



УДК 577.214:582.282.23:576.311.34

## ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ ТРАНСПОРТУ ГЕКСОЗ І КАТАБОЛІТНОЇ РЕПРЕСІЇ СЕНСОРАМИ ГЕКСОЗ *HpGcr1* І *HpHxs1* ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

О. Г. Стасик<sup>1,2</sup>, І. О. Денега<sup>1,2</sup>, Н. І. Климишин<sup>2</sup>, Н. О. Сибірня<sup>2</sup>, О. В. Стасик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: olenastasyk@gmail.com

Для дріжджів, як і для більшості мікроорганізмів, глюкоза є основним джерелом Карбону та енергії, а також ключовою ефекторною молекулою, задіяною у процесах регуляції транскрипції, оскільки експресія значної кількості генів репресується глюкозою, а експресія інших індукується цим карбоновим субстратом. У мутантів пекарських дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* з пошкодженим транспортом гексоз здатність транспортувати глюкозу визначає потужність сигналу репресії. У мутантів метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* з делетованими сенсорами глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1* було досліджено ефективність поглинання клітинами глюкози та фруктози і вплив пошкодження транспорту цих гексоз на катаболітну репресію пероксисомної алкогольоксидази, ферменту першого етапу метаболізму метанолу. На відміну від *S. cerevisiae*, у мутантів  $\Delta gcr1$  і  $\Delta hxs1$  пошкодження транспорту глюкози і фруктози не у всіх випадках корелювало зі ступенем пошкодження катаболітної репресії генів метаболізму альтернативних джерел Карбону. Так, у рецесивного мутанта *gcr1-2* з амінокислотною заміною S85F транспорт глюкози був менш пошкодженим, ніж у делеційного мутанта, тоді як дефект глюкозної репресії був помітнішим. Також у мутантів  $\Delta hxs1$  і  $\Delta gcr1$  пошкодження транспорту фруктози відрізнялися несуттєво, тоді як дефект репресії був більш вираженим у  $\Delta hxs1$ . Таким чином, специфічне пошкодження транспорту гексоз у разі делеції альтернативних сенсорів цих цукрів у *H. polymorpha* – не єдина причина, яка визначає ступінь пошкодження катаболітної репресії.

**Ключові слова:** метилотрофні дріжджі, *Hansenula polymorpha*, транспортнеподібні сенсори, глюкозна репресія, транспорт гексоз.

### ВСТУП

Метилотрофні дріжджі, такі як *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*, *Pichia methanolica* та *Pichia pastoris* належать до групи еукаріотичних мікроорганізмів, що широко використовуються для продукції рекомбінантних білків із застосуванням

сильних індукованих метанолом промоторів [11]. Такі промотори є строго регульованими: репресуються різними концентраціями гексоз, дисахаридів та етанолу, депрепресуються під час вирощування на гліцеролі й індукуються за умов, коли метанол є єдиним джерелом карбону.

На сьогодні мало відомо про шляхи глюкозного сигналювання у метилотрофних дріжджів і про компоненти, задіяні в передачі сигналу глюкозної репресії до промоторів репресибельних генів. Проте раніше нами було ідентифіковано два білки *HpGcr1* і *HpHxs1*, які беруть участь у каскадних механізмах передачі глюкозного сигналу репресії та індукції експресії генів [18, 19].

Гомолог транспортерів гексоз у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* білок *HpHxs1* (**H**e**X**ose **S**ensor) належить до групи, членами якої є всі відомі на сьогодні транспортероподібні сенсори глюкози, такі як *Snf3*, *Rgt2* *S. cerevisiae*, *Rag4* *Kluyveromyces lactis* і *Hgt4* *Candida albicans*. Усі близькі гомологи білка *HpHxs1* у дріжджів є нетранспортуєчими сенсорами глюкози. Вказана ознака та схожість у амінокислотній послідовності виокремлюють ці гомологи транспортерів в окрему групу транспортероподібних сенсорів глюкози [6]. Найближчі гомологи *HpHxs1* у *S. cerevisiae* – *ScSNF3* і *ScRGT2* – кодуєть, відповідно, високо- та низькоафінні сенсори глюкози, що регулюють експресію функціональних транспортерів гексоз. Інші два близькі гомологи *Rag4* *K. lactis* і *Rco3* *Neurospora crassa* задіяні як у передачі сигналу репресії, так і в регуляції транспорту цукрів [4, 12]. Подібно до інших Кребтрі-негативних дріжджів, таких як *K. lactis* і *C. albicans*, у геномі *H. polymorpha* виявлено лише один такий сенсор.

Окрім значної подібності амінокислотної послідовності *HpHxs1* до транспортероподібних сенсорів глюкози, свідченням класичної сенсорної функції даного білка є те, що: 1) ген *HpHXS1* експресується на дуже низькому рівні, а його експресія індукується у разі вичерпання глюкози; 2) подібно до *Snf3*, *Rgt2* *S. cerevisiae* та *Rag4* *K. lactis*, які не здатні транспортувати глюкозу, *HpHxs1* не функціонує як пермеаза гексоз у гетерологічній системі *S. cerevisiae*; 3) вкорочені форми білка *HpHxs1*, які втратили частину цитоплазматичної С-кінцевої послідовності, не здатні функціонально комплементувати делеційний мутант  $\Delta hxs1$ ; 4) заміна одного консервативного амінокислотного залишка (R203K) конвертує *HpHxs1* у конститутивно сигнально-активну форму, що забезпечує підвищену резистентність до інгібітора дихання, антимицину А на високих концентраціях глюкози, ймовірно, внаслідок високого рівня експресії генів транспортерів гексоз, які забезпечують ферментативний ріст [19].

Інший гомолог транспортероподібних сенсорів глюкози у *H. polymorpha*, *HpGcr1* (**G**lucose **C**atabolite **R**epression) є необхідним для глюкозної репресії у цих дріжджів [2, 18]. Проте, на відміну від нетранспортуєчих сенсорів глюкози, *HpGcr1* втратив довгий С-кінцевий „хвіст”, необхідний для глюкозного сигналювання [18]. Унікальна коротка С-кінцева амінокислотна послідовність *HpGcr1* має обмежену гомологію до С-кінцевої ділянки домену „сенсора глюкози” в *ScSnf3*, *ScRgt2*, *K/Rag4*, проте її функціональне значення наразі не встановлено. Також остаточно не встановлено, чи є *HpGcr1* функціональним транспортером у *H. polymorpha* чи у гетерологічній системі *S. cerevisiae*. Слід зазначити, що сенсорні білки дріжджів філогенетично пов'язані з високоафінними симпортерами гексоз дріжджів і грибів, найближчим до яких є власне гомолог транспортерів гексоз *H. polymorpha* – *HpGcr1*.

Делеція гена *HpGcr1* призводить до значного пошкодження росту на субстратах-гексозах, що корелює з пошкодженням кatabолітної репресії пероксисомної алкогольоксидази [18]. У той же час делеція *HpHXS1* не призводить до значного пошкодження росту, але зумовлює транз'єнтний дефект фруктозної репресії [19].

Таким чином, виникає питання, чи корелює у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* ступінь пошкодження глюкозної та фруктозної репресії генів, продукти яких задіяні в метаболізмі альтернативних джерел Карбону, зі ступенем пошкодження транспорту відповідних цукрів у клітину.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даній роботі використовували штами *H. polymorpha* NCYC495 (прототроф) надалі WT (дикий тип),  $\Delta gcr1met6$  надалі  $\Delta gcr1$  (з делецією гена, який кодує потенційний сенсор глюкози), точковий мутант *gcr1-2* [18] і  $\Delta hxs1$  (прототроф, із делецією гена, який кодує низькоафінний сенсор глюкози) [19]. Дріжджі вирощували за 37°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 (аналог YNB – середовище Бельгольдера) такого складу, у г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1; дріжджовий екстракт „Difco” – 0,5. Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактори росту – лейцин, метіонін у концентрації 40–50 мг/л. Концентрація джерел Карбону становила 1% (масовий або об’ємний), якщо не вказано інакше. Агаризовані середовища містили агар (2%).

Для біохімічних експериментів дріжджі культивували до середини логарифмічної фази росту в колбах на качалці за 220 об/хв, якщо не вказано інакше. Біомасу клітин (в одиницях оптичної густини ( $\text{OD}_{600}$ )) визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі „Helios- $\gamma$ ” за довжини хвилі 600 нм у кюветі шириною 1 см.

### Визначення активностей ферментів

Кількісне визначення активності АО проводили або *in situ* в пермеабілізованих дигітоніном клітинах дріжджів, або у безклітинних екстрактах [1].

Питому активність алкогольоксидази визначали за кількістю утвореного перекису водню за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка або клітин. Перекис водню аналізували фотометрично за утворенням кольорового продукту пероксидазного окиснення *o*-діанізидину або ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфатної кислоти)).

### Імунодетекція білків методом Вестерн-блотингу

Приготування безклітинних екстрактів, електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності натрій додецилсульфату (SDS-PAGE) та імунодетекцію білків методом Вестерн-блот-аналізу проводили згідно з Waterham et al. [21].

### Аналіз транспорту глюкози/фруктози

Транспорт радіоактивно міченої глюкози в клітину визначали згідно з методом, описаним у [10] із низкою модифікацій. Клітини підрощували на мінеральному середовищі з різними концентраціями глюкози та фруктози до середини експоненційної фази росту й осаджували при оптичній густині 60 мг/мл. Поглинання глюкози/фруктози визначали додаванням 0,1 мл клітин (за 37°C) до 0,05 мл розчину радіоактивно-міченої  $^{14}\text{C}$ -глюкози/ $^{14}\text{C}$ -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 із 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 (20 с) фільтрували з використанням вакуумного фільтра та двічі відмивали в 10 мл охолодженої 500 мМ глюкози/фруктози. Зразки (фільтрувальні папірці з осадженими клітинами) переносили у сцинтиляційну рідину. Порцію (0,01 мл) реакційної суміші використовували для визначення загальної радіоактивності. Радіоактивність визначали на сцинтиляційному лічильнику (Pac-Beta 1219, ЛКВ, Швеція). Швидкість засвоєння (транспорту) глюкози/фруктози ( $V_{\text{Glc}}$ ) виражали у нмоль глюкози на мг сухої маси клітин за 1 хв.

$$[\text{Glc}]_{\text{клітинна}} = \frac{(\text{срм } ^{14}\text{C-Glc}_{\text{проби}} - \text{срм } ^{14}\text{C-Glc}_{\text{B0}}) \times [\text{нмоль мкл}^{-1} \text{Glc}] \times 100 \text{ мкл}}{\text{срм } ^{14}\text{C-Glc}_{\text{C0}} \times 10},$$

де  $\text{срм } ^{14}\text{C-Glc}_{\text{B0}}$  – радіоактивність неспецифічно зв'язаної  $^{14}\text{C}$ -глюкози з фільтрувальним папірцем;  $\text{срм } ^{14}\text{C-Glc}_{\text{C0}} \times 10$  – вихідна радіоактивність розчину  $^{14}\text{C}$ -глюкози; 100 мкл – порція суспензії клітин і  $^{14}\text{C}$ -глюкози, в якій визначали радіоактивність; нмоль мкл $^{-1}$  Glc – вираження концентрації глюкози (ммоль л $^{-1}$ ), яку додавали до суспензії клітин.

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

де 0,083 хв – вираження 5 с (часу інкубації клітин із розчином  $^{14}\text{C}$ -Glc) у хв; 1 мг сухої маси клітин – маса клітин у порції суспензії, в якій визначали радіоактивність.

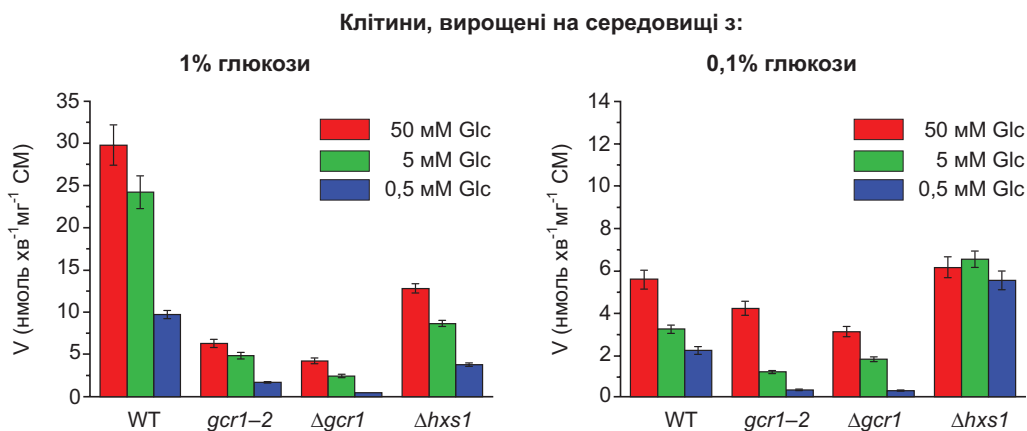
## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше було встановлено, що мутанти *H. polymorpha*  $\Delta gcr1$  і  $\Delta hxs1$  з делетованими сенсорами глюкози виявляли певну затримку в рості на тих чи інших цукрах і різний ступінь порушення катаболітної репресії [2, 17–19]. Пошкодження транспорту цукрів могло як впливати на швидкість росту дріжджів, так і зумовлювати дефект репресії генів, продукти яких задіяні в метаболізмі альтернативних джерел Карбону, тому нами було досліджено транспорт глюкози та фруктози у штамів  $\Delta gcr1$  та  $\Delta hxs1$ . Транспортну активність мутантів визначали за умов культивування клітин на середовищах із різними концентраціями цукрів. У експериментах досліджували швидкість поглинання радіоактивно мічених глюкози та фруктози у трьох концентраціях – 0,5 мМ, 5 мМ та 50 мМ.

У разі вирощування штамів *H. polymorpha* на середовищі з 1% глюкозою поглинання цього цукру було пошкоджене більшою мірою у мутантів *gcr1-2* (точковий) [18],  $\Delta gcr1$  і частково в  $\Delta hxs1$ , що вказує на участь білків *HpGcr1* і *HpHxs1* у низькоафінному транспорті глюкози (рис. 1). За умов вирощування клітин на середовищі з низькими концентраціями глюкози було показано, що високоафінний транспорт незначно пошкоджений лише у *gcr1*-мутантів, тоді як у  $\Delta hxs1$  глюкоза транспортувалась подібно до штаму дикого типу. Можна припустити, що сповільнення росту *gcr1*-мутантів на глюкозі зумовлювалося пошкодженням транспорту і зниженням внутрішньоклітинного пулу даного субстрату.

Беручи до уваги сповільнення росту  $\Delta hxs1$  на середовищі з фруктозою, було зроблено припущення, що продукт гена *HpHXS1* є регуляторним компонентом транспортної системи даного карбонового субстрату. Як було описано раніше,

делеція гена *HpGCR1* також призводила до пошкодження росту відповідного делеційного мутанта на середовищі з фруктозою і, як наслідок, до пошкодження репресії гена, який кодує алкогольоксидазу [18].



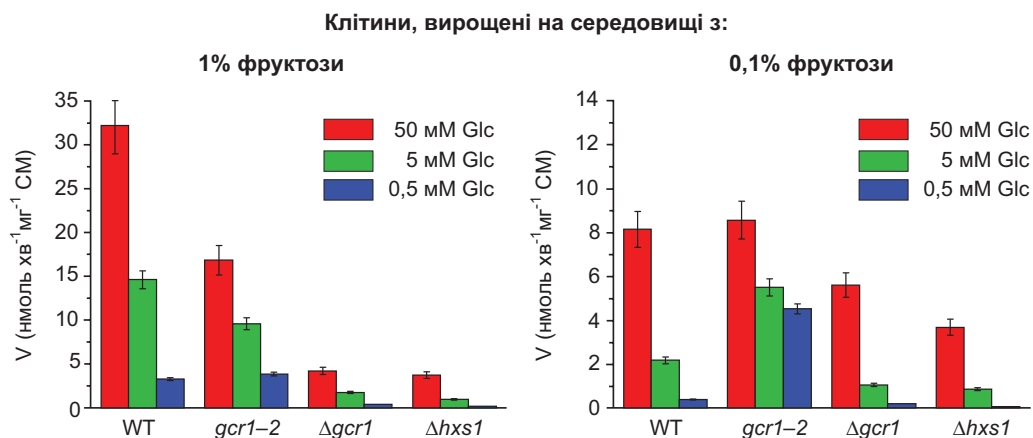
**Рис. 1.** Поглинання глюкози клітинами штамів *H. polymorpha*. Клітини інкубували протягом 14 год у середовищах із високою (1%) та низькою (0,1%) концентраціями глюкози і визначали швидкість поглинання даного карбонового субстрату (V). Умовні позначення: Glc – глюкоза, СМ – суха маса клітин, WT – штам дикого типу NCYC495

**Fig. 1.** Glucose uptake by *H. polymorpha* strains. Cells were incubated in the media with high (1%) and low (0.1%) glucose concentrations during 14 h and glucose uptake rate was determined (V). Species abbreviations are: Glc – glucose, CM – cell dry weight, WT – wild type strain NCYC495

Встановлено, що обидва делеційні штами  $\Delta gcr1$  та  $\Delta hxs1$  характеризувалися незначним пошкодженням високоафінного (у разі вирощування клітин на середовищі з 0,1% фруктози) та помітним пошкодженням низькоафінного (з 1% фруктози) транспорту цієї гексози, тоді як точковий мутант *gcr1-2* мав пошкоджений лише низькоафінний транспорт (рис. 2). Слід наголосити, що в разі вирощування клітин на середовищі з високою концентрацією фруктози точкова мутація в гені *HpGCR1* негативно впливала на транспорт цього цукру, але не блокувала його, тоді як делеція гена практично повністю блокувала низькоафінний транспорт фруктози. Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що *HpGcr1* та *HpHxs1* регулюють експресію білків, задіяних у транспорті цього цукру. Схожість у фенотипі двох делеційних штамів  $\Delta gcr1$  та  $\Delta hxs1$  вказує на можливу взаємодію *HpGcr1* та *HpHxs1* під час передачі фруктозного сигналу.

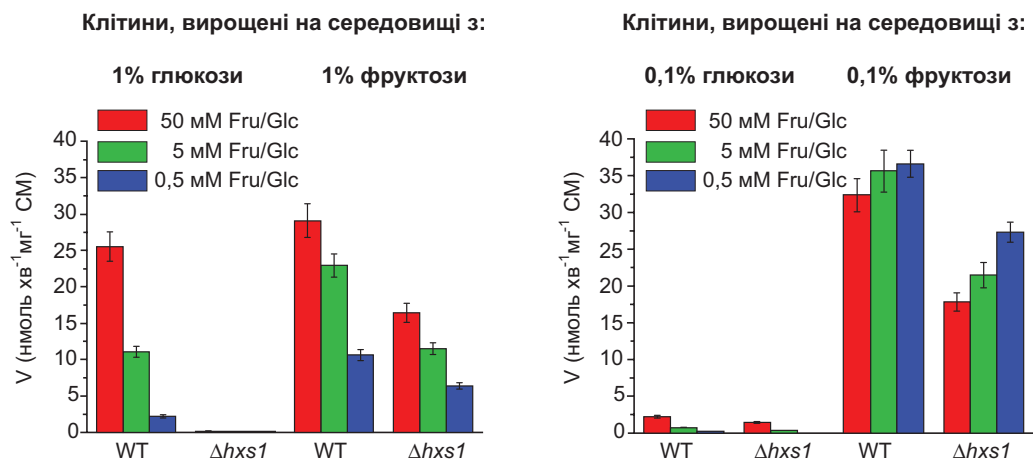
Відомо, що в *S. cerevisiae* глюкоза інгібує транспорт фруктози і, навпаки, фруктоза інгібує транспорт глюкози, що свідчить про спільну систему транспорту цих цукрів [6]. Для *H. polymorpha* було показано, що такі цукри як фруктоза, мальтоза, манноза та ксилоза є конкурентами у разі низькоафінної системи транспорту [10]. Мутант  $\Delta hxs1$  характеризувався пошкодженням обох систем транспорту фруктози під час вирощування клітин на цьому субстраті й лише частковим пошкодженням низькоафінного транспорту глюкози, порівняно зі штамом дикого типу.

Також було вивчено транспорт цього цукру у клітин, вирощених на середовищі з високою концентрацією глюкози, за умов, коли не генерується фруктозний сигнал та індукуються транспортери гексоз, здатні транспортувати як глюкозу, так і фруктозу (рис. 3).



**Рис. 2.** Поглинання фруктози у штамів *H. polymorpha*. Клітини інкубували протягом 14 год у середовищах із високою (1%) та низькою (0,1%) концентраціями фруктози і визначали швидкість поглинання даного карбонового субстрату (V). Умовні позначення: Fru – фруктоза, CM – суха маса клітин, WT – штам дикого типу NCYC495

**Fig. 2.** Fructose uptake by *H. polymorpha* strains. Cells were incubated in the media with high (1%) and low (0.1%) fructose concentrations during 14 h and fructose uptake rate was determined (V). *Species abbreviations are:* Fru – fructose, CM – cell dry weight, WT – wild type strain NCYC495



**Рис. 3.** Поглинання глюкози та фруктози у штамів *H. polymorpha*. Клітини інкубували протягом 14 год у середовищах із високою (1%) та низькою (0,1%) концентраціями глюкози та фруктози і визначали швидкість поглинання радіоактивно міченої фруктози (V). Умовні позначення: Glc – глюкоза, Fru – фруктоза, CM – суха маса клітин, WT – штам дикого типу NCYC495.

**Fig. 3.** Glucose and fructose uptake by *H. polymorpha* strains. Cells were incubated in the media with high (1%) and low (0.1%) glucose and fructose concentrations during 14 h and fructose uptake rate was determined (V). *Species abbreviations are:* Glc – glucose, Fru – fructose, CM – cell dry weight, WT – wild type strain NCYC495

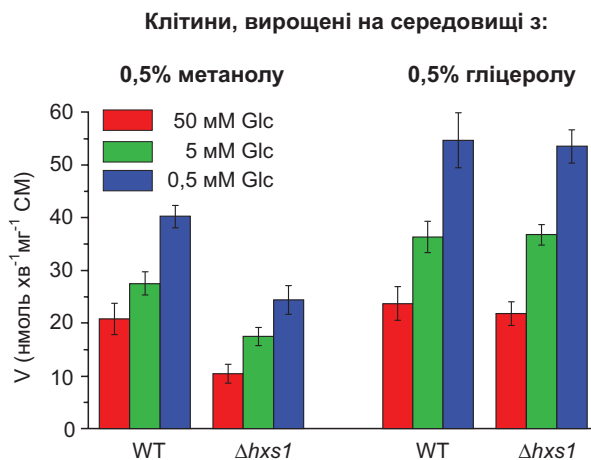
Було показано, що штам  $\Delta hxs1$  не поглинав фруктозу під час вирощування клітин як на середовищі з високою, так і на середовищі з низькою концентрацією



глюкози (рис. 3). Отримані експериментальні дані підтверджують раніше встановлений факт, що високоафінні системи транспорту глюкози та фруктози в *H. polymorpha* не мають спільних елементів [10].

Поглинання глюкози у клітин штаму дикого типу та  $\Delta hxs1$ , вирощених на середовищі з високою концентрацією фруктози, суттєво не відрізнялося від транспорту цього цукру у клітин, вирощених на середовищі з високою концентрацією глюкози.

Слід зауважити, що під час вирощування клітин як штаму дикого типу, так і мутанта  $\Delta hxs1$ , на середовищі з низькою концентрацією глюкози, фруктоза не транспортувалась, тоді як вирощені на середовищі з низькою концентрацією фруктози клітини обох штамів індукували високоафінний транспорт глюкози. Відомо, що у клітин *H. polymorpha*, вирощених на метанолі й етанолі, експресується високоафінна система транспорту глюкози [10]. Аналіз транспорту цього цукру у клітин дикого типу та  $\Delta hxs1$ , вирощених на середовищі з метанолом і гліцеролом, підтвердив факт функціонування високоафінного транспорту глюкози за умов відсутності цього субстрату в ростовому середовищі (рис. 4). Такий феномен, імовірно, дає можливість клітинам, вирощеним на незброджувальних субстратах, швидко адаптуватися до появи глюкози в ростовому середовищі.



**Рис. 4.** Поглинання глюкози у штамів *H. polymorpha*. Клітини інкубували протягом 18 год на метанольному та гліцерольному середовищах і визначали швидкість поглинання глюкози (V). Умовні позначення: Glc – глюкоза, CM – суха маса клітин. WT – штам дикого типу NCYC495

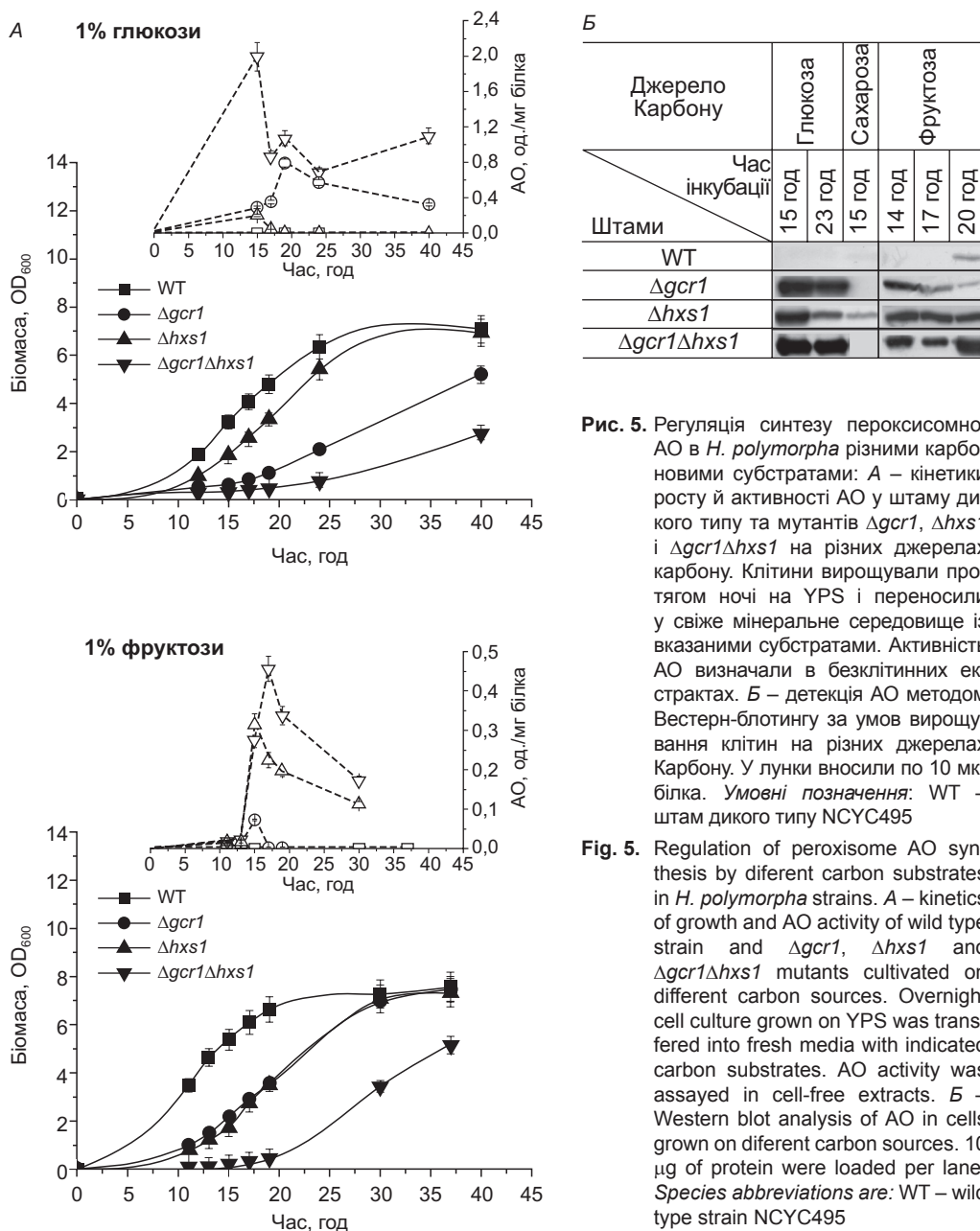
**Fig. 4.** Glucose uptake by *H. polymorpha* strains. Cells were incubated on methanol- and glycerol-containing media during 18 h and glucose uptake rate was determined (V). Species abbreviations are: Glc – glucose, CM – cell dry weight, WT – wild type strain NCYC495

Отже, присутність індуктора в середовищі не є обов'язковою умовою для функціонування високоафінного транспорту глюкози, тоді як для індукції високоафінного фруктозного транспорту необхідна наявність фруктози (рис. 3).

Встановлено, що дефект поглинання глюкози у сконструйованого подвійного делеційного мутанта  $\Delta gcr1\Delta hxs1$  мав кумулятивний характер. Цей штам характеризувався повним блоком високо- та низькоафінного транспорту.

Оскільки у мутантів *S. cerevisiae* з пошкодженим транспортом гексоз здатність транспортувати глюкозу визначає потужність сигналу репресії [13], нами було перевірено, як впливає пошкодження транспорту гексоз у мутантних штамів  $\Delta gcr1$ ,

$\Delta hxs1$  і  $\Delta gcr1\Delta hxs1$  на ступінь катаболітної репресії пероксисомного ферменту алкогільоксидази. Подібно до делеції гена *HpGCR1* [18], делеція *HpHXS1* призводила до пошкодження глюкозної репресії АО (рис. 5) [18]. Проте цей фенотип був менше виражений у  $\Delta hxs1$ , ніж у  $\Delta gcr1$ . Частковий блок глюкозної репресії у штаму  $\Delta hxs1$  був підтверджений за допомогою Вестерн-блотингу при визначенні рівня білка АО та біохімічного аналізу активності цього ферменту (рис. 5). Слід зауважити,



**Рис. 5.** Регуляція синтезу пероксисомної АО в *H. polymorpha* різними карбонними субстратами: А – кінетики дико типу й активності АО у штаму дико типу та мутантів  $\Delta gcr1$ ,  $\Delta hxs1$  і  $\Delta gcr1\Delta hxs1$  на різних джерелах карбону. Клітини вирощували протягом ночі на YPS і переносили у свіже мінеральне середовище із вказаними субстратами. Активність АО визначали в безклітинних екстрактах. Б – детекція АО методом Вестерн-блотингу за умов вирощування клітин на різних джерелах Карбону. У лунки вносили по 10 мкг білка. Умовні позначення: WT – штам дико типу NCYC495

**Fig. 5.** Regulation of peroxisome AO synthesis by different carbon substrates in *H. polymorpha* strains. A – kinetics of growth and AO activity of wild type strain and  $\Delta gcr1$ ,  $\Delta hxs1$  and  $\Delta gcr1\Delta hxs1$  mutants cultivated on different carbon sources. Overnight cell culture grown on YPS was transferred into fresh media with indicated carbon substrates. AO activity was assayed in cell-free extracts. B – Western blot analysis of AO in cells grown on different carbon sources. 10  $\mu$ g of protein were loaded per lane. Species abbreviations are: WT – wild type strain NCYC495



що ступінь пошкодження глюкозної репресії у штамів  $\Delta gcr1$  та  $\Delta hxs1$  негативно корелював зі швидкістю росту цих штамів на даному карбоновому субстраті.

Делеційний штам  $\Delta hxs1$  не здатний рости на середовищі з метанолом за присутності 2-DOG, що вказує на незначне пошкодження глюкозної репресії в цього мутанта [18]. Відомо, що найближчий гомолог *HpHxs1* у патогенного виду дріжджів *S. albicans*, *Hgt4*, необхідний для росту на фруктозі як єдиному джерелі Карбону, а мутант  $\Delta hgt4$  характеризується незначним дефектом росту на глюкозі та маннозі за умов відсутності аерації [7]. Подібно до мутанта *S. albicans*  $\Delta hgt4$ , штам *H. polymorpha*  $\Delta hxs1$  характеризувався деяким відставанням у *lag*-фазі росту, порівняно зі штамом дикого типу, на середовищі з глюкозою та фруктозою (рис. 5, А).

У разі вирощування мутантів  $\Delta gcr1$  і  $\Delta hxs1$  на фруктозі рівень пошкодження репресії АО у штаму  $\Delta hxs1$  був значно вищим, ніж під час культивування цього мутанта в середовищі з глюкозою, тоді як у  $\Delta gcr1$  дефект фруктозної репресії алкогольоксидази не був таким помітним, як пошкодження глюкозної репресії (рис. 5, Б). Слід зазначити, що етанол залишався сильним репресором синтезу АО в обох штамів  $\Delta gcr1$  та  $\Delta hxs1$ .

Однчасне делетування генів *HpGCR1* і *HpHXS1* у відповідного мутанта ( $\Delta gcr1\Delta hxs1$ ) призводило до більш вираженого дефекту глюкозної та пошкодження фруктозної репресії АО, а також до тривалішої *lag*-фази росту на обох цукрах (рис. 5). Виходячи з даних про активність АО під час культивування подвійного делеційного мутанта на глюкозі та фруктозі, пошкодження глюкозної репресії гена, який кодує цей білок, мало кумулятивний характер, тоді як рівень пошкодження фруктозної репресії в  $\Delta gcr1\Delta hxs1$  практично не відрізнявся від  $\Delta hxs1$ .

Таким чином, делеція гена *HpGCR1* у штаму  $\Delta hxs1$  зумовлювала сповільнення росту на середовищі з фруктозою та незначно впливала на ступінь пошкодження репресії даним субстратом. Водночас делеція обох генів призводила до сповільнення росту на середовищі з глюкозою та значного пошкодження глюкозної репресії АО.

## ВИСНОВКИ

Одержані дані свідчать про те, що, на відміну від *S. cerevisiae*, пошкодження транспорту глюкози і фруктози в *H. polymorpha* не завжди корелює зі ступенем пошкодження катаболітної репресії генів, продукти яких задіяні в метаболізмі альтернативних джерел Карбону. Так, у рецесивного мутанта *gcr1-2* з точковою амінокислотною заміною S85F транспорт глюкози є менш пошкодженим, ніж у делеційного мутанта  $\Delta gcr1$ , тоді як дефект глюкозної репресії є більш вираженим саме у точкового мутанта, а не у  $\Delta gcr1$ . У штаму *gcr1-2* дефект глюкозної репресії не корелює зі здатністю транспортувати глюкозу. Точкова заміна серину на фенілаланін у положенні 85 амінокислотної послідовності *HpGcr1* локалізується у другому трансмембранному сегменті, який перекривається з „лейциновим замком” (zipper) у більшості транспортерів гексоз, необхідним для гетеро- або гомо-олігодимеризації транспортерів гексоз [6]. Тому можна припустити, що точкова заміна у другому трансмембранному домені *HpGcr1* специфічно перешкоджає взаємодії з потенційними білками-партнерами.

З наведених результатів випливає, що *HpGcr1* може бути як транспортером глюкози, так і сенсором, який регулює експресію генів транспортерів гексоз.

Встановлено, що у мутантів  $\Delta hxs1$  і  $\Delta gcr1$  пошкодження транспорту фруктози відрізняється несуттєво, тоді як дефект репресії є більш вираженим у  $\Delta hxs1$ . Диференційована участь ферментів гексо- та глюкокінази у глюкозній і фруктозній репресії може бути причиною такого фенотипу.

Таким чином, специфічне пошкодження транспорту гексоз у разі делеції альтернативних сенсорів цих цукрів у *H. polymorpha* є не єдиною причиною, яка визначає ступінь пошкодження катаболітної репресії.

1. Гончар М.В., Сибірний А.А. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з великого практикуму для студентів IV курсу біологічного факультету ЛДУ. – Львів: ЛДУ ім. І. Франка, 1995. – 23 с.
2. Стасык О.В., Кшеминская Г.П., Кулачковский А.Р. та ін. Мутанти метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной катаболитной репрессией. **Микробиология**, 1997; 66: 755–760.
3. Berkey C.D., Vyas V.K., Carlson M. Nrg1 and Nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source. **Eukar. Cell**, 2004; 3: 311–317.
4. Betina S., Goffrini P., Ferrero I. et al. RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, 2001; 158: 541–548.
5. Bisson L. F., Kunathigan V. On the trail of an elusive flux sensor. **Res. Microbiol**, 2003; 154: 603–610.
6. Boles E., Hollenberg C.P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, 1997; 21: 85–111.
7. Brown V., Sexton J., Johnston M. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukar. Cell**, 2006; 5(10): 1726–1737.
8. Faber K.N., Haima P., Harder W. et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. **Curr. Genet**, 1994; 25: 305–310.
9. Hartner F., Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories**, 2006; 5(39): 1–21.
10. Karp H., Alamae T. Glucose transport in a methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Microbiol. Lett**, 1998; 166: 267–273.
11. Krasovska O.S., Stasyk O.G., Nahorny V.O. et al. Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. **Biotech. Bioeng**, 2007; 97(4): 858–870.
12. Madi L., McBride S.A., Bailey L.A. et al. rco-3, a gene involved in glucose transport and condensation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, 1997; 146(2): 499–508.
13. Ozcan S., Dover J., Johnston M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *S. cerevisiae*. **EMBO J**, 1998; 17: 2566–2573.
14. Parpinello G., Berardi E., Strabbioli R. A regulatory mutant of *Hansenula polymorpha* exhibiting methanol utilization metabolism and peroxisome proliferation in glucose. **J. Bacteriol**, 1998; 180(11): 2958–2967.
15. Reifemberger E., Boles E., Ciriacy M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem**, 1997; 245: 324–333.
16. Sohn J. H., Choi E. S., Kang H. A. et al. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 1999; 51: 800–807.
17. Stasyk O.V., Petryshyn A.V., Sibirny A.A. Impairment of glucose uptake as a possible cause of catabolite repression deficiency in mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Folia Microbiol**, 1994; 39: 545–546.

18. Stasyk O.V., Stasyk O.G., Komduur J. et al. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **J. Biol. Chem**, 2004; 279(9): 8116–8125.
19. Stasyk O.G., Maidan M.M., Stasyk O.V. et al. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Eukar. Cell**, 2008; 7(4): 735–746.
20. Walsh E.P., Lamont D.J., Beattie K.A. et al. Novel interactions of *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase identified by single-step affinity purification and mass spectrometry. **Biochem**, 2002; 41: 2409–2420.
21. Waterham H.R., Titorenko V.I., Haima P. et al. The *Hansenula polymorpha* PER1 gene is essential for peroxisome biogenesis and encodes a peroxisomal matrix protein with both carboxy and amino-terminal targeting signals. **J. Cell Biol**, 1994; 127: 737–749.

---

### PECULIARITIES OF HEXOSE TRANSPORT AND CATABOLITE REPRESSION REGULATION BY HEXOSE SENSORS *HpGcr1* AND *HpHxs1* IN THE YEAST *HANSENULA POLYMORPHA*

O. G. Stasyk<sup>1,2</sup>, I. O. Denega<sup>1,2</sup>, N. I. Klymyshyn<sup>2</sup>, N. O. Sybirna<sup>2</sup>, O. V. Stasyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>2</sup>*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine*

*e-mail: olenastasyk@gmail.com*

In the yeasts, as in the majority of microorganisms, glucose is the main source of carbon and energy, as well as a key effector molecule involved in transcriptional regulation. Many genes are repressed in the presence of glucose, others are instead induced by glucose. In the mutants of bakers' yeast *Saccharomyces cerevisiae* impaired in hexose transport, the proficiency of transport determines the strength of the repression signal. In the mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* with deleted glucose sensors *HpGcr1* and *HpHxs1*, efficiency of glucose and fructose uptake and the effect of hexose transport on catabolite repression of peroxisomal alcohol oxidase was investigated. Contrary to *S. cerevisiae*, in the mutants  $\Delta gcr1$  and  $\Delta hxs1$  impairment glucose and fructose transport did not always correlate with the rate of catabolite repression of metabolic genes of alternative carbon sources. For instance, in the recessive *gcr1-2* mutant with one amino acid substitution S85F glucose transport was less impaired relative to corresponding deletion mutant, whereas defect of glucose repression was more pronounced. Also, in the mutants  $\Delta hxs1$  and  $\Delta gcr1$ , the defect of fructose transport was similar, when fructose repression defect was stronger in  $\Delta hxs1$ . Therefore, specific impairment of hexose transport upon deletion of alternative hexose sensors in *H. polymorpha* is not an only cause that determines proficiency of hexose catabolite repression.

**Keywords:** methylotrophic yeasts, *Hansenula polymorpha*, transporter-like sensors, glucose repression, hexose transport.

## ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТА ГЕКСОЗ И КАТАБОЛИТНОЙ РЕПРЕССИИ СЕНСОРАМИ ГЕКСОЗ *HpGcr1* И *HpHxs1* ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

О. Г. Стасик<sup>1,2</sup>, І. О. Денега<sup>1,2</sup>, Н. І. Клымышин<sup>2</sup>, Н. О. Сибірня<sup>2</sup>, О. В. Стасик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: olenastasyk@gmail.com

Для дрожжей, как и для большинства микроорганизмов, глюкоза является основным источником углерода и энергии, а также ключевой эффекторной молекулой, вовлеченной в процессы регуляции транскрипции, поскольку экспрессия значительного количества генов репрессируется глюкозой, а экспрессия других индуцируется этим субстратом. У мутантов пекарских дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* с поврежденным транспортом гексоз способность транспортировать глюкозу определяет силу сигнала репрессии. У мутантов метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с делетированными сенсорами глюкозы *HpGcr1* и *HpHxs1* была исследована эффективность поглощения клетками глюкозы и фруктозы, а также влияние повреждения транспорта этих гексоз на катаболитную репрессию пероксисомной алкогольоксидазы, фермента первого этапа метаболизма метанола. В отличие от *S. cerevisiae*, у мутантов  $\Delta gcr1$  и  $\Delta hxs1$  повреждение транспорта глюкозы и фруктозы не во всех случаях коррелировало со степенью повреждения катаболитной репрессии генов метаболизма альтернативных источников углерода. Так, у рецессивного мутанта *gcr1-2* с аминокислотной заменой S85F транспорт глюкозы был менее поврежден по сравнению с делеционным мутантом, тогда как дефект глюкозной репрессии был более заметным. Также у мутантов  $\Delta hxs1$  и  $\Delta gcr1$  повреждение транспорта фруктозы отличалось несущественно, тогда как дефект репрессии был более выражен у  $\Delta hxs1$ . Таким образом, специфическое повреждение транспорта гексоз при делеции альтернативных сенсоров этих сахаров у *H. polymorpha* не является единственной причиной, определяющей степень повреждения катаболитной репрессии.

**Ключевые слова:** метилотрофные дрожжи, *Hansenula polymorpha*, транспортные сенсоры, глюкозная репрессия, транспорт гексоз.

Одержано: 02.07.2012