

## ЛОКАЛІЗАЦІЯ МУТАЦІЇ *rib83*, ЩО БЛОКУЄ НАДСИНТЕЗ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ *PICHA GUILLIERMONDII*

Ю. Борецький<sup>1</sup>, Д. Федорович<sup>1</sup>, В. Борецький<sup>1</sup>, Л. Фаюра<sup>1</sup>,  
Ю. Пиняга<sup>1</sup>, А. Сибірний<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України  
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна  
e-mail: boretsky@cellbiol.lviv.ua

<sup>2</sup>Кафедра біотехнології та мікробіології, Жешівський університет  
вул. Цвіклінської, 2, Жешів, 35-601, Польща

Гени *P. guilliermondii*, що потенційно кодують транскрипційні фактори Sef1p та Yap1p, ідентифіковано, клоновано і делетовано. Делеція гена PGUG\_00664.1, що потенційно кодує активатор транскрипції генів антиоксидантного захисту Yap1p, призводить до зниження флавіногенної активності за умов дефіциту заліза у 2,5–3,5 разу та до зниження вмісту негемінового заліза у клітинах приблизно в 1,8–2,2 разу. Делеція гена PGUG\_03868.1, що потенційно кодує активатор транскрипції, ортологічний до білка Sef1p *C. famata* (DEHA0C17930g), повністю блокує здатність штамів *P. guilliermondii* до надсинтезу рибофлавіну. Результати комплементційного аналізу свідчать, що описана раніше мутація *rib83* інактивує цей транскрипційний фактор.

**Ключові слова:** рибофлавін, регуляція біосинтезу, дріжджі *P. guilliermondii*.

*Pichia (Candida) guilliermondii* є одним із представників видів дріжджів, що надсинтезують рибофлавін (РФ) за умов недостатнього забезпечення клітин залізом. До цієї групи дріжджів належать також *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces subglobosus*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida famata*, *Candida albicans* [3, 4, 10, 13, 14]. За послідовністю нуклеотидів штам *Pichia guilliermondii*, із якими проводилась робота, є дуже близькими (приблизно 0,4–0,6% нуклеотидних замінів) до *Candida guilliermondii* ATCC 6260, геном якого просеквеновано повністю. Тому при цитуванні робіт ми дотримуємося назви, яка вживається у тій чи іншій цитованій роботі [2, 4, 11, 13].

Здатність *P. guilliermondii* до схрещування дає змогу застосовувати методи гібридологічного аналізу для дослідження генетичних аспектів регуляції метаболізму [1]. Окрім того, встановлено нуклеотидну послідовність геному цих дріжджів і розроблено методи інсерційного мутагенезу та делеції генів [13]. Таким чином, *P. guilliermondii* є зручним модельним об'єктом для вивчення генетичних механізмів регуляції біосинтезу вітаміну В<sub>2</sub> і гомеостазу заліза.

У *P. guilliermondii* виділено 9 комплементційних груп мутантів (*rib80*, *rib81*, *hit1*, *red1-red6*), що надсинтезують РФ незалежно від вмісту заліза у середовищі, та дві групи мутантів (*rib83*, *rib84*), які нездатні до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза [3, 12]. Цікаво, що пошкодження будь-якого із цих генів призводить до дефектів не тільки в регуляції біосинтезу РФ, але і в транспорті заліза у клітини *P. guilliermondii*. Згадані мутації не ідентифіковано. Деякі із них (*rib80*, *rib81*, *hit1*) призводять до виникнення оксидативного стресу [6], що може свідчити про участь стресового активатора транскрипції Yap1p у регуляції біосинтезу РФ та метаболізму заліза у *P. guilliermondii*. У 2006 році було описано нездатний до надсинтезу РФ інсерційний мутант *C. famata*, що був дефектний за геном *SEF1* [9]. Оскільки обидва види дріжджів продукують підвищені кількості РФ за умов

дефіциту заліза, можна припустити, що ортолог транскрипційного фактора Sef1p задіяний у регуляції біосинтезу РФ також і у *P. guilliermondii*. У даній роботі описано конструювання і дослідження фенотипових характеристик штамів *P. guilliermondii* із делеціями генів, що кодують транскрипційні фактори Yap1p, Sef1p та доведено, що описана раніше мутація *rib83* інактивує транскрипційний фактор Sef1p.

#### Матеріали та методи

У роботі використовувалися бази даних *Candida (Pichia) guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* та *Candida albicans* [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Saccharomyces\\_cerevisiae](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Saccharomyces_cerevisiae) – <http://www.yeastgenome.org/>. Аналіз амінокислотних і нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою пакету програм, доступних за адресами: <http://www.bioinformatics.org/sms/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>.

Для делеції генів використано ауксотрофний за уридином штам *P. guilliermondii* R66 *Mar hisX ura3* [11]. Дріжджі вирощували у синтетичному середовищі, як описано раніше [12]. При вирощуванні ауксотрофних мутантів вносили відповідні амінокислоти й аденін (40 мг/л) і уридин (400 мг/л). Отримання гібридів *P. guilliermondii* та основні принципи сегрегаційного аналізу описані в роботах А. А. Сибірного [1, 12]. Трансформацію дріжджів *P. guilliermondii* з використанням оцтовокислого літію проводили, як описано нами раніше [7]. Екстракцію і визначення негемінового заліза проводили за модифікованим методом Карап і Броді [2]. Вміст флавінів у культуральній рідині та в клітинах визначали флюорометрично на апараті ЕФ-3М.

#### Результати і їхнє обговорення

**Ідентифікація та делеція генів транскрипційних факторів.** У результаті пошуку гомологій до білка Sef1p *C. famata* (*D. hansenii* : *DEHA0C17930g*) у геномі *P. guilliermondii* виявлено кілька генів, що кодують подібні білки. Серед них найбільший інтерес становлять білки, гени яких перелічені у табл. 1. **Із них найбільш подібними є білки, що кодуються генами PGUG\_03868.1, PGUG\_00835.1, PGUG\_05411.1.** Усі вони мають характерну послідовність, здатну формувати Zn(2)-Cys(6) двоядерний кластер і послідовності, притаманні транскрипційним факторам.

Таблиця 1

Потеційні білки *C. guilliermondii* ATCC 6260, що містять послідовності, характерні для білка *D. hansenii* *DEHA0C17930g*

Поліпептид/ген	Ідентичні амінокислотні залишки	Споріднені заміни
PGUG_03868.1	534/936	114/936
PGUG_00835.1	116/472	94/472
PGUG_05411.1	147/713	125/713
PGUG_00677.1	38/142	24/142
PGUG_00104.1	50/210	36/210

Проте поліпептид, що кодується геном PGUG\_00835.1, є меншої довжини (складається із 621 амінокислотного залишка), а два інші є близькими за розміром до Sef1p *C. famata* – 821 та 825 амінокислотних залишків відповідно; при цьому поліпептид PGUG\_03868.1 за рівнем подібності до Sef1p *C. famata* суттєво переважає PGUG\_05411.1. Таким чином, саме ген PGUG\_03868.1, розміщений у послідовності 1115630-1118095–4-го суперконтигу геному *C. guilliermondii* ATCC6260, кодує білок, що є найбільш вірогідним ортологом білка Sef1p *C. famata* (*DEHA0C17930g*).

Фрагмент хромосомної ДНК довжиною 4,7 т.п.н., що містить ген PGUG\_03868.1 (позначений *PgSEF1*) з промоторною і термінаторною послідовностями, ампліфікували за

допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із праймерами, що несли 5'-кінцеві EcoRI-сайти (SEF1 ATGAATTTCATATAGCTTAACTACTTC і SEF2r ACGAATTCGTTGATTTGTGTGACCAC), використовуючи геномну ДНК штаму *C. guilliermondii* ATCC6260 як матрицю. Отриманий фрагмент ДНК гідролізували по EcoRI-сайтах і лігували в EcoRI-сайт плазмиди pUC57.

Для конструювання делеційної касети усю послідовність сконструйованої плазмиди pSEF1, за винятком структурного гена *PgSEF1*, було ампліфіковано з використанням праймерів BseI AAAGATCTTTTAGGGTGAATTAGTG та RBS2 CTAGATCTAGTG ATGACTTTTTGGGG. Даний ПЛР-продукт очищали, гідролізували за допомогою ендонуклеази BglII і лігували з 1,5 т.п.н. BamHI-фрагментом плазмиди pGKURA3, що містить модифікований ген *URA3 S. cerevisiae*. Сконструйована рекомбінантна плазміда pSEF1URA3 містила ген *URA3 S. cerevisiae*, розміщений між промоторною і термінаторною (~1,0 т.п.н. кожна) ділянками гена *PgSEF1*. EcoRI-фрагмент плазмиди pSEF1URA3 використовували як делеційну касету *sef1::URA3* для трансформації *ura3* мутанта (R-66) *P. guilliermondii* (рис. 1).

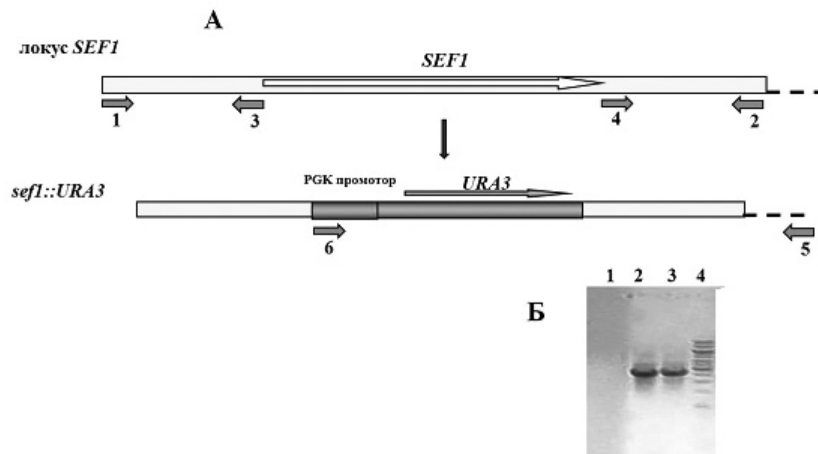


Рис. 1. Схема делеції гена *PgSEF1 P. guilliermondii*. А. Схема конструювання делеційної касети *sef1::URA3*. Положення структурних генів *SEF1* та *URA3* показано стрілками та відповідно підписано. Б. Електрофореграма продуктів ПЛР, отриманих при аналізі коректності делеції гена *PgSEF1*. Доріжка 1 – ДНК-сигнал, отриманий із реципієнтного штаму (праймери JB12 (№ 5) і Ura32r (№ 6); Доріжки 2, 3 – ДНК-сигнали, отримані з рекомбінантних клонів  $\Delta sef1$ -1,  $\Delta sef1$ -2, відповідно; доріжка 4 - 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Для ідентифікації  $\Delta sef1$ -мутантів *P. guilliermondii*, геномну ДНК прототрофних за уридином трансформантів тестували за допомогою ПЛР на присутність «гібридного» ДНК-сигналу, використовуючи праймери Ura32r CGGGATCCGGTAATAACTGATATAATT та JB12 GTTATGACACAAGAAGCAGATAATG (див. рис.1, Б).

Для ідентифікації гена, що кодує ортолог Yarp1p, використали пошук гомологій до двох білків: Yarp1p *S. cerevisiae* та ортолога Car1p, описаного у *C. albicans* [5, 15]. У результаті цього аналізу у *C. guilliermondii* ATCC 6260 в обидвох випадках було виявлено один і той самий білок PGUG\_00664.1. Цей потенційний поліпептид має 165 (27%) ідентичних залишків і 84 (14%) споріднених заміни, порівняно із білком Yarp1p *S. cerevisiae*, а також 221 (42%) ідентичний залишок і 78 (16%) споріднених заміни, порівняно із білком Car1p *C. albicans*; у сумі це становить відповідно 41% та 58% гомології. Незважаючи на

невисокий сумарний ступінь подібності, наявність висококонсервативних послідовностей у N- та C-кінцевих ділянках дає підстави стверджувати, що ген PGUG\_00664.1 (*PgYAP1*), розміщений у послідовності 1164199-1165587 + 1-го суперконтигу геному *C. guilliermondii* ATCC 6260, кодує білок, що є ортологом білків YAP1p *S. cerevisiae* та Cap1p *C. albicans*.

Фрагмент хромосомної ДНК *C. guilliermondii* ATCC6260, довжиною 3,4 т.п.н., що містить ген PGUG\_00664.1 (позначений *PgYAP1*) з промоторною і термінаторною послідовностями, ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з праймерами, що несли 5' кінцеві XbaI-сайти (JB44 GGTCTAGACCGTGAACCTCTTTAT та JB45 CATCTAGATGAATCTTTGGAATAATCGAT) і клонували у XbaI-сайт вектора pUC19. За винятком структурного гена *PgYAP1*, усю послідовність сконструйованої плазмиди pGAP1 було ампліфіковано, використовуючи праймери, що несли 5' кінцеві BglII-сайти (JB46 CAAGATCTTGATTATATAGTTCGTGCATCA та JB47 TCAGATC TGATAAGTTTCGTA AAAAGG), і використано для клонування 1,5 т.п.н. BamHI-фрагмента плазмиди pG-KURA3, що містить ген *URA3 S. cerevisiae* (див. вище). Отримана плазміда pGAP1URA3 містила ген *URA3 S. cerevisiae*, розміщений між промоторною (1,0 т.п.н.) і термінаторною (1,0 т.п.н.) ділянками гена *PgYAP1*. XbaI-фрагмент плазмиди pGAP1URA3 використовували як делеційну касету *yap1::URA3* для трансформації *ura3* мутанта (R-66) *P. guilliermondii*. За допомогою ПЛР аналізу серед прототрофних за уридином трансформантів ідентифікували мутанти, у геномі яких структурний ген *PgYAP1* було заміщено геном *URA3 S. cerevisiae* за механізмом гомологічної рекомбінації. Усі сконструйовані мутанти характеризувалися певними змінами фенотипу, як описано нижче.

**Дослідження сконструйованих мутантів.** За умов оптимального вмісту заліза у середовищі (3,6 мкМ), клітини сконструйованого мутанта  $\Delta yap1-2$  містили негемінового заліза приблизно у два рази менше, ніж вихідний штам дикого типу. Незважаючи на це, сконструйований штам  $\Delta yap1-2$  практично не відрізнявся від вихідного штаму R66 (дикого типу) за продуктивністю флавіногенезу за умов оптимального вмісту заліза у середовищі (рис. 2). Проте за умов дефіциту заліза (0,18 мкМ) або за наявності у середовищі іонів кобальту продуктивність флавіногенезу штаму  $\Delta yap1-2$  була в середньому у 2 рази нижчою ніж у штаму дикого типу (див. рис. 2). Таким чином, делеція гена PGUG\_00664.1 (*PgYAP1*) суттєво знижує, але не блокує повністю надсинтез РФ клітинами *P. guilliermondii*. Отже, фенотип сконструйованих мутантів  $\Delta yap1-2$  є відмінним від фенотипу мутантів *P. guilliermondii*, що несуть мутацію *rib83*.

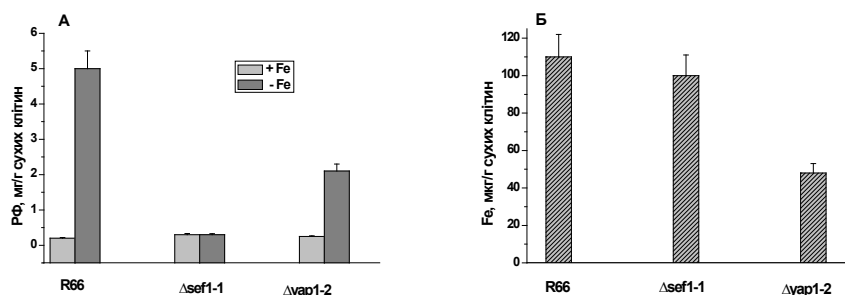


Рис. 2. Продуктивність флавіногенезу (А) та вміст заліза в клітинах (Б) сконструйованих мутантів *P. guilliermondii*.

За умов оптимального забезпечення залізом (3,6 мкМ) сконструйований штам  $\Delta sef1-1$  також практично не відрізнявся від вихідного штаму R66 за продуктивністю флавіногенезу

та за вмістом заліза у клітинах (див. рис. 2). У той же час, мутант  $\Delta sef1-1$  повністю втратив здатність до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза (0,18 мкМ) (рис. 2), що характерно для описаного раніше мутанта *rib83-LV-251* [2]. Тому було проведено генетичний аналіз сконструйованого нами мутанта *P. guilliermondii*  $\Delta sef1-1$  (табл. 2). Для цього мутант *P. guilliermondii*  $\Delta sef1 hisX$  було схрещено зі штамми *P. guilliermondii* L1, *P. guilliermondii* *rib81-130-1* та *P. guilliermondii* *rib83-LV-251*. Виявилось, що всі диплоїди, крім *rib83x*  $\Delta sef1$  (вказано тільки мутації, що мають стосунок до регуляції біосинтезу РФ), зберігали здатність до надсинтезу РФ за умов дефіциту йонів заліза (див. табл. 2). Це свідчить про рецесивний характер мутації  $\Delta sef1$ . У той же час ні диплоїд *rib83x*  $\Delta sef1$ , ні отримані із нього гаплоїдні сегреганти не були здатні до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза.

Раніше було показано, що мутант *P. guilliermondii* *rib83* суттєво не відрізняється від штамів дикого типу за ознаками «швидкість поглинання заліза» та «продуктивність флавіногенезу» за умов фізіологічного забезпечення залізом [2]. Дефіцит заліза в середовищі приводив до зростання швидкості поглинання заліза і клітинами дикого штаму, і клітинами мутанта *rib83-LV-251*. Однак рівень цього зростання (співвідношення швидкості поглинання  $^{55}\text{Fe}$  залізодефіцитними клітинами до швидкості поглинання цього металу залізовмісними клітинами) у мутанта *rib83* був у кілька разів менший, ніж у штаму дикого типу. Ця властивість проявляється також у присутності мутації *rib81*, яка посилює поглинання  $^{55}\text{Fe}$ .

Таблиця 2

Вплив мутації  $\Delta sef1$  на продуктивність флавіногенезу штамів *P. guilliermondii*

Штам*	Походження	Продукція рибофлавіну мкг/мг сухої ваги клітин	
		Вміст заліза у середовищі 3,60мкМ	Вміст заліза у середовищі 0,18мкМ
$\Delta sef1-1$	Дана робота	0,31±0,04	0,31±0,04
R-66	[11]	0,20±0,03	4,5±0,4
<i>rib83-LV-251</i>	[2]	0,31±0,04	0,5±0,05
L2	[12]	0,25±0,04	8,2±0,4
<i>rib81-130-1</i>	[12]	5,50±0,3	8,0±0,4
$\Delta sef1 / SEF1$	Дана робота	0,28±0,04	3,2±0,3
$\Delta sef1 RIB81 / SEF1 rib81$	Дана робота	0,50±0,05	6,3±0,4
$\Delta sef1 rib81$	Дана робота	0,21±0,03	0,23±0,03
$\Delta sef1 RIB83 / SEF1 rib83$	Дана робота	0,09±0,02	0,24±0,03
S1	Дана робота	0,24±0,03	0,30±0,04
S2	Дана робота	0,22±0,03	0,29±0,04
S3	Дана робота	0,25±0,04	0,31±0,04

**Примітка.** \* – вказано тільки мутації та гени, що мають стосунок до регуляції біосинтезу РФ.

Клітини мутантів, які містили в одному гаплоїдному геномі обидві мутації *rib83* та *rib81*, і за умов дефіциту заліза в клітинах, і за умов оптимального забезпечення цим металом, не відрізнялися від штаму із мутацією *rib83* за швидкістю поглинання  $^{55}\text{Fe}$  [2]. Таким чином, мутація *rib83* епістатує над мутацією *rib81* не тільки щодо флавіногенезу, а й щодо асиміляції заліза [2]. Необхідно зауважити, що у достатньо близького виду *C. albicans* ортологічний транскрипційний фактор *Sef1p* задіяний у регуляції транспорту заліза [8].

Отримані нами гаплоїдні сегреганти генотипу *rib81*  $\Delta sef1$ , подібно до раніше описаних сегрегантів *rib81 rib83*, також були нездатними до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза. Таким чином, отримані результати свідчать, що мутація *rib83* лежить у гені *SEF1*.

Підсумовуючи наші результати і наведені дані, можна стверджувати, що мутація *rib83* локалізована у гені *PgSEF1*, який кодує активатор транскрипції, задіяний у регуляції біосинтезу РФ, і поглинання заліза. Можливо, у всіх видів флавіногенних дріжджів ортоло-

ги Sef1р беруть участь у регуляції цих двох ланок метаболізму, проте ця гіпотеза потребує експериментальної перевірки.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сибирный А., Шавловский Г., Киановская Б., Наумов Г. Гибридизация и мейотическое расщепление у парафинусваивающих дрожжей *Pichia guilliermondii* Wickerham // Генетика. 1977. Т. 13. № 2. С. 314–321.
2. Стенчук Н. Н., Куцяба В. И., Киановская Б. В., Федорович Д. В. Влияние мутации *rib83* на биосинтез рибофлавина и ассимиляцию железа у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 1–5.
3. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М. Сверхсинтез флавинов у микроорганизмов и его молекулярные механизмы // Прикл. биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. № 4. С. 435–447.
4. Abbas C., Sibirny A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011. Vol. 75. N 2. P. 321–360.
5. Alarco A., Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. N 3. P. 700–708.
6. Boretsky Y., Protchenko O., Prokopiv T. et al. Mutations and environmental factors affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii* // J. Basic Microbiol. 2007. Vol. 47. N 5. P. 371–377.
7. Boretsky Y., Pynyaha Y., Boretsky V. et al. Development of a transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* // J. Microbiol. Methods. 2007. Vol. 70. N 1. P. 13–9.
8. Chen C., Noble S. Post-transcriptional regulation of the Sef1 transcription factor controls the virulence of *Candida albicans* in its mammalian host // PLoS Pathog. 2012. Vol. 8. N 11. P. 1–11.
9. Dmytruk K. V., Voronovsky A. Y., Sibirny A. A. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. Curr. Genet. 2006. Vol. 50. N 3. P. 183–191.
10. Knight S., Lesuisse E., Stearman R. et al. Reductive iron uptake by *C. albicans*: role of copper, iron and TUP1 regulator // Microbiol. 2002. Vol. 148. N 1. P. 29–40.
11. Pynyaha Y., Boretsky Y., Fedorovych D. et al. Deficiency in frataxin homologue *YFH1* in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to missregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation // Biometals. 2009. Vol. 22. N 6. P. 1051–1061.
12. Sibirny A. A. Chapter 7. *Pichia guilliermondii*. In Nonconventional Yeasts in Biotechnology. Heidelberg: Springer-Verlag. 1996. 489 p.
13. Sibirny A., Boretsky Y. Chapter VI: *Pichia guilliermondii*. In Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Heidelberg: Springer. 2009. 438 p.
14. Tanner F., Voinovich C., Van Lanen J. Riboflavin production by *Candida* species // Science. 1945. Vol. 101. P. 180–181.
15. Wemmie J., Wu A., Harshman K., Parker C., Moye-Rowley W. Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. N 20. P. 14690–14697.

## LOCALIZATION OF MUTATION *rib83* THAT BLOCKS OVER-SYNTHESIS OF RIBOFLAVIN BY YEAST *PICHA GUILLIERMONDII*

Y. Boretsky<sup>1</sup>, D. Fedorovych<sup>1</sup>, V. Boretsky<sup>1</sup>, L. Fayura<sup>1</sup>, Y. Pynyaga<sup>1</sup>, A. Sibirny<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology NAS of Ukraine  
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: boretsky@cellbiol.lviv.ua*

<sup>2</sup>*Department of Biotechnology and Microbiology, Rzeszow University  
2, Cwiklinskiej St., Rzeszow 35-601, Poland*

*P. guilliermondii* genes potentially encoding transcription factors an orthologs of yeast Sef1p and Yap1p proteins were identified, cloned and deleted. Deletion of gene PGUG\_00664.1 potentially encoding transcription factors Yap1p that controls response to oxidative stress caused 1,8–2,2 fold decrease of intracellular content of non-heme iron, and 2,5–3,5 fold in riboflavin production under iron limitation conditions when compare to the parental strain. Deletion of *P. guilliermondii* gene PGUG\_03868.1 potentially encoding ortholog of *C. famata* transcription factors Sef1p (*DEHA0C17930g*) completely blocked over-synthesis of riboflavin by the recombinant strains. Using complementation analysis we show that the previously reported mutation *rib83* inactivates *P. guilliermondii* transcription factor Sef1p.

*Keywords:* riboflavin, regulation of biosynthesis, yeast *P. guilliermondii*.

## ЛОКАЛИЗАЦІЯ МУТАЦІЇ *rib83*, БЛОКУЮЩОЇ СВЕРХСИНТЕЗ РИБОФЛАВІНА У ДРОЖЖЕЙ *PICHA GUILLIERMONDII*

Ю. Борецький<sup>1</sup>, Д. Федорович<sup>1</sup>, В. Борецький<sup>1</sup>, Л. Фаюра<sup>1</sup>, Ю. Пиняга<sup>1</sup>, А. Сибірний<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Інститут біології клітки НАН України  
ул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна  
e-mail: boretsky@cellbiol.lviv.ua*

<sup>2</sup>*Кафедра біотехнології і мікробіології, Жешувський університет  
ул. Цвклінської, 2, Жешув, 35-601, Польща*

Гени *P. guilliermondii*, потенціально кодуючі транскрипційні фактори Sef1p і Yap1p, ідентифіковані, клоніровані і делетовані. Делеція гена PGUG\_00664.1, який потенціально кодує активатор транскрипції генів антиоксидантної захисти Yap1p, приводить до зниженню флавіногенної активності в умовах дефіциту заліза в 2,5–3,5 рази і до зниженню вмісту негемінового заліза в клітках приблизно в 1,8–2,2 рази. Делеція гена PGUG\_03868.1, який потенціально кодує активатор транскрипції, ортологічний білок Sef1p *C. famata* (*DEHA0C17930g*), повністю блокує здатність штамів *P. guilliermondii* до сверхсинтезу рибофлавіну. Результати комплементарного аналізу свідчать про те, що описана раніше мутація *rib83* інактивує цей транскрипційний фактор.

*Ключові слова:* рибофлавін, регуляція біосинтезу, дрожжі *P. guilliermondii*.