



УДК 577.214:582.282.23:576.311.34

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПОТЕНЦІЙНИХ ТРАНСПОРТЕРІВ ГЕКСОЗ У ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* ДИФЕРЕНЦІЙНО РЕГУЛЮЄТЬСЯ СЕНСОРАМИ ГЛЮКОЗИ *Hxs1* ТА *Gcr1*

О. Г. Стасик^{1,2}, І. О. Денега^{1,2}, Н. О. Сибірна², О. В. Стасик¹

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

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: olenastasyk@gmail.com

Першим і лімітуючим кроком у метаболізмі глюкози, найпоширенішого джерела Карбону та енергії для більшості клітин, є транспорт цього цукру крізь цитоплазматичну мембрану клітини. У багатьох еукаріотичних клітин глюкоза контролює і забезпечує власний ефективний метаболізм, виступаючи зовнішнім ефектором, який на транскрипційному і трансляційному рівнях регулює кількість, вид та активність відповідних транспортерів. У даній роботі нами було досліджено регуляцію експресії генів, які кодують гомологи транспортерів гексоз – *HpHxt1*, *HpHxt2*, *HpHxt3* та потенційний транспортер фруктози – *HpFrt1*, сенсорами глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1* метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*. Зокрема, нами було встановлено, що потенційний сенсор глюкози *HpGcr1* задіяний у репресії гена функціонального низькоафінного транспортера гексоз *HpHXT1* за умов дефіциту глюкози, а також у репресії генів потенційних високоафінних транспортерів глюкози *HpHXT2* та *HpHXT3* за умов надлишку даного карбонового субстрату. Для сенсора глюкози *HpHxs1* була показана участь в індукції експресії гена *HpHXT1*. Встановлено, що в разі делеції *HpGCR1*, але не *HpHXS1*, відбувається конститутивна експресія гена потенційного високоафінного транспортера фруктози *HpFRT1*, незалежно від наявності й кількості глюкози в ростовому середовищі.

Отже, регуляція транспорту гексоз (глюкози і фруктози) в метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* на рівні експресії генів є наслідком взаємодії системи регуляторних елементів, ключова роль серед яких належить сенсорам глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1*.

Ключові слова: метилотрофні дріжджі, *Hansenula polymorpha*, транспортероподібні сенсори глюкози, глюкозна регуляція, експресія генів транспортерів гексоз.

ВСТУП

Для більшості мікроорганізмів, у тому числі дріжджів, глюкоза є основним джерелом Карбону й енергії, а також важливою ефекторною молекулою, задіяною у процесах регуляції транскрипції шляхом репресії та індукції експресії значної кількості генів.

Сучасні знання про геноміку та протеоміку дріжджів є важливою базою в розумінні відповіді клітини на глюкозу. Наприклад, відомо, що через 20 хв після додавання глюкози в ростове середовище близько 20% із 6 200 генів у *Saccharomyces cerevisiae* виявляють зміни (репресію або індукцію) у рівні експресії більше, ніж у 3 рази, а 40% – більше, ніж у 2 рази [21]. У відповідь на глюкозу відбувається репресія експресії генів, задіяних у поглинанні та метаболізмі альтернативних вуглеводів, а також генів, задіяних у глюконеогенезі та диханні. Експресія деяких генів гліколізу і транспортерів глюкози також регулюється у відповідь на зовнішньоклітинну концентрацію глюкози. За росту *S. cerevisiae* на суміші глюкози та іншого цукру, такого як сахароза, мальтоза чи галактоза, метаболізм набуває діауксичного характеру, тобто першою метаболізується глюкоза, тоді як інші цукри починають утилізуватись лише в умовах вичерпування глюкози [10]. Глюкоза також регулює експресію транспортерів альтернативних цукрів, зокрема може репресувати експресію специфічних транспортерів фруктози, таких як *Fsy1* у *Saccharomyces bayanus* [3, 8, 11]. Такий феномен є наслідком глюкозної (катаболітної) репресії.

Сучасне знання про компоненти головного шляху глюкозної регуляції, котрий відповідає за передачу сигналу репресії до промоторів генів, які кодують ферменти глюконеогенезу, транспорту і катаболізму альтернативних цукрів, та сигналу індукції до промоторів генів транспортерів гексоз, базується на результатах досліджень вузького кола об'єктів або навіть єдиного організму – пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Молекулярно-генетичні дослідження інших, так званих неконвенційних видів дріжджів, перебувають на початку інтенсивного розвитку, що також зумовлено зростанням їхнього промислового значення.

Метилотрофні дріжджі, які здатні засвоювати метанол як єдине джерело Карбону й енергії [2], мають низку переваг як модельний об'єкт для досліджень катаболітної регуляції. У цих мікроорганізмів синтез пероксисомних і цитозольних ферментів метаболізму метанолу є регульованим – репресується глюкозою та деякими іншими цукрами, а також етанолом [12]. Глюкозній репресії підлягає також біогенез пероксисом – органел, необхідних для метилотрофного росту, але не для утилізації глюкози та інших альтернативних субстратів-репресорів [2].

Раніше було ідентифіковано два білки *HpGcr1* і *HpHxs1* метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, які беруть участь у каскадних механізмах передачі глюкозного сигналу репресії та індукції експресії генів [19, 20].

Гомолог транспортерів гексоз у дріжджів *H. polymorpha* білок *HpHxs1* (**Hexose Sensor**) належить до групи транспортероподібних сенсорів глюкози, таких як *Snf3*, *Rgt2* *S. cerevisiae* [14], *Rag4* *Kluyveromyces lactis* [4] і *Hgt4* *Candida albicans* [7]. Найближчі гомологи *HpHxs1* у *S. cerevisiae* *Snf3* і *Rgt2* є, відповідно, високо- та низько-афінними сенсорами глюкози, які регулюють експресію функціональних транспортерів гексоз [15, 17].

Подібно до генів *ScSNF3* і *ScRGT2* *S. cerevisiae* [15, 17], які кодують сенсори гексоз, ген *HpHXS1* *H. polymorpha* експресується на дуже низькому рівні, а його експресія індукується у разі вичерпання глюкози. Іншою важливою ознакою, яка підтверджує сенсорну функцію *HpHxs1*, є те, що даний білок не функціонує як пермеаза гексоз у гетерологічній системі *S. cerevisiae*. Окрім цього, вкорочені форми білка *HpHxs1*, які втратили частину цитоплазматичного С-кінцевого „хвоста”, не здатні функціонально комплементувати делеційний мутант *Δhxs1*, а заміна одного консервативного амінокислотного залишка (R203K) конвертує *HpHxs1* у конститутивно сигнально-активну форму [20].

Інший гомолог транспортероподібних сенсорів глюкози у *H. polymorpha*, *HpGcr1* (**G**lucose **C**atabolite **R**epression) задіяний у глюкозній репресії генів метаболізму альтернативних джерел Карбону [2, 19]. Проте, на відміну від класичних нетранспортуючих сенсорів глюкози, у тому числі *HpHxs1*, *HpGcr1* не містить довгого С-кінцевого домену, необхідного для глюкозного сигналювання [19]. Делеція гена *HpGCR1* призводить до значного пошкодження росту на субстратах-гексозах, що корелює з пошкодженням катаболітної репресії пероксисомної алкогольоксидази [2, 19].

У мутантів пекарських дріжджів *S. cerevisiae* з пошкодженим транспортом гексоз здатність транспортувати глюкозу визначає потужність сигналу репресії [11, 17]. На відміну від *S. cerevisiae*, у штамів *Δgcr1* і *Δhxs1* дефект транспорту глюкози та фруктози не у всіх випадках корелює зі ступенем пошкодження катаболітної репресії генів метаболізму альтернативних джерел Карбону [1]. Наприклад, у мутанта *gcr1-2* (з амінокислотною заміною S85F) транспорт глюкози менш пошкоджений, ніж у відповідного делеційного штаму, тоді як дефект глюкозної репресії в першого є помітнішим. Також у мутантів *Δhxs1* і *Δgcr1* порушення низькоафінного транспорту фруктози принципово не відрізняється, тоді як дефект репресії є більш вираженим у *Δhxs1* [1].

Порушення поглинання глюкози у разі вирощування мутантів *H. polymorpha* *Δgcr1* і *Δhxs1* на середовищі з високим вмістом глюкози вказує на участь білків *HpGcr1* і *HpHxs1* у низькоафінному транспорті даного цукру [1].

У разі делеції гена *HpGCR1* або *HpHXS1* відбувається незначне пошкодження високоафінного та помітне пошкодження низькоафінного транспорту фруктози, тому можна припустити, що *HpGcr1* та *HpHxs1* також регулюють експресію генів, продукти яких задіяні в транспорті цього цукру [1]. Схожість у фенотипі двох делеційних штамів *Δgcr1* та *Δhxs1* вказує на можливу взаємодію *HpGcr1* та *HpHxs1* під час передачі фруктозного сигналу.

Таким чином, виходячи з отриманих раніше даних про порушення транспорту глюкози та фруктози в мутантів із делетованими генами сенсорів глюкози *HpGCR1* і *HpHXS1*, доцільно було проаналізувати експресію ідентифікованих нами генів, які кодують функціональний транспортер гексоз *HpHxt1*, потенційні транспортери гексоз *HpHxt2* та *HpHxt3*, а також ймовірний транспортер фруктози *HpFrt1* за умов культивування клітин мутантів *Δgcr1* і *Δhxs1* на середовищах із різним вмістом глюкози або фруктози.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даній роботі використовували штам *H. polymorpha* NCYC495 (прототроф) надалі WT (дикий тип), *Δgcr1met6* надалі *Δgcr1* (з делецією гена, який кодує потенційний сенсор глюкози *HpGcr1*) [19], *Δhxs1* (прототроф, з делецією гена, який кодує низькоафінний сенсор глюкози *HpHxs1*) [20] і подвійний делеційний мутант *Δgcr1Δhxs1*. Дріжджі вирощували за 37°C у живильному 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 Белькгольдера) такого 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 у концентрації 40–50 мг/л. Концентрація джерел Карбону становила 1% (масовий або об’ємний), якщо не вказано інакше. Агаризовані середовища містили агар (2%).

Біомасу клітин (в одиницях оптичної густини, OD_{600}) визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі „Helios-γ” за довжини хвилі 600 нм у кюветі шириною 1 см.

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 за 4 000 об./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 струшування на вортексі „FastPrep” за 6 000 об./с протягом 20 с. Гомогенну суміш центрифугували за 14 000 об./хв протягом 15 хв. Супернатант переносили в чисті пробірки типу «Епендорф», додавали 0,2 мл хлороформу, інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв та центрифугували за 14 000 об./хв протягом 15 хв. Із відібраної водної фази шляхом преципітації 0,5 мл ізопропанолу отримували нерозчинну фракцію сумарної РНК, яку осаджували за 14 000 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.

Умови кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу [8]. 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 флуоресціюючим барвником®SYBR®Green, виробництва „Invitrogen” (США). Реакції проводили на термоциклері ABI Prism 7000 фірми „Applied Biosystems” (США) з відповідним програмним забезпеченням. Для ампліфікації фрагментів ДНК на матриці кДНК відповідних генів використовували пари праймерів (табл. 1).

Таблиця 1. Перелік праймерів, використаних для ПЛР реального часу

Table 1. List of primers for real time Q-PCR

Ген	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність праймера
<i>HpACT1</i>	F- <i>ACT1</i>	5'-TGTCGTCCCAGTTGGTAACG-3'
<i>HpACT1</i>	R- <i>ACT1</i>	5'-GGCCCAATCCAAGAGAGGTAT-3'
<i>HpHXT1</i>	F- <i>HXT1</i>	5'-GTATCGGTATGGCCGTGTGTT-3'
<i>HpHXT1</i>	R- <i>HXT1</i>	5'-CCAAACTCGCCCTGTACAGA-3'
<i>HpHXT2</i>	F- <i>HXT2</i>	5'-TTTCAGTGGCGTCGCTGTT-3'
<i>HpHXT2</i>	R- <i>HXT2</i>	5'-GCGGACCCTATCATCAGCA-3'
<i>HpHXT3</i>	F- <i>HXT3</i>	5'-GGCGCTCAGGAGTCAAACC-3'
<i>HpHXT3</i>	R- <i>HXT3</i>	5'-GGCTCGATATCCTGAGGCAAG-3'
<i>HpFRT1</i>	F- <i>FRT1</i>	5'-GCCTGTCTCACCTGGGTCA-3'
<i>HpFRT1</i>	R- <i>FRT1</i>	5'-GAGGCGGTGATCCGTAGG-3'

Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ($\Delta\Delta Ct$ метод) [8]. Розрахунки 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

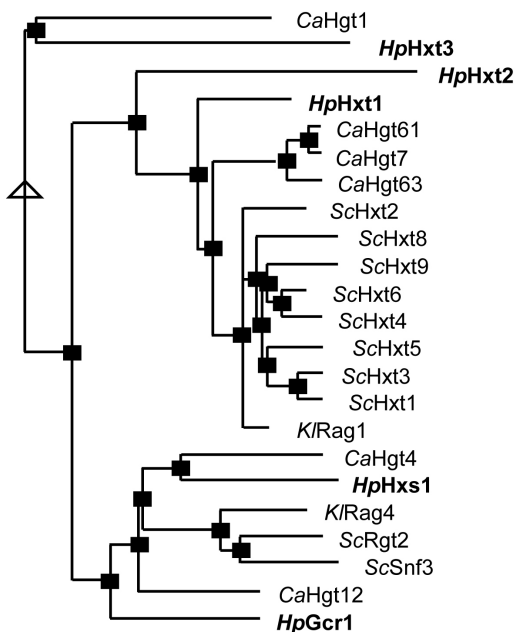
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

З метою встановлення функціональної ролі двох транспортероподібних сенсорів глюкози *H. polymorpha* було проведено аналіз експресії генів, можливих мішеней *HpGcr1*- та *HpHxs1*-опосередкованої регуляції, які кодують гомологи транспортерів гексоз – *HpHxt1* [20], *HpHxt2* (contig 16, orf 323), *HpHxt3* (contig 24, orf 467), потенційний транспортер фруктози – *HpFRT1* (contig 42, orf 249).

Використовуючи програми BLAST, у базі даних геному *H. polymorpha* (<https://ssl.biomax.de/rheinbiotech/>) нами було ідентифіковано гени потенційних транспортерів гексоз і встановлено, що ймовірний білковий продукт гена *HpHXT1* (contig 06, orf 206) складається з 540 амінокислотних залишків. Подібно до *HpGcr1* та *HpHxs1*, у *HpHxt1* наявні 12 характерних для всіх описаних на сьогодні транспортерів гексоз трансмембранних доменів (TM) та є функціональним у гетерологічній системі *S. cerevisiae* [20]. *HpHxt1* виявляє найвищий ступінь гомології до функціональних транспортерів гексоз: з *C. albicans* *CaHgt7* та *CaHgt61* (58% ідентичності, 73% подібності), *CaHgt63* (61% ідентичності, 76% подібності), *K. lactis* *KIRag1* (61% ідентичності, 78% подібності), а також з *S. cerevisiae*, таких як *ScHxt3* (59% ідентичності, 75% подібності), *ScHxt6* та *ScHxt7* (58% ідентичності, 73% подібності), *ScHxt1* (57% ідентичності, 74% подібності) (рис. 1, 2). В аналізі також використовувались амінокислотні послідовності й інших двох потенційних транспортерів гексоз *H. polymorpha*, таких як *HpHxt2* та *HpHxt3*. Обидва ці білки характеризувалися високим ступенем гомології до транспортерів гексоз *C. albicans* та *S. cerevisiae* (рис. 1, 2).

Рис. 1. Філогенетичне дерево транспортерів/сенсорів гексоз дріжджів на основі ступенів гомології амінокислотних послідовностей, побудоване за допомогою програми ClustalW algorithm. Корінь дендрограми показано білим трикутником. Умовні позначення: Ca – *Candida albicans*, Hp – *Hansenula polymorpha*, Kl – *Kluyveromyces lactis*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*

Fig. 1. Phylogenetic tree based on primary sequence similarity depicting predicted evolutionary relationship of *H. polymorpha* Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxs1, and Gcr1 proteins to other yeast and fungal hexose transporters. The tree was built using the ClustalW algorithm for multiple alignments. The tree root is shown as an open triangle, and subtrees' roots are shown as solid squares. **Abbreviations:** Ca – *Candida albicans*, Hp – *Hansenula polymorpha*, Kl – *Kluyveromyces lactis*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*



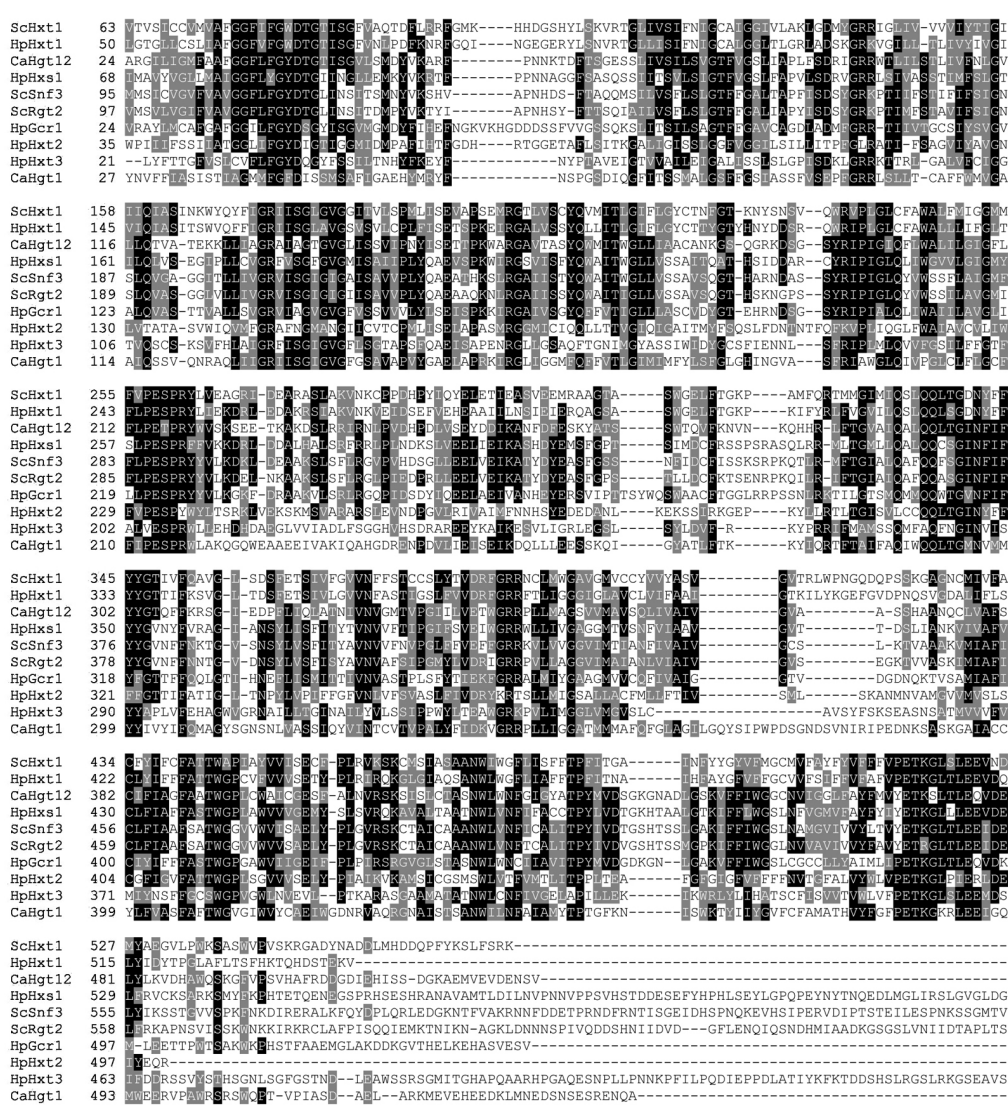


Рис. 2. Накладання амінокислотних послідовностей гомологів транспортерів гексоз дріжджів. Консервативні амінокислотні залишки виділені чорним, подібні – сірим кольором. **Умовні позначення:** Hp – *Hansenula polymorpha*; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Ca – *Candida albicans*, Kl – *Kluyveromyces lactis*

Fig. 2. Multiple alignment of yeast hexose transporter homologues. Conservative amino acid residues colored in black, similar amino acid residues - in gray. **Abbreviations:** Hp – *Hansenula polymorpha*; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Ca – *Candida albicans*, Kl – *Kluyveromyces lactis*

Для встановлення відносного рівня експресії досліджуваних генів *HpHXT1*, *HpHXT2*, *HpHXT3* та *HpFRT1* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (кПЛР). Клітини штамів дикого типу, $\Delta gcr1$, $\Delta hxs1$ та $\Delta gcr1\Delta hxs1$, вирощені за умов дерепресії (YPEth – живильне середовище з етанолом), переносили на мінеральне середовище з метанолом і різними концентраціями глюкози (0,01%, 0,1% та 1,0%). Відносний рівень експресії визначали через 0,5 год,

1 год, 2 год інкубації в середовищах із відповідними карбовоними субстратами та виражали в $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Отримані значення ΔCt для кожного гена калібрували відносно значення ΔCt гена *H. polymorpha ACT1*, який кодує актин і конститутивно експресується у дріжджів, незалежно від умов культивування та джерела Карбону. Точкою відліку рівнів експресії генів слугували значення експресії цих генів, розраховані для штаму дикого типу, культивованого на YPEth. На діаграмах представлено дані типового експерименту.

Як було показано раніше, штами $\Delta gcr1$ та $\Delta gcr1\Delta hxs1$ характеризувалися пошкодженням низько- та високоафінного транспорту глюкози, а $\Delta hxs1$ – лише низькоафінного [1]. Тому нами було проаналізовано експресію функціонального транспортера глюкози *HpHXT1* у разі інкубації клітин досліджуваних мутантів на середовищі з глюкозою та метанолом для встановлення умов, за яких відбувається індукція чи репресія експресії даного гена (рис. 3).

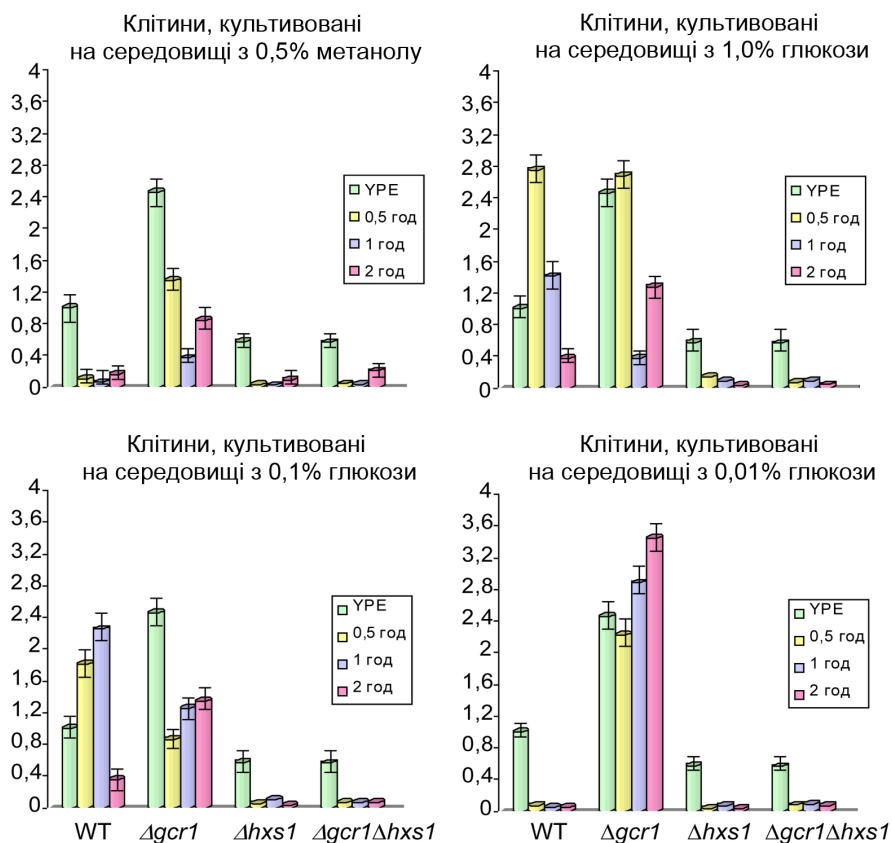


Рис. 3. Відносний рівень експресії *HpHXT1* (виражений у $2^{-\Delta\Delta Ct}$) у штамах *H. polymorpha*, культивованих на середовищах з 0,5% метанолу та різними концентраціями глюкози

Fig. 3. Relative level of *HpHXT1* expression (expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$) in *H. polymorpha* strains cultivated on media with 0.5% of methanol and different glucose concentrations

Під час культивування клітин штаму дикого типу на середовищах із метанолом та 0,01% глюкозою ген *HpHXT1* не експресувався, тоді як за умов інкубації клітин

на середовищах з 0,1% та 1% глюкози індукувалась експресія гена даного транспортера глюкози. Отримані результати підтверджують гіпотезу, що *HpHXT1* кодує низькоафінний транспортер глюкози [20], який індукується високими концентраціями цього цукру в ростовому середовищі та репресується за умов культивування на середовищах із низькими концентраціями глюкози, а також за відсутності цього карбонового субстрату (рис. 3).

Слід зауважити, що у мутантів $\Delta hxs1$ та $\Delta gcr1\Delta hxs1$, незалежно від концентрації глюкози в середовищі, *HpHXT1* не експресувався, що вказує на існування *HpHxs1*-залежного шляху індукції експресії даного транспортера. За відсутності *HpGcr1* у клітинах *HpHXT1* експресувався як на високих, так і на низьких концентраціях глюкози, а також на метанолі, що може свідчити про *HpGcr1*-опосередковану репресію гена даного транспортера за умов вирощування клітин на середовищах із низькими концентраціями глюкози та за її відсутності.

Окрім *HpHxt1*, у базі даних геному *H. polymorpha* було ідентифіковано інший гомолог транспортерів гексоз *HpHxt2*.

Аналіз експресії *HpHXT2* у штаму дикого типу, інкубованого на середовищах із метанолом та різними концентраціями глюкози, виявив, що промотор даного гена строго репресувався високими концентраціями глюкози й експресувався у разі вирощування клітин на середовищі з низькими концентраціями цього цукру (0,01%) або метанолом (рис. 4). Зростання рівня експресії *HpHXT2* у клітин штаму дикого типу через 2 год інкубації на середовищі з 0,1% глюкози можна пояснити вичерпуванням карбонового субстрату і, відповідно, зниженням концентрації цього цукру в культуральній рідині. Таким чином, відносні рівні експресії *HpHXT2* за різних умов культивування клітин штаму дикого типу свідчать, що білковий продукт даного гена виконує функцію високоафінного транспортера глюкози, а для індукції його продукції в клітині глюкоза не потрібна.

На відміну від штаму дикого типу, делеційні мутанти $\Delta gcr1$, $\Delta hxs1$, $\Delta gcr1\Delta hxs1$ характеризувалися зміненою регуляцією експресії *HpHXT2* на середовищі з метанолом, а деякі з них – і на середовищі з глюкозою. Так, під час інкубації клітин усіх мутантних штамів на середовищі з метанолом як єдиним джерелом Карбону спостерігався знижений рівень експресії *HpHXT2*, порівняно зі штамом дикого типу, тобто відсутність сенсорів глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1* негативно впливала на експресію даного гена (рис. 4). Окрім цього, у мутанта $\Delta gcr1$, вирощеного на середовищі з глюкозою, відбувалося зростання відносного рівня експресії *HpHXT2*, що може свідчити про *HpGcr1*-опосередковану репресію гена даного транспортера за умов надлишку глюкози.

У базі даних геному *H. polymorpha* було ідентифіковано ще один гомолог транспортерів гексоз *HpHxt3*, який за своєю амінокислотною послідовністю є близьким до функціонального високоафінного транспортера глюкози *S. albicans* Hgt1.

Аналіз експресії *HpHXT3* у штаму дикого типу, інкубованого на середовищах із метанолом та різними концентраціями глюкози, виявив, що експресія даного гена строго репресувалася високими концентраціями глюкози й індукувалась під час вирощування клітин на середовищі з низькими концентраціями цього цукру (0,01–0,1%) та на метанолі (рис. 5). На відміну від штаму дикого типу, делеційні мутанти $\Delta gcr1$, $\Delta gcr1\Delta hxs1$ характеризувалися зміненою регуляцією експресії *HpHXT3* на середовищі з 1% глюкози, тоді як у разі інкубації клітин усіх мутантних штамів на середовищі з метанолом та низькими концентраціями глюкози рівень експресії *HpHXT3* практично не відрізнявся від штаму дикого типу. Виходячи з отриманих

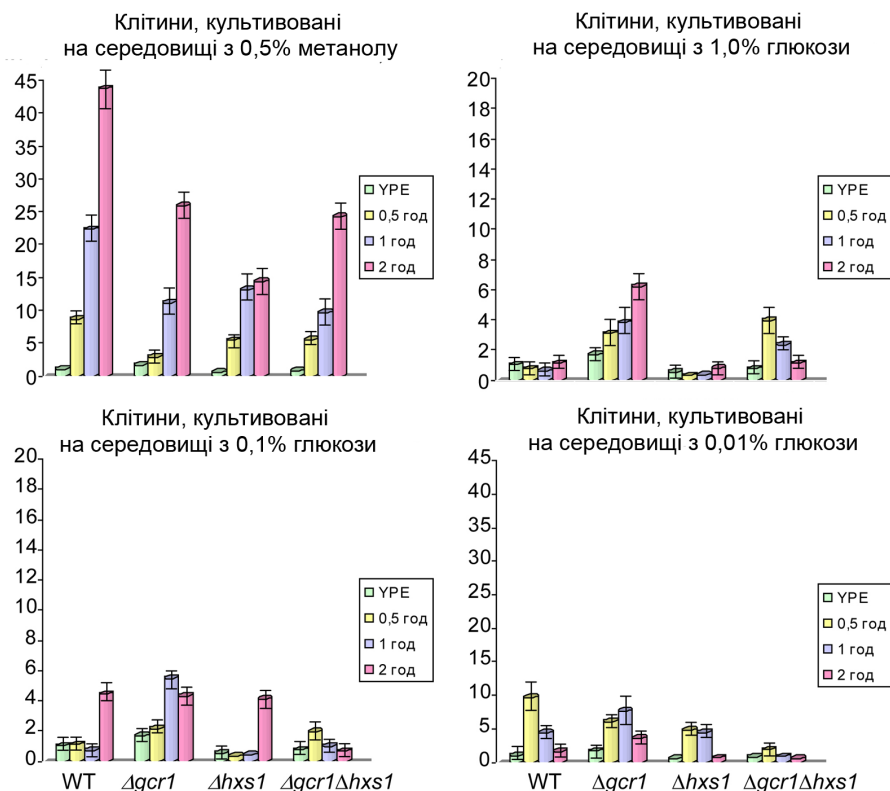


Рис. 4. Відносний рівень експресії *HpHXT2* (виражений у $2^{-\Delta\Delta Ct}$) у штамів *H. polymorpha*, культивованих на середовищах з 0,5% метанолу та різними концентраціями глюкози

Fig. 4. Relative level of *HpHXT2* expression (expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$) in *H. polymorpha* strains cultivated on media with 0.5% of methanol and different glucose concentrations

даних про регуляцію експресії *HpHXT3*, можна припустити, що продукт цього гена є високоафінним транспортером глюкози, синтез якого у клітині індукується низькими концентраціями глюкози та репресується високими. Слід зауважити, що в мутанта $\Delta gcr1$, вирощеного на середовищі з високою концентрацією глюкози, відбувалося зростання відносного рівня експресії *HpHXT3*, що може свідчити про *HpGcr1*-опосередковану репресію гена даного транспортера за умов надлишку глюкози.

Відомо, що *S. cerevisiae* транспортує фруктозу та інші гексози шляхом полегшеної дифузії за допомогою численних Hxt транспортерів гексоз. Проте у споріднених до *S. cerevisiae* видів дріжджів, *Saccharomyces pastorianus* (*carlsbergensis*) та *Saccharomyces bayanus* фруктоза може транспортуватись за допомогою симпортера фруктози, Fsy1 [17]. Експресія Fsy1p у мутанта *hxt-null* *S. cerevisiae*, не здатного до росту на цукрах [11], відновлює ріст на середовищі з фруктозою, але не з глюкозою. Крім цього, експресія Fsy1 строго регулюється обидвома цукрами та їхньою концентрацією у ростовому середовищі.

У *S. pastorianus*, як і у *S. bayanus*, дуже низькі концентрації фруктози та глюкози індукують експресію, тоді як високі концентрації цих вуглеводів перешкоджають транскрипції FSY1 [11]. При цьому глюкоза виступає більш ефективним репресором експресії цього гена, ніж фруктоза.

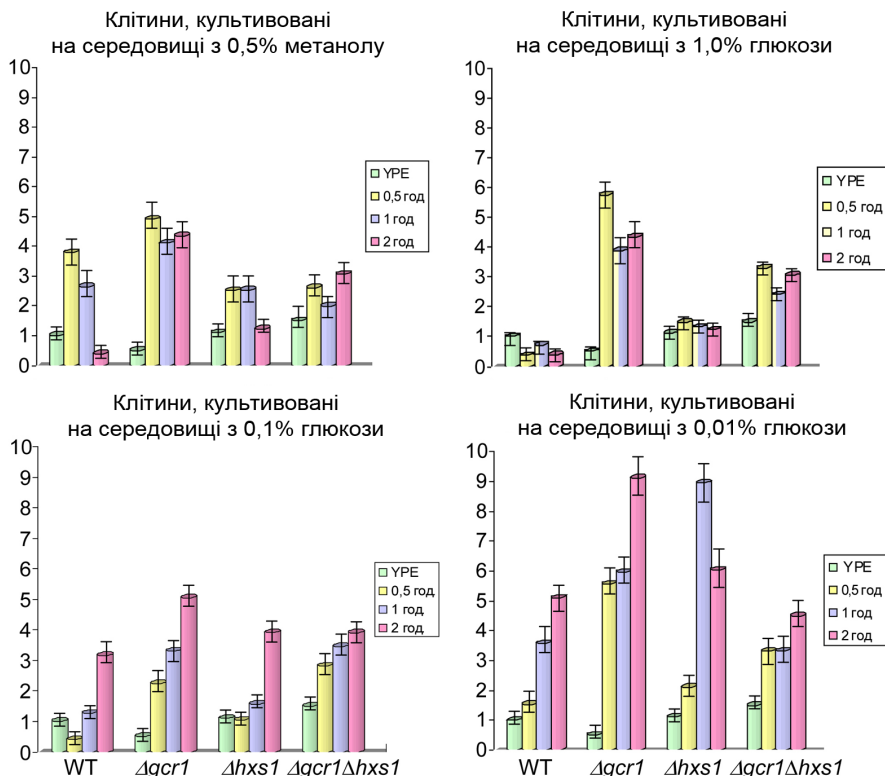


Рис. 5. Відносний рівень експресії *HpHXT3* (виражений у $2^{-\Delta\Delta Ct}$) у штамів *H. polymorpha*, культивованих на середовищах з 0,5% метанолу та різними концентраціями глюкози

Fig. 5. Relative level of *HpHXT3* expression (expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$) in *H. polymorpha* strains cultivated on media with 0.5% of methanol and different glucose concentrations

Використання програми BLAST у базі даних геному *H. polymorpha* (<https://ssl.biomax.de/rheinbiotech/>) дало змогу ідентифікувати два потенційні гомологи специфічних транспортерів фруктози – *HpFrt1* та *HpFrt2* (рис. 6). Білок *HpFrt1* *H. polymorpha* характеризувався 51% ідентичності і 65% подібності до функціонального транспортера фруктози *Frt1* *K. lactis* [17] та 51% ідентичності і 68% подібності до *Fsy1* *S. pastorianus* [11]. Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей специфічних функціональних транспортерів фруктози дріжджів *K. lactis*, *S. pastorianus*, *C. albicans* і потенційних транспортерів фруктози *H. polymorpha* виявив, що спеціалізовані транспортери фруктози становлять окрему групу (рис. 7), відмінну від групи транспортерів гексоз, до якої належать також нетранспортуючі сенсори глюкози *Snf3*, *Rgt2* *S. cerevisiae*, *Hxs1* *H. polymorpha* та функціональні транспортери гексоз – *Hxt* білки (рис. 5).

Було проаналізовано, як впливає глюкоза та її концентрація у культуральному середовищі, а також мутації у генах сенсорів гексоз, на експресію одного з потенційних специфічних транспортерів фруктози *H. polymorpha*. Аналіз експресії *HpFRT1* у штаму дикого типу, інкубованого на середовищах із метанолом і різним вмістом глюкози, виявив, що промотор даного гена строго репресувався високими концентраціями глюкози й індукувався за умов вирощування клітин на середовищі з низькими

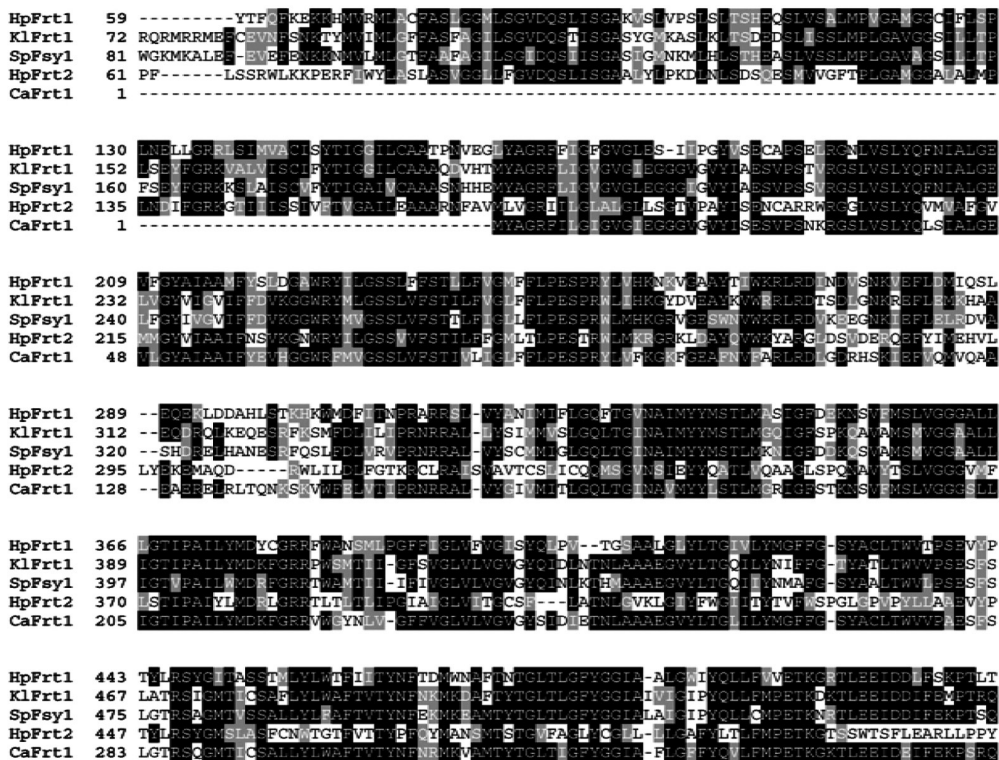


Рис. 6. Накладання амінокислотних послідовностей гомологів транспортерів фруктози дріжджів. Консервативні амінокислотні залишки виділені чорним, подібні – сірим кольором. Умовні позначення: Hp – *Hansenula polymorpha*; Sp – *Schizosaccharomyces pombe*; Ca – *Candida albicans*, Kl – *Kluyveromyces lactis*

Fig. 6. Multiple alignment of yeast hexose transporter homologues. Conservative amino acid residues colored in black, similar amino acid residues – in gray. **Abbreviations:** Hp – *Hansenula polymorpha*; Sp – *Schizosaccharomyces pombe*; Ca – *Candida albicans*, Kl – *Kluyveromyces lactis*

концентраціями цього цукру (0,01%), а також на метанолі (рис. 8). Зростання рівня експресії *HpFRT1* у клітин штаму дикого типу через 2 год інкубації на середовищі з 0,1% глюкози можна пояснити вичерпуванням субстрату й, відповідно, зниженням концентрації цього цукру. Отримані результати узгоджуються з даними про регуляцію експресії гена високоафінного транспортера фруктози *FSY1 S. pastorianus* [11].

У мутанта $\Delta gcr1$ спостерігався надзвичайно високий рівень експресії *HpFRT1*, порівняно зі штамом дикого типу та іншими мутантними штамми, на середовищі з метанолом і на середовищі з різними концентраціями глюкози.

Делеція гена *HpHXS1* не впливала на експресію *HpFRT1* за умов відсутності фруктози в ростовому середовищі. Проте відсутність *HpHxs1* у мутанта $\Delta gcr1\Delta hxs1$ повністю нівелювала регуляторний вплив делеції гена *HpGCR1* на експресію *HpFRT1* (рис. 8).

Беручи до уваги високий ступінь гомології *HpFrt1* до специфічних транспортерів фруктози *Frt1 K. lactis*, *Fsy1 S. pastorianus* і подібність у їх регуляції глюкозою, можна припустити, що *HpFrt1* належить до високоафінної системи транспорту фруктози, а його експресія регулюється транспортероподібними сенсорами глюкози *HpGcr1* (репресія) та *HpHxs1* (індукція).

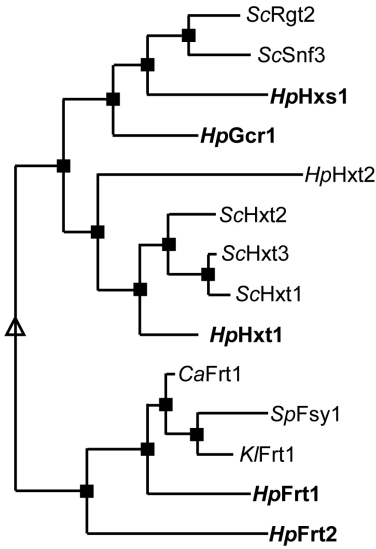


Рис. 7. Філогенетичне дерево транспортерів/сенсорів гексоз дріжджів на основі ступенів гомології амінокислотних послідовностей, побудоване за допомогою програми ClustalW algorithm. Корінь дендрограми показано білим трикутником. **Умовні позначення:** Ca – *Candida albicans*, Hp – *Hansenula polymorpha*, Kl – *Kluyveromyces lactis*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*, Sp – *Schizosaccharomyces pombe*

Fig. 7. Phylogenetic tree based on primary sequence similarity depicting predicted evolutionary relationship of *H. polymorpha* Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxs1, and Gcr1 proteins to other yeast and fungal hexose transporters. The tree was built using the ClustalW algorithm for multiple alignments. The tree root is shown as an open triangle, and subtrees' roots are shown as solid squares. **Abbreviations:** Ca – *Candida albicans*, Hp – *Hansenula polymorpha*, Kl – *Kluyveromyces lactis*, Sc – *Saccharomyces cerevisiae*, Sp – *Schizosaccharomyces pombe*

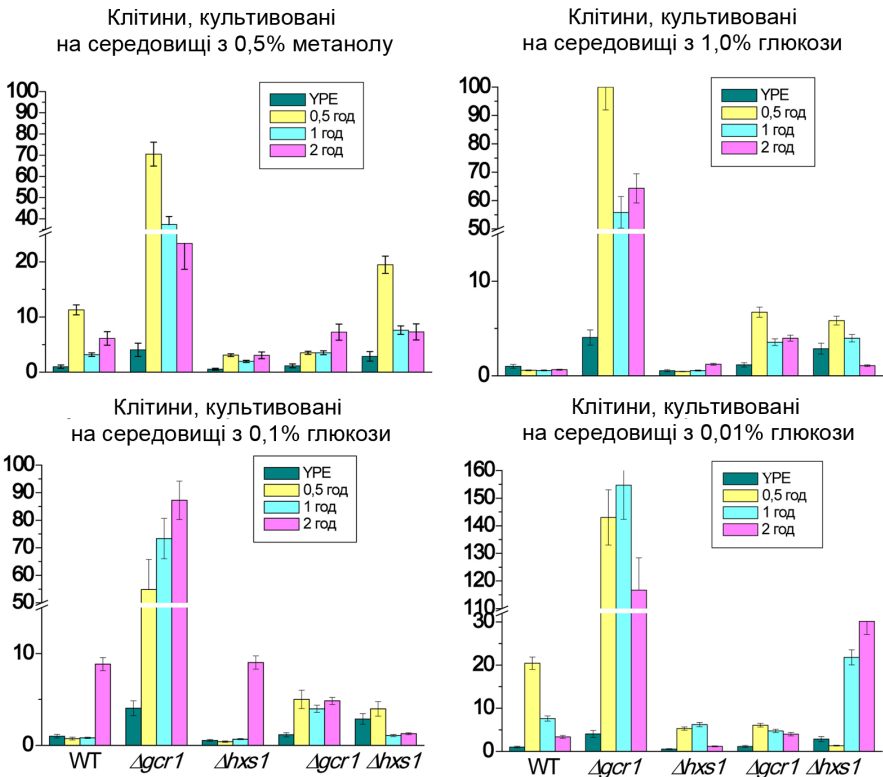


Рис. 8. Відносний рівень експресії *HpFRT1* (expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$) у штамів *H. polymorpha*, культивованих на середовищах з 0,5% метанолу та різними концентраціями глюкози

Fig. 8. Relative level of *HpFRT1* expression (expressed in $2^{-\Delta\Delta Ct}$) in *H. polymorpha* strains cultivated on media with 0.5% of methanol and different glucose concentrations

ОБГОВОРЕННЯ

Раніше було встановлено, що ген *HpHXT1* *H. polymorpha* кодує низькоафінний транспортер глюкози [20], який індукується високим вмістом цього цукру в ростовому середовищі та репресується за умов культивування клітин штаму дикого типу на середовищах із низькими концентраціями глюкози, а також за відсутності цього карбонового субстрату. Оскільки делеція *HpHXS1*, гена функціонального низькоафінного сенсора глюкози, призводила до пригнічення експресії *HpHXT1* незалежно від концентрації глюкози в ростовому середовищі, ми пропонуємо, що білок *HpHxs1* задіяний у шляху індукції експресії даного транспортера. За відсутності *HpGcr1* у клітинах, вирощених на середовищах із низькими концентраціями глюкози та метанолом, рівень експресії *HpHXT1* був підвищеним, що свідчить про *HpGcr1*-опосередковану репресію гена, який кодує *HpHxt1*, за умов дефіциту глюкози в культуральній рідині.

Опираючись на результати аналізу відносного рівня експресії гена *HpHXT2* у клітин штаму дикого типу, вирощених на середовищах із різними концентраціями глюкози, можна припускати, що білковий продукт даного гена виконує функцію високоафінного транспортера глюкози, а для індукції його продукції у клітині не потрібна глюкоза. Дисфункція сенсорів глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1* негативно впливала на експресію гена *HpHXT2* за умов відсутності глюкози. Окрім цього, у вирощеного на середовищі з високою концентрацією глюкози мутанта з делетованим *HpGCR1*, відбувалося зростання відносного рівня експресії *HpHXT2*, що може свідчити про *HpGcr1*-опосередковану репресію гена даного транспортера за умов надлишку глюкози.

Результати аналізу відносного рівня експресії *HpHXT3* у клітин, культивованих на середовищах із різним вмістом глюкози, вказують на те, що продукт даного гена також є високоафінним транспортером глюкози, синтез якого у клітині індукується низькими концентраціями глюкози та репресується високими. Слід зауважити, що у мутанта $\Delta gcr1$, вирощеного на середовищі з високою концентрацією глюкози, відбувалося зростання відносного рівня експресії *HpHXT3*, подібно до *HpHXT2*, що вказує на *HpGcr1*-опосередковану репресію генів високоафінних транспортерів глюкози у *H. polymorpha*.

Окрім цього, нами була показана функціональна роль потенційного сенсора глюкози *HpGcr1* у регуляції експресії ймовірного високоафінного транспортера фруктози. У мутанта $\Delta gcr1$, інкубованого на середовищі з метанолом і на середовищах із різними концентраціями глюкози, спостерігався надзвичайно високий рівень експресії *HpFRT1*. Відсутність *HpHxs1* у штаму $\Delta gcr1\Delta hxs1$ повністю нівелювала регуляторний вплив делеції гена *HpGCR1* на експресію *HpFRT1*, що вказує на взаємодію двох білків у регуляції високоафінного транспорту фруктози.

Таким чином, ми можемо стверджувати, що два сенсори глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1* *H. polymorpha* регулюють експресію генів, які кодують транспортери гексоз, а саме: *HpGcr1* бере участь у репресії гена низькоафінного транспортера гексоз *HpHXT1* за умов дефіциту глюкози, а також у репресії генів потенційних високоафінних транспортерів глюкози *HpHXT2* та *HpHXT3* за умов надлишку даного карбонового субстрату. Для *HpHxs1* була показана участь в індукції експресії гена, який кодує низькоафінний транспортер глюкози *HpHxt1*. Як було виявлено раніше [20], у штамів із делетованими генами *HpHXS1* або *HpHXT1* пошкодженим є лише низькоафінний транспорт глюкози, що узгоджується з отриманими нами даними

про регуляцію експресії *HpHXT1* сенсором *HpHxs1*. Зростання рівня експресії генів високоафінних транспортерів гексоз *HpHXT2* та *HpHXT3* у клітин штаму $\Delta gcr1$, культивованих на середовищах із високим вмістом глюкози, не впливає на ефективність транспорту цього карбонового субстрату, оскільки, як було показано раніше, $\Delta gcr1$ характеризувався дефектом низькоафінного транспорту гексоз (глюкози і фруктози) [1]. Окрім цього, у клітин із делетованим *HpGCR1* конститутивно експресується ген функціонального низькоафінного транспортера гексоз *HpHXT1*, проте система низькоафінного транспорту глюкози залишається слабофункціональною. Такі дані можуть свідчити про нестабільність мРНК *HpHXT1*, *HpHXT2* та *HpHXT3* або про низький вміст чи відсутність білкових продуктів досліджуваних генів у клітин штаму $\Delta gcr1$ за умов культивування на середовищах із різним вмістом глюкози.

Окрім участі в репресії генів низькоафінного транспортера гексоз *HpHXT1* і потенційних високоафінних транспортерів глюкози *HpHXT2* та *HpHXT3*, потенційний сенсор глюкози *HpGcr1* також задіяний у регуляції експресії ймовірного високоафінного транспортера фруктози. У разі делеції *HpGCR1* відбувається конститутивна експресія *HpFRT1*, незалежно від наявності й кількості глюкози в ростовому середовищі.

Отже, регуляція транспорту гексоз (глюкози і фруктози) в метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* на рівні експресії генів є складною системою взаємодій регуляторних елементів, чільне місце серед яких посідають сенсори глюкози *HpGcr1* і *HpHxs1*.

1. Стасик О. Г., Денега І. О., Климишин Н. І. та ін. Особливості регуляції транспорту гексоз і катаболітної репресії сенсорами гексоз *HpGcr1* і *HpHxs1* дріжджів *Hansenula polymorpha* І. **Біологічні студії/Studia Biologica**, 2012; 6(2): 33–44.
2. Стасык О.В., Кшеминская Г.П., Кулачковский А.Р. и др. Мутанты метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной катаболитной репрессией. **Микробиология**, 1997; 66: 755–760.
3. Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Res**, 2004, 4: 683–689.
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. Microbiology**, 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. Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **J. Mol. Endocrinology**, 2002; 29: 23–39.
9. DeSousa H. R., Spencer-Martins I., Goncalves P. Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/HC symporter in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. **Yeast**, 2004; 21: 519–530.
10. Dynesen J., Smits H. P., Olsson L. et al. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 1998; 50(5): 579–82.
11. Goncalves P., DeSousa R. H., Spencer-Martins I. FSY1, a novel gene encoding a specific fructose/HC symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. **J. Bacteriology**, 2000; 182: 5628–5630.

12. Hartner F., Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbiol Cell Factories**, 2006; 5(39): 1–21.
13. Karp H., Alamae T. Glucose transport in a methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 1998; 166: 267–273.
14. Madi L., McBride S.A., Bailey L.A. et al. rco-3, a gene involved in glucose transport and coidiation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, 1997; 146(2): 499–508.
15. Ozcan S., Dover J., Johnston M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, 1998; 17: 2566–2573.
16. Reifenberger 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. Biochemistry**, 1997; 245: 324–333.
17. Santangelo G. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 2006; 70(1): 253–258.
18. 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 Microbiology**, 1994; 39: 545–546.
19. 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. Chemistry**, 2004; 279(9): 8116–8125.
20. 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.
21. Wang Y., Pierce M., Schepner L. et al. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. **PLoS Biology**, 2004, 2: 0610–0622.

EXPRESSION OF GENES OF PUTATIVE HEXOSE TRANSPORTERS IN THE YEAST *HANSENULA POLYMORPHA* ARE DIFFERENTIALLY REGULATED BY GLUCOSE SENSORS Hxs1 AND Gcr1

O. G. Stasyk^{1,2}, I. O. Denega^{1,2}, N. O. Sybirna², O. V. Stasyk¹

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: olenastasyk@gmail.com

The first and limiting step of metabolism of glucose, the most widespread carbon and energy source for majority of cells, is the transport of this sugar across cytoplasmic membrane. In the eukaryotic cells glucose controls and ensures its own effective metabolism, acting as extracellular effector, regulating on transcriptional and translational levels amount, type and activity of corresponding hexose transporters. In this study we investigated regulation of expression of genes encoding hexose transporter homologues – *HpHxt1*, *HpHxt2*, *HpHxt3* and putative fructose transporter – *HpFrt1* by two glucose sensors *HpGcr1* and *HpHxs1* in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. We have demonstrated that putative glucose sensor *HpGcr1* is involved in repression of the gene of functional low affinity hexose transporter *HpHXT1* under glucose deficient conditions and participates in repression of genes of putative high affinity glucose transporters *HpHXT2* and *HpHXT3* under excess of this carbon source. It was shown that glucose sensor *HpHxs1* is involved in induction of *HpHXT1* expression. As a result of deletion of *HpGCR1*, but not *HpHXS1*, the gene of putative high affinity fructose transporter *HpFRT1* is constitutively expressed independently of glucose presence and its concentration in growth medium.

Therefore, regulation of hexose (glucose and fructose) transport in methylotrophic yeast *H. polymorpha* at the level of gene expression is a complicated system of interacting regulatory and transporting elements where glucose sensors *HpGcr1* and *HpHxs1* act as the key factors.

Keywords: methylotrophic yeasts, *Hansenula polymorpha*, glucose transporter-like sensors, glucose regulation, genes of hexose transporters.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ ГЕКСОЗ У ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA* ДИФФЕРЕНЦИОННО РЕГУЛИРУЕТСЯ СЕНСОРАМИ ГЛЮКОЗЫ *Hxs1* ТА *Gcr1*

О. Г. Стасик^{1,2}, І. О. Денега^{1,2}, Н. О. Сибірна², О. В. Стасик¹

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

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

Первым и лимитирующим шагом в метаболизме глюкозы, самого распространенного источника углерода и энергии для большинства клеток, является транспорт этого сахара сквозь цитоплазматическую мембрану клетки. У большинства эукариотических клеток глюкоза сама контролирует и обеспечивает собственный эффективный метаболизм, выступая внешним эффектором, который на транскрипционном и трансляционном уровнях регулирует количество, вид и активность соответствующих транспортеров. В данной работе нами была исследована регуляция экспрессии генов, кодирующих гомологи транспортеров гексоз – *HpHxt1*, *HpHxt2*, *HpHxt3* и потенциального транспортера фруктозы – *HpFrt1*, сенсорами глюкозы *HpGcr1* и *HpHxs1* метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. В частности, нами было показано, что потенциальный сенсор глюкозы *HpGcr1* задействован в репрессии гена функционального низкоаффинного транспортера гексоз *HpHXT1* в условиях дефицита глюкозы, а также в репрессии генов возможных высокоаффинных транспортеров глюкозы *HpHXT2* та *HpHXT3* в условиях избытка данного углеродного субстрата. Для сенсора глюкозы *HpHxs1* также было показано участие в индукции экспрессии гена *HpHXT1*. Определено, что в случае делеции *HpGCR1*, но не *HpHXS1*, происходит конститутивная экспрессия гена вероятного высокоаффинного транспортера фруктозы *HpFRT1*, независимо от присутствия и количества глюкозы в ростовой среде.

Таким образом, регуляция транспорта гексоз (глюкозы и фруктозы) у метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* на уровне экспрессии генов является результатом взаимодействия системы регуляторных элементов, главенствующую роль среди которых занимают сенсоры глюкозы *HpGcr1* и *HpHxs1*.

Ключевые слова: метилотрофные дрожжи, *Hansenula polymorpha*, транспортноподобные сенсоры глюкозы, глюкозная регуляция, экспрессия генов транспортеров гексоз.

Одержано: 18.10.2012