron*, vol. 13, no. 9, pp. 945–52, Oct. 1998.
- [466] O. M. Moroz, M. V Gonchar, and A. A. Sibirny, “Efficient bioconversion of ethanol to acetaldehyde using a novel mutant strain of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*,” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 68, no. 1, pp. 44–51, Apr. 2000.
- [467] H. el-Enshasy, K. Hellmuth, and U. Rinas, “GpdA-promoter-controlled production of glucose oxidase by recombinant *Aspergillus niger* using nonglucose carbon sources,” *Appl. Biochem. Biotechnol*, vol. 90, no. 1, pp. 57–66, Jan. 2001.
- [468] A. Vassileva, D. Arora Chugh, S. Swaminathan, and N. Khanna, “Effect of Copy Number on the Expression Levels of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif*, vol. 21, no. 1, pp. 71–80, Feb. 2001.
- [469] J. M. Cregg *et al*, “High-Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*,” *Nat. Biotechnol*, vol. 5, no. 5, pp. 479–485, May 1987.

- [470] T. Kjeldsen, "Yeast secretory expression of insulin precursors," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 3, pp. 277–86, Sep. 2000.
- [471] M. Mansur *et al.*, "Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 27, no. 5, pp. 339–45, Mar. 2005.
- [472] R. J. S. Baerends, G. J. Sulter, T. W. Jeffries, J. M. Cregg, and M. Veenhuis, "Molecular characterization of the *Hansenula polymorpha*FLD1 gene encoding formaldehyde dehydrogenase," *Yeast*, vol. 19, no. 1, pp. 37–42, Jan. 2002.
- [473] J. Klabunde, G. Kunze, G. Gellissen, and C. P. Hollenberg, "Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element," *FEMS Yeast Res.*, vol. 4, no. 2 SPEC.ISS, pp. 185–193, Nov. 2003.
- [474] A. I. Bogdanova, M. O. Agafonov, and M. D. Ter-Avanesian, "Plasmid instability in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: the capture of chromosomal DNA fragments by integrative plasmids," *Mol. Biol. (Mosk)*, vol. 34, no. 1, pp. 28–35, 2000.
- [475] U. Weydemann *et al.*, "High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*-authentic processing of three different preprohirudins," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 44, no. 3–4, pp. 377–85, Dec. 1995.
- [476] C. B. Brachmann *et al.*, "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications," *Yeast*, vol. 14, no. 2, pp. 115–32, Jan. 1998.
- [477] J. L. Cereghino and J. M. Cregg, "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 45–66, Jan. 2000.
- [478] G. Gellissen, A. W. M. Strasser, and M. Suckow, "Key and Criteria to the Selection of An Expression Platform," in *Production of Recombinant Proteins*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 1–5.

- [479] A. J. Sunga and J. M. Cregg, "The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*," *Gene*, vol. 330, pp. 39–47, Apr. 2004.
- [480] J. H. Sohn *et al*, "A novel autonomously replicating sequence (ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1," *J. Bacteriol*, vol. 178, no. 15, pp. 4420–4428, 1996.
- [481] C. P. Kurtzman, "A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolyomorpha*, the ascosporic state of *Candida parapolyomorpha*," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 100, no. 3, pp. 455–462, Oct. 2011.
- [482] O. O. Kurylenko *et al*, "Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, p. 197, Dec. 2018.
- [483] О. С. Красовська, С. П. Федосюк, О. В. Стасик, А. А. Сибірний, "Нова система селекції мультикопійних інтегрантів у дріжджів *Hansenula polymorpha* на основі ауксотрофного та ензиматичного маркерів," *Збірник наукових праць „Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» з'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів*, vol. 1, pp. 355–359, 2007.
- [484] О. С. Красовська *et al*, "Конструювання продуцентів амінооксидази дріжджів *Hansenula polymorpha* як біоселективного елемента сенсорів на біогенні аміни," *Дослідження в галузі сенсорних систем та технологій. Збірник наукових праць НАН України*, pp. 125–133, 2006.
- [485] D. E. Bassett *et al*, "Exploiting the complete yeast genome sequence," *Curr. Opin. Genet. Dev*, vol. 6, no. 6, pp. 763–6, Dec. 1996.
- [486] P. F. Cliften, R. S. Fulton, R. K. Wilson, and M. Johnston, "After the Duplication: Gene Loss and Adaptation in *Saccharomyces* Genomes," *Genetics*, vol. 172, no. 2, pp. 863–872, Feb. 2006.

- [487] X. Escalera-Fanjul, H. Quezada, L. Riego-Ruiz, and A. González, “Whole-Genome Duplication and Yeast’s Fruitful Way of Life,” *Trends Genet*, vol. 35, no. 1, pp. 42–54, Jan. 2019.
- [488] A. J. Schifferdecker, S. Dashko, O. P. Ishchuk, and J. Piškur, “The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*,” *Yeast*, vol. 31, no. 9, pp. 323–332, Sep. 2014.
- [489] M. Johnston, H. Kim, and J.-H. Kim, “Nutrient Sensing through the Plasma Membrane of Eukaryotic Cells,” *Biochem. Soc. Trans*, vol. 33, no. September 2004, pp. 247–252, 2005.
- [490] K. Gunkel, R. van Dijk, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei, “Routing of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 1347–55, Mar. 2004.
- [491] M. S. Ebberink, J. Kofster, R. J. A. Wanders, and H. R. Waterham, “Spectrum of *PEX6* mutations in Zellweger syndrome spectrum patients,” *Hum. Mutat*, vol. 31, no. 1, pp. E1058–E1070, Jan. 2010.
- [492] C. Rebnegger *et al*, “In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response,” *Biotechnol. J*, vol. 9, no. 4, pp. 511–25, Apr. 2014.

ДОДАТОК 1

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА:

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**)
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**)
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**)
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**)
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**)

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.
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 HprGcr1 і HprHxs1 дріжджів *Hansenula polymorpha*. *Біологічні Студії*. 2012. Т. 6, № 2, С. 33–44.
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.
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**)
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**).
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**)
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**).

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**)
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**)
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**)
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.
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**)
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.
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.
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**).
 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**).
 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**)
 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.
 24. Nazarko V. Y, Pochapinsky O. D., Nazarko T. Y., **Stasyk O. V.**, Sibirny A. A. Isolation and characterization of cold sensitive *pex6* mutant of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Biopolymers and Cells*. 2002. Vol. 18, P. 131–134.
 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**).
 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**).
 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)

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. Sybirny. Springer International Publishing AG, 2017. P. 325–350. DOI 10.1007/978-3-319-58829-2.

Патенти:

1. Abbas C., Sybirny 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.
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.

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

1. Stasyk O. G., Sybirny 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 Congresss 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.

ДОДАТОК 2

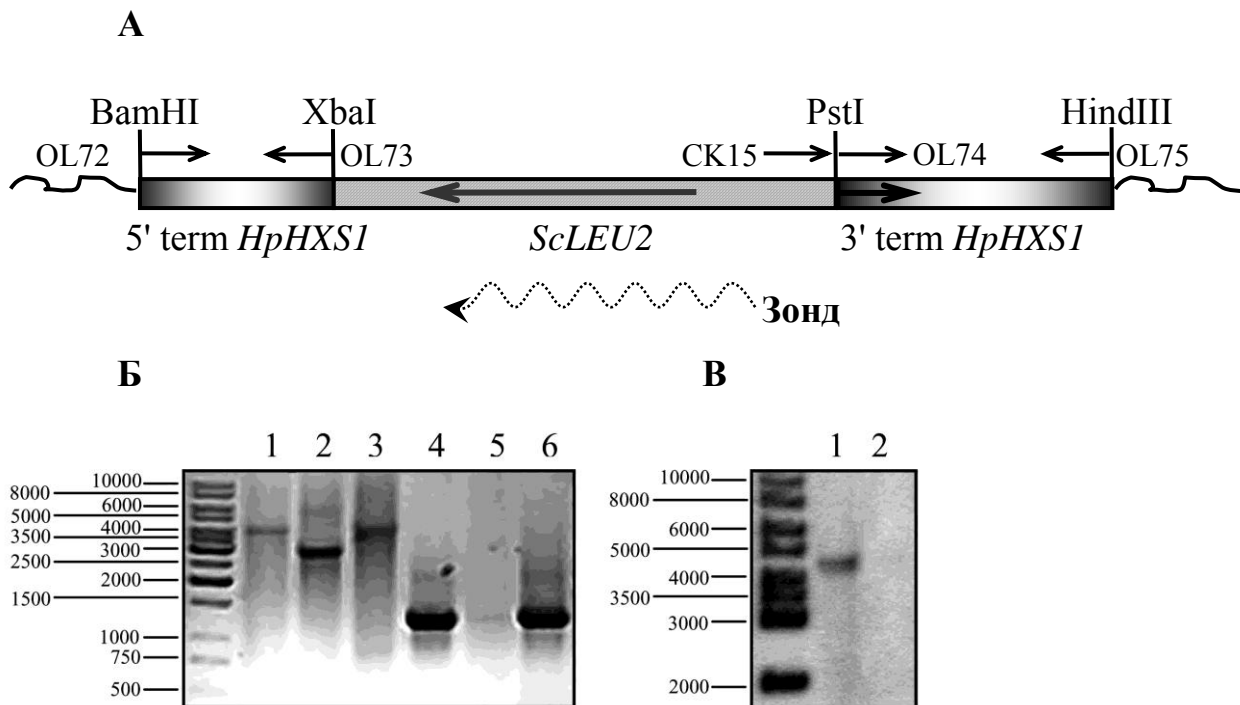


Рис. 2.7.1. Конструювання делеційного штаму *H. polymorpha* $\Delta hxs1$. **(А)** Схема делеційної касети в складі вектора рОН11. Напрямки транскрипції *HpHXS1*, *ScLEU2* позначені стрілками; геномна ДНК, що фланкує делеційну касету після інтеграції в геном – хвилятсою лінією. **(Б)** Електрофорез фрагментів ДНК, утворених в ПЛР з сумарної ДНК штамів дикого типу та мутанта $\Delta hxs1$, з використанням праймерів OL72/OL75 (доріжки: № 1 – $\Delta hxs1$, № 3 – штам дикого типу, № 3 – рОН11), та праймерів СК15/OL75 (доріжки: № 4 – $\Delta hxs1$, № 5 – штам дикого типу, № 6 – рОН11). **(В)** Саузерн-блот аналіз геномних ДНК штамів $\Delta hxs1$ (доріжка № 1) та штаму дикого типу (доріжка № 2), обролених рестриктазою HindIII. Фрагмент гену *ScLEU2*, розміром 1,4 т.п.н, ампліфікований з рУТ1, слугував зондом.

Праймери, що були використані в дослідженнях по генах *HpHXS1* та *HpHXT1*

Ген	Назва Праймера	Послідовність
Молекулярне клонування		
<i>HpHXS1</i>	OL72	5'-TGTGGATCCAAAGCTTAAGGAGACGCT-3'
<i>HpHXS1</i>	OL73	5'-GGTTCTAGATAATATGGGCACAGGGA-3'
<i>HpHXS1</i>	OL74	5'-TAACTGCAGCAGTGCTCGGGAATTAAT-3'
<i>HpHXS1</i>	OL75	5'-TGGAAGCTTCCTATGATCAACATCTAC-3'
<i>HpHXS1</i>	OG1	5'-TGGAAGCTTATGTTCGACAGAAGCTCGAGA-3'
<i>HpHXS1</i>	OG2	5'-GGTGAATTCCTTATTGTCCATGGCTATGT-3'
<i>HpHXS1</i>	OG3	5'-GGTGAATTCCTTACTTGAAATACATGGAC-3'
<i>HpHXS1</i>	OG4	5'-GGTGAATTCCTTAGTATTCGCTCAGGTGC-3'
<i>HpHXS1</i>	OL178	5'-TGTGGATCCTCAGCTCTTACAAGACCATC-3'
<i>HpHXS1</i>	OL179	5'-CAGATCCT(C→T)TGATCCACTTGGGCGACA-3'
<i>HpHXS1</i>	OL180	5'-GGATCA(G→A)AGGATCTGTGATTTTCGTTTTACC-3'
<i>HpHXS1</i>	OL181	5'-TATGCGGCCGCTCGGTGGTCTTCATTT-3'
<i>HpHXT1</i>	OG5	5'-AACAAAGCTTATGTCTAACGCGGATCAA-3'
<i>HpHXT1</i>	OG6	5'-GAAGAGCTCTTTATCTATCAGTCAATAA-3'
<i>HpHXT1</i>	OL80	5'-AACCAATTGATGTCTAACGCGGATCA-3'
<i>HpHXT1</i>	OL108	5'-TGTGGATCCGAATTTACTCTTTGGTTC-3'
<i>HpHXT1</i>	OL109	5'-GGTTCTAGAGAGAATAAACTAGGGAG-3'
<i>HpHXT1</i>	OL110	5'-TAACTGCAGATCCAAACCAGAGTGTG-3'
<i>HpHXT1</i>	OL111	5'-TGGAAGCTTAAATGCCTGCAAGCGAG-3'
<i>ScLEU2</i>	CK15	5'-TGTAATTGTTGGGATTCC-3'
<i>ScLEU2</i>	K22	5'-TGCTCTAGAAGGTGGTTAGCAATCGTC-3'
<i>ScLEU2</i>	KD21	5'-CTAGTCTAGAGTGTGGTGCCTCCTCCTTG-3'
Нозерн-блот		
<i>HpHXS1</i>	HP39F	5'-ATGCTCACAGGCATGCTT-3'
<i>HpHXS1</i>	HP40R	5'-ATAGCTCGTCCACCTCCT-3'
<i>HpHXT1</i>	HP43F	5'-AATCCTTGCAGCAACTGT-3'
<i>HpHXT1</i>	HP44R	5'-TGTAGTCGATGTACAGCT-3'
<i>HpACT1</i>	HP41F	5'-AGATACCCAATTGAGCAC-3'
<i>HpACT1</i>	HP42R	5'-CATTCCTCTCAGCAATACC-3'
Кількісна ПЛР (Q-PCR)		
<i>HpHXS1</i>	F- <i>HXS1</i>	5'-CGAGCTATTCAGGGTGTGCAA-3'
<i>HpHXS1</i>	R- <i>HXS1</i>	5'-CCTCGTTCTCCTGCGTTTCT-3'
<i>HpHXT1</i>	F- <i>HXT1</i>	5'-GTATCGGTATGGCCGTGTGTT-3'
<i>HpHXT1</i>	R- <i>HXT1</i>	5'-CCAAACTCGCCCTTGTACAGA-3'
<i>HpACT1</i>	F- <i>ACT1</i>	5'-TGTCGTCCCAGTTGGTAACG-3'
<i>HpACT1</i>	R- <i>ACT1</i>	5'-GGCCCAATCCAAGAGAGGTAT-3'

Штами дріжджів використані в дослідженнях по *HpHXS1*

Штам	Генотип
	<i>H. polymorpha</i>
NCYC 495 <i>leu1-1</i>	-//-
<i>gcr1Δ</i>	<i>gcr1Δ::ScLEU2leu1-1met6</i>
<i>hxs1Δ</i>	<i>hxs1Δ::ScLEU2leu1-1</i>
<i>hxs1Δ/Hxs1^{R203K}</i>	<i>hxs1Δ::ScLEU2leu1-1</i> , pOH13 (pGLG578+ <i>HpHXS1-1</i>)
<i>hxs1Δ/Hxs1ΔC38</i>	<i>hxs1Δ::ScLEU2leu1-1</i> , pOH17 (pPICZB+ <i>HpHXS1Δ1</i>)
<i>hxs1Δ/Hxs1ΔC95</i>	<i>hxs1Δ::ScLEU2leu1-1</i> , pOH18 (pPICZB+ <i>HpHXS1Δ2</i>)
<i>hxs1Δ/Hxs1^{R203K}ΔC95</i>	<i>hxs1Δ::ScLEU2leu1-1</i> , pOH19 (pPICZB+ <i>HpHXS1-1Δ2</i>)
<i>tup1Δ</i>	<i>tup1Δ::HpURA3ura3leu1-1</i>
<i>hxt1Δ</i>	<i>hxt1Δ::ScLEU2leu1-1</i>
	<i>S. cerevisiae</i>
VW1A	<i>MATα leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8C SUC2</i>
	<i>leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8C SUC2 hxt17Δ</i>
EBY.VW4000	<i>hxt13Δ hxt15Δ hxt16Δ hxt14Δ hxt12Δ hxt9Δ hxt11Δ hxt10Δ</i> <i>hxt8Δ hxt514Δ hxt2Δ hxt367Δ gal2Δ slt1Δ agt1Δ ydl247Δ</i>
EBY.VW4000/ <i>HpGcr1</i>	EBY.VW4000, plasmid pOH20 (pBM2974+ <i>HpGCR1</i>)
EBY.VW4000/ <i>HpHxs1</i>	EBY.VW4000, plasmid pOH15 (pBM2974+ <i>HpHXS1</i>)
EBY.VW4000/ <i>HpHxt1</i>	EBY.VW4000, plasmid pOH16 (pBM2974+ <i>HpHXT1</i>)
EBY.VW4000/ <i>ScSnf3</i>	EBY.VW4000, plasmid pBM3135 (pBM2974+ <i>ScSNF3</i>)
EBY.VW4000/ <i>ScHxt1</i>	EBY.VW4000, plasmid pBM3362 (pBM2974+ <i>ScHXT1</i>)

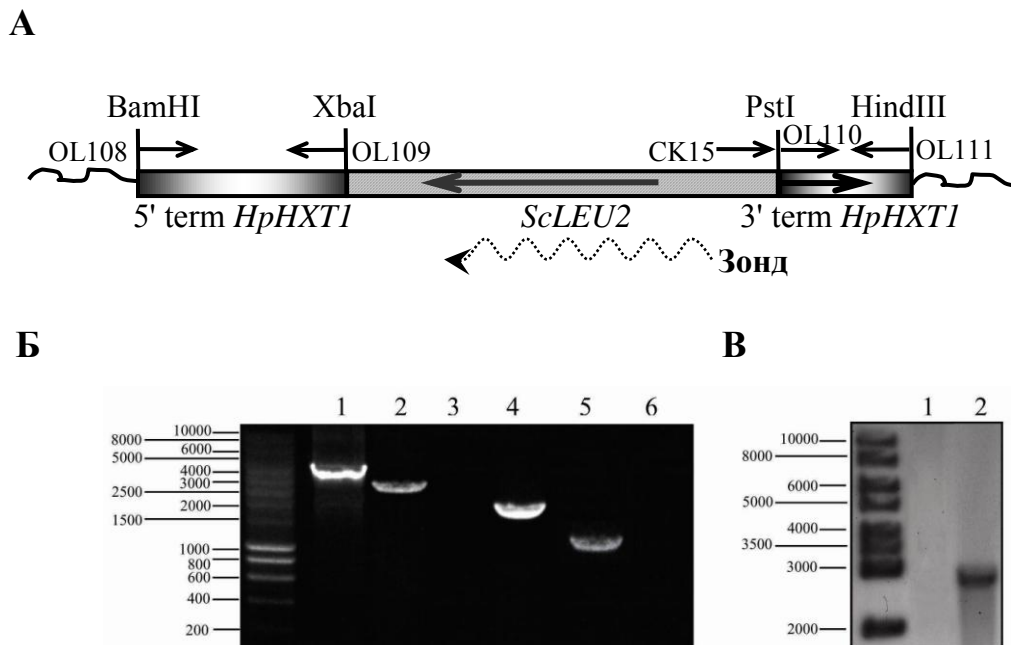


Рис. 2.7.2. Конструювання делеційного штаму *H. polymorpha* $\Delta hxt1$. **(А)** Схема делеційної касети у складі вектора рОН14. Напрямок транскрипції генів *HpHXT1* та *ScLEU2* вказано стрілками; геномна ДНК, що фланкує делеційну касету після інтеграції в геном – позначена хвилястою лінією. **(Б)** електрофоретичний аналіз фрагментів ДНК, отриманих у ПЛР реакції з тотальною ДНК штамів дикого типу та мутантів $\Delta hxt1$ з використанням пар праймерів OL108/OL111 (доріжки: № 1 – $\Delta hxt1$, № 2 – штам дикого типу), та OL80/OL111 (доріжки: № 3 – $\Delta hxt1$, № 4 – штам дикого типу), та праймерів CK15/OL111 (доріжки: № 5 – $\Delta hxt1$, № 6 – штам дикого типу). **(С)** Саузерн-блот аналіз геномної ДНК із штамів дикого типу (доріжка № 1) та $\Delta hxt1$ (доріжка № 2), оброблених ендонуклеазою PstI. Фрагмент *ScLEU2* було використано як зонд.

Штами дріжджів використані в дослідженні *HpGCR1*

Назва штаму	Геноти
<i>Hansenula polymorpha</i>	
WT – wild type (NCYC 495, prototroph)	<i>leu1-1::ScLEU2 leu1-1</i>
<i>gcr1Δ</i>	<i>gcr1::ScLEU2 leu1-1 met6</i>
<i>gcr1Δ</i> / <i>HpGcr1</i> ^{R165K}	<i>gcr1::ScLEU2 GCR1-1 leu1-1 met6</i>
<i>gcr1Δ</i> / P _{GAPDH} - <i>HpHXT1</i>	<i>gcr1::ScLEU2 leu1-1 met6 P_{GAPDH}-HpHXT1</i>
NCYC495 / P _{GAPDH} - <i>HpGCR1</i>	<i>leu 1-1 Zeo^R P_{GAPDH}-HpGCR1</i>
NCYC495 / P _{GAPDH} - <i>HpHXT1</i>	<i>leu 1-1 Zeo^R P_{GAPDH}-HpHXT1</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
WT – wild type (JT20131)	<i>MATα ade2-101 his3Δ200 lys2-801 leu2,3-112 trp1-901 tyr1-501 ura3-52 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3Δ1 MAL2-8C SUC2 hxt17Δ hxt13Δ hxt15Δ hxt16Δ hxt14Δ hxt12Δ hxt9Δ hxt11Δ</i>
<i>hxt</i> -null (EBY.VW4000)	<i>hxt10Δ hxt8Δ hxt514Δ hxt2Δ hxt367Δ gal2Δ slt1Δ agt1Δ ydl247Δ yjr160cΔ (hxt-null genotype)</i>
<i>hxt</i> -null / P _{MET25} - <i>GFP</i>	<i>hxt</i> -null genotype + <i>URA3 P_{MET25}-yEGFP3-His-tag-T_{CYC1}</i>
<i>hxt</i> -null / P _{MET25} - <i>HpGCR1-GFP</i>	<i>hxt</i> -null genotype + <i>URA3 P_{MET25}-yEGFP3-His-tag - HpGCR1-T_{CYC1}</i>
<i>hxt</i> -null / P _{MET25} - <i>HpHXT1-GFP</i>	<i>hxt</i> -null genotype + <i>URA3 P_{MET25}-yEGFP3-His-tag- HpHXT1-T_{CYC1}</i>
<i>hxt</i> -null / P _{MET25} - <i>HpGCR1</i>	<i>hxt</i> -null genotype + <i>URA3 P_{MET25}-His-tag-HpGCR1-T_{CYC1}</i>
<i>hxt</i> -null / P _{MET25} - <i>HpHXT1</i>	<i>hxt</i> -null genotype + <i>URA3 P_{MET25}-His-tag-HpHXT1-T_{CYC1}</i>

ПЛР праймери, використані в дослідженні *HpGCR1*

Назва праймера	Ген	Послідовність праймера
OL82	<i>HpGCR1</i>	5'-TGTGGATCCAAC T TTGTCTCTAAGGTCTT-3'
OL83	<i>HpGCR1</i>	5'-TGGCACCT(C→T)TGATTTTCTTTGGAGAAAAT-3'
OL84	<i>HpGCR1</i>	5'-AAATCAAAGGTGCCATCGT(G→A)TCCGGTTA-3'
OL85	<i>HpGCR1</i>	5'-TATGCGGCCGCTAAAAAAGGTCAACTAC-3'
Ko121	<i>ZeoR</i>	5'-CCCAAGCTTATAACTTCGTATAGCATAC-3'
Ko122	<i>ZeoR</i>	5'-CCCAAGCTTTAATTCGCTTCGGATAAC-3'
Ko123	<i>P_{HpGAPDH}</i>	5'-CCGGAATTCCAATTATCATTAATAATC -3'
Ko124	<i>P_{HpGAPDH}</i>	5'-CGCGAGCTCTTTGTTTCTATATTATC-3'
Ko125	<i>P_{HpGAPDH}</i>	5'-CGCGTCGACTCTAGACAATTATCATTAATAATC-3'
Ko126	<i>P_{HpGAPDH}</i>	5'-CGCGGATTCCTTTGTTTCTATATTATC-3'
Ko127	<i>HpGCR1</i>	5'-CGCGAGCTCTTTGTTTCTATATTATC-3'
Ko128	<i>HpGCR1</i>	5'-TGCTCTAGATTAAAAGTGGTCCGAGGAG-3'
Ko129	<i>HpHXT1</i>	5'-CGCGGATTCATGGCTGGCGGCAGTATTAC-3'
Ko130	<i>HpHXT1</i>	5'-TGCTCTAGAAATCATATCGGGACTCCGCAC-3'
OG17	<i>HpGCR1</i>	5'-TATCTCGAGATGGCTGGCGACAGTATT-3'
OG18	<i>HpGCR1</i>	5'-TATCTCGAGCTATACACTCTCAACGCT-3'
OG19	<i>HpHXT1</i>	5'-GACATCGATATGTCTAACGCGGATCAA-3'
OG20	<i>HpHXT1</i>	5'-CGCATCGATTTAGACCTTTTCAGTGGA-3'
OG21	<i>P_{ScMET25}</i>	5'-TATGAGCTCCGGATGCAAGGGTTCGAA-3'
ID1F	<i>HpACT1</i>	5'-GGCCCAATCCAAGAGAGGTAT-3'
ID2R	<i>HpACT1</i>	5'-CCAAGACAATACCGGTCGTTC-3'
ID3F	<i>HpHXT1</i>	5'-CGGTACAGGTTTGCTCTGT-3'
ID4R	<i>HpHXT1</i>	5'-TGGAATTCTCCACTGTCTCG-3'
ID5F	<i>HpAOX1</i>	5'-ACTACACGTATCCTACGTGC-3'
ID6R	<i>HpAOX1</i>	5'-ACTACACGTATCCTACGTGC-3'

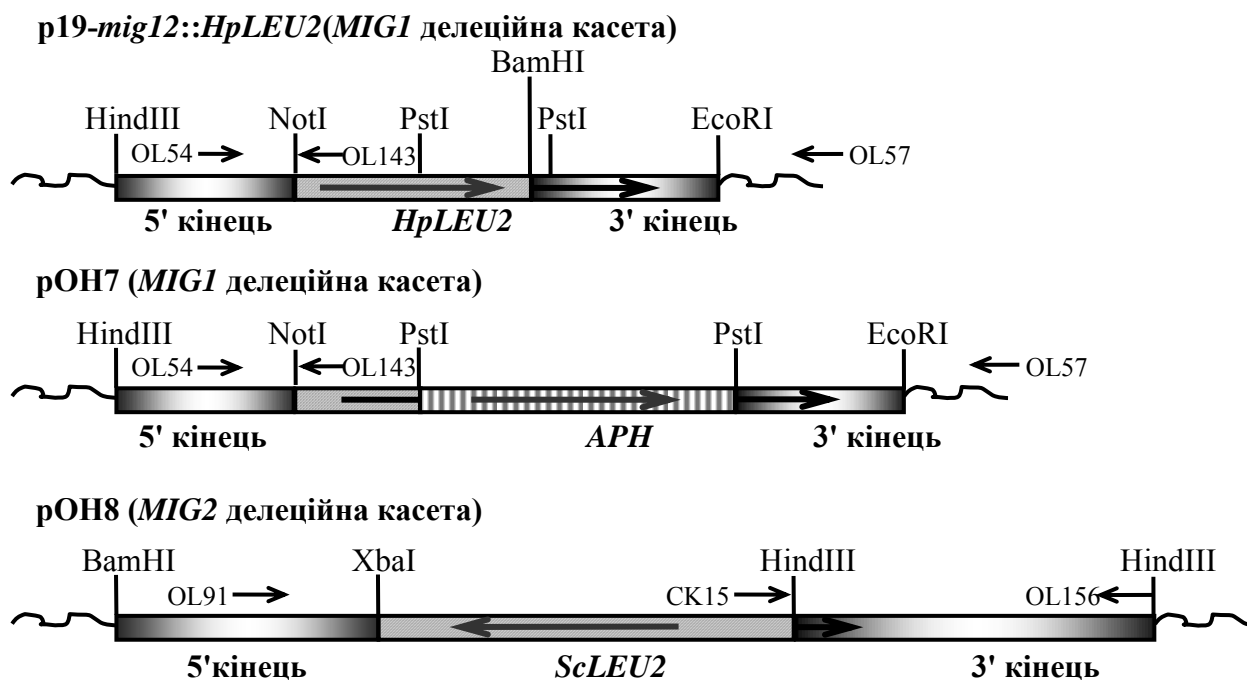


Рис. 2.7.3. Схема конструювання штамів $\Delta mig1$ і $\Delta mig2$ *H. polymorpha*. Гени *HrMIG1*, *HrMIG2*, *HrLEU2*, *ScLEU2* і *APH* та напрямки транскрипції вказані стрілками у плазмідах p19-mig12::*HrLEU2*, pOH7 і pOH8. p19-mig12::*HrLEU2* містить фрагмент довжиною 943 п.н, що включає 5' некодовану ділянку *HrMIG1* гена (HindIII-NotI секція); фрагмент довжиною 991 п.н, що містить 3' некодовану ділянку і коротку кінцеву частину *HrMIG1 ORF* (BamHI-EcoRI секція). pOH7 містить фрагмент довжиною 943 п.н, що включає 5' некодовану ділянку *HrMIG1* гена (HindIII-NotI секція); . фрагмент довжиною 897 п.н, що містить 3' некодовану ділянку і коротку кінцеву частину *HrMIG1 ORF* (PstI-EcoRI секція). pOH8 містить фрагмент довжиною 1,39 т.п.н, що включає 5' некодовану ділянку *HrMIG2* гена (BamHI-XbaI секція); фрагмент довжиною 1,9 т.п.н, що містить 3' некодовану ділянку і коротку кінцеву частину *HrMIG2 ORF* (HindIII-HindIII секція). Геномна ДНК *H. polymorpha* фланкуючих делеційних касет при інтеграції у геном, представлена хвилястою лінією. Вказані назви і положення послідовності праймерів у плазмідних конструкціях і ПЛР аналізі делеційних мутантів.

Праймери, використані при дослідженні генів *MIG1* і *MIG2*

Специфічність гена	Назва праймера	Послідовність
<i>HpMIG1</i>	OL54	5'-TGTGGATCCTTTTTTGGCGTGGATGT-3'
<i>HpMIG1</i>	OL55	5'-GGTTCTAGATCACTCAGAAAACATGG-3'
<i>HpMIG1</i>	OL57	5'-TGGAAGCTTAGAAAGACCTGCTTGCTG-3'
<i>HpMIG1</i>	Mi12Nf	5'-CCCAAGCTTGGTGTAGTTGTCGGAG-3'
<i>HpMIG1</i>	Mi12Nr	5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTACACTGTAGCTACG-3'
<i>HpMIG1</i>	Mi12Cf	5'-CGAGACCTGCATACATG-3'
<i>HpMIG1</i>	Mi12Cr	5'-CCGGAATTCGCATCCCAGAGTACTC-3'
<i>HpMIG2</i>	OL91	5'-AAACTAAAACAGGGATCG-3'
<i>HpMIG2</i>	OL92	5'-AAAATACGACTGCAGCGA-3'
<i>HpMIG2</i>	OL153	5'-TGTGGATCCAAATTTTCACACCTCAGG-3'
<i>HpMIG2</i>	OL154	5'-CCGATATATCTAGAGACGTGCTTCCAT-3'
<i>HpMIG2</i>	OL155	5'-TCCATAGAAAGCTTCTGAACAGCCCCGAAGA-3'
<i>HpMIG2</i>	OL156	5'-GGAAGCTTGAGCTCGAAATATTCCTTCTTTGC-3'
<i>HpLEU2</i>	OL143	5'-GCACAATGTTCTTACTCAT-3'
<i>ScLEU2</i>	CK15	5'-TGTAATTGTTGGGATTCC-3'

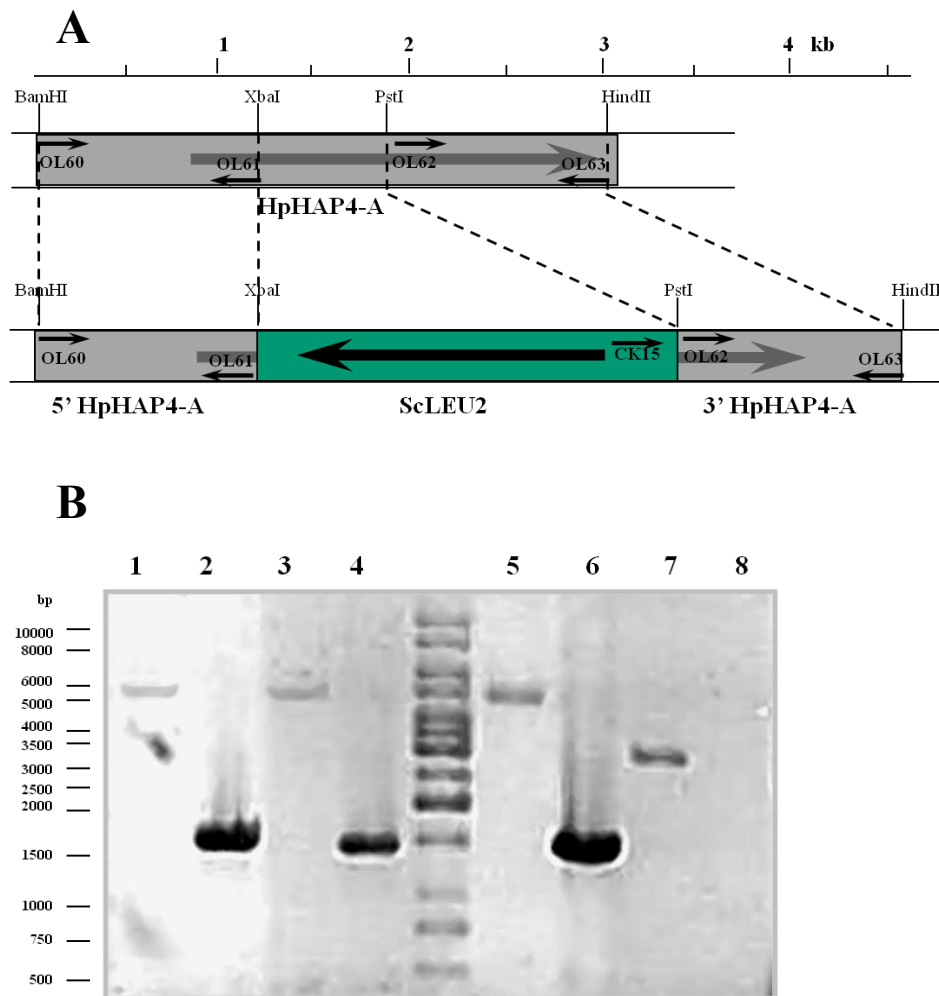


Рис. 2.7.4. Конструювання делеційного мутанта *har4-A* *H. polymorpha*. **(А)** Схематичне зображення локусу *HprHAP4-A* і алеля $\Delta har4-A$. **(В)** Агарозний гель, на якому показані фрагменти, які генеруються за допомогою ПЛР з геномних ДНК *H. polymorpha* дикого штаму (WT) чи штаму $\Delta har4-A$ (Δ) як матриць, використовуючи специфічні праймери штаму дикого типу *HAP4-A* OL60 і OL63 (доріжки 1, 3, 5, 7) чи $\Delta har4-A$ -специфічні праймери OL63 і СК15 (доріжки 2, 4, 6, 8). Доріжки 1, 2 – відповідають ПЛР з ДНК з $\Delta har4_1$ (клон #11), 3, 4 – $\Delta har4-A$ (клон #29), 5, 6 - pYT1-*har4-A*::ScLEU2 плазмідна ДНК з делеційної касети *HprHAP4-A* і 7, 8 – ДНК дикого типу (WT DNA).

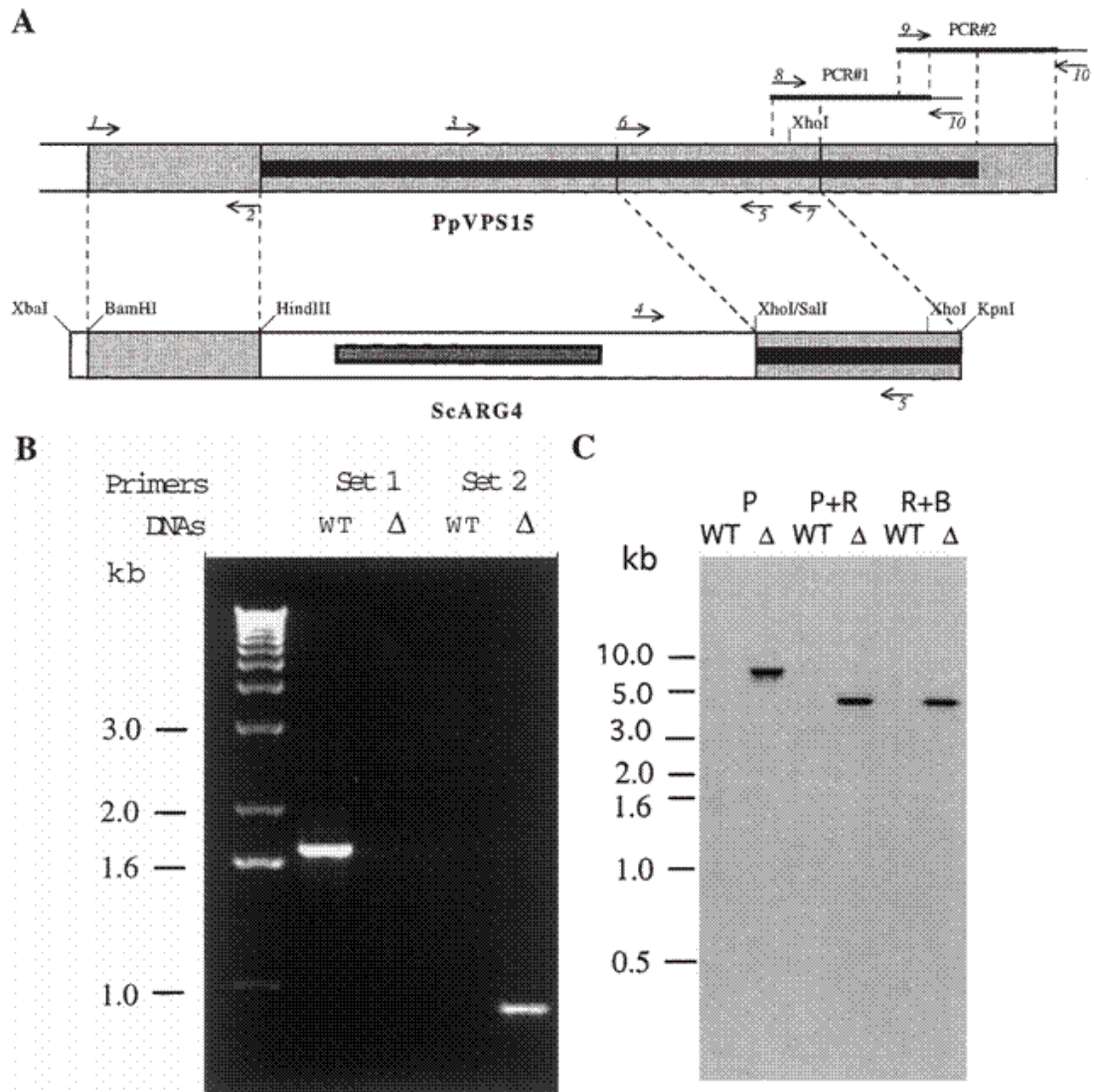


Рис. 2.7.5. Виділення гена *VPS15* *P. pastoris* і конструювання $\Delta vps15$ штаму. (А) Схематичне зображення *VPS15* локусу і $\Delta vps15$ -алеля. ПЛР праймери показані пронумерованими стрілками відповідно до переліку в Таблиці 2.7.6. **(В)** Електрофореграма ПЛР-фрагментів ампліфікації геномної ДНК *P. pastoris* GS200 (WT) або а $\Delta vps15$ штаму використовуючи *VPS15*-специфічний праймер 3 і 5 дикого типу або $\Delta vps15$ -специфічний праймер 4 і 5 (див. А і Таблицю 2.7.6). **(С)** Саузерн блот аналіз геномних ДНК дикого типу (WT) і $\Delta vps15$ штамів (Δ), розщеплених за допомогою відповідних рестриктаз і гібридизованих з міченими зондами, що містять послідовності з *ScARG4* гена. Скорочення назв рестриктаз: EcoRI, – R; PvuII, -P; and BamHI, – B.

ПЛР праймери, використані у дослідженні *PpVPS15*

Генна специфічність	Назва праймера	Послідовність
<i>PpVPS15</i>	1	5'– CgAAgCTTTTACgCTAgAggAATggCgATg –3'
<i>PpVPS15</i>	2	5'– ATggATCCAAATCCCAgATCTCCACACTgg –3'
<i>PpVPS15</i>	3	5'– AAACTCCTTATGATTCTgC –3'
<i>ScARG4</i>	4	5'– TAATTAgAgAgAgggAggAAC –3'
<i>PpVPS15</i>	5	5'– AAATACTgTTgATCCggTg –3'
<i>PpVPS15</i>	6	5'– ACgCgTCgACTCAAAGATTggggAATCgg –3'
<i>PpVPS15</i>	7	5'– CggggTACCgATCATAgAAgTCCAAAATACC –3'
<i>PpVPS15</i>	8	5'– CTTTgATTTgAgAgATATgC –3'
<i>PpVPS15</i>	9	5'– gATAAAAgAgTCATTCTCTgg –3'
<i>PpVPS15</i>	10	5'– TgCgTTgATgCAATTTCTAT –3'

Штами дріжджів, використані у дослідженні ATG28

Штам	Генотип	Посилання
GS115	<i>his4</i>	LinCereghinoetal, 2001
PPY12	<i>arg4 his4</i>	Sakaietal, 1998
DMM1	<i>GS115::pDM1 (P_{AOXI}BFP-SKL, Zeo^R)</i>	Kimetal, 2001
SMD542	<i>P_{AOX}-β-Gal:PpARG4 arg4 his4</i>	Stasyk et al, 2006
GS190	<i>arg4</i>	LinCereghinoetal, 2001
GS200	<i>arg4 his4</i>	LinCereghinoetal, 2001
SMD1163	<i>pep4 prb1 his4</i>	TuttleandDunn, 1995
<i>atg28-52</i>	<i>atg28 his4</i>	Stasyk et al, 2006
<i>Δatg28</i>	<i>Δatg28::ScARG4 arg4 his4</i>	Stasyk et al, 2006
GS115 (GFP-PTS1)	<i>P_{AOX}-GFP-PTS1:PpHIS4 his4</i>	Stasyk et al, 2006
<i>Δatg28</i> (GFP-PTS1)	<i>Δatg28::ScARG4 arg4 his4:P_{AOX}-GFP-PTS1:PpHIS4</i>	Stasyk et al, 2006
<i>Δatg28</i> (Atg28-GFP)	<i>Δatg28:: ScARG4 arg4 his4: Zeo^RP_{ATG28}-ATG28-GFP</i>	Stasyk et al, 2006
SJCF585	<i>PPY12 arg4 his4 Atg28::P_{ATG28}-ATG28-CFP-Kan^R his4::P_{GAPDH}YFP-ATG17-HIS4</i>	Stasyk et al, 2006
SJCF586	<i>Δatg28::ScARG4 P_{ATG28}::P_{ATG28}-ATG28-GFP:: Zeo^R P_{AOXI}:: P_{AOXI}-BFP-PTS1-Blasticidin^R</i>	Stasyk et al, 2006
SJCF588	<i>Δatg28::ScARG4 P_{AOXI}:: P_{AOXI}-BFP-PTS1-Blasticidin^R</i>	Stasyk et al, 2006

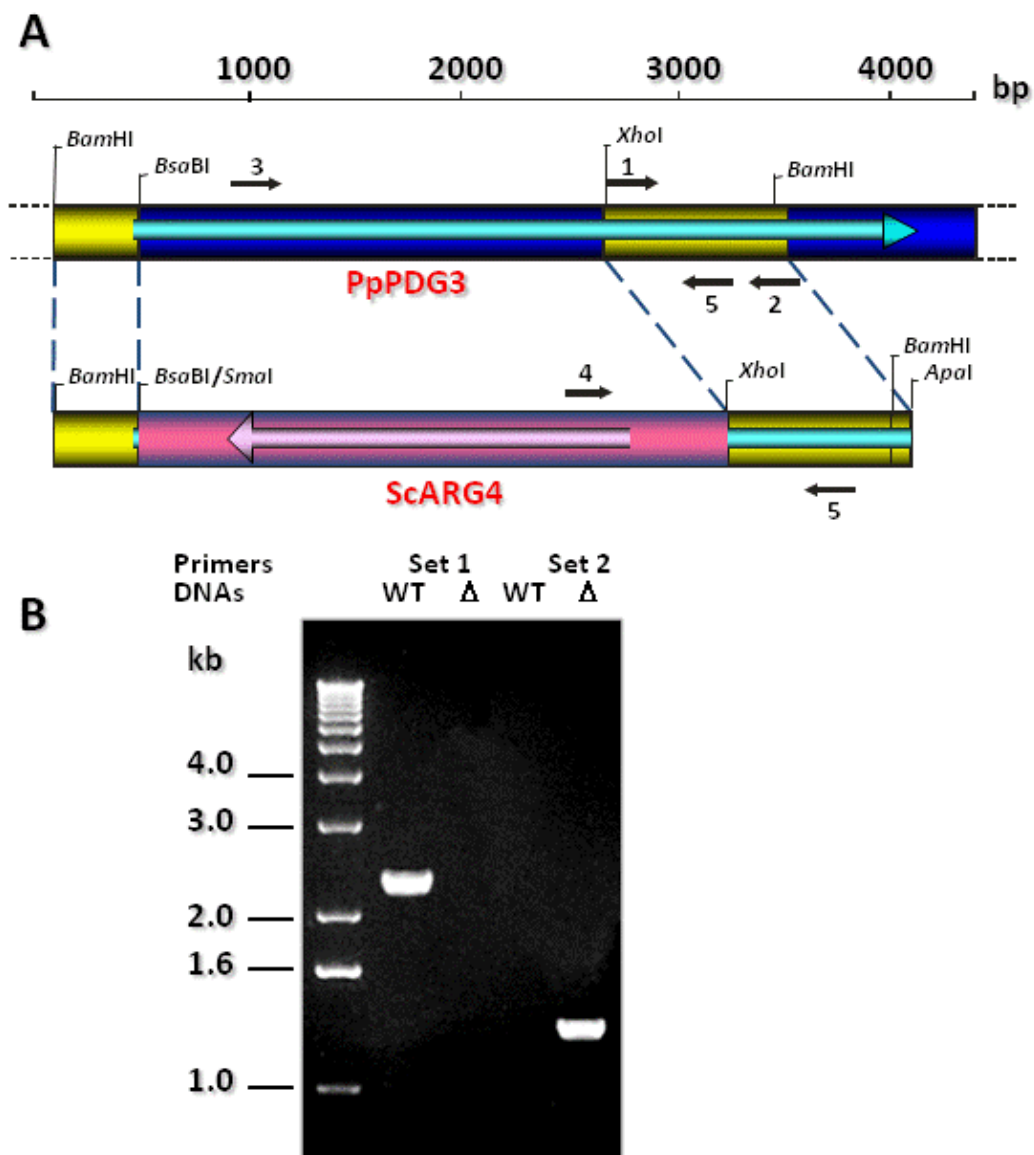


Рис. 2.7.6. Конструювання делеційного мутанта *atg26 P. pastoris*. **(А)** Схема делеції *ATG26/PDG3* гену. ПЛР-праймери, використані в конструюванні і аналізі, показані стрілками та пронумеровані. **(В)** Коректна інтеграція делеційної касети була підтверджена аналізом ПЛР. Електрофореграма показує фрагменти, отримані у ПЛР з геномними ДНК *P. pastoris* GS200 (WT) або Δ *atg26* штама (Δ), що служили матрицями з використанням *ATG26*-специфічних праймерів 3 і 5 (Set1) дикого типу, або Δ *atg26*-специфічних праймерів 4 і 5 (Set2) (див. А щодо їх розміщення). Розмір маркерів ДНК леддера у т.п.н є показаний зліва.

ПЛР приклади, використані у дослідженні *ATG26 H. polymorpha*

Ген	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність
<i>HpATG26</i>	OL68	5'-ATACGCATGCATGCTGCTTATGTTTTTCG-3'
<i>HpATG26</i>	OL69	5'-TAACTGCAGGACTGAGACTGATTAАCT-3'
<i>HpATG26</i>	OL70	5'-GGTTCTAGAAGCCTTGGATCAAGAAAC-3'
<i>HpATG26</i>	OL71	5'-TGTGGATCCTCCCTGATTATTGGAATC-3'
<i>ScLEU2</i>	K22	5'-TGCTCTAGAAGGTGGTTAGCAATCGTC-3'
<i>ScLEU2</i>	KD21	5'-TAGTCTAGAGTGTGGTGCCCTCCTCCTTG-3'

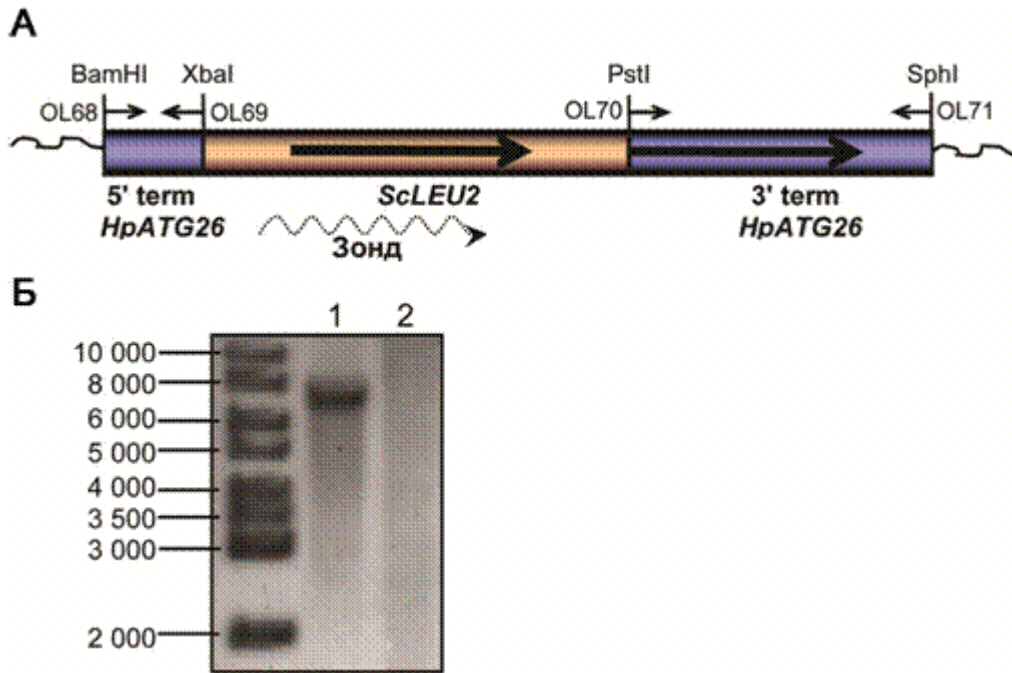


Рис. 2.7.7. Конструювання делеційного штаму *Δatg26 H. polymorpha*. **(А)** Схема делеційної касети з рΥТ1-delta*HpaATG26*. Гени *HpaATG26* і *ScLEU2* і напрямки їх транскрипції позначені стрілками. **(В)** Саузерн-блот-аналіз геномної ДНК, виділеної з *Δatg26* (доріжка # 1), і штаму дикого типу NCYC495 NC1C495 *leu1-1* (доріжка # 2). Фрагмент гена *ScLEU2* довжиною 1.4 т.п.н, ампліфікований з рΥТ1, був використаний як зонд для гібридизації.

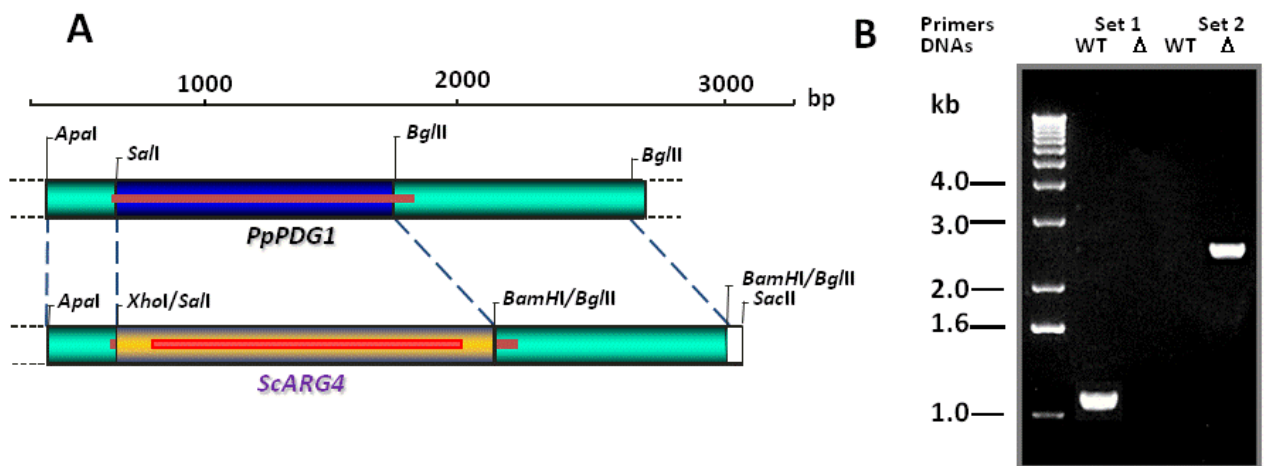


Рис. 2.7.8. Конструювання мутанта *Δpdg1* *P. pastoris* (A) Схематичне зображення сконструйованої нокаутної касети *PDG1* і її верифікація. (B) ПЛР аналіз геномних ДНК штаму дикого штаму (WT) і сконструйованого *Δpdg1* мутанта з двома наборами праймерів: набір 1, специфічний для ДНК дикого штаму і набір 2 – до ДНК делеційного мутанта.

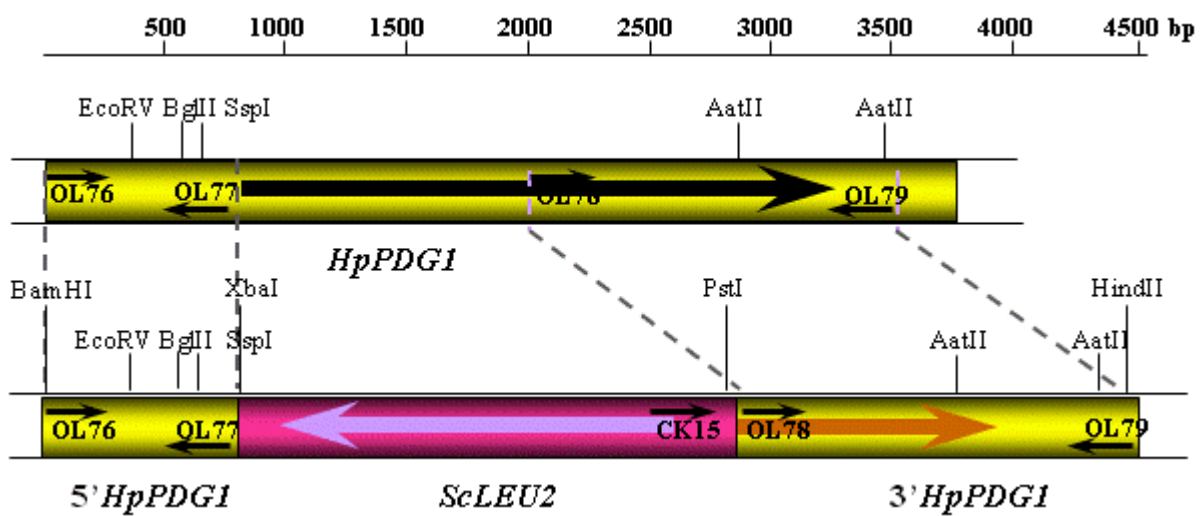


Рис. 2.7.9. Схематичне зображення локусу *HpPDG1* і алелі $\Delta pdg1$.

ПЛР праймери, використані у дослідженні *PDG1 H. polymorpha*

Ген	Назва праймерів	Нуклеотидна послідовність
<i>HpPDG1</i>	OL76	5'-TgTggATCCAgCTggAAAATggCATTT-3'
<i>Hp PDG1</i>	OL77	5'-ggTTCTAgATAgTgATTAATCgCATgAg-3'
<i>Hp PDG1</i>	OL78	5'-TAACTgCAgAAgCTCAACAAACTgACC-3'
<i>Hp PDG1</i>	OL79	5'-TggAAgCTTAAAgAgCAgCAggACCAT -3'
<i>ScLEU2</i>	CK15	5'-TgTAATTgTTgggATTCC-3'