

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.218

**Rpn4-ПОДОБНЫЙ БЕЛОК *Candida glabrata* КОМПЛЕМЕНТИРУЕТ  
ДЕЛЕЦИЮ ГЕНА *RPN4* У *Saccharomyces cerevisiae***

© 2019 г. Д. С. Карпов<sup>a, b, \*</sup>, Е. Н. Гринева<sup>a</sup>, С. В. Киселева<sup>a</sup>,  
Е. С. Челарская<sup>a</sup>, Д. С. Спасская<sup>a</sup>, В. Л. Карпов<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

\*e-mail: aleom@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.09.2018 г.

После доработки 06.10.2018 г.

Принята к публикации 08.10.2018 г.

Экспрессия протеасомных генов в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* координировано регулируется системой, состоящей из фактора транскрипции ScRpn4 и его сайта связывания, названного РАСЕ. Ранее мы показали, что, несмотря на незначительное общее сходство с ScRpn4, Rpn4-подобные белки биотехнологически значимых видов дрожжей *Komagataella pfaffii* (*Pichia pastoris*), *Yarrowia lipolytica* и *Debaryomyces hansenii* способны комплементировать делецию *RPN4* у *S. cerevisiae*. Условно-патогенные дрожжи *Candida glabrata* также имеют ген Rpn4-подобного белка, однако экспериментально этот белок не охарактеризован. В настоящей работе показано, что в гетерологичной системе экспрессии *S. cerevisiae* ортолог ScRpn4 из *C. glabrata* восстанавливает устойчивость к стрессовым воздействиям и уровень мРНК протеасомных генов у мутантного штамма *S. cerevisiae* с делецией гена *SCRPN4*. Кроме того, уникальная N-концевая область необходима для функционирования CgRpn4. Полученные нами данные указывают на то, что CgRpn4 служит активатором транскрипции протеасомных генов, а модельная система *S. cerevisiae* может использоваться в дальнейшем структурном и функциональном анализе этого белка.

**Ключевые слова:** Rpn4, *Candida glabrata*, регуляция транскрипции, протеасомные гены, устойчивость к стрессу

**DOI:** 10.1134/S002689841902006X

## ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Candida glabrata* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, нередко обитающим на слизистых оболочках в качестве компонента нормальной микрофлоры человека. Тем не менее, в ряде случаев, в частности у пациентов с иммунодефицитом, *C. glabrata* может вызывать кандидоз. По статистике *C. glabrata* становится причиной 15–25% всех случаев кандидозов [1]. *C. glabrata*, принадлежащие к семейству Saccharomycetaceae класс Saccharomycetes, филогенетически более близки к пекарским дрожжам *Saccharomyces cerevisiae*, чем к возбудителям кандидоза, например *C. albicans* [2].

Причины вирулентности *C. glabrata*, по-видимому, частично связаны с повышенной устойчи-

востью этих микроорганизмов к действию активных форм кислорода [1]. Также *C. glabrata* характеризуется устойчивостью к азолам (например флюконазолу) – фунгицидам, нарушающим биосинтез эргостерола, компонента клеточных мембран. Одним из ключевых факторов формирования устойчивости к лекарственным препаратам и окислительному стрессу является Pdr1p [3]. У дрожжей *S. cerevisiae* экспрессия гена этого фактора транскрипции регулируется Rpn4p, в то же время Pdr1p служит трансактиватором гена *RPN4*, который отвечает за устойчивость ко многим типам неблагоприятных воздействий – тепловому шоку, окислительному и ДНК-повреждающему стрессу [4].

Фактор транскрипции Rpn4 впервые был охарактеризован нами в сотрудничестве с коллегами

Сокращения: РАСЕ – регуляторный элемент, ассоциированный с протеасомными генами (Proteasome associated control element); MMS – метилметансульфонат (methyl methane sulfonate); 4-NQO – 4-нитрохинолин-1-оксид (4-nitroquinolin-1-oxide); NAD – N-концевой “кислый домен” (N-terminal acidic domain); CAD – C-концевой “кислый домен” (C-terminal acidic domain); NTAD – N-концевой трансактиваторный домен (N-terminal transactivation domain); N-ZnF – N-концевой домен “цинкового пальца” (N-terminal zinc finger domain); C-ZnF – C-концевой домен “цинкового пальца” (C-terminal zinc finger domain); QRR – участок, обогащенный остатками глутамина (Glutamine rich region).

из Германии как компонент системы координированной регуляции экспрессии протеасомных генов [5, 6]. 26S протеасома – это АТР-зависимый мультисубъединичный протеазный комплекс, который отвечает за деградацию большинства внутриклеточных белков, в том числе поврежденных и неправильно свернутых. В промоторах почти всех генов, кодирующих субъединицы протеасомы, обнаружен регуляторный элемент PACE (Proteasome Associated Control Element, 5'-GGTGGCAAA-3'), с которым связывается Rpn4. Фактор Rpn4 *S. cerevisiae* (ScRpn4) регулирует не только протеасомные гены, но и множество других, включая гены компонентов различных антистрессовых ответов [7].

В ходе биоинформатического анализа геномов различных организмов PACE-подобные элементы и гены, кодирующие ScRpn4-подобные белки, были выявлены только у дрожжей класса Saccharomycetes [2]. Ранее мы показали, что ScRpn4-подобные белки таких биотехнологически значимых дрожжей, как *Yarrowia lipolytica*, *Komagataella affinis* (*Pichia pastoris*) и *Debaryomyces hansenii* способны восстанавливать уровень мРНК протеасомных генов и устойчивость к стрессовым воздействиям штамма *S. cerevisiae* с делецией гена *SCRPN4* [8, 9]. Ортолог этого гена найден и у *C. glabrata*. Показано, что экспрессия *CGRPN4* увеличивается в условиях окислительного стресса, в связи с чем возникает предположение о его участии в устойчивости к неблагоприятным условиям по аналогии с белком *S. cerevisiae* [3, 10]. Вероятно, этот фактор транскрипции вовлечен в активацию программы, направленной на нейтрализацию активных форм кислорода. Однако экспериментально белок CgRpn4 до сих пор не охарактеризован.

В настоящей работе ген ортолога Rpn4 *C. glabrata* клонирован и экспрессирован в штамме *S. cerevisiae* с делецией собственного гена *RPN4*. Установлена способность белка CgRpn4 обеспечивать устойчивость к различным видам стресса, включая окислительный стресс, и восстанавливать экспрессию *PRE1*, кодирующего важную струк-

турную субъединицу 20S протеасомного субкомплекса *S. cerevisiae*. Установлено также, что делеция участка гена, кодирующего N-концевую область, приводит к инактивации CgRpn4.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы дрожжей и условия роста клеток.** В работе использовали штаммы *S. cerevisiae* BY4742 (MAT $\alpha$ ; *his3* $\Delta$ 1; *leu2* $\Delta$ 0; *lys2* $\Delta$ 0; *ura3* $\Delta$ 0) дикого типа (“Euroscarf”, Германия) и BY4742 *rpn4*- $\Delta$  (MAT $\alpha$ ; *his3* $\Delta$ 1; *leu2* $\Delta$ 0; *lys2* $\Delta$ 0; *ura3* $\Delta$ 0; *YDL020c::kanMX4*) с делецией гена *RPN4* (“Euroscarf”). Клетки дрожжей растили при 30°C на среде YPD (2% глюкозы, 2% пептона, 1% дрожжевого экстракта) и трансформировали, используя литий-ацетатный метод [11]. Трансформированные клетки растили на селективной среде, содержащей YNB, смесь аминокислот Dropout media, аденин и 2% глюкозы без урацила (все компоненты производства “Sigma”, США).

**Получение плазмидных конструкций.** Получение плазмиды YCp-Lac36-CGRPN4. Участок гена *CAGL0K0172g*, кодирующий предполагаемый ортолог ScRpn4, амплифицировали с геномной ДНК *C. glabrata* HTL [12], выделенной методом встряхивания со стеклянными шариками (“Sigma”) [13], с праймерами CgRpn4-NcoI-F и CgRpn4-XhoI-R (табл. 1). Амплифицированный фрагмент очищали и клонировали в плазмиду YCpLac36-SCRPN4 (табл. 1) по сайтам NcoI и XhoI вместо гена *SCRPN4*.

Получение плазмиды YCp-Lac36- $\Delta$ N177-CGRPN4. Фрагмент гена *CAGL0K0172g*, кодирующий CgRpn4 без первых 177 N-концевых аминокислотных остатков, амплифицировали с геномной ДНК *C. glabrata* HTL с праймерами CgRPN4- $\Delta$ N177-NcoI-F и CgRpn4-XhoI-R и клонировали в YCpLac36-SCRPN4 по сайтам NcoI и XhoI.

Присутствие клонированных фрагментов ДНК проверяли с помощью ПЦР с колоний *Escherichia coli* и рестрикционным анализом плазмид, выде-

**Таблица 1.** Плазмиды, использованные в работе

Плаزمида	Характеристика плазмиды	Источник
YCpLac36	Низкокопийный центромерный дрожжевой вектор	[14]
YCpLac36-SCRPN4	Экспрессионная плаزمида, производная YCpLac36, кодирующая ген <i>RPN4</i> <i>S. cerevisiae</i> , под контролем промотора <i>SCRPN4</i>	[14, 15]
YCpLac36- $\Delta$ N210-SCRPN4	Экспрессионная плазмида, производная YCpLac36-SCRPN4, кодирующая ScRpn4 с делецией 210 N-концевых аминокислот	[9]
YCp-Lac36-CGRPN4	Экспрессионная плазмида, производная YCpLac36-SCRPN4, кодирующая Rpn4 <i>C. glabrata</i>	Данная работа
YCp-Lac36- $\Delta$ N177-CGRPN4	Экспрессионная плазмида, производная YCpLac36-SCRPN4, кодирующая CgRpn4 с делецией 177 N-концевых аминокислот	»

ленных из ПЦР-положительных колоний. Нуклеотидную последовательность клонированных фрагментов подтверждали секвенированием.

**Определение устойчивости дрожжей к стрессу с помощью серии разведений культуры на чашках Петри.** Культуры клеток дрожжей, выращенные в течение ночи на жидкой селективной среде, разводили до оптической плотности  $OD_{600} = 1$ . Далее готовили серию из последовательных десятикратных разведений суспензии клеток в воде и высевали на твердую селективную среду без урацила с добавлением стрессовых агентов: ацетата кадмия, MMS, 4-NQO и циклогексимида. Тест на устойчивость к *L*-канаванину проводили на селективной среде без урацила и аргинина (все реактивы производства “Sigma”). В контроле штаммы растили на среде без добавления стрессовых агентов. Устойчивость штаммов дрожжей к стрессу определяли качественно по скорости формирования колоний.

**Определение относительного уровня мРНК.** Культуры клеток дрожжей, выращенные в течение ночи на жидкой селективной среде, разводили до  $OD_{600} = 0.2$  и подращивали в течение 4 ч. Стресс индуцировали, добавляя 4-NQO до конечной концентрации 2 мкг/мл и инкубируя в течение еще 45 мин. Клетки осаждали центрифугированием, суммарную РНК выделяли с использованием горячего кислого фенола [16]. кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы RevertAid H-minus (“Thermo Scientific”, США) по протоколу, рекомендованному производителем, с олиго(dT) в качестве затравки. Относительное количество мРНК протеасомного гена *PRE1* определяли методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентным красителем Eva Green (“Синтол”, Россия) на приборе LightCycler-480-II (“Roche Life Science”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Референсным геном служил ген актина (*ACT1*). Первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором. Дальнейшую обработку проводили с помощью Microsoft Excel. Олигонуклеотиды, по-

следовательности которых представлены в табл. 2, подбирали с помощью сервера mFold [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *CgRpn4* имеет слабое сходство с *ScRpn4* вне ДНК-связывающего домена

В ходе биоинформатического анализа установлено, что общее сходство аминокислотных последовательностей белков *CgRpn4* (XP\_448300.1, кодируемого геном *CAGL0K01727g*), и *ScRpn4* составляет 48.1% (рис. 1). К участкам, имеющим наибольшее локальное сходство, можно отнести N-концевой фрагмент (остатки 1–21), входящий в состав сигнала убиквитиннезависимого протеолиза у *ScRpn4* [18], и C-концевую область, содержащую предполагаемый ДНК-связывающий домен, представленный “цинковыми пальцами” (N-ZnF и C-ZnF). В центральной части *CgRpn4*, как и у *ScRpn4*, можно выделить два участка, обогащенных остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот (так называемые кислые домены). N-концевые кислые домены (NAD) этих белков хорошо сопоставлены в выравнивании, тогда как C-концевые (CAD) не имеют значимого сходства и удалены друг от друга. Отметим, что в целом N-концевая область *CgRpn4* не обладает значимым сходством с N-концевой областью *ScRpn4*, содержащей сильный трансактиваторный домен [19]. Примечательно, что в N-концевой области *CgRpn4* обнаружен участок, обогащенный остатками глутаминина (QRR), который, возможно, входит в состав потенциального глутамин-богатого трансактиваторного домена.

Одна из особенностей структуры Rpn4-подобных белков – необычный N-ZnF. Этот участок не выявляется онлайн программами, идентифицирующими домены цинковых пальцев, например (<http://zf.princeton.edu/> [21]), тогда как стандартный C-концевой цинковый палец типа C2H2 и распознаваемый им фрагмент 3'-GGTG-5' РАСЭ-элемента предсказываются правильно. Предполагаемые контакты между цинковыми пальцами выведены в соответствии с системой правил рас-

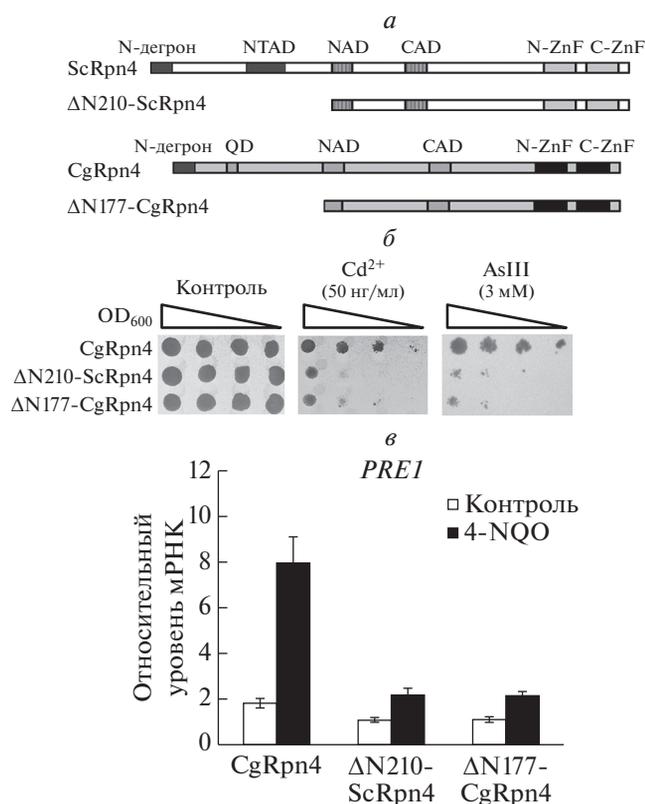
**Таблица 2.** Олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
CgRpn4-NcoI-F	GAGAGAGAACCATGGCGTCTATAGATTTGGGACT
CgRpn4-XhoI-R	GAGAGAGAACTCGAGTTATGCAGTGACAAATCCGAT
CgRPN4-ΔN177-NcoI-F	GAGAGAGAACCATGGACGACGATGACCTGAGTGA
PRE1-EX-RT-F	ACTACTGAGGAGGGTTTAG
PRE1-EX-RT-R	CTTATGCCATCTTTATCCACGA
ACT1-ex-RT-F	CCTTCTGTTTTGGGTTTTGGAATC
ACT1-ex-RT-R	TGGAGCCAAAGCGGTGATTTCTT

Примечание: жирным выделены сайты эндонуклеаз рестрикции.







**Рис. 4.** N-концевая область необходима для функционирования CgRpn4. *а* – Схема структуры белков, кодируемых экспрессионными плазмидами. *б* – CgRpn4 с делецией 177 N-концевых остатков не восстанавливает устойчивость штамма *rpn4*-Δ к стрессу. *в* – CgRpn4-Δ177 не восстанавливает уровень экспрессии *PRE1* в штамме *rpn4*-Δ. Ген *ACT1* использовали в качестве референсного. Нормированное значение уровня мРНК *PRE1* в штамме *rpn4*-Δ, продуцирующем ΔN210-ScRpn4, в нормальных условиях принято за единицу. Представлены средние значения трех независимых опытов. Разброс данных представлен стандартным отклонением. ΔN210-ScRpn4 – штамм *rpn4*-Δ, трансформированный плазмидой YCpLac36-ΔN210-SCRPN4; ΔN177-CgRpn4 – штамм *rpn4*-Δ, трансформированный плазмидой YCpLac36-ΔN177-CGRPN4. Cd<sup>2+</sup> – CdCl<sub>2</sub>; AsIII – NaAsO<sub>2</sub>, вызывает окислительный стресс.

Комплементация делеции гена *SCRPN4* в штамме *S. cerevisiae* путем введения в плазмиды YCpLac36-SCRPN4, кодирующей полноразмерный белок под контролем собственного промотора, восстанавливает нормальный фенотип клеток в условиях стресса, вызванного канаванином, кадмием, мышьяком, циклогексимидом и ДНК-повреждающими агентами – MMS и 4-NQO (рис. 3а). Трансформация плазмидой YCp-Lac36-CGRPN4, кодирующей ортолог Rpn4 из *C. glabrata*, также приводит к восстановлению устойчивости к указанным стрессовым агентам (рис. 3а). Таким образом, функциональный анализ указывает на первоначальную роль гена *CGRPN4* в обеспечении

устойчивости клеток к окислительному, протеотоксическому и ДНК-повреждающему стрессу.

#### *CgRpn4* восстанавливает экспрессию протеасомного гена *PRE1* в штамме с делецией *SCRPN4*

Белок Rpn4 идентифицирован как фактор транскрипции, обеспечивающий координированную экспрессию генов, кодирующих субъединицы 26S протеасомы [5, 6]. В условиях действия стресса, индуцирующего экспрессию *SCRPN4*, например при повреждении ДНК, происходит накопление белка Rpn4 и последующая активация экспрессии его генов-мишеней, включая протеасомные гены [27]. В штамме с делецией гена *SCRPN4* уровень мРНК гена *PRE1*, кодирующего субъединицу 20S протеолитического субкомплекса протеасомы, снижен в нормальных условиях роста, и наблюдается его слабая индукция в присутствии ДНК-окисляющего агента 4-NQO (рис. 3б). Введение в мутантный штамм полноразмерной копии как собственного гена, так и ортолога из *C. glabrata* восстанавливает уровень мРНК гена *PRE1* как в норме, так и в присутствии 4-NQO (рис. 3б). Это означает, что белок CgRpn4 способен связываться с промоторами генов-мишеней Rpn4, включая протеасомный ген *PRE1*, и выполнять функцию активатора транскрипции.

#### N-концевая область CgRpn4 содержит трансактиваторный домен и необходима для функционирования белка

Основной трансактиваторный домен ScRpn4 находится в пределах 210 N-концевых аминокислот. Делеция этой области приводит к полной утрате активности фактора транскрипции [19]. Соответственно ей N-концевой участок CgRpn4 продолжается до NAD-домена и составляет 177 аминокислот (рис. 4а). Делеция соответствующего фрагмента гена *CGRPN4* также приводит к потере трансактиваторной активности белка CgRpn4. Укороченный белок не способен восстанавливать устойчивость к стрессу и уровень мРНК генов-мишеней в штамме с делецией *SCRPN4* (рис. 4б, в). Таким образом, N-концевая область белка CgRpn4 также может содержать весь основной трансактиваторный домен или его часть.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе впервые клонирован ген Rpn4-подобного белка условно-патогенных дрожжей *C. glabrata*. В гетерологичной системе экспрессии *S. cerevisiae* показано, что CgRpn4 способен функционально замещать ScRpn4. Кроме того, уникальная N-концевая область необходима для функционирования CgRpn4.

*C. glabrata* эволюционно более близкий *S. cerevisiae* вид, чем *K. paffii*, *Y. lipolytica* и *D. hansenii* [2]. В соответствии с этим CgRpn4 обнаруживает большее сходство с ScRpn4 (48.1%), чем KpRpn4 (36.8%), YlRpn4 (36.3%) [8] или DhRpn4 (37.2%) [9]. Как и у других Rpn4-подобных белков, наивысшее локальное сходство выявлено у предполагаемого цинковыми пальцами, тогда как N-концевая область уникальна для CgRpn4. Отметим, что высокое сходство ДНК-связывающих доменов ScRpn4 и CgRpn4 и идентичность аминокислотных остатков, контактирующих, вероятно, с ДНК, соответствует высокому сходству профилей распознаваемых PACE-подобных элементов (рис. 2а). Можно ожидать, что CgRpn4 способен регулировать те же гены, что и ScRpn4. В числе генов, регулируемых Rpn4, можно отметить *YAP1*, кодирующий фактор транскрипции, действующий как сенсор активных форм кислорода, и как регулятор экспрессии генов, чьи продукты участвуют в ответе на окислительный стресс, например тиоредоксинов [28]. Кроме того, важными мишенями Rpn4 служат факторы транскрипции Pdr1–Pdr3, участвующие в феномене множественной лекарственной устойчивости [4].

Различия же в последовательности N-концевых областей CgRpn4 и ScRpn4 ведут к закономерному вопросу, содержит ли N-концевая область CgRpn4 трансактиваторный домен? Полученные нами данные указывают на то, что N-концевая область CgRpn4 действительно необходима для функционирования белка как фактора транскрипции и вносит основной вклад в формирование устойчивости к стрессу. В N-концевой области CgRpn4 находится короткий участок, обогащенный остатками глутамин, который может быть частью домена большего размера. Обогащенные глутамином домены встречаются у небольшого числа факторов транскрипции и вспомогательных транскрипционных комплексов *S. cerevisiae*, например, у Nap1p, Nap2p и в субъединице Gal11p одного из медиаторных комплексов [29].

Таким образом, нами впервые показано, что в гетерологической системе *S. cerevisiae* Rpn4-подобный белок из *C. glabrata* служит активатором транскрипции протеасомных генов и участвует в ответе на различные виды стресса, включая окислительный. Можно предположить, что этот белок вносит значительный вклад в устойчивость *C. glabrata* к окислительному стрессу и фунгицидам, и, опосредованно, в вирулентность микроорганизма. Эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН ([http://www.eimb.ru/rus/skr/ccu\\_genome\\_c.php](http://www.eimb.ru/rus/skr/ccu_genome_c.php)).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00704) (рис. 1), Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (№ 01201363823) (рис. 2) и Российского научного фонда (№ 17-74-30030) (рис. 3, 4).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gabalton T., Carrete L. (2016) The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* **16**, fov110.
- Mannhaupt G., Feldmann H. (2007) Genomic evolution of the proteasome system among hemiascomycetous yeasts. *J. Mol. Evol.* **65**, 529–540.
- Vermitsky J.-P., Earhart K.D., Smith W.L., Homayouni R., Edlind T.D., Rogers P.D. (2006) Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**, 704–722.
- Owsianik G., Balzil L., Ghislain M. (2002) Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1295–1308.
- Капранов А.Б., Преображенская О.В., Тютяева В.В., Штука Р., Фельдман Х., Карпов В.Л. (2001) Выделение и идентификация PACE-связывающего белка Rpn4 – нового транскрипционного активатора, участвующего в регуляции 26S протеасомных и других генов. *Молекуляр. биология.* **35**, 420–431.
- Mannhaupt G., Schnall R., Karpov V., Vetter I., Feldmann H. (1999) Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27–34.
- Спаская Д.С., Карпов Д.С., Миронов А.С., Карпов В.Л. (2014) Транскрипционный фактор Rpn4 *Saccharomyces cerevisiae* обеспечивает комплексный антистрессовый ответ при действии метилметансульфоната. *Молекуляр. биология.* **48**, 166–175.
- Гринева Е.Н., Лейнсоо А.Т., Спаская Д.С., Карпов Д.С., Карпов В.Л. (2014) Функциональный анализ Rpn4-подобных белков из *Komagataella (Pichia) pastoris* и *Yarrowia lipolytica* в гетерологической системе *Saccharomyces cerevisiae*. *Биотехнология.* **6**, 8–17.
- Karpov D.S., Grineva E.N., Leinsoo A.T., Nadolinskaia N.I., Danilenko N.K., Tutyayeva V.V., Spasskaya D.S., Preobrazhenskaya O.V., Lysov Y.P., Karpov V.L. (2017) Functional analysis of *Debaryomyces hansenii* Rpn4 on a genetic background of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **17**, fow098.
- Enjalbert B., Smith D.A., Cornell M.J., Alam I., Nicholls S., Brown A.J.P., Quinn J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 1018–1032.

11. Gietz R.D., Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**, 87–96.
12. Schwarzmuller T., Ma B., Hiller E., Istel F., Tscherner M., Brunke S., Ames L., Firon A., Green B., Cabral V., Marcet-Houben M., Jacobsen I.D., Quintin J., Seider K., Frohner I., Glaser W., Jungwirth H., Bachellier-Bassi S., Chauvel M., Zeidler U., Ferrandon D., Gabaldon T., Hube B., d'Enfert C., Rupp S., Cormack B., Haynes K., Kuchler K. (2014) Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. *PLoS Pathog.* **10**, e1004211.
13. Amberg D.C., Burke D.J., Strathern J.N. (2006) Isolation of yeast genomic DNA for southern blot analysis. *CSH Protoc.* **2006**.
14. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Tutyaeva V.V., Mironov A.S., Karpov V.L. (2013) Proteasome inhibition enhances resistance to DNA damage via upregulation of Rpn4-dependent DNA repair genes. *FEBS Lett.* **587**, 3108–3114.
15. Спасская Д.С., Карпов Д.С., Карпов В.Л. (2011) Dam-метилаза *Escherichia coli* как молекулярный инструмент для картирования сайтов связывания дрожжевого фактора транскрипции Rpn4p. *Молекуляр. биология.* **45**, 642–651.
16. Schmitt M.E., Brown T.A., Trumppower B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **18**, 3091–3092.
17. Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3406–3415.
18. Ha S.W., Ju D., Xie Y. (2012) The N-terminal domain of Rpn4 serves as a portable ubiquitin-independent degron and is recognized by specific 19S RP subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**, 226–231.
19. Karpov D.S., Tutyaeva V.V., Karpov V.L. (2008) Mapping of yeast Rpn4p transactivation domains. *FEBS Lett.* **582**, 3459–3464.
20. McWilliam H., Li W., Uludag M., Squizzato S., Park Y.M., Buso N., Cowley A.P., Lopez R. (2013) Analysis tool web services from the EMBL–EBI. *Nucl. Acids Res.* **41**, W597–600.
21. Persikov A., Singh M. (2014) *De novo* prediction of DNA-binding specificities for Cys2His2 zinc finger proteins. *Nucl. Acids Res.* **42**, 97–108.
22. Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 183–212.
23. Dreier B., Segal D.J., Barbas C.F. (2000) Insights into the molecular recognition of the 5'-GNN-3' family of DNA sequences by zinc finger domains. *J. Mol. Biol.* **303**, 489–502.
24. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190.
25. Brennan R.J., Schiestl R.H. (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* **356**, 171–178.
26. Haugen A.C., Kelley R., Collins J.B., Tucker C.J., Deng C., Afshari C.A., Brown J.M., Ideker T., Van Houten B. (2004) Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol.* **5**, R95.
27. London M.K., Keck B.I., Ramos P.C., R. Dohmen R.J. (2004) Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett.* **567**, 259–264.
28. Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 16040–16046.
29. Mitchell P.J., Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science.* **245**, 371–378.

## Rpn4-LIKE PROTEIN *Candida glabrata* COMPLEMENTS *RPN4* DELETION IN *Saccharomyces cerevisiae*

D. S. Karpov<sup>1,2,\*</sup>, E. N. Grineva<sup>1</sup>, S. V. Kiseleva<sup>1</sup>, E. S. Chelarskaya<sup>1</sup>,  
D. S. Spasskaya<sup>1</sup>, V. L. Karpov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia

\*e-mail: aleom@yandex.ru

Expression of *Saccharomyces cerevisiae* proteasomal genes is regulated in coordinated manner by the system comprised of the ScRpn4 transcription factor and its binding site called PACE. Rpn4-like proteins from biotechnologically important yeast species *Komagataella pfaffii* (*Pichia pastoris*), *Yarrowia lipolytica* and *Debaryomyces hansenii* are able to complement *RPN4* deletion in *S. cerevisiae* despite the weakness of their similarity with ScRpn4. Opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata* also has a gene encoding Rpn4-like protein; this protein is not characterized experimentally yet. Here we show that heterologously expressed ScRpn4 ortholog from *C. glabrata* restores stress resistance and expression of proteasomal genes in the mutant *S. cerevisiae* strain with *RPN4* deletion. This complementation requires unique N-terminal region of CgRpn4. Our data indicate that CgRpn4 acts as an activator of transcription of proteasomal genes. Further structural and functional analysis of CgRpn4 may be performed in a model of *S. cerevisiae*.

**Keywords:** Rpn4, *Candida glabrata*, transcription regulation, proteasomal genes, stress resistance