

ДЕГРАДАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ КАТАБОЛІЗМУ МЕТАНОЛУ ФОРМАЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗИ ТА ФОРМІАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

О.В. ДМИТРУК^{1*}, Н.В. БУЛБОТКА¹, А.А. СИБІРНИЙ^{1,2}

¹ Відділ молекулярної генетики і біотехнології, Інститут біології клітини НАН України, м. Львів, 79005, вул. Драгоманова 14/16

² Відділення біотехнології і мікробіології, Жешівський університет, вул. Зельверовича 4, Жешів 35-601, Польща

* E-mail: verbaolena@gmail.com

*З'ясування механізмів деградації цитозольних білків має велике фундаментальне та прикладне значення. Досліджено зміни в активності цитозольних ферментів катаболізму метанолу – формальдегіддегідрогенази (Fdh1) та форміатдегідрогенази (Fdh1) у контрольного штаму дикого типу GS200, штаму з делецією гена сенсора гексоз GSS1 та штаму з дефектом автофагії SMD1163 *K. phaffii* при короткотривалій та довготривалій індукції метанолом з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132. Показано, що тривалість інкубації клітин на метанолі не має особливого впливу на інактивацію ферменту. Ефект протеасомного інгібітора MG132 був незначний. Катаболітна інактивація цитозольних і пероксисомних ферментів пошкоджена в *gss1Δ* мутанта, оскільки пошкоджене сигналювання глюкозою. Fdh1 та Fdh1 ймовірно деградують вакуолярним шляхом, незалежно від тривалості індукції метанолом.*

Ключові слова: формальдегіддегідрогеназа, форміатдегідрогеназа, питома активність, деградація, вакуолі, дріжджі.

Вступ. Одним з найбільш яскравих досягнень сучасної біотехнології є бурхливий розвиток виробництва рекомбінантних білків, що знаходять своє використання в різноманітних галузях народного господарства та медицини. Метилотрофні дріжджі (організми, що здатні використовувати метанол як ростовий субстрат) вважаються одними з найефективніших продуцентів власних та рекомбінантних білків промислового значення, зокрема, інсуліну, поверхневого антигену вірусу гепатиту В, інтерферонів, ферментів алкогольоксидази, нітрилази тощо [1–3]. Метилотрофні дріжджі *Komagataella phaffii* (колишня назва *Pichia pastoris*) [4] широко використовується для отри-

мання рекомбінантних білків для фундаментальних та прикладних досліджень. Промотори генів, що кодують ферменти метаболізму метанолу належать до найбільш сильних і строго регульованих. Для *K. phaffii* добре розроблені методи генетичних маніпуляцій, зокрема – високоефективна трансформація, інтеграція ДНК в цільові локуси, клонування генів за допомогою функціональної комплементации. Ці властивості, а також такі характеристики *K. phaffii*, як висока продукція біомаси, ефективна секреція і вихід цільових білків, надає цьому організму суттєвих переваг у порівнянні з іншими системами для продукції гетерологічних білків. Однією з невирішених проблем є стабільність гетерологічних білків при їх надсинтезі. Підвищення рівня експресії рекомбінантних білків в *K. phaffii* можливе за рахунок інгібування протеолітичної деградації. Для *K. phaffii* отримані мутанти з пошкодженими протеазами (Per4 та Prb1). Недоліком таких штамів є знижена швидкість росту та низька ефективність трансформації. Саме тому, дослідження механізмів деградації цитозольних білків у метилотрофних дріжджів є надзвичайно актуальним завданням.

Функціонування організму та нормальну життєдіяльність клітини забезпечують збалансовані процеси синтезу та деградації. Порушення цих процесів призводить до патологічних станів, у тому числі багатьох захворювань. Важливість деградації полягає у тому, що клітинні білки мають обмежений період функціонування, коли вони перебувають у правильній просторовій конформації і здатні виконувати свої функції. Через певний час, специфічний для кожної групи білків, вони втрачають правильну конформацію внаслідок денатурації, і щоб уникнути негативних наслідків для клітини,

такі білки розщеплюються до амінокислот, які в подальшому використовуються для побудови нових функціональних білків.

Розрізняють два основні типи деградації білків. В еукаріотичній клітині це протеасомна деградація, що відбувається в цитоплазмі, та автофагія, що відбувається в спеціальній органелі — лізосомі або вакуолі [5]. В протеасомах гідролізуються, переважно, короткоживучі білки, такі як транскрипційні фактори, регулятори клітинного циклу та дефектні білки. Однак, переважна більшість усіх клітинних білків належать до довгоживучих, які деградують у вакуолях [6].

Автофагію у дріжджів спостерігають під час голодування, пошкодженні клітинних структур, або зміні умов культивування. Процес автофагії необхідний не лише для виживання за несприятливих умов, але й у нормальному житті клітини. Дріжджі, зокрема метилотрофні використовуються як зручний модельний об'єкт, для дослідження механізмів автофагії.

Незважаючи на великий масив інформації про механізми деградації білків та клітинних органел, механізми регуляції деградації цитозольних білків залишаються не до кінця з'ясованими [5]. Тому аналіз механізмів деградації цитозольних білків у метилотрофних дріжджів, селекція мутантів з пошкодженням відповідних механізмів та вивчення продуктивності синтезу цитозольних білків у таких мутантів має значний науковий інтерес та прикладне значення.

Метилотрофні дріжджі є зручним об'єктом для дослідження механізмів деградації шляхом автофагії [7]. На моделях дріжджів *Hansenula polymorpha* та *K. phaffii* були ідентифіковані нові гени, що залучені в автофагію, зокрема, специфічну автофагію пероксисом (пексофагію). В нашій попередній роботі ідентифіковано низку генів, що беруть участь в автофагії та пексофагії, зокрема, *GCR1*, *HXS1*, *ATG26*, *ATG28*, *ATG35*, *GSS1* [8–14]. У мутантів з дефектом зазначених генів пошкоджено деградацію пероксисом (і, відповідно, пероксисомних білків). Водночас механізми деградації власних і рекомбінантних білків у метилотрофних дріжджів, що локалізуються в цитозолі, практично не досліджені. В дослідженнях на пекарських дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* встановлено,

що специфічна деградація цитозольних ферментів фруктозобісфосфатази та малатдегідрогенази відбувається за участю як протеасомної деградації, так і автофагії та ендоцитозу [15–18]. Натомість механізми деградації цих та інших власних цитозольних білків (формальдегіддегідрогенази та форміатдегідрогенази), а також рекомбінантних гетерологічних білків біотехнологічного значення з цитозольною локалізацією у метилотрофних дріжджів залишаються нез'ясованими. В даній роботі шляхом визначення питомих активностей формальдегіддегідрогенази та форміатдегідрогенази за умов короткотривалої (1 доба) та довготривалої (3 доби) індукції метанолом у штаммах *GS200*, *SMD1163*, $\Delta gss1$ метилотрофних дріжджів *K. phaffii* з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132, ми спробували з'ясувати шлях деградації цих ферментів метаболізму метанолу.

Матеріали і методи. У роботі використані хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм: «Sigma» (США), «Fluka» (Німеччина), «Fermentas» (Литва), «Difco» (США). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва — «хч» та «осч».

Штами дріжджів *K. phaffii* вирощували у багатому середовищі YPD (1%-ний дріжджовий екстракт, 2 % пептон, 1 % глюкоза) або мінеральному середовищі YNB (0,67 % Yeast Nitrogen Base (Difco)) з додаванням різних джерел вуглецю. Як джерела вуглецю використовували метанол (0,5 %), етанол (0,5 %), глюкозу (2 %). Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактори росту — амінокислоти L-гістидин — 50 мг/л, L-аргінін — 50 мг/л. Агаризовані середовища містили агар (2 %). Вирощування дріжджів *K. phaffii* проводили на агаризованих середовищах на чашках Петрі у термостаті або культивували в рідких середовищах із перемішуванням 220 обертів/хв при 28 °С. Біомасу клітин (в одиницях оптичної густини (OD_{600})) визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі «Helios Epsilon» при довжині хвилі 600 нм у кюветі шириною 1 см.

Для приготування безклітинних екстрактів використовували скляні кульки. На першому

етапі до осаду відмитих від культуральної рідини клітин додавали 50 мМ Тріс-НСІ буфер, рН 7,5 з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфлуорид) до кінцевої концентрації клітин 50–100 мг/мл. Одержану суспензію переносили у пластикові пробірки «Еппендорф» та додавали скляні кульки (діаметр 0,45–0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували методом вортексування (вібрації) протягом 15 хв при +4 °С з охолодженням на льоді через кожні 5 хв. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізували центрифугували впродовж 20 хв при 14000 об./хв. при +4 °С на мікроцентрифузі. Супернатант використовували для подальшого аналізу.

Для визначення питомої активності формальдегідегідрогенази та форміатдегідрогенази клітини підрощували до середини логарифмічної фази і готували безклітинні екстракти. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [19], використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Активність Fldh1 визначали в реакційній суміші наступного складу (на 1 мл): 1М К-Р буфер, рН 8 – 100 мкл; 1М формальдегід – 0,3 мкл; 50 мМ NAD⁺ – 20 мкл; 100 мМ глутатіон – 20 мкл.

Активність Fdh1 визначали в реакційній суміші наступного складу (на 1 мл): 1 М NaCOOH – 200 мкл; 50 мМ NAD⁺ – 40 мкл; 1М К-Р буфер, рН 7,5 – 100 мкл.

Для запуску реакції до суміші додавали безклітинний екстракт у концентрації 0,1 мг/мл і визначали зміну екстинції при довжині хвилі 340 нм в кінетиці. Ця довжина хвилі відповідає піку поглинання нікотинамідних кофакторів. Обрахунок активності Fbp1 здійснювали відповідно до рівняння: од/мл ферменту = $(OD_{340}/хв)/(6,22 \times \text{мг ферменту/мл реакційної суміші})$, де $OD_{340}/хв$ – зміна екстинції при довжині хвилі 340 нм за одиницю часу (хв); 6,22 – коефіцієнт екстинції нікотинамідних кофакторів.

Результати та обговорення. Для створення надпродуцентів білків промислового значення важливо максимально знизити рівень деградації цільового білка у цитозолі. Нами було проведено дослідження деградації цитозольних білків Fldh1 і Fdh1 у штаму дикого типу *GS200 K. phaffii*, штаму з дефектом вакуолярних протеїназ *SMD1163* та гена, що кодує сенсор глю-

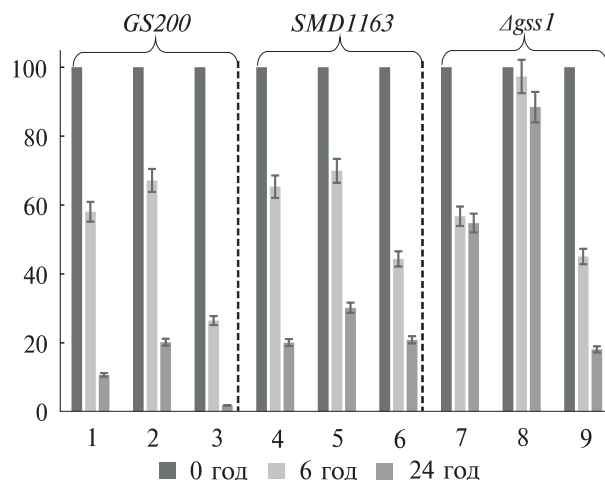


Рис. 1. Питомі активності Fldh1 та AOX за умов короткотривалої (1 доба) індукції метанолом у штамах *GS200*, *SMD1163*, *Agss1* метилотрофних дріжджів *K. phaffii* з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132; по вертикалі – активність, МО/мг білка; по горизонталі: 1 – Fldh1, 2 – Fldh1 + MG132, 3 – AOX, 4 – Fldh1, 5 – Fldh1 + MG132, 6 – AOX, 7 – Fldh1, 8 – Fldh1 + MG132, 9 – AOX

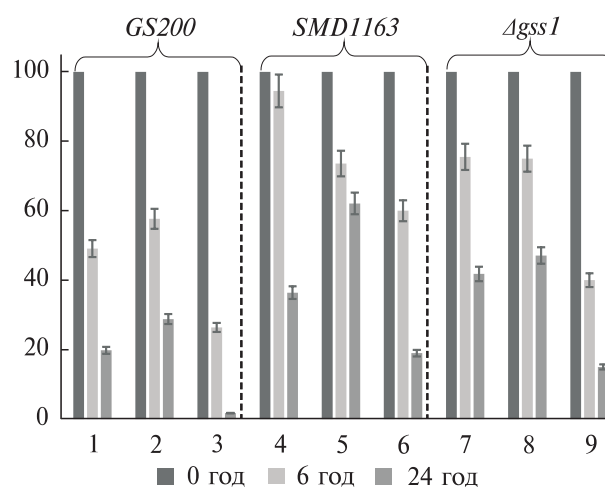


Рис. 2. Питомі активності Fldh1 та AOX за умов довготривалої індукції метанолом (3 доби) у штамах *GS200*, *SMD1163*, *Agss1* метилотрофних дріжджів *K. phaffii* з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132; по вертикалі – активність, МО/мг білка; по горизонталі: 1 – Fldh1, 2 – Fldh1 + MG132, 3 – AOX, 4 – Fldh1, 5 – Fldh1 + MG132, 6 – AOX, 7 – Fldh1, 8 – Fldh1 + MG132, 9 – AOX

кози (*Agss1*). Fldh1 і Fdh1 є зручними модельними білками для дослідження деградації ци-

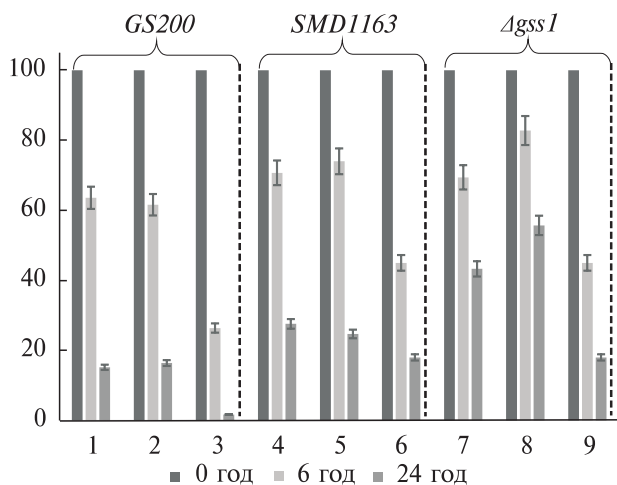


Рис. 3. Питомі активності Fdh1 та AOX за умов короткотривалої (1 доба) індукції метанолом у штаммах *GS200*, *SMD1163*, Δ *gss1* метилотрофних дріжджів *K. phaffii* з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132; по вертикалі – активність, МО/мг білка; по горизонталі: 1 – Fdh1, 2 – Fdh1 + MG132, 3 – AOX, 4 – Fdh1, 5 – Fdh1 + MG132, 6 – AOX, 7 – Fdh1, 8 – Fdh1 + MG132, 9 – AOX

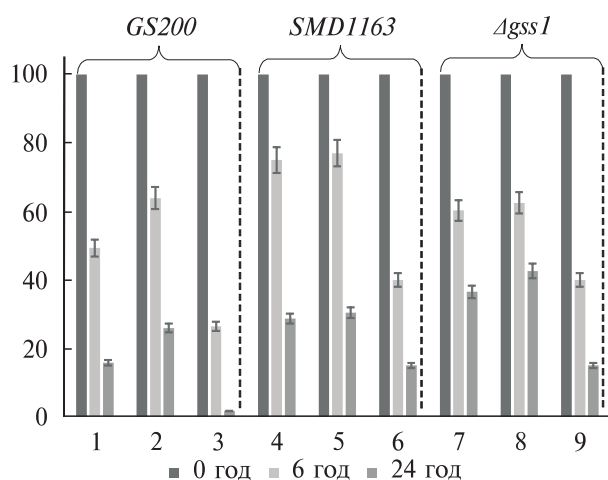


Рис. 4. Питомі активності Fdh1 та AOX за умов довготривалої індукції метанолом (3 доби) у штаммах *GS200*, *SMD1163*, Δ *gss1* метилотрофних дріжджів *K. phaffii* з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132; по вертикалі – активність, МО/мг білка; по горизонталі: 1 – Fdh1, 2 – Fdh1 + MG132, 3 – AOX, 4 – Fdh1, 5 – Fdh1 + MG132, 6 – AOX, 7 – Fdh1, 8 – Fdh1 + MG132, 9 – AOX

тозольних білків у метилотрофних дріжджів, оскільки вони задіяні в утилізації метанолу і

їх активність суттєво і швидко спадає після перенесення метилотрофно вирощених клітин в середовище з глюкозою. Також досліджували деградацію Fldh1 і Fdh1 в присутності інгібітора протеасомної деградації білків MG132.

Досліджено зміни в активності Fldh1 і Fdh1 у перелічених штамів *K. phaffii* в умовах короткотривалої (1 доба) (рис. 1, рис. 3) та довготривалої (3 доби) (рис. 2, рис. 4) голодування за глюкозою з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132. Питома активність Fldh1 і Fdh1 у штамів *SMD1163* та Δ *gss1* зростала у порівнянні з активністю Fldh1 і Fdh1 штаму дикого типу, що свідчить про вакуолярний шлях деградації цього ферменту. Подібний ефект спостерігався для модельного пероксисомного ферменту AOX (рис. 1, рис. 2, рис. 3, рис. 4), для якого встановлений вакуолярний шлях деградації [20]. Виявлено, що інактивація ферментів Fldh1 і Fdh1 та їх деградація не залежить від тривалості голодування за глюкозою. Ефект протеасомного інгібітора MG132 був незначний.

Відповідно до результатів дослідження питомої активності Fldh1 і Fdh1 у штаммах *GS200*, *SMD1163* та Δ *gss1*, можна зробити висновок, що незалежно від тривалості голодування за глюкозою, Fbp1 деградує вакуолярним шляхом. Додавання протеасомного інгібітора MG132 не впливало на деградацію, як Fldh1 і Fdh1 так і AOX у досліджуваних штамів, що підтверджує висновок.

Інактивація Fldh1 і Fdh1 у штаму Δ *gss1* де-що сповільнена, порівняно з штамом дикого типу, що зумовлено зниженням вмісту внутрішньоклітинної глюкози, необхідної для каталітичної інактивації цього ферменту.

Висновки. Досліджено зміни питомої активності Fldh1 і Fdh1 у штаму дикого типу *GS200*, штамів з дефектом автофагії *SMD1163* та делецією гена сенсора гексоз *GSS1* *K. phaffii* при короткотривалій та довготривалій індукції метанолом з додаванням або ж без додавання інгібітора протеасомної деградації MG132. Встановлено, що Fldh1 і Fdh1 деградують вакуолярним шляхом незалежно від тривалості індукції метанолом.

Дотримання етичних стандартів. Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним

із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано за часткової фінансової підтримки польського гранту Національного наукового центру (NCN) DEC-2012/05/B/NZ1/01657.

DEGRADATION OF METHANOL CATABOLISM ENZYMES OF FORMALDEHYDE DEHYDROGENASE AND FORMATE DEHYDROGENASE IN METHYLOTROPHIC YEAST *KOMAGATAELLA PHAFFII*

O.V. Dmytruk, N.V. Bulbotka, A.A. Sibirny

Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv 79005 Ukraine
Department of Biotechnology and Microbiology, University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601 Poland

E-mail: verbaolena@gmail.com

The investigation of the mechanisms of cytosolic protein degradation is of great fundamental and applied importance. The decrease in the specific activity of formaldehyde dehydrogenase (Fldh1) and formate dehydrogenase (Fdh1) in the wild type strain *GS200*, the strain with the deletion of the *GSS1* hexose sensor gene and a strain, defected in autophagy pathway *SMD1163* of *K. phaffii* in short-term and long-term induction with methanol, and with or without the addition of the MG132 (proteasome degradation inhibitor) was investigated. It was shown that the duration of cell incubation on methanol had no particular effect on the inactivation of enzymes. The effect of the proteasome inhibitor MG132 was insignificant. Catabolic inactivation of cytosolic and peroxisomal enzymes was damaged in the $\Delta gss1$ mutant as glucose signaling was impaired. Fldh1 and Fdh1 are likely to degrade by a vacuolar pathway, regardless of the duration of methanol induction.

ДЕГРАДАЦІЯ ФЕРМЕНТОВ КАТАБОЛІЗМА МЕТАНОЛА ФОРМАЛЬДЕГІД ДЕГІДРОГЕНАЗИ И ФОРМИАТ ДЕГІДРОГЕНАЗИ У МЕТИЛЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Е.В. Дмитрук, Н.В. Булботка, А.А. Сибирный

Выяснение механизмов деградации цитозольных белков имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Исследованы изменения в активности цитозольных ферментов катаболізма метанола — формальдегид дегидрогеназы (Fldh1) и формиат де-

гидрогеназы (Fdh1) у контрольного штамма дикого типа *GS200*, штамма с делецией гена сенсора гексоз *GSS1* и штамма с дефектом автофагии *SMD1163* *K. phaffii* при кратковременной и долговременной индукции метанолом с добавлением или же без добавления ингибитора протеасомной деградации MG132. Показано, что продолжительность инкубации клеток в метаноле не имеет особого влияния на инактивацию фермента. Эффект протеасомного ингибитора MG132 был незначителен. Катаболитная инактивация цитозольных и пероксисомных ферментов повреждена у *gss1Δ* мутанта, поскольку повреждено сигнализирование глюкозой. Fldh1 и Fdh1 вероятно деградируют вакуолярным путем, независимо от продолжительности индукции метанолом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gellissen, G., *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Edited by G. Gellissen. 2002. WILEY.
- Krasovska, O.S., Stasyk, O.G., Nahorny, V.O., Stasyk, O.V., Granovski, N., Kordium, V.A., Vozyanov, O.F., and Sibirny, A.A., Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, vol. 97. pp. 858–70. doi: 10.1002/bit.21284.
- Grabek-Lejko, D., Sibirny, V., and Sibirny, A., Regulation of gene expression in methylotrophic yeasts. *Postepy biochemii.* 2013, vol. 59, pp. 95–106.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., and Harvey, L.M., Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005, vol. 22, no. 4, pp. 249–70. doi: 10.1002/yea.1208.
- Sibirny, A.A., Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res.* 2016, vol. 16, no. 4. doi: 10.1093/femsyr/fow038.
- Nazarko, V.Y., Futej, K.O., Thevelein, J.M., and Sibirny, A.A., Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy.* 2008, vol. 4, pp. 381–4. doi: 10.4161/auto.5634.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A. Jr, Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y.A., Unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 2003, vol. 5, no. 4, pp. 539–45, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00296-x.
- Stasyk, O.V., Nazarko, T.Y., and Sibirny, A.A., Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection for ATG gene cloning in yeasts. *Methods Enzymol.* 2008, vol. 451, pp. 229–39.

9. Stasyk, O.V., Stasyk, O.G., Komduur, J., Veenhuis, M., Cregg, J.M., and Sibirny, A.A., A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* 2004, vol. 279, pp 8116–25. doi: 10.1074/jbc.M310960200.
10. Stasyk, O.V., Stasyk, O.G., Mathewson, R.D., Farré, J.-C., Nazarko, V.Y., Krasovska, O.S., Subramani, S., Cregg, J.M., and Sibirny, A.A., Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2006, vol. 2, pp. 30–8.
11. Nazarko, V.Y., Nazarko, T.Y., Farre, J.C., Stasyk, O.V., Warnecke, D., Ulaszewski, S., Cregg, J.M., Sibirny, A.A., and Subramani, S., Atg35, a micropephagy-specific protein that regulates micropephagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy*. 2011, vol. 7, pp. 1–11. doi: 10.4161/auto.7.4.14369.
12. Polupanov, A.S., Nazarko, V.Y., and Sibirny, A.A., CCZ1, MON1 and YPT7 genes are involved in pexophagy, the Cvt pathway and non-specific macroautophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Cell Biol. Int.* 2011, vol. 35, no. 4, pp. 311–9, doi: 10.1042/CBI20100547.
13. Polupanov, A.S., Nazarko, V.Y., and Sibirny, A.A., Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012, vol. 44, no. 11, pp. 1906–18, doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.017.
14. Polupanov, A.S., Sibirny, A.A., Cytoplasmic extension peptide of *Pichia pastoris* glucose sensor Gss1 is not compulsory for glucose signalling. *Cell Biol. Int.* 2014, vol. 38, no. 2, pp. 172–8. doi: 10.1002/cbin.10189.
15. Hung, G.C., Brown, C.R., Wolfe, A.B., Liuand, J., and Chiang, H.L., Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J. Biol. Chem.* 2004, vol. 279, pp. 49138–50. doi: 10.1074/jbc.M404544200.
16. Brown, C.R., Wolfe, A.B., and Chiang, H.L., The vacuolar import and degradation pathway merges with the endocytic pathway to deliver fructose-1,6-bisphosphatase to the vacuole for degradation. *J. Biol. Chem.* 2008, vol. 283, pp. 26116–27, doi: 10.1074/jbc.M709922200.
17. Menssen, R., Schweiggert, J., Schreiner, J., Kusevic, D., Reuther, J., Braun, B., and Wolf, D.H., Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzyme. *J. Biol. Chem.* 2012, vol. 287, pp. 25602–14, doi: 10.1074/jbc.M112.363762.
18. Giardina, B.J., Chiang, H.L., Fructose-1,6-bisphosphatase, Malate Dehydrogenase, Isocitrate Lyase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, and Cyclophilin A are secreted in *Saccharomyces cerevisiae* grown in low glucose. *Commun. Integr. Biol.* 2013, vol 6, pp. 27216, doi: 10.4161/cib.27216.
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193, pp. 265–75.
20. Tuttle, D.L., Dunn, A.J., Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell. Sci.* 1995, vol. 108, pp. 25–35.

Надійшла в редакцію 10.03.20
Після доопрацювання 24.03.20
Прийнята до друку 18.09.20