Biol. Stud. 2011: 5(2); 93–104 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0502.149
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК 576.34:576.311.34:582.282.31

СЕЛЕКТИВНА ДЕГРАДАЦІЯ ПЕРОКСИСОМ У ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA* ПОТРЕБУЄ СТЕРОЛГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗУ *Atg26*

О. Г. Стасик[1,2], О. В. Стасик[2]

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

[2]Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

UDP-глюкоза:стерол глюкозилтрансфераза (ЕС 2.4.1.173) каталізує біосинтез ергостеролглюкозиду, мінорного мембранного ліпіду у дріжджів і рослин. Стеролглюкозилтрансфераза різних видів дріжджів, у тому числі й метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris*, виявляє вузьку субстратну специфічність щодо цукру, який активується, і акцептора глікозилу. Нами було отримано мутант метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* з делецією гена *ATG26*, який кодує стеролглюкозилтрансферазу, і проаналізовано його фенотип. Встановлено, що, як і у випадку *P. pastoris*, продукт гена *ATG26 H. polymorpha* є необхідним для пексофагії – процесу селективної автофагійної деградації органел пероксисом у вакуолях. Таким чином, стеролглюкозилтрансфераза у різних видів метилотрофних дріжджів виконує аналогічну функцію у процесі пексофагії, імовірно, пов'язану з особливостями морфогенезу та регуляції гомеостазу пероксисом у цих дріжджів.

Ключові слова: метилотрофні дріжджі, *Hansenula polymorpha*, пероксисоми, пексофагія, стеролглюкозилтрансфераза.

ВСТУП

Ріст дріжджів на таких джерелах Карбону, як метанол або олеат, потребує проліферації пероксисом, у яких локалізовані ключові ферменти метаболізму цих субстратів [31]. Проте, коли доступними стають джерела Карбону, для метаболізму яких пероксисоми не потрібні (наприклад, глюкоза або етанол), відбувається селективна деградація цих органел у вакуолях [1]. Селективна деградація пероксисом (пексофагія) залежить від функціонування продуктів генів консервативного в еукаріотів механізму загальної автофагії (*ATG*-генів, від *англ*. ***A***u***T***opha***G***y), та ряду специфічних факторів [3]. Сьогодні відомо 35 *ATG*-генів [10, 13, 26], продукти яких беруть участь у деградації пероксисом.

У метилотрофних дріжджів є два морфологічно відмінних механізми оточення пероксисом додатковими мембранами під час їхньої деградації вакуолями: 1) *макропексофагія*, індукована після перенесення клітин зі середовища, яке містить метанол, у середовище з етанолом (*P. pastoris*), чи у середовище з етанолом або глюкозою (*H. polymorpha*); 2) *мікропексофагія*, індукована після перенесення клітин *P. pastoris* зі середовища з метанолом у середовище з глюкозою [14]. Протягом макропексофагії перед злиттям з вакуолями окремі пероксисоми оточуються додатковими мембранами, утворюючи пексофагосоми. Під час мікропексофагії цілі кластери пероксисом поглинаються випинаннями вакуолярних мембран (від *англ*. *VSMs* – ***V***acuolar ***S***equestering ***M***embrane***s***). Для злиття *VSMs* необхідна наявність мікропексофагійного мембранного апарату (від *англ*. *MIPA* – ***MI***cropexo***P***hagic membrane ***A***pparatus). Мембрани пексофагосом і *MIPA* починають формуватись у спільній точці, так званій преавтофагосомній структурі (*PAS*), яка вважається центральною для всіх автофагійних везикул [3, 6, 11, 21].

Селективність макропексофагії та мікропексофагії щодо пероксисом може забезпечуватись білками Atg11 [12, 14, 18], Atg25 [17], Atg26 [22, 25], Atg28 [26] і Atg35 [20], задіяними в селективному транспортуванні пероксисом у вакуолі, але не в механізмі загальної автофагії у клітин *P. pastoris, H. polymorpha* і *S. cerevisiae*. Atg11 і Atg28 – це білки з coiled-coil доменами, які локалізуються в *PAS* і *VSM* [12, 17, 26]. Atg11 і Atg26 необхідні для утворення пексофагосом і *MIPA* [3, 14, 30]. Окрім того, локалізацію Atg26 в *MIPA* визначає його GRAM домен, який зв'язує фосфатидилінозитол 4′-монофосфат. Цей домен є необхідним для функції білка Atg26 в мікропексофагії [22; 30].

Atg26 – це UDP-глюкоза:стерол глюкозилтрансфераза (ЕС 2.4.1.173), яка синтезує мінорний мембранний ліпід стеролглюкозид (СГ) [23, 28]. Еукаріотичні клітини, в тому числі дріжджові, містять різні форми стеролів, задіяних у численних процесах. Відомо, що для рецептор-опосередкованого ендоцитозу та гомотипового злиття вакуолярних мембран необхідними є ергостерол, найбільш поширений стерол дріжджів, та його попередники [8]. Проте фізіологічна роль окремої групи стеролів, таких як стеролглюкозиди, котрі синтезуються стеролглюкозилтрансферазою [23, 28], наразі залишається не з'ясованою. Стеролглюкозилтрансфераза, Atg26, метилотрофних дріжджів *P. pastoris* задіяна у процесах мікро- та макропексофагії пероксисом. Індуковані метанолом пероксисоми втрачають здатність до деградації за відсутності стеролглюкозиду [19]. Участь Atg26 у пексофагії можна пояснити відносно високим рівнем СГ у цього виду дріжджів, порівняно з іншими, зокрема *Saccharomyces cerevisiae* [28]. Оскільки в *P. pastoris* Atg26 є білком асоційованим з мембранами [22], вміст СГ у певних мембранах впливає на злиття цих структур, зокрема, під час автофагійної деградації пероксисом. Окрім цього, було показано, що Atg26 не задіяний у макропексофагії пероксисом, індукованих олеатом і амінами, хоча швидкість деградації таких пероксисом за відсутності СГ була дещо сповільненою [19]. Такий феномен вказує на те, що *P. pastoris* специфічно використовує конверсію стеролів стеролглюкозилтрансферазою для пришвидшення селективної деградації великих за розміром і об'ємом пероксисом, індукованих метанолом.

Чи є Atg26 необхідним для пексофагії у інших видів метилотрофних дріжджів, зокрема *H. polymorpha*, було невідомо. Відповідь на це питання допоможе з'ясувати, якими є механізми, що забезпечують селективність пексофагії – подібними чи частково відмінними в різних модельних системах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мікроорганізми і умови культивування

У даній роботі використовували такі штами *H. polymorpha*: NCYC495 *leu1-1* [7], делеційний мутант Δ*atg26* (сконструйований під час виконання даної роботи).

Клітини *H. polymorpha* вирощували за 37°C на багатому середовищі YPD (1% пептону, 2% дріжджового екстракту, 1% глюкози) або мінімальному середовищі, до складу якого входило 0,67% YNB з амонію сульфатом (Yeast Nitrogen Base, Difco, Detroit, MI) і 1% метанолу (YNM) або 1% глюкози (YNG). Концентрація лейцину становила 40 мг/л.

Escherichia coli DH5α використовували як штам-реципієнт для ампліфікації плазмід і вирощували за 37°C на середовищі Луріа-Бертані (LB), як описано http://mfa.od.ua/index.htm.

Молекулярно-біологічні методи

У роботі застосовували стандартні методи клонування ДНК, описані Sambrook et al. [24]. Геномну ДНК *H. polymorpha* виділяли за допомогою набору реактивів Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI). Ендонуклеази рестрикції та ДНК-лігазу (Fermentas, Vilnius, Lithuania) використовували згідно з інструкціями виробника. Ампліфікацію фрагментів ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали полімеразою Taq DNA Polymerase High Fidelity (Fermentas, Vilnius, Lithuania) згідно з інструкціями виробника. Праймери, які використовували в даній роботі, наведені в таблиці. Трансформацію *H. polymorpha* методом електропорації проводили, як було описано раніше [5].

Аналіз нуклеотидних і амінокислотних послідовностей

Для аналізу послідовностей ДНК і білків використовували таке програмне забезпечення: http://tools.neb.com/NEBcutter2/, (рестрикційний аналіз нуклеотидних послідовностей), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (мережевий сервіс BLAST для пошуку гомологічних амінокислотних послідовностей), http://elm.eu.org/ (пошук функціональних сайтів у білках).

Біохімічні методи

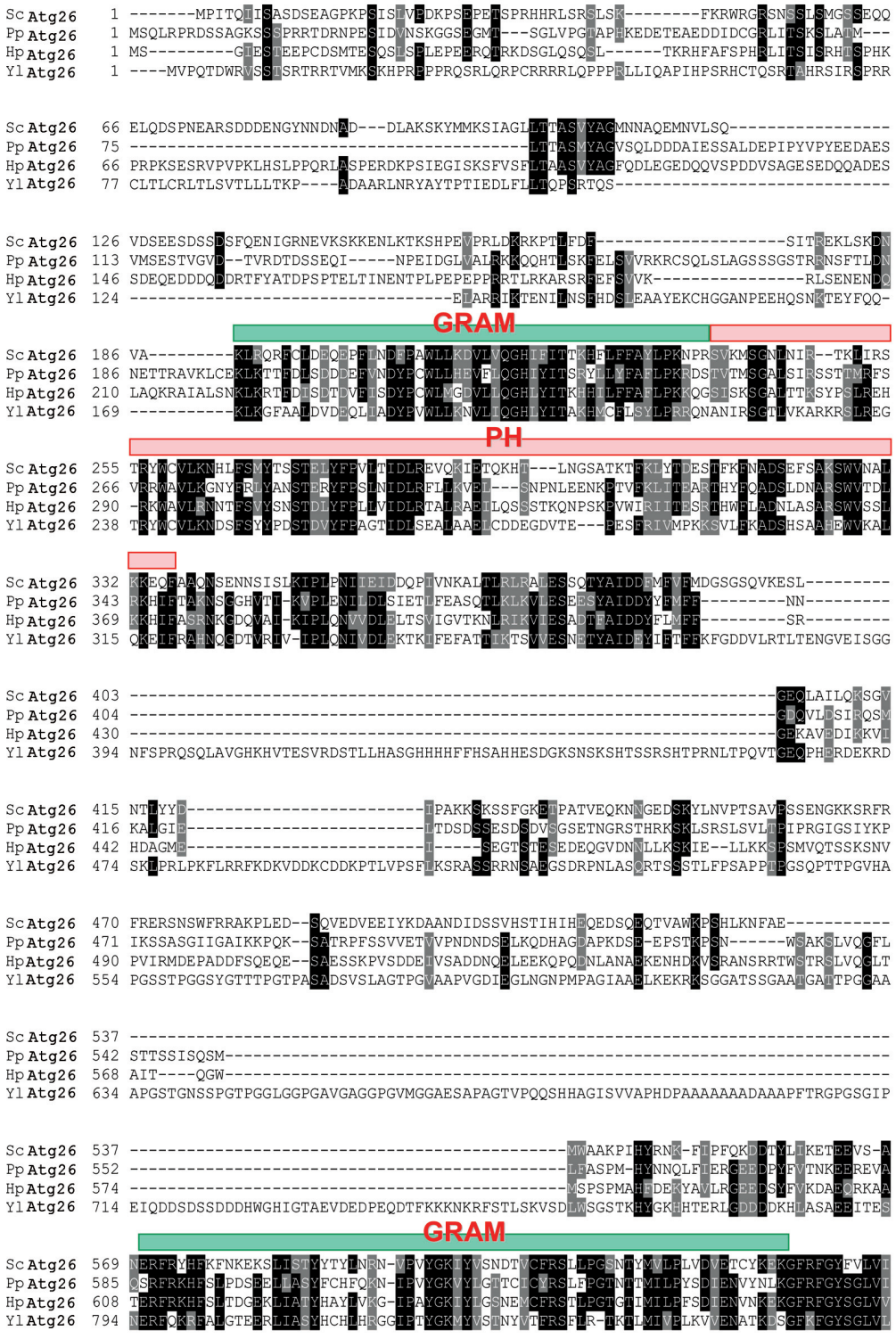
Приготування безклітинних екстрактів, електрофорез у поліакриламідному гелі за наявності натрій додецилсульфату (SDS-PAGE) та імунодетекцію білків методом Вестерн-блот-аналізу проводили згідно з Waterham et al. [29].

Якісне визначення активності пероксисомної алкогольоксидази методом прямих заливок на чашках проводили згідно з [27].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Комп'ютерний аналіз амінокислотної послідовності білкового продукту гена *HpATG26*

Використовуючи програму BLAST, у базі даних геному *H. polymorpha* (http://ssl.biomax.de/rheinbiotech) було ідентифіковано ген *HpATG26* як найближчий гомолог гена *PpATG26 P. pastoris* [25]. Імовірний білковий продукт даного гена складається з 1241 амінокислотних залишків і виявляє 51% ідентичності та 68% подібності до амінокислотної послідовності *PpATG26*. Подібно до *PpATG26*, *HpATG26* містить каталітичний домен, локалізований у С-кінцевій ділянці білка, та GRAM і PH домени в N-термінальній частині (рис.1) [3]. Відомо, що делеція каталітичного домену не впливає на локалізацію білка у клітині, проте пошкоджує пексофагію, вказуючи на те,


GRAM
PH
GRAM

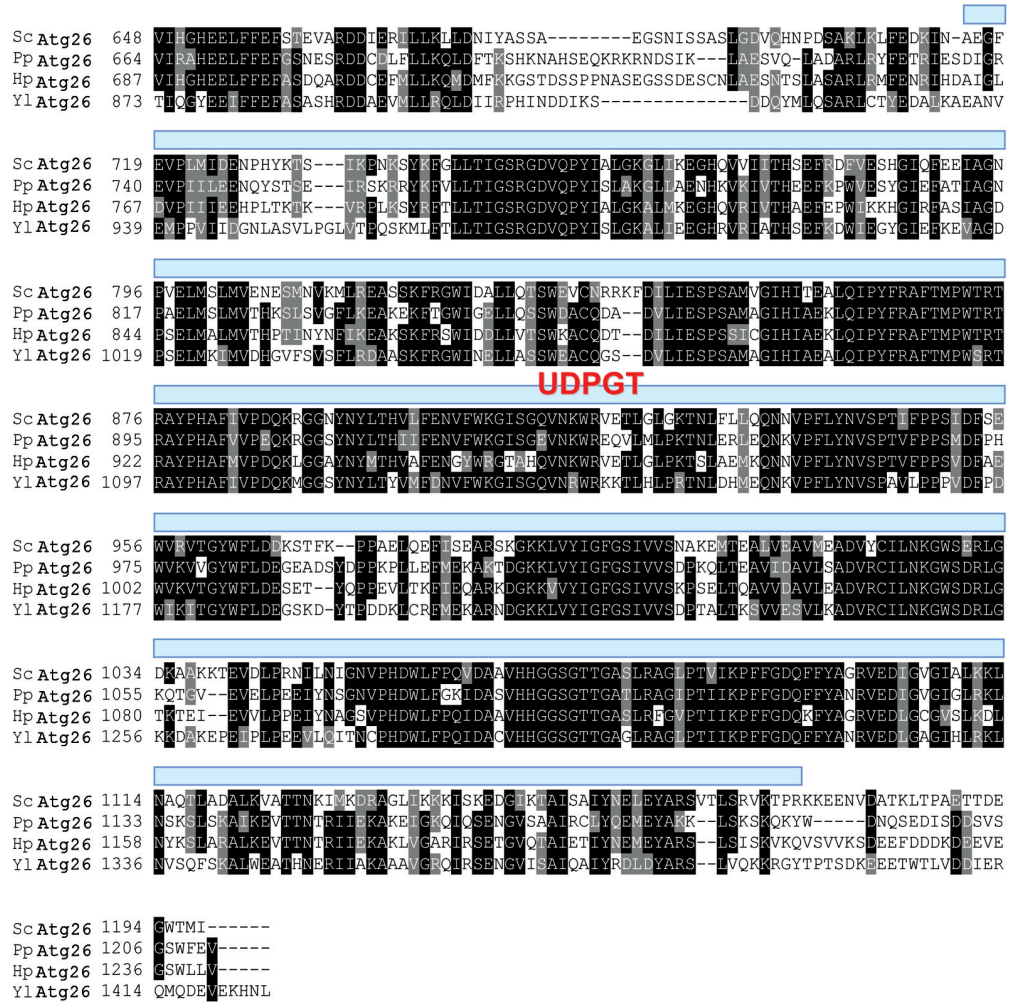


Рис. 1. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей ортологів стеролглюкозилтрансфераз дріжджів. *Умовні позначення:* Hp – *Hansenula polymorpha*; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Pp – *Pichia pastoris*; Yl – *Yarrowia lipolitica*

Fig. 1. Multiple alignment of yeast sterol glucosyltransferase orthologes. *Species abbreviations are:* Hp – *Hansenula polymorpha*; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Pp – *Pichia pastoris*; Yl – *Yarrowia lipolitica*

що біосинтез СГ є необхідним для деградації пероксисом [22]. Накладання послідовностей *Hp*Atg*26* та його гомологів з інших видів дріжджів виявило, що GRAM, PH і UDPGT сегменти є найбільш консервативними структурами цих білків (рис. 1).

Відомо, що GRAM домен наявний у структурі трьох родин білків: глюкозилтрансфераз, активаторів Rab-подібних GTPаз і міотубуляринів [3]. Домен складається приблизно з 70 амінокислотних залишків і, ймовірно, формує чотири β-структури й одну α-петлю. Оскільки більшість білків, які містять GRAM-домени, мають додаткові послідовності для взаємодії з ліпідами, так звані FYVE або плекстрин-гомологічні (PH) домени, вважається, що ці білки є зв'язаними з внутрішньоклітинними

мембранами. В *P. pastoris* заміна однієї амінокислоти в GRAM-домені призводить до порушення здатності стеролглюкозилтрансферази взаємодіяти з мембранами мікрофагійного апарату (*MIPA*) і, як наслідок, до пошкодження мікропексофагії [15].

Конструювання мутанта з делецією гена *HpATG26*

Для детального аналізу фізіологічної ролі *Hp*Atg26 у деградації пероксисом у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* був сконструйований штам з делетованим геном *HpATG26*. Вектор pYT1-delta*HpATG26* (рис. 2), що використовувався для делетування ORF (відкритої рамки зчитування) *HpATG26*, конструювався у два етапи.

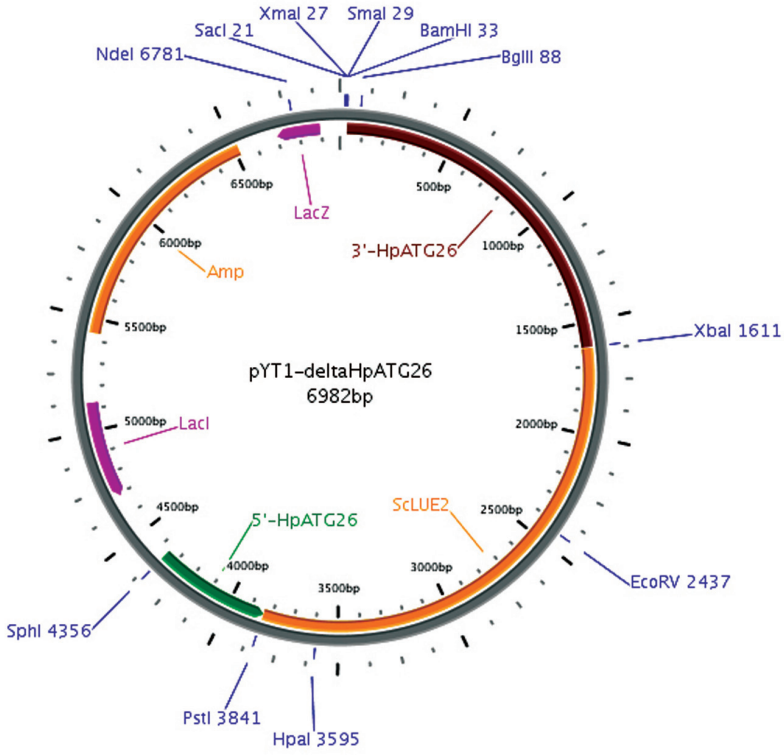


Рис. 2. Вектор pYT1-delta*HpATG26* для делетування ORF *HpATG26*.
Fig. 2. pYT1-delta*HpATG26* plasmid for deletion of *HpATG26* ORF

Фрагмент розміром 1,57 т.п.н. був ампліфікований методом ПЛР з геномної ДНК *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* і включав у себе 3′-кодуючу ділянку, розміром 1,25 т.п.н. (рис. 2). Праймери, які використовувались у даній реакції, OL70 та OL71 (див. таблицю) містили сайти рестрикції XbaI та BamHI, відповідно, для наступного клонування отриманого фрагмента в плазміду pYT1. Фрагмент розміром 0,51 т.п.н., що містив 5′-метіонін-ініціюючий ATG кодон гена *HpATG26*, був ампліфікований методом ПЛР з використанням пари праймерів OL68/OL69 (див. таблицю), які містили сайти рестрикції SphI та PstI, відповідно, для клонування ампліфікованої 5′-ділянки гена в плазміду, сконструйовану на попередньому етапі. Отриманий конструкт, pYT1-delta*HpATG26*, використовували як матрицю для ампліфікації методом ПЛР делеційної касети з парою праймерів OL68/OL71.

Перелік праймерів, використаних у роботі
List of primers used in this study

Ген	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність праймера
HpATG26	OL68	5′-ATACGCATGCATGCTGCTTATGTTTTCG-3′
HpATG26	OL69	5′-TAACTGCAGGACTGAGACTGATTAACT-3′
HpATG26	OL70	5′-GGTTCTAGAAGCCTTGGATCAAGAAAC-3′
HpATG26	OL71	5′-TGTGGATCCTCCCTGATTATTGGAATC-3′
ScLEU2	K22	5′-TGCTCTAGAAGGTGGTTAGCAATCGTC-3′
ScLEU2	KD21	5′-TAGTCTAGAGTGTGGTGCCCTCCTCCTTG-3′

Касету для делеції *HpATG26*, розміром 4,28 т.п.н., трансформували у штам *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1* методом електропорації (рис. 3, *А*). Селекцію прототрофних трансформантів проводили на мінеральному середовищі без додавання лейцину.

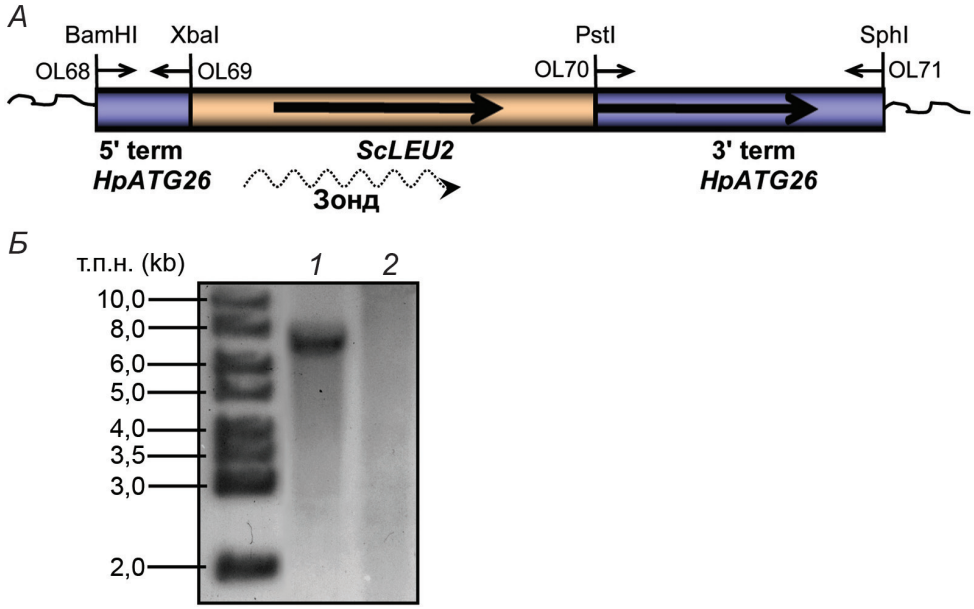


Рис. 3. Конструювання делеційного штаму *H. polymorpha atg26*Δ. *А* – Схема делеційної касети у складі вектора pYT1-delta*HpATG26*. Напрямки транскрипції *HpATG26*, *ScLEU2* позначені стрілками; геномна ДНК, що фланкує делеційну касету після інтеграції в геном – хвилястою лінією. *Б* – Саузерн-блот-аналіз геномної ДНК штамів *atg26*Δ (доріжка № 1) і дикого типу NCYC495 *leu1-1* (доріжка № 2), розщепленої рестриктазою BamHI. Фрагмент гена *ScLEU2*, із розміром 1,4 т.п.н., ампліфікований з pYT1, слугував зондом у Саузерн-блот-аналізі

Fig. 3. Construction of *H. polymorpha* deletion strain *atg26*Δ. *A* – Scheme of deletion cassette composed of pYT1-delta*HpATG26*. The *HpATG26*, *ScLEU2* genes and directions of transcription are indicated by arrows. Genomic DNA of the *H. polymorpha* that flank deletion cassette upon integration into genome is represented by wavy line. *Б* – Southern-blot analysis of genomic DNA isolated from *atg26*Δ (lane # 1) and wild type strain NCYC495 *leu1-1* (lane # 2). 1.4 kb – *ScLEU2* gene fragment amplificated from pYT1 was used as a probe for Southern-blot analysis

Коректна інтеграція в геном касети для делеції гена *HpATG26* була підтверджена методом Саузерн-блот-аналізу. Для аналізу використовували сумарну ДНК трансформантів, оброблену рестриктазою BamHI, та зонд – фрагмент гена *ScLEU2*, виділений з плазміди pYT1 як продукт ПЛР розміром 1,4 т.п.н. з парою праймерів K22/KD21 (див. таблицю). У результаті був відібраний один трансформант *ATG26*::*ScLEU2 leu1-1*, зі сумарної ДНК якого генерувався сигнал, що відповідав BamHI/BamHI фрагменту розміром 7,5 т.п.н., який утворювався при гомологічній інтеграції делеційної касети в геном (рис. 3, *Б*).

Роль *Hp*Atg26 у деградації пероксисом у *H. polymorpha*

В отриманого делеційного мутанта *atg26*Δ і штаму дикого типу NCYC495 *leu1-1* досліджували пексофагію, аналізуючи залишкову активність пероксисомного матриксного білка алкогольоксидази (АО) у процесі пексофагії, візуалізуючи активність АО в колоніях дріжджів [27]. Як показано на рис. 4, *А*, штам дикого типу вияв-

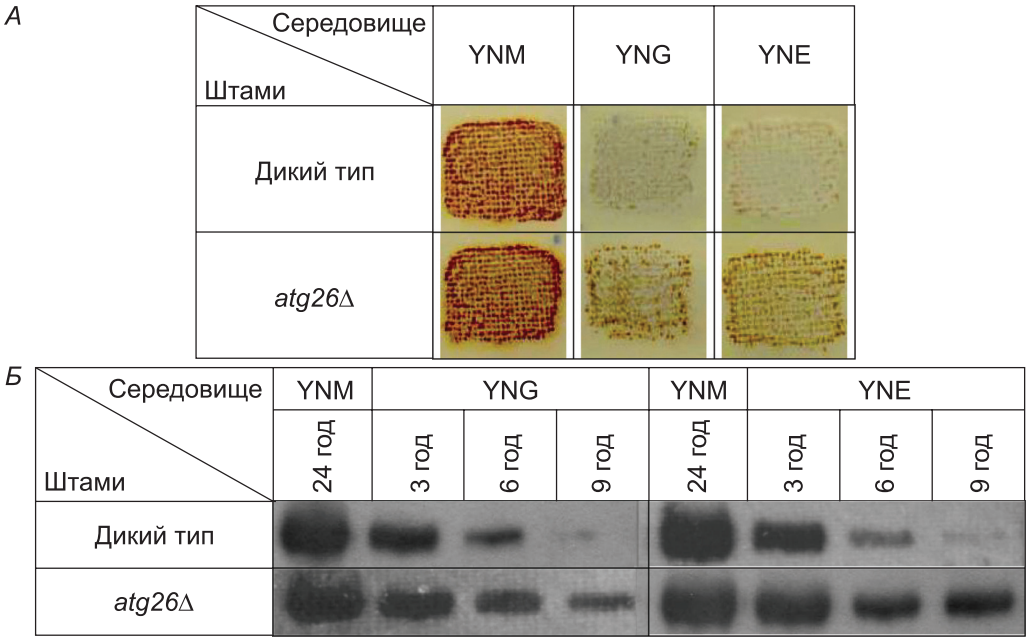


Рис. 4. Фенотипова характеристика мутанта *H. polymorpha atg26*Δ. *А* – Візуалізація активності АО в колоніях дріжджів, вирощених на середовищі з метанолом (YNM) і перенесених на середовища з глюкозою (YNG) і етанолом (YNE) (в концентрації 1% v/w, w/w). *Б* – Кінетичний аналіз пексофагії. Клітини зазначених штамів були вирощені на метанолі та перенесені на свіже мінеральне середовище з глюкозою і етанолом для індукції селективної деградації пероксисом. Проби відбирали через певні проміжки часу. Однакові об'єми культур були нанесені в лунки і проаналізовані на наявність АО методом Вестерн-блот-аналізу

Fig. 4. Phenotypic characterization of *H. polymorpha atg26*Δ mutant strain. *A* – Visualization of AO activity in yeast colonies grown on methanol (YNM) and transferred onto glucose- (YNG) and ethanol- (YNE) containing media (carbon substrate concentration was 1% v/w, w/w). *Б* – Kinetic analysis of pexophagy. Strains were grown in methanol-containing liquid medium and shifted into glucose- and ethanol-containing media for induction of peroxisome degradation. Samples were taken at the indicated time points after the shift. Equal volumes of cultures were loaded per lane and studied by Western blot analysis for the presence of AO protein.

ляв колонії білого кольору, що вказувало на повну деградацію АО під час макропексофагії (після перенесення вирощених на метанолі клітин на середовище з глюкозою або етанолом). На відміну від NCYC495 *leu1-1*, колонії мутанта *atg26*∆ набували темно-багряного кольору, внаслідок збереження значної активності алкогольоксидази, вказуючи на пошкодження пексофагії. Дефект деградації АО у штаму *atg26*∆ також був підтверджений імуноблот-аналізом з використанням специфічних до АО антитіл (рис. 4, *Б*).

Імунопозитивна смуга, яка відповідала алкогольоксидазі, зникала у штаму дикого типу через 9 год після перенесення вирощених на метанольному середовищі клітин у середовище з глюкозою. Проте у делеційного мутанта білок АО зберігався навіть після 9 год інкубації клітин у середовищі з глюкозою чи етанолом.

ОБГОВОРЕННЯ

Хоча механізми біогенезу і деградації пероксисом активно досліджені у різних видів дріжджів, досі залишається не з'ясованим питання природи факторів селективності пексофагії у різних модельних системах [4, 6, 11]. Відомо, що, на відміну від дріжджів *P. pastoris*, у яких пероксисоми деградують двома шляхами (мікро- і макропексофагія), у *H. polymorpha* і глюкоза, й етанол індукують виключно макропексофагію. Atg26 є унікальним білком-ферментом, каталітична активність якого у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* є необхідною і для макро-, і для мікропексофагії індукованих метанолом пероксисом, але не для механізму загальної автофагії [22, 25]. Завданням даної роботи було з'ясувати, чи стеролглюкозилтрансфераза *H. polymorpha*, яка кодується геном *ATG26*, задіяна у процесі макропексофагії у цього виду дріжджів.

З цією метою нами був сконструйований мутантний штам *H. polymorpha* з делетованим геном *ATG26* і проведено аналіз залишкової активності алкогольоксидази як маркерного ферменту індукованих метанолом пероксисом, під час індукції макропексофагії глюкозою чи етанолом. Нами встановлено, що відсутність стеролглюкозилтрансферази Atg26 у клітинах *H. polymorpha* призводила до порушення макропексофагії, індукованої глюкозою та етанолом.

Виходячи з наших і отриманих раніше даних, можна стверджувати, що ергостеролглюкозид виконує видоспецифічну функцію в пексофагії, оскільки ця сполука потрібна для деградації пероксисом у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*, але не потрібна для пексофагії у алканзасвоюючих дріжджів *Yarrowia lipolytica* [19, 25]. Підтвердженням цієї ідеї стала робота, в якій було показано, що у пекарських дріжджів *S. cerevisiae* Atg26 також не задіяний у пексофагії [2]. Стеролглюкозилтрансфераза є лише частково необхідною для макропексофагії олеат- і метиламін-індукованих пероксисом у *P. pastoris* [19]. Поясненням такої дивергентності функцій стеролглюкозилтрансферази у різних видів дріжджів може бути відмінність в об'ємі та кількості пероксисом, індукованих різними карбоновими субстратами і, як наслідок, відмінність у потребі СГ для їхньої деградації.

1. *Bellu A. R., Kiel J. A.* Selective degradation of peroxisomes in yeasts. **Microsc. Res. Tech**, 2003; 61: 161–170.
2. *Cao Y., Klionsky D.J.* Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in Saccharomyces cerevisiae. **Autophagy**, 2007; 3: 17–20.

3. *Doerks T., Strauss M., Brendel M., Bork P.* GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. **Trends Biochem. Sci**, 2000; 25(10): 483–485.
4. *Dunn W. A. Jr., Cregg J. M., Kiel J.A.K.W.* et al. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. **Autophagy**, 2005; 1: 75–83.
5. *Faber K.N., Haima P., Harder W.* et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. **Curr Genet**, 1994; 25: 305–310.
6. *Farré J.C., Subramani S.* Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. **Trends Cell Biol**, 2004; 14: 515–523.
7. *Gleeson M.A., Sudbery P.E.* Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, 1988; 4: 293–303.
8. *Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari B.* et al. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. **Mol. Biol. Cell**, 2002; 13(8): 2664–2680.
9. *Iwata J., Ezaki J., Komatsu M.* et al. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. **J. Biol. Chem**, 2006; 17: 4035–4041.
10. *Kawamata T., Kamada Y., Suzuki K.* et al. Characterization of a novel autophagy-specific gene, ATG29. **Biochem. Biophys. Res**, 2005; 30: 1884–1889.
11. *Kiel J.A., Komduur J. A., van der Klei I.J., Veenhuis M.* Macropexophagy in *Hansenula polymorpha*: facts and views. **FEBS. Lett**, 2003; 14: 1–6.
12. *Kim J., Kamada Y., Stromhaug P. E.* et al. Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. **J. Cell Biol**, 2001; 16: 381–396.
13. *Klionsky D.J., Cregg J.M., Dunn W.A.* et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Dev. Cell**, 2003; 5: 539–545.
14. *Komduur J.A.* **Molecular aspects of peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha***. Haren, The Netherlands: University of Groningen, 2004.
15. *Lemmon M.A., Ferguson K.M.* Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. **Biochem. J**, 2000; 350(1): 1–18.
16. *Luers G.H., Advani R., Wenzel T., Subramani S*. The *Pichia pastoris* dihydroxyacetone kinase is a PTS1-containing, but cytosolic, protein that is essential for growth on methanol. **Yeast**, 1998; 14: 759–771.
17. *Monastyrska I., Kiel J.A.K.W., Krikken A. M.* et al. The *Hansenula polymorpha* ATG25 gene encodes a novel coiled-coil protein that is required for macropexophagy. **Autophagy**, 2005; 1: 92–100.
18. *Mukaiyama H., Oku M., Baba M.* et al. Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. **Genes Cells**, 2002; 7: 75–90.
19. *Nazarko T., Polupanov A., Manjithaya R. R.* et al. The requirement of sterol glucoside for pexophagy in yeast is dependent on the species and nature of peroxisome inducers. **Mol. Biol Cell**, 2007; 18: 106–118.
20. *Nazarko V.Y., Nazarko T. Y., Farré J.-C.* et al. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in Pichia pastoris. **Autophagy**, 2011; 7(4): (in press).
21. *Noda T., Suzuki K., Ohsumi Y.* Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. **Trends Cell Biol**, 2002; 12: 231–235.
22. *Oku M., Warnecke D., Noda T.* et al. Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain. **EMBO J**, 2003; 22: 3231–3241.
23. *Sakaki T., Zahringer U., Warnecke D.C.* et al. Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. **Yeast**, 2001; 18: 679–695.
24. *Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989. 356.
25. *Stasyk O.V., Nazarko T.Y., Stasyk O.G.* et al. Sterol glucosyltransferases have different functional roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. **Cell Biol. Int**, 2003; 27: 947–952.

26. *Stasyk O.V., Stasyk O.G., Mathewson R.D.* et al. Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Autophagy**, 2006; 2: 30–38.
27. *Stasyk O.V., Nazarko T.Y., Sibirny A.A.* Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection of transformants for ATG gene cloning in yeasts. **Methods Enzymology**, 2008; 451: 229–39.
28. *Warnecke D., Erdmann R., Fahl A.* et al. Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. **J. Biol. Chem**, 1999; 274: 13048–13059.
29. *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.
30. *Yamashita S., Oku M., Wasada Y.* et al. PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy**. J. Cell Biol**, 2006; 173: 709–717.
31. *Yan M., Rayapuram N., Subramani S.* The control of peroxisome number and size during division and proliferation. **Curr. Opin. Cell Biol**, 2005; 17: 376–383.

SELECTIVE DEGRADATION OF PEROXISOMES IN THE YEAST *HANSENULA POLYMORPHA* REQUIRES STEROLGLUCOSYLTRANSFERASE *Atg26*

O. G. Stasyk[1,2], O. V. Stasyk[2]

[1]Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: olenastasyk@gmail.com

[2]Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

UDP-glucose:sterol glucosyltransferase (EC 2.4.1.173) catalyses the biosynthesis of ergosterol glucoside, a minor membrane lipid present in yeasts and plants. The sterol glucosyltransferases from different yeast species, including the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, display narrow substrate specificity with respect to both activated sugar and glycosyl acceptor. We isolated the mutant of the methanol-utilizing yeast *Hansenula polymorpha* defective in the *ATG26* gene (encoding sterol glucosyltransferase) and analysed its phenotype. Similarly to *P. pastoris* product of the *H. polymorpha ATG26* gene was required for pexophagy, the process of selective autophagic peroxisome degradation in vacuoles. Thus, sterol glucosyltransferases in different species of methylotrophic yeasts have a similar function in pexophagic process probably related to peculiarities of peroxisome morphogenesis and regulation of their homeostasis in these yeasts.

***Key words*:** methylotrophic yeasts, *Hansenula polymorpha*, peroxisomes, pexophagy, sterol glucosyltransferase.

ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПЕРОКСИСОМ У ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA* ТРЕБУЕТСЯ СТЕРОЛГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗА *Atg26*

О. Г. Стасык[1,2], О. В. Стасык[2]

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

[2]Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

UDP-глюкоза:стерол глюкозилтрансфераза (EC 2.4.1.173) катализирует биосинтез эргостеролглюкозида, минорного мембранного липида у дрожжей и растений. Стеролглюкозилтрансфераза разных видов дрожжей, в том числе и метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, проявляет узкую субстратную специфичность по отношению к активирующемуся сахару и акцептору гликозила. Нами был изолирован мутант метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с делецией гена *ATG26*, кодирующего стеролглюкозилтрансферазу. Показано, что, как и в случае с *P. pastoris*, ген *ATG26 H. polymorpha* необходим для пексофагии – процесса селективной автофагической деградации пероксисом в вакуолях. Таким образом, стеролглюкозилтрансфераза у разных видов метилотрофных дрожжей имеет аналогичную функцию в процессе пексофагии, вероятно, связанную с особенностями морфогенеза и регуляции гомеостаза пероксисом у этих дрожжей.

***Ключевые слова*:** метилотрофные дрожжи, *Hansenula polymorpha*, пероксисомы, пексофагия, стеролглюкозилтрансфераза.

Одержано: 29.06.2011