

КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ *SEF1* І *TUP1*, ЯКІ КОДУЮТЬ ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ АКТИВАТОР І ГЛОБАЛЬНИЙ РЕПРЕСОР У ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ *MEYEROZYMA (CANDIDA, PICHIA) GUILLIERMONDII*

Д. ФЕДОРОВИЧ¹, В. БОРЕЦЬКИЙ¹, Ю. ПИНЯГА¹, І. БОГОВИЧ², Ю. БОРЕЦЬКИЙ^{1,3}, А. СИБІРНИЙ^{1,4}

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

² Університет Небраска-Лінкольн, вул. 1400 R, Лінкольн, NE 68588, США

³ Львівський державний університет фізичної культури, Львів, Україна

⁴ Жешувський університет, вул. Зельверовича, Жешув, 35-601, Польща

E-mail: fedorovych.d@gmail.com

Ідентифіковано, клоновано і делетовано гени *Meurozyma (Candida, Pichia) guilliermondii*, які кодують гомологи транскрипційного фактора *Sef1p Candida famata* і *Tup1p Candida albicans*, відповідно. Делеція гомолога транскрипційного фактора *Sef1p* у *M.(P.) guilliermondii* повністю блокує надсинтез рибофлавіну за умов дефіциту заліза. Результати комплементарного аналізу вказують на те, що раніше описані мутанти *M.(P.) guilliermondii gib83* і сконструйовані делеційні штами належать до однієї комплементарної групи і мають дефект у тому ж гені *SEF1*. Інактивация ідентифікованого гомолога гена *TUP1* у штаму дикого типу *M.(P.) guilliermondii* приводить до зростання вмісту заліза в клітинах в 1,5 раза та підвищення продукції рибофлавіну в 1,6–1,7 раза. Введення плазмиди, що несе копію гена *TUP1*, не відновлює метаболічні дефекти у мутанта, здатного до надпродукції рибофлавіну і акумуляції заліза в клітинах мутанта *M.(P.) guilliermondii t3*, що несе мутацію *hit1*. Отримані результати дозволяють вважати, що у дріжджів, які належать до класу CUG, і транскрипційний фактор *Sef1p*, і *Tup1p* залучені в регуляцію обох процесів: забезпечення залізом і синтезу рибофлавіну. Молекулярні механізми дії *Tup1p* на біосинтез рибофлавіну у *M.(P.) guilliermondii* потребують подальшого дослідження.

Ключові слова: дріжджі, рибофлавін, асиміляція заліза, транскрипційна регуляція.

Вступ. *Candida guilliermondii* (телеоморф *Pichia guilliermondii*, з 2010 р. *Meurozyma guilliermondii*), є аскоміцетними дріжджами широко розповсюдженими у навколишньому середовищі, а також є частиною сапрофітної мікрофлори людини [1]. *M.(P.) guilliermondii* належить до Кребтрі-негативних дріжджів, які не можуть рости у строго анаеробних умовах, має всі три точки фосфорилування у дихальному ланцюзі

[2]. *M.(P.) guilliermondii*, *Candida albicans*, як і більшість представників так званої CUG класу, здатні до надсинтезу рибофлавіну (вітамін B₂) за умов недостатнього забезпечення залізом [1, 3]. Селекціоновано мутанти *M.(P.) guilliermondii* з пошкодженою регуляцією біосинтезу рибофлавіну і показано, що вони на додаток мають порушення регуляції забезпечення залізом та зміни у відповіді на оксидативний стрес [4]. Наприклад, мутант, *M.(P.) guilliermondii hit1-1* (high iron transport), який конститутивно надсинтезує рибофлавін, характеризується підвищеною редуцтазною активністю клітин, високим вмістом заліза, гіперчутливістю до іонів міді та деякими дефектами у відповіді на оксидативний стрес [5]. На відміну від цього мутанта, штам *gib83-13*, нездатний до надпродукції рибофлавіну за умов дефіциту заліза, має пошкоджену високоафінну систему поглинання заліза [6]. Однак, згадані гени не були ідентифіковані через відсутність відповідних фенотипових ознак мутантів придатних для клонування генів дикого типу.

Ймовірно, що *M.(P.) guilliermondii* та інші дріжджі, здатні до надсинтезу рибофлавіну у відповідь на нестачу заліза, мають дуже схожі залізоалежні регуляторні механізми, які значно відрізняються від *Saccharomyces cerevisiae* [3, 7]. Раніше повідомлялось, що головним регулятором біосинтезу рибофлавіну у іншого виду флавіногенних дріжджів – *Candida famata*, є активатор транскрипції *Sef1p* [8]. Пізніше *Sef1p C. albicans* (як і білки *Har43p* і *Sfu1p*) був ідентифікований як головний регулятор метаболізму заліза (але не біосинтезу рибофлавіну) [9–11].

На додаток, у регуляцію обидвох цих метаболічних процесів у *C. albicans* залучений кон-

© Д. ФЕДОРОВИЧ, В. БОРЕЦЬКИЙ, Ю. ПИНЯГА, І. БОГОВИЧ, Ю. БОРЕЦЬКИЙ, А. СИБІРНИЙ, 2020

сервативний транскрипційний фактор Tup1p [12, 13]. Слід зазначити, що глобальний репресор Tup1p утворює комплекси з Cus8p та іншими специфічними білками та регулює низку інших генів, залучених у такі процеси як мейоз, споруляція, флокуляція, використання різних джерел вуглецю, а також захист від осмотичного стресу [14, 15].

У даній роботі ми описуємо ідентифікацію транскрипційних факторів Sef1p і Tup1p у дріжджів *M.(P.) guilliermondii* і демонструємо, що ці білки залучені в регуляцію обидвох процесів: постачання заліза та біосинтезу рибофлавіну.

Матеріали і методи. Штами, умови вирощування і середовища. Штами *M.(P.) guilliermondii*, використані у даній роботі, перелічені в табл. 1

Для конструювання і ампліфікації плазмід використано штам *Escherichia coli* DH5 α (lacZDM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1hsdR17(rK^{mK}⁺)supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169). Штами *E. coli* вирощували в середовищі Лурія-Бергані (LB) при 37 °С, яке містило, у разі потреби, ампіцилін (100 мкг мл⁻¹).

Дріжджі вирощували у багатому середовищі YPD (10 г дріжджового екстракту, 20 г пептону, 20 г сахарози, 20 г агару)/л при 30 °С або в

синтетичному середовищі Беркгольдера з доданими, у разі необхідності, амінокислотами (40 мг/л) і уридином (400 мг/л). Дріжджі вирощували у колбах Ерленмейера на шейкері (200 об/хв) при 30 °С. Гібридизацію дріжджових штамів і сегрегаційний аналіз проводили як описано [1].

Конструювання плазмиди і делеції гену. Маніпуляції з ДНК і трансформацію *E. coli* проводили згідно з попереньо опублікованими протоколами [18].

Хромосомний фрагмент ДНК *M.(P.) guilliermondii* розміром 4.7 т.п.н., що містить ген PGUG_03868.1 (кодує ортолог Sef1p) разом із фланкуючими ділянками (1 т.п.н.) ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи хромосомну ДНК *M.(P.) guilliermondii* ATCC6260 як матрицю і праймери SEFd1 TGAATTCAT-ATAGCTTAACTACTTC і SEF2rGAATTCGTTGATTTGTGTGACCAC, які несуть введені *EcoRI* сайти. Продукт ПЛР був очищений, оброблений ендонуклеазою рестрикції *EcoRI* і клонований в сайт *EcoRI* плазмиди pUC57. Сконструйована плазмиди pSEF1 була використана для заміщення структурного гена *SEF1* модифікованим геном *URA3 S. cerevisiae* під промотором гена фосфогліцерат кінази [19]. Май-

Таблиця 1. Штами, використані в роботі

Штам, ауксотрофний маркер	Генотип **	Джерело
R-66, ura3 hisX	WT	[16]
L2, hisX	WT	[1]
m3, ura3 hisX ,	<i>hit1</i>	[17]
<i>sef1-1</i> , hisX	<i>sef1Δ</i>	дана робота
<i>sef2-2</i> , hisX	<i>sef1Δ hit1</i>	дана робота
<i>rib83-13</i> , argX	<i>rib83</i>	[6]
<i>rib81-131</i> , hisX	<i>rib81</i>	[4]
<i>sef1-1</i> , hisX \times L1 <i>adeX</i>	<i>sef1Δ/SEF1</i> (diploid)	дана робота
<i>sef1-2</i> , <i>adeX</i> \times <i>rib81-131</i> , hisX	<i>sef1ΔRIB81/SEF1 rib81</i> (diploid)	дана робота
S181	<i>sef1Δ rib81</i>	дана робота
DS1-83-LV251	<i>sef1-1Δ \times rib83</i> (diploid)	дана робота
S1	<i>sef1Δ</i>	дана робота
S2	<i>sef1Δ</i>	дана робота
S3	<i>sef1Δ</i>	дана робота
Δ tup38-2, hisX	<i>tup1Δ</i>	дана робота
Δ tup53-h1, hisX	<i>tup1Δ hit1</i>	дана робота
m3-R-pT1-11, hisX	<i>hit1</i>	дана робота
TUP1	<i>TUP1 hit1</i>	дана робота

Примітка. ** – наведено мутації, пов'язані лише з метаболізмом рибофлавіну і заліза.

же повну послідовність плазмиди pSEF1, за винятком структурного гена *SEF1*, було ампліфіковано, використовуючи праймери *Bse1* AG-ATCTTTTTAGGGTGAATTAGTG і *RBS2* AG-ATCTAGTGATGACTTTTTGGGG, що містили сайти *Bgl*II. Продукт ПЛР було очищено, оброблено ендонуклеазою рестрикції *Bgl*II і лігровано з фрагментом *Bam*HI розміром 1,5 т.п.н. плазмиди pPGKURA3, що містить модифікований ген *URA3 S. cerevisiae*. Отримана плазміда pSEF1dURA3 містила модифікований ген *URA3 S. cerevisiae*, клонований між 1,0 т.п.н. промоторної і 1,0 п.н. термінаторної послідовності гена *SEF1 C.(P.) guilliermondii*. Далі плазмиду pSEF1dURA3 було оброблено ендонуклеазою рестрикції *Eco*RI. Отриману делеційну касету *sef1::URA3* використано для трансформації штаму R-66 *M.(P.) guilliermondii* [16].

Фрагмент хромосомної ДНК розміром 3,3 т.п.н., що містив цільовий ген (кодує ортолог *Tup1p*) разом з фланкуючими ділянками було ампліфіковано за допомогою ПЛР, використовуючи праймери *PgΔTup1F* ATCTAGATTCTGTGCTCGAATAAG і *PgΔTup1R* TATCTAGACTTTTCATCGTAACG та хромосомну ДНК *M.(P.) guilliermondii* ATCC6260 як матрицю. Ампліфікований фрагмент ДНК. було оброблено ендонуклеазою *Xba*I і клоновано у ті самі сайти векторів pUC57(-*Bam*HI) і pUC-ARS-URA3. Отримані плазмиди pUC57TUP1 і pUC-ARS-URA3-TUP1, було використано для конструювання делеційної касети і комплементаційного аналізу, відповідно. Плазмиду pUC-57TUP1 було оброблено ендонуклеазою *Bam*HI для видалення фрагмента ДНК розміром 1,0 т.п.н., що містить центральну частину відкритої рамки зчитування *PgTUP1*. Її більший фрагмент (5,1 т.п.н.), що містить решту відкритої рамки зчитування разом з 5' і 3' фланкуючими ділянками гена, було очищено і використано для клоування модифікованого гена *URA3 S.cerevisiae* [19]. Отриману плазмиду pdTU5 було оброблено ендонуклеазою рестрикції *Xba*I і отриману делеційну касету *tup1::URA3-5* було використано для трансформації реципієнтного штаму R-66 *M.(P.) guilliermondii* [16].

Для ідентифікації делеційних штамів було проведено ПЛР-аналіз з використанням сумарної ДНК, очищеної з селекціонованих транс-

формантів як матриці і праймерів, локалізованих близько відповідних локусів, але поза послідовностями, використаними у делеційній касеті. Трансформацію дріжджів і ПЛР-аналіз трансформантів проводили як описано раніше [16].

Пошук гомології і послідовностей проводили за допомогою програм BLAST, і ClustalW 1.8, використовуючи дані секвенування, надані Broad Institute (доступні на <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> і http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida_group/MultiHome.html, відповідно).

Інші процедури. Рибофлавін визначали флюориметрично, використовуючи синтетичний рибофлавін як стандарт, на флюориметрі FM 109510-33, максимум збудження 440 нм, максимум емісії 535 нм). Клітини руйнували з скляними кульками розміром 0,4–0,5 мм. Білок визначали після діалізу за методом Лоурі. Активність ГТФ-циклогідролази II – першого фермента шляху біосинтезу рибофлавіну, визначали у безклітинних екстрактах флюориметричним методом [20]. Інкубаційна суміш для визначення ГТФ-циклогідролази II містила 20 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,2), 2 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ГТФ і 2 мМ дітіотрейтол. Реакцію розпочинали додаванням безклітинного екстракту (0,5 мг білка). Вміст заліза в клітинах і фериредуктазну активність визначали з 2,2'-дипіридиллом як описано раніше [5].

Результати і обговорення. Роль гомолога *Sef1p* у біосинтезі рибофлавіну і регуляції засвоєння заліза у *M.(P.) guilliermondii*. Раніше у *C. famata* було ідентифіковано інсерційний мутант, нездатний до надсинтезу рибофлавіну, і показано, що він має дефект у гені, позначеному як *SEF1* [8]. Цей ген кодує потенційний Zn²⁺-Cys₆ транскрипційний фактор, гомолог якого залучений у регуляцію постачання заліза у *C. albicans*. Однак його роль у регуляції біосинтезу рибофлавіну у цього виду дріжджів не була досліджена [10, 11]. Логічно було припустити, що транскрипційний фактор *Sef1p*, залучений у регуляцію обох цих ланок метаболізму у представників так званих «флавіногенних» дріжджів, які належать до CUG-клади. Ген PGUG_03868.1, який потенційно кодує *Sef1p*, був ідентифікований у геномі *M.(P.) guillier-*

mondii, використовуючи пошук гомологій до послідовності цього транскрипційного фактора *C. famata*. Цей ген розміщений у послідовності 115630-1118095 п.н. 4-ого суперконтігу геному *M.(P.) guilliermondii*. Він кодує білок молекулярною масою 92.528 кДа, що складається з 821 амінокислотного залишку, який містить характерну послідовність, що здатна формувати двоядерний Zn(2)-Cys(6) кластерний домен, і виявляє 64 % подібності до відповідних аналогів *C. famata* і *C. albicans*. Інших потенційних гомологів *Sef1p* *C. famata* у *M.(P.) guilliermondii* не знайдено. Делеційна касета *sef1::URA3*, конструювання якої описано вище, була використана для трансформації двох реципієнтних штамів: дикого типу *M.(P.) guilliermondii* R-66 і і штаму m3, здатного до надсинтезу рибофлавіну. В обох випадках було селекціоновано декілька рекомбінантних клонів, що містили делеційні касети *sef1::URA3*, інтегровані в геном шляхом гомологічної рекомбінації, що призвело до делеції структурного гена *SEF1*, що було підтверджено ПЛР-аналізом. Селекціоновані штами *sef1Δ*, які були похідними від R-66 (дикий тип) і m3

(продукує рибофлавін) мали дуже подібний фенотип, незважаючи на значні відмінності між батьківськими штамми (табл. 2).

Продукція рибофлавіну і активність ГТФ-циклогідролази II сконструйованих *sef1Δ* штамів, отриманих з штаму дикого типу і здатного до надсинтезу рибофлавіну мутанта m3, вирощених при високому вмісті заліза, були низькими, такими ж як у штаму дикого типу R66 (табл. 2). Це говорить про те, що інактивація *Sef1p* супресує конститутивну надпродукцію рибофлавіну у штаму m3, який несе мутацію *hit1*. На відміну від відповідних батьківських штамів, обидва *Sef1p*-дефіцитні мутанти володіли низькою ГТФ-циклогідролазною активністю II і не мали підвищеного синтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза. За умов достатнього забезпечення залізом вміст заліза в клітинах і фериредуктазна активність *sef1Δ* мутантів *M.(P.) guilliermondii* були такими ж як у реципієнтних штамів. За умов дефіциту заліза внутрішньоклітинний вміст заліза і фериредуктазна активність обидвох сконструйованих мутантів була нижчою як у реципієнтних штамів (дані не наведено). Такий фенотип нагадує ключові оз-

Таблиця 2. Продукція рибофлавіну і активність ГТФ-циклогідролази II штамів *M.(P.) guilliermondii* з делетованим геном PGUG_03868.1 і штамів дикого типу

Штами	Генотип	Продукція рибофлавіну, мкг/мг сухих клітин		Активність ГТФ-циклогідролази II, Е/хв × мг білка	
		3,6 мкМ заліза *	0,18 мкМ заліза *	3,6 мкМ заліза *	0,18 мкМ заліза *
R-66	WT	0,20 ± 0,03	7,2 ± 0,7	0,60 ± 0,05	8,20 ± 0,90
L2	WT	0,25 ± 0,04	8,2 ± 0,7	0,72 ± 0,04	8,00 ± 0,81
m3	<i>hit1</i>	1,40 ± 0,30	7,0 ± 0,7	2,20 ± 0,05	7,85 ± 0,65
<i>sef1-1</i>	<i>sef1Δ</i>	0,31 ± 0,04	0,37 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,78 ± 0,05
<i>sef1-2</i>	<i>sef1Δ hit1</i>	0,26 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,70 ± 0,06	0,81 ± 0,04
<i>rib83-13</i> ,	<i>rib83</i>	0,30 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,46 ± 0,06
<i>rib81-131</i>	<i>rib81</i>	5,50 ± 0,60	8,00 ± 0,70	6,19 ± 0,60	10,19 ± 1,11
<i>sef1-1</i> × L1	<i>sef1Δ</i> /WT	0,28 ± 0,04	3,20 ± 0,30	0,70 ± 0,05	3,85 ± 0,08
<i>sef1-1</i> × <i>rib81-131</i>	<i>sef1ΔRIB81/SEF1 rib81</i> (диплоїд)	0,50 ± 0,05	3,30 ± 0,50	0,40 ± 0,06	1,70 ± 0,07
S181	<i>sef1Δ rib81</i>	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,03	н/в	н/в
DS1-83-1	<i>sef1Δ-1</i> × <i>rib83</i> (диплоїд)	0,09 ± 0,02	0,24 ± 0,03	н/в	н/в
S1	сегрегант з DS1-83-1	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,04	н/в	н/в
S2	сегрегант з DS1-83-1	0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,04	н/в	н/в
S3	сегрегант з DS1-83-1	0,25 ± 0,04	0,31 ± 0,04	н/в	н/в

Примітка. * Клітини вирощували у середовищі з високим вмістом заліза 3,6 мкМ, (умови достатнього забезпечення залізом) або з вмістом заліза 0,18 мкМ (залізодефіцитні умови), н/в – не визначали.

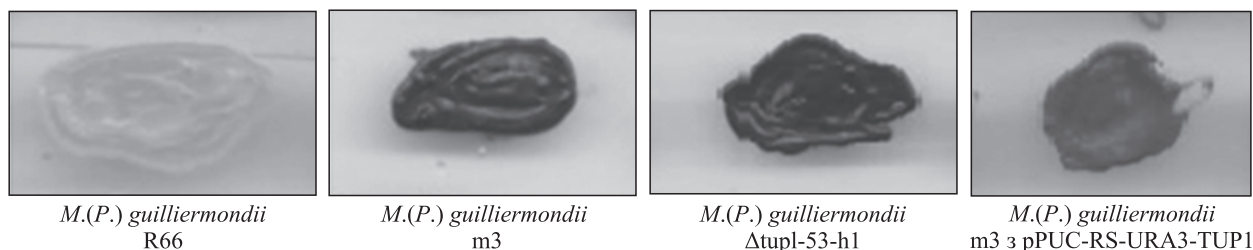


Рис. 1. Забарвлення *M.(P.) guilliermondii* дикого типу і рекомбінантних штамів на середовищі, що містить ТТХ. Усі тестовані штами росли аеробно на твердому середовищі YPD протягом 48 г. Потім клітини перенесли на те саме середовище, що містило 40 мг/л ТТХ. Чашки інкубували при 30 °С впродовж 3–4 днів. Наведено результати типового експерименту

наки описаного раніше мутанта *rib83-13*, який мав одночасно пошкоджену регуляцію біосинтезу рибофлавіну і високоафінної системи поглинання заліза (таблиця) [6]. Можна припустити, що мутації *sef1Δ* і *rib83* належать до однієї комплементарної групи та інактивують той самий ген. У цьому випадку диплоїдний штам, який би містив обидві мутації не повинен продукувати рибофлавін за умов дефіциту заліза. Можна припустити також, що мутація *sef1Δ* може супресувати конститутивну надпродукцію рибофлавіну штамом *M.(P.) guilliermondii*, який містить мутацію *rib81*, як раніше повідомлялось для мутації *rib83* [6]. Щоб підтвердити ці гіпотези було селекціоновано відповідні диплоїдні штами та їх мейотичні сегреганти і досліджено їх фенотип.

Гетерозиготні диплоїдні штами, які містили *rib83* або *Δsef1*, не втрачали здатності до продукції рибофлавіну у відповідь на лімітування за залізом. У той же час диплоїдний штам *Δsef1-1 X rib83-LV251*, так само як і всі його мейотичні сегреганти (наприклад S1, S2, S3), були нездатними до надпродукції рибофлавіну за умов недостатнього забезпечення залізом (табл. 2).

Крім цього, інактивація *Sef1p* супресувала надпродукцію рибофлавіну в гаплоїдних штамів, що містять мутації *hit1* або *rib81* (штам *sef1Δ-2* і мейотичний сегрегант S181, відповідно). Отже, можна стверджувати, що обидві мутації *sef1Δ* і *rib83* інактивують той самий ген PGUG_03868.1, який кодує транскрипційний активатор, гомологічний до *Sef1p*, що залучений у регуляцію біосинтезу рибофлавіну в *C. fumata* [8]. Оскільки мутація *rib83*, як було показано раніше, блокує і надпродукцію рибофлавіну, і

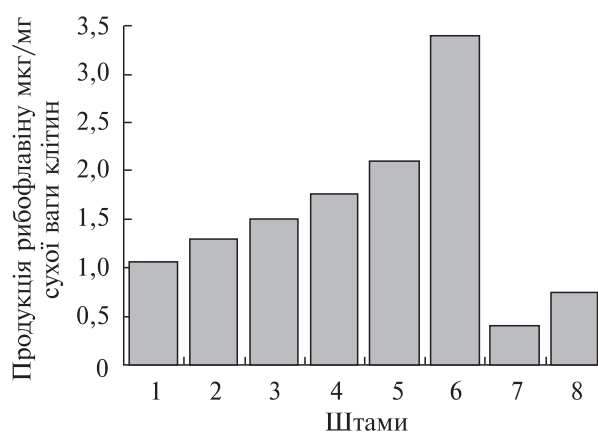


Рис. 2. Продукція рибофлавіну рекомбінантними штамми, що містять додаткову копію гена *PgTUP1* і контрольних штамів *M.(P.) guilliermondii* (1–5), 6 – m3, 7 – R-66, 8 – АТСС

активацію високоафінної системи поглинання заліза в *M.(P.) guilliermondii*, ідентифікований транскрипційний активатор *Sef1p*, має відношення до регуляції постачання залізом у цього виду дріжджів, подібно до того як описано в *S. albicans* [11]. Загалом, можна припустити, що у дріжджів, які належать до CUG-клади і надсинтезують рибофлавін за умов дефіциту заліза, гомологи *Sef1p* є залучені в регуляцію обох ланок метаболізму – і біосинтезу рибофлавіну, і транспорту заліза.

Потенційна роль загального репресора транскрипції Tup1p у регуляції біосинтезу рибофлавіну і засвоєння заліза у M.(P.) guilliermondii. Ген PGUG_01096.1, який кодує потенційний гомолог загального транскрипційного репресора було ідентифіковано у геномі *M.(P.) guilliermondii* шляхом пошуку гомологій до амінокислотних послідовностей *Tup1p* *S. albicans* і *S. cere-*

visiae (дані не наведено). Цей ген *M.(P.) guilliermondii*, позначений як *PgTUP1*, кодує білок, що має 569 амінокислотних залишків з молекулярною масою 63.113 кДа. Незважаючи на різницю в довжині поліпептидів (*Tup1p C. albicans* і *S. cerevisiae* містять – 512 і 713 амінокислотних залишків, відповідно), амінокислотна послідовність *M.(P.) guilliermondii* має 85 % подібності до *Tup1p C. albicans* і містить характерний домен WD40.

Для з'ясування ролі *Tup1p* у регуляції біосинтезу рибофлавіну і постачання залізом у *M.(P.) guilliermondii*, ген *PgTUP1* було клоновано разом з фланкуючими ділянками і використано для конструювання делеційної касети (див. вище). Сконструйовану делеційну касету *tup1::URA3-5* було введено в обидва реципієнтні штами (WT) і m3 (конститутивний надсинтетик рибофлавіну). Делецію *PgTUP1* було підтверджено ПЛР-аналізом.

Сконструйовані нокаунтні мутанти *tup1Δ-38* і *tup1Δ-53-h1* проявляли незначно підвищену (приблизно в 2 рази) продукцію рибофлавіну у порівнянні з батьківськими штамми R-66 і m3, відповідно (табл. 3). Ця різниця була більш суттєвою в середовищі, що містило 0,9 мМ хлориду кобальту – умови, які імітують дефіцит заліза [21]. *Tup1p*-дефіцитні мутанти містили також приблизно в 1,5–1,7 рази більше заліза в клітинах, ніж відповідні батьківські штами, при вирощуванні в залізовмісному середовищі. Батьківський (продукує рибофлавін) штам m3 і його похідний *Δtup1-53-h1* володіли високою неспецифічною редуктазною активністю клітин: їх колонії забарвлювались у темно-червоний колір на середовищі, що містило 2,

3,5-трифеніл-2Н-тетразолій хлорид (ТТХ), внаслідок відновлення цієї сполуки до інтенсивно забарвленого формазану (рис. 1).

Трансформанти батьківського штаму m3, які містили додаткову копію гена *PgTUP1*, (отримані з плазмідною рUC-ARS-URA3-TUP1) характеризувались значно нижчою продукцією рибофлавіну, ніж описано для типового штаму *M.(P.) guilliermondii* m3-R-pT1-11(рис. 2). Крім того, вони виявляли значно слабше забарвлення на середовищі, що містило ТТХ (рис. 1).

Отримані результати вказують на те, що глобальний репресор *Tup1p* може бути залучений в регуляцію біосинтезу рибофлавіну і асиміляцію заліза в *(P.) guilliermondii*, однак він відіграє другорядну, додаткову роль у порівнянні з транскрипційним активатором *Sef1p*. Участь *Tup1p* в регуляції біосинтезу рибофлавіну, ймовірно, не є прямою. *TUP1* є глобальним регулятором морфології і метаболізму. Відомо, що в *S.cerevisiae* комплекс *Sus8-Tup1* потрібний для репресії транскрипції багатьох родин генів. Біля 3 % дріжджових генів є дерепресованими у мутантів *tup1*. Цільові гени включають гени, які підлягають глюкозній репресії, гени, які індукуються при осмотичному стресі, гени, що кодують ферменти метаболізму жирних кислот, а також гени, пов'язані з флокуляцією, споруляцією і мейозом [13, 14, 22]. *TUP1p* відіграє також важливу роль у залізо-залежній регуляції генів [12]. Делеція цього регулятора впливає на гомеостатичний контроль відновного поглинання заліза. Між іншим, як зазначалось, голодування за залізом індукуює продукцію флавінів і ця регуляція може бути зміненою за відсутності *TUP1*-контролю. У

Таблиця 3. Продукція рибофлавіну і вміст заліза в клітинах штамів *M.(P.) guilliermondii*, дефіцитних за геном PGUG_01096.1 (*PgTUP1*)

Штами	Продукція рибофлавіну, мкг/мг сухих клітин		Вміст заліза, мкг/г сухих клітин	
	3,6 мкМ залізо *	0,18 мкМ залізо *	0,9 мМ CoCl ₂ *	3,6 мкМ залізо
R-66	0,20 ± 0,03	6,10 ± 0,70	8,32 ± 0,82	78,37 ± 3,46
m3	1,40 ± 0,31	7,00 ± 0,72	н/в	166,08 ± 7,64
Δtup1-38-2	0,46 ± 0,05	10,32 ± 1,16	17,75 ± 1,90	117,55 ± 5,64
Δtup1-53-h1	2,40 ± 0,32	12,80 ± 0,86	н/в	282,31 ± 13,55

Примітка.* Клітини росли в середовищах з вмістом заліза 3,6 мкМ; 0,18 мкМ, а також з 0,9 мМ CoCl₂ – умови, які імітують дефіцит заліза.

P. guilliermondii дефіцит заліза приводить до дерепресії майже всіх ферментів, залучених у біосинтез рибофлавіну [3, 4]. Селекціоновано низку мутантів з пошкодженою залізоалежною репресією синтезу рибофлавіну. Більшість з цих надпродукуючих рибофлавін мутантів мають також дерепресований транспорт заліза і підвищений вміст негемового заліза в клітинах [3, 4]. Ці дані вказують на координовану регуляцію біосинтезу рибофлавіну і постачання заліза у *P. guilliermondii*. Було показано, що залізо регулює біосинтез рибофлавіну на транскрипційному рівні, репресуючи утворення *RIB1* і *RIB7* мРНК, і що така транскрипційна репресія пошкоджена у мутантів-надсинтетиків рибофлавіну *rib81* і *red6* [23]. Крім того, надсинтез рибофлавіну в *P. guilliermondii* може бути викликаний іонами Co^{2+} [24] та оксидативним стресом [17]. Пізніше було показано, що іони Co^{2+} , дефіцит заліза і мутації *rib80*, *rib81* та *hit1* викликають оксидативний стрес [25]. Ймовірно, що комплекс *Sus8-Tup1* у *S. cerevisiae*, регулює експресію інших генів не прямо, а контролюючи рівень транскрипції активаторів або репресорів, що специфічно діють на ці інші гени [26]. У той же час, у *C. albicans* *Ssn6* р не є важливим для опосередкованої *Tup1p* репресії багатьох генів [14]. Молекулярний механізм дії *Tup1p* на біосинтез рибофлавіну у *M.(P.) guilliermondii* залишається не розшифрованим.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить жодних досліджень, проведених на тваринах чи людях будь-ким із авторів.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження було підтримане Національною Академією наук України (Грант № 36, 2015–2019) і Польським національним науковим центром, грант Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497.

CLONING OF GENES *SEF1* AND *TUP1* ENCODING TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR AND GLOBAL REPRESSOR IN THE FLAVINOGENIC YEAST *MEYEROZYMA (CANDIDA, PICHIA) GUILLIERMONDII*

D. Fedorovich, V. Boretsky, Y. Pynyaha, I. Bohovych, Y. Boretsky, A. Sibirny

Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, Drahomanov St., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine
University of Nebraska-Lincoln 1400 R St., Lincoln, NE 68588, USA
Lviv State University of Physical Culture, Tadeusha Kostyushko St, 11, Lviv, 79000, Ukraine
Rzeszow University, Zelverowicz St., 4, 35-601 Rzeszow, Poland

Two *Meyerozyma (Candida, Pichia) guilliermondii* genes coding for homologs of transcriptional factor *Sef1p Candida famata* and *Tup1p Candida albicans* were identified, cloned and deleted. Deletion of a homologue of *Sef1p* transcriptional factor in *M.(P.) guilliermondii* completely blocked over-synthesis of riboflavin under iron-deficient conditions. Results of genetic complementation analysis suggest that previously reported *rib83* mutants and newly constructed knock-out strains belong to the same complementation group and are defective in the same *SEF1* gene. Inactivation of identified homolog of *TUP1* gene in *M.(P.) guilliermondii* wild-type strain led to 1,5 folds increase of cellular iron content and 1,5 – 1,7 folds increase of riboflavin production. Introduction of a plasmid-borne copy of *TUP1* gene did not restore metabolic defects of the riboflavin overproducing, iron accumulating mutant strain *M.(P.) guilliermondii* m3 that bears mutation *hit1*. Obtained results can suggest that both transcription factors *Sef1p* and *Tup1p* are involved in regulation both of iron acquisition and riboflavin biosynthesis by yeast belonging to CUG-clade. The molecular mechanism of action *Tup1p* on riboflavin biosynthesis in *M.(P.) guilliermondii* remains to be deciphered.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ *SEF1* И *TUP1*, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АКТИВАТОР И ГЛОБАЛЬНЫЙ РЕПРЕССОР У ФЛАВИНОГЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ *MEYEROZYMA (CANDIDA, PICHIA) GUILLIERMONDII*

Д. Федорович, В. Борецкий, Ю. Пиняга, И. Богович, Ю. Борецкий, А. Сибирный

Идентифицированы, клонированы и делетированы гены *Meyerozyma (Candida, Pichia) guilliermondii*, кодирующие гомологи транскрипционного фактора *Sef1p Candida famata* и *Tup1p Candida albicans*, соответственно. Делеция гомолога транскрипционного фактора *Sef1p* у *M.(P.) guilliermondii* полностью блокирует сверхсинтез рибофлавина в условиях дефицита железа. Результаты комплементационного анализа указывают на то, что ранее описанные мутанты *M.(P.) guilliermondii rib83* и сконструированные делеционные штаммы относятся к одной комплементационной группе и дефектны в одном и том

же гене *SEFI*. Инактивация идентифицированного гомолога гена *TUP1* у штамма дикого типа *M.(P.) guilliermondii* приводит к возрастанию содержания железа в клетках в 1,5 раза и повышению продукции рибофлавина в 1,6–1,7 раза. Введение плазмиды, несущей копию гена *TUP1*, не восстанавливает метаболические дефекты у мутанта, обладающего способностью к сверхсинтезу рибофлавина и аккумуляции железа в клетках мутанта *M.(P.) guilliermondii* m3, несущего мутацию *hit1*. Полученные результаты позволяют считать, что у дрожжей, относящихся к кладе CUG, и транскрипционный фактор *Sef1p*, и *Tup1p* вовлечены в регуляцию обоих процессов: обеспечение железом и синтез рибофлавина. Молекулярные механизмы действия *Tup1p* на биосинтез рибофлавина у *M.(P.) guilliermondii* требуют дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Sibirny, A., Boretsky, Y., *Pichia guilliermondii*. In: Yeast biotechnology: diversity and applications. T. Satyanarayana, G. Kunze [eds.]. Springer Science, 2009. pp.113–134. doi: 10.1007/978-1-4020-8292-4_6.
- Zviagil'skaia, R.A., Fedorovich, D.V., and Shavlovskii, G.M., Respiratory system of *Pichia guilliermondii* yeasts with different levels of flavinogenesis. *Mikrobiologiya*. 1978, vol. 47, no. 6, pp. 975–84. PMID: 745565.
- Abbas, C.A., Sibirny, A.A., Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011, vol. 75, no. 2, pp 321–60. doi: 10.1128/MMBR.00030-10.
- Sibirny, A.A., Fedorovich, D.V., Boretsky, Y.R., and Voronovsky, A.Y., Microbial synthesis of flavins. *Naukova Dumka, Kyiv*, 2006, 192 p.
- Fedorovich, D., Protchenko, O., and Lesuisse, E., Iron uptake by the yeast *Pichia guilliermondii*. Flavinogenesis and reductive iron assimilation are co-regulated processes. *Biometals.*, 1999. vol. 12, no. 4, pp. 295–300. doi: 10.1023/a:1009298530145.
- Stenchuk, N.N., Kutsiaba, V.I., Kshanovskaia, B.V., and Fedorovich, D.V., Effect of *rib83* mutation on riboflavin biosynthesis and iron assimilation in *Pichia guilliermondii*. *Mikrobiologiya*. 2001. vol. 70, no. 6, pp. 753–8. PMID:11785131.
- Philpott, C.C., Protchenko, O., Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 2008 vol. 7, no. 1, pp. 20–7. doi: 10.1128/EC.00354-07.
- Dmytruk, K.V., Voronovsky, A.A., and Sibirny, A.A., Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. *Curr. Genet.*, 2006. vol. 50, no. 3, pp. 183–91. doi: 10.1007/s00294-006-0083-0.
- Hsu, P.C., Yang, C.Y., and Lan, C.Y., *Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. *Eucaryot. Cell.*, 2011, vol. 10, no. 5, pp. 207–25. doi: 10.1128/EC.00158-10.
- Linde, J., Wilson, D., Hube, B., and Guthke, R., Regulatory network modelling of iron acquisition by a fungal pathogen in contact with epithelial cells. *BMC Syst Biol.*, 2010. vol. 4, no. 4, pp. 148–62. doi: 10.1186/1752-0509-4-148.
- Chen, C., Pande, K., French, S.D., Tuch, B.B., and Noble, S.M., An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host. Microbe.*, 2011. vol. 10, no. 2, pp. 118–35. doi: 10.1016/j.chom.2011.07.005.
- Knight, S., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R., and Dancis, A., Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and TUP1 regulator. *Microbiology.*, 2002. vol. 148, no. 1, pp. 29–40. doi: 10.1099/00221287-148-1-29.
- Murad, A.M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaiia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J., and Brown, A.J., Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol. Microbiol.*, 2001. vol. 42, no. 4, pp. 981–93. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02713.x.
- García-Sánchez, S., Mavor, A., Russell, C., Argimon, S., Dennison, P., Enjalbert, B., and Brown, A., Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.*, 2005. vol. 16, no. 6, pp. 2913–25. doi: 10.1091/mbc.e05-01-0071.
- Tartas, A., Zarkadas, C., Palaiomyliou, M., Gounalaki, N., Tzamaras, D., and Vlassi, M., Ssn6-Tup1 global transcriptional co-repressor: Role of the N-terminal glutamine-rich region of Ssn6. *PLoS ONE* 2017. vol. 12, no. 10, e0186363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186363>.
- Pynyaha, Y.V., Boretsky, Y.R., Fedorovich, D.V., Fayura, L.R., Levkiv, A.I., Ubiyovok, V.M., Protchenko, O.V., Philpott, C.C., and Sibirny, A.A., Deficiency in frataxin homologue YFH1 in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to misregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation. *Biometals.*, 2009. vol. 22, no. 6, pp. 1051–61. doi: 10.1007/s10534-009-9256-x.
- Boretsky, Y.R., Protchenko, O.V., Prokopiv, T.M., Mukalov, I.O., Fedorovich, D.V., and Sibirny, A.A., Mutations affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii*. *J. Basic Microbi-*

- ol.*, 2007. vol. 47, no. 5, pp. 371–7. doi: 10.1002/jobm.200610279.
18. Sambrook, J., Russell, D.W., Molecular cloning, a laboratory manual. 3ed ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. 2001. 2100 pp. ISBN-10 0-87969-577-3.
 19. Boretsky, Y.R., Pynyaha, Y.V., Boretsky, V.Y., Kutsyaba, V.I., Protchenko, O.V., Philpott, C.C., and Sibirny, A.A., Development of a transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. *J. Microbiol. Methods.*, 2007, vol. 70, no. 1, pp. 13–9. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.004.
 20. Shavlovskii, G., Logvinenko, E., and Zakalskii, A., Purification and properties of GTP cyclohydrolase II of the yeast *Pichia guilliermondii*. *Biokhimiia*, 1983, vol. 48, no. 5, pp. 837–43. PMID: 6871289.
 21. Stadler, J.A., Schweyen, R.J., The Yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *J. Biol. Chem.*, 2002. vol. 277, no. 42, pp. 39649–54. doi: 10.1074/jbc.M203924200.
 22. Lin, X., Yu, A.Q., Zhang, C.Y., Pi, L., Bai, X.-W., and Xiao, D.G., Functional analysis of the global repressor Tup1 for maltose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: different roles of the functional domains. *Microb. Cell Fact.*, 2017. vol. 16, no. 1, pp.194–206. doi: 10.1186/s12934-017-0806-6.
 23. Boretsky, Y.R., Kapustyak, K.Y., Fayura, L.R., Stasyk, O.V., Stenchuk, M.M., Bobak, Y.P., Drobot, L.B., and Sibirny, A.A., Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. *FEMS Yeast Res.*, 2005. vol. 5, no. 9, pp. 829–37. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.03.007.
 24. Fedorovych, D., Boretsky, Y., Prokopiv, T., Grabek-Leiko, D., and Sybirny, A., Cobalt As A Dangerous Environmental Pollutant. In: Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. Rzeszow University A. Sibirny, D. Fedorovych, M. Gonczar, D. Grabek-Leiko [Eds], pp. 33–40.
 25. Prokopiv, T.M., Fedorovych, D.V., Boretsky, Y.R., and Sibirny, A.A., Oversynthesis of riboflavin in the yeast *Pichia guilliermondii* is accompanied by reduced catalase and superoxide dismutases activities. *Curr. Microbiol.*, 2013. vol. 66, no. 1, pp.79–87. doi: 10.1007/s00284-012-0242-0.
 26. Wong, K.H., Struhl, K., The Cyc8–Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein *Genes Dev.*, 2011, vol. 25, no. 23, pp. 2525–39. doi: 10.1101/gad.179275.111.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 24.03.20
Прийнята до друку 18.09.20