## НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ

На правах рукопису

## БЛАЖЕНКО ОЛЕКСАНДРА ВАСИЛІВНА

УДК 582.282.23+575.113+579.66

# РОЛЬ ГЕНІВ ПОЧАТКОВИХ ЕТАПІВ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛУТАТІОНУ У ЗАХИСТІ ВІД СТРЕСУ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник: Сибірний Андрій Андрійович академік НАН України, доктор біологічних наук, професор

## **3MICT**

ПЕРЕЛІК В	ИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП		9
OCHOBHA	ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 1. О	ГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	16
1.1. Власти	вості та функції глутатіону в клітині	.16
1.2. Генети	чний контроль метаболізму глутатіону	. 18
1.2.1.	Біосинтез глутатіону	18
1.2.2.	Регуляція біосинтезу глутатіону у дріжджів	.19
1.2.3.	Деградація глутатіону в дріжджів: ү-глутамілтрансфераза та	
	її функції у прокаріот та еукаріот	21
1.2.4.	Регуляція ү-глутамілтрансферази в дріжджів	23
1.3. Шляхи метаболізму сірки та їх регуляція в мікроорганізмів24		
1.3.1.	Метаболічні шляхи асиміляції сірки і біосинтезу сірковмісни	X
	біомолекул в еукаріотичних мікроорганізмів	24
1.3.2.	Біосинтез сірогему, простетичної групи сульфітредуктази, у	
	мікроорганізмів	27
1.3.3.	Регуляція шляхів метаболізму сірки в еукаріотичних	
	мікроорганізмів	29
1.4. Участь	глутатіону у стресових відповідях	.31
1.4.1.	Роль глутатіону у метилотрофному метаболізмі	31
1.4.2.	Участь глутатіонової системи захисту у відповіді на	
	оксидативний стрес у дріжджів	33
1.4.3.	Роль глутатіону у детоксикації ксенобіотиків	34
1.5. Вплив	кадмію на живі організми і механізми захисту проти його дії	35
1.5.1.	Токсичні ефекти кадмію	.35
1.5.2.	Механізми детоксикації кадмію в дріжджів	.37
1.5.3.	Відповідь дріжджової клітини на кадмій відбувається на	
	загальному системному рівні	.41

РОЗДІЛ 2. N	<b>ТАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>
2.1. Матер	іали досліджень45
2.1.1.	Реактиви
2.1.2.	Штами мікроорганізмів 45
2.1.3.	Плазміди47
2.1.4.	Праймери48
2.1.5.	Поживні середовища49
2.2. Метод	и досліджень
2.2.1.	Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів <i>Н. polymorpha</i> 51
2.2.2.	Електротрансформація дріжджів <i>Н. polymorpha</i> 52
2.2.3.	Схрещування дріжджів53
2.2.4.	Базові молекулярно-генетичні методи53
2.2.5.	Програмне забезпечення для аналізу амінокислотних та
	нуклеотидних послідовностей 54
2.2.6.	Дослідження мітотичної стабільності дріжджових
	трансформантів55
2.2.7.	Отримання безклітинних екстрактів 55
2.2.8.	Визначення вмісту глутатіону 55
2.2.9.	Визначення активності алкогольоксидази 56
2.2.10	. Визначення активності γ-глутамілцистеїнсинтетази 57
2.2.11	. Визначення активності ү-глутамілтрансферази 59
2.2.12	. Флуоресцентна мікроскопія59
2.2.13	. Транспорт електрофільних сполук з клітин дріжджів 59
2.2.14	. Визначення фітохелатинів і глутатіону 60
2.2.15	. Визначення вмісту рибофлавіну61
2.2.16	. Визначення вмісту заліза61
2.2.17	. Вивчення акумуляції іонів кадмію61
2.2.18	. Транспорт іонів кадмію в дріжджові клітини
2.2.19	. Статистичний аналіз експериментальних даних

# РОЗДІЛ З. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ...... 63 3.1. Ідентифікація та функціональний аналіз гена GSH1/MET1 Н. 3.1.1. Молекулярне клонування гена GSH1/MET1 H. polymorpha, що функціонально комплементує мутацію gsh1......63 3.1.2. Аналіз амінокислотної послідовності гіпотетичного білкового продукту гена GSH1/MET1 H. polymorpha...... 69 3.1.3. Конструювання касети з делецією гена GSH1/MET1 та отримання делеційних штамів *Agsh1/met1 H. polymorpha*.....74 3.1.4. Конструювання касети з делецією гена GSH2 та отримання 3.1.5. Функціональний аналіз гена GSH1/MET1 H. polymorpha...... 81 3.2. Регуляція першого етапу біосинтезу глутатіону у метилотрофних 3.2.1. Характеристика молекулярної організації промотора гена 3.2.2. Дослідження залежності між довжиною регуляторної ділянки гена GSH2 та відповіддю на кадмієвий та оксидативний стрес у 3.2.3. Конструювання репортерної касети prGSH2-AOX та одержання 3.2.4. Дослідження експресії гена GSH2 Н. polymorpha у відповідь 3.2.5. Дослідження взаємозв'язку між вмістом клітинного глутатіону, активністю у-глутамілцистеїнсинтетази та чутливістю до іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.....104 3.3. Вивчення ролі у-глутамілтрансферази у процесах метаболізму глутатіону та його кон'югатів у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*..... 107 3.3.1. Аналіз амінокислотної послідовності білкового продукту гена *GGT1 H. polymorpha*.....107

3.3.2.	Конструювання касети з делецією гена GGT1 та отримання		
	делеційного штама <i>Aggt1 H. polymorpha</i> 109		
3.3.3.	Функціональний аналіз гена GGT1 Н. polymorpha113		
3.3.4.	Вивчення метаболізму флуоресцентних ксенобіотиків у		
	дріжджів <i>H. polymorpha</i> і <i>S. cerevisiae</i> 120		
3.3.5.	Вивчення транспорту електрофільних похідних з клітин		
	дріжджів <i>H. polymorpha</i> та <i>S. cerevisiae</i> 123		
3.4. Вивчення особливостей відповіді метилотрофних дріжджів			
<i>H. polymorpha</i> на кадмієвий стрес127			
3.4.1.	Ідентифікація специфічних хелаторів іонів кадмію у дріжджів		
	H. polymorpha127		
3.4.2.	Вивчення акумуляції іонів кадмію129		
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ			
Д	<b>ОСЛІДЖЕНЬ</b> 140		
ВИСНОВКИ			
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ1			
д <b>одатки</b>			

5

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

- а.з. амінокислотних залишків
- АОХ алкогольоксидаза
- ВЕРХ високоефективна рідинна хроматографія високого тиску
- ВРТ відкрита рамка трансляції
- ДНК дезоксирибонуклеїнова кислота
- **ДТТ** дитіотрейтол
- ЕДТА етилендіамінтетраацетат

**КФ** – Комісія по ферментах (використовується перед класифікаційним кодом фермента)

М.м. – молекулярна маса

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

т.п.н. – тисяч пар нуклеотидів

- AdoHys S-аденозилгомоцистеїн
- АДР аденозин-5'-дифосфат
- APS аденозин-5'-фосфосульфат
- ARS автономний елемент реплікації
- АТР аденозин-5'-трифосфат
- **BSO** L-бутіонін-S-сульфоксимін

Ста – каталаза

Cd-(GS)<sub>2</sub>, Cd-GSH – глутатіон кадмієвий комплекс

Cd-S<sub>2</sub> – комплекс кадмію з цистеїніл-гліцином

CdS-(GS)<sub>2</sub> – сульфід-вмісний комплекс кадмію з глутатіоном

CdS-PC – сульфід-вмісний комплекс кадмію з фітохелатинами

СРС – вакуолярна серинкарбоксипептидаза С

СРУ – вакуолярна серинкарбоксипептидаза Ү

(Cys-Gly)-X, Cys-X, NAC-X, GS-X – кон'югати цистеїнілгліцину, цистеїну, Nацетилцистеїну та глутатіону з ксенобіотиком, відповідно **Cys-mB, Cys-Gly-біман, GS-біман** – кон'югати цистеїну, цистеїнілгліцину та глутатіону з монобромобіманом, відповідно

**Cys/NAC-Npyr** – кон'югати цистеїну або N-ацетилцистеїну з N-[1піреніл]малеїнімідом

Das – дигідроксиацетонсинтаза

**DHA** – дигідроксиацетон

**DTNB** – 5,5'-дітіобіс (2-нітробензойна кислота)

Fdh – форміатдегідрогеназа

Fld – формальдегіддегідрогеназа

GAP – гліцеральдегід 3-фосфат

**GAPDH** – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа

GCLC – каталітично активна важка субодиниця γ-глутамілцистеїнсинтетази ссавців

GCLM – легка регуляторна субодиниця ү-глутамілцистеїнсинтетази ссавців

 $\gamma GCS$  –  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетаза

үGlu-Cys, ү-EC – L-ү-глутаміл-L-цистеїн

 $\gamma GT - \gamma$ -глутамілтрансфераза

Glr – глутатіонредуктаза

**Gpx** – глутатіонпероксидаза

Grx – глутаредоксин

 $\mathbf{GS}$  – глутатіонсинтетаза

- **GSH** відновлений глутатіон
- **GS-R** змішаний дисульфід глутатіону з тіолами білків
- GSSG окиснений глутатіон

GST – глутатіон S-трансфераза

HMW PC-Cd – високомолекулярний комплекс фітохелатину з кадмієм

LMW PC-Cd – низькомолекулярний комплекс фітохелатину з кадмієм

**mBBr** – монобромобіман

**MNNG** – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин

**NADPH** – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений

**N-Pyr** – N-[1-піреніл]малеїнімід

**ОАЅ** – О-ацетилсериновий шлях

РАРЅ – 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат

РС – фітохелатини

 $PCS - \phi$ ітохелатинсинтаза

Рі – неорганічний фосфат

PMSF – фенілметансульфонілфторид

**ROOH** – алкілгідропероксид

ROS – реакційні сполуки кисню

 $\mathbf{R}\mathbf{X}$  – ксенобіотик

SAM, AdoMet – S-аденозилметіонін

**SDS** – додецилсульфатнатрію

SiR – сульфітредуктаза

**SNP** – натрійнітропрусид

SUMT – S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилаза

*t*-BOOH – терт-бутил гідропероксид

ТР – тетрапірол

Trx<sub>red</sub>, Trx<sub>ox</sub> – тіоредоксин відновлений та окиснений, відповідно

TS – шлях транссульфурилювання

Ubp – деубіквітинуючий фермент

UMT – уропорфіриноген метилтрансферазний мотив

Хи5Р – ксилулозо 5-фосфат

#### ВСТУП

Актуальність теми. Глутатіон (GSH) є основним компонентом загальної стресової відповіді майже у всіх живих організмів, зокрема і людини [1]. На практиці GSH широко застосовується v меличній косметичній та промисловості, а також використовується як харчова добавка [2, 3]. Метаболізм GSH та його регуляція добре досліджені на моделі пекарських дріжджів Saccharomyces cerevisiae [4, 5], тоді як дані процеси майже не вивчені у метилотрофних дріжджів, здатних засвоювати токсичний метанол як єдине джерело вуглецю та енергії. Зокрема, у метилотрофних дріжджів Hansenula polymorpha (сучасна таксономічна назва – Ogataea polymorpha) клоновано лише GSH2. кодує перший фермент біосинтезу GSH. ген ШО  $\gamma$ глутамілцистеїнсинтетазу (уGCS) [6]. Дослідження метаболізму GSH, його регуляції, а також участі глутатіонової системи у захисті від стресу у дріжджів *H. polymorpha* має важливе фундаментальне та прикладне значення. Це зумовлено як безпосередньою участю GSH у процесах детоксикації токсичного інтермедіату метаболізму метанолу, формальдегіду [7, 8], так і рядом унікальних властивостей даного виду дріжджів, зокрема, природно високим рівнем внутрішньоклітинного глутатіону та підвищеною толерантністю до різного роду стресів, спричинених важкими металами, ксенобіотиками, оксидативним стресом, теплом, і т.д., що робить їх привабливими у біотехнологічному аспекті [9]. Відтак, не виключено, що метилотрофним дріжджам *H. polymorpha* можуть бути притаманні певні особливості регуляції біосинтезу GSH або участі GSH-залежних метаболічних систем в забезпеченні резистентності до різних видів стресу, відмінні від тих, які показані для інших видів дріжджів. Доступність інформації про послідовність геному Н. polymorpha та добре розроблені молекулярно-генетичні методи відкривають можливість для отримання всебічної інформації про функцію генів та їх регуляцію. На даний час регуляція біосинтезу GSH, процеси деградації GSH, шляхи детоксикації кон'югатів GSH з електрофільними ксенобіотиками та GSH-залежні механізми детоксикації іонів кадмію залишаються нез'ясованими у метилотрофних дріжджів *Н. роlymorpha*. Оскільки, загально прийнято, що перший етап є лімітуючим в біосинтезі GSH, важливо було ідентифікувати та дослідити функцію генів, залучених у синтез попередника біосинтезу GSH, цистеїну, початкових етапах метаболізму GSH і/або його кон'югатів у дріжджів *Н. polymorpha*. Ці дослідження також необхідні для подальшого вивчення особливостей гомеостазу глутатіону у даного виду дріжджів та для модифікації шляхів метаболізму глутатіону з метою отримання потенційних продуцентів цього важливого метаболіту у майбутньому на базі дріжджів *H. polymorpha*, які є одним з перспективних господарів для продукції рекомбінантних білків на промисловому рівні [10]. Дослідження механізмів GSH-залежної адаптації до різних видів стресу викликає особливий інтерес у зв'язку із збільшенням негативного тиску навколишнього середовища і є важливим для розвитку мікробіологічної промисловості, а також має еволюційне, екологічне та біотехнологічне значення. Зокрема, в нашій державі гострою проблемою є накопичення токсичних важких металів у промислових стічних водах, що в подальшому призводить до забруднення довкілля. Висвітлення молекулярних механізмів детоксикації одного з найнебезпечніших важких металів, кадмію, дріжджами *H. polymorpha* може послужити основою для подальшого використання клітин даного виду дріжджів для біоремедіації забруднених місць.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами «Молекулярні механізми регуляції гомеостазу пероксисом, біосинтезу флавінів і гетерологічних білків та захисту від стресу у неконвенційних дріжджів» (№ держреєстрації 0102V000613, Шифр теми 2.2.9.13, 2002-2005 рр.), «Молекулярні механізми клітинної сигналізації гомеостазу пероксисом, синтезу флавінів, етанолу та глутатіону у дріжджів» (№ держреєстрації 0106U002600, Шифр теми 2.28.2.6., 2006-2010 рр.), білатерального українсько-корейського проекту за темою «Створення рекомбінантних дріжджових штамів для детоксикації важких металів у сточних водах та їх використання в якості біосенсорів» (№ держреєстрації 0103U002338, 01.2003-12.2003 рр.), а також міжнародних проектів INTAS № 2002-0583 «Генетичний аналіз різних шляхів у *H. polymorpha* через мутації і функціональний скрінінг генів, залучених у метаболізмі метанолу, гомеостазі пероксисом, глікозилюванні білків, цілісності клітинної стінки і секреції» (2002-2004 рр.) та Collaborative NATO Linkage Grant LST.CLG 979872 «Генетичний контроль метаболізму глутатіону у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*» (2004-2005 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищеназваних досліджень.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи була ідентифікація і/або з'ясування функції генів, залучених в початкові етапи метаболізму глутатіону та його попередника, цистеїну, у захисті від електрофільного та кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, шляхом отримання та аналізу рекомбінантних штамів цих дріжджів. Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. Ідентифікувати ген, що комплементує GSH-залежний фенотип мутанта *gsh1* дріжджів *H. polymorpha*.

2. Сконструювати та охарактеризувати штами з делеціями генів *GSH1/MET1* та *GSH2 H. polymorpha*, що кодують S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген (III) трансметилазу (SUMT) та γGCS, відповідно. Дослідити активність γGCS в залежності від джерела сірки та наявності білка HpGsh1p/Met1p.

3. Сконструювати рекомбінантний штам дріжджів *H. polymorpha* з делецією гена *GGT1*, що кодує γ-глутамілтрансферазу (γGT). З'ясувати роль γGT у деградації глутатіону як екзогенного джерела сірки в *H. polymorpha* та дослідити регуляцію активності γGT джерелами азоту та сірки.

4. З'ясувати чи γGT залучена у процесах детоксикації електрофільних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*.

5. Вивчити особливості відповіді метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* на кадмієвий стрес (чутливість, здатність утворювати SH-вмісні хелатори та акумулювати іони кадмію).

6. Сконструювати рекомбінантний штам *H. polymorpha*, що містить репортерну касету prGSH2-AOX та дослідити регуляцію транскрипції гена *GSH2* у відповідь на дію іонів кадмію.

**Об'єкт дослідження.** Об'єктом дослідження даної роботи є початкові етапи метаболізму глутатіону та механізми захисту від електрофільного і кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

**Предмет дослідження.** Предметом дослідження даної роботи є гени та відповідні білкові продукти, залучені у початкових етапах метаболізму глутатіону, детоксикації електрофільних сполук і кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Методи дослідження. Для конструювання рекомбінантних векторів, отримання та аналізу рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* використовували наступні методи: молекулярно-біологічні (ферментативний гідроліз ДНК, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюція фрагментів ДНК з агарозного гелю. обробка 3'/5'-однониткових виступів лінеаризованого або фрагмента ЛНК полімеразами нуклеазами, дефосфорилювання лінеаризованого вектора, лігування вектора із вставкою, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електропорація, виділення і очистка плазмідної та хромосомної ДНК), генетичні (схрещування), біохімічні (визначення активності ферментів, рівня клітинного глутатіону, вмісту рибофлавіну та заліза, атомний абсорбційний аналіз, високоефективна рідинна хроматографія високого тиску (ВЕРХ), гель-хроматографія, флуоресцентна мікроскопія, спектроскопія), мікробіологічні (дослідження ростових характеристик, чутливості до різних ін.). У роботі також широко використовували методи факторів та комп'ютерного аналізу та комп'ютерні бази даних відомих генів та білків.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше ідентифіковано ген GSH1/MET1 дріжджів Н. polymorpha, який комплементує ауксотрофність за цистеїном та глутатіоном мутанта gsh1 H. polymorpha і є гомологом гена MET1 S. cerevisiae, що кодує SUMT. Вперше з'ясовано, що ген GGT1 H. polymorpha є гомологом гена CIS2 S. cerevisiae, що підтверджується відсутністю відповідної активності уGT у мутантів з делецією гена GGT1. Вперше у дріжджів показано, що у GT бере участь у деградації кон'югатів глутатіону з електрофільними ксенобіотиками, що підтверджується дефектом відповідних мутантів Н. polymorpha i S. cerevisiae у зникненні флуоресцентного вакуолярного комплексу GSH з ксенобіотиком біманом та відсутністю ймовірних кінцевих продуктів деградації кон'югатів GSH-ксенобіотик, цистеїн-ксенобіотик і/або Nацетилцистеїн-ксенобіотик, у зовнішньоклітинному середовищі цих мутантів. Вперше у *H. polymorpha* з'ясовано, що утилізація GSH, як екзогенного джерела сірки, не залежить від  $\gamma$ GT, свідченням чого є здатність мутанта  $\Delta ggt1$ утилізувати екзогенний GSH, як єдине джерело сірки. Вперше у *H. polymorpha* показано, що активність у GT регулюється джерелами азоту та сірки, свідченням чого є зниження активності уGT за використання іонів амонію (у 4,3 раза) та зростання – за умов голодування за азотом (у 1,6 раза, порівнюючи в обох випадках з GSH і глутаматом як єдиним джерелом азоту) і сіркою (у 4,8-5,2 раза, порівняно з іонами сульфату та GSH як єдиним джерелом сірки). Водночас, білок HpGsh1p/Met1p та такі джерела сірки як іони сульфату, цистеїн чи GSH не впливають на активність уGCS, про що свідчить неушкоджена активність цього фермента у точкового gsh1 та делеційного gsh1/met1 мутантів *H. polymorpha* та лише незначні коливання значень γGCS у штама дикого типу на вищезгаданих джерелах сірки. Вперше показано, що дріжджі *H. polymorpha* не синтезують фітохелатини у відповідь на дію іонів кадмію, на відміну від Schizosaccharomyces pombe та Candida glabrata. Встановлено, що поглинання іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* є енергозалежним процесом, що підтверджується зниженням акумуляції іонів кадмію у 2,4 раза за присутності азиду натрію.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлено, що генетична лінія DL-1 дріжджів *Н. роlymorpha* має найкращий вихідний

потенціал для продукції глутатіону і може бути використана для створення на її основі рекомбінантних штамів, здатних до надсинтезу глутатіону. Дослідження генетичного контролю та регуляції початкових етапів метаболізму глутатіону у дріжджів *H. polymorpha* послужить першим кроком на шляху до отримання надпродуцентів глутатіону на базі цих дріжджів, які на даний час широко використовуються для продукції гетерологічних білків і розглядаються як природно багате джерело глутатіону. Штами *H. polymorpha* з підвищеною сорбцією іонів кадмію можуть в перспективі бути використані як потенційні кандидати для мікробіологічної ремедіації стоків, забруднених сполуками кадмію. Дослідження детоксикації електрофільних ксенобіотиків у дріжджів можуть бути корисними для вивчення GSH-залежної множинної резистентності до ліків у деяких пухлинах ссавців та детоксикації гербіцидів у рослин.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто проаналізовано наукову літературу за темою дослідження. Дисертантом, спільно з науковим керівником, розроблено програму проведення досліджень та підібрано методи розв'язання поставлених завдань. Практично вся експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводилися спільно з іншими співробітниками відділу молекулярної генетики і біотехнології (Інститут біології клітини, м. Львів, Україна), а також з докт. Ціммерманном М. (Інститут мікробіології та генетики IV університету RWTH-Аахен, м. Аахен, Німеччина), та у співпраці із проф. Канг Г.А. та аспірантом Сонг М. (Корейський інститут біологічних наук і біотехнології, м. Даеджон, Корея), проф. Пеннінксом М. та докт. Джіготом Д. (Вільний університет Брюсселя, м. Брюссель, Бельгія). Результати досліджень опубліковано у спільних друкованих працях. Аналіз та обговорення результатів досліджень, а також підготовку публікацій за темою дослідження проведено разом із співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені у вигляді тез усних та стендових доповідей на наступних наукових конференціях: XXI Міжнародному спеціалізованому симпозіумі по дріжджах ISSY «Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Nonconventional Yeasts (NCY)» (Львів, Україна, 2001), Науково-практичній конференції Біофорум-ІІ (Лодзь, Польща, 2001), 9-му Міжнародному симпозіумі по генетиці промислових мікроорганізмів (Генджоу, Корея, 2002), 1-му FEMS конгресі європейських мікробіологів (Любляна, Словенія, 2003), XXI-ій Міжнародній конференції по генетиці і молекулярній біології дріжджів (Гьотеборг, Швеція, 2003), 1-му Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, Україна, 2004), Міжнародному симпозіумі корейського товариства мікробіології і біотехнології (Даегу, Корея, 2004), Міжнародній конференції «Генетика в России и мире» (Москва, Росія, 2006), Міжнародній науково-технічній конференції «Сучасні проблеми фізики, хімії та біології. ФізХімБіо-2012» (Севастополь, Україна, 2012), 26-ій Міжнародній конференції по генетиці і молекулярній біології дріжджів (Франкфурт на Майні, Німеччина, 2013) та щорічних звітних конференціях молодих вчених Інституту біології клітини НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, підсумків, висновків, списку використаних джерел, що охоплює 266 найменувань, та додатку. Роботу викладено на 184 сторінках і проілюстровано 49 рисунками та 14 таблицями.

#### **РОЗДІЛ 1**

#### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Властивості та функції глутатіону в клітині

Глутатіон був відкритий Rey-Pahlade в етанольних екстрактах пекарських дріжджів у 1888 році, як речовина, яка має здатність відновлювати елементарну сірку, вивільняючи гідроген сульфід, і отримав назву "філотіон". У 1921 році англійський біохімік Hopkins вперше ізолював цей компонент і перейменував у глутатіон після встановлення його молекулярної структури [11]. В хімічному відношенні GSH виявився тіольним трипептидом з незвичайним γ-глутамільним зв'язком (L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин) (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Хімічна формула глутатіону

GSH виявлений майже у всіх живих клітинах від бактерій [12], грибів, рослин [13] і до ссавців [1]. Концентрація GSH в клітині коливається в межах 1-10 мМ [1], тоді як інші окисно-відновні пари присутні в мікромолярних концентраціях [14]. GSH відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті, метаболізмі поживних речовин, регуляції клітинних подій (експресії генів, синтезі ДНК та білка, проліферації клітин та апоптозі, сигнальній трансдукції, продукції цитокінів, імунній відповіді, глутатіонуванні білків, процесах фолдингу та посттрансляційної модифікації білків), а також у підтриманні структури мітохондрій та цілісності мембран [15, 16]. Деякі компоненти GSHзалежної антиоксидантної системи підтримують резистентність до теплового шоку і осмотичного стресу. GSH також бере участь у детоксикації важких металів, шляхом хелатування і секвестрування іонів металів і/або елімінування продукованих ними реакційних сполук кисню (ROS). GSH містить шість потенційних координуючих сайтів для зв'язування металів: SH-групу залишку цистеїну, аміногрупу залишку глутамату, карбоксильні групи залишків гліцину та глутамату і два пептидні зв'язки. З них, SH-група має найбільшу спорідненість до металів. Зв'язування металу з SH-групою в GSH може стабілізуватися координацією з одним з інших потенційних центрів зв'язування в трипептиді. Окрім цього, GSH бере участь у дозріванні цитоплазматичних Fe/S білків [17], регулюванні 20S протеосоми [18] в S. cerevisiae, і стабілізації дріжджової вакуолярної АТФ-ази [19]. GSH також виступає як цистеїн запасаюча сполука та за умов голодування служить джерелом азоту і сірки [20]. Своєю важливістю в клітині GSH завдячує двом важливим хімічним властивостям, таким як низький окисно-відновний потенціал (Е<sup>/</sup><sub>0</sub>= -240 mV для тіол-дисульфідного обміну) [21] і стабільність, яка забезпечується незвичайним у-глутамільним пептидним зв'язком, який зумовлює підвищену резистентність до протеолітичної деградації, даючи можливість трипептиду існувати у високих концентраціях в клітині [22]. Сильні нуклеофільні властивості тіольного залишку GSH дозволяють йому кон'югувати з електрофільними компонентами, зокрема з ксенобіотиками [23]. Глутатіон присутній у відновленій формі (GSH) і двох окиснених формах: глутатіондисульфід (GSSG) і змішаний дисульфід глутатіону з тіолами білків (GS-R) [1]. За нормальних фізіологічних умов в клітині співвідношення GSH/GSSG >20 [24]. Рівні GSH і співвідношення GSH/GSSG повинні постійно підтримуватись в клітині. На додаток, до біосинтезу, деградації і використання в різних процесах, рівні GSH змінюються шляхом їх компартменталізації і відтоку з клітини [25]. За нормальних фізіологічних умов більшість клітинного глутатіону зосереджено в цитозолі. Однак, значна його частина також знаходиться у вакуолі та дещо менше у мітохондріях, ядерному матриксі, пероксисомах та ендоплазматичному ретикулумі [25-27]. Окрім біосинтезу GSH, який відбувається в цитоплазмі [1], GSH також може транспортуватися із зовнішньоклітинного середовища [28]. Ці багаточисельні процеси поєднуються для підтримання гомеостазу GSH в клітині. Вичерпування внутрішньоклітинного GSH може бути наслідком підвищеної деградації, кон'югації, окиснення, відтоку/екскреції і/або зниженого

синтезу. У клітинах ссавців неправильний гомеостаз глутатіону, зокрема вичерпування GSH, відбувається після впливу різноманітних хімічних речовин/ліків і призводить до оксидативного стресу, який відіграє ключову роль в старінні та патогенезі багатьох хвороб, включаючи плямовидну дегенерацію очей, дитячу пелагру, епілепсію, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, муковісцидоз, хвороби печінки, серповидноклітинну анемію, HIV, AIDS, рак, інфаркт і діабет [15]. Пошкодження біосинтезу GSH у *S. cerevisiae* призводить до зниженої толерантності до широкого спектру стресових умов [29-31]. Делеція гена, кодуючого перший фермент біосинтезу GSH,  $\gamma$ GCS, у *S. cerevisiae* і *S. pombe*, призводить до нездатності до росту [29, 32], тоді як аналогічне пошкодження в мишей – до летальності ще в ембріональному періоді [33]. Водночас надпродукція  $\gamma$ GCS збільшує тривалість життя *Drosophila melanogaster* [34]. Однак, підвищені рівні клітинного GSH (>10 мМ) можуть призводити до глутатіонової токсичності, принаймні у дріжджів [35].

#### 1.2. Генетичний контроль метаболізму глутатіону

**1.2.1. Біосинтез слутатіону.** Біосинтез GSH в клітині відбувається шляхом нерибосомного синтезу, внаслідок послідовної дії двох цитозольних ферментів, які потребують ATP та  $Mg^{2+}$  для ферментативної активності. Перша реакція біосинтезу глутатіону каталізується γGCS (КФ 6.3.2.2) і полягає в конденсації L-глутамату з L-цистеїном з утворенням дипептиду γGlu-Cys. В другій реакції, що каталізується глутатіонсинтетазою (GS; КФ 6.3.2.3), відбувається лігування γGlu-Cys з L-гліцином з утворенням GSH. ADP та Pi є побічними продуктами в обох реакціях біосинтезу GSH [16]. Гени, що кодують γGCS і GS, ідентифіковано у дріжджів, бактерій, найпростіших, вищих рослин, щура, миші та людини [16, 36]. γGCS ссавців є гетеродимером, який складається з каталітично активної важкої субодиниці (GCLC, 73 кДа) і легкої регуляторної субодиниці (GCLM, 31 кДа) [26], які кодуються генами *GSH1* та *GSH0*, відповідно, і дисоціюють за умов відновлення. GCLC містить всі

субстрат зв'язуючі сайти і всі суттєві каталітичні залишки, тоді як GCLM модулює афінність GCLC до субстратів та інгібіторів [15]. Ген, що кодує GCLM, клоновано лише для щура, миші та людини. γGCS дріжджів та бактерій відрізняється від ферменту ссавців і виявляє подібність до уGCS Trypanosoma, яка містить лише GCLC. γGCS Escherichia coli являє собою поліпептид розміром 518 а.з. з М.м. 58 кДа, що кодується геном gshl [37]. уGCS S. cerevisiae (78 кДа) є поліпептидом розміром 678 а.з., що кодується геном GSH1, картованим на X хромосомі дріжджів [38]. уGCS *H. polymorpha* містить 650 а.з. і кодується геном GSH2 [6]. На відміну від генів GSH1 S. cerevisiae та GSH2 H. polymorpha, які є безінтронними, ген GCS1 S. pombe, що кодує γGCS, містить два інтрони розташовані в 5'-кінцевій ділянці гена, розміром 251 п.н. та 138 п.н. завдовжки. Кодуючі ділянки гена транслюються у білок (623 а.з.) з М.м. 71,3 кДа [39]. В більшості еукаріотичних організмів, включаючи S. cerevisiae, S. pombe, Arabidopsis thaliana, Homo sapiens i Rattus norvegicus GS є гомодимером (104-112 кДа), що складається з двох ідентичних субодиниць 52-56 кДа [40]. Стабільність димеру очевидно залежить лише від нековалентних взаємодій, оскільки жодних дисульфідних зв'язків між субодиницями не виявлено [41]. Очищений фермент GS E. coli є тетрамером, з М.м. 152 кДа, який складається з чотирьох ідентичних субодиниць (38 кДа), довжина поліпептиду – 316 а.з. [42].

Варто відмітити, що у грам-позитивних бактерій біосинтез GSH каталізується єдиним біфункціональним ферментом γглутамілцистеїнсинтетаза-глутатіонсинтетаза. N-кінцева ділянка (518 а.з.) цього білка виявляє гомологію до γGCS з *E. coli*, тоді як C-кінцевий ймовірний GS домен (решта 202 а.з.) не виявляє суттєвої подібності до відомих GS [43, 44].

**1.2.2.** Регуляція біосинтезу глутатіону у дріжджів. Лімітуючою стадією в біосинтезі GSH є перша стадія. Біосинтез GSH в клітині регулюється на різних рівнях, включаючи транскрипційну регуляцію гена, що кодує γGCS, пострансляційну регуляцію γGCS та доступність субстратів реакції, насамперед цистеїну [3]. Базуючись на експериментах *in vitro* загально прийнято, що біосинтез глутатіону у дріжджів *S. cerevisiae* регулюється кінцевим метаболітом

шляху, GSH в "нестресових" клітинах, завдяки транскрипційному фактору Met4, як на рівні експресії гена GSH1, так і на рівні активності ферменту  $\gamma GCS$ [45]. Транскрипційна регуляція гена GSH1 у відповідь на виснаження за GSH потребує корегульованої дії транскрипційних факторів Yap1 і Met4 [46]. Високі концентрації метіоніну спричинюють інактивацію Met4, що перешкоджає Yap1-регульованій індукції експресії GSH1, в якій білок Cbf1 ймовірно виконує функцію репресора GSH1 [46]. За стресових умов експресія гена GSH1 S. *cerevisiae* регулюється окисниками ( $H_2O_2$ , терт-бутил гідропероксид (*t*-BOOH) і менадіон), важкими металами (кадмій та ртуть) і дією теплового шоку на рівні транскрипції у Уар1-залежний спосіб [47, 48]. Різке пониження температури в ростовому середовищі також індукує транскрипцію гена GSH1 S. cerevisiae, але у Yap1-незалежний спосіб [49]. Сильна індукція транскрипції гена GSH1, яка спостерігається за обробки кадмієм [50-53] залежить від транскрипційних факторів Met4 та Met31/Met32 [51]. Експресія гена GCS1 S. pombe індукується оксидативним і нітрозилюючим стресами та глутатіон-виснажуючими агентами [54]. Транскрипційні фактори Рар1 і Atf1 відповідають за індукцію стресспоріднених генів у S. pombe [55]. Рар1 залучений в індукцію гена GCS1 менадіоном і L-бутіонін-S-сульфоксиміном (BSO), але не NO-генеруючим натрійнітропрусидом (SNP) та низькою концентрацією глюкози (0,4%) [56]. Варто зазначити, що дія кадмію та ртуті призводить до незначних змін в експресії гена GCS1 S. pombe, тоді як алюміній сильно індукує транскрипцію даного гена [54]. Експресія гена GSH2 S. cerevisiae, що кодує GS, індукується у відповідь на оксидативний стрес у Уар1-залежний спосіб [48].

Посттрансляційна регуляція γGCS полягає у зворотньому інгібуванні ферменту GSH. Дане інгібування є неалостеричним, оскільки GSH зв'язується радше з глутамат- та цистеїнзв'язуючими сайтами, а не з окремим сайтом ферменту. Зв'язування GSH з γGCS конкурує з L-глутаматом і залежить від цистеїніл тіольної групи. Експерименти *in vitro* з ферментом ссавців показали, що K<sub>i</sub> для зворотнього інгібування GCLC GSH становить 2 мM. Кінетичні дослідження з γGCS *Trypanosoma* показали, що фермент, який складається з однієї субодиниці, також підлягає зворотній регуляції [57]. Однак, нещодавно показано, що подвоєння вмісту клітинного GSH у мутантів  $\Delta dug2$  і  $\Delta dug3$  S. *cerevisiae*, з пошкодженою деградацією GSH, не мало суттєвого ефекту на швидкість синтезу GSH *in vivo* [58].

Показано, що серед інших субстратів реакції цистеїн є лімітуючим для біосинтезу GSH. Зростання внутрішньоклітинних рівнів цистеїну підвищує синтез GSH, як результат зростання насиченості ферменту, який сприяє видаленню надлишку цистеїну, запобігаючи його токсичності [3]. Підвищені внутрішньоклітинні рівні глутамату також можуть стимулювати синтез GSH, очевидно шляхом подолання неалостеричного зворотнього інгібування GSH, радше ніж шляхом безпосереднього зростання доступності субстрату [41].

1.2.3. Деградація глутатіону в дріжджів: у-глутамілтрансфераза та її функції у прокаріот та еукаріот. У дріжджів описано два шляхи деградації GSH: γGT і Dug шлях. У γGT шляху деградація GSH відбувається за участю γGT (КФ 2.3.2.2.) і L-Cys-Gly дипептидази (КФ 3.4.13.6.). γGT виділено з різних організмів, включаючи актиноміцети (Mycobacterium smegmatis) [11], дріжджі S. cerevisiae [59], S. pombe [60], Candida albicans, плісеневі гриби (Tricholoma shimeji, Aspergillus oryzae i Neurospora crassa) [61] і найпростіші (Trypanosoma *cruzi*). Очищена мікробна уGT, як і фермент ссавців, може каталізувати три типи реакцій [11]: (1) гідроліз, в процесі якого у-глутамільна група переноситься на молекулу води, (2) транспептидацію, у якій у-глутамільна група переноситься на амінокислоту чи пептидний акцептор і (3) автотранспептидацію, в якій у-глутамільна група переноситься на GSH. Фермент має різну локалізацію у різних організмів. У Е. coli і Proteus mirabilis він знаходиться у клітинній стінці і/чи периплазматичному просторі, у А. *thaliana* – зв'язаний з вакуолярною (GGT4) і цитоплазматичною (GGT1 і GGT2) мембранами, у *T. cruzi* і *M. smegmatis* – представлений цитозольними формами, а в А. oryzae виявлено навіть секреторну форму ферменту [11, 62, 63]. У дріжджів, уGT переважно зв'язана з вакуолярними мембранами [59], хоча повідомлялось, що фермент був виявлений у плазмалемній фракції іншими

авторами [64]. S. cerevisiae має єдиний фермент уGT, який являє собою поліпептид розміром 660 а.з. з М.м. ~90 кДа (М.м. неглікозильованої форми – 73,2 кДа), і кодується геном ECM38/CIS2/YLL299w, розміщеним на XII-й хромосомі [59]. У S. pombe виявлено 3 гени, що кодують уGT. Обидва гени GGTI і GGTII клоновані та охарактеризовані [65, 66]. Ген GGTI кодує поліпептид 630 а.з. з ймовірною М.м. 68,7 кДа, який виявляє 43% ідентичності до поліпептиду (611 а.з., ймовірна М.м. 67,2 кДа), що кодується геном GGTII. Гени GGTII і GGTIII кодують білок однакової амінокислотної послідовності, хоча нуклеотидні послідовності в обох генах відмінні, що може передбачати відмінну регуляцію [66]. уGT S. cerevisiae за голодування за азотом відіграє роль у вакуолярному транспорті GSH, шляхом підвищення максимальної швидкості поглинання (V<sup>арр</sup>) втричі, і в метаболізмі вакуолярного GSH [59]. Клітини S. cerevisiae, піддані голодуванню за азотом, запасають близько 90% GSH у центральній вакуолі, завдяки дії Ycf1 та вакуолярної (H<sup>+</sup>)ATP-азної спряженої системи, які забезпечують 70% і 30% транспорту GSH у вакуолю, відповідно [59]. GSH у вакуолі гідролізує до вільних амінокислот за участю уGT i L-Cys-Gly дипептидази, ймовірно виступаючи альтернативним джерелом азоту та сірки під час голодування [27, 67]. Голодування за азотом призводить і до тимчасової стимуляції біосинтезу GSH у S. cerevisiae та S. pombe [27, 68].

Деградація GSH, як екзогенного джерела сірки в *S. cerevisiae* не залежить від  $\gamma$ GT, і відбувається за участю цитоплазматичного комплексу, який включає білки Dug1p, Dug2p і Dug3p [14]. Dug2p і Dug3p необхідні для гідролізу  $\gamma$ глутамільного зв'язку між глутаматом та Cys-Gly, а Dug1p – для гідролізу Cys-Gly [69]. Мутанти з відсутністю хоча б одного з цих білків не здатні утилізувати GSH, як єдине джерело сірки [14]. Деградація GSH майже повністю заблокована в мутантів *Adug2* та *Adug3* і лише частково пошкоджена у *Adug1*. Очевидно інші пептидази можуть частково компенсувати відсутність Dug1p [58]. Голодування за сіркою та ріст на середовищі з GSH, як єдиним джерелом сірки, сильно активують деградацію GSH, що корелює з підвищенням Dug активності та транскрипційною активацією генів *DUG2* і *DUG3*. За умов виснаження за сіркою ця регуляція відбувається у Met4-залежний спосіб [58]. Dug шлях також критичний для утилізації екзогенного GSH у *C. albicans* [70].

уGT виконує чисельні функції в живих організмах. уGT S. cerevisiae та білки GGTI і GGTII S. pombe залучені у відповідь на різні види стресу в клітині. Зокрема, мутант  $\Delta cis2$  S. cerevisiae більш чутливий до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, метилгліоксалю і теплового шоку [71]. У С. albicans зростання активності уGT зумовлює швидке зниження внутрішньоклітинного GSH під час переходу з дріжджової до міцеліальної форми [72]. У Bacillus subtilis уGT діє як потужна екзо-углутамілгідролаза, яка бере участь у деградації капсулярного полі (углутамату), забезпечуючи клітини глутаматом у стаціонарній фазі [73], та в утилізації GSH, як єдиного джерела сірки [74]. У Helicobacter pylori GGT є вірулентним та колонієутворюючим фактором і відіграє важливу роль в його рості *in vitro* [75]. У рослин та ссавців уGT бере участь у детоксикації ксенобіотиків [62, 76-79]. У ссавців у GT також залучена у катаболізмі GSH, який відбувається виключно за межами клітини [80], та необхідна для реадсорбції GSH з ниркового глумеролярного фільтрату [81]. Дефіцит уGT спричинює глутатіонурію, втрату значних кількостей GSH з сечею, що призводить до системного дефіциту попередників GSH і обмеженого синтезу GSH в печінці. Делеційні миші з дефектом уGT характеризуються летаргією, суворим порушенням росту, вкороченим періодом життя, неплідністю та порушенням неврологічної функції [81]. Визначення активності уGT також використовують як маркер для ідентифікації Neisseria meningitidis [82] та в діагностуванні багатьох хвороб людини, оскільки його активність зростає при серцевосудинних хворобах, цукровому діабеті, раку і хворобах печінки.

**1.2.4.** Регуляція  $\gamma$ -глутамілтрансферази в дріжджів. У дріжджів *S.* сегеvisiae виявлено сильне зростання активності  $\gamma$ GT за умов голодування за сіркою та азотом [67, 71]. Активність  $\gamma$ GT також регулюється в залежності від природи джерела азоту. Вона є високою за вирощування на сечовині, L-глутаматі або проліні, як єдиному джерелі азоту, і низькою – за вирощування на NH<sub>4</sub><sup>+</sup> чи глутаміні. Сильне зростання активності  $\gamma$ GT під час голодування за

азотом та за вирощування на сечовині, L-глутаматі або проліні корелює з індукцією експресії гена *CIS2* і залежить від транскрипційних факторів позитивного типу дії Gln3 і Nill [71]. Водночас білок Gzf3 діє як негативний регулятор *CIS2* експресії, контрольованої джерелом азоту. Присутність NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, глутаміну або обох компонентів призводить до сильної репресії *CIS2*, завдяки механізму, який залучає Gln3-зв'язуючий білок Ure2/GdhCR. TOR сигнальний шлях також залучений у регуляцію експресії *CIS2*, очевидно завдяки зв'язуванню TOR білків з Gln3 та Nill та подальшим інгібуванням їх активності. У *S. pombe* голодування за азотом також призводить до зростання активності γGT та індукції експресії обох генів *GGTI* і *GGTII* у Pap1незалежний і Pap1-залежний спосіб, відповідно [68]. Зростання активності GGT у *S. pombe* зумовлює посилену регенерацію і поглинання GSH [65, 66]. У *С. albicans* активність GGT під час диморфізму також регулюється джерелами вуглецю та азоту [83].

На відміну від гена *CIS2 S. cerevisiae*, експресія якого не регулюється кадмієм, етанолом,  $H_2O_2$ , диамідом, тепловим і осмотичним стресом [71], експресія генів *GGTI* і *GGTII S. pombe* регулюється джерелами вуглецю та факторами, що спричинюють оксидативний стрес [65]. Транскрипція гена *GGTI* індукується SNP і BSO у Pap1-залежний спосіб [65], тоді як експресія гена *GGTII* індукується SNP (у Pap1-залежний спосіб), діетилмалеатом і  $H_2O_2$  [66]. Індукція експресії гена *GGTII* неферментативними (гліцерол, ацетат та етанол) [65, 84] та гена *GGTII* ферментативними (низькі концентрації глюкози, лактоза і сахароза) джерелами вуглецю відбувається у Pap1-незалежний та Pap1-залежний спосіб, відповідно. Гліцерол також індукує транскрипцію гена *GGTII*, але інші неферментативні джерела вуглецю, такі як ацетат та етанол – ні [85].

#### 1.3. Шляхи метаболізму сірки та їх регуляція в мікроорганізмів

**1.3.1.** Метаболічні шляхи асиміляції сірки і біосинтезу сірковмісних біомолекул в еукаріотичних мікроорганізмів. Неорганічний сульфат є

важливим джерелом сірки. Шлях асиміляції сульфату добре вивчений у нитчастих грибів Aspergillus nidulans, N. crassa та дріжджів S. cerevisiae і S. pombe [86, 87]. Біохімічні етапи від поглинання сульфату до асиміляції організмів. неорганічний консервативні цих Спершу, сульфат В котранспортується в клітину з трьома Н<sup>+</sup> за участю енергозалежного процесу, каталізованого специфічними плазматичними пермеазами Sul1p i Sul2p [88], і тоді активується аденілюванням до аденозин 5'-фосфосульфату (APS) в реакції, каталізованій АТР-сульфурилазою (КФ 2.7.7.4) (рис. 1.2). Наступним етапом є фосфорилювання APS з утворенням З'-фосфоаденозин-5'-АТР-залежне фосфосульфату (PAPS) за участю APS-кінази (КФ 2.7.1.25). Далі PAPSредуктаза (КФ 1.8.4.8) реагує з відновленим тіоредоксином і генерує вільний сульфіт. Наступним етапом є відновлення сульфіту до сульфіду за окиснення ЗNADPH, що каталізується сульфітредуктазою (SiR, КФ 1.8.1.2). Далі в залежності від організму сульфід може конденсуватися з О-ацетилсерином, в Оацетилсериновому (OAS) шляху, за участю цистеїнсинтази (КФ 4.2.99.8.) або з О-ацетилгомосерином, в шляху транссульфурилювання (TS), за участю гомоцистеїнсинтази (КФ 4.2.99.10), утворюючи цистеїн або гомоцистеїн, відповідно. Цистеїн може використовуватися для біосинтезу GSH або перетворюватися до гомоцистеїну з утворенням проміжної сполуки цистатіоніну у шляху прямого TS за участю послідовної дії цистатіонін у-синтази та цистатіонін β-ліази (КФ 4.4.1.8). Гомоцистеїн у шляху зворотнього TS може перетворюватися до цистатіоніну та цистеїну за участю цистатіонін β-синтази (КФ 4.2.1.22) та цистатіонін у-ліази (КФ 4.4.1.1.) або в метильному циклі до метіоніну і S-аденозилметіоніну (SAM) за участю гомоцистеїнметилтрансферази (КФ 2.1.1.10) та SAM-синтази (КФ 2.5.1.6), відповідно. SAM далі може метаболізувати S-аденозилгомоцистеїну, який участю S-ДО за аденозилгомоцистеїнази (КФ 3.3.1.1) перетворюється до гомоцистеїну, замикаючи метильний цикл (див. рис. 1.2). Гриби, такі як A. nidulans, N. crassa Yarrowia lipolytica i Cephalosporium acremonium [89], володіють [86], найбагатшим репертуаром варіантів метаболізму сірки і характеризуються



Рис. 1.2. Шлях асиміляції сульфату та синтезу сірковмісних сполук і глутатіону у дріжджів S. cerevisiae та S. pombe [90]. S-аденозилметіонін (AdoHys), (AdoMet). S-аденозилгомоцистеїн у-глутамілцистеїн  $(\gamma - EC)$ , тіоредоксин відновлений (Trx<sub>red</sub>) і окиснений (Trx<sub>ox</sub>). Гени SUL1 і SUL2 кодують пермеази Sul1p i Sul2p, відповідно, MET3 – АТР-сульфурилазу, MET14 – APSкіназу, MET16 – PAPS-редуктазу, MET5 і MET10 – сульфітредуктазу, MET17 – гомоцистеїнсинтазу, MET6 – гомоцистеїнметилтрансферазу, SAM1 і SAM2 – SAM-синтазу, CYS4 – цистатіонін  $\beta$ -синтазу, CYS3 – цистатіонін  $\gamma$ -ліазу, STR2 – STR3 MET2 цистатіонін у-синтазу, цистатіонін β-ліазу, гомосеринтрансацетилазу,  $GSH1 - \gamma GCS$ , GSH2 - глутатiонсинтетазу

наявністю як OAS, так і обох шляхів TS (прямого та зворотнього). Дріжджі *S. cerevisiae* характеризуються відсутністю OAS шляху та наявністю обох шляхів TS. Дріжджі *S. pombe* містять OAS шлях та прямий шлях TS. Наявність шляху зворотнього TS дає можливість організмам метаболізувати метіонін до цистеїну. Організми, які позбавлені реакцій зворотнього TS мають альтернативні шляхи перетворення метіоніну в цистеїн. Зокрема, дріжджі *S. pombe* можуть перетворювати сірку метіоніну до сульфату з наступним відновленням і

вбудовуванням у гомоцистеїн і/або цистеїн [91]. Деякі бактерії, найпростіші та рослини володіють метантіолдеградуючим шляхом [92-94], центральну роль в якому відіграє метіонін γ-ліаза (КФ 4.4.1.11), яка каталізує перетворення Lметіоніну до α-кетобутирату, метантіолу та амонію, і типово атакує інші такі гомоцистеїн сірковмісні амінокислоти, як та цистеїн. Потреби мікроорганізмів у сірці можуть також бути задоволені шляхом поглинання сірковмісних сполук з середовища. Метіонін транспортується в клітини дріжджів за участю однієї високо-афінної (Мир1) та двох низько-афінних (Мир2 та Мир3) пермеаз [95]. За транспорт цистеїну у S. cerevisiae відповідає один високо-афінний цистеїн-специфічний транспортер Yct1 [96] та принаймні вісім неспецифічних пермеаз (Gap1, Gnp1, Mup1, Bap2, Agp1) [97, 98]. У транспорті GSH у S. cerevisiae бере участь високо-афінна транспортна система GSH-P1, що кодується геном GSH11, та низько-афінна транспортна система GSH-P2. Однак, GSH, який поглинається системою GSH-P2, достатній для росту клітини лише за умов інтактного шляху асиміляції сульфату [99].

1.3.2. Біосинтез сірогему, простетичної групи сульфітредуктази, у мікроорганізмів. Ферментативне відновлення сульфіту ДО сульфіду € фундаментальними процесами в утилізації сірки, яке каталізується відмінними SiR, знайденими у бактерій, грибів і рослин [100, 101]. Дріжджова SiR характеризується  $\alpha_2\beta_2$  олігомерною структурою із загальною М.м. 604 кДа;  $\alpha$ (флавопротеїн – 116 кДа) і в (гемопротеїн – 167 кДа) субодиниці дріжджів S. cerevisiae кодуються генами MET10 і MET5, відповідно [88]. Функціональна SiR потребує біосинтезу специфічної гемової молекули, сірогему. Сірогем, простетична група, необхідна для шести-електронного відновлення сульфіту [102], є модифікованим тетрапіролом, який структурно пов'язаний з гемом, хлорофілом і кобаламіном [103]. Сірогем локалізований в активному центрі SiR і ковалентно зв'язаний з [4Fe-4S] кластером. Сірогем синтезується з уропорфіриногену III в чорити фермент-опосередковані етапи: два SAMзалежних трансметилювання в позиціях 2 і 7 (синтез прекоріну-2), дегідрогенування (синтез сірогідрохлорину), і феррохелатування [104, 105]

(рис. 1.3). У *E. coli* та *Salmonella typhimurium* ці реакції здійснюються мультифункціональним ферментом сірогемсинтазою (CysG), що кодується геном cysG [106]. У Е. coli цей білок містить два функціональні домени: GysG<sup>A</sup> (202-457 а.з.), що відповідає за трансметилазну активність, і СуѕG<sup>В</sup> (1-201 а.з.) – залучений в реакціях дегідрогенування і феррохелатування [104, 105]. У Bacillus megaterium трансформація уропорфіриногену III в сірогем кодується кластером з трьох генів sirABC, де SirA являє собою SUMT (КФ 2.1.1.107), SirC прекоррін-2 дегідрогеназу, а SirB – феррохелатазу [107]. У *S. cerevisiae* два гени залучені у трансформацію уропорфіриногену III до сірогему, MET1 і MET8 [108]. Ген МЕТІ вперше ідентифікований у скрінінгу мутантів з дефектом біосинтезу метіоніну [109]. Згодом було з'ясовано, що мутант metl характеризується пошкодженою активністю SiR та акумуляцією сульфіту в клітині [110]. Нездатність обох мутантів met1 і met8 відновлювати сульфіт комплементується геном cvsG S. typhimurium [108]. Ген MET1 кодує SUMT (593 а.з.) з М.м 66 кДа, яка каталізує перетворення уропорфіриногену III в прекорін-2. МЕТ8 кодує поліпептид 274 а.з. з М.м. 32 кДа, який каталізує дві реакції: NAD<sup>+</sup>-залежне дегідрогенування і феррохелатування, які відбуваються в єдиному біфункціональному активному центрі ферменту [111, 112].



Рис. 1.3. Схема біосинтезу сірогему у дріжджів S. cerevisiae [112]

SUMT очищено та біохімічно охарактеризовано з рослин та з декількох видів бактерій [113-115]. Більшість SUMT є гомодимерами, окрім ферменту з *B. megaterium*, який є мономером [114]. Деякі SUMT інгібуються субстратом уропорфіриногеном III і побічним продуктом реакції S-аденозилгомоцистеїном [114, 115]. Кристалічну структуру SUMT встановлено для ферменту з

*Pseudomonas denitrificans* [116]. Меt1р значно більший за бактерійні SUMT білки, які містять близько 280 а.з. та виявляє суттєву подібність до GysG<sup>A</sup> *E. coli* та SUMT *P. denitrificans* лише в його С-кінцевій ділянці (326-556 а.з.). Надпродукція *S. cerevisiae* Met1p, на відміну від інших SUMT, токсична для бактерій, що ймовірно опосередковано N-кінцевою ділянкою Met1p. Met8p виявляє суттєву подібність до NAD<sup>+</sup>-зв'язуючого сайту GysG, що включає перших 60 а.з. Met8p [112].

Регуляція 1.3.3. шляхів метаболізму сірки в еукаріотичних *мікроорганізмів.* Нитчасті гриби *A. nidulans* і *N. crassa* та дріжджі *S. cerevisiae* і S. pombe володіють складним регуляторним циклом, який контролює експресію генів, що кодують ферменти, залучені, як в здобуванні сірки з навколишнього середовища, так і в її асиміляції. Контроль структурних генів, що визначають сукупність ферментів, які каталізують реакції метаболізму сірки відбувається на транскрипційному рівні із залученням факторів позитивного і негативного типу дії. Білки Met4 S. cerevisiae, Zip1 S. pombe, METR A. nidulans i CYS3 N. crassa є транскрипційними активаторами, які належать до сім'ї bZIP білків. За умов лімітування за сіркою Met4 S. cerevisiae і METR A. nidulans позитивно регулюють експресію генів асиміляції сульфату, сірковмісних амінокислот та біосинтезу GSH, тоді як CYS3 N. crassa і Zip1 S. pombe в основному включають експресію внутрішнього набору генів, що кодують пермеази і ферменти, залучені у здобутті сірки з оточуючого середовища [86, 117, 118]. Для зв'язування з промоторами MET генів білок Met4 потребує різноманітної комбінації допоміжних факторів: Cbf1, Met28 або Met31/Met32 [88].

Відомо, що органічні джерела сірки більш енергетично вигідні для клітини, порівняно з неорганічними. Відтак, додавання сірковмісних амінокислот (цистеїну, метіоніну, гомоцистеїну) та GSH в різній мірі репресує асиміляцію сульфату у дріжджів *S. pombe*. При цьому цистеїн спричинює найсильнішу репресію [87]. У *S. cerevisiae* та *A. nidulans* за умов перенесення клітин у багате середовище або при додаванні до ростового середовища мілімолярних концентрацій метіоніну запускаються механізми репресії синтезу

ферментів необхідних для асиміляції сульфату та синтезу сірковмісних амінокислот [86]. Оскільки, дана репресія супроводжується транскрипційною репресією генів, що кодують дані ферменти (МЕТ гени), вважають, що дана регуляція в основному відбувається на транскрипційному рівні [88]. Однак, нещодавно було показано, що сильна репресія, яка спостерігається після додавання метіоніну, є опосередкована перетворенням метіоніну спочатку в SAM [88], а потім у цистеїн [119], і тоді підвищені внутрішньоклітинні концентрації цистеїну репресують шлях [119]. Метаболічні характеристики, зокрема, зростання пулу цистеїну при додаванні метіоніну, свідчать на користь даного твердження [120]. Метіонін-індукована репресія *MET* генів потребує присутності фактора негативного типу дії, F-бокс білка Met30 [121]. Met30 відрізняється від більшості F-бокс білків, тим що розпізнає свій субстрат (Met4) у конститутивний спосіб. Натомість регуляція підтримується на рівні експресії MET30, яка контролюється Met4 в ауторегуляторній петлі [122]. Активність Met4 контролюється принаймні двома різними шляхами за участю комплексу SCF<sup>Met30</sup>, в залежності від середовища в якому вирощені дріжджі. У середовищі, внутрішньоклітинних мінімальному коли пули сіркових метаболітів у дріжджів є низькими, додавання мілімолярних концентрацій метіоніну до ростового середовища призводить до SCF<sup>Met30</sup>-опосередкованого поліубіквітинування Met4 і наступної деградації 26S протеосомами [122, 123]. У багатому середовищі, Met4 олігоубіквітинований SCF<sup>Met30</sup>, але це не призводить до його деградації [123-126]. SCF (Skp1-Cullin-F-box) комплекси є консервативними багатосубодиничними убіквітин-лігазними ферментами, які складаються з декількох корових компонентів: адапторного білка Skp1p, скелетного білка Cdc53/cullin, F-бокс білка, білка Hrt1/Rbx1/Roc1 та убіквітинкон'югуючого ферменту Cdc34 [122, 127, 128]. У S. pombe активність білка Zip1 знаходиться під контролем фактора негативного типу дії, Pofl. На відміну від Met4, Zip1 за нормальних ростових умов не потрібний для засвоєння неорганічних джерел сірки і конститутивно деградує за участю убіквітинпротеосомного шляху через його взаємодію з SCF<sup>Pof1</sup> [118]. Подібно до S.

*cerevisiae* SCF<sup>Met30</sup>, *A. nidulans* SCF<sup>SCONB</sup> та *N. crassa* SCF<sup>SCON2</sup> комплекси негативно регулюють експресію генів асиміляції сірки, коли доступність органічних сірковмісних компонентів є висока, через інактивацію чи деградацію транскрипційних активаторів METR та CYS3, відповідно [117, 129].

### 1.4. Участь глутатіону у стресових відповідях

1.4.1. Роль глутатіону V метилотрофному метаболізмі. Метилотрофні дріжджі *H. polymorpha*, *Candida boidinii*, *Pichia pastoris* та види роду Kloeckera під час росту на метанолі, як джерелі вуглецю та енергії, цитоплазматичні органели пероксисоми, які містять утворюють алкогольоксидазу (АОХ; КФ 1.1.3.13), каталазу та дигідроксиацетонсинтазу [7]. У першій реакції катаболізму метанолу за участю AOX утворюється H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та формальдегід (ФД). Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> далі розщеплюється за участю каталази (КФ 1.11.1.6), а ФД за участю дигідроксиацетонсинтази, включається в анаболічну частину центрального метаболізму дріжджів, або неферментативно взаємодіє з GSH, з утворенням S-гідроксиметилглутатіону, який надалі потрапляє у цитоплазму (рис. 1.4). Формальдегіддегідрогеназа (Fld, КФ 1.2.1.1) каталізує наступне перетворення сполуки у S-формілглутатіон, який швидко гідролізує до форміату і GSH за участю S-формілглутатіонгідролази (Fgh; КФ 3.1.2.12). Форміат далі окиснюється до CO2 за участю форміатдегідрогенази (Fdh, КФ 1.2.1.2) [11, 130]. Fld, Fgh i Fdh забезпечують повне окиснення метанолу до CO<sub>2</sub>. В процесі окиснення 1 моля метанолу генерується 2 молі NADH, який окиснюється в мітохондріях у процесі дихання, що дає енергію у формі АТР, необхідну для перебігу біосинтетичних та фізіологічних реакцій в клітині. Проте, роль дисиміляційного шляху, як головної енергетичної підтримки під час росту клітин на метанолі, суперечлива. Він радше виконує функцію детоксикації, оскільки Fld і Fdh не обов'язкові для росту на метанолі, але без них клітини стають чутливішими до вищих його концентрацій [131]. На користь цього також свідчать експерименти по окисненню та асиміляції



Рис. 1.4. Глутатіонова окисно-відновна система та метаболізм метанолу у дріжджів метилотрофних [132]. Aox, алкогольоксидаза; Das, дигідроксиацетонсинтаза; Cta, каталаза; Fld, формальдегіддегідрогеназа; Fgh, Sформілглутатіонгідролаза; Fdh, форміатдегідрогеназа; Pmp20, пероксисомальна глутатіонпероксидаза; GS-CH2OH, Sглутатіонпероксидаза; Gpx, гідроксиметилглутатіон; GS-CHO, S-формілглутатіон; Xu5P, ксилулозо 5фосфат; DHA, дигідроксиацетон; GAP, гліцеральдегід 3-фосфат; ROOH, алкілгідропероксид (де R – аліфатична або ароматична органічна група або водень). Пунктирна лінія вказує, що гідроксил радикал з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> атакує пероксисомальну мембрану, призводячи до утворення ROOH (14). Ферменти, які підлягають Yap1-опосередкованій регуляції виділені прямокутником

міченого [ $C^{13}$ ] метанолу у *H. polymorpha*. Зокрема, відсутність міченого ФД і форміату в клітинах за нормальних умов та їх поява в екстремальних умовах підтверджує роль цього шляху у детоксикації [8]. У неметилотрофних організмів, таких як *S. cerevisiae* та *E. coli* можливу роль Fld зводять виключно до детоксикації ФД, який може утворюватись у незначних кількостях у метаболічних реакціях [11].

1.4.2. Участь глутатіонової системи захисту у відповіді на оксидативний стрес у дріжджів. Оксидативний стрес трапляється, коли клітини піддаються підвищеним рівням ROS, таким як O2<sup>•</sup>, H2O2, і алкіл гідропероксиди (ROOH). ROS є відновленими формами молекулярного кисню (O<sub>2</sub>), що продукується і акумулюється всередині живих клітин, як результат переносу одного, двох чи трьох електронів, формуючи О2<sup>•</sup>, H2O2 і HO<sup>•</sup>, відповідно [16]. Акумуляція ROS є низькою за нормальних аеробних умов, тоді як зміни в оточуючому середовищі, які спричинюють осмотичний чи тепловий стреси, пошкодження ДНК, опосередковане ультрафіолетом, або вичерпування поживних речовин, значно посилюють акумуляцію ROS, призводячи до оксидативного стресу [133-135]. Оксидативний стрес може зумовлювати ушкодження ДНК і мутації, перекисне окиснення ліпідів і розпад Fe/S кластерів, формування дисульфідних зв'язків та інші типи білкових окиснень [136]. GSH неферментативно реагує з рядом ROS, включаючи HO', HOCl, RO', RO2<sup>•</sup>, O2, а також з багатьма азот- та вуглець-вмісними радикалами [137]. GSH також взаємодіє з SH-групами білків з утворенням змішаних дисульфідів типу GS-R. Таке глутатіонування білків захищає редокс-чутливі SH-групи деяких важливих ферментів від незворотного окиснення [138]. GSH виконує функцію антистресового захисту й v складі ферментативних систем: глутатіонпероксидази (Gpx), глутатіонредуктази (Glr) глутатіон-Sта трансферази (GST). В еукаріотичних клітинах, GSH є донором електронів для антиоксидантного ферменту Gpx (КФ 1.11.1.9) та глутаредоксинів (Grx). Gpx грибів є ключовим ферментом у механізмах захисту проти H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [139], ліпідних і фосфоліпідних гідропероксидів [24, 140-142]. У S. cerevisiae виявлено три гени, що кодують Gpx (GPX1, GPX2 i GPX3) [141], тоді як у Р. pastoris i S. pombe – лише один ген GPX1 [132, 139]. GPX1 індукується голодуванням за глюкозою, а *GPX2* – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та *t*-BOOH у Yap1p-залежний спосіб. Gpx3p очевидно є основною Gpx, яка інактивує пероксиди у S. cerevisiae, оскільки ген GPX3 експресується конститутивно. Grx є тіольними оксидоредуктазами, які залучені у відновленні білкових дисульфідів або GS-R змішаних дисульфідів та в знешкодженні ROS [143]. У S. cerevisiae Grx1p залучений у детоксикації  $O_2^{-1}$ радикалів, Grx2p – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, тоді як Grx5p – обох O<sub>2</sub>. та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [144]. Регенерація обох форм Grx-S<sub>2</sub> та Grx-SSG відбувається за участю GSH (Grx-S<sub>2</sub> + 2GSH =  $Grx-(SH)_2 + GSSG$ ; Grx-SSG + GSH = Grx-SH + GSSG). Відновлення GSSG до GSH каталізується Glr (КФ 1.6.4.2), що кодується геном GLR1, при затраті NADPH, який регенерується глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою [4]. Glr відіграє важливу роль у підтриманні GSH/GSSG співвідношення в клітинах. GST (КФ 2.5.1.18) у свою чергу каталізує утворення кон'югатів GSH з найбільш цитотоксичними продуктами перекисного окиснення ліпідів. Варто зазначити, що гени GSH1, GPX2 та GLR1, експресія яких індукується оксидативним стресом, знаходяться під контролем транскрипційних факторів Yap1 і Skn7.

*1.4.3. Роль глутатіону у детоксикації ксенобіотиків.* Ксенобіотики – це створені людиною хімічні речовини, чужорідні для біологічних систем. Вони включають агенти оточуючого середовища, фунгіциди, інсектициди, ліки, канцерогени, мутагенні агенти і т. д. Багато ксенобіотиків спонтанно або за допомогою GST (GSH + RX = GS-X + RH) взаємодіють з SH-групою GSH, формуючи GSH S-кон'югати (GS-X) [23]. GST виявлені у багатьох організмів, включаючи ссавців, бактерії, найпростіші, водорості, нитчасті гриби та дріжджі [11, 23, 145, 146]. GST каталізує нуклеофільну атаку атома сірки в GSH електрофільною групою субстрату, як ендобіотичного, так і ксенобіотичного походження, за допомогою чого субстрат або кон'югує з GSH, або відновлюється, або ізомеризується з супутнім утворенням GSSG [23, 147, 148]. *S. cerevisiae* має два гени *GTT1* і *GTT2,* що кодують функціональні GST [149]. Різні ксенобіотики індукують різноманітні форми GST. Відомо, що кон'югати

GSH з електрофільними ксенобіотиками можуть секретуватись з клітини або у уGT-залежному шляху детоксикації ксенобіотиків, метаболізуватись відомому для вищих еукаріот. Кінцеві продукти цього шляху (цистеїнксенобіотик або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик) менш токсичні, ніж вихідний ксенобіотик, і більш доступні для виведення з організму [76-78]. У клітинах ссавців може відбуватися N-ацетилювання глутаматного залишку кон'югатів GSH [150], а також спряження кон'югатів GSH та продуктів шляху деградації ксенобіотиків з глутаматом [151]. У рослин також існує інший шлях метаболізму сполук GS-X за участю фітохелатинсинтази (PCS) [152, 153]. Показано, що GSH відіграє важливу роль у вакуолярній акумуляції та екструзії електрофільних ксенобіотиків з клітин дріжджів S. cerevisiae і H. polymorpha [154-157]. У S. cerevisiae GS-X кон'югати транспортуються у вакуолю за участю вакуолярного GS-X транспортера Ycf1 [154, 158]. У S. cerevisiae дія алкілюючого агента метилметансульфонату, здатного взаємодіяти з GSH, виявила індукцію 325 транскриптів (>4 рази) [159]. Одна з найсильніших індукцій – у 28,8 раза – спостерігалась для гена GTT2. Більше того, за аналогічних умов виявлено індукцію генів *CIS2* та *PDR10*, що кодують γGT [59] та АВС транспортер плазматичної мембрани, у 8,8 і 7,7 раза, відповідно. Відтак, дріжджів уGT-залежного можна припустити існування В прототипу детоксикаційного шляху, відомого для рослин і ссавців [1].

#### 1.5. Вплив кадмію на живі організми і механізми захисту проти його дії

1.5.1. Токсичні ефекти кадмію. Забруднення грунту і грунтових вод важкими металами формує основну проблему оточуючого середовища і загрозу здоров'ю людини, оскільки вони дуже токсичні і мають стійку природу. Токсичність важких металів походить в основному від їх сильних зв'язуючих властивостей до метал-чутливих груп, таких як тіоли або гістидильні залишки в клітинах, навіть за низьких концентрацій, що призводить до блокування функціональних груп біологічно важливих молекул, зміщення і/або заміщення

важливих іонів металів, таких як іони Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> з біомолекул, конформаційних модифікацій, денатурації та інактивації ферментів, і пошкодження цілісності клітини та органел [160]. Для деяких важких металів, токсична дія пов'язана із здатністю до редокс-реакцій, які є джерелами ROS. Багато іонів металів відіграють важливу роль в метаболічних шляхах, будучи необхідними в слідових кількостях. Однак, кадмій є неістотним металом і акумулюється в оточуючому середовищі внаслідок промислової діяльності. Приблизно 13 000 тон кадмію щорічно виробляється в світі для нікелькадмієвих батарей, пігментів, хімічних стабілізаторів, покриття і сплавів металів [161]. Він є побічним продуктом видобування і виплавки цинку та свинцю. У XX столітті сильно зросла емісія кадмію, однією з причин чого є кадмій-вмісні продукти, які рідко рециркулюють, але часто викидаються із домашнім сміттям [162]. Куріння цигарок є основним джерелом поширення кадмію [163]. В некурців, головним джерелом кадмію є їжа; ці іони найшвидше поглинаються коренями рослин [164]. Кадмій посів 7 місце в реєстрі агенції токсичних речовин і хвороб у 1997 році [165]. Період півжиття кадмію в людському організмі становить 15-20 років, що перетворює його у кумулятивний токсин [166]. Кадмій може спричинювати остеопороз, анемію, негіпертрофічну емфізему, незворотне пошкодження ниркових канальців, еозинофілію, втрату нюху і хронічні риніти. Кадмій є потенційним людським канцерогеном і асоціюється з раком легень, простати, підшлункової залози і нирок. На молекулярному рівні, токсичність кадмію полягає в інактивації важливої ДНК репаруючої системи MMR (mismatch repair) [161]. Інгібування MMR призводить до поширення помилок репарації, відтак токсичні ефекти кадмію можуть ампліфікуватись в клітинах, шляхом утворення мутацій в генах, індукують наступні помилкові функції. Кадмій може ковалентно ЩО зв'язуватися з ДНК (ймовірно в G, A і T центри) і формувати міжниткові біфункціональні АТ аддукти, але не GG аддукти. Окрім цього, кадмій здатний конкурувати з хімічно подібними металами, цинком та кобальтом, за транспорт в клітину та зв'язування з ферментами, що задіяні в реакціях обміну ДНК
(реплікація, репарація та рекомбінація), спричинюючи мутагенний та канцерогенний ефекти [167]. Дослідження клітинного циклу виявили, що кадмій індукує затримку в переході від G<sub>1</sub> до S фази клітинного циклу, повільну прогресію через S фазу та фосфорилювання білка Rad53, контрольну точку клітинного циклу (рис. 1.5, а). Окрім "прямих" ушкоджень, які можуть залучати конформаційні зміни в біомолекулах, завдяки координуванню металу, кадмій здатний здійснювати і "непрямі" ушкодження, які полягають в утворенні реакційних сполук кисню та азоту, таких як  $O_2^{-1}$ , HO<sup>+</sup>, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і/або інших ендогенних оксидантів. Механізм, запропонований для пояснення непрямої ролі кадмію в утворенні вільних радикалів, базується на здатності кадмію заміщати залізо і мідь в різноманітних цитоплазматичних і мембранних білках (ферритин, апоферритин), збільшуючи кількість незв'язаних вільних іонів міді та заліза, що беруть участь в окиснювальному стресі через реакції Фентона:  $Me^{n^+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{(n^+1)^+} + OH^+ + OH^-$  [161]. Високі концентрації кадмію також призводять до вичерпування GSH, очевидно, завляки продукуванню ROS, в межах, що перевищують антиоксидантну буферну здатність клітини [168].

1.5.2. Механізми детоксикації кадмію в дріжджів. Живі організми розвинули два основних захисних механізми для подолання токсичності металів. Це обмеження потрапляння металів в клітину, завдяки зниженому поглинанню, підвищеному видаленню з клітини або утворенню комплексів ззовні клітини, та зниження їх рівня в цитозолі, завдяки хелатуванню з з подальшим тіольними компонентами видаленням 3 клітини або компартменталізацією у вакуолі. Процес поглинання металів у дріжджів включає метаболізм-незалежний (початкову/вихідну сорбцію) і метаболізмзалежний (транспорт-опосередкований) етапи [169]. У початковій сорбції іонів кадмію беруть участь як дріжджова клітинна стінка, так і зовнішньоклітинні глікопротеїни, які здатні зв'язувати іони важких металів [170]. У S. cerevisiae транспорт іонів кадмію здійснюється, в основному, завдяки транспортеру іонів цинку, Zrt1, і транспортеру іонів марганцю, Smf1 [171, 172]. Окрім цього, іони





Рис. 1.5. Модель клітинної відповіді на кадмієвий стрес [173] (*a*) та модель  $Cd^{2+}$ -опосередкованої активації сітки *MET* генів через інгібування  $SCF^{Met30}$  убіквітинлігази та активацію недостатньо вивченого деубіквітинуючого ферменту (Ubp) [52] (*б*)

кадмію коімпортуються разом з Н<sup>+</sup> крізь плазматичну або внутрішньоклітинні мембрани за участю білків сім'ї Nrap (2.А.55) [174]. Видалення іонів Cd<sup>2+</sup> з клітин S. cerevisiae опосередковане транспортером Cad2 [175] та членами субсім'ї ACR3 (2.А.59.1), які викачують арсеніт, сурму, телурій і кадмій з клітини у відповідь на закачування протонів. Домінуючим механізмом детоксикації кадмію в клітинах еукаріот є синтез хелатуючих молекул, які зв'язують іони кадмію та опосередковують їх транспорт з клітини або секвестрування в субклітинні компартменти, тоді як бактерійна система резистентності функціонує шляхом енерго-залежного відтоку токсичних іонів [176-178]. GSH є основною молекулою, залученою в хелатування іонів кадмію в клітинах S. cerevisiae, тоді як фітохелатини (PC) виконують цю роль у S. pombe та С. glabrata [4, 179]. Транспорт кон'югатів Cd(SG)<sub>2</sub> з клітини S. cerevisiae опосередкований білком Yor1, локалізованим у цитоплазматичній мембрані [180]. Компартменталізація іонів кадмію у клітинах S. cerevisiae контролюється білком Ycf1, який відповідає за секвестрування комплексів Cd(SG)<sub>2</sub> з цитозолю у вакуоль [154, 158] (рис. 1.6, *a*). У *S. ротве* вакуолярний білок Hmt1 спрощує транспорт низько-молекулярних комплексів PC з  $Cd^{2+}$  (LMW PC-Cd) у вакуолю [181], де вони вбудовують сульфід, що спрощує подальшу інкорпорацію іонів  $Cd^{2+}$ , та перетворюються у високомолекулярні комплекси (HMW PC-CdS), які складаються з CdS кристалічного кору, покритого PC [182]. У S. pombe Cd<sup>2+</sup> кон'югує 3 GSH утворюючи комплекси GSH-Cd, які також далі перетворюються у PC-Cd, і врешті формують CdS-PC нанокристали [183]. GSHкомплекс може прямо вбудовувати сульфід, формуючи CdS-GSH Cd нанокристали [184-186] (див. рис. 1.6, б). Утворення CdS нанокристалів підвищує як кількість  $Cd^{2+}$ , що припадає на одну молекулу, так і стабільність комплексу [160, 183, 185]. Всі три компоненти, GSH, PC і неорганічний сульфід, є важливими для високої толерантності до кадмію в S. pombe [187-189]. З відповіддю на кадмієвий стрес у грибів пов'язані такі ферменти, як НМТ2 мітохондріальна сульфідоксидоредуктаза (S. pombe), яка може знешкоджувати надлишок сульфіду, який генерується під час формування



Рис. 1.6. Механізми резистентності до кадмію у дріжджів *S. cerevisiae* (*a*) і *S. pombe* (*б*). Cd-(GS)<sub>2</sub> та Cd-S<sub>2</sub> – комплекси кадмію з глутатіоном та цистеїнілгліцином, відповідно; CdS-(GS)<sub>2</sub> – сульфід-вмісний комплекс кадмію з глутатіоном; LMW PC-Cd та HMW PC-CdS – низькомолекулярні та високомолекулярні комплекси кадмію з фітохелатинами, відповідно

41

НМШ PC-CdS [190], і НЕМ2 порфобіліногенсинтаза (КФ 4.2.1.24; C. glabrata), яка залучена в біосинтез кофактора SiR, сірогему [191]. Вважають, що у S. cerevisiae ізоформа Gtt2 GST залучена у формування Cd-GSH комплексу [165], тоді як уGT та Lap4 амінопептидаза залучені у його вакуолярну деградацію [192, 193]. Контроль внутрішньоклітинного рівня іонів Cd<sup>2+</sup> в S. cerevisiae підтримується завдяки гіпотетичній регуляції Zrt1-залежного транспорту іонів кадмію Cd-GSH комплексом [194]. Відповідно, чим вища концентрація комплексу в цитоплазмі, тим нища абсорбція кадмію і навпаки. Відтак, мутант  $\Delta ycfl$ , з пошкодженим транспортом Cd-GSH комплексу у вакуолю, виявляє вдвічі нижчу, тоді як мутант  $\Delta gshl$ , з дефектом біосинтезу GSH (відсутністю Cd-GSH комплексу), вдвічі вищу абсорбцію іонів кадмію, порівняно з диким типом [194]. Мутант  $\Delta gtt2$ , з пошкодженим утворенням, та мутанти  $\Delta cis2$  i *Дар4*, з пошкодженою деградацією Cd-GSH комплексу, виявляють у 2,5-3 рази підвищену абсорбцію кадмію, порівняно з диким типом [165, 192, 193]. Транспорт Cd-GSH комплексу у вакуолю не пошкоджений у мутантів *Acis2* та Дар4 [192, 193]. В цитоплазмі Cd-GSH комплекс також відповідає за мутагенний ефект металу [165, 192].

1.5.3. Відповідь дріжджової клітини на кадмій відбувається на загальному системному рівні. Дія кадмію призводить до широкої реорганізації транскриптому, протеому та метаболому S. cerevisiae, результатом чого є суттєве зростання біосинтезу GSH [90, 120]. Транскриптомний аналіз дріжджових клітин, підданих дії кадмію (1 мМ, 1 год), виявив ~ 600 генів індукованих більш, ніж втричі і 138 генів з фактором індукції >7. Ці гени кодують ферменти біосинтезу сірковмісних амінокислот, білки теплового шоку, протеази, ферменти з антиоксидантними властивостями, ферменти залучені в метаболізму, детоксикацію, ферменти вуглецевого транспортери i транскрипційні фактори [50, 195]. Індукція набору генів, асоційованих з антиоксидантними функціями, служить для захисту проти токсичності, спричиненої вільними радикалами, тоді як індукція генів, залучених у протеоліз, покликана для подолання акумуляції потенційно токсичних окисномодифікованих білків, які акумулюються за дії іонів Cd<sup>2+</sup>. Сильна індукція генів, що кодують транспортери сіркових компонентів (сульфат, метіонін) підтверджує надзвичайну потребу клітини у різних джерелах сірки за дії кадмію. Регулятори цього шляху (Met30p, Met32p) також високо індуковані. Майже всі гени сірко-амінокислотного шляху належать до 400 генів найбільш індукованих металом та їх індукція є Met4-залежною [195]. Показано, що дія іонів Cd<sup>2+</sup> пошкоджує як залежне, так і незалежне від деградації Met4 убіквітинування шляхом дисоціації Met30 з кору SCF комплексу (див. рис. 1.5, а,б). Деубіквітинування вже існуючих пулів неактивного олігоубіквітинованого Met4 у багатому середовищі забезпечує швидку відповідь на кадмій. Цікаво, що ці механізми є специфічними до кадмію, оскільки за дії інших металів не спостерігається транскрипційної індукції МЕТ генів [52]. Кадмій-індукована Met4 не € опосередкованим наслідком вичерпування рівнів метіоніну, оскільки внутрішньоклітинних додавання високих концентрацій метіоніну не запобігає активації Met4 у відповідь на дію кадмію [173]. Більше того, регуляція взаємодії Met30:Skp1 є унікальною для кадмієвої

відповіді, оскільки голодування за метіоніном, яке також блокує Met4 убіквітинування, не руйнує Met30:Skp1 комплекс [122]. Подібно до Met4 S. cerevisiae, Zip1 є основним фактором, необхідним для транскрипційної відповіді S. pombe на кадмієвий стрес. Клітини мутанта zip1 S. pombe виявляють гостру чутливість до кадмію, подібно до кадмій-чутливих мутантів *Amet4 S*. cerevisiae [52, 118, 173]. Більше того, 15 з 20 відомих Zip1 генів-мішеней є кадмій стрес-специфічними [118]. За кадмієвого стресу Zip1 уникає деградації в убіквітин-протеосомному шляху за участю SCF<sup>Pof1</sup> та активує транскрипційну програму необхідну для виживання за присутності кадмію [118]. Толерантність до кадмію у S. cerevisiae також підтримується транскрипційним фактором Yap1, який позитивно регулює експресію генів YCF1, GSH1 і GLR1 [196].

активація

Протеомний аналіз у відповідь на дію кадмію виявив у S. cerevisiae 54 білки [50], а в S. pombe – 106 білків [160], індукованих металом. Серед 106 білків S. pombe, лише 21 білок має ортологи в S. cerevisiae [160]. Ці головно

білки з антиоксидантними властивостями і білки теплового шоку. Для економного використання сірки дріжджова відповідь на кадмій сприяє експресії білків з низьким вмістом сірки і заміщення деяких надлишкових гліколітичних ферментів, бідними на сірку ізозимами (див. рис. 1.5, *a*). Зокрема, ген, що кодує ізоформу піруватдекарбоксилази Рdc6 (4Met і 1Суѕ) сильно індукується, тоді як ген, що кодує ізоформу Pdc1 (12Met і 4Cys) зарепресований. У мутанта *Дтеt4* транскрипція *PDC6* більше не індукується кадмієвим стресом [195], вказуючи на важливу роль білка Met4 у сіркозберігальній відповіді на кадмієвий стрес [195]. Цікаво, що голодування за сіркою сповільнює ріст, але не індукує сіркозберігальну відповідь [195]. Не виключено, що ізоферментне перемикання може мати й іншу функцію в клітині. Бідні на сірку ізоформи можуть бути менш чутливими до інгібування кадмієм, ніж багаті на сірку ферменти [197, 198]. Однак, це тлумачення є менш ймовірним, оскільки не очікувалось би супутнього зменшення в кількості метіонінових залишків за відсутності селективного тиску. Глобальна зміна в білковій експресії дозволяє зберегти понад 30% сірковмісних амінокислот. Цей сіркозберігальний ефект значно посилюється за рахунок падіння в глобальному білковому синтезі за дії кадмію. Ці протеомні дані узгоджуються з ідею про те, що сильне зростання синтезу GSH в подальшому посилюється завдяки зростанню доступності сірковмісних амінокислот, невбудованих у білки. За контрольних умов 79% асимільованого сульфату вбудовується у білки, і ця пропорція знижується до 19% у клітинах, оброблених кадмієм. Однак, дія кадмію призводить не лише до зниження загального вмісту сірки, необхідного для синтезу білків [195], а й до зміни напрямку відтоку сірки на рівні синтезу гомоцистеїну, з відтоком у напрямку шляху TS, і далі синтезом GSH, та зниженням відтоку у напрямку метильного циклу. За стандартних умов, відтік сірки в метильний цикл становить 60%, а у Cys/GSH шлях – 40%. За дії кадмію в метильний цикл поступає 20% сірки, а в Cys/GSH шлях – 80% [120]. Відтак, дія кадмію призводить до сильного зростання всіх метаболітів сіркового шляху, окрім метіоніну [195].

Поєднання протеомних та метаболічних даних дає можливість, в три етапи, чітко описати метаболічні зміни, що призводять до акумуляції GSH: (1) зниження утилізації сірки для синтезу білків, (2) зростання пулу гомоцистеїну, який спрямовує відтік сірки в GSH шлях та (3) неосинтез ферментів сіркового шляху. Відповідно аналіз дріжджової кадмієвої відповіді підтвердив чітку кореляцію між індукцією ферментів, залучених у GSH шлях, і зростанням продукції GSH y *S. cerevisiae* [50, 195]. Окрім цього, обробка кадмієм інгібує деградацію GSH y *S. cerevisiae* [58]. Відтак, зростання клітинного вмісту GSH у відповідь на дію кадмію є наслідком не лише підвищення синтезу GSH [50, 120], а й зниженої його деградації [58]. Отже, у дріжджів клітинна відповідь на кадмій відбувається на загальному системному рівні, що покладається на метаболічний, транскрипційний та пост-транскрипційний еффектори.

Підсумки. У даному розділі висвітлено основні досягнення в галузі дослідження метаболізму глутатіону, що стосуються, зокрема, ферментативних етапів біосинтезу і деградації GSH, їх генетичного контролю, а також молекулярних механізмів регуляції перших етапів метаболізму GSH в еукаріот. Також розглянуто шляхи метаболізму сірки та їх регуляцію в еукаріотичних мікроорганізмів. Значну увагу зосереджено на участі GSH у стресових відповідях: метилотрофному рості, детоксикації ксенобіотиків, кадмієвому та оксидативному стресах. Незважаючи на те, що процеси біосинтезу, деградації GSH та їх регуляція добре вивчені на моделі пекарських дріжджів S. cerevisiae, принципово важливе фундаментальне та прикладне значення має дослідження генетичного контролю метаболізму глутатіону та участі GSH-залежних метаболічних систем в забезпеченні резистентності до різних видів стресу у метилотрофних дріжджів *Н. роlymorpha*, які на даний час широко використовуються для продукції гетерологічних білків і розглядаються як природно багате джерело глутатіону.

### РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

## 2.1. Матеріали досліджень

2.1.1. Реактиви. Використані у роботі хімічні сполуки, реактиви та ферменти були виробництва фірм "Sigma-Aldrich" (США), "Reanal" (Угорщина), "Fermentas" (Литва), "Fluka" (Німеччина), "NEB" (США), "Promega" (США), "Difco" (США). Хімічні реактиви вітчизняного виробництва мали кваліфікації "хч" та "осч".

**2.1.2. Штами мікроорганізмів.** Штами дріжджів *H. polymorpha*, *Pichia guilliermondii*, *S. cerevisiae* та бактерій *E. coli*, що використовувались у даній роботі, наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Назва штаму	Генотип	Посилання або джерело			
	Дріжджі H. polvmorpha				
Генетична лінія NCYC495					
NCYC495 leu1-1		NCYC, Норвіч, Великобританія			
gsh1	gsh1, leu1-1	[199]			
gsh2	gsh2, leu1-1	[199]			
pG1	<i>gsh1, leu1-1</i> (pYT3+BPT1+ BPT2+BPT3+BPT4)	[199]; пункт 3.1.1. даної дисертації			
pG1-36	gsh1, leu1-1 (pYT3+BPT4)	Пункт 3.1.1.			
pG1-47	gsh1, leu1-1 (pYT1+BPT4)	Пункт 3.1.1.			
<i>pG1-23 gsh1, leu1-1</i> (рҮТ3+ВРТ2+ВРТ3) Пункт 3		Пункт 3.1.1.			

Штами мікроорганізмів, використані в роботі

Продовж. табл. 2.1

Назва штаму	Генотип	Посилання або джерело			
pG2	gsh2, leu1-1 (pG2)	[199]			
pG24	gsh2, leu1-1 (pG24)	[199]			
NCYC495 leu1-1 ade11		музей ІБК НАН України			
⊿gsh1/met1 ade11	leu1-1, ade11, ∆gsh1/met1::ScLEU2	Пункт 3.1.3.			
$\Delta gsh2 a dell$	leu1-1, ade11, ∆gsh2::ScLEU2	Пункт 3.1.4.			
	Генетична лінія CBS4732				
CBS4732 leu2-2 ura3-20		Лахчев К., Софія, Болгарія			
CBS4732 <i>leu2-2::ScLEU2</i> <i>ura3-20</i>		Пункт 3.3.2.			
∆ggt1 ura3-20	leu2-2, ura3-20, ∆ggt1::ScLEU2	Пункт 3.3.2.			
∆gsh1/me1 ura3-20	leu2-2, ura3-20, Agsh1/met1::ScLEU2	Пункт 3.1.3.			
CBS4732 ura3-20 met2-2		Лахчев К., Софія, Болгарія			
CBS4732 leu2-2 met2-2		Лахчев К., Софія, Болгарія			
⊿gsh1/met1 met2-2	leu2-2, met2-2, ∆gsh1/met1::ScLEU2	Пункт 3.1.3.			
∆gsh2 met2-2	leu2-2, met2-2, ∆gsh2::ScLEU2	Пункт 3.1.4.			
CBS4732 leu2		CBS, Дельф, Нідерланди			
CBS4732 leu2-2		Лахчев К., Софія, Болгарія			
CBS4732 prGSH2-AOX	<i>leu2-2,</i> (prGSH2-AOX)	Пункт 3.2.3.			
	Генетична лінія DL-1				
DL-1 <i>leu2</i>		Канг Г.А., Лаелжон. Корея			
∆gsh2	leu2, ∆ura3, ∆trp1::URA3, ∆gsh2::HpTRP1	Канг Г.А., Даеджон, Корея			
∆met4	Δura3, leu2, Δmet4::LEU2	Канг Г.А., Даеджон, Корея			
mcMET4	<i>Дига3, leu2::mcMET4::HpLEU2</i> (pGLG61-HpMET4)	Канг Г.А., Даеджон, Корея			

Продовж. табл. 2.1

Назва штаму	Генотип	Посилання або джерело	
mcGSH2	Δura3, Δtrp1::URA3, leu2::mcGSH2 <sub>CBS</sub> ::HpLEU2 (pGLG61-HpGSH2)	Канг Г.А., Даеджон, Корея	
	P. guilliermondii		
R-66	MAT <sup>-</sup> hisX, ura3	[200]	
⊿gsh1	hisX, ura3, ∆gsh1∷pPGK-ScURA3	[201]	
⊿gsh2	hisX, ura3, ∆gsh2::pPGK-ScURA3	[201]	
	S. cerevisiae		
	Генетична лінія ВҮ4742		
BY4742	Y10000 MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0	Пеннінкс М., Брюссель, Бельгія	
Δcis2	Y15209 MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YLR299w::kanMX4	Пеннінкс М., Брюссель, Бельгія	
⊿met1	Y15985 MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YKR069w::kanMX4	Euroscarf, Франкфурт, Німеччина	
ScGAPDH- HpGSH1/MET1	MATa; his $3\Delta 1$ ; leu $2\Delta 0$ ; lys $2\Delta 0$ ; ura $3\Delta 0$ ; YKR $069w$ ::kanMX4 (YEp_HpGSH1/MET1)	Пункт 3.1.5.	
Генетична лінія L3262-Y			
L3262-Y ura3 his4	MATα, ura3-52, 112 his4-34, leu2::ScLEU2	Канг Г. А., Даеджон, Корея	
$\Delta met4 \qquad \qquad MAT\alpha, ura3-52, 112 his4-34, leu2-3, Kan table Sci FU2 \qquad \qquad$		Канг Г. А., Даеджон, Корея	
Бактерії			
DH5a	$\begin{array}{c} \textbf{L. Con} \\ \textbf{lacZ}\Delta M15, \textbf{recA1}, \textbf{endA1}, \textbf{gyrA96}, \\ \textbf{thi-1}, \textbf{hsdR17}(r_{K}^{-}, m_{K}^{+}), \textbf{supE44}, \\ \textbf{relA1}, \textbf{deoR}, \Delta(\textbf{lacZYA-argF})U169 \end{array}$	[202]	

**2.1.3.** Плазміди. Перелік плазмід, використаних у даній роботі, та посилання на їх конструювання наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Назва	Посилання на конструювання
pG1	[199]
pYT3	[203]
pYT1	[203]
(рҮТ3 + 4,4 т.п.н.)	Пункт 3.1.1. даної дисертації
(рҮТ1 + 5,3 т.п.н.)	Пункт 3.1.1. даної дисертації
(рҮТ3 + 5,3 т.п.н.)	Пункт 3.1.1. даної дисертації
pYT1_C-GSH1/MET1	Пункт 3.1.3. даної дисертації
pY∆HpGSH1/MET1	Пункт 3.1.3. даної дисертації
pYT1_N-GSH2	Пункт 3.1.4. даної дисертації
pY∆HpGSH2	Пункт 3.1.4. даної дисертації
pGLG61	[204]
prGSH2-AOX	Пункт 3.2.3. даної дисертації
pYT1_N-GGT1	Пункт 3.3.2. даної дисертації
pY∆HpGGT1	Пункт 3.3.2. даної дисертації
YEp352GAP-II	[205]
YEp_HpGSH1/MET1	Пункт 3.1.5. даної дисертації

Перелік векторів, використаних у даній роботі

**2.1.4. Праймери.** Перелік праймерів, використаних для конструювання рекомбінантних плазмід та перевірки коректності делетування генів, наведено у табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Назва	Послідовність (5'-3')	Сайт
VU1F	GG <u>AAGCTT</u> TCCCTCAAGTCCTACAA	HindIII
VU2R	AA <u>CTGCAG</u> GCCGTCCATGTATTAGT	PstI
VU3F	GC <u>TCTAGA</u> TTCCATACCAACGTCGA	XbaI

Олігонуклеотиди, використані як праймери для ПЛР ампліфікації

Продовж. табл. 2.3

Назва	Послідовність (5'-3')	Сайт
VU4R	CG <u>GGATCC</u> ACTTTTTCCATTCTGCT	BamHI
VU5F	GG <u>AAGCTT</u> GGCACTCCAGAATGA	HindIII
VU6R	AA <u>CTGCAG</u> TGCAAGGAGAACGTTT	PstI
VU7F	GG <u>AAGCTT</u> TCGGGCTGGCAGTGTTA	HindIII
VU8R	GAA <u>CTGCAG</u> GGTCGATAAGGTTTTTC	PstI
VU9F	GC <u>TCTAGA</u> GTACCTCAAGCTGGTGA	XbaI
VU10R	GT <u>GAGCTC</u> TAGCGTGCAATTTTTCC	SacI
VU11F	TCTGTGTGCTCACGAATGCT	
VU12R	AGTATCCGGTCACCAGCAAT	
VU13F	AAGAAGATCGTCGTTTTGCC	
VU14F	AAAGACTTTGCGGTGAGAGA	
VU15F	GTCAACATCGCTCCATTGAT	
VU30F	TCTAGAATCAGCCTCCACATAAGCC	
VU31R	CACCTGGCAAAACGACGATCTTCTT	
VU32F	GCTGGAGACACTCCAGGTATTCTGC	
VU34R	TT <u>GCGGCCGC</u> TGTGGCAACTCCAGCCTTGG	NotI
VU35F	TT <u>GCGGCCGC</u> CCAATGCTTTGGGACTTGAA	NotI
VU37R	CCC <u>AAGCTT</u> GGTCGATAAGGTTTTTCAGGAAAG	HindIII
VU38F	CCC <u>AAGCTT</u> ATGGCCATTCCTGACGAATTC	HindIII
Mh3F	CGG <u>GGTACC</u> ATGAAGTTTCTGTGTGCTCAC	KpnI
UV61R	TTGCGGCCGCAAAAGACAACAAAGA	

Примітка. Підкресленим шрифтом позначено сайти впізнавання ендонуклеаз рестрикції, які зазначено у графі справа

**2.1.5. Поживні середовища.** Штами дріжджів вирощували за температури 28 °C та 37 °C у багатому середовищі (YPD: 1% дріжджовий екстракт, 1,5-2% пептон, 1-2% глюкоза [202] або YPEt: 1% дріжджовий екстракт, 1,5% пептон, 2% етанол), стандартному синтетичному середовищі

(YNB: 0,67% Yeast Nitrogen Base, 1-3% глюкоза) або мінеральному середовищі Беркгольдера (на 1 л): 10 г глюкози; 3,5 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 г MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,1 г CaCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 1 мкг біотину та 1 мкг тіаміну. Кінцева концентрація мікроелементів: 0,2 мкМ CuSO<sub>4</sub>, 1,25 мкМ KI, 4,5 мкМ MnSO<sub>4</sub>, 2,0 мкМ NaMoO<sub>4</sub>, 0,75 мкМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 17,5 мкМ ZnSO<sub>4</sub> [131].

Регуляцію активності уGT у дріжджів *Н. роlутогрha* вивчали на азотдефіцитному синтетичному середовищі, що містило наступні компоненти (на 1 л): 1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 г MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,1 г CaCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O в залежності від наявності джерела азоту (5 мМ глутамат, GSH (1,5 мМ; 2,5 мМ) або 26,5 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ ) та сірко-дефіцитному амоній-вмісному середовищі, що містило (на 1 л): 1 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 2,8 г NH<sub>4</sub>Cl, 0,4 г MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 0,1 г CaCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O або в сірко-дефіцитному глутамат-вмісному середовищі, що містило (на 1 л): 1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 г MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 0,1 г CaCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 1 г глутамату залежності від присутності джерела сірки (0,1 мМ GSH або 26,5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Сірко- та азот-дефіцитні середовища також містили біотин, тіамін та мікроелементи у вищевказаній концентрації, а в якості джерела вуглецю – 1% глюкозу. Ростові характеристики мутантів gsh1 та  $\Delta gsh1/met1$  вивчали на вищезгаданому сіркодефіцитному амоній-вмісному середовищі за присутності різних сірковмісних сполук: 2,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,1 мМ SAM, 0,1 мМ Sаденозилгомоцистеїну, 0,1 мМ метіоніну, 0,1 мМ цистеїну або 0,1 мМ GSH. Для визначення активності уGCS клітини дріжджів вирощували у сіркодефіцитному середовищі Б [206], в яке додавали 38 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 мМ цистеїн або 0,1 мМ GSH. Для вивчення флуоресцентної мікроскопії та транспорту електрофілів у дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* використано синтетичне середовище А (рН 6,5), що містило наступні компоненти (на 1 л): 30 г глюкози, 0,7 г MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 г CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,5 г NaCl, 1 г  $K_2SO_4$ , 10,5 г лимонної кислоти, 8,5 г KOH і 26,4 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а також вітаміни та мікроелементи [27]. Для схрещування дріжджів використовували агаризовані середовища YPD та ME (2% малт екстракт).

Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактори росту в кількості на 1 л середовища – 250 мг лейцину, 79-100 мг урацилу, 75 мг аденіну, 80 мг метіоніну і 150 мг гістидину та 0,1 мМ GSH, якщо не вказано інакше. Агаризовані середовища для бактерійних і дріжджових штамів містили 2% агар.

Бактерійні штами вирощували за температури 37 °C на багатому середовищі (LB) [202]. Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

#### 2.2. Методи досліджень

2.2.1. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів Н. polymorpha. Даний метод є модифікацією методу розробленого для S. cerevisiae [207] з використанням літикази для сферопластування клітин, протеїнази К для руйнування білків, рибонуклеази А для розщеплення РНК та з подальшим осадженням ДНК спиртом. Цей метод використовується для виділення (через ретрансформацію *E. coli*) плазмідної ДНК з клітин дріжджових трансформантів.

Реактиви:

- ➤ ST буфер: 1 М сахароза,50 мМ Тріс-HCl (pH 8,0);
- ➤ SE буфер:0,2% SDS, 50 мМ ЕДТА (pH 8,0);
- 5 М ацетат калію (pH 4,8);
- ➤ 3 М ацетат амонію (pH 5,2);
- ▶ ізопропанол;
- ▶ 70% і 96% етанол.

Клітини нарощували в 5 мл рідкого селективного середовища за температури 37 °C до пізньої логарифмічної фази (OD<sub>540</sub> ~ 2-4; кювета 0,3 см). Біомасу осаджували центрифугуванням і промивали 1 мл ST буфера, далі ресуспендували в 0,5 мл ST буфера, переносили у мікроцентрифужні пробірки і додавали 10 мкл 2-меркаптоетанолу. До ресуспендованих клітин додавали літиказу (500 одиниць активності) та інкубували 40-60 хв за температури 30 °C.

Одержані сферопласти центрифугували в м'яких умовах (1000 x g); осад ресуспендували в 300 мкл SE буфера та інкубували 15 хв за температури 70 °С. Далі суспензію охолоджували до кімнатної температури, додавали 10 мкл РНКази А (10 мг/мл), 0,8 мкл протеїнази К (20 мг/мл), перемішували та інкубували 30-60 хв за температури 37 °С. До інкубаційної суміші додавали 300 мкл 5 М ацетату калію, перемішували та витримували на льоді 30 хв, центрифугували при 4000 х g, 10 хв. До супернатанту додавали 0,7 об'єму ізопропанолу, витримували 5 хв за кімнатної температури і центрифугували. Отриманий осад промивали 0,5 мл 70% етанолу, підсушували та розчиняли в 100-150 мкл ТЕ буфера. Далі додавали однаковий об'єм фенолу, насиченого буфером, інтенсивно перемішували і центрифугували 4000 х g, 10 хв. Водну фазу відбирали у чисту мікропробірку і додавали 0,1 об'єм 3 М ацетату натрію і два об'єми 96% етанолу, перемішували та витримували протягом 10 хв за температури –70 °C і далі центрифугували (4000 х g, 10 хв). Осад промивали 70% етанолом і підсушували. Виділену ДНК розчиняли у 50-100 мкл ТЕ буфера, зберігали за температури –20 °С.

2.2.2. Електротрансформація дріжджів Н. polymorpha. Метод базується на здатності екзогенної ДНК проникати під впливом електричного імпульсу в клітини дріжджів [208]. Електротрансформацію здійснювали за допомогою електропоратора марки ЕСМ600 фірми "ВТХ" (США).

Реактиви:

- ▶ розчин 25 мМ ДТТ у 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,5);
- ➤ STM буфер: 270 мМ сахароза; 10 мМ Тріс-HCl (pH 7,5); 1 мМ MgCl<sub>2</sub>

Нічну культуру *H. polymorpha*, вирощену у неселективному середовищі УРD за 37 °C розводили у 100 раз і переносили у свіже YPD середовище (200 мл) та вирощували до оптичної густини  $OD_{600}$ ~ 1,2-1,5. Клітини осаджували центрифугуванням при 3000 х g протягом 10 хв, ресуспендували у 0,2 об'єму (40 мл) фосфатного буферу з дитіотреітолом (ДТТ) та інкубували 15 хв за 37 °C. Далі клітини двічі промивали охолодженим до 0 °C STM буфером – спочатку в 1 об'ємі (200 мл), а потім у 0,5 об'ємах (100 мл). Відмиті клітини ресуспендували в 1 мл STM буфера (0 °C), щоб досягнути ~2 х 10<sup>10</sup> клітин/мл. Для довготривалого зберігання компетентних клітин, аліквоти з 60 мкл клітинної суспензії у STM буфері заморожували і зберігали за температури –70 °С. До 60 мкл суспензії клітин додавали ДНК і цю суміш переносили на дно, попередньо охолодженої, електропораційної кювети та піллавали лії електричного імпульсу (7,5 кВ/см, 50 мкФ, 129 Ом) тривалістю ~5 мс. До суміші клітини/ДНК відразу додавали 1 мл середовища YPD та інкубували протягом 1 години за 37 °C без перемішування. Клітини осаджували центрифугуванням (3000 x g, 5 хв), промивали 1 мл середовища YNB i ресуспендували у необхідному об'ємі YNB (0,5-1 мл). Отриману суспензію розсівали на чашки з селективним середовищем (YNB) та інкубували за 37 °С 3-4 доби, після чого підраховували кількість трансформантів.

2.2.3. Схрещування дріжджів. Штами дикого типу та мутантні штами дріжджів *H. polymorpha* наносили повздовжніми смугами на чашки з агаризованим середовищем YPD і ME та інкубували у термостаті за температури 37 °C протягом ночі. Далі робили відбиток з YPD чашки на тканину, на яку потім накладали ME чашку, таким чином, щоб утворилася сіточка. Далі МЕ чашку інкубували в термостаті за температури 30 °C впродовж 3-4 діб і тоді робили відбиток на мінімальне глюкозовмісне середовище без та з глутатіоном. Диплоїди утворювалися на перетині перпендикулярних смуг на третю-п'яту добу інкубації у термостаті за температури 37 °C. Приналежність точкових та делеційних мутантів до однієї чи різних груп комплементації встановлювали за здатністю відповідних диплоїдів до росту в залежності від наявності екзогенного глутатіону в середовищі.

2.2.4. Базові молекулярно-генетичні методи. Виділення та очистку плазмідної ДНК, підготовку та трансформацію компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК рестриктазами, затуплення "липких" (комплементарних) кінців лінеаризованої ДНК за допомогою великого фрагмента ДНК-полімерази І *E. coli* (фрагмента Кленова), дефосфорилювання

"липких" кінців ДНК, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК та ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою ПЛР здійснювали як описано раніше [209]. При ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР олігонуклеотидні використовували синтетичні праймери фірми "IDT Technologies" (США). ПЛР проводили використовуючи термоциклер фірми "Parkin Elmer" (США). Визначення нуклеотидної послідовності ДНК фрагмента проводили у Корейському інституті біологічних наук і біотехнології (м. Даеджон, Корея).

2.2.5. Програмне забезпечення для аналізу амінокислотних ma нуклеотидних послідовностей. Для множинного вирівнювання використовували амінокислотних послідовностей алгоритм ClustalW, http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html i Boxshade 3.21, http://www.ch.embnet.org/software/BOX form.html. Пошук подібності амінокислотних послідовностей проводили, використовуючи мережевий сервіс BLAST Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Пошук доменів здійснювали за допомогою вебсервісів Scan Prosite, http://prosite.expasy.org/scanprosite та Pfam, http://pfam.sanger.ac.uk/search; пошук ймовірних coiled-coil доменів – за http://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil. вебсервіса MARCOIL, допомогою Моделювання просторової структури білка здійснювали за допомогою програми Phyre<sup>2</sup> (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) в інтенсивному режимі [210], <u>http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2</u>, а візуалізацію третинної структури білка - за допомогою програми Swiss-PdbViewer (DeepView) v4.1, http://spdbv.vital-it.ch. Для побудови філогенетичного дерева використовували програму MetaPIGA v3.0b0 [211, 212], www.metapiga.org (алгоритм Maximum Likelihood). Для аналізу нуклеотидних послідовностей на наявність відкритих рамок трансляції (ВРТ) використовували вебсервіс ORF Finder Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html, для рестрикційного аналізу ДНК фрагментів – NEB cutter, http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php, для дизайну олігонуклеотидних праймерів – Oligonucleotide Properties Calculator, <u>http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</u>, для маніпуляцій з ДНК – The Sequence Manipulation Suite, <u>http://www.bioinformatics.org/sms/</u>, для симулювання клонування, операцій з ферментами та схематичного представлення рекомбінантних плазмід – програму Clone Manager.

В роботі було використано наступні геномні бази даних: геміаскоміцетних дріжджів - Génolevures, http://www.genolevures.org/, дріжджів Н. polymorpha, https://ssl.biomax.de/rheinbiotech/ i http://genome.jgipsf.org/Hanpo2/Hanpo2.info.html, S. cerevisiae, http://www.yeastgenome.org/, P. guilliermondii, http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/, S. pombe, http://www.pombase.org/ та рослини A. thaliana, http://www.plantgdb.org/AtGDB/.

2.2.6. Дослідження мітотичної стабільності дріжджових трансформантів. Мітотичну стабільність дріжджових трансформантів визначали методом, описаним раніше для *P. pastoris* [213].

Отримання безклітинних екстрактів. 2.2.7. Для приготування безклітинних екстрактів використовували скляні кульки. До мікропробірок з осадом дріжджових клітин додавали 1 об'єм буферу для руйнування, що містив 100 мМ Tpic-HCl буфер (pH 7.5). 1 мМ MgCl<sub>2</sub> 2 мМ i фенілметансульфонілфторид (PMSF) і 1 об'єм склянних кульок (діаметр 0,45-0,5 мм). Клітини руйнували методом вортексування (вібрації) на планетарному дезінтеграторі "Vortex" протягом 15 хв за температури 4 °С. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізат центрифугували на мікроцентрифузі ( $r_{cep} =$ 9,5 см) протягом 20 хв при 14000 об/хв за температури 4 °C. Супернатант використовували для подальшого аналізу.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі та співавторами [214], використовуючи сироватковий альбумін бика як стандарт.

**2.2.8.** Визначення вмісту глутатіону. Принцип методу полягає в детекції відновленого забарвленого продукту, який утворюється в результаті функціонування циклу регенерації глутатіону з аддукту DTNB (5,5<sup>/</sup>-дітіобіс (2-нітробензойна кислота))-глутатіон за участю глутатіонредуктази та NADPH

[215]. Цей метод дозволяє (при дуже великому розведенні біологічної рідини) специфічно вимірювати глутатіон у суміші різних HS-вмісних сполук.

Реактиви:

▶ реагент 1:	0,1 М калій фосфатний буфер pH 7,2;
	15 мМ ЕДТА;
	0,04% альбумін;
	0,3 мM DTNB
▶ реагент 2:	35 мМ Тріс-HCl pH 7,2;
	1 мМ ЕДТА;
	0,02% альбумін;
	0,6 мM NADPH;
	0,2 Е/мл глутатіонредуктаза

До 0,3 мл екстракту, розведеного в n разів, або стандартної проби з певною концентрацією глутатіону додавали 0,3 мл реагента 1. Реакцію запускали додаванням 0,3 мл реагента 2 та проводили протягом 30 хв за кімнатної температури. Детекцію GSH+GSSG здійснювали на спектрофотометрі Helious при 412 нм. Калібрувальну криву будували за стандартним розчином GSH (10 мкМ). Глутатіон визначали в пробах паралельно з побудовою калібрувальної кривої.

**2.2.9.** Визначення активності алкогольоксидази. Клітини дріжджів попередньо вирощували в 5 мл середовища YNB (1% глюкоза) за температури 37 °C протягом ночі. Далі клітини переносили в дві колби з 150 мл середовища YNB (3% глюкоза) або YPEt з початковою OD<sub>590</sub>~ 0,1. До однієї з двох колб додавали іони кадмію (0,1-100 мкМ) або іони міді, цинку, хромату (25 мкМ) та інкубували впродовж 1, 2 або 4 годин. Клітини збирали, двічі промивали водою і заморожували для подальшого визначення активності AOX та концентрації білка.

Питому активність АОХ визначали у безклітинних екстрактах, як попередньо описано [131]. Для якісного виміру активності АОХ у дріжджових клітинах використовували метод, описаний раніше [216]. **2.2.10. Визначення активності у-глутамілцистеїнсинтетази.** Клітини дріжджів *H. polymorpha* попередньо вирощували у 3 мл сірко-дефіцитного середовища Б за присутності 38 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 мМ цистеїну (*gsh1* та  $\Delta gsh1/met1$ ) або 0,1 мМ GSH ( $\Delta gsh2$ ) за температури 37 °C впродовж 1 доби і переносили у 125 мл аналогічного середовища з початковою OD<sub>590</sub> ~0,04 та вирощували до пізньої логарифмічної фази. Клітини мутанта  $\Delta gsh2$  та штаму дикого типу, вирощені за присутності 0,1 мМ GSH двічі відмивали стерильною водою і переносили на інкубацію в середовище Б з 0,1 мМ цистеїном на 6 годин. Клітини *H. polymorpha* штамів дикого типу різних генетичних ліній попередньо культивували у 20 мл стандартного синтетичного середовища (2% глюкоза) впродовж 2 діб. Далі клітини переносили у 125 мл аналогічного (NCYC495 *leu1-1* і CBS4732 *leu2-2* до OD<sub>590</sub> ~3,0 та DL-1 *leu2* до 5,0) і стаціонарної фаз. Клітини збирали, двічі промивали водою і заморожували для подальшої гомогенізації.

Для визначення активності уGCS використано раніше описаний метод [217] з деякими модифікаціями. Клітини ресуспендували в 1 об'ємі 100 мМ Тріс-HCl буфера pH 8,0, що містив 2 мМ ЕДТА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ KCl, 5 мМ глутамат та 2 мМ PMSF, додавали 1 об'єм склянних кульок (діаметр 0,425-0,6 мм; Sigma) і гомогенізували на дезінтеграторі (20 хв, режим 90) за температури 4 °С. Після центрифугування (15000 х g, 20 хв, 4 °С) 250-300 мкл супернатанту діалізували на колонці з сефадексом G-25 (0,76 х 5,5 см), попередньо зрівноваженій аналогічним Тріс-НСІ буфером, але без PMSF. Аліквоти по 200 мкл діалізованого супернатанту збирали і визначали білок. Білкову криву будували в залежності від поглинання аліквот при 280 нм. Першу половину піку (рис. 2.1), яка ймовірно містила низькомолекулярні a фракції з найбільшою компоненти відсікали, концентрацією білка об'єднували і використовували для визначення активності γGCS.

Інкубаційна суміш для визначення активності γGCS містила 135 мкл екстракту, позбавленого низькомолекулярних компонентів (2-3 мг/мл білка),



Рис. 2.1. Білкова крива залежності поглинання аліквот діалізованого безклітинного екстракту дріжджів *Н. роlymorpha* штама дикого типу NCYC495 *leu1-1* при 280 нм. Аліквоти 1-3 і 7-11 викидали, тоді як аліквоти 4-6 об'єднували та використовували для визначення активності γGCS

25 мкл 100 мМ глутамату, 25 мкл 100 мМ цистеїну/1,2 М ДТТ, 12,5 мкл 100 мМ АТР, 25 мкл 100 мМ фосфоенолпірувату, 10 мкл 1 М Тріс-HCl pH 8,0, 2,5 мкл 0,5 М MgCl<sub>2</sub>, 3,5 од. а. піруваткінази. Аналогічна реакційна суміш, але без цистеїну була використана як контроль. Реакцію проводили за температури 37 °С протягом 1 години. Після цього інкубаційну суміш у загальному об'ємі 250 мкл обробляли 37,5 мкл борогідриду натрію (1 мг/мл в 2,5 М NaOH) впродовж 5 хв за кімнатної температури. Для осадження білків додавали 50 мкл 3,5 М HCl, інкубували 10 хв на льоді і центрифугували при 12000 х g, 10 хв. Супернатант фільтрували і наносили на ВЕРХ колонку. Розділення проводили на колонці Мегск Lichrosphere 100 RP-18 з розчинником A (0,05% фосфорна кислота) та розчинником Б (ацетонітрил). Починали при 100% A, тоді застосовували градієнт до 20% Б в межах 20 хв. Для детекції тіольного дипептиду використовували реактив Елмана (100 мг/л в 0,05 М калій фосфатному буфері pH 8,0), абсорбцію вимірювали при 410 нм. Продукт γGCS реакції, γ-глутаміл-цистеїн, ідентифікували використовуючи автентичний компонент (Sigma) для калібрування. Активність γGCS виражали у нмоль\* год.<sup>-1</sup>\* мг білка<sup>-1</sup>.

2.2.11. Визначення активності у-глутамілтрансферази. Для визначення активності уGT було використано метод, описаний раніше [64], з деякими модифікаціями. Безклітинні екстракти (0,1-0,2 мг білка) інкубували в 0,5 мл реакційної суміші, що містила 0,1 М Тріс-HCl pH 7,5 і 2,5 мМ L-глутамат у-(nнітроанілід) впродовж 3-4 годин за температури 37 °С. Реакцію зупиняли 0.3 ΜЛ 3.5 Μ оцтової кислоти. Зразки осаджували додаванням центрифугуванням (10000 х g, 5 хв). Утворення р-нітроаніліну вимірювали в супернатанті спектрофотометрично при 410 нм (M<sub>ε</sub> 8800 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Активність ферменту виражали в мкмоль\* год<sup>-1</sup>\* мг білка<sup>-1</sup>.

2.2.12. Флуоресцентна мікроскопія. Флуоресцентну мікроскопію здійснювали згідно з [154] з деякими модифікаціями. Клітини (штами диких типів та делеційні ggt мутанти), вирощені в синтетичному середовищі А до OD<sub>600</sub> ~ 1,0-2,0, відмивали водою і ресуспендували до OD<sub>600</sub> ~ 1,0 в 10 мл ідентичного свіжого середовища, що містило 100 мкМ монобромобіман. Після 3 26 °C годин клітини вирощування протягом за осаджували центрифугуванням, двічі відмивали 0,1 М Na-фосфатним буфером рН 7,2. Частину клітин, вирощених впродовж 3 годин (3 год-0), відразу ресуспендували з  $OD_{600} \sim 1.0$  в 0,1 М Na-фосфатному буфері рН 7,2, що містив 3% глюкозу та інкубували наступні 16 годин (3 год-16) за 26 °С. Всі клітини 3 год-0 та 3 год-16 вивчали без фіксації під флуоресцентним мікроскопом Nikon з фазовоконтрастним додатком.

**2.2.13.** Транспорт електрофільних сполук з клітин дріжджів. Клітини (штами диких типів та мутанти  $\Delta ggt1$  і  $\Delta cis2$ ) вирощені в синтетичному середовищі А до OD<sub>600</sub>~ 1,0-2,0 відмивали водою і ресуспендували до OD<sub>600</sub>~ 1,0 в ідентичному свіжому середовищі, що містило 100 мкМ монобромобіман

(клітини I) або без електрофілів (клітини II). Після вирощування протягом 3 годин за 26 °С клітини I і II осаджували центрифугуванням та двічі відмивали холодною водою. Після цього клітини I і II відразу ресуспендували в 1-2 мл ( $OD_{600} \sim 50,0$ ) 0,1 M Na-фосфатного буфера рН 7,2, що містив 3% глюкозу та інкубували 1 годину за 26 °С (буфер для клітин II додатково містив 30 мкМ N-[1-піреніл]малеімід). Супернатанти центрифугованих клітин зберігали замороженими на –20 °С і потім наносили на колонку С18µ для вивчення похідних монобромобіману та N-[1-піреніл]малеїніміду у зовнішньоклітинному середовищі.

Похідні елюювали з колонки C18µ Bondapak (300 x 39 мм) у BEPX апараті з лінійним градієнтом ацетонітрилу (0% -100%), що містив 0,05% трифтороцтову кислоту. Детекцію похідних N-[1-піреніл]малеїніміду і монобромобіману проводили шляхом виміру поглинання при 340 нм і 400 нм, відповідно. GSH-кон'юговані похідні, так само як і цистеїн та N-ацетилцистеїнкон'юговані похідні N-[1-піреніл]малеїніміду і монобромобіману були ідентифіковані як автентичні компоненти синтезовані неферментативно, як описано раніше [157]. Оскільки, N-[1-піреніл]малеїнімід-SH-вмісні кон'югати можуть формувати димери, нами було ідентифіковано два піки GSHкон'югованого N-[1-піреніл]малеїніміду (час затримки на колонці: 19,2; 19,8 хв), цистеїн-N-[1-піреніл]малеїніміду (час затримки на колонці: 19,8; 20,8 хв) і N-ацетилцистеїн-N-[1-піреніл]малеїніміду (час затримки на колонці: 19,9; 21,1 хв).

**2.2.14. Визначення фітохелатинів і глутатіону.** Клітини штамів дикого типу дріжджів *H. polymorpha* попередньо вирощували в 20 мл стандартного синтетичного середовища YNB (1% глюкоза) або багатого середовища YPD за температури 37 °C протягом однієї доби. Далі клітини переносили в дві колби з 100 мл аналогічного середовища з початковою OD<sub>590</sub>~ 0,01. У середині експоненційної фази росту до однієї з двох колб додавали іони кадмію (0,1 мМ або 0,3 мМ) та інкубували впродовж 2-23 годин. Клітини осаджували центрифугуванням, двічі промивали водою і ліофілізували. PC і GSH визначали

у безклітинних ліофілізованих сирцевих екстрактах при взаємодії з реактивом Елмана, як описано для дріжджів *S. pombe* [218]. Час затримки PC і GSH на ВЕРХ колонці становить 20 хв і 5,5 хв, відповідно.

2.2.15. Визначення вмісту рибофлавіну. Вміст рибофлавіну визначали у культуральній рідині флюорометрично на флюорометрі Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33, використовуючи синтетичний рибофлавін як стандарт.

**2.2.16.** Визначення вмісту заліза. Вміст заліза у клітинах визначали з 2,2дипірідилом як описано раніше [219].

2.2.17. Вивчення акумуляції іонів кадмію. Дріжджову колонію інокулювали в 20 мл середовища YNB (глюкоза 1%) з 0,1 мМ глутатіоном, інкубували 2 доби і переносили в 125 мл аналогічного середовища з вихідною OD<sub>590</sub>~ 0,1 та вирощували до пізньої логарифмічної фази (OD<sub>590</sub>~ 4-8). Клітини збирали центрифугуванням, стерильно відмивали 1 раз водою і переносили в 50 мл середовища YNB без або з глюкозою (2%) без глутатіону до кінцевої густини 1 × 10<sup>8</sup> клітин/мл. Суспензію клітин преінкубували 30 хв за температури 28 °C при постійному перемішуванні. Поглинання іонів важких металів ініціювали додаванням CdCl<sub>2</sub> до кінцевої концентрації 0,3 мМ. Після інкубації за температури 28 °С впродовж 1 години, клітини двічі відмивали водою, осад обробляли 0,25 мл 6 М HNO<sub>3</sub> протягом ночі і розводили до 0,5 М азотної кислоти (перше розведення). Вміст іонів кадмію визначали в 5 мл 20 кратно розведеного 0,5 М азотною кислотою зразка (друге розведення) на полум'яному атомному абсорбційному спектрофотометрі (Perkin-Elmer 1100B) при 228 нм. Вміст іонів кадмію визначали за калібрувальною кривою, яку будували за стандартним розчином CdCl<sub>2</sub>xH<sub>2</sub>O (7,18 мг/л, що відповідало 4 мг/л іонів Cd<sup>2+</sup>). Акумуляцію іонів кадмію вираховували як різницю абсорбції іонів кадмію клітинами, інкубованими з глюкозою (енергізовані клітини), і без джерела вуглецю (неенергізовані клітини) на мг сухої ваги клітин.

**2.2.18.** Транспорт іонів кадмію в дріжджові клітини. Для визначення кількості кадмію сорбованого на поверхні клітини, а не поглинутого всередину

клітини, досліджували транспорт, як описано вище для акумуляції іонів кадмію, але за присутності або відсутності 1 мМ азиду натрію.

2.2.19. Статистичний аналіз експериментальних даних. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали стандартними методами, за допомогою статистичної програми SigmaPlot 11.0, використовуючи *t*-критерій Ст'юдента.

Підсумки. У матеріалах досліджень дисертаційної роботи описано 37 штамів дріжджів, 12 з яких отримано в даній роботі; 16 плазмід, 11 з яких сконструйовано у даній роботі, а також склад поживних середовищ для дріжджів. У методах досліджень описано молекулярно-генетичні та біохімічні методи, а також програмне забезпечення, використане в роботі.

#### РОЗДІЛ З

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою полегшення сприйняття та систематизації експериментальних даних, отриманих в роботі, в додатку А представлено загальну схему досліджень.

## 3.1. Ідентифікація та функціональний аналіз гена GSH1/MET1 H. polymorpha

3.1.1. Молекулярне клонування гена GSH1/MET1 Н. polymorpha, що функціонально комплементує мутацію gsh1. Попередньо нами було описано клонування фрагмента хромосомної ДНК розміром ~ 7-9 т.п.н. з бібліотеки генів штама CBS4732 *Н. роlymorpha*, який функціонально комплементував глутатіон-залежний фенотип мутанта gsh1 [199, 220-222]. Отримані Gsh<sup>+</sup>трансформанти відновлювали здатність до росту на GSH-дефіцитному синтетичному середовищі з метанолом та глюкозою і набували резистентності іонів кадмію чутливості N-метил-N'-нітро-N-ЛО та хромату і до нітрозогуанідину (MNNG) подібно до штама дикого типу (табл. 3.1). Подальші дослідження встановили, що плазміда pG1, виділена з Gsh<sup>+</sup>-трансформантів мутанта gsh1, містила фрагмент геномної ДНК *H. polymorpha* розміром 8,6 т.п.н., вбудований у сайт ВатНІ плазміди рҮТЗ. Було визначено нуклеотидну послідовність даного фрагмента геномної ДНК (рис. 3.1, а,б) та проведено її комп'ютерний аналіз, який виявив присутність принаймні чотирьох ВРТ. ВРТ1 виявляла гомологію до гена *CDC5 S. cerevisiae*, що кодує білок (574 а.з.), залучений в регуляції цитокінезу; ВРТ2 – до гена, що кодує гіпотетичний білок (355 а.з.): ВРТЗ – до гена, що CDPкодує алкогольфосфатидилтрансферазу (286 а.з.) S. cerevisiae, яка бере участь у метаболізмі фосфоліпідів; ВРТ4 виявилась гомологом гена MET1 S. cerevisiae,

64

Ростові характеристики метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу, мутанта *gsh1* і трансформанта *pG1* за присутності метанолу, іонів кадмію і хромату та MNNG

	Ріст на синтетичному середовищі					
Штами	Глюкоза 1%	Метанол 1%	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 0,2 мМ	CdSO <sub>4</sub> , 0,1 мМ	MNNG,* 0,4 мМ	
NCYC495 <i>leu1-1</i>	+++	++	++	++	_	
gsh1 leu1-1	_	—	_	_	+++	
pG1	++	+	++	+++	_	

Примітка. Ріст дріжджів оцінювали на третю добу інкубації за температури 37 °C: (+++) – дуже інтенсивний ріст; (++) – інтенсивний ріст; (+) – слабкий ріст; (-) - відсутній ріст. \*Середовище для мутанта *gsh1* додатково містило 1 мкМ GSH

що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилазу (527 а.з.), яка відповідає за біосинтез сірогему (рис. 3.2) [112]. З метою з'ясування, яка з вказаних ВРТ, розташованих на даному фрагменті, здатна комплементувати Gsh<sup>-</sup>-фенотип точкового мутанта gsh1, була вибрана наступна стратегія Плазміду субклонування даного фрагмента. pG1 було оброблено ендонуклеазою рестрикції SacI та отримано субфрагмент розміром 4,4 т.п.н., що містив ВРТ2 і ВРТ3, і субфрагмент розміром 5,3 т.п.н., що містив ВРТ4 (див. рис. 3.2). Далі фрагмент розміром 4,4 т.п.н. лігували з вектором рҮТЗ, а фрагмент розміром 5,3 т.п.н. – з векторами рУТЗ та рУТ1, ліанеризованими по сайту SacI. Отримані плазміди було використано для трансформації мутантного штама gsh1 leu1-1 дріжджів Н. polymorpha. Показано, що лише плазміди (рҮТ1+5,3 т.п.н.) і (рҮТ3+5,3 т.п.н.) трансформували вищезгаданий штам до  $Leu^+Gsh^+$ -фенотипу. Через ретрансформацію *E. coli* з отриманих дріжджових трансформантів виділено плазмідні ДНК, ідентичні до (рҮТ1+5,3 т.п.н.) і (рҮТ3+5,3 т.п.н.). Дослідження мітотичної стабільності цих трансформантів у

#### a

AGTATGGGCTAAATCAATGGGCTCGTGTGAGCTCCTTACTGGAGAAGAAAACAGCCCAAACAATGTAAGATGAGATGGCAAGAATGGCTCGAATCAAAAAAGCTCGAATGGACCAAAGAGGAAGACCA GGAGCAAGAGGAGGAAAGCGATCCATTGGAGCCAAAAGAATCGCTGAGTAGCAAGCTGGCCAAGCTGCCCGCTGAATGACTTTGAGATTGTGGACAGCGACGAGCAGCGAGGAGGAGGAGCGGGCGCGCCCACAG  $\label{eq:constraint} Constraint Constrain$ CTTGCTGGACTTTCI AACAGTTGACTCATCGTCGGACAGAGCAGATGACGACTCGTCGATGCAAGTCAGATACCACGTGGGAATTCGAGTTCTGTGTGGATTCCATAGGACTCCAACGACTTGGAAAGCTCCATCTTCTTTCCGGAATAC  ${\tt G} {\tt A} {\tt G} {\tt G} {\tt G} {\tt A} {\tt G} {\tt A} {\tt A$ CAATCGCCCGTCATGGACATGTTGGTCCCCTCAGTTCTAACGGAGGGCCCCGGAGCGATTTATCTGTGAATAGTCATGCACAATGCAACAAATAGATGGTCTGAATGGCGTGTATGTTGTGTAACTTTAAAAGGA TGTCTAATCTTCTTGCAAGTCCGTAGTCCGAAAGCCACACCGTGCGCTAGCCCGCAGAGCTC б 

${\tt TTAGACGCGATTGCTAAATGTCACTTACCCAAAATGATGACGAACGA$
${\tt GAATACCGCAACGTTCTAATAATCCAAAATATTTCCCAAGACGGGAAAAAAAA$
${\tt TCCTAATACGCCGATTATGTCGTGTAATGACCGTTCGCACATGAGTCTCATGGTATCCTTCCT$
${\tt TGGAGGCCGGCTTTCCACAGCCTTCAAAACATCGATCAAATCTCCCCAATCTGGTGCGGGATCAGACGCTGGTCTGGACACGAGGCTCTTTCCACCACACACGGGCAGATCTGTGGGCCATTTTCTGTCATAT$
$\label{eq:accalc} Agcaacdgcagaatatccgaccatcttttccccdgccacatcaaaaccccdctttttcccctdttttcccctdttttcccctdtaaaacccdgccgcaaatccgcdcacatcaaaacccdgctcggagaaatccgcdcacatcaaaacccdgttccgdcdgagaaatccgcdcacatcaaaaccaaaacccdgttccgcdcacatcaaaaccaaaacccgdcacatcaaaaccaaaaccaaaaccaaaaccaaaaccaaaaccaaaa$
${\tt CGTCTCTGTGGGTAGTAGGCACGGTGGCAACAACCGGTGCTACCAGCGCCGACGTGAGGCCCGGCATCACAACAGGCTTATAGCCGTGCGAAGCAAGAAATTGTACTCCTCGCCCCCGCGACCGAAAATGTA$
${\tt CGGATCTCCCTGTTTGAGACGGACAATGTGTTTTCCCCGTTGGAGGGTTTTCGATCCCGATGTTGAGCAGCTCCTGCTGTGCGGTTTTCGGCGATGTTTCTGGCGATGAAAATCTCCGGTTTTCTTATCGCGATGTGAGAAAATCTCCGGTTTTCTGAGCAATGTCGGCGATGTTCGGCGATGTTGAGCAGCTCCTGTTGTGGCGTTTTCGGCGTTTTCGGCGATGTTGAGCAGCTCCTGTGTGGCGTTTTCGGCGTTTTCGGCGATGTTGAGCAGCTCTGTGGCGTTTTCGGCGTTTTCGGCGATGTTGGCGGGGAATGTTTCGGCGTTTTCGGCGATGTTGGGCGTTTTCGGCGTTTTCGGCGATGTTGGGCGTTTTCGGCGTTTTCGGCGGGGGAATGTTTCGGCGGGGGAATGTTTCGGCGGTGTTGGGCGTTTTCGGCGGTGTTGGGCGTTTTCGGCGG$
${\tt GGAATAATGTCTATGATCTGCCGCGCCACGGATCAGGATAAGATCTGCATTGTAGATCTCGTGCAAGGCGCCCCACCGTCAGCATCGGCCAGGGATCCCGACCAGAGAAATGCCGGCCACGGTCCGGCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCCGGTCCGGCCAGGAAATGCCGGCCACGGTCCGGTCCGGTCCCGGTCCGGTCCCGGTCCGGTCCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCGGTCCGGTCCGGTCGGTCCGGTCCGGTCGGTCCGGTCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCGGTCCGGTCGGTCGGTCGGTGTGTGGTG$
${\tt cctttttagtatcgtcctgtccgttccaccacaggcatatttgcgtaagcatcggtcagatcggataggataggataggataggataggatagtactcaattatctgcgaaagccatctaggtctttttttt$
${\tt GGCATCCTTGACGTCATCCAGAATATCCTCGCTGCTCAATGGAATGGATCCTGCGCTTCAAATTGCCGATGTTAGCGATCCGGTCCAAGTTTTCAGGCAGCTTCTGAAAAATCTCTCTTTTTAGC$
${\tt CGGTTCGCCAGCTTCGCAGCCTCGGGGGTGGTTGTCACTCCTAGCTGGAAATCGCCCTTCTTGTAGTAGATAACATTGTGAACGACGAAGTTCAGACGAGTGGTGGTGGTGGTGGTCGACGGAATTCTCAATTTCT$
${\tt TGCACCGCTCAAAGAGTTGCCGCTTGATTGGGTGGTCGCTCTTCATCGTGACAAAAAACCCCGGTCGACAAACGTTATCGACCTCGCAGCGACCAAACGTCTCCCGAACCTCGCCGACCAAACGTCTCCGACAACGTCTCCGACAACGTCTCCGACCAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCGCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCTCCGACAAACGTCGCGCGACAAACGTCGCGACAAACGTCGCGACAAACGTCGCGACAAACGTCGCGACAAACGTCGACAAACGTCGCGACAAACGTCGACAAAAAAAA$
${\tt TTCAAGCTCCTGCTGGTTGAAGAGCGCATTGTTCAAAGCCTGCACGCCAAGTTCTCGTTGACGAGGATCGGCCTGGCCCCAGACGCGATGATGTGGTGGTGATGCCGCCTGATGACCACGCGCGACAGATTTTCT$
${\tt GAGTCGTCGATGATCAGGTGGTGCTCGCCAGAGCATTCGTGAGCACACAGAAACTT {\tt CAT} {\tt TCTTGCAAGGAGAACGTTTAGGGGATTGATTTTTTTTTT$
${\tt cggagaataatgagacgggaatgaaatgtgcgttgataggtgctggcggagataatctgtggggcatggagcaatggcgaggatgatggcaaggatgatggcaaaggctggcgaggatgatgtgtgtg$
TTCATATTGAGAAACTGTGACGCACATCTCTACATCTTCTCCCGATTTATTT
${\tt GCAAGAATGAACCAGAGCCCGAGGAGGCTCCAGTGACCAACGAGCTAACTGTGGAGCTTCCGCAAGAGGTGGATGCTGACGATCCTCTGCGCCAACTCGAAGGATTATGGCTTACGTGGATAAGATCCCCCTG$
GAATACTTGTTGATAAAAAAACTACATACAAATGAGTGTGAGGTGTCATGAATTTTATTGCAGACGGGTTTTCATTCTGGAGTGCCG

Рис. 3.1. 5'-3'-нуклеотидна послідовність вставки 8,6 т.п.н. в складі плазміди pG1 до сайту SacI, що включає ВРТ1, ВРТ2 і ВРТ3 (*a*), та від сайту SacI, що включає ВРТ4 у протилежній орієнтації до ВРТ1, ВРТ2 і ВРТ3 (*б*). Сайт впізнавання ендонуклеази SacI позначено підкресленим шрифтом, сайт початку транскрипції – курсивом, а промоторна ділянка гена виділена сірим фоном

багатому середовищі YPD додатково підтвердило, що обидві BPT4-вмісні плазміди (рYT1+5,3 т.п.н.) і (рYT3+5,3 т.п.н.) підтримувалися автономно у



Рис. 3.2. Схема лінеаризованої плазміди pG1 та субклонування фрагмента геномної ДНК розміром 8,6 т.п.н., що містить ген *GSH1/MET1 H. polymorpha*. Ген *LEU2 S. cerevisiae* позначено чорною пунктирною лінією, фрагмент геномної ДНК *H. polymorpha* 8,6 т.п.н. – товстим посмугованим відрізком, автономний елемент реплікації (ARS) *H. polymorpha* – товстою сірою смугою, бактерійну частину вектора pUC19 – тонкою чорною лінією.

клітинах дріжджових трансформантів і відповідали за відновлення фенотипу Leu<sup>+</sup>Gsh<sup>+</sup>. Окрім тестування на здатність відновлювати ріст на селективному середовищі (без додавання лейцину та GSH), трансформанти, що містили ВРТ4 у складі плазмід рYT3 (pG1-36) та рYT1 (pG1-47), також досліджували на здатність відновлювати рівні загального клітинного глутатіону (GSH+GSSG). Для цього штам дикого типу, мутант gsh1 та Gsh<sup>+</sup>-трансформанти були попередньо вирощені у мінімальному синтетичному середовищі з глюкозою (1%) до лагорифмічної фази і далі перенесені на інкубацію в аналогічне середовище без або з іонами кадмію на 13 годин. Вихідне ростове середовище для мутанта gsh1 додатково містило 0,05% дріжджовий екстракт. Показано, що рівні GSH+GSSG у трансформанта pG1-47 були у 2,3, у pG1-36 - y 2,8 та у pG1– у 3,1 раза вищими, ніж у точкового мутанта gsh1 за нормальних умов вирощування. За інкубації з іонами кадмію рівні загального клітинного GSH+GSSG трансформантів pG1-47, pG1-36 та pG1 перевищували відповідний показник точкового мутанта gsh1 у 10,4, 14,7 та 11,3 раза, відповідно (рис. 3.3). Однак, за обох умов культивування дані показники у всіх Gsh<sup>+</sup>-трансформантів були трохи нижчими за відповідні показники штама дикого типу (див. рис. 3.3).



Рис. 3.3. Рівні загального клітинного GSH+GSSG у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу NCYC495 *leu1-1* (*WT*), мутанта *gsh1* та трансформантів *pG1*, *pG1-47* і *pG1-36* в залежності від присутності іонів кадмію:  $\square$  контроль,  $\blacksquare$  100 мкМ іони кадмію

Також було показано, що трансформанти pG1-47 та pG1-36, що містять ВРТ4-вмісні плазміди, набували резистентності до іонів важкого металу кадмію та чутливості до MNNG на твердому синтетичному середовищі з глюкозою подібно до трансформанта pG1 (табл. 3.2).

ВРТ4 довжиною 1539 п.н., позначена як ген *GSH1/MET1*, кодує білок розміром 513 а.з. з ймовірною молекулярною масою 58 кДа.

Таблиця 3.2

	Ріст на синтетичному середовищі з глюкозою (1 %) та лейцином				
Назва штаму	IC.	CdSO <sub>4</sub> , мМ			MNNG,
	Контроль	0,1	0,4	1	0,4 мМ
NCYC495 leu1-1	++	+±	Ŧ	_	_
gsh1 leu1-1	+±	±	_	_	++
pG1	+++	+++	++	+±	_
<i>pG1-47</i> (pYT1 + BPT4)	+++	+++	++	+	_
<i>pG1-36</i> (pYT3 + BPT4)	+++	+++	++	+	_

Чутливість дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу, мутанта *gsh1* та трансформантів *pG1*, *pG1-47* і *pG1-36* до іонів кадмію та MNNG

Примітка. Ріст дріжджів оцінювали на третю добу інкубації за температури 37 °C: (+++) – дуже інтенсивний ріст; (++) – інтенсивний ріст; (+±) – помірний ріст; (+) – слабкий ріст; (±) – дуже слабкий ріст; (–) - відсутній ріст. Ростове середовище для мутанта *gsh1* додатково містило 10 мкМ GSH

Отже, ген *GSH1/MET1* у складі плазмід рYT1 та рYT3 відповідає за відновлення  $Gsh^+$ -фенотипу у мутанта *gsh1 leu1-1* стосовно росту на GSHдефіцитному синтетичному середовищі, рівня глутатіону, чутливості до MNNG та резистентності до іонів кадмію. Ауксотрофність за лейцином комплементується гетерологічним геном *LEU2 S. cerevisiae*, розміщеним у складі плазмід рYT1 та рYT3. Плазміди (рYT1+5,3 т.п.н.) та (рYT3+5,3 т.п.н.) підтримуються автономно в клітинах дріжджових трансформантів.

3.1.2. Аналіз амінокислотної послідовності гіпотетичного білкового продукту гена GSH1/MET1 H. polymorpha. Порівняння амінокислотної послідовності білкового продукту гена GSH1/MET1 Н. polymorpha (HpGsh1p/Met1p) з комп'ютерними базами даних виявило значну подібність між HpGsh1p/Met1p та білками інших дріжджів, що містять уропорфіриноген III трансметилазний домен. Білком з найвищим ступенем загальної подібності виявилась ймовірна уропорфірин-3 С-метилтрансфераза з С. albicans (51%) ідентичності, 70% подібності, Entrez-Protein Accession No. EAK96258.1). H. polymorpha Met1p також виявляє 50% ідентичності та 70% подібності до ймовірної уропорфірин-3 С-метилтрансферази з Dekkera bruxellensis (Entrez-Protein Accession No. gb|EIF49502.1|). Іншими білками з високою подібністю є: S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилаза з P. pastoris (49% ідентичності та 69% подібності, Entrez-Protein Accession No. CAY67134.1), Sаденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилаза з S. cerevisiae, ScMet1p, (43% ідентичності і 59% подібності, Entrez-Protein Accession No. NP 012995), ймовірна уропорфірин метилтрансфераза з S. pombe (42%) ідентичності, 60% подібності, Entrez-Protein Accession No. NP 588414.1) та уропорфірин-ІІІ С-метилтрансфераза з *N. crassa* (38% ідентичності, 54% подібності, Entrez-Protein Accession No. CAE76594). Суттєво нижчу подібність також встановлено до багатофункціонального білка CysG, сірогемсинтази з Е. *coli* (28%) ідентичності, 48% подібності, Entrez-Protein Accession No. CBG36455). Порівняльний аналіз білкової послідовності ймовірного білка Gsh1p/Met1p H. polymorpha з гомологічними білками з C. albicans, D. bruxellensis, P. pastoris, S. cerevisiae, S. pombe, N. crassa та E. coli представлено на рис. 3.4.

Слід зазначити, що у С-кінцевій послідовності білка HpGsh1p/Met1p, виявлено значно вищий ступінь подібності, до вищезгаданих білків-ортологів, ніж у його N-кінцевій послідовності. Порівняння просторових структур Скінцевої і повнорозмірної послідовностей білка Gsh1p/Met1p *H. polymorpha* та

# Met1p *S. cerevisiae* також виявило значну їх схожість у С-кінцевій ділянці та суттєві відмінності у N-кінцевій частині білка (рис. 3.5).

HpMet1p CaUropor DbUropor PpUropor ScMet1p SpUropor NcUropor EccysG	1 1 1 1 1 1 1 1 1	MKFICAHECSGEHHLIIDDSENLSR VISRITNITASGAKPILVNENLAVQALNNAIFNQQE
HpMet1p CaUropor DbUropor PpUropor ScMet1p SpUropor NcUropor EccysG	73 76 81 73 87 75 99 56	RDIETEGRCEVDNVVDRVFVTVKSDHPIMRQLFERCKKLRIPINTINSSDISSFTMLSTMKKOFQLGVTTH-SCKLANRLKREIVQ HYLTTLGRAEVDSIVDRVVVSIPSQLALKQEIMQRCKKLRIPVNTDSPDLCFTMLSTYTSOFQLGVTTNGKGCKLASRIKREIVN DDIEREGRSQVDGIVDRVFVDLAVNSNGDNWAICDALEQSIYSTCCRLRIPINVCNNLKRSTFSILSTYKONLQIGVTTNGCKLASRIKREIVN SGLTQLGRDEVDNVVDKVFVDLSQYAQLKKDISALCRRIPVSVDSPBLCSFTLSTYSNADFQLGVTTNGCKLASRIKREIVS SDLTTLGREVDNVVDKVFVDLPITQSRLCEEIFWGCQKLRIPINTFNKPJFSFNMTFWVDPKGSGLQISVTNGKGCKLASRIKREIVS FSLTTLGKEETEFIVDAVFVSESNHHEEIIFWGCQKLRIPINTDNPSLCSFTLSTSILSTYSNPLQISISTSNSCRLACRLEFFVS EDLTTLGREEVDNVVDAVFVDLPITQSRLGEIFWGCQKLRIPINTDNPSLCSFTLSTSNLTGKGCDISTSNSCRLACRLEFFVS GMLTLVEGFFDSIDTCVIAAFATDD
HpMetlp CaUropor DbUropor PpUropor ScMetlp SpUropor NcUropor EccysG	161 165 178 162 179 162 186 146	KLEENLORIVTNIGNLKRRIQFILSEDEEDIAINNHKENSFVPEFNKTQEDIKLGRARWLSQITEYYPISKLADIS ADLT SLESDILAICKQVGELRQIQMEDKAESEHGEDIAINNHKENSFVPEFNKTQEDIKLGRARWLSQIVEYYPINKLGSISIKDLS ELEQNIDEIVQHVGDLRFALVESDREHQRQLIRAMQRNNAHEDIAIQTSRLNQLVEBENMTKGKKLQRTRWLSQIVEYYPINKLGSISIKDLS TLESNITKVCENIGNLEHRIQGEDDQVEEIYNRLQLLGEDEDIAIQTSRLNQLVEBENMTKGKKLQRTRWLSQIVEYYPIGKLAEVSVDDLS HLEPNISEVVINNGYLKDRIINEDHKALLEEKYYQTDMSLPGFGYGLDDGGWESHKFNKLIREFETSRCQIKRTRWLSQIMEYYPMKLSJIKUVMTEDIL SLESGVEAIERFGRWRAITKTEKQ
HpMetlp CaUropor DbUropor PpUropor ScMetlp SpUropor NcUropor EccysG	225 251 262 256 279 212 282 202	DAYANMPVVERQDDTKKCRISLVGSGPGSLSMLTVGALHEIYNADLILADKLVPOOIIDIIPKKTEIF SAYKLHKQANVPGAKBEDSEAGOUTLVGSGPGSVSLLTLGALGIQTADLVLADKLVPOOIDDIPKKTEIF N
HpMetlp CaUropor DbUropor PpUropor ScMetlp SpUropor NcUropor EccysG	293 325 334 330 377 310 378 267	IARKFPGNAENAQQELINIGIENUQRGKHIVRLKQGDPYIFGRGGEEYNFFASHGYKPVWPGLTSALVAPVVATVETTHRDVSDQVLVCTGTGKKGK IARKFPGNAEKAQELLIIGLE IRRGEKVVRLKQGDPYIFGRGGEENFFSOHGFKPTVVPGITSALAAPVISNIEMTHRDVADQVLICTGTGRGA IARKFPGNACNAQQELHRIALESIKAGKVVRLKQGDPYIFGRGGEEYEFFVANGFRPVVPGISSALVAPAVAOIPTORDVSDQVLICTGTGRGA IARKFPGNAEKAQQELISKGLAIDAGKKVRLKQGDPYIFGRGGEEYEFFVANGFRPVVPGISSALVAPAVISOIPTORDVSDQVLICTGTGRGA IARKFPGNAERAQQELISKGLAIDAGKKVRLKQGDPYIFGRGGEENFFFSOHGYRPVVPGISSALAAPVISOIPTORDVSDQVLICTGTGRGA IARKFPGNAERAQQELIAKGLESIDNGLKVVRLKQGDPYIFGRGGEEYEFFOHGYRPVVPGISSALAAPVISOIPATQRDVADQVLICTGTGRGA IARKFPGNAERAQQELIAKGLESIDNGLKVVRLKQGDPYIFGRGGEEYEFFOHGYPVVPGISSALAAPVISOIPATQRDADQVLICTGTGRGA IARKFPGNAARAQDELHCVAFDALSGDYVVRLKQGDPYIFGRGGEEYEFFOHGYPVVPGISSALMAPISAGIFVTHRGVADQFLVCTGTGCKGS IARKFPGNADRAQDELLGVRGKTVIRLKQGDPIIYGRGGEEYEFFCHGYPVVPGITSSLSSLTATVIAOIPATQRDADQVLICTGTGCKGS IARKFPGNADRACEELLBOALEGVRAGKTVIRLKQGDPIIYGRGGEEVEFFEHGLGDVVVLPGITSSLSSIDATORDVSDQVLICTGTGKKG- FVGKRAGYHCVPGEEINCILLREAQKGKHVVRLKGGDPIIFGRGGEELETLCNAGIPFSVPGITAASCCSAYSCIFLTHRDVAQSVRITTGHKTGG
HpMet1p CaUropor DbUropor PpUropor ScMet1p SpUropor NcUropor EccysG	391 423 432 428 475 408 477 365	LED-LEAFOSNRTVVFIMSLGKWVDILE-LLYDRKWETDLEVCVVERASCPDORLIRTRLGDLIDVLKAVESRPPGLLVTGYS VEN-LPDFVSSRTVVFIMALHRVVELIELLVNDK
HpMet1p CaUropor DbUropor PpUropor ScMet1p SpUropor NcUropor EccysG	472 505 515 509 556 489 577 445	CEVICKLD-EGQKYLIEIGYHETHVRTSLHDIIGVLGEDKLPK CEVICKNSGSESLPWVVEEGCNSGDDGEIKRIVELVNGNCKESTAVVSPNLQKEIAA CLFIAKHLGPNEKYRIEIGY GCITEKLEKEWEVVEGWDDIGGSTILDTVSNLSK VNAUVEKDLINFDESRKFVIDEGFEEVDVDSLFKLY NTURNTA

Рис 3.4. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей ймовірного білка Gsh1p/Met1p з *H. polymorpha* (HpMet1p) з гомологічними білками з *C. albicans* (CaUropor), *D. bruxellensis* (DbUropor), *P. pastoris* (PpUropor), *S. cerevisiae* (ScMet1p), *N. crassa* (NcUropor), *S. pombe* (SpUropor) та *E. coli* (EccysG). Консервативні амінокислотні залишки виділені чорним кольором, а подібні – сірим кольором



Рис. 3.5. Гіпотетичні просторові структури С-кінцевих і повнорозмірних послідовностей білків Gsh1/Met1p *H. polymorpha* (HpGsh1p/Met1p – позначено червоним кольором) і Met1p *S. cerevisiae* (ScMet1p – позначено чорним кольором) та їх накладання одна на одну

За допомогою комп'ютерного аналізу проаналізовано доменну структуру білка Gsh1p/Met1p *H. polymorpha* та гомологічних білків з інших організмів. У

С-кінцевій послідовності білка HpGsh1p/Met1p виявлено тетрапіролметилазний мотив (243-452 а.з.) і на короткій ділянці уропорфіриноген метилтрансферазний мотив (UMT-1; 247-261 а.з.). Аналогічна доменна структура також характерна для С-кінцевої ділянки усіх вищезгаданих білків-ортологів (рис. 3.6). Однак, суттєві відмінності помічені у N-кінцевій послідовності білка HpGsh1p/Met1p.



Рис. 3.6. Схематичне представлення доменної організації Gsh1p/Met1p з *H. polymorpha* (HpGsh1p/Met1p) та гомологічних білків з *C. albicans* (CaUropor), *D. bruxellensis* (DbUropor), *P. pastoris* (PpUropor), *S. cerevisiae* (ScMet1p), *S. pombe* (SpUropor), *N. crassa* (NcUropor) і *E. coli* (EccysG). Мотиви UMT-1 та UMT-2 позначені квадратами та прямокутниками чорного кольору, відповідно; TP – тетрапірол
На відміну від білків-ортологів з *C. albicans*, *P. pastoris*, *N. crassa*, *S. pombe* та *E. coli*, які характеризуються наявністю  $NAD(P)^+$ -зв'язуючого домену в N-кінцевій послідовності, білок HpGsh1p/Met1p, подібно до Met1p S. cerevisiae та уропорфірин-3 С-метилтрансферази D. bruxellensis, характеризується його відсутністю. Отже. можна припустити, шо каталітична активність HpGsh1p/Met1p, залучена в реакціях SAM-залежного трансметилювання уропорфіриногену III в прекорін-2, локалізована в С-кінцевій ділянці білка, тоді як аміно-кінцева ділянка Gsh1p/Met1p, вірогідно, не бере участі в жодному ензиматичному перетворенні в біосинтезі сірогему і його функція залишається невідомою. Однак, в N-кінцевій ділянці білка HpGsh1p/Met1p виявлено наявність Coiled-coil структур (156-198 а.з.), які можуть бути складовою частиною транскрипційного фактора за типом "лейцинової застібки". Дані структури не були виявлені у білків-ортологів з інших організмів (див. рис. 3.6). Таким чином, аналіз молекулярної структури білка HpGsh1p/Met1p вказує на його потенційну можливість зв'язуватися з ДНК та регулювати експресію деяких генів.

В еволюційному плані, білок Gsh1p/Met1p *H. polymorpha* найближчий до ймовірної уропорфірин-3 С-метилтрансферази з *D. bruxellensis* та Met1p з *S. cerevisiae* (рис. 3.7).

Отже, можна припустити, що відсутність каталітичної активності білка Gsh1p/Met1p у мутанта *gsh1 H. polymorpha* може призводити не лише до нездатності асимілювати сульфати і синтезувати цистеїн, що є субстратом  $\gamma$ GCS, а й виконувати певну регуляторну роль. Виходячи з фізіологічної функції глутатіону в клітині, як компонента системи антистресового захисту, так і форми запасання органічної сірки, висловлено припущення, що регуляція синтезу GSH може здійснюватись як за участю механізмів загальної стресової відповіді, так і механізмів регуляції обміну сірки, складовим компонентом якої може бути ген *GSH1/MET1 H. polymorpha*.



Рис. 3.7. Еволюційне дерево білків з уропорфіриноген III трансметилазною активністю з *S. pombe* (SpUropor), *N. crassa* (NcUropor), *E. coli* (EccysG), *P. pastoris* (PpUropor), *H. polymorpha* (HpGsh1p/Met1p), *D. bruxellensis* (DbUropor), *S. cerevisiae* (ScMet1p) та *C. albicans* (CaUropor). Статистична вірогідність порядку розгалуження вказана у відсотках

Конструювання касети з делецією гена GSH1/MET1 3.1.3. ma отримання делеційних штамів *Agsh1/met1* H. polymorpha. 3 метою додаткового підтвердження того, що клонована з бібліотеки генів ВРТ є власне геном GSH1/MET1 отримано мутантні штами з делецією у цьому гені. Касету для делеції гена GSH1/MET1 Н. polymorpha було сконструйовано на основі плазміди рYT1+5,3 т.п.н., що містила клонований ген *HpGSH1/MET1* (рис. 3.8). *Hpgsh1/met1::ScLEU2*, Для конструювання мутантного алеля кодуючу послідовність амінокислотних залишків (1-178) гена GSH1/MET1 H. polymorpha замістили фрагментом ДНК, що містив маркерний ген LEU2 S. cerevisiae. З цією метою N-кінцевий фрагмент розміром 557 п.н., що відповідав промоторній ділянці гена *HpGSH1/MET1*, було ампліфіковано з геномної ДНК штама CBS4732 leu2 H. polymorpha шляхом ПЛР, використовуючи праймери VU5F та VU6R, що містили сайти HindIII та PstI, відповідно (див. табл. 2.3). Клонування

С-кінцевого фрагмента, розміром 1,509 т.п.н., що відповідав кодуючій та термінаторній послідовності гена *HpGSH1/MET1*, у 3'-фланкуючу ділянку гена *ScLEU2*, здійснили внаслідок вищеплення фрагмента BamHI/BamHI з плазміди pYT1+5,3 т.п.н. з наступним її самолігуванням. Сконструйована плазміда отримала назву pYT1\_C-GSH1/MET1. Її лінійна схема наведена на рис. 3.8.



1 т.п.н.

Рис. 3.8. Лінійні схеми плазмід рYT1+5,3 т.п.н., рYT1\_C-GSH1/MET1 та рY $\Delta$ HpGSH1/MET1. Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що містить ген *LEU2*, позначено товстою сірою смугою; промоторну та C-кінцеву ділянки гена *GSH1/MET1 H. polymorpha* – незабарвленим відрізком; ARS-елемент *H. polymorpha* – товстою чорною смугою, послідовність pUC19 – тонкою чорною лінією. Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; Sp, SphI; PI, PstI; Sa, SalI; XI, XbaI; BI, BamHI; SI, SacI

Клонування N-кінцевого фрагмента гена *HpGSH1/MET1* було здійснено у 5'-фланкуючу ділянку гена ScLEU2 на векторі рУТ1 С-GSH1/MET1 по сайтах HindIII/PstI. Сконструйована плазміда рУДНрGSH1/MET1 (див. рис. 3.8) була розщеплена ендонуклеазами рестрикції HindIII та SacI для вивільнення делеційної касети Hpgsh1/met1::ScLEU2 розміром 4,29 т.п.н., що містила ген S. LEU2 cerevisiae, фланкований 5'-(N-кінець) 3'-(С-кінець) та послідовностями гена GSH1/MET1 Н. polymorpha. Дана делеційна касета була використана для трансформації клітин *H. polymorpha* штамів NCYC495 leu1-1 ade11, CBS4732 leu2-2 ига3-20 та CBS4732 leu2-2 met2-2, методом електропорації [208]. Leu<sup>+</sup> трансформанти відбирали на глюкозовмісному середовищі без лейцину і далі аналізували на Gsh<sup>-</sup> фенотип методом відбитків на мінімальне глюкозовмісне середовище без лейцину та GSH. У результаті було відібрано 5 Leu<sup>+</sup>Gsh<sup>-</sup> трансформантів. Частота гомологічної рекомбінації ділянок ДНК гена GSH1/MET1 з відповідними послідовностями у складі делеційної касети у штамів NCYC495 leu1-1 ade11, CBS4732 leu2-2 ura3-20 та CBS4732 *leu2-2 met2-2* становила 0,8, 4,7 та 8,3%, відповідно. З даних Leu<sup>+</sup>Gsh<sup>-</sup> трансформантів було виділено хромосомну ДНК. Коректне заміщення гена дикого типу на мутантний алель було підтверджено за допомогою ПЛР аналізу з двома наборами праймерів: VU11F і VU12R – для дикого гена *HpGSH1/MET1* та VU13F i VU12R – для делетованого гена *Hpgsh1/met1* (див. табл. 2.3, рис. 3.9, а). У результаті ПЛР аналізу з геномної ДНК штама дикого типу синтезувався лише фрагмент 1,403 т.п.н., що відповідав гену *HpGSH1/MET1*, а фрагмент 2,386 т.п.н., що відповідав делетованому гену Hpgsh1/met1, ампліфікувався лише з геномної ДНК мутантних штамів. Результати ПЛР аналізу для штама дикого типу NCYC495 leu1-1 ade11 та мутанта Agsh1/met1 ade11 представлені на рис. 3.9, б. Схрещування отриманих мутантів *Agsh1/met1 ade11*, *Agsh1/met1* ura3-20 та Agsh1/met1 met2-2 з точковим мутантом gsh1 leu1-1 та відповідними штамами дикого типу показало, що відібрані мутанти *Agsh1/met1* та точковий мутант gsh1 належать до однієї групи комплементації, оскільки всі отримані

диплоїди *∆gsh1/met1* х *gsh1* були здатні до росту на мінімальному середовищі лише за присутності екзогенного GSH (табл. 3.3).



1 т.п.н.

Рис. 3.9. Схематичне представлення (*a*) та ПЛР аналіз (*б*) гена *GSH1/MET1 H. polymorpha* у штама дикого типу та відповідного делеційного мутанта. ПЛР праймери позначені як маленькі стрілки. Доріжка 2 і 4 містить праймери, специфічні до дикого алеля *GSH1/MET1*; доріжка 3 і 5 – праймери, специфічні до мутантного алеля  $\Delta gsh1/met1$ . Як матриці для ПЛР ампліфікації, були використані геномні ДНК штама дикого типу (*WT*, доріжка 2 і 3) і мутанта  $\Delta gsh1/met1$  (доріжка 4 і 5). ДНК маркер – доріжка 1. Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; PI, PstI; BI, BamHI; SI, SacI

3.1.4. Конструювання касети з делецією гена GSH2 та отримання делеційних штамів  $\Delta gsh2$  H. polymorpha. Відомо, що  $\gamma GCS \in \kappa пючовим$ ферментом в біосинтезі глутатіону. Ген GSH2 H. polymorpha, що кодує  $\gamma GCS$ , був попередньо клонований шляхом функціональної комплементації точкового мутанта gsh2 бібліотекою генів H. polymorpha [6]. З метою дослідження властивостей штама з делецією гена GSH2 та їх порівняння з властивостями точкового мутанта gsh2 та іншого глутатіон-дефіцитного мутанта gsh1

Ріст диплоїдних штамів дріжджів <i>Н. polymorpha</i> на синтетичному
середовищі в залежності від присутності екзогенного глутатіону

Назва штаму	+GSH	-GSH
∆gsh1/met1 ade11 x gsh1 leu1-1	++	_
∆gsh1/met1 ura3-20 x gsh1 leu1-1	++	_
∆gsh1/met1 met2-2 x gsh1 leu1-1	++	_
gsh1 leu1-1 x CBS4732 ura3-20 met2-2	++	++
Δgsh1/met1 ade11 x CBS4732 ura3-20 met2-2	++	++
Δgsh1/met1 ura3-20 x NCYC495 leu1-1 ade11	++	++
∆gsh1/met1 met2-2 x NCYC495 leu1-1 ade11	++	++

Примітка. Ріст диплоїдів оцінювали на четверту добу інкубації за температури 37 °С: (++) - інтенсивний ріст; (–) - відсутній ріст

(точкового та делеційного) було отримано мутанти з делецією в цьому гені. Касету для делеції гена *GSH2 H. polymorpha* було сконструйовано на основі плазміди pYT1 [203]. Для створення мутантного алеля *Hpgsh2::ScLEU2*, кодуючу послідовність амінокислотних залишків (1-574) гена *GSH2 H. polymorpha* замістили фрагментом ДНК, що містив маркерний ген *LEU2 S. cerevisiae*. Для цього N-кінцевий фрагмент, розміром 380 п.н., що відповідав промоторній ділянці гена *HpGSH2* і C-кінцевий фрагмент, розміром 1000 п.н., що відповідав кодуючій та термінаторній послідовності гена *HpGSH2*, було ампліфіковано з геномної ДНК штама CBS4732 *leu2 H. polymorpha* за допомогою ПЛР, використовуючи праймери VU7F і VU8R для N-кінця та VU9F і VU10R для C-кінця (див. табл. 2.3). N-кінець гена *HpGSH2* був клонований як HindIII/PstI фрагмент у HindIII/PstI сайти вектора pYT1, що містив ген *ScLEU2* (рис. 3.10). Отриману плазміду pYT1\_N-GSH2 було



Рис. 3.10. Лінійні схеми плазмід рҮТ1, рҮТ1\_N-GSH2 та рҮ∆НрGSH2. Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що містить ген *LEU2*, позначено товстою сірою смугою; промоторну та С-кінцеву ділянки гена *GSH2 H. polymorpha* – товстим посмугованим відрізком; послідовність pUC19 – тонкою чорною лінією. Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; Sp, SphI; PI, PstI; Sa, SalI; XI, XbaI; BI, BamHI; SI, SacI

розщеплено ендонуклеазами рестрикції XbaI і SacI та проведено її лігування з XbaI/SacI C-кінцевим фрагментом гена HpGSH2. Сконструйовану плазміду рY $\Delta$ HpGSH2 (див. рис. 3.10) гідролізували по сайтах HindIII і SacI для вивільнення делеційної касети Hpgsh2::ScLEU2 розміром 3,58 т.п.н., що містила ген LEU2 S. cerevisiae фланкований 5'- (N-кінець) та 3'- (C-кінець) послідовностями гена GSH2 H. polymorpha. Делеційну касету Hpgsh2::ScLEU2 було використано для трансформації дріжджів H. polymorpha штамів NCYC495 leu1-1 ade11 та CBS4732 leu2-2 met2-2 методом електропорації [208]. Leu<sup>+</sup> трансформанти відбирали на мінімальному середовищі з 1% глюкозою та

100 мкМ глутатіоном без лейцину. Далі Leu<sup>+</sup> трансформанти тестували на Gsh<sup>-</sup> фенотип методом відбитків на мінімальне середовище з 1% глюкозою без лейцину та глутатіону. В результаті було відібрано 4 Leu<sup>+</sup>Gsh<sup>-</sup> трансформанти. Частота гомологічної рекомбінації ділянок ДНК гена *GSH2* з відповідними послідовностями у складі делеційної касети у штамів NCYC495 *leu1-1 ade11* та CBS4732 *leu2-2 met2-2* становила 3,6 та 11,5%, відповідно. З даних Leu<sup>+</sup>Gsh<sup>-</sup> трансформантів було виділено сумарну геномну ДНК. Коректна заміна гена дикого типу на мутантний алель була підтверджена за допомогою ПЛР аналізу з двома наборами праймерів: VU15F і VU10R – для дикого гена *HpGSH2* та VU30F і VU31R – для делетованого гена *Hpgsh2* (див. табл. 2.3, рис. 3.11, *a*). В



1 т.п.н.

Рис. 3.11. Схематичне представлення (*a*) та ПЛР аналіз (*б*) гена *GSH2 H*. *polymorpha* у штама дикого типу та відповідного делеційного мутанта.

ПЛР праймери позначені як маленькі стрілки. Доріжка 2 і 4 містить праймери специфічні до дикого алеля *GSH2*; доріжка 3 і 5 – праймери специфічні до мутантного алеля *Agsh2*. Як матриці для ПЛР ампліфікації були використані геномні ДНК штама дикого типу (*WT*, доріжка 2 і 3) і мутанта *Agsh2* (доріжка 4 і 5). ДНК маркер – доріжка 1. Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; PI, PstI; SI, SacI, XI, XbaI

результаті ПЛР аналізу з геномної ДНК штама дикого типу синтезувався лише фрагмент 1,882 т.п.н., що відповідав гену *HpGSH2*, а фрагмент 1,115 т.п.н., що

фрагмент 1,882 т.п.н., що відповідав гену *HpGSH2*, а фрагмент 1,115 т.п.н., що відповідав делетованому гену *Hpgsh2*, ампліфікувався лише з геномної ДНК мутантних штамів. Результати ПЛР аналізу для штама дикого типу NCYC495 *leu1-1 ade11* та мутанта  $\Delta gsh2$  ade11 представлені на рис. 3.11, *б*. Проведено схрещування відібраних нами мутантів  $\Delta gsh2$  ade11 та  $\Delta gsh2$  met2-2 з точковим мутантом *gsh2 leu1-1* та відповідними штамами дикого типу. Результати схрещування показали, що диплоїди  $\Delta gsh2$  x *gsh2*, отримані на середовищі з GSH, нездатні до росту на синтетичному середовищі без додавання екзогенного GSH (табл. 3.4). Це свідчить про те, що алелі  $\Delta gsh2$  та *gsh2* є мутантними щодо одного й того ж гена.

Таблиця 3.4

Ріст диплоїдних штамів дріжджів *Н. роlymorpha* на синтетичному середовищі в залежності від присутності екзогенного глутатіону

Назва штаму	+GSH	-GSH
$\Delta$ gsh2 ade11 x gsh2 leu1-1	++	_
$\Delta$ gsh2 met2-2 x gsh2 leu1-1	++	_
gsh2 leu1-1 x CBS4732 ura3-20 met2-2	+++	+++
Δgsh2 ade11 x CBS4732 ura3-20 met2-2	++	++
∆gsh2 met2-2 x NCYC495 leu1-1 ade11	++	++

Примітка. Ріст диплоїдів оцінювали на четверту добу інкубації за температури 37 °C: (+++) – дуже інтенсивний ріст; (++) – інтенсивний ріст; (-) – відсутній ріст

3.1.5. Функціональний аналіз гена GSH1/MET1 H. polymorpha. Клонований ген *HpGSH1/MET1* може бути залучений у реакції сірогемзалежного відновлення сульфіту у шляху асиміляції сульфату і, відповідно, у шляхах біосинтезу сірковмісних амінокислот та GSH. У зв'язку з цим, ми вивчали вплив різних джерел сірки на глутатіон-залежний фенотип точкового gsh1 та  $\Delta gsh1/met1$  мутантів. Відомо, що потреба клітини в сірці може бути покрита за рахунок поглинання сірковмісних амінокислот, глутатіону або завдяки асиміляції сульфату (через послідовне відновлення до сульфіту і сульфіду) в органічні компоненти такі як цистеїн і/або гомоцистеїн [88, 99].

Подібно до мутанта metl S. cerevisiae, мутант  $\Delta gsh1/metl$  H. polymorpha не ріс у мінімальному середовищі з сульфатом і сульфітом, як єдиними джерелами сірки. Однак, на противагу до мутанта met1 S. cerevisiae, який задовольняв ростові потреби у сірці S-амінокислотами та їх похідними [108, 110], мутантний штам *Agsh1/met1 H. polymorpha* проявляв лише незначну здатність до асиміляції метіоніну і SAM та знижену ростову активність на Sаденозилгомоцистеїні і гомоцистеїні, як єдиному джерелі сірки (рис. 3.12, в). У сірко-дефіцитному середовищі, забезпеченому цистеїном або GSH, мутант  $\Delta gsh1/met1$  H. polymorpha проявляв повне відновлення росту. Поряд з цим, точковий мутант gsh1 H. polymorpha проявляв відсутність росту на неорганічних джерелах сірки (сульфат, сульфіт), незначну ростову активність на SAM і менш виражене зниження росту на метіоніні, S-аденозилгомоцистеїні і гомоцистеїні (див. рис. 3.12, б). Аналіз ростових характеристик вказує на те, що активність Gsh1/Met1 є абсолютно необхідною для росту на сульфаті та сульфіті, яка є пошкодженою у точкового та делеційного мутантів gsh1/met1 H. *polymorpha*. Пошкодження даного гена лише частково порушує здатність до росту на решті S-вмісних сполук (з метильного циклу). Фенотипову відмінність у рості мутантів metl S. cerevisiae і ∆gsh1/metl H. polymorpha можна пояснити відмінностями у шляхах асиміляції сульфату на етапі вбудовування H<sub>2</sub>S з утворенням гомоцистеїну у S. cerevisiae [88] і цистеїну у H. polymorpha [223], та відмінностями в ефективності вбудовування цистеїну і метіоніну у сірковмісні метаболіти у S. cerevisiae і H. polymorpha. Незважаючи на те, що метіонін і SAM можуть служити як єдине джерело сірки для дріжджів *H. polymorpha* (див. рис. 3.12, *a*), останні дослідження показали, що *H. polymorpha*, на відміну від *S*.



*cerevisiae*, характеризується значно вищою ефективністю вбудовування міченого <sup>35</sup>S-цистеїну у сіркові компоненти, а ніж <sup>35</sup>S-метіоніну [223].

Рис. 3.12. Ріст та клітинний рівень глутатіону у дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу (*a*) і мутантів *gsh1* (*б*) та  $\Delta gsh1/met1$  (*в*) в залежності від джерела сірки: 1 – сульфат, 2 – сульфіт, 3 – S-аденозилметіонін, 4 – S-аденозилгомоцистеїн, 5 – метіонін, 6 – гомоцистеїн, 7 – цистеїн, 8 – глутатіон. Клітини дріжджів інокулювали з початковою OD<sub>590</sub> 0,001. Ростові дані представлені на п'яту добу

Також було досліджено рівні клітинного глутатіону у дріжджів H. polymorpha штама дикого типу, точкового gsh1 та  $\Delta$ gsh1/met1 мутантів в залежності від джерела сірки. Показано, що рівень клітинного глутатіону у мутанта  $\Delta$ gsh1/met1 частково відновлювався лише за росту у сірко-дефіцитному середовищі за присутності гомоцистеїну, цистеїну або GSH, порівняно з відповідними показниками штама дикого типу (див. рис. 3.12, *a, 6*). За росту мутанта  $\Delta$ gsh1/met1 на середовищі з S-аденозилгомоцистеїном та метіоніном як сдиними джерелами сірки було зафіксовано лише залишкові рівні клітинного глутатіону. Поряд з цим, точковий мутант gsh1 характеризувався відновленням рівнів клітинного глутатіону за росту у сірко-дефіцитному середовищі за присутності цистеїну та GSH і частковим відновленням – за присутності гомоцистеїну, метіоніну та S-аденозилгомоцистеїну, порівняно з відповідними показниками штама дикого типу (див. рис. 3.12, *a, 6*).

Щоб з'ясувати чи ген GSH1/MET1 Н. polymorpha комплементує мутацію met1 S. cerevisiae сконструйовано плазміду, в якій ВРТ гена GSH1/MET1 Н. polymorpha клоновано у вектор для гетерологічної експресії у S. cerevisiae YEp352GAP-II [224], який містить промоторну та термінаторну ділянки гена, що кодує гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH) S. cerevisiae. Для цього, ВРТ з термінаторною послідовністю гена GSH1/MET1 H. polymorpha розміром 1,919 т.п.н. було ампліфіковано з плазмідної ДНК (pG1) за допомогою ПЛР із використанням праймерів Mh3F і UV61R (див. табл. 2.3). Отриманий фрагмент розщеплено ендонуклеазою рестрикції КрпІ та клоновано у сайти YEp352GAP-II. KpnI/SmaI вектора Сконструйована плазміда УЕр HpGSH1/MET1 (рис. 3.13) була використана для трансформації мутанта *∆met1 S. cerevisiae* літійацетатним методом [225]. Клони, що містили плазміду YEp HpGSH1/MET1, відбирали як Ura<sup>+</sup>-трансформанти на мінімальному 2% середовищі 3 глюкозою та 0.1 мМ цистеїном без урацилу. Комплементаційний аналіз показав, що отримані трансформанти ScGAPDH-*HpGSH1/MET1 S. cerevisiae*, відновлювали їх ріст на мінімальному середовищі з іонами сульфату, як єдиним джерелом сірки, порівняно з штамом дикого типу (рис. 3.14). Отже, ген *GSH1/MET1 H. polymorpha* є гомологом гена *MET1 S. cerevisiae*, що кодує SUMT.



1 т.п.н.

Рис. 3.13. Лінійні схеми плазмід YEp352GAP-II та YEp HpGSH1/MET1. Фрагмент ДНК S. cerevisiae, що містить ген URA3, позначено товстою сірою смугою; промоторну термінаторну ділянки гліцеральдегід-3та S. фосфатдегідрогенази cerevisiae (GAPDHpr/ter) позначено товстим посмугованим відрізком; ВРТ гена GSH1/MET1 Н. polymorpha – незабарвленим відрізком; 2µ огі S. cerevisiae – товстою чорною смугою; послідовність pUC18 – тонкою чорною лінією. Скорочення сайтів рестрикції: KI, KpnI; Sm, SmaI

Беручи до уваги специфічну молекулярну структуру гіпотетичного білка HpGsh1p/Met1p та його потенційну можливість зв'язуватися з ДНК та perулювати експресію деяких генів висловлено припущення, що даний білок на додаток до SUMT активності, залученої в сірогем-залежному відновленні сульфіту в шляху асиміляції сульфату, і відповідно, синтезі цистеїну, який є субстратом γGCS, може виконувати й певну регуляторну роль. Оскільки, γGCS є ключовим ферментом в біосинтезі GSH досліджено ймовірну участь білка HpGsh1p/Met1p в регуляції синтезу γGCS у дріжджів *H. polymorpha*. З цією метою було проведено визначення активності даного ферменту у мутантів *gsh1* 



38 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 мМ цистеїн

Рис. 3.14. Ріст дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* штамів дикого типу NCYC495 *leu1-1 ade11 (HpWT)* і BY4742 (*ScWT*), делеційних мутантів  $Hp\Delta gsh1/met1$  і *Sc\Delta met1* та трансформанта *ScGAPDH-HpGSH1/MET1* на синтетичному середовищі YNB в залежності від джерела сірки.

Клітини кожного штаму були вирощені у рідкому синтетичному середовищі YNB з 2% глюкозою та 0,1 мМ цистеїном до логарифмічної фази. Середовище для штамів *ScWT* і *ScAmet1* додатково містило 100 мг/л урацилу. 4 мкл суспензії клітин з OD<sub>590</sub> 1,0; 0,1 та 0,01 були нанесені на чашки. Ріст оцінювали на п'яту добу інкубації за температури 30 °C

і  $\Delta gsh1/met1$  та відповідного штама дикого типу, вирощених у сіркодефіцитному середовищі Б за присутності 0,1 мМ цистеїну. Як негативний контроль був використаний мутантний штам дріжджів *H. polymorpha*  $\Delta gsh2$ *ade11* з делецією гена  $\gamma$ GCS, сконструйований шляхом заміни структурної ділянки даного гена на ген *LEU2 S. cerevisiae*, як описано у розділі 3.1.4. (див. рис. 3.11, *a*,*б*). Показано, що як у точкового *gsh1*, так і в делеційного *gsh1/met1* мутантів активність  $\gamma$ GCS була на рівні штама дикого типу (табл. 3.5). Мутант  $\Delta gsh2$  вирощений у сірко-дефіцитному середовищі Б за присутності 0,1 мМ GSH виявляв лише залишкові рівні активності  $\gamma$ GCS, які також були виявлені у відповідного мутанта *S. cerevisiae* [217]. Отже, білок HpGsh1p/Met1p не залучений у регуляції синтезу γGCS у дріжджів *H. polymorpha*.

#### Таблиця 3.5

Активність γGCS (нмоль\*год<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу та мутантів gsh1, Δgsh1/met1 і Δgsh2 в залежності від джерела сірки

	Джерело сірки			
Штам	SO4 <sup>2-</sup>	GSH	Cys	
NCYC495 leu1-1	281±12,6	291±11,2	262±9,17	
gsh1 leu1-1	-	-	256±9,5	
∆gsh1/met1 ade11	-	-	342±13,7	
Δgsh2 ade11	-	44±0,4	-	

Примітка. (-) – визначення не проводили

В багатьох організмів, включаючи *S. cerevisiae* [45], глутатіон розглядається як негативний регулятор  $\gamma$ GCS. У зв'язку з цим, було досліджено вплив різних джерел сірки на активність  $\gamma$ GCS у клітин штама дикого типу NCYC495 *leu1-1 H. polymorpha*. Встановлено, що активність  $\gamma$ GCS у дріжджів *H. polymorpha* не регулюється такими джерелами сірки, як сульфат амонію, цистеїн чи глутатіон (див. табл. 3.5).

Вплив мутації gsh1 на глутатіон-залежний ріст дріжджів H. polymorpha на різних джерелах вуглецю і на резистентність до різних стресових факторів було оцінено у крапельному тесті у порівнянні з штамом дикого типу, точковим gsh2 і  $\Delta$ gsh2 мутантами. Обидва точковий і делеційний мутанти gsh1 та gsh2 були здатними відновлювати їх ріст на глюкозі, метанолі, етанолі та гліцерині, як єдиному джерелі вуглецю, за присутності екзогенного GSH (рис. 3.15). Окрім цього, було показано, що точкові та делеційні мутанти gsh1 та gsh2 проявляли підвищену чутливість до вуглецевого субстрату метанолу, який є токсичним за



Рис. 3.15. Ріст дріжджів Н. polymorpha штама дикого типу NCYC495 *leu1-1 (WT)*, точкових та делеційних мутантів gsh1 та gsh2 на різних вуглецевих субстратах В залежності від присутності 20 мкМ GSH або різних стрес-індукуючих факторів: іонів хромату  $(K_2Cr_2O_7)$ , метанолу, терт-бутил гідропероксиду (t-BOOH), формальдегіду та іонів кадмію  $(CdSO_4).$ Синтетичне стрес-індукуючими середовище 3 факторами додатково містило 20 мкМ GSH.

Клітини кожного штаму були вирощені до пізньої логарифмічної фази. 4 мкл суспензії клітин з OD<sub>590</sub> 3,0 (верхній ряд) та 0,3 (нижній ряд) були нанесені на чашки. Ріст оцінювали на третю добу інкубації за температури 37 °C

високих концентрацій, а також до формальдегіду, органічного пероксиду та іонів важкого металу кадмію, порівняно з штамом дикого типу (див. рис. 3.15). Подібний фенотип також було виявлено у глутатіон-залежних мутантів  $\Delta gsh1$ та  $\Delta gsh2$  флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii*, з пошкодженням генів *GSH1* та *GSH2*, що кодують γGCS та глутатіонсинтетазу, відповідно. Ці мутанти

виявляли підвищену чутливість до органічного і неорганічного пероксиду та іонів кадмію, порівняно з штамом дикого типу (рис. 3.16). Окрім цього, пошкодження біосинтезу глутатіону у мутантів  $\Delta gsh1$  та  $\Delta gsh2$  P. guilliermondii призводило до надсинтезу рибофлавіну (табл. 3.6), що свідчить про істотну роль GSH у процесах регуляції біосинтезу рибофлавіну. Оскільки, GSH відіграє центральну роль в оксидативній стресовій відповіді, можна припустити, що чутливий фенотип мутантів gsh1/met1 H. polymorpha до вищезгаданих факторів

*∆gsh2 ∆gsh1 WT* 



Рис. 3.16. Чутливість Р. дріжджів guilliermondii штама дикого типу R-66 (WT) та мутантів  $\Delta gsh1$  і  $\Delta gsh2$  до стрес-індукуючих факторів: терт-бутил гідропероксиду (*t*-ВООН), гідроген пероксиду та іонів кадмію (CdCl<sub>2</sub>). Синтетичне середовище YNB 3 стресіндукуючими факторами додатково містило 50 мкМ GSH.

Клітини кожного штаму були вирощені у рідкому синтетичному середовищі з 100 мкМ глутатіоном і 100 мг/л уридину впродовж 24 годин і розведені до OD<sub>600</sub>=0,2. Приготовано серію п'ятикратних розведень. 4 мкл суспензії клітин з кожного розведення були нанесені на чашки. Ріст оцінювали на третю-п'яту добу інкубації за температури 30 °С



CdCl<sub>2</sub> 75 мкМ

 $H_2O_2$ 

2 мМ

## Ріст та продуктивність рибофлавіну клітин *P. guilliermondii* штама дикого типу R-66 (*WT*) та мутантів *Agsh1* і *Agsh2* в рідкому синтетичному залізовмісному середовищі в залежності від концентрації глутатіону

GSH,	Біомаса, мг сухих клітин*мл <sup>-1</sup>			Продуктивність рибофлавіну, мкг*мг сухих клітин <sup>-1</sup>		
MIVI	WT	∆gsh1	∆gsh2	WT	∆gsh1	∆gsh2
0	4,62±0,233	0,04±0,011	0,29±0,023	0,05±0,001	18,23±0,907	7,4±0,814
0,001	4,47±0,314	2,16±0,07	5,43±0,064	0,06±0,006	0,28±0,026	0,06±0,006
0,01	4,66±0,012	3,09±0,311	6,13±0,488	0,05±0,003	0,09±0,015	0,05±0,003
0,05	4,54±0,252	3,14±0,006	5,76±0,905	0,06±0,011	0,08±0,015	0,06±0,006
0,1	4,56±0,274	3,09±0,106	5,85±0,214	$0,06\pm 0,007$	0,07±0,014	$0,06\pm 0,007$
0,2	4,34±0,077	2,97±0,148	5,3±0,622	$0,06\pm 0,004$	0,08±0,021	$0,08{\pm}0,009$
0,5	1,59±0,132	2,68±0,198	2,64±0,169	0,09±0,008	0,11±0,007	0,13±0,011

Примітка. Ростові дані та продуктивність рибофлавіну представлені на п'яту добу

пов'язаний із порушеним біосинтезом цистеїну, і відповідно, GSH, а у випадку мутантів gsh2 H. polymorpha та  $\Delta$ gsh1 і  $\Delta$ gsh2 P. guilliermondii – з пошкодженим біосинтезом GSH. Нами було показано, що дріжджі H. polymorpha нездатні синтезувати фітохелатини у відповідь на інкубацію з іонами кадмію (див. детальніше розділ 3.4.1.). Таким чином, GSH можна вважати основною молекулою, залученою у внутрішньоклітинну детоксикацію іонів кадмію у даного виду дріжджів. У дріжджів S. pombe та C. glabrata комплекси Cd-GSH можуть прямо вбудовувати сульфід, утворюючи CdS-GSH нанокристали, що суттєво підвищує їх Cd-зв'язуючу здатність, а також підвищує детоксикаційний ефект [184, 185, 226]. У зв'язку з цим, ймовірна нестача утворення сульфіду у мутанта gsh1/met1 може також вносити свій вклад у підвищену чутливість до кадмію. Окрім цього, показано, що обидва точковий і делеційний мутанти

gsh1/met1 H. polymorpha також проявляли підвищену чутливість до іонів хромату, порівняно з мутантами gsh2 та штамом дикого типу (див. рис. 3.15). Відомо, що аніони сульфату і хромату використовують спільну систему асиміляції для їх транспорту і подальшого відновлення в клітині [227]. Можна припустити, що підвищена чутливість мутантів gsh1/met1 H. polymorpha до іонів хромату може бути пов'язана з надакумуляцією найтоксичнішого проміжного інтермедіату Cr(V) замість менш токсичної форми Cr<sup>3+</sup> завдяки пошкодженню у сірогем-залежній сульфітредуктазній реакції.

Підсумки. Шляхом функціональної комплементації глутатіон-залежного фенотипу мутанта gsh1 H. polymorpha клоновано ген GSH1/MET1 H. polymorpha. З'ясовано, що даний ген здатний відновлювати резистентність до іонів кадмію, чутливість до MNNG, нормальні рівні глутатіону та проліферацію клітин на мінімальному середовищі без додавання цистеїну або глутатіону, при введені його у клітини мутанта gsh1 [228-230]. Показано, що ген GSH1/MET1 H. polymorpha виявляє гомологію до гена MET1 S. cerevisiae, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилазу, залучену у біосинтез кофактора сульфідредуктази, сірогему. Сконструйовано рекомбінантні штами дріжджів Н. polymorpha з делеціями генів GSH1/MET1 і GSH2 та проведено їх фізіологобіохімічний аналіз. Схрещування точкового мутанта gsh1 з делеційним мутантом gsh1/met1 продемонструвало, що обидва алелі є мутантними формами одного й того ж гена. Мутант  $\Delta gsh1/met1$  повністю відновлює ріст та частково відновлює рівні клітинного глутатіону на синтетичному середовищі з цистеїном або GSH, як єдиним джерелом сірки, але не з метіоніном або Sаденозилметіоніном чи неорганічними (сульфат, сульфіт) джерелами сірки. Окрім цього, обидва точковий та делеційний мутанти gsh1 i gsh2 проявляють підвищену чутливість до метанолу, формальдегіду, органічного пероксиду, іонів кадмію та хромату [228, 231]. Ген GSH1/MET1 H. polymorpha комплементує мутацію metl S. cerevisiae стосовно росту на мінімальному середовищі з іонами сульфату, як єдиним джерелом сірки. Комп'ютерний аналіз доменної організації білка Gsh1p/Met1p *H. polymorpha*, окрім тетрапіролметилазного та уропорфіриноген метилтрансферазного мотивів, які також характерні для білків-гомологів з інших організмів, виявив в його Nкінцевій ділянці унікальну "coiled-coil" структуру, що може вказувати на потенційну можливість зв'язуватися з ДНК та регулювати експресію деяких генів. Встановлено, що білок Gsh1p/Met1p та такі джерелами сірки як іони сульфату, цистеїн чи GSH не впливають на активність γGCS у дріжджів *H. polymorpha* [228].

Результати висвітлені в цьому розділі опубліковані в наступних роботах [201, 220-222, 228-231].

## 3.2. Регуляція першого етапу біосинтезу глутатіону у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*

3.2.1. Характеристика молекулярної організації промотора гена GSH2 *H. polymorpha.* 5'-фланкуючу ділянку, розміром 3712 п.н. (AY195835), гена GSH2 штама CBS4732 H. polymorpha (Gene Database Accession No. AF435121) було проаналізовано на присутність імовірних регуляторних послідовностей, що можуть бути залучені у відповідь на оксидативний чи інший вид стресу. Відтак, було виявлено чотири YRE-сайти з ДНК послідовностями ТТАСТАА (-3497 -3491 п.н.), ТGACAAA (-49 -43 п.н. та -3227 -3221 п.н.) і ТТАСААА (-1766 -1760 п.н.), які у S. cerevisiae розпізнаються транскрипційним фактором позитивного типу дії Yap1 (Yeast AP-1 like transcription factor) [232]. Регуляторна ділянка гена GSH2 також містить три OSRE елементи із ДНК послідовностями GGCTGGC, GGCCAGA і GGCCCAGA, розташованими в ділянках -375 -369 п.н., -3134 -3128 п.н. і -342 -335 п.н., відповідно, які у S. cerevisiae розпізнаються транскрипційним фактором негативного типу дії Skn7 [232]. У ділянці -1163 -1156 п.н. виявлено послідовність TGACGTCA, що відповідає можливому сайту зв'язування транскрипційного фактора Atf1 дріжджів S. pombe [233]. Регуляторна ділянка гена GSH2 H. polymorpha також містить чотири CDEI-зв'язуючі сайти з консенсусною послідовністю T/GCACG, розташовані в ділянках -419 -415 п.н., -2042 -2038 п.н., -2865 -2861 п.н. та -3111 -3107 п.н., яка у *S. cerevisiae* розпізнається транскрипційним фактором Cbf1 (Centromer binding factor 1) [51]. Однак, 5'-фланкуюча ділянка даного гена не містить жодного сайту зв'язування транскрипційних факторів Met31 і Met32. У *S. cerevisiae* білки Met4 і Met31/Met32 залучені у позитивну регуляцію транскрипції гена *GSH1* у відповідь на кадмієвий стрес [51]. У промоторі гена *GSH2 H. polymorpha* також ідентифіковано XRE-зв'язуючі сайти (Xenobiotic Response Element) з ДНК послідовностями GCGTG у позиції -629 -624 п.н. та CACGCAA – у позиціях -1325 -1331 п.н. і -3466-3472 п.н. Ці послідовності у ссавців розпізнаються білковим комплексом AhR/Arnt, що регулює гени, залучені в метаболізм канцерогенів, таких як 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*n*-діоксин та поліхлорвмісних біфенолів [234, 235].

Аналіз геному дріжджів *H. polymorpha* гомологією до за генів CBF1/YJR060W SKN7/YHR206W. S. YAP1/YML007W. cerevisiae та ATF1/SPBC29B5.01 S. pombe виявив гени, що кодують білки, гомологічні транскрипційним факторам Yap1, Skn7, Cbf1 та Atf1. Ймовірний білок HpYap1 виявляє значну подібність до ар-1-подібного транскрипційного фактора D. bruxellensis (36% ідентичності, 49% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF49857.1|), ймовірного AP-1-подібного транскрипційного фактора Candida dubliniensis (34% ідентичності, 45% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CAX42747.1|) та AP-1-подібного транскрипційного фактора P. pastoris (33%) ідентичності, 47% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CCA40538.1|). Гіпотетичний білок HpSkn7 виявляє гомологію до skn7p D. bruxellensis (57% ідентичності, 72% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF48867.1|), транскрипційного фактора SKN7 Pichia ciferrii (47%) ідентичності, 60% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CCH42550.1|), спорідненого до транскрипційного фактора SKN7 Zygosaccharomyces bailii 59% подібності. (47%) ідентичності. Entrez-Protein Accession No. emb|CDH12271.1|) та Skn7p S. cerevisiae (45% ідентичності, 58% подібності,

Entrez-Protein Accession No. ref|NP\_012076.3|). Ймовірний білок HpCbf1 показує гомологію до центромер-зв'язуючого кінетохорного білка Pichia stipitis (72% ідентичності, 86% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP 001387293.1|), ймовірного центромер-зв'язуючого фактора 1 С. albicans (69% ідентичності, 81% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CAC19005.1|), транскрипційного фактора Cbf1 Candida orthopsilosis (57% ідентичності, 68% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP 003867278.1|) та Cbf1 S. cerevisiae (51% ідентичності та 73% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|AAA34490.1|). Гіпотетичний білок HpAtf1 виявляє значну подібність до ймовірного транскрипційного фактора atf1 Glarea lozovensis (52% ідентичності і 73% подібності – до С-кінцевої та 28% ідентичності і 40% подібності – до Nкінцевої ділянок, **Entrez-Protein** Accession No. gb|EHK98466.1|), транскрипційного фактора Atf1 S. pombe (50% ідентичності і 71% подібності – до С-кінцевої та 30% ідентичності і 37% подібності – до N-кінцевої ділянок, Entrez-Protein Accession No. ref|NP 595652.1|), а також білків споріднених з транскрипційним фактором Atf1+ N. crassa (51% ідентичності і 74% подібності - до С-кінцевої та 33% ідентичності і 42% подібності – до N-кінцевої ділянок, Entrez-Protein Accession No. emb|CAC18235.2|) ta Fusarium fujikuroi (45% ідентичності і 64% подібності – до С-кінцевої та 31% ідентичності і 37% подібності N-кінцевої ділянок, Entrez-Protein Accession No. \_ ЛО emb|CCT68523.1|).

У промоторній ділянці гена GSH2 *H. polymorpha*, окрім специфічних сайтів зв'язування транскрипційних факторів оксидативної стресової відповіді (YRE, OSRE, CREB), CDE1- та XRE-послідовностей, подібно до промотора гена GSH1 *S. cerevisiae*, також виявлено азот-регульовані елементи. Зокрема, промотор GSH2 *H. polymorpha* містить шість потенційних сайтів зв'язування транскрипційних факторів Gln3 та Nill/Gat1 з послідовністю GAT(T/A)A, залучених у регуляцію транскрипції генів в залежності від джерела азоту у *S. cerevisiae* [71]. Білок Gat1 ідентифіковано у *H. polymorpha* [236]. В геномі цих дріжджів також виявлено ген, що кодує білок, який виявляє гомологію до gln3р

*D. bruxellensis* (34% ідентичності, 45% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF48420.1|) та Gln3p *S. cerevisiae* (30% ідентичності, 45% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|NP\_010958.3|). Вважають, що азот-регульовані елементи, присутні в промоторах обох генів *GSH1* і *GSH2 S. cerevisiae* [71], відповідають за індукцію синтезу GSH за умов голодування за азотом [27].

Отже, промоторна ділянка гена *GSH2 H. polymorpha* містить значну кількість регуляторних елементів, що може передбачати складну регуляцію даного гена у відповідь на різні стресові фактори, а геном *H. polymorpha* містить гени, що кодують ймовірні транскрипційні фактори Yap1, Skn7, Cbf1, Atf1, Gat1 та Gln3.

3.2.2. Дослідження залежності між довжиною регуляторної ділянки гена GSH2 та відповіддю на кадмієвий та оксидативний стрес у дріжджів *H. polymorpha.* 3 метою дослідження залежності між довжиною регуляторної ділянки гена GSH2 і відповіддю на кадмієвий та оксидативний стрес у дріжджів *H. polymorpha* було використано pG2- та pG24-трансформанти, попередньо одержані внаслідок комплементації GSH-залежного фенотипу мутантного штама gsh2 H. polymorpha плазмідами pG2 та pG24, відповідно [199]. Трансформанти pG2 та pG24 відновлювали дикий фенотип за здатністю до синтезу глутатіону, росту на GSH-дефіцитному синтетичному середовищі з різними джерелами вуглецю, включаючи метанол, і за резистентністю до іонів кадмію (50 мкМ) за рахунок наявності плазмід pG2 та pG24 [199], що містили ген GSH2 з різною довжиною 5'-фланкуючої послідовності. Ген GSH2, що кодує γGCS, походив зі штаму CBS4732 Н. polymorpha. Регуляторна ділянка гена, що кодує уGCS у вищих еукаріот і людини, складає до 4 т.п.н. Аналіз 5'фланкуючої послідовності гена GSH2 Н. polymorpha розміром 3712 п.н. виявив чотири YRE, чотири CDE1, три OSRE та один ATF1 – імовірні зв'язуючі сайти, які можуть розпізнаватися відомими транскрипційними факторами (рис. 3.17). Поряд з цим, промоторна ділянка гена GSH2 Н. polymorpha розміром 450 п.н. характеризується наявністю лише одного YRE, одного CDE1 та двох OSRE ймовірних елементів (див. рис. 3.17).



100 п.н.

Рис. 3.17. Схема молекулярної організації 5'-фланкуючої ділянки гена *GSH2 H. polymorpha* розміром 3712 п.н. і 450 п.н.

Дослідження чутливості pG2- та pG24-трансформантів проводили на твердому синтетичному середовищі за присутності різних агентів, що спричинюють оксидативний стрес. Показано, що pG24-трансформант із вкороченою довжиною промоторної ділянки (450 п.н.) більш чутливий до іонів кадмію, органічного та неорганічного пероксиду, метанолу та формальдегіду, порівняно з pG2-трансформантом, в якого довжина 5'-фланкуючої ділянки складає 3712 п.н., та штамом дикого типу NCYC495 *leu 1-1* (табл. 3.7).

Отже, промотор гена *GSH2* розміром 450 п.н., що міститься в складі плазміди pG24, є недостатнім для повноцінної регуляції експресії гена *GSH2* за відповіді на кадмієвий та оксидативний стрес. Це свідчить про істотну роль стрес-опосередкованих регуляторних елементів, розташованих у 5'-фланкуючій ділянці вище 450 п.н. від початку ініціації трансляції.

3.2.3. Конструювання репортерної касети prGSH2-AOX та одержання рекомбінантного штама, що містить дану касету. З метою конструювання репортерної касети prGSH2-AOX, промотор гена GSH2 довжиною 1,832 т.п.н. та відкриту рамку трансляції з термінаторною послідовністю (BPT-T) гена, що кодує AOX, було ампліфіковано за допомогою ПЛР із використанням, відповідно, праймерів VU35F і VU37R та VU38F і VU34R (див. табл. 2.3) та

## Чутливість трансформантів *pG2* та *pG24* із різною довжиною 5'-фланкуючої ділянки гена *GSH2 H. polymorpha* до факторів, що спричинюють оксидативний стрес

Штам	Контроль	CdSO <sub>4</sub> 75 мкМ	<i>t</i> –ВООТ 0,1 мМ	Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> 1,5 мМ	Метанол 3%	Формаль- дегід 1,5 мМ
NCYC495 <i>leu1-1</i>	+++	++	+++	++	+++	+
pG2	+++	++	+++	++	+++	++
pG 24	+++	_	+	+	+	_

рG 24 +++ – + + – Примітка. Ріст дріжджів на відбитках після трьох діб інкубації за температури 37 °C: (+++) – дуже інтенсивний ріст; (++) – інтенсивний ріст; (+) – слабкий

ріст; (–) –відсутній ріст

геномної ДНК штама CBS4732 *leu2 H. polymorpha*. Фрагменти ДНК, що відповідають промотору гена *GSH2* та BPT-T ділянці AOX, послідовно було розщеплено ендонуклеазами рестрикції HindIII і NotI та одночасно клоновано у вектор pGLG61 [204], попередньо лінеаризований за унікальним сайтом рестрикції NotI (рис. 3.18). Сконструйовану плазміду було використано для трансформації клітин *H. polymorpha* штамів NCYC495 *leu1-1* та CBS4732 *leu2-*2. Клони, що містили репортерну касету prGSH2-AOX, відбирали як Leu<sup>+</sup>-трансформанти і тестували на активність AOX в контрольних та кадмій-індукованих (50 мкМ, 4 год) умовах.

3.2.4. Дослідження експресії гена GSH2 H. polymorpha у відповідь на дію іонів кадмію. Вивчення регуляції гена GSH2, що кодує  $\gamma$ GCS у дріжджів H. polymorpha, є досить важливим, оскільки даний фермент відіграє принципову роль в модулюванні гомеостазу GSH і, відповідно, здатності клітини протистояти згубним ефектам оксидативного стресу. Для зручного моніторингу експресії гена GSH2 H. polymorpha сконструйовано репортерну касету, що містить структурну частину гена AOX під промотором гена GSH2. Відомо, що

97



Рис. 3.18. Лінійні схеми плазмід pGLG61 та prGSH2-AOX. Фрагмент ДНК *H. polymorpha*, що містить ген *LEU2*, позначено товстою сірою смугою; послідовність промотора гена *GSH2 H. polymorpha* – товстим чорним відрізком; ВРТ гена *AOX* – незабарвленою смугою; термінатор AOX – товстим посмугованим відрізком; послідовність pUC19 – тонкою чорною лінією. Скорочення сайтів рестрикції: SII, SacII; NI, NotI; BI, BamHI; HIII, HindIII. У промоторній ділянці гена *GSH2 H. polymorpha* позначено ймовірні сайти зв'язування транскрипційних факторів як на рис. 3.17

ген АОХ, який експресується за наявності метанолу в середовищі, підлягає катаболітній репресії глюкозою та етанолом. Особливістю сконструйованої касети prGSH2-AOX є здатність експресувати ген АОХ за вирощування на середовищі із глюкозою чи етанолом як єдиним джерелом вуглецю, тоді як нативний ген зарепресований. Репресію нативного гена АОХ підтверджено шляхом визначення активності АОХ у дріжджових колоніях та в безклітинних екстрактах дріжджів *H. polymorpha* штамів дикого типу NCYC495 *leu1-1* та CBS4732 *leu2-2*, відповідно (рис. 3.19, рис. 3.21-3.22).



Рис. 3.19. Якісне визначення активності АОХ у клітинах дріжджів, вирощених на багатому середовищі YPD. Буквою К позначений штам дикого типу NCYC495 *leu1-1*, а цифрами – штами, що містять репортерну касету prGSH2-AOX

Використовуючи репортерну касету prGSH2-AOX досліджено концентраційну та часову залежність відповіді промотора гена *GSH2 H. polymorpha* на дію іонів важкого металу кадмію. Показано, що зі зростанням концентрації іонів кадмію (50, 100 мкМ) спостерігається зниження активності AOX, як на другу, так і на четверту годину інкубації (рис. 3.20). У зв'язку з



Рис. 3.20. Активність АОХ (нмоль\*хв<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) у штама CBS4732 *prGSH2-AOX* дріжджів *H. polymorpha* за вирощування в мінімальному середовищі YNB з 3% глюкозою за присутності різних концентрацій іонів кадмію протягом П двох та Пчотирьох годин

цим, подальші дослідження відповіді промотора гена *GSH2* проводили за низьких концентрацій іонів кадмію (0,1 1, 10 мкМ) протягом 1, 2 та 4 годин із культивуванням у мінімальному YNB (3% глюкоза) та багатому YPEt (2% етанол) середовищах. Підвищення активності AOX на 29% спостерігали в клітинах, культивованих у багатому середовищі за двогодинної інкубації з 1 мкМ і 10 мкМ та 25% – із концентрацією іонів  $Cd^{2+}$  0,1 мкМ і підвищення активності AOX на 18% та 33% відмічено протягом однієї та чотирьох годин інкубації з 10 мкМ та 1 мкМ концентрацією іонів  $Cd^{2+}$ , відповідно (див. рис. 3.21). За культивування клітин у мінімальному середовиці підвищення



Рис. 3.21. Активність АОХ (нмоль\*хв<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) у штама CBS4732 *prGSH2-AOX* та штама дикого типу CBS4732 *leu2* дріжджів *H. polymorpha* за вирощування в багатому середовищі YPEt без (□ контроль) та з іонами кадмію в концентрації: □0,1 мкМ, □1 мкМ і ■10 мкМ

активності (на 25%) спостерігали лише на четверту годину інкубації з 0,1 мкМ концентрацією іонів кадмію у середовищі, порівняно з контрольними умовами (див. рис. 3.22). Окрім цього, відмічено зростання абсолютних значень активності АОХ, як у контрольних умовах, так і за інкубації з іонами кадмію (0,1 1, 10 мкМ) на другу та четверту годину, за культивування в багатому середовищі порівняно із мінімальним середовищем (див. рис. 3.21-3.22).



Рис. 3.22. Активність АОХ (нмоль\*хв<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) у штама CBS4732 *prGSH2-AOX* та штама дикого типу CBS4732 *leu2* дріжджів *H. polymorpha* за вирощування в мінімальному середовищі YNB з 3% глюкозою без (□ контроль) та з іонами кадмію в концентрації: □0,1 мкМ, □1 мкМ і □10 мкМ

Додатково було оцінено регуляцію промотора гена *GSH2 H. polymorpha* у відповідь на дію інших важких металів. Показано, що інкубація з іонами міді, цинку та хромату у концентрації 25 мкМ впродовж двох та чотирьох годин не призводила до суттєвого зростання активності AOX у порівнянні з контрольними умовами (рис. 3.23).

Дослідження експресії гена GSH2 H. polymorpha за допомогою репортерної касети prGSH2-AOX вказують лише на незначні зміни в експресії цього гена у відповідь на дію іонів кадмію. Отримані дані добре узгоджуються з результатами RT-PCR аналізу проведеного корейськими авторами. Вони показали, що інкубація з іонами кадмію не призводить до змін в рівнях мРНК гена GSH2 H. polymorpha, порівняно з контрольними умовами (Song MJ, Kang HA, неопубліковані дані). Кадмій-індукована експресія гена GSH1 S. cerevisiae потребує транскрипційного активатора Met4 і ДНК-зв'язувальних білків Met31/Met32 [51]. Відтак, однією із причин незначних або відсутніх змін в експресії гена GSH2 H. polymorpha у відповідь на дію іонів кадмію може бути відсутність сайтів зв'язування білків Met31/Met32 у промоторній ділянці цього



Рис. 3.23. Активність АОХ (нмоль\*хв<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) у штама CBS4732 *prGSH2-AOX* дріжджів *H. polymorpha* за вирощування у мінімальному середовищі YNB з 3% глюкозою без (К) та з іонами міді, цинку або хромату в концентрації 25 мкМ протягом □ двох та □ чотирьох годин

гена. Однак, дріжджі *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae* та *S. pombe* [90], характеризуються зростанням вмісту загального клітинного глутатіону під впливом іонів кадмію (див. рис. 3.3, рис. 3.24). Більше того, нещодавно було



Рис. 3.24. Рівень клітинного GSH+GSSG (нмоль\*мг білка<sup>-1</sup>) у штама CBS4732 *prGSH2-AOX* дріжджів *Н. роlутогрha* за вирощування в мінімальному середовищі YNB з 3% глюкозою без (□контроль) та з іонами кадмію в концентрації: □ 0,1 мкМ, □ 1 мкМ і ■ 10 мкМ

показано збільшення включення мічено <sup>35</sup>S-цистеїну в GSH у дріжджів *H*. polymorpha за дії іонів кадмію [237]. Ці дані переконливо свідчать на користь зростання біосинтезу глутатіону під впливом іонів кадмію. Оскільки, в умовах кадмієвого стресу дріжджі *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae*, активують сіркозберігальний шлях поряд із сірковмісним амінокислотним шляхом та позитивно регулюють експресію транспортерів іонів сульфату та інших генів шляху асиміляції сірки [238], можна припустити, що зростання вмісту клітинного глутатіону у дріжджів *H. polymorpha* за дії кадмію може бути пов'язано зі зростанням надходження сірки в глутатіоновий шлях. Позитивна регуляція гена CYSD/CYS1, що кодує цистеїнсинтазу, та негативна регуляція гена МЕТ6, що кодує гомоцистеїнметилтрансферазу, яка опосередковує перетворення гомоцистеїну в метіонін, під впливом іонів кадмію у Н. свідчить на polymorpha також користь посиленого відтоку сірки y глутатіоновий шлях [238]. Відомо, що токсичні ефекти кадмію призводять до оксидативного стресу, який в свою чергу впливає на зміну окисно-відновного потенціалу клітини. Не виключено, що позитивна регуляція біосинтезу глутатіону за умов оксидативного стресу, спричиненого іонами кадмію, може бути наслідком посттрансляційних модифікацій γGCS дріжджів H. polymorpha, подібно до того, як було показано для уGCS рослин [239-241]. Окрім цього, нещодавно було показано, що іони кадмію інгібують деградацію GSH у S. cerevisiae [58]. Відтак, зростання вмісту клітинного глутатіону у відповідь на дію іонів кадмію може бути наслідком не лише підвищення синтезу GSH [90], а й зниження його деградації [58].

Отже, подібно до гомологічного гена GCS1 S. pombe [54], дія іонів кадмію призводить до незначних змін в експресії гена GSH2 H. polymorpha, на відміну від сильної індукції експресії гомологічного гена GSH1 S. cerevisiae [50-53]. Висловлено припущення, що зростання рівня загального клітинного глутатіону за умов кадмієвого стресу в дріжджів H. polymorpha не контролюється на рівні транскрипції гена GSH2, що кодує перший фермент біосинтезу глутатіону,  $\gamma$ GCS.

3.2.5. Дослідження взаємозв'язку між вмістом клітинного глутатіону, активністю у-глутамілцистеїнсинтетази та чутливістю до іонів кадмію у метилотрофних дріжджів Н. polymorpha. Особливості біосинтезу глутатіону та відповідь на дію важкого металу кадмію вивчали у штамів *H. polymorpha* трьох різних генетичних ліній – NCYC495, CBS4732 та DL-1. Дослідження рівнів клітинного глутатіону у логарифмічній та стаціонарній фазах росту виявило, що генетична лінія NCYC495 характеризувалася найнижчими, а лінія DL-1 – найвищими рівнями GSH+GSSG в обох фазах росту (рис. 3.25). Окрім цього, відмічено зростання рівнів глутатіону у штамів всіх генетичних ліній у стаціонарній фазі росту, порівняно з відповідними показниками в логарифмічній фазі (див. рис. 3.25).



Рис. 3.25. Рівень клітинного GSH+GSSG та активність γGCS у дріжджів *H. polymorpha* штамів дикого типу NCYC495 *leu1-1*, CBS4732 *leu2-2* і DL-1 *leu2* в залежності від фази росту: □ логарифмічна фаза, □ стаціонарна фаза. Клітини дріжджів були вирощені у рідкому середовищі YNB з 2% глюкозою до вказаної фази росту

Для того, щоб з'ясувати, чи підвищення рівнів клітинного GSH+GSSG у стаціонарній фазі є наслідком зростання активності γGCS, було проведено визначення активності даного ферменту у штамів NCYC495 *leu1-1*, CBS4732

*leu2-2* та DL-1 *leu2 H. polymorpha* в логарифмічній та стаціонарній фазах росту. Виявлено, що рівні активності уGCS у стаціонарній фазі були нижчими за відповідні показники в логарифмічній фазі, за винятком штаму NCYC495 leul-1 (див. рис. 3.25). Оскільки, за нормальних умов немає насичення ферментів в Cys/GSH шляху [120], підвищення рівнів глутатіону у стаціонарній фазі може бути наслідком підвищення деградаційних процесів в клітині, які призводять до вивільнення субстратів GCS реакції, глутамату та цистеїну, і зростання швидкості синтезу дипептиду, і відповідно глутатіону, хоча рівні активності уGCS не зростають. Також не виключено, що у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до S. cerevisiae [138], збільшений рівень клітинного глутатіону у стаціонарній фазі спричинений вичерпуванням субстратів (вуглецю або азоту) і є необхідним для глутатіонування напівокиснених білків з метою їх захисту від повної інактивації і забезпечення вчасного переходу культури із стану голодування в нормальні умови росту. Поряд з цим, відмічено кореляцію між рівнями клітинного глутатіону штамів дикого типу та їх чутливістю до іонів кадмію. Штам NCYC495 leu1-1 з найнижчим вмістом глутатіону був найчутливішим до іонів кадмію, а штам DL-1 leu2 з найвищим вмістом глутатіону, відповідно найрезистентнішим (табл. 3.8).

#### Таблиця 3.8

III	Ріст на YPD середовищі		
ШТам	Контроль	1 мM CdSO <sub>4</sub>	
NCYC495 leu1-1	+++	-	
CBS4732 <i>leu2-2</i>	+++	+	
DL-1 <i>leu2</i>	+++	++	

### Чутливість дріжджів *H. polymorpha* штамів дикого типу NCYC495 *leu1-1*, CBS4732 *leu2-2* та DL-1 *leu2* до іонів кадмію

Примітка. Ріст дріжджів оцінювали після двох діб інкубації за температури 37 °C: (+++) – дуже інтенсивний ріст; (++) – інтенсивний ріст; (+) – слабкий ріст; (-) – відсутній ріст

Водночас, чутливість до іонів кадмію не корелювала з акумуляцією іонів кадмію штамами дикого типу. Клітини дріжджів *H. polymorpha* трьох різних генетичних ліній NCYC495 *leu1-1*, CBS4732 *leu2-2* та DL-1 *leu2* акумулювали приблизно однакову кількість іонів кадмію на мг сухої ваги клітин (див. детальніше розділ 3.4.2.).

Підсумки. Проведено аналіз молекулярної організації промотора гена GSH2 H. polymorpha і виявлено ймовірні сайти зв'язування транскрипційних факторів Yap1, Skn7, Atf1 та Cbf1. В геномі дріжджів Н. polymorpha ідентифіковано гени, що кодують згадані транскрипційні фактори. З'ясовано, що для повноцінної регуляції експресії гена GSH2 у відповідь на кадмієвий та оксидативний стрес необхідний промотор GSH2 більший за 450 п.н. від початку ініціації трансляції [242, 243]. Для дослідження транскрипційної регуляції гена GSH2 H. polymorpha сконструйовано рекомбінантний штам, що містить репортерну касету, в якій регуляторна ділянка гена GSH2 розміром 1,832 т.п.н. термінаторною ділянками гена, злита 3i структурною та ЩО кодує алкогольоксидазу. Показано, що дія іонів кадмію призводить до незначних змін в експресії гена GSH2 дріжджів Н. polymorpha [242, 243], подібно до гомологічного гена GCS1 S. pombe [54] та на відміну від сильної індукції експресії гомологічного гена GSH1 S. cerevisiae [50-53]. Висловлено припущення, що підвищення вмісту загального клітинного глутатіону за кадмієвого стресу у дріжджів *H. polymorpha* ймовірно не контролюється на рівні транскрипції гена GSH2. Також досліджено взаємозв'язок між вмістом клітинного глутатіону, активністю уGCS та чутливістю до іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* трьох різних генетичних ліній. Показано, що генетична лінія NCYC495 характеризується найнижчим, а лінія DL-1 – найвищим вмістом клітинного глутатіону, що корелює з резистентністю до іонів кадмію [244]. Однак, зростання рівнів клітинного глутатіону у стаціонарній фазі росту, порівняно з логарифмічною фазою, не є наслідком зростання активності γGCS, яку вважають лімітуючим ферментом в біосинтезі глутатіону [228].

Результати висвітлені в цьому розділі опубліковані в наступних роботах [228, 242-244].

# 3.3. Вивчення ролі γ-глутамілтрансферази у процесах метаболізму глутатіону та його кон'югатів у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*

3.3.1. Аналіз амінокислотної послідовності білкового продукту гена **GGT1 Н. роlymorpha.** Геном дріжджів Н. роlymorpha проаналізували на присутність гена, що кодує γGT, залучену у катаболізмі глутатіону. На основі гомології до гена CIS2/ECM38/YLR299w S. cerevisiae, виявлено наявність двох генів *HpGGT1* та *HpGGT2*. Порівняння амінокислотної послідовності білкового продукту гена *HpGGT1* (HpγGT1p) з комп'ютерними базами даних виявило значну подібність між НруGT1р та білками з інших організмів, що володіють углутамілтрансферазною/у-глутамілтранспептидазною активністю. Білком 3 найвищою ступінню загальної подібності виявилась ү-глутаміл-үглутамілтрансфераза з D. bruxellensis (58% ідентичності, 72% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF47677.1|). Іншими білками з високою подібністю є: у-глутамілтранспептидаза з *P. pastoris* (51% ідентичності, 71% Accession подібності, Entrez-Protein No. ref|XP 002492788.1|), γглутамілтрансфераза з *P. stipitis* (44% ідентичності, 60% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP\_001385435.2|), білок Cis2p з S. cerevisiae (43% ідентичності, 60% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|NP 013402.1|), білки Ggt1p (37% ідентичності, 56% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|NP 593457.1|) та Ggt2p (38% ідентичності, 54% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP 593273.1]) з S. pombe,  $\gamma$ -глутамілтранспептидаза 1 з R. norvegicus (37% ідентичності, 54% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP 446292.2]), у-глутамілтрансфераза 1 з *H. sapiens* (36% ідентичності, 53% Accession подібності, **Entrez-Protein** gb|AAA52546.1|) No. та γглутамілтранспептидази: GGT1 (35% ідентичності, 54% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP\_195674.2]), GGT2 (35% ідентичності, 53% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP\_195675.2]) і GGT4 (33% ідентичності, 52% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP\_194650.1]) з *A. thaliana*. Порівняльний аналіз білкової послідовності ймовірного білка НруGT1р з гомологічними білками з *D. bruxellensis, P. pastoris, P. stipitis, S. cerevisiae, S. pombe, R. norvegicus, H. sapiens* та *A. thaliana* представлено на рис. 3.26.

Подібність між білками уGT1р та уGT2р *H. polymorpha* становить лише 24% ідентичності та 40% подібності. Ймовірна уGT2р *H. polymorpha* виявляє найвищий ступінь подібності до у-глутамілтранспептидази 1 з *P. ciferrii* (55%) ідентичності, 72% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CCH46238.1|), a також значну подібність до Ест38 у-глутамілтрансферази з *C. orthopsilosis* (50%) 65% подібності, Entrez-Protein Accession ідентичності, No. ref|XP 003870065.1|), у-глутамілтрансферази з *P. stipitis* (49% ідентичності, 65% подібності. Entrez-Protein Accession No. ref|XP 001384117.2|), γглутамілтрансферази з Candida tenuis (47% ідентичності, 64% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP 006683683.1|), у-глутамілтранспептидази з Fusarium oxysporum (45% ідентичності, 59% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EWZ30110.1|) та у-глутамілтранспептидази з Aspergillus clavatus (44% ідентичності, 58% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[XP 001272211.1]). Натомість, ймовірна уGT2р *Н. роlутогрha* виявляє незначну подібність до Cis2p з S. cerevisiae (21% ідентичності і 38% подібності), у-глутамілтранспептидази з *P. pastoris* (22% ідентичності, 38% подібності), Ggt1p (24% ідентичності, 42% подібності) та Ggt2p (23% ідентичності, 41% подібності) з *S. pombe*, у-глутамілтранспептидази 1 з *R*. norvegicus (23% ідентичності, 42% подібності), у-глутамілтрансферази 1 з Н. sapiens (24% ідентичності, 42% подібності), GGT1, GGT2 і GGT4 з А. thaliana (26% ідентичності, 44% подібності) та у-глутамілтрансферази з Е. coli (27% ідентичності, 46% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|KEL80028.1|).
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	-MGGFEDQPLLGLSAGHKKSLGLRYRLRTKLVVTAUA AL FVY S-WPSHYKPPDLPKYPAHVPFIGGPTWN MGESDPLLLKNTGKSRHVKLQALRK FITALAUT TLLWWRQ, NGCWL SYPDLPKYPAHVPFIKGAFTW 
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	73 72 96 97 89 79 40 41 70	DINLTARESHE GVASDSALCSOL GVEIL KKGGFA DAAVT CLCIGATNIMFSACIGGGA BITTEKHGEDGAVSIDAREMA PAKAHKOMENGREVLSKFGGIAVAL DENLTIVEKHGAVASDIEKCSOMGVEIL KKGGFA DAAVT CLCIGTUDIM SSGIGGGA FITTEKHGEDGAVSIDAREMA PAKAHKOMENGREVLSKFGGIAVAL SKNYSISVON AVASDIECCSKIGVSIL OCGGNA DGSAVTVALCIGTIN-SYSSGIGGGA FITEKLANETGALSIDAREMA PGA YRDMEKGREVASY GGLAVAL SEEHLHLGSK WYNSU PLCSTMGK ILLSGGNA DAAVTVALCIGTIN-SYSSGIGGGA FITEKLANETGALSIDAREMA PGA YRDMEKGREVAS SORVVVEKKOVAN DEETCSOLGVSIL OCGGNA DAAVTVALCIGTIN-SYSSGIGGGAFIVSKILDNITALS BD GREMA PSKSFKOMEN YHEEKAR VGGLAVAL SORVLKVCLHGAISSDIEVCSNITINDILLFFPSINA DAAVTVALCIGTIN-SYSSGIGGGAFIVSKILDNITALS BD GREMA PSKSFKOMEN YHEEKAR VGGLAVAN SORVVVEKNGVAN DEETCSOLGVSILADGGNAVDAALAS GICIGAVY FINSGIGGGGFML KHPN-GTAHSIN FRETAPACAS KNMHGNSTLSOVGGLSVAV SORVVVEKNGVAN DEETCSOLGVSILADGGNAVDAALAS GICIGAVN FINSGIGGGGFML KHPN-GTAHSIN FRETAPACAS KNMHGNSTLSOVGGLSVAV GREGAVAS VINCSDIGVSILADGGNAVDAALAS GICIGAVN FISSGIGGGGFML KHPN-TAHSIN FRETAPACAS KNMHGNSTLSOVGGLSVAV GREGAVAS VINCSDIGVSILADGGNAVDAALAS TECIGAVN FISSGIGGGGFML KHPN-TAHSIN FRETAPACAS KNMHGNSTLSOVGGLSVAV 
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	180 179 171 200 206 194 176 134 135 176	SELCELYELHELHESGEWSMEEL MPVMD LEGGEEMNELLCLALSAYKSYFHDYRRDMEEVEK-DGS-LLARGSLWRROLAATUROLAONGSATI YDHHGPI SELSLYELYESHGSGNISMSEL MPVMELARSSNNATOLUPGALSSOTEN KLYRKDMEFVENKDQS-LKARGSFYSREELKDEDMTAKNSSDIT VDEKGPI SELKGLYELSG-HGSGNIGMENDL LPVAELARSSNNATOLUPGALSSOTEN KLYRKDMEFVENKDQS-LKKARGFYSREELKDEDMTAKNSSDIT VDEKGPI SELKGLYELSV-HGSGNIGMENDL LPVAELARSSNNATOLUPGSELSKIEHH YEHSYDMAFALNEDGS-LKKARGFYSREELKDETEMTAKNSSDIT VDEKGPI SELKGLYELV-HGSGNIGMENDL LPVAELARSSNNATOLUPGSELSKIEHH YEHSYDMAFALNEDGS-LKKARGFYSREELKDETEMTAKNSSDIT VDEKGPI SELKGLYELV-HGSGNIGMENDL LPVAELASSOTON GEALCAT ELYEDVFI TLKEDNSFVLNSTHDGVLKBOOM KREALSNMMELAKNSSDIT VDEKGPI SELMGLYELV-HGSGNIGMENDL EPVAKLESVGON GEALCAT ELYEDVFI TLKEDNSFVLNSTHDGVLKBOOM KREALSNMMELAKNSSDIT VDEKGPI SELMGLYELMKSHG-SIDANKIEFFTEN MENGEMPI FRELASKIRAPEFSYFKTHPONSKIEAPECV-FIHNGSKFYRFALASTLEETAKFEPEVSTTGKI SELAGLYBANKNYG-SIDARHGFFTEN KLARGFFVCKGARFIDK-KLYPMAH LKDFINOP LMPNGK-VLARGKSVRFREAVSKTEDINKGEPENRGSI SELSGYELAHO-HCRUPMARIFGESIOLARHGFVCGARFIDK-KTVIEQQEVLCEVECRERK-VLAEGER TIBOLADTOILOGS SQLAARFINGSI SELSGYELAHO-HCRUPMARIFGESIOLARGFFVCGARFIDK-KTVIEQQFUNCEVCKGRR-VLAEGER TIBOLADTYBLAIGAAFNGSI SELSGYELAHO-HCRUPMARIFGESIOLARGFFVCGARFINKST-KNAM LKDFUNCEVERRA-VLAEGER TIBOLADTYBLAIGAAFNGSI SELSGYELAHO-HCRUPMARIFGESIOLARGFFVCGARFINKST-KNAM LKDFUNCEVERRA-VLAEGER TIBOLADTYBLAGEGRAAFNGSI
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	284 284 276 308 312 294 276 233 234 275	PHLAROVGRMGGULOAEDFARNOAVLE PALVINNFSRRFLD Y SSGASSGLALLSE KIIDTE EPAKNK FAVRESHRLVE VKWIASVRSNLGDVGVIS PFLARMRQYGGLIJAEDFARNOV 20 PALOFHGFSRRLTIY PAGSSSGLALLAAL EVENGLKNOCDQT-DTTP A TORLVESMKWIASVRSNLGD VGVIS SSLVATIKYGGLIJAEDFARNOV 20 PALOFHGFSRRLTIY PAGSSSGLALLAAL EVENGLKNOCDQT-DTTP A TORLVESMKWIASVRSNLGD LUIY SSLVATIKYGGLIJAEDFARNOV 20 PALOFH NUTT GKRLSYLAAGVSSGLALLAAL NFFNEI INDKDDVSLHLALVESEKWISGIRSEFGVNIDN KSWIDTVAKYNGINN QDVSSYDUHVTKPIS KIRKGANF FENDMUTLISSESSGALLAAL NFFNEI INDKDDVSLHLALVESEKWISGIRSEFGVNIDN KSWIDTVAKYNGINN QDVSSYDUHVTKPIS KIRKGANF FENDMUTLISSESSSGALLAAL NFFNEI INDKDDVSLHLAVESEKWISGIRSEFGVNIDN KSWIDTVAKYNGINN QDVSSYDUHVTKPIS KIRKGANF FENDMUTLISSESSSGALLAAL NFFNEI INDKDDVSLHLAVESEKWISGIRSEFGVNIDN KSWIDTVAKYNGINN QDVSSYDUHVTKPIS KIRKGANF FENDMUTLISSESSSGALLAAL NFFNEI INDKDDVSLHLAVESEKWISGIRSEFGDVNIDN KSWIFTCONGGIVTVEDENSYVSTAAL HTSYYDREVIGGSPCS EALL LCINNISKVDLSEGTSILGCWTD GVHELUFWKWI ASARS RLCDFEG NSWKFTCONGGIVTVEDENNY TARVAKWISGGCOFGDE GSTLYP SPALLEGNNIDGYPLNTFSLAFPKRLHLEVBAKKWISGRAVLADFE YAVNDIGEAGINTVEDELNY TARVIT ANSVERTING GSTLYP SPALLEGNNID LINILKGYNS SRESVESPEGKALTYHL VEAF TAYKKRILGBEKSVD AQUVKDIGAAGGIVTAEDLNYRAELI HHPLNIS GBAVLYV PAPLSGPVLILINILKGYNS SRESVESPEGKA TYHLIVEAF TAYKKRILGBEKSVD XLVKDVKKAGGIUTMEDLRYYRVT ANSVDV
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	386 387 380 408 420 397 375 337 338 375	NKTAREFRDARYSRLASEEWCGALAGKINDNRILP-NOAVEFAKOPNEFHGTSHLSVVDRYHNAVS.TTTVNLLFGSLVDDVTGIILNDEMDDFSIF KKTAREDHTYRYQOFLKEEWAEH RKKIHDIRLESKKEWGEAOPNEFHGTSHLSVVDRYHNAVS.TTTVNLLFGSLVDDVTGIILNDEMDDFSVFTKNAFEFRE FEEDDDHRKYDRYKSDEWAEHAKKINDSHLESKKEWGEAOPNEFHGTSHSVDOKGNAVSTTTVNLLFGGVIDEVTGIILNDEMDDFSVFTKNAFEFRE KQDL TKYTSKSWIKEVFDKGEYSERFFEYNNHEKKELT PEGTSHESIDEDNAISKTTTVNLLFGSLVDFSGIILNDEMDDFSEKEVENAFNIT NMDHVECILELEVIDE RINNSERFFEYNNHEKKELT PEGTSHESIDEDNAISKTTVNLLFGSLVDFSGIILNDEMDDFSEGEKVFNAFNIT NMDHVECILELEVIDE RINNS
HpyGT1p DbGGT PpGGT PsGGT ScCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	495 497 490 512 528 499 478 438 438 439 476	YN IEPE KRELSSTE SU VURATGKUUWU GAAGGSRITTAVLEALWRTYHYD GU ST AF PRLHHOLLF TUY ENPAR NM EEPY KRELSSCAFU VURSTEKUMU GAAGGSRITTAVLEALWRTYHYD GU DEALAR PRLHHOLLF TUY ENP
HpyGT1p DbGGT PpGGT SsCCis2p SpGgt1p SpGgt2p RnGgt1p HsGgt1p AtGGT4	578 580 572 597 612 578 558 518 519 584	SEVQGMEQLEHSVENIDHSTANN-ETSLQNDTITALSTYNRKLEGAVCY FLENBLENKOHKVETGHLANN-ATSLLNNTTYAQSTYNRKLERAAGY KLERHEMERGHDEVQAPITYNGITKRGESIAVSHARKEGREMG SEGHNNIGTECKLEHTYESGSLISN-FTERNODHEGVSEFARREGEBGY AVLSTEKEMEYTKEFFPKSVNN-ATSNVREMHA STYNRKGEISSV EIEVLRALEKFGHIVD-IF, QYPFSEIQAFRINGTYCSSFARREGEBGY SSVATRUKKYGHVWRIKGHDTFLSICATRHHSTYGVSD-FRIGGEGAAY DQVVTAGKTEHEHTEVTPDFIAVCAVRISGMAAASD-SRGGEFAGY DQAVTAKETEHEHTEVTPDFIAVCAVRISGMAAASD-SRGGEFAGY

Рис. 3.26. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білка  $\gamma$ GT1p з *H. polymorpha* з гомологічними білками з *D. bruxellensis* (DbGGT), *P. pastoris* (PpGGT), *P. stipitis* (PsGGT), *S. cerevisiae* (ScCis2p), *S. pombe* (SpGgt1p i SpGgt2p), *R. norvegicus* (RnGgt1p), *H. sapiens* (HsGgt1p) та *A. thaliana* (AtGGT4). Консервативні амінокислотні залишки виділені чорним кольором, подібні – сірим кольором

3.3.2. Конструювання касети з делецією гена GGT1 та отримання делеційного штама Aggt1 H. polymorpha. Касету для делеції гена GGT1 H. *polymorpha* було сконструйовано на основі плазміди рУТ1 [203]. Для конструювання мутантного алеля *Hpggt1::ScLEU2* кодуючу послідовність амінокислотних залишків (4-480) гена GGT1 Н. polymorpha замістили фрагментом ДНК, що містив маркерний ген LEU2 S. cerevisiae. N-кінцевий фрагмент розміром 433 п.н., що відповідав промоторній та частині кодуючої ділянки гена *HpGGT1*, і С-кінцевий фрагмент розміром 836 п.н., що відповідав кодуючій та термінаторній послідовності гена *HpGGT1*, ампліфікували з геномної ДНК штама CBS4732 leu2 Н. polymorpha за допомогою ПЛР, використовуючи праймери VU1F i VU2R для N-кінця та VU3F i VU4R для Cкінця (див. табл. 2.3). N-кінець гена *HpGGT1* був клонований, як HindIII/PstI фрагмент у HindIII/PstI сайти вектора рУТ1 (рис. 3.27), що містив ген LEU2 S. cerevisiae. Отриману плазміду pYT1\_N-GGT1 було розщеплено ендонуклеазами рестрикції XbaI і BamHI та проведено її лігування з XbaI/BamHI С-кінцевим фрагментом гена *HpGGT1*. Сконструйовану плазміду pYAHpGGT1 (див. рис. 3.27) розщепили по сайтах HindIII і SacI для вивільнення делеційної касети Hpggt1::ScLEU2 розміром 3,47 т.п.н., що містила ген LEU2 S. cerevisiae, фланкований 5'- (N-кінець) та 3'- (С-кінець) послідовностями гена GGT1 Н. polymorpha. Делеційна касета *Hpggt1::ScLEU2* була використана ДЛЯ трансформації дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу CBS4732 leu2-2 ura3-20 методом електропорації. Leu<sup>+</sup> трансформанти відбирали на мінімальному середовищі з глюкозою (1%) без лейцину. Далі Leu<sup>+</sup> прототрофи аналізували на здатність до росту на мінімальному сірко- та азот-дефіцитному середовищах за присутності глутатіону, як єдиного джерела сірки та азоту, відповідно. В якості джерел вуглецю використовували глюкозу, гліцерин, етанол та метанол. Оскільки, на чашках важко створити дефіцит сірки та азоту, всі Leu<sup>+</sup> трансформанти однаково росли на всіх вказаних середовищах. Наступними спробами відбору мутантів з пошкодженим геном *HpGGT1* були: вирощування у рідкій культурі (сірко- та азот-дефіцитне середовище в залежності від присутності GSH), визначення активності уGT, визначення внутрішньо- та зовнішньоклітинного GSH+GSSG в пермеабілізованих клітинах та ріст за

110



Рис. 3.27. Лінійні схеми плазмід pYT1, pYT1\_N-GGT1 та pY $\Delta$ HpGGT1. Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що містить ген *LEU2*, позначено товстою сірою смугою; промоторну та C-кінцеву ділянки гена *GGT1 H. polymorpha* – товстим чорним відрізком; послідовність pUC19 – тонкою чорною лінією. Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; Sp, SphI; PI, PstI; Sa, SalI; XI, XbaI; BI, BamHI; SI, SacI

присутності електрофільних сполук (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, метанол). Але жоден з даних підходів не дав позитивного результату. Тому надалі пошук мутантів з делецією гена *GGT1* проводили за допомогою ПЛР-скрінінгу. З Leu<sup>+</sup> трансформантів виділяли сумарну геномну ДНК та проводили перевірку коректного заміщення гена дикого типу на дизруптивний ген за допомогою ПЛР аналізу з двома наборами праймерів: VU14F i VU4R – для дикого гена *HpGGT1* та VU32F i VU31R – для делетованого гена *Hpggt1* (див. табл. 2.3, рис. 3.28, *a*). В результаті ПЛР аналізу з геномної ДНК штама дикого типу синтезувався лише фрагмент 1,214 т.п.н., що відповідав гену *HpGGT1*, а фрагмент ~1,1 т.п.н., що відповідав делетованому



Рис. 3.28. Схематичне представлення (*a*) та ПЛР аналіз (*б*) гена *GGT1 H*. *polymorpha* у штама дикого типу та відповідного делеційного мутанта.

ПЛР праймери позначені як маленькі стрілки. Доріжка 2 і 3 містить праймери специфічні до дикого алеля *GGT1*; доріжка 4 і 5 – праймери специфічні до мутантного алеля  $\Delta ggt1$ . Як матриці для ПЛР ампліфікації були використані геномні ДНК штама дикого типу (*WT*, доріжка 2 і 4) і мутанта  $\Delta ggt1$  (доріжка 3 і 5). ДНК маркер (доріжка 1 і 6). Скорочення сайтів рестрикції: HIII, HindIII; PI, PstI; XI, XbaI; BI, BamHI

гену *Hpggt1* ампліфікувався лише з геномної ДНК мутантних штамів (див. рис. 3.28, *б*). Таким чином, було відібрано 3 мутанти з делецією гена *GGT1 H. polymorpha*. Частота гомологічної рекомбінації ділянок ДНК гена *GGT1* штама CBS4732 *leu2-2 ura3-20* з відповідними послідовностями у складі делеційної касети становила 3,6%.

Штам CBS4732 *leu2-2::ScLEU2 ura3-20 H. polymorpha* отримали шляхом електропорації клітин *H. polymorpha* штама дикого типу CBS4732 *leu2-2 ura3-20* вектором pYT1, який попередньо було лінеаризовано за унікальним сайтом рестрикції PstI. Leu<sup>+</sup> інтегранти відбирали на мінімальному середовищі з 1% глюкозою без лейцину.

**3.3.3.** Функціональний аналіз гена GGT1 H. polymorpha. Відомо, що  $\gamma$ GT дріжджів каталізує перенесення  $\gamma$ -глутамільного залишку глутатіону та  $\gamma$ -глутамільних компонентів на амінокислоти, а також гідролітичне вивільнення L-глутамату з GSH,  $\gamma$ -глутамільних компонентів та S-заміщених похідних глутатіону [11]. Активність  $\gamma$ GT у дріжджів H. polymorpha визначали за здатністю до гідролізу  $\gamma$ -глутамільних компонентів, зокрема  $\gamma$ -глутаміл-n-нітроаніліду. Показано, що активність  $\gamma$ GT у дріжджів H. polymorpha регулюється джерелами азоту та сірки. Дана активність є низькою за використання глутамату або глутатіону, як єдиного джерела азоту, і найвищою за голодування за джерелом азоту (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

## Ефект джерел сірки та азоту на активність γGT (мкмоль\*год<sup>-1</sup>\*мг білка<sup>-1</sup>) дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу та мутанта Δggt1

Джерелс	о поживної	Штам				
рече	овини	CBS4732 leu2-2 ura3-20	∆ggt1 ura3-20			
	-S	0,23±0,01	0,003±0,001			
сірка	GSH	0,044±0,002	0,009±0,002			
	SO4 <sup>2-</sup>	0,048±0,003	0,011±0,002			
	-N	$0,069{\pm}0,005$	0,009±0,002			
	GSH	0,044±0,005	0,003±0,001			
азот	$\mathrm{NH_4}^+$	0,010±0,004	0,004±0,001			
	Glu	0,043±0,004	0,015±0,001			

Подібна регуляція природою джерела азоту також показана для дріжджів *S. cerevisiae* та *S. pombe*, як на рівні активності γGT, так і на рівні експресії генів

ScCIS2 та SpGGT1 i SpGGT2, що кодують даний фермент [68, 71]. Подібно до S. cerevisiae [67], значне зростання активності γGT відмічено у клітин дикого типу дріжджів *H. polvmorpha* за голодування за джерелом сірки, тоді як вирощування клітин на глутатіоні, як єдиному джерелі сірки, не призводило до змін в активності уGT порівняно з сульфат-вирощеними клітинами (див. табл. 3.9). Активність  $\gamma$ GT у мутанта  $\Delta ggt1$  *H. polymorpha* була суттєво зниженою на всіх досліджуваних середовищах (див. табл. 3.9). Аналіз ростових характеристик показав, що мутант  $\Delta ggtl$ , так само як і штам дикого типу, здатний засвоювати екзогенний GSH як єдине джерело сірки, незалежно від використаного джерела азоту в середовищі (іони амонію чи глутамат) (рис. 3.29). Це свідчить про, те що деградація GSH, як екзогенного джерела сірки, у *H. polymorpha* відбувається у уGT-незалежний спосіб. Водночас, обидва штами (дикий тип і мутант) демонстрували однаково слабкий ріст на GSH як єдиному джерелі азоту, порівняно із глутамат- чи амонійвмісним середовищем (рис. 3.30). Подібні результати також нещодавно були отримані для штама дикого типу дріжджів S. cerevisiae [58]. Оскільки, дріжджі Н. polymorpha добре ростуть на глутаматі (див. рис. 3.30), і глутамат є першою амінокислотою, яка вивільняється під час деградації глутатіону, це може свідчити, про те що GSH не деградує на достатньому рівні для забезпечення клітин азотом. Висловлено припущення, що у дріжджів S. cerevisiae уGT бере участь в утилізації вакуолярних запасів GSH за умов голодування за азотом або сіркою [27, 67], тоді як утилізація GSH як екзогенного джерела сірки не залежить від уGT [245] і відбувається за участю деградосоми, яка включає білки Dug1p, Dug2p і Dug3p [14]. Аналіз геному дріжджів *H. polymorpha*, на основі гомології до генів DUG1/YFR044C, DUG2/YBR281C i DUG3/YNL191W S. cerevisiae, виявив наявність трьох генів *HpDUG1*, *HpDUG2* і *HpDUG3*, відповідно. Білковий продукт гена *HpDUG1* виявляє 65% ідентичності та 80% подібності до Dug1p з S. cerevisiae (Entrez-Protein Accession No. ref|NP 116702.1|), тоді як білковий продукт гена *HpDUG2* виявляє 41% ідентичності та 59% подібності до Dug2p з S. cerevisiae (Entrez-Protein Accession No. ref[NP 009840.3]). Подібність між білковим продуктом



CBS4732 leu2-2 ura3-20

*∆ggt1 ura3-20* 

Рис. 3.29. Ріст дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу CBS4732 *leu2-2 ura3-20* (*a*, *б*) та мутанта  $\Delta ggt1$  (*в*, *г*) в залежності від джерела сірки. (*a*, *в*) сіркодефіцитне амоній-вмісне середовище (кружечки), за присутності 0,1 мМ GSH (квадратики) або 26,5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (трикутники); (*б*, *г*) сірко-дефіцитне глутамат-вмісне середовище (кружечки), за присутності 0,1 мМ GSH (квадратики) або 2 мМ MgSO<sub>4</sub> х 7H<sub>2</sub>O (трикутники). Як джерело вуглецю використано 1% глюкозу

гена *HpDUG3* та білком Dug3p *S. cerevisiae* становить 67% ідентичності та 79% подібності (Entrez-Protein Accession No. ref]NP\_014208.1|). Високий ступінь подібності між білковими продуктами генів *HpDUG1*, *HpDUG2* і *HpDUG3* та гомологічними білками Dug1p, Dug2p і Dug3p з *S. cerevisiae* дає можливість припустити існування у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae* [14, 245], альтернативного  $\gamma$ GT-незалежного шляху деградації GSH для забезпечення клітин сіркою.



Рис. 3.30. Ріст дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу CBS4732 *leu2*-2::ScLEU2 ura3-20 та мутанта *Aggt1 ura3-20* в залежності від джерела азоту: азот-дефіцитне сульфат-вмісне середовище (кружечки), за присутності 1,5 мМ GSH (заповнені квадратики), 2,5 мМ GSH (відкриті квадратики), 26,5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (трикутники) або 5 мМ глутамату (ромбики). Як джерело вуглецю використано 1% глюкозу

Показано, що мутант  $\Delta ggt1$  характеризується подібним до штама дикого типу вмістом клітинного глутатіону, як за вирощування на різних джерелах сірки, так і азоту (рис. 3.31). Рівні відновленого глутатіону у мутанта  $\Delta cis2$  S. cerevisiae також були співмірними з відповідними показниками штама дикого типу [71]. Однак, варто зазначити, що за вирощування у середовищі без джерела сірки рівні клітинного GSH+GSSG у штама дикого типу та мутанта  $\Delta ggt1$  були настільки низькими, що їх не вдалось проміряти. Це, вірогідно, може бути наслідком того, що за даних умов обидва штами інтенсивно деградують клітинний глутатіон для забезпечення клітин сіркою. Активація деградації GSH також була показана для штама дикого типу та мутанта  $\Delta cis2$  S. cerevisiae за інкубації в середовищі без джерела сірки. Голодування за сіркою протягом 1 години у штама дикого типу S. cerevisiae призводило до різкого

116

падіння рівнів внутрішньоклітинного глутатіону (в 30 раз), порівняно з відповідними показниками на сульфатвмісному середовищі [58].



Рис. 3.31. Вміст клітинного глутатіону у дріжджів *H. polymorpha* штамів дикого типу та мутанта  $\Delta ggt1$ , вирощених у сірко-дефіцитному амонійвмісному середовищі (*a*, *б*) за присутності 0,1 мМ GSH, 1 мМ GSH або 26,5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та в азот-дефіцитному сульфат-вмісному середовищі (*в*) за присутності 1,5 мМ GSH, 2,5 мМ GSH, 26,5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> або 0,1% глутамату

Штам дикого типу та мутант  $\Delta ggt1$  *H. polymorpha* проаналізували на здатність до росту в середовищі, що містить стрес-індукуючі фактори. Показано, що мутант  $\Delta ggt1$  більш чутливий до органічного пероксиду та до калькофлуору білого, агенту, що призводить до пертурбації полімерів клітинної поверхні, і більш резистентний до іонів кадмію, порівняно із штамом дикого типу (рис. 3.32). Слід зазначити, що підвищена резистентність до іонів кадмію



Рис. 3.32. Чутливість дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу CBS4732 *leu2-2::ScLEU2 ura3-20 (WT)* та мутанта  $\Delta ggt1$  *ura3-20* до різних стрес-індукуючих факторів: 10 мг/л калькофлуору білого (CW), 0,8 мМ тертбутил гідропероксиду (*t*-BOOH) та 125 мкМ іонів кадмію (CdSO<sub>4</sub>). Клітини дріжджів були вирощені у середовищі YPD протягом ночі, відмиті водою та доведені до OD<sub>590</sub> 3,0; 0,3 та 0,03 перед нанесенням 4 мкл суспензії клітин на чашки. Ріст оцінювали на третю (\*) та п'яту (\*\*) добу інкубації за температури 37 °C

також спостерігалася у мутанта  $\Delta cis2$  дріжджів *S. cerevisiae* [71]. Однак, не виявлено відмінностей в чутливості мутанта  $\Delta ggt1$  *H. polymorpha* та відповідного штама дикого типу в ростовому крапельному тесті на середовищах з різними концентраціями стрес-індукуючих факторів: метанолу, етанолу та формальдегіду (табл. 3.10). Окрім цього, мутант  $\Delta ggt1$ 

# Чутливість дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу та мутанта *Aggt1* до різних концентрацій формальдегіду, метанолу та етанолу

	Ріст на синтетичному середовищі											
Штам	Формальдегід, мМ			Метанол, %			Етанол, %					
	1	1,5	2	1	4	6	2	4	6	8	10	12
CBS4732 leu2-2:: ScLEU2 ura3-20	++			++			++					
∆ggt1 ura3-20	++		++		++							

Примітка. Ріст оцінювали на третю та п'яту добу інкубації за температури 37 °C; (++) – інтенсивний ріст

характеризувався подібною до штама дикого типу швидкістю росту та виходом біомаси в рідкому синтетичному середовищі з різними концентраціями метанолу (0,5%, 2%, 4% і 6%), як єдиного джерела вуглецю та енергії (рис. 3.33). Попередньо показано, що штам дикого типу CBS4732 leu2 H. polymorpha характеризується підвищенням рівнів клітинного глутатіону за вирощування у рідкому GSH-вмісному середовищі з метанолом (0,5%), порівняно з відповідними показниками на середовищі з глюкозою [199]. Цей ефект також спостерігали у метилотрофних дріжджів *P. pastoris* під час вирощування на метанолі, порівняно з глюкозо- чи олеатвмісним середовищем [132]. Підвищення рівнів клітинного глутатіону під час метилотрофного росту очевидно пов'язано з підвищеною необхідністю детоксикації формальдегіду у GSH-залежній формальдегіддегідрогеназній реакції і, можливо, у GSHзалежному шляху деградації електрофільних сполук за участю уGT, відомому для вищих еукаріот. На користь того, що у метилотрофних дріжджів уGT може виконувати деякі специфічні функції пов'язані з метаболізмом метанолу свідчить той факт, що метанол сильно індукує γGT у мутантів gsh2 H. polymorpha [199] з пошкодженою уGCS, які проявляють послаблений або



Рис. 3.33. Ріст дріжджів *Н. роlутогрha* штама дикого типу CBS4732 *leu2-*2::ScLEU2 ura3-20 (ромбики) та мутанта *Aggt1 ura3-20* (квадратики) у стандартному синтетичному середовищі в залежності від концентрації метанолу

відсутній ріст в рідкому GSH-збагаченому середовищі з високими концентраціями метанолу (1% і 4%) за рахунок накопичення токсичних концентрацій формальдегіду (більше 0,5 мМ) [199, 246]. Оскільки, мутант  $\Delta ggt1$  не виявляє чутливості за росту в присутності високих концентрацій метанолу та формальдегіду, висловлено припущення, що в альтернативному шляху метаболізування кон'югатів глутатіону з формальдегідом може бути залучений ген *GGT2 H. polymorpha*.

3.3.4. Вивчення метаболізму флуоресцентних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha i S. cerevisiae.* Відомо, що дріжджі *H. polymorpha* i *S. cerevisiae* елімінують електрофільні ксенобіотики (монобромобіман) з цитозолю після їх спонтанної, або опосередкованої GST, кон'югації з GSH (GS-біман) (рис. 3.34) з наступним транспортуванням цих кон'югатів у вакуолю [156, 157]. Подальша



Рис. 3.34. Схема утворення [146] (1) та гіпотетична схема метаболізму (2) кон'югату GSH з монобромобіманом (GS-біман) у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae*. Ймовірні продукти метаболізму кон'югату GS-біман виділено прямокутниками

доля кон'югатів глутатіону у вакуолі і можливі шляхи детоксикації у клітинах дріжджів залишаються не відомими. У клітинах ссавців та в рослин деградація кон'югатів GS-ксенобіотик ініціюється відщепленням  $\gamma$ -глутамільного залишку за участю  $\gamma$ GT [62, 79, 247]. Рослинам також властивий й інший шлях деградації кон'югатів GS-ксенобіотик, який ініціюється відщепленням залишку гліцину за участю PCS [152, 153]. Аналіз геному *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae*, не виявив гена, що кодує PCS (див. детальніше розділ 3.4.1.). Натомість, обидва види дріжджів містять функціональну  $\gamma$ GT (розділ 3.3.3; [71]). З метою з'ясування того, чи  $\gamma$ GT також залучена у деградації кон'югатів GS-ксенобіотик и ровористано монобромобіман як модельний ксенобіотик. Відомо, що біман майже не флуоресціює поки не провзаємодіє з тіолами. Проведено флуоресцентно-мікроскопічне дослідження вакуолярної акумуляції флуоресціюючого GS-біман кон'югату (цей тіольний кон'югат був ідентифікований раніше) [156, 157] та зникнення вакуолярної флуоресценції

клітинами штамів дикого типу і мутантів з відсутньою активністю  $\gamma$ GT ( $\Delta ggt1$  та  $\Delta cis2$ ) *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*. Вихідну GS-біман вакуолярну флуоресценцію спостерігали в обох *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу та делеційних мутантів  $\Delta ggt1$  і  $\Delta cis2$  після 3 годин росту в середовищі з електрофілом монобромобіманом (рис. 3.35, 3 год-0). Подальша стабільна



Рис. 3.35. Флуоресцентна (*a*) та фазово-контрастна (*б*) мікроскопія дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу (*HpWT, ScWT*) та мутантів (*HpAggt1, ScAcis2*). Клітини були вирощені протягом 3 годин у синтетичному середовищі з 100 мкМ монобромобіманом (3 год-0) і далі інкубовані впродовж 16 годин (3 год-16) у Na-фосфатному буфері pH 7,2 з 3% глюкозою

GS-біман вакуолярна флуоресценція була виявлена у мутантів  $\Delta ggt1$  H. polymorpha i  $\Delta cis2$  S. cerevisiae після 16 год (3 год-16) інкубації на противагу до швидкого зникнення вакуолярної флуоресценції у штамів дикого типу H. polymorpha та S. cerevisiae з дифузним розподілом флуоресценції у цитозоль (див. рис. 3.35). Висловлено припущення, що цитозольна флуоресценція в основному може бути представлена кон'югатами монобромобіману з тіольними інтермедіатами шляху меркаптурових кислот: цистеїніл-гліцином, цистеїном і N-ацетилцистеїном (див. рис. 3.34). Висловлено припущення, що зникнення вакуолярної GS-біман флуоресценції є γGT-залежним процесом, який базується на деградації похідних ксенобіотиків та їх елімінації з вакуолі у цитозоль і можливо назовні клітини.

3.3.5. Вивчення транспорту електрофільних похідних з клітин дріжджів Н. polymorpha ma S. cerevisiae. Дослідження зовнішньоклітинної екструзії похідних монобромобіману клітинами дріжджів *H. polymorpha* і *S.* cerevisiae штамів дикого типу та відповідних делеційних мутантів Aggt1 і Acis2 зовнішньоклітинному середовищі клітин проводили V дріжджів, шо інкубувались впродовж 1 години у 0,1 М натрій фосфатному буфері і були попередньо навантажені монобромобіманом протягом 3 годин. Показано, що ВЕРХ пік, що відповідає цистеїн-біману відсутній у зовнішньоклітинному середовищі мутантів Aggt1 H. polymorpha i Acis2 S. cerevisiae, порівняно із зовнішньоклітинним середовищем штамів дикого типу (рис. 3.36, а). Висловлено припущення, що детектований цистеїн-біман кон'югат може бути ймовірним продуктом уGT-залежної деградації GS-біману, який був видалений у зовнішньоклітинне середовище. Також було досліджено уGT-залежну екструзію іншого електрофільного компоненту – N-[1-піреніл]малеїніміду, який може формувати кон'югати з GSH і видалятися з клітин у вигляді різних ксенобіотика похідних [157]. He виявлено похідних цистеїн-N-[1піреніл]малеїніміду і/або N-ацетилцистеїн-N-[1-піреніл]малеїніміду (обидва компоненти показують дуже подібний час затримки на колонці ВЕРХ) у зовнішньоклітинному середовищі клітин мутантів  $\Delta ggt1$  H. polymorpha та  $\Delta cis2$ S. cerevisiae, інкубованих впродовж 1 години з N-[1-піреніл]малеїнімідом, порівняно із зовнішньоклітинним середовищем штамів дикого типу. Вірогідно,



Рис. 3.36. Профілі ВЕРХ зовнішньоклітинних похідних монобромобіману (mBBr) (a) і N-[1-піреніл]малеїніміду (N-Pyr) ( $\delta$ ), які експортуються клітинами дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*, штамів дикого типу (*WT*) і делеційних мутантів ( $\Delta ggt1$ ,  $\Delta cis2$ ). Клітини інкубували з 100 мкМ mBBr або 30 мкМ N-Pyr впродовж 3-ох годин та 1-ї години, відповідно. Кон'югати цистеїну з mBBr (Cys-mB) та GSH, цистеїну або N-ацетилцистеїну з N-Pyr (GS-N-Pyr; Cys/NAC-N-pyr), відповідно

мутантні клітини здатні до екструзії лише кон'югатів GSH з N-[1піреніл]малеїнімідом, на відміну від клітин штамів дикого типу, які можуть видаляти два типи кон'югатів (див. рис. 3.36,  $\delta$ ). Таким чином, висловлено припущення, що метаболізм електрофільних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* здійснюється у γGT-залежному шляху детоксикації ксенобіотиків, який включає детоксикацію сполук типу GS-ксенобіотик з утворенням комплекса цистеїн-ксенобіотик і/або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик як кінцевих продуктів. Гіпотетична схема метаболізму кон'югатів GSH з електрофільними ксенобіотиками (монобромобіманом і N-[1піреніл]малеїнімідом) у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* представлена на рис. 3.37.

$$GSH + RX \xrightarrow{GST}_{RH} GS-X \xrightarrow{\gamma GT}_{\gamma Glu} (Cys-Gly)-X \xrightarrow{Gly} Cys-X \xrightarrow{Cys-X}_{Ac-CoA} NAC-X$$

Гіпотетична метаболізму Рис. 3.37. схема кон'югатів GSH 3 електрофільними ксенобіотиками (mBBr i N-Pyr) у дріжджів *H. polymorpha* та *S.* cerevisiae. RX – ксенобіотик, GS-X – глутатіон-ксенобіотик, (Cys-Gly)-X – цистеїнілгліцин-ксенобіотик, Cys-X – цистеїн-ксенобіотик, NAC-X – Nацетилцистеїн-ксенобіотик. Ймовірні кінцеві продукти деградації кон'югатів GS-X, які видаляються зовнішньоклітинне середовище, виділено V прямокутниками

Підсумовуючи слід зазначити, що нами вперше у дріжджів було показано, що γGT залучена у детоксикації електрофільних сполук. Згодом, участь γGT у метаболізмі GS-біман кон'югатів до цистеїнілгліцин-біману також була підтверджена іншими авторами у дріжджів *S. cerevisiae* [248]. Окрім цього, вони показали, що γGT необхідна для розщеплення кон'югату γглутамілцистеїн-біману, який утворюється в альтернативному шляху деградації GS-біман кон'югатів за участю вакуолярних серинкарбоксипептидаз C i Y (CPC i CPY), до цистеїн-біману, а також для секреції похідних ксенобіотика [248]. Кінцевим продуктом в обох шляхах деградації GS-біман кон'югатів є цистеїнбіман [248], що добре узгоджується з нашими експериментальними даними (див. рис. 3.36, *a*). Не виключено, що альтернативний шлях деградації GS-біман кон'югатів з утворенням проміжної сполуки  $\gamma$ -глутамілцистеїн-біману також може існувати й у *H. polymorpha*, оскільки в геномі цих дріжджів також виявлено гени, що кодують ймовірні карбоксипептидази СРС і СРҮ (див. детальніше розділ 3.4.1.). Варто зазначити, що у дріжджів  $\gamma$ GT відіграє ключову роль у деградації сполук типу GS-ксенобіотик, оскільки  $\gamma$ GT бере участь в обох шляхах деградації цих сполук, а також у секреції похідних ксенобіотика.

Підсумки. Встановлено, що ген GGT1 дріжджів Н. polymorpha є гомологом гена CIS2/ECM38 S. cerevisiae, що кодує γGT. Сконструйований рекомбінантний штам з делецією гена GGT1 H. polymorpha характеризується суттєво зниженою активністю уGT на всіх досліджуваних середовищах [249, 250]. Показано, що активність уGT у дріжджів *H. polymorpha* регулюється джерелами азоту та сірки і є найвищою за умов голодування за сіркою та азотом і найнижчою за використання іонів амонію як джерела азоту [250]. З'ясовано, що деградація GSH, як екзогенного джерела сірки, не залежить від үGT у дріжджів Н. polymorpha [249, 250]. Досліджено метаболізм флуоресцентних ксенобіотиків та транспорт електрофільних похідних з клітин дріжджів *H. polymorpha* та *S.* cerevisiae штамів дикого типу та мутантів з пошкодженою уGT. Вперше у дріжджів показано, що γGT залучена у детоксикації електрофільних сполук [249,250]. Висловлено припущення, метаболізм електрофільних ЩО ксенобіотиків (монобромобіману та N-піренілмалеїніміду) у дріжджів *H*. polymorpha i S. cerevisiae відбувається, у відомому для клітин вищих еукаріот, уGT-залежному шляху деградації ксенобіотиків з утворенням як кінцевих продуктів сполук типу цистеїн-ксенобіотик і/або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик.

Результати висвітлені в цьому розділі опубліковані в наступних роботах [249, 250].

3.4. Вивчення особливостей відповіді метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* на кадмієвий стрес

3.4.1. Ідентифікація специфічних хелаторів іонів кадмію у дріжджів Н. *polymorpha*. Відомо, що одним із механізмів забезпечення толерантності до іонів кадмію у дріжджів S. pombe і C. glabrata, а також у багатьох видів рослин є синтез полімерних похідних глутатіону, фітохелатинів, за участю ферменту PCS [167, 251]. Гени, що кодують PCS були виявлені у ціанобактерій (Nostoc sp., Anabaena variabilis, Prochlorococcus marinus), дріжджів (S. pombe), водоростей (Chlamydomonas reinhardtii), вищих рослин (A. thaliana, Triticum aestivum) і навіть у тварин (нематоди Caenorhabditis elegans та земляного черв'яка Eisenia fetida) [252, 253]. Однак, нічого не повідомлялось ні про поширення гена PCS, ні про синтез фітохелатинів, у метилотрофних мікроорганізмів. У зв'язку з цим, цікаво було з'ясувати чи метилотрофні дріжджі *H. polymorpha*, яким притаманна підвищена толерантність до різного роду стресів, здатні синтезувати фітохелатини у відповідь на дію іонів кадмію. З цією метою, геном *H. polymorpha* спершу було проаналізовано на присутність гена, що кодує PCS, за гомологією до генів PCS2/PCS/SPAC3H1.10 S. pombe, CAD1/PCS1 і PCS2 А. thaliana та PCS-1 С. elegans. Пошук здійснювався як на основі гомології до ДНК послідовностей вищезгаданих генів, так і до амінокислотної послідовності відповідних білкових продуктів. Подібно до дріжджів S. cerevisiae, в геномі H. polymorpha не виявлено гена, що кодує PCS. Однак, нещодавно було показано, що незважаючи на відсутність гена PCS, дріжджі S. cerevisiae за присутності іонів кадмію здатні синтезувати короткі фітохелатини (PC<sub>2</sub>) за участю вакуолярних серинкарбоксипептидаз, СРУ і СРС [254]. У зв'язку з цим, геном Н. polymorpha також було проаналізовано на присутність генів, що кодують СРУ і СРС. На основі гомології до генів PRC1/YMR297W та YBR139W S. cerevisiae, що кодують СРУ і СРС, відповідно, було виявлено два гени НрСРУ та НрСРС. Білковий продукт гена НрСРУ виявляє 61% ідентичності та 72% подібності до CPY/Prc1 з S. cerevisiae (EntrezProtein Accession No. ref[NP\_014026.1]), тоді як білковий продукт гена *HpCPC* виявляє 56% ідентичності та 71% подібності до CPC з *S. cerevisiae* (Entrez-Protein Accession No. ref[NP\_009697.3]).

Для ідентифікації ймовірних хелаторів іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, клітини штамів дикого типу трьох різних генетичних ліній – NCYC495, CBS4732 і DL-1 були проаналізовані на здатність продукувати SH-вмісні компоненти після їх інкубації в середовищі без або з іонами кадмію, як описано у матеріалах і методах (див. розділ 2.2.14). Встановлено, що дріжджі *H. polymorpha* штамів NCYC495 *leu1-1*, CBS4732 *leu2-2*, DL-1 *leu2* та CBS4732 *leu2* не синтезують фітохелатини, але містять GSH як основний SH-вмісний компонент за використання різних умов культивування: синтетичне чи багате середовище, різна концентрація іонів кадмію (0,1 мМ і 0,3 мМ), різна тривалість інкубації клітин з іонами кадмію (2-23 год). Типові профілі BEPX SH-вмісних компонентів з клітин штама дикого типу NCYC495 *leu1-1 H. polymorpha* за контрольних умов та за інкубації з іонами кадмію представлені на рис. 3.38.

Нездатність *H. polymorpha* синтезувати фітохелатини узгоджується з відсутністю в геномі цих дріжджів гена *PCS*, залученого в основному шляху синтезу фітохелатинів, а також може свідчити про те, що ймовірні білкові продукти генів *HpCPY* та *HpCPC*, на відміну від CPY та CPC *S. cerevisiae* [254], вірогідно, не задіяні в обхідному шляху синтезу фітохелатинів. Слід зазначити, що ген, який кодує СРУ, основний фермент в біосинтезі РС2 у S. cerevisiae [254], також присутній в геномі S. pombe [255] та A. thaliana (Entrez-Protein Accession No. prf|1908426A). Однак, мутанти psc2 S. pombe та cad1 A. thaliana, із пошкодженою PCS, не здатні до синтезу фітохелатинів за дії іонів кадмію [256]. Відтак, висловлено припущення, ЩО обхідний ШЛЯХ синтезу фітохелатинів за участю СРУ не є універсальним компенсаторним механізмом серед живих організмів за відсутності або пошкодження основного шляху синтезу фітохелатинів.



Тривалість елюції, хв

Рис. 3.38. ВЕРХ профілі SH-вмісних компонентів, що утворюються в клітинах метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, для штама дикого типу NCYC495 *leu1-1*, вирощеного у YNB середовищі з 1% глюкозою за контрольних (*a*) та кадмій-індукованих (0,1 мМ ; 16 год) умов (*б*)

3.4.2. Вивчення акумуляції іонів кадмію. Вміст іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* визначали в клітинах, інкубованих у середовищі без або з глюкозою. Висловлено припущення, що клітини, які піддані голодуванню за глюкозою, будуть відображати неспецифічну абсорбцію, тоді як клітини, забезпечені глюкозою, будуть демонструвати внутрішньоклітинну акумуляцію іонів кадмію, завдяки забезпеченню клітини енергією. Однак, нами було показано, що клітини *H. polymorpha*, забезпечені глюкозою, виявляли лише незначне підвищення абсорбції іонів кадмію, порівняно з клітинами інкубованими без глюкози. Не виключено, що клітини *H. polymorpha* інкубовані без глюкози, мають достатньо внутрішних джерел енергії (трегалоза, глікоген), які можуть енергізувати транспорт іонів кадмію. Тому наступний експеримент був проведений з клітинами, вбитими нагріванням або додаванням 1 мМ азиду натрію. Показано, що додавання азиду натрію призводило до зниження абсорбції іонів кадмію (табл. 3.11). Клітини, оброблені азидом натрію, абсорбували лише 40% іонів кадмію порівняно з глюкозо-голодуючими клітинами. Дані результати свідчать, що акумуляція іонів кадмію у дріжджів Н. *polymorpha* є енергозалежною. Транспорт іонів кадмію у дріжджів *H*. polymorpha ймовірно спряжений з транспортом інших аніонів або з електрохімічним градієнтом через плазматичну мембрану, як було показано для опосередкованого Zrt1 поглинання у S. cerevisiae [257]. В енергізованих клітинах різницю в концентрації кадмію в цитоплазмі і в середовищі можна пояснити мембранним потенціалом як рушійною силою. Прогрівання клітин не спричиняло зниження абсорбції іонів кадмію, можливо, завдяки частковому руйнуванню клітин, що призводило до вивільнення додаткових сайтів внутрішньоклітинну акумуляцію зв'язування. Відтак, іонів кадмію вираховували як різницю абсорбції іонів кадмію клітинами, інкубованими з глюкозою (енергізовані клітини), і без джерела вуглецю (неенергізовані клітини) на мг сухої ваги клітин. Показано, що штами дикого типу дріжджів Н. polymorpha трьох різних генетичних ліній (NCYC495, CBS4732, DL-1) акумулюють приблизно однакову кількість іонів кадмію (див. табл. 3.11). Цікаво зазначити, що абсорбція іонів кадмію у *H. polymorpha* є значно вищою, ніж у S. cerevisiae, особливо коли порівнювати клітини, що голодують за глюкозою (див. табл. 3.11). Це вказує на потенційну біотехнологічну важливість дріжджів *H. polymorpha* для сорбції іонів кадмію з розчинів, включаючи стічні води. Підвищена неспецифічна абсорбція іонів кадмію дріжджами *H. polymorpha*, вірогідно, може бути пов'язана з оптимальним складом зовнішньоклітинних глікопротеїнів. Нещодавні дослідження сорбції іонів кадмію декількома різними видами дріжджів показали, що дріжджі

## Таблиця 3.11

Акумуляція іонів кадмію (мкг\*мг сухої ваги клітин<sup>-1</sup>) штамами дикого типу та рекомбінантними штамами дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* 

	Штам	Абсорбція мкг*мг сухої	Акумуляція	
		+глюкоза	-глюкоза	ioнiв Cd <sup>2+</sup>
	NCYC495 <i>leu1-1</i> +NaN <sub>3</sub>	-	0,5±0,011	-
$H_{n}WT$	NCYC495 <i>leu1-1</i>	1,45±0,131	1,2±0,085	0,25
11011	CBS4732 <i>leu2-2</i>	1,42±0,014	1,12±0,024	0,3
	DL-1 leu2	1,54±0,064	1,26±0,021	0,28
ScWT	L3262-Y ura3 his4	0,56±0,014	0,2±0,021	0,36
	<i>∆gsh2</i> NCYC495	1,56±0,021	1,79±0,184	-0,23
Hp∆gsh2	∆gsh2 CBS4732	1,2±0,134	0,86±0,028	0,34
	⊿gsh2 DL-1	1,36±0,035	0,95±0,049	0,41
II. Acal 1	<i>∆gsh1</i> NCYC495	1,63±0,136	1,63±0,156	0
Hp⊿gsn1	∆gsh1 CBS4732	2,37±0,141	2,62±0,035	-0,25
Hp∆ggt1	⊿ggt1 CBS4732	1,18±0,115	1,31±0,115	-0,13
Hp∆met4	<i>∆met4</i> DL-1	0,22±0,014	0,13±0,007	0,09
HpmcMET4	mcMET4 DL-1	0,39±0,014	0,27±0,007	0,12
HpmcGSH2	mcGSH2 DL-1	0,26±0,007	0,42±0,021	-0,16
Sc∆met4	<i>∆met4</i> L3262-Y	0,29±0,013	0,31±0,013	-0,02

*Hansenula anomala* характеризуються найвищою толерантністю до іонів кадмію і їх зовнішньоклітинні глікопротеїни адсорбують близько 90% загального вмісту кадмію, зв'язаного клітинами. Поряд з цим, дріжджі *S. cerevisiae* виявляють найнижчу толерантність до іонів кадмію, і їх зовнішньоклітинні глікопротеїни адсорбують близько 6% загального вмісту кадмію [170].

Також було досліджено акумуляцію іонів кадмію у мутантних клітин Н. polymorpha з пошкодженим метаболізмом глутатіону ( $\Delta gsh2$  і  $\Delta ggt1$ ) та асиміляцією сульфату (Agsh1/met1 і Amet4). Показано, що неенергізовані Hp⊿gsh2 штама NCYC495 3 пошкодженою клітини мутанта γGCS, характеризувалися особливо високою неспецифічною абсорбцією іонів кадмію. Можливо, з цієї причини вони показали негативний результат для акумуляції іонів кадмію. Такі результати можна пояснити аденіновою ауксотрофністю даного мутанта, оскільки відомо, що гени біосинтезу пуринів є необхідними для кадмієвої толерантності у S. pombe [187]. Два інші мутанти HpAgsh2, похідні від CBS4732 і DL-1, демонстрували 10% і 50% зростання в акумуляції іонів кадмію клітинами, порівняно з відповідними штамами дикого типу. Мутант  $\Delta gsh1$  S. cerevisiae, з аналогічним пошкодженням шляху біосинтезу глутатіону, демонстрував двохкратне збільшення поглинання іонів металу у порівнянні з штамом дикого типу [194]. Показано, що у дріжджів S. cerevisiae комплекс Cd-GSH регулює поглинання іонів кадмію у клітину, запобігаючи надакумуляції металу [194]. Клітини GSH-дефіцитних мутантів Hp/2gsh2 ймовірно нездатні формувати комплекс Cd-GSH та, відповідно, регулювати поглинання іонів кадмію, і тому надакумулювали іони кадмію.

Клітини мутанта  $\Delta ggt1 H. polymorpha$  з пошкодженою активністю γGT за присутності глюкози абсорбували навіть менше кадмію, ніж клітини, що голодували за глюкозою (див. табл. 3.11). Висловлено припущення, що γGT *H. polymorpha*, бере участь у метаболізмі клітинного комплексу Cd-GSH, подібно до участі даного ферменту в метаболізмі комплексу Cd-GSH у *S. cerevisiae* [192], з утворенням Cd-цистеїнілгліцину, та трансформації кон'югатів GSHксенобіотик у вищих еукаріот [76, 78] та у дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* (див. детальніше розділ 3.3.4 і 3.3.5). Нещодавно також було показано, що дріжджі *S. cerevisiae* мають інший фермент, GST, що каталізує реакції ксенобіотиків з тіольним залишком глутатіону і, очевидно, може каталізувати кон'югацію кадмію з GSH, формуючи комплекси Cd-GSH [165]. У *S. cerevisiae* акумуляція GSH у вакуолі може проявляти ефект зворотнього інгібування на його Ycf1-залежний транспорт у вакуолю [59]. Оскільки, білок Ycf1 транспортує не лише GSH, а й глутатіон-S-кон'югати (Cd-GSH) у вакуолю, висловлено припущення, що нездатність мутанта  $\Delta ggt1$  метаболізувати Cd-GSH комплекс, вірогідно, призводить до його накопичення у вакуолі, що в свою чергу може порушувати подальший транспорт Cd-GSH комплексу у вакуолю, і відповідно, зростання його концентрації у цитозолі, результатом чого є сильне інгібування акумуляції іонів кадмію. У *S. cerevisiae* γGT здатна, прямо або опосередковано, активувати транспортер Ycf1 [59]. Відтак, не виключено, що γGT може бути необхідною й для транспорту Cd-GSH комплексу у вакуолю і/або для видалення продуктів метаболізму кон'югатів GSH з кадмієм з клітини, як це було показано для продуктів деградації GSH з електрофільними сполуками у *S. cerevisiae* [248].

Показано, що мутанти  $Hp \Delta gsh1/met1$  з пошкодженим геном GSH1/MET1, який є гомологом гена MET1 S. cerevisiae, що кодує SUMT, залучену у біосинтезі сірогему і необхідну для відновлення сульфіту до сульфіду [112], характеризувалися сильно зниженою акумуляцією іонів кадмію, порівняно із штамом дикого типу (див. табл. 3.11). Клітини мутанта HpAgsh1/met1, вирощеного на глюкозі, демонстрували однаковий або нижчий рівень абсорбції іонів кадмію порівняно з клітинами, що голодували за глюкозою. Дослідження акумуляції іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* з делецією транскрипційного регулятора шляху асиміляції сірки, білка Met4, показало, що обидва мутанти *Amet4* характеризувалися зниженням акумуляції іонів кадмію, у порівнянні з відповідними показниками штамів дикого типу (див. табл. 3.11). Повідомлялось, що у S. pombe і C. glabrata, комплекс Cd-GSH може прямо включати сульфід, утворюючи нанокристали CdS-GSH [184, 185, 226]. У зв'язку з цим, можна припустити, що сульфід регулює дозрівання комплексу Cd-GSH за невідомим механізмом, і в цей спосіб також регулює поглинання іонів кадмію.

Поглинання іонів кадмію також було досліджено у трансформантів *mcGSH2* та *mcMET4 H. polymorpha*, що містили додаткові копії гена *GSH2* та

*MET4*, відповідно. Показано, що трансформант *mcGSH2* демонстрував сильно знижену акумуляцію іонів кадмію, порівняно із штамом дикого типу (див. табл. 3.11). Наявність додаткових копій гена *GSH2* у даного трансформанта зумовлює суттєве підвищення рівнів внутрішньоклітинного глутатіону, порівняно із штамом дикого типу [258]. Відтак, сильне зниження акумуляції іонів кадмію в мультикопійного трансформанта *mcGSH2* може бути наслідком зростання концентрації Cd-GSH комплексу в клітині. У трансформанта *mcMET4*, з надекспресією гена *MET4 H. polymorpha*, акумуляція іонів кадмію лише незначно зростала порівняно з мутантом Нр $\Delta met4$  та була зниженою, порівняно з відповідним штамом дикого типу (див. табл. 3.11), що також можна пояснити підвищеним внутрішньоклітинним рівнем глутатіону у даного трансформанта [258] і, відповідно, зростанням концентрації Cd-GSH комплексу в клітині.

Гіпотетична схема участі генів *GSH2*, *GGT1*, *GSH1/MET1* та *MET4* в регуляції акумуляції іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* представлено на рис. 3.39.

Також не виключено, що в *H. polymorpha* глутатіон або інші сірковмісні сполуки залучені в утворення Fe/S кластерів і в регуляції поглинання кадмію. Попередньо було показано, що у *S. cerevisiae* біосинтез GSH є критичним для дозрівання цитозольних Fe/S-вмісних білків [17]. Окрім цього, у *S. cerevisiae* глутатіон та монотіольні глутаредоксини Grx3 та Grx4 беруть участь у сенсуванні заліза завдяки транскрипційному регулятору гомеостазу заліза Aft1, який опосередковано сенсує залізо через біогенез клітинних Fe/S кластерів [259-261]. У дріжджів *P. guilliermondii* пошкодження біосинтезу глутатіону у мутантів  $\Delta gsh1$  та  $\Delta gsh2$ , з делецією першого та другого гена біосинтезу GSH, відповідно, також призводило до порушення гомеостазу заліза в клітинах (рис. 3.40).

Окрім цього, було досліджено толерантність до іонів кадмію у рекомбінантних штамів дріжджів *Н. роlymorpha* з делецією та надекспресією гена *MET4*. Показано, що мутант *Дтеt4* дріжджів *Н. роlymorpha*, подібно до мутанта *Дтеt4 S. cerevisiae* [52, 173], більш чутливий до іонів кадмію,



Рис. 3.39. Гіпотетична схема участі генів *GSH2*, *GGT1*, *GSH1/MET1* та *MET4* в регуляції акумуляції іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H*. *polymorpha*. Cd-(GS)<sub>2</sub> та Cd-S<sub>2</sub> – комплекси кадмію з глутатіоном та цистеїнілгліцином, відповідно; CdS-(GS)<sub>2</sub> – сульфід-вмісний комплекс кадмію з глутатіоном

порівняно з штамом дикого типу (рис. 3.41). Водночас, штам *H. polymorpha*, що містить додаткові копії гена *MET4*, проявляє підвищену резистентність до іонів кадмію, порівняно з відповідним мутантом  $\Delta met4$  та штамом дикого типу (див. рис. 3.41). Ці дані свідчать про чітку залежність між механізмами резистентності до іонів кадмію та функціональною активністю гена *MET4* дріжджів *H. polymorpha*. Також варто зазначити, що як штам дикого типу, так і мутант  $\Delta met4$ , дріжджів *H. polymorpha* проявляють значно вищу толерантність до іонів кадмію торівняно з відповідними штамами дріжджів *S. cerevisiae* (див. рис. 3.41).

Відомо, що дріжджі *S. cerevisiae* володіють подібною стратегією детоксикації електрофільних ксенобіотиків та кадмію, яка полягає в їх



Рис. 3.40. Вміст заліза у штама дикого типу R-66 (*WT*) та мутантів  $\Delta gsh1$  і  $\Delta gsh2$  дріжджів *P. guilliermondii* за присутності ( та відсутності ( 50 мкМ глутатіону

спонтанній або опосередкованій GST [149, 165] кон'югації з GSH, з подальшим видаленням глутатіон-S-кон'югатів з клітини або їх компартменталізації у вакуолю за участю MgATP-енергізованого, нечутливого до роз'єднувачів та інгібованого ванадатом вакуолярного транспортера Ycfl [154, 156, 158]. Вірогідно, що у *H. polymorpha* GST також може бути залучена в утворенні кон'югатів GSH з електрофільними сполуками і/або кадмієм, оскільки в геномі цих дріжджів виявлено 2 гени *HpGTT1* і *HpGTT2*, які кодують GST. Білковий продукт гена GTT1 виявляє високий ступінь подібності до GST з P. pastoris (56%) ідентичності, 75% подібності, Entrez-Protein Accession No. emb|CCA38487.1|), D. bruxellensis (51% ідентичності, 71% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF46508.1|), Aspergillus niger (50% ідентичності, 66% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP 001399792.2|) та Gst1 (38% ідентичності, 50% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|NP 588298.1|) і Gst2 з S. pombe (41% ідентичності, 55% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref[NP 588517.1]), тоді як білковий продукт гена GTT2 виявляє значну подібність до GST з бактерій. Більше того, показано, що експресія генів GTT Н. polymorpha позитивно регулюється за дії високих концентрацій іонів кадмію [238]. Аналіз геномної бази даних *Н. polymorpha* також виявив ген, що кодує



Рис. 3.41. Чутливість дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* штамів дикого типу (*WT*) та мутантів  $\Delta met4$  і мультикопійного трансформанта *mcMET4* до різних концентрацій іонів кадмію (0-8 мМ) у середовищі YNB за наявності 0,1 мМ метіоніну і 0,1 мМ глутатіону. Клітини дріжджів були вирощені у середовищі YPD протягом ночі, відмиті водою та доведені до OD<sub>590</sub> 0,3 перед нанесенням 4 мкл суспензії клітин на чашки. Ріст оцінювали на четверту добу інкубації за температури 28 °C

гіпотетичний білок Ycfl, який виявляє високий ступінь подібності до метал резистентного білка YCF1 з *P. pastoris* (58% ідентичності і 73% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref $|XP_002490758.1|$ ) та *C. albicans* (56% ідентичності і 71% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EEQ47028.1|), а також Ycflp з *S. cerevisiae* (53% ідентичності і 69% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EEU09342.1|). Окрім цього, для штама дикого типу дріжджів *H. polymorpha* показано існування MgATP-залежного, нечутливого до роз'єднувачів та інгібованого ванадатом поглинання кон'югатів [<sup>3</sup>H]N-етилмалеїнімід-S-глутатіону сирцевими мембранними везикулами, ймовірно вакуолярного, а не плазматичного походження [262]. Відтак, висловлено припущення, що подібно до *S. cerevisiae*, транспорт глутатіон S-кон'югатів у вакуолю дріжджів *H. polymorpha* здійснюється за участю білка Ycfl. Відомо,

що у *S. cerevisiae* видалення комплексів глутатіону з кадмієм з клітини опосередковано білком Yorl [180]. Аналіз бази даних *H. polymorpha* також виявив ген, що кодує гіпотетичний білок Yorl, який виявляє високий ступінь подібності до олігоміцин резистентної ATP-залежної пермеази yorl з *D. bruxellensis* (56% ідентичності і 74% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIF45182.1|), Yorl з *C. orthopsilosis* (52% ідентичності і 76% подібності, Entrez-Protein Accession No. ref|XP\_003868934.1|) та Yorlp з *S. cerevisiae* (43% ідентичності і 62% подібності, Entrez-Protein Accession No. gb|EIW10630.1|). Окрім цього, показано, що дріжджі *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* здатні транспортувати кон'югати GSH з електрофільними сполуками назовні клітини (розділ 3.3.5; [156, 157]). Таким чином, не виключено, що детоксикація іонів кадмію у *H. polymorpha*, подібно до детоксикації електрофільних ксенобіотиків, може включати в себе не лише транспортування комплексів (GS)<sub>2</sub>Cd у вакуолю, а й назовні клітини.

Підсумки. Встановлено, що дріжджі *H. polymorpha*, на відміну від *S. pombe* та *C. glabrata* [167], не синтезують фітохелатини, але містять GSH, як основний SH-вмісний компонент за різних умов культивування з іонами кадмію [262]. Аналіз геному дріжджів *H. polymorpha* також не виявив гена, що кодує фітохелатинсинтазу – основний фермент в біосинтезі фітохелатинів. Вірогідно, вакуолярні карбоксипептидази СРҮ і СРС, гени, яких ідентифіковано у геномі *H. polymorpha*, не залучені в обхідному шляху синтезу коротких фітохелатинів, відомому для *S. cerevisiae* [254]. Також досліджено акумуляцію іонів кадмію штамами дикого типу та рекомбінантними штамами дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*. Показано, що неспецифічна абсорбція іонів кадмію та толерантність до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* є значно вищою, ніж у *S. cerevisiae* [262, 263]. Встановлено, що внутрішньоклітинна акумуляція іонів кадмію є енергозалежним процесом. Пошкодження біосинтезу глутатіону у мутантів *Agsh2* призводить до деякого підвищення акумуляції іонів кадмію, а пошкодження деградації GSH і/або його кон'югатів у мутанта *Aggt1* та шляхів

асиміляції сульфату у мутантів  $\Delta gsh1/met1$  і  $\Delta met4$  – до зниження енергозалежної акумуляції іонів кадмію [262, 263]. Надекспресія генів GSH2 та *MET4* у мультикопійних трансформантів *mcGSH2* та *mcMET4* дріжджів *H. polymorpha* призводить до зниження внутрішньоклітинної акумуляції іонів кадмію [263]. Висловлено припущення, що поглинання іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* регулюється комплексом Cd-GSH, як це було показано для *S. cerevisiae*, а гени *GSH1/MET1* і *MET4* залучені у дозрівання, тоді як ген *GGT1* – у метаболізм клітинного комплексу Cd-GSH. Окрім цього, з'ясовано, що ген *MET4* залучений у підтриманні резистентності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* [263]. В результаті проведених досліджень запропоновано гіпотетичну схему детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Результати висвітлені в цьому розділі опубліковані в наступних роботах [262, 263].

#### РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Глутатіон є важливим метаболітом для росту еукаріотичних клітин, бере участь у їх захисті від важких металів, вільних радикалів та електрофільних сполук [1, 4, 11, 16, 20]. Завдяки своїм унікальним антиоксидантним властивостям GSH широко застосовується у медичній, косметичній та харчовій промисловості [2, 3]. Незважаючи на те, що метаболізм GSH та його регуляція добре вивчені на моделі пекарських дріжджів S. cerevisiae, дані процеси практично не досліджені у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, які характеризуються безпосередньою участю GSH у процесах детоксикації токсичного інтермедіату метаболізму метанолу, формальдегіду [7, 8], природно високим рівнем внутрішньоклітинного глутатіону, підвищеною толерантністю до різного роду стресів і розглядаються як перспективний господар для продукції рекомбінантних білків на промисловому рівні, біоконверсії та ремедіації навколишнього середовища [9, 10]. Відтак, дослідження генетичного контролю метаболізму глутатіону та GSH-залежних механізмів захисту від стресу у дріжджів *H. polymorpha* залишається актуальним у сучасній світовій науці, як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору. У зв'язку з цим, дана дисертаційна робота була присвячена двом основним напрямкам:

1. ідентифікації нових генів, залучених у метаболізм GSH або його попередника, цистеїну, у дріжджів *H. polymorpha*;

2. дослідженню механізмів захисту від електрофільного та кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, а саме:

- ідентифікації специфічних хелаторів іонів кадмію;
- вивченню функції ідентифікованих генів *GSH1/MET1* і *GGT1*, гена *MET4* та попередньо клонованого гена *GSH2 H. polymorpha*.

Ген *GSH1/MET1 Н. polymorpha* клоновано шляхом функціональної комплементації глутатіон-залежного фенотипу мутанта gsh1 H. polymorpha,

який був попередньо виділений як MNNG-резистентний та кадмій-чутливий клон [246]. Показано, що даний ген здатний відновлювати резистентність до іонів кадмію, чутливість до MNNG, нормальні рівні глутатіону та проліферацію клітин на мінімальному середовищі без додавання цистеїну або глутатіону, при введені його у клітини мутанта gsh1. Для з'ясування функції гена GSH1/MET1 у GSH і/або процесах біосинтезу його регуляції сконструйовано та охарактеризовано рекомбінантні штами дріжджів *H. polymorpha* з делецією цього гена та гена GSH2, що кодує перший фермент біосинтезу глутатіону уGCS. Виходячи з результатів генетичного аналізу, у мутантів gsh1 та  $\Delta gsh1/met1$  пошкоджений один і той же ген. Показано, що ген GSH1/MET1 H. polymorpha виявляє гомологію до гена MET1 S. cerevisiae, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилазу, залучену у біосинтез кофактора сульфітредуктази, сірогему. Здатність мутанта  $\Delta gsh1/met1$ повністю відновлювати ріст та частково відновлювати рівні клітинного глутатіону на синтетичному середовищі з цистеїном або GSH, як єдиним джерелом сірки, але не з метіоніном або S-аденозилметіоніном чи неорганічними (сульфат, сульфіт) джерелами сірки, свідчить про те, що активність Gsh1p/Met1p H. polymorpha, подібно до Metlp S. cerevisiae, є абсолютно необхідною для росту на сульфаті та сульфіті. Однак, на відміну від мутанта metl S. cerevisiae, який здатний засвоювати S-амінокислоти та їх похідні, делеція гена GSH1/MET1 H. polymorpha частково порушує здатність до росту на S-вмісних сполуках з метильного циклу. Фенотипову відмінність у рості мутантів metl S. cerevisiae i Agsh1/met1 H. polymorpha можна пояснити відмінностями у шляхах асиміляції сульфату на етапі вбудовування H<sub>2</sub>S з утворенням гомоцистеїну у S. cerevisiae [88] і цистеїну у Н. polymorpha [223], та відмінностями в ефективності вбудовування цистеїну і метіоніну у сірковмісні метаболіти у S. cerevisiae і H. *polymorpha*. Зокрема, нещодавно показано, що *H. polymorpha*, на відміну від *S.* cerevisiae, значно ефективніше вбудовує мічений <sup>35</sup>S-цистеїн у сіркові компоненти, ніж <sup>35</sup>S-метіонін, що узгоджується з наявністю в геномі *H*. polymorpha гомологів генів YCT1 і MUP3 S. cerevisiae, що кодують високо-

цистеїн-специфічний транспортер і низько-афінну метіонінову афінний пермеазу, відповідно, та відсутністю гомолога гена MUP1 S. cerevisiae, що кодує високо-афінну метіонінову пермеазу [223]. Нездатність мутанта metl S. cerevisiae рости на сульфаті та сульфіті пов'язана із нездатністю відновлювати сульфіт до сульфіду, завдяки пошкодженню активності сірогем-залежної сульфітредуктази, що корелює із накопиченням сульфіту в клітині [110]. Ген GSH1/MET1 H. polymorpha відновлює ріст мутанта  $\Delta met1$  S. cerevisiae на мінімальному середовищі з іонами сульфату, як єдиним джерелом сірки. На основі строгої гомології між білком HpGsh1p/Met1p і SUMT з S. cerevisiae та інших дріжджів, та здатності гена GSH1/MET1 H. polymorpha комплементувати мутацію metl S. cerevisiae, зроблено висновок про те, що клонований ген GSH1/MET1 Н. polymorpha, кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилазу. Біоінформатичний аналіз білка HpGsh1p/Met1p, окрім тетрапіролметилазного та уропорфіриноген метилтрансферазного мотивів, які також характерні для білків-гомологів з інших організмів, виявив унікальну "coiled-coil" структуру, що може вказувати на потенційну можливість зв'язуватися з ДНК та регулювати експресію деяких генів. Відтак, було висловлено припущення, що відсутність каталітичної активності даного білка у мутанта gsh1/met1 H. polymorpha може призводити не лише до нездатності асимілювати сульфати і синтезувати цистеїн, що є субстратом уGCS, а й виконувати певну регуляторну роль. Оскільки, регуляція біосинтезу GSH відбувається на першому етапі, цікаво було дослідити ймовірну участь білка Gsh1p/Met1p в регуляції синтезу γGCS. Виходячи з того, що активність γGCS не ушкоджена в обох мутантів gsh1 і  $\Delta$ gsh1/met1 H. polymorpha, на відміну від мутанта  $\Delta gsh2$  H. polymorpha, зроблено висновок про те, що білок Gsh1p/Met1p не залучений у регуляції синтезу γGCS. Загально прийнято, що активність уGCS у дріжджів S. cerevisiae регулюється кінцевим продуктом шляху біосинтезу, глутатіоном [45]. В роботі показано, що активність уGCS у дріжджів *H. polymorpha* не регулюється такими джерелами сірки як іони сульфату, цистеїн чи GSH. Окрім цього, показано, що активність уGCS не

корелює з підвищеним внутрішньоклітинним вмістом глутатіону у Н. *polymorpha* штамів дикого типу трьох різних генетичних ліній, вказуючи на те, що клітинні рівні глутатіону є результатом комплексних процесів транспорту, деградації, а також синтезу попередника біосинтезу GSH, цистеїну. З іншого боку, рівні клітинного глутатіону штамів дикого типу добре корелюють з їх чутливістю до іонів кадмію. Подібно до мутантів з пошкодженим біосинтезом глутатіону (*Agsh1 S. cerevisiae* [29, 264], *Agsh2 H. polymorpha*, *Agsh1 i Agsh2 P.* guilliermondii), точковий та делеційний gsh1/met1 мутанти H. polymorpha, виявляють підвищену чутливість до іонів важких металів та факторів, що спричинюють оксидативний стрес. Враховуючи важливу роль глутатіону в оксидативній стресовій відповіді, висловлено припущення, що чутливий фенотип мутантів gsh1 i gsh1/met1 H. polymorpha до підвищених концентрацій метанолу, формальдегіду, органічного пероксиду та іонів кадмію ймовірно пов'язаний із порушенням продукції цистеїну і, відповідно, глутатіону за рахунок пошкодження шляху асиміляції сульфату. Слід зауважити, що мутант S. pombe, з пошкодженням в гені SPCC1739.06с, що кодує ймовірну уропорфірин метилтрансферазу, гомологічну білку Gsh1p/Met1p H. polymorpha, характеризується підвищеною чутливістю до неорганічного пероксиду та іонів кадмію [265]. Не виключено, що ймовірна нездатність мутанта *Agsh1/met1 H*. polymorpha утворювати неорганічний сульфід також може призводити до підвищеної чутливості до кадмію, оскільки відомо, що у дріжджів S. pombe та С. glabrata вбудовування сульфіду у комплекси Cd-GSH суттєво підвищувало їх Cd-зв'язуючу здатність, а також підвищувало детоксикаційний ефект [184, 185, 226]. Тісний взаємозв'язок між чутливістю до кадмію, біосинтезом глутатіону і сірогему та сірогем-залежною активністю сульфітредуктази також було помічено у мутанта hem2 С. glabrata з пошкодженим геном HEM2, що кодує порфобіліногенсинтазу [191]. Більше того, було показано, що ген МЕТІ S. cerevisiae та його гомолог SPCC1739.06с S. pombe належать до генів, експресія яких специфічно індукувалась у відповідь на обробку іонами кадмію [53, 266]. Варто зазначити, що інший мутант Н. polymorpha з пошкодженою

асиміляцією сульфату, за рахунок делеції гена, що кодує глобальний регулятор метаболізму сірки білок Met4p, також виявляв кадмій-чутливий фенотип. Однак, штам, що містив додаткові копії гена MET4 Н. polymorpha був більш резистентним до іонів кадмію. Отже, подібно до S. cerevisiae [52, 173], білок Met4p *H. polymorpha*, вірогідно, відіграє важливу роль у забезпеченні толерантності до іонів кадмію. Не менш цікавим є також той факт, що обидва точковий та делеційний gsh1/met1 мутанти є більш чутливими до іонів хромату, ніж мутанти gsh2 H. polymorpha, з пошкодженою  $\gamma GCS$ , незважаючи на те, що за росту у багатому середовищі YPD вони характеризуються значно вищими рівнями клітинного глутатіону, порівняно з мутантами gsh2 [229]. Враховуючи те, що аніони сульфату і хромату використовують спільну систему асиміляції для їх транспорту і подальшого відновлення в клітині [227], висловлено припущення, що підвищена чутливість мутантів gsh1 та *Agsh1/met1 H*. *polymorpha* до іонів хромату може бути пов'язана радше не з пошкодженим біосинтезом глутатіону, а з надакумуляцією найтоксичнішого проміжного інтермедіату Cr(V) замість менш токсичної форми  $Cr^{3+}$  завдяки пошкодженню у сірогем-залежній сульфітредуктазній реакції.

Отже, шляхом відновлення GSH-залежного фенотипу точкового мутанта *gsh1 H. polymorpha* клоновано ген *GSH1/MET1 H. polymorpha*, який є гомологом гена *MET1 S. cerevisiae*, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген III трансметилазу, і є необхідним для сірогем-залежної асиміляції сульфату і, відповідно, синтезу попередника біосинтезу глутатіону, цистеїну. Запропоновано ймовірну участь даного гена у толерантності до іонів кадмію та хромату.

З метою вивчення процесу деградації глутатіону у клітинах дріжджів H. *polymorpha* геном цього виду дріжджів було проаналізовано на присутність гена, що кодує γGT. Цей фермент, у дріжджів та ссавців, каталізує перенесення γ-глутамільного залишку глутатіону та γ-глутамільних компонентів на амінокислоти, а також гідролітичне вивільнення L-глутамату з GSH, γглутамільних компонентів та S-заміщених похідних глутатіону [11] і на початок
наших досліджень вважався основним ферментом залученим в деградації Ha глутатіону організмів. основі гомології В живих до гена CIS2/ECM38/YLR299w S. cerevisiae, що кодує уGT, виявлено два гени GGT1 та GGT2 Н. polymorpha. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей виявив суттєву подібність між білками уGT1p *H. polymorpha* та Cis2p *S.* cerevisiae (43% ідентичності, 60% подібності), і незначну подібність між уGT2p *H. polymorpha* та Cis2p S. cerevisiae (21% ідентичності, 38% подібності). Для з'ясування молекулярно-біологічної функції гена GGT1 сконструйовано та охарактеризовано мутант з делецією у цьому гені. Показано, що у дріжджів Н. *polymorpha* спостерігається регуляція активності уGT джерелами азоту та сірки. Зокрема, активність уGT у *H. polymorpha* є найвищою за умов голодування за сіркою та азотом, і найнижчою за використання фаворитного джерела азоту, такого як іони амонію. Подібна регуляція уGT джерелом сірки також показана для S. cerevisiae [67], а джерелом азоту – для S. cerevisiae та S. pombe, як на рівні активності ферменту, так і на рівні експресії генів, що кодують даний фермент [68, 71]. У мутанта  $\Delta ggt1$  активність  $\gamma$ GT є суттєво зниженою на всіх досліджуваних середовищах. Ростові експерименти свідчать, що уGT не ініціює перетворення GSH для забезпечення клітин *H. polymorpha* цистеїном/сіркою, оскільки мутант *Aggt1*, подібно до штама дикого типу, здатний утилізувати екзогенний GSH як єдине джерело сірки. Вірогідно, уGT дріжджів Н. polymorpha також залучена v забезпеченні клітин азотом i3 не зовнішньоклітинного GSH, тому що дикий тип і мутант Aggtl виявляють однаково слабкий ріст на глутатіоні, як єдиному джерелі азоту, порівняно із глутамат- чи амонійвмісним середовищем. Висловлено припущення, що у дріжджів *S. cerevisiae* уGT, вірогідно, залучена в утилізації вакуолярних запасів GSH за умов голодування за сіркою або азотом [27, 67], тоді як утилізація GSH як екзогенного джерела сірки не залежить від уGT [245] і відбувається за участю деградосомного комплексу, який включає білки Dug1p, Dug2p і Dug3p [14]. Значне зростання активності уGT у дріжджів *H. polymorpha* за умов

голодування за сіркою та азотом, подібно до S. cerevisiae [67, 71], також може свідчити про вірогідну роль даного ферменту в деградації вакуолярного глутатіону. Фенотипова схожіть мутантів  $\Delta ggt1$  H. polymorpha i  $\Delta cis2$  S. *cerevisiae*, з пошкодженою  $\gamma$ GT, та аналіз геному дріжджів *H. polymorpha*, який виявив гени, що кодують білкові продукти з високим ступенем подібності до гомологічних білків Dug1p, Dug2p і Dug3p з S. cerevisiae дає можливість припустити існування у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae* [14, альтернативного уGT-незалежного шляху 2451. деградації GSH лля забезпечення клітин сіркою з глутатіону. Слабкий ріст дріжджів *H. polymorpha* на GSH (1,5-2,5 мМ) як єдиному джерелі азоту може бути пов'язаний із значно більшими потребами дріжджів у джерелі азоту, а ніж сірки, інгібуючим ефектом GSH на ріст у концентраціях вищих, ніж 0,5 мМ для *H. polymorpha* [246] або, подібно до дріжджів S. cerevisiae [58], нездатністю використовувати екзогенний GSH, як ефективне джерело азоту. Як і мутант *Acis2 S. cerevisiae* [71], мутант  $\Delta ggt1$  H. polymorpha характеризується подібним до штама дикого типу вмістом клітинного глутатіону. Окрім цього, показано, що мутант  $\Delta ggt1 H$ . polymorpha більш чутливий до органічного пероксиду, але не до іонів кадмію, етанолу, метанолу та формальдегіду. Подібний фенотип також характерний для мутанта  $\Delta cis2$  S. cerevisiae, який є більш чутливим до неорганічного пероксиду, але не до іонів кадмію та етанолу [71]. Враховуючи те, що обидва мутанти Н. polymorpha та S. cerevisiae з пошкодженою уGT володіють, подібними до штамів дикого типу, рівнями клітинного глутатіону, однак, є більш чутливими до органічного або неорганічного пероксидів, висловлено припущення, про вірогідну роль уGT у детоксикації пероксидів у дріжджів. Детоксикація електрофільних ксенобіотиків у вищих рослин та ссавців відбувається у γGTзалежному шляху детоксикації ксенобіотиків [62, 76-79]. Дріжджі Н. polymorpha i S. cerevisiae видаляють електрофільні ксенобіотики (монобромобіман) з цитозолю шляхом їх кон'югації з GSH (GS-біман), з подальшим транспортуванням кон'югатів GSH-ксенобіотик у вакуолю [156,

157]. ймовірні шляхи метаболізму кон'югатів глутатіону Олнак. 3 електрофільними сполуками у дріжджів залишались нез'ясованими. Нами вперше у дріжджів показано, що уGT бере участь у деградації кон'югатів глутатіону з електрофільними ксенобіотиками, що підтверджується дефектом мутантів  $\Delta ggt1$  H. polymorpha та  $\Delta cis2$  S. cerevisiae, з пошкодженою  $\gamma$ GT, у зникненні флуоресцентного вакуолярного комплексу GSH з ксенобіотиком біманом та відсутністю ймовірних кінцевих продуктів деградації кон'югатів GSH-ксенобіотик, цистеїн-ксенобіотик і/або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик, у зовнішньоклітинному середовищі цих мутантів. Висловлено припущення, що метаболізм електрофільних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha* та *S.* cerevisiae, подібно до вищих еукаріот [62, 76-79], здійснюється у уGTзалежному шляху детоксикації ксенобіотиків, який включає детоксикацію сполук типу GS-ксенобіотик з утворенням комплекса цистеїн-ксенобіотик і/або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик як кінцевих продуктів. Згодом, участь уGT у метаболізмі GS-біман кон'югатів, з утворенням як кінцевого продукту цистеїнбіману, була підтверджена іншими авторами у дріжджів *S. cerevisiae*, які також показали, що уGT є необхідною для секреції похідних ксенобіотика [248]. Слід зазначити, що у метилотрофних дріжджів уGT також може виконувати деякі специфічні функції пов'язані з метаболізмом метанолу. На користь цього твердження свідчить сильна індукція үGT метанолом у мутантів gsh2 H. polymorpha, з пошкодженням першого етапу біосинтезу глутатіону [199]. Однак, з'ясування специфічної функції γGT у метаболізмі метанолу потребує додаткових досліджень.

В роботі також було досліджено механізми захисту метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* у відповідь на кадмієвий стрес. Відомо, що молекулярні механізми детоксикації кадмію у дріжджів включають синтез хелатуючих молекул, GSH або фітохелатинів, які зв'язують іони кадмію та опосередковують їх транспорт із клітини або секвестрування комплексів із металом у вакуолю з подальшим їх метаболізмом [176, 178, 192, 193]. Неорганічний сульфід також відіграє важливу роль у толерантності до кадмію у S. pombe та С. glabrata [160, 184]. Однак, нічого не відомо про механізми детоксикації кадмію у метилотрофних H. polymorpha, дріжджів які характеризуються підвищеною толерантністю до різного роду стресів. Показано, що дріжджі *H. polymorpha*, на відміну від *S. pombe* та *C. glabrata* [167], не синтезують фітохелатини, але містять GSH, як основний SH-вмісний компонент за різних умов культивування з іонами кадмію. Нездатність Н. polymorpha синтезувати фітохелатини узгоджується з відсутністю в геномі цих дріжджів гена, що кодує PCS – основний фермент в біосинтезі фітохелатинів, а також може свідчити про те, що вакуолярні карбоксипептидази СРУ і СРС, гени, яких ідентифіковано у геномі *H. polymorpha*, вірогідно, не залучені в обхідному шляху синтезу коротких фітохелатинів, відомому для S. cerevisiae [254]. Цікаво відмітити, що незважаючи на те, що, подібно до S. cerevisiae, GSH є основним хелатором іонів кадмію у *H. polymorpha*, дія іонів кадмію призводить лише до незначних або відсутніх змін в експресії гена GSH2 H. polymorpha, що кодує перший та лімітуючий фермент біосинтезу GSH, подібно до гомологічного гена GCS1 S. pombe [54], та на відміну від сильної індукції експресії гомологічного гена GSH1 S. cerevisiae [50-53]. До аналогічного висновку дійшли й корейські вчені, які досліджували рівні мРНК гена GSH2 H. polymorpha в нормі та за інкубації з іонами кадмію за допомогою RT-PCR аналізу (Song MJ, Kang HA, неопубліковані дані). Кадмій-індукована експресія гена GSH1 S. cerevisiae потребує транскрипційного активатора Met4 і ДНКзв'язувальних білків Met31/Met32 [51]. Відсутність сайтів зв'язування білків Met31/Met32 у промоторній ділянці гена GSH2 Н. polymorpha може вказувати на те, що даний ген не підлягає HpMet4-опосередкованій регуляції у відповідь на дію іонів кадмію. Висловлено припущення, що зростання рівня загального клітинного глутатіону за умов кадмієвого стресу в дріжджів *H. polymorpha* не контролюється на рівні транскрипції гена GSH2, що кодує γGCS, однак, подібно до S. cerevisiae [58, 90, 195], може бути пов'язано зі зниженою деградацією глутатіону і/або з позитивною регуляцією біосинтезу глутатіону, яка може включати сіркозберігальний ефект та зростання надходження сірки в глутатіоновий шлях [238], і/або, подібно до рослин [239-241], можливу регуляцію γGCS на посттрансляційному рівні у відповідь на зміну окисновідновного потенціалу клітини.

Вірогідно, у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae* [154, 158, 165], детоксикація електрофільних ксенобіотиків та кадмію відбувається шляхом їх спонтанної або опосередкованої GST кон'югації з GSH з подальшим транспортуванням комплексів GS-ксенобіотик або (GS)<sub>2</sub>-Cd у вакуолю за участю MgATP-енергізованого, нечутливого до роз'єднувачів та інгібованого ванадатом вакуолярного транспортера Ycf1. На користь цього може свідчити наявність в геномі *H. polymorpha* гомолога гена YCF1 S. cerevisiae та генів GTT1 і GTT2, що кодують GST, позитивна регуляція GTT генів у відповідь на дію іонів кадмію, а також MgATP-залежне, нечутливе до роз'єднувачів та [<sup>3</sup>H]N-етилмалеїнімід-Sкон'югатів інгібоване ванадатом поглинання глутатіону сирцевими мембранними везикулами, ймовірно вакуолярного, а не плазматичного походження [262]. Також показано, що внутрішньоклітинна акумуляція іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* є енергозалежним процесом. Подібно до S. cerevisiae [194], пошкодження першого етапу біосинтезу GSH у мутантів Дgsh2 призводить до деякого підвищення акумуляції іонів кадмію. Водночас, пошкодження катаболізму GSH і/або його кон'югатів у мутанта  $\Delta ggt1$  H. polymorpha і шляхів асиміляції сульфату у мутантів  $\Delta gsh1/met1$  та обох мутантів Amet4 H. polymorpha i S. cerevisiae призводить до зниження енергозалежної акумуляції іонів кадмію. Висловлено припущення, що поглинання іонів кадмію у дріжджів *Н. роlутогрha*, подібно до *S. cerevisiae* [194], регулюється комплексом Cd-GSH, а білки Gsh1p/Met1p та Met4p залучені у дозрівання Cd-GSH комплексу у вакуолі, тоді як уGT – у метаболізм кон'югатів GSH з кадмієм та з електрофільними ксенобіотиками, подібно до участі даного ферменту в метаболізмі комплексу Cd-GSH у S. cerevisiae [192], з утворенням Ссицистеїнілгліцину, та трансформації кон'югатів GSH-ксенобіотик у вищих еукаріот [76, 78]. Окрім цього, показано, що детоксикація електрофільних ксенобіотиків у *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* включає видалення комплексів

GSH-ксенобіотик і/або продуктів їх метаболізму з клітини (розділ 3.3.5; [156, 157]). Наявність в геномі *H. polymorpha* гомолога гена *YOR1/YGR281W S. cerevisiae*, білковий продукт якого залучений у видаленні комплексів Cd-GSH з клітини [180], дає можливість припустити, що механізми резистентності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae*, можуть включати не лише транспорт Cd-GSH комплексів у вакуолю, з подальшим їх метаболізмом, а й видалення цих комплексів з клітини. Також не виключено, що *H. polymorpha* може видаляти й продукти метаболізму кон'югатів GSH з кадмієм з клітини, як це було показано для продуктів деградації GSH з електрофільними сполуками у *S. cerevisiae* [248]. Узагальнену гіпотетичну схему детоксикації електрофільних ксенобіотиків та кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* представлено на рис. 4.1.



Рис. 4.1. Узагальнена гіпотетична схема детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* за участі білкових продуктів генів *GSH2*, *GGT1*, *GSH1/MET1* і *MET4* 

В результаті виконання даної роботи ідентифіковано та з'ясовано функцію генів GSH1/MET1 і GGT1 в початкових етапах метаболізму глутатіону та його попередника, цистеїну, у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. Вперше у дріжджів показано, що  $\gamma$ GT, яка кодується геном GGT1 у *H. polymorpha* та його гомологом CIS2 у *S. cerevisiae*, залучена у захисті від електрофільного стресу. З'ясовано, що GSH є основною хелатуючою молекулою у відповідь на кадмієвий стрес у дріжджів *H. polymorpha*. Запропоновано узагальнену гіпотетичну схему детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* за участі білкових продуктів генів *GSH2*, *GGT1*, *GSH1/MET1* і *MET4*.

## ВИСНОВКИ

В результаті виконаної роботи ідентифіковано та з'ясовано функцію генів *GSH1/MET1* і *GGT1* в початкових етапах метаболізму глутатіону та його попередника, цистеїну, у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*. Вивчено вплив джерел азоту і/або сірки на активність ферментів першого етапу біосинтезу і деградації глутатіону. Досліджено γGT-залежну детоксикацію електрофільних ксенобіотиків та механізми детоксикації кадмію у дріжджів *H. роlymorpha*, зокрема чутливість, кадмій-залежну регуляцію гена *GSH2*, здатність продукувати SH-вмісні хелатори іонів кадмію та акумулювати іони кадмію.

1. Клоновано ген *HpGSH1/MET1*, що комплементує ауксотрофність за цистеїном та глутатіоном мутанта *gsh1 H. polymorpha* та є гомологом гена *MET1 Saccharomyces cerevisiae*, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген (III) трансметилазу.

2. Сконструйовано та охарактеризовано рекомбінантні штами дріжджів *H. polymorpha* з делецією гена *GSH1/MET1* та генів початкових етапів метаболізму глутатіону *GSH2* і *GGT1*, що кодують  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетазу ( $\gamma$ GCS) та  $\gamma$ -глутамілтрансферазу ( $\gamma$ GT), відповідно.

3. Встановлено, що у дріжджів *H. polymorpha* білок HpGsh1p/Met1p та такі джерела сірки як іони сульфату, цистеїн чи глутатіон не впливають на активність γGCS. Водночас, активність γGT регулюється джерелами азоту та сірки і є найвищою за умов голодування за сіркою та азотом, і найнижчою за використання іонів амонію як джерела азоту.

4. Вперше у дріжджів показано, що γGT залучена у детоксикації електрофільних ксенобіотиків. Однак, з'ясовано, що γGT не бере участі в утилізації глутатіону як екзогенного джерела сірки у *H. polymorpha*.

5. За допомогою сконструйованого рекомбінантного штама *H. polymorpha*, що містить репортерну касету prGSH2-AOX, з'ясовано, що експресія гена *GSH2 H. polymorpha* дуже слабо або зовсім не змінюється у

відповідь на дію іонів кадмію, на відміну від сильної індукції експресії гомологічного гена *GSH1 S. cerevisiae*.

6. Показано, що дріжджі *H. polymorpha*, на відміну від *Schizosaccharomyces pombe* та *Candida glabrata*, не синтезують фітохелатини у відповідь на інкубацію з іонами кадмію.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Meister A. Glutathione / A. Meister, M. E. Anderson // Annu. Rev. Biochem. 1983. – V. 52. – P. 711–760.
- Li Y. Glutathione: a review on biotechnological production / Y. Li, G. Wei, J. Chen // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 66, № 3. P. 233–242.
- Glutathione production in yeast / [A. K. Bachhawat, D. Ganguli, J. Kaur et al.] // Yeast Biotechnology: Diversity and Applications; ed. T. Satyanarayana, G. Kunze. – Springer Science+Business Media B.V., 2009. – P. 259–280.
- Penninckx M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus nonconventional yeasts / M. J. Penninckx // FEMS Yeast Res. – 2002. – V. 2. – P. 295–305.
- The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, of sulfur / V. M. Boer, J. H. de Winde, J. T. Pronk [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 3265–3274.
- GSH2, a gene encoding γ-glutamylcysteine synthetase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* / V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko, O. G. Stasyk [et al.] // FEMS Yeast Res. – 2002. – V. 1486. – P. 1–6.
- Sahm H. Metabolism of methanol by yeast / H. Sahm // Adv. Biochem. Eng. 1977. – V. 6. – P. 103–127.
- Jones J. G. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha* / J.
   G. Jones, E. Bellion // Biochem. J. 1991. V. 280. P. 475–481.
- Hansenula polymorpha: Biology and Applications; ed. G. Gelissen. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. – 347 p.
- Gellissen G. The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: its use in fundamental research and as a cell factory / G. Gellissen, M. G. Veenhuis // Yeast. 2001. V. 18. i-iii.

- Penninckx M. J. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms / M. J. Penninckx, M. Elskens // Adv. Microb. Physiol. – Academic Press Limited, 1993. – V. 34. – P. 239–301.
- Fahey R. C. Novel thiols of prokaryotes / R. C. Fahey // Annu. Rev. Microbiol. –
   2001. V. 55. P. 533–556.
- Hell R. Molecular physiology of plant sulfur metabolism / R. Hell // Planta. 1997. – V. 202. – P. 138–148.
- Ganguli D. The Alternative Pathway of Glutathione Degradation Is Mediated by a Novel Protein Complex Involving Three New Genes in *Saccharomyces cerevisiae* / D. Ganguli, C. Kumar, A. K. Bachhawat // Genetics. – 2007. – V. 175. – P. 1137–1151.
- Glutathione Metabolism and Its Implications for Health / G. Wu, Y.-Z. Fang, S.
   Yang [et al.] // J. Nutr. 2004. V. 134, № 3. P. 489–492.
- Pocsi I. Glutathione, Altruist Metabolism in fungi / I. Pocsi, R. Prade, M. J. Penninckx // Advances in microbial physiology. – 2004. – V. 49. – P. 1–76.
- Maturation of cytosolic Iron–sulfur proteins requires glutathione / K. Sipos, H. Lange, Z. Fekete [et al.] // Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 26944–26949.
- Demas M. 20 S Proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated / M. Demas, G. M. Silva, L. E. S. Netto // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 679–685.
- Oluwatosin Y. E. Mutations in the *CYS4* gene provide evidence for regulation of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by oxidation and reduction *in vivo* / Y. E. Oluwatosin, P. M. Kane // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 28149–28157.
- Penninckx M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses / M. Penninckx // Enzyme Microb. Technol. 2000. V. 26. P. 737–742.
- 21. Ostergaard H. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol / H. Ostergaard, C. Tachibana, J. R. Winther // J. Cell Biol. 2004. V. 166. P.

337–345.

- 22. Why is glutathione (a tripeptide) synthesized by specific enzymes while TSH releasing hormone (TRH or thyroliberin), also a tripeptide, is produced as part of a prohormone protein? / D. Ganguly, C. V. Srikanth, C. Kumar [et al.] // IUBMB Life. 2003. V. 55. P. 553–554.
- 23. Vuilleumier S. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? / S. Vuilleumier // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 1431–1441.
- 24. Emri T. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum* / T. Emri, I. Pocsi, A. Szentirmai // Free Radic. Biol. Med. 1997. V. 23. P. 809–814.
- Perrone G. G. Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* / G. G. Perrone, C. M. Grant, I. W. Dawes // Mol. Biol. Cell. – 2005. – V. 16. – P. 218–230.
- 26. Lu S. C. Regulation of glutathione synthesis / S. C. Lu // Curr. Top. Cell Regul.
   2000. V. 36. P. 95–116.
- Mehdi K. An important role for glutathione and γ-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / K. Mehdi, M. Penninckx // Microbiology. 1997. V. 143. P. 1885–1889.
- Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast Saccharomyces cerevisiae / A. Bourbouloux, P. Shahi, A. Chakladar [et al.] // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 13259–13265.
- Grant C. M. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / C. M. Grant, F. H. MacIver, I. W. Dawes // Curr. Genet. 1996. V. 29. P. 511–515.
- Turton H. E. Saccharomyces cerevisiae exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde / H. E. Turton, I. W. Dawes, C. M. Grant // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 1096–1101.

- Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon sourcedependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* / A. F. Maris, A. L. Kern, J. N. Picada [et al.] // Curr. Genet. – 2000. – V. 37. – P. 175– 182.
- Chaudhuri B. *apd11*, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump / B. Chaudhuri, S. Ingavale, A. K. Bachhawat // Genetics. 1997. V. 145. P. 75–83.
- Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture / Z. Z. Shi, J. Osei-Frimpong, G. Kala [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 5101–5106.
- 34. Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila* melanogaster / W. C. Orr, S. N. Radyuk, L. Prabhudesai [et al.] // J. Biol. Chem. - 2005. - V. 280. - P. 37331-37338.
- 35. Multiple cis-regulatory elements and the yeast sulphur regulatory network are required for the regulation of the yeast glutathione transporter, Hgt1p / C. V. Srikanth, P. Vats, A. Bourbouloux [et al.] // Curr. Genet. – 2005. – V. 47. – P. 345–358.
- 36. Griffith O. W. The enzymes of glutathione synthesis: γ-glutamylcysteine synthetase / O. W. Griffith, R. T. Mulcahy // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: Mechanism of Enzyme Action, Part A; ed. D. L. Purich. NY: John Wiley and Sons, 1999. V. 73. P. 209–267.
- The nucleotide sequence of the gene for gamma-glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli* / K. Watanabe, Y. Yamano, K. Murata [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1986. – V. 14. – P. 4393–4400.
- Ohtake Y. Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of Saccharomyces cerevisiae / Y. Ohtake, S. Yabuuchi // Yeast. – 1991. – V. 7. – P. 95–961.

- 39. Coblenz A. *GCS1*, a gene encoding γ-glutamylcysteine synthetase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / A. Coblenz, K. Wolf // Yeast. 1995. V. 11, № 12. P. 1171–1177.
- 40. The glutathione synthetase of *Schizosaccharomyces pombe* is synthesized as a homodimer but retains full activity when present as a heterotetramer / N. Phlippen, K. Hoffmann, R. Fischer [et al.] // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 40152–40161.
- 41. Griffith O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis / O. W. Griffith // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 27. P. 922–935.
- 42. Three-dimensional structure of the glutathione synthetase from *Escherichia coli B* at 2.0 A resolution / H. Yamaguchi, H. Kato, Y. Hata [et al.] // J. Mol. Biol. 1993. V. 229. P. 1083–1100.
- Janowiak B. E. Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities / B. E. Janowiak, O. Griffith // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 11829–11839.
- 44. Vergauwen B. Characterization of the bifunctional gamma-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of *Pasteurella multocida* / B. Vergauwen, D. De Vos, J. J. Van Beeumen // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 4380–4394.
- 45. Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor / G. L. Wheeler, K. A. Quinn, G. Perrone [et al.] // Mol. Microbiol. – 2002. – V. 46. – P. 545–556.
- 46. Coupling of the Transcriptional Regulation of Glutathione Biosynthesis to the Availability of Glutathione and Methionine via the Met4 and Yap1 Transcription Factors / G. L. Wheeler, E. W. Trotter, I. W. Dawesl [et al.] // J. Biol. Chem. 2003. V. 278, № 50. P. 49920–49928.
- 47. The adaptive response of Saccharomyces cerevisiae to mercury exposure / J.

Westwater, N. F. McLaren, U. H. Dormer, D. J. Jamieson // Yeast. – 2002. – V. 19, № 3. – P. 233–239.

- 48. Sugiyama K. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* / K. Sugiyama, S. Izawa, Y. Inoue // J. Biol. Chem. 2000. V. 275, № 20. P. 15535–15540.
- Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae* / L. Zhang, K. Onda, R. Imai [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 307. P. 308–314.
- A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* / K.
   Vido, D. Spector, G. Lagniel [et al.] // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P.
   8469–8474.
- Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network / U. H. Dormer, J. Westwater, N. F. McLaren [et al.] // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 32611–32616.
- 52. Inducible dissociation of SCF<sup>Met30</sup> ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium / R. Barbey, P. Baudouin-Cornu, T. A. Lee [et al.] // EMBO J. 2005. V. 24. P. 521–532.
- 53. Momose Y. Comparison of Genome-wide Expression Patterns in Response to Heavy Metal Treatment in Saccharomyces cerevisiae / Y. Momose, E. Kitagawa, H. Iwahashi // Chem-Bio Informatics Journal. 2001. V. 1, № 1. P. 41–49.
- 54. Kim S. J. Stress-dependent regulation of the gene encoding γ-glutamylcysteine synthetase from the fission yeast / S. J. Kim, E. H. Park, C. J. Lim // Mol. Biol. Rep. – 2004. – V. 31. – P. 23–30.
- 55. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase / A. N. Nguyen, A. Lee, W. Place [et al.] // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. P. 1169–1181.
- 56. Transcriptional Regulation of the Gene Encoding  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase

from the fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* / S. J. Kim, H. G. Kim, B. C. Kim [et al.] // J. Microbiol. – 2004. – V. 42, № 3. – P. 233–238.

- 57. Lueder D. V. Characterization of *Trypanosoma brucei* gamma-glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine) / D. V. Lueder, M. A. Phillips // J. Biol. Chem. 1996. V. 271, № 29. P. 17485–17490.
- 58. Glutathione Degradation Is a Key Determinant of Glutathione Homeostasis / P. Baudouin-Cornu, G. Lagniel, C. Kumar [et al.] // J. Biol. Chem. 2012. V. 287, № 7. P. 4552–4561.
- Mehdi K. γ-Glutamyltranspeptidase in the yeast Saccharomyces cerevisiae and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione / K. Mehdi, J. Thierie, M. J. Penninckx // Biochem. J. – 2001. – V. 359. – P. 631–637.
- 60. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe* / V. Wood, R. Gwilliam,
  M. A. Rajandream [et al.] // Nature. 2002. V. 415. P. 845–848.
- The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa* / J. E. Galagan, S. E. Calvo, K. A. Borkovich [et al.] // Nature. 2003. V. 422. P. 859–868.
- 62. gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis / A. Grzam, M. N. Martin, R. Hell, A. J. Meyer // FEBS Lett. 2007. V. 581, № 17. P. 3131–3138.
- 63. Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, *GGT1* and *GGT2*, in *Arabidopsis* / N. Ohkama-Ohtsu, S. Radwan, A. Peterson [et al.] // Plant J. 2007. V. 49, № 5. P. 865–877.
- 64. Payne G. M. γ-glutamyltransferase is not involved in the bulk uptake of amino acids, peptides or γ-glutamyl-amino acids in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) / G. M. Payne, J. W. Payne // Biochem. J. 1984. V. 218. P. 147–155.
- 65. Characterization and regulation of the γ-glutamyl transpeptidase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / H. J. Park, H. W. Lim, K. Kim [et

al.] // Can. J. Microbiol. - 2004. - V. 50. - P. 61-66.

- 66. Characterization of a second gene encoding γ-glutamyl transpeptidase from *Schizosaccharomyces pombe* / H. J. Park, J. S. Moon, H. G. Kim [et al.] // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. P. 269–275.
- Elskens M. T. Glutathione as an endogeneous sulphur source in the yeast Saccharomyces cerevisiae / M. T. Elskens, C. J. Jaspers, M. J. Penninckx // J. Gen. Microbiol. – 1991. – V. 137. – P. 637–644.
- 68. Song S. H. Nitrogen depletion causes up-regulation of glutathione content and gamma-glutamyltranspeptidase in *Schizosaccharomyces pombe* / S. H. Song, C. J. Lim // J. Microbiol. 2008. V. 46, № 1. P. 70–74.
- 69. Dug1p Is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of Saccharomyces cerevisiae and represents a novel family of Cys-Gly peptidases / H. Kaur, C. Kumar, C. Junot [et al.] // J. Biol. Chem. 2009. V. 284, № 21. P. 14493–14502.
- 70. Desai P. R. Glutathione utilization by *Candida albicans* requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual member of the oligopeptide transporter family / P. R. Desai, A. Thakur, D. Ganguli [et. al] // J. Biol. Chem. 2011. V. 286, № 48. P. 41183–41194.
- 71. Springael J. Y. Nitrogen-source regulation of yeast gammaglutamyltranspeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3 / J. Y. Springael, M. J. Penninckx // Biochem. J. – 2003. – V. 371. – P. 589–595.
- Changes in glutathione metabolic enzyme during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans* / M. Manavathu, S. Gunasekaran, Q. Porte [et al.] // Can. J. Microbiol. – 1996. – V. 42. – P. 76–79.
- 73. Characterization of *Bacillus subtilis* γ-glutamyltranspeptidase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate / K. Kimura, L. S. Tran, I. Uchida [et al.] // Microbiol. 2004. V. 150. P. 4115–4123.

- 74. Minami H. γ-glutamyltranspeptidase, but not YwrD, is important in utilization of extracellular glutathione as a sulfur source in *Bacillus subtilis* / H. Minami, H. Suzuki, H. Kumagai // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186. – P. 1213–1214.
- 75. Gong M. Prominent role of γ-glutamyltranspeptidase on the growth of *Helicobacter pylori* / M. Gong, B. Ho // World J. Gastroenterol. 2004. V. 10. P. 2994–2996.
- 76. Tsuchida S. Glutathione transferases / S. Tsuchida // Encyclopedia of Cancer;
  ed. J. R. Bertino. NY, London: Academic Press, 1997. V. 1. P. 733–743.
- 77. The GS-X pump in plant, yeast and animal cells: structure, function and gene expression / T. Ishikawa, Z.-S. Li, Y.-P. Lu [et al.] // Biosci. Rep. 1997. V. 17. P. 189–207.
- Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics / A. Parkinson // Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons; ed. C. D. Klaassen. – NY: McGraw-Hill, 2001. – P. 133–224.
- 79. Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase *GGT3* in *Arabidopsis* / N. Ohkama-Ohtsu, P. Zhao, C. Xiang, D. J. Oliver // Plant J. 2007. V. 49, № 5. P. 878–888.
- 80. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom [et al.] // Biol. Chem. 2009. V. 390, № 3. P. 191–214.
- 81. Mice with Genetic g-Glutamyl Transpeptidase Deficiency Exhibit Glutathionuria, Severe Growth Failure, Reduced Life Spans, and Infertility / C. O. Harding, P. Williams, E. Wagner [et al.] // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 12560–12567.
- 82. Reliability of the detection of meningococcal γ-glutamyl transpeptidase as an identification marker for *Neisseria meningitidis* / H. Takahashi, T. Kuroki, Y. Watanabe [et al.] // Microbiol. Immunol. 2004. V. 48. P. 485–487.
- 83. Influence of carbon and nitrogen sources on glutathione catabolic enzymes in

*Candida albicans* during dimorphism / S. Gunasekaran, M. Imbayagwo, L. McDonald [et al.] // Mycopathologia. – 1995. – V. 131. – P. 92–97.

- 84. The *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding γ-glutamyl transpeptidase I is regulated by non-fermentable carbon sources and nitrogen starvation / H. G. Kim, H. J. Park, H. J. Kang [et al.] // J. Microbiol. 2005. V. 43. P. 44–48.
- 85. The Gene Encoding γ-Glutamyl Transpeptidase II in the fission Yeast Is Regulated by Oxidative and Metabolic Stress / H. J. Kang, B. C. Kim, E. H. Park [et al.] // J. Biochem. Mol. Biol. – 2005. – V. 38, № 5. – P. 609–618.
- Marzluf G. A. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast / G. A. Marzluf // Annu. Rev. Microbiol. – 1997. – V. 51. – P. 73–96.
- Sulfur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulfur metabolism in fungi / J. Brzywczy, M. Sienko, A. Kucharska [et al.] // Yeast. 2002. V. 19. P. 29–35.
- Thomas D. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* / D. Thomas, Y. Surdin-Kerjan // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V. 61. – P. 503–532.
- Lewandowska M. Regulation of sulphur amino acids metabolic enzymes in *Cephalosporium acremonium* strains differing in antibiotic production / M. Lewandowska, A. Paszewski // Acta Microbiol. Pol. – 1987. – V. 36.– P. 39–51.
- 90. Baudouin-Cornu P. Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells / P. Baudouin-Cornu, J. Labarre // Biochimie. – 2006. – V. 88, № 11. – P. 1673–1685.
- 91. Bánszky L. Sulphate metabolism of selenate-resistant Schizosaccharomyces pombe mutants / L. Bánszky, T. Simonics, A. Maráz // J. Gen. Appl. Microbiol. 2003. V. 49, № 5. P. 271–278.
- 92. A gene encoding L-methionine gamma-lyase is present in *Enterobacteriaceae* family genomes: identification and characterization of *Citrobacter freundii* L-

methionine gamma-lyase / I. V. Manukhov, D. V. Mamaeva, S. M. Rastorguev [et al.] // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, № 11. – P. 3889–3893.

- 93. Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gammalyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-amino acid degradation in an anaerobic parasitic protist that lacks forward and reverse transsulfuration pathways / M. Tokoro, T. Asai, S. Kobayashi [et al.] // J. Biol. Chem. - 2003. - V. 278, № 43. - P. 42717-42727.
- 94. Functional characterization of a methionine gamma-lyase in *Arabidopsis* and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway / A. Goyer, E. Collakova, Y. Shachar-Hill, A. Hanson // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48, No 2. P. 232–242.
- 95. Isnard A. D. The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases / A. D. Isnard, D. Thomas, Y. Surdin-Kerjan // J. Mol. Biol. – 1996. – V. 262. – P. 473–484.
- 96. Kaur J. Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast Saccharomyces cerevisiae / J. Kaur, A. K. Bachhawat // Genetics. 2007. V. 176, № 2. P. 877–890.
- 97. MUP1, High Affinity Methionine Permease, is Involved in Cysteine Uptake by Saccharomyces cerevisiae / A. Kosugi, Y. Koizumi, F. Yanagida [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. V. 65, № 3. P. 728–731.
- 98. Cysteine uptake by Saccharomyces cerevisiae is accomplished by multiple permeases / L. Düring-Olsen, B. Regenberg, C. Gjermansen [et al.] // Curr. Genet. – 1999. – V. 35. – P. 609–617.
- Role of the Sulphate Assimilation Pathway in Utilization of Glutathione as a Sulphur Source by *Saccharomyces cerevisiae* / T. Miyake, H. Sammoto, M. Kanayama [et al.] // Yeast. – 1999. – V. 15. – P. 1449–1457.
- 100. Stroupe M. E. Sulfite reductase hemoprotein / M. E. Stroupe, E. D. Getzoff // Handbook of Metalloproteins; [ed. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt]. – Chichester: Wiley J. and Sons, Ltd, 2001. – P. 471–485.

- 101. Siverio J. M. Assimilation of nitrate by yeasts / J. M. Siverio // FEMS Microbiol. Rev. – 2002. – V. 26. – P. 277–284.
- 102. Crane B. R. Sulfite reductase structure at 1.6 A: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions / B. R. Crane, L. M. Siegel, E. D. Getzoff // Science. – 1995. – V. 270. – P. 59–67.
- 103. Structural diversity in metal ion chelation and the structure of uroporphyrinogen III synthase / H. L. Schubert, E. Raux, M. A. Matthews [et al.] // Biochem. Soc. Trans. 2002. V. 30. P. 595–600.
- 104. The *Escherichia coli cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase / J. B. Spencer, N. J. Stolowich, C. A. Roessner [et al.] // FEBS Lett. 1993. V. 335. P. 57–60.
- 105. Gene dissection demonstrates that the *Escherichia coli cysG* gene encodes a multifunctional protein / M. J. Warren, E. L. Bolt, C. A. Roessner [et al.] // Biochem. J. 1994. V. 302. P. 837–844.
- 106. Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis / S. C. Woodcock, E. Raux, F. Levillayer [et al.] // Biochem. J. 1998. V. 330. P. 121–129.
- 107. Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium* / E. Raux, H. K. Leech, R. Beck [et al.] // Biochem. J. – 2003. – V. 370. – P. 505–516.
- 108. Siroheme biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae requires the products of both the MET1 and MET8 genes / J. Hansen, M. Muldbjerg, H. Chérest [et al.] // FEBS Lett. – 1997. – V. 401. – P. 20–24.
- 109. Masselot M. Methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants / M. Masselot, H. De Robichon-Szulmajster // Mol. Gen. Genet. 1975. V. 139, № 2. P. 121–132.

- 110. Physiological analysis of mutants of Saccharomyces cerevisiae impaired in sulphate assimilation / D. Thomas, R. Barbey, D. Henry, Y. Surdin-Kerjan // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138, № 10. P. 2021–2028.
- 111. The structure of *Saccharomyces cerevisiae* Met8p, a bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase / H. L. Schubert, E. Raux, A. A. Brindley [et al.] // EMBO J. 2002. V. 21. P. 2068–2075.
- 112. The role of *Saccharomyces cerevisiae* Met1p and Met8p in sirohaem and cobalamin biosynthesis / E. Raux, T. McVeigh, S. E. Peters [et al.] // Biochem.
  J. 1999. V. 338. P. 701–708.
- 113. Maize uroporphyrinogen III methyltransferase: overexpression of the functional gene fragments in *Escherichia coli* and one-step purification / J. Fan, D. Wang, Z. Liang [et al.] // Protein Expr. Purif. 2006. V. 46, № 1. P. 40–46.
- 114. Primary structure, expression in *Escherichia coli*, and properties of S-adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase from *Bacillus megaterium*/ C. Robin, F. Blanche, L. Cauchois [et al.] // J. Bacteriol. 1991. V. 173, № 15. P. 4893–4896.
- 115. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from *Pseudomonas denitrificans* / F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut [et al.] // J. Bacteriol. 1989. V. 171, № 8. P. 4222–4231.
- 116. Structure/function studies on a S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III C methyltransferase (SUMT), a key regulatory enzyme of tetrapyrrole biosynthesis / J. Vévodová, R. M. Graham, E. Raux [et al.] // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 344. – P. 419–433.
- 117. The Aspergillus nidulans metR gene encodes a bZIP protein which activates transcription of sulfur metabolism genes / R. Natorff, M. Sienko, J. Brzywczy [et al.] // Mol. Microbiol. 2003. V. 49, № 4. P. 1081–1094.
- 118. SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast / C. Harrison, S. Katayama, S. Dhut [et al.] // EMBO J.

-2005. - V. 24. - P. 599-610.

- 119. Hansen J. Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Hansen, P. F. Johannesen // Mol. Gen. Genet. – 2000. – V. 263. – P. 535–542.
- 120. Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism / A. Lafaye, C. Junot, Y. Pereira [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 24723–24730.
- 121. Met30p, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S-adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats / D. Thomas, L. Kuras, R. Barbey [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 1995. – V. 15. – P. 6526–6534.
- 122. Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator Met4 is triggered by the SCF(Met30) complex / A. Rouillon, R. Barbey, E. E. Patton [et al.] // EMBO J. – 2000. – V. 19. – P. 282–294.
- 123. Dual regulation of the met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment / L. Kuras, A. Rouillon, T. Lee [et al.] // Mol. Cell. – 2002. – V. 10. – P. 69–80.
- 124. Willems A. R. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin / A. R. Willems, M. Schwab, M. Tyers // Biochem. Biophys. Acta. 2004. V. 1695. P. 133–170.
- 125. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4 / P. Kaiser, K. Flick, C. Wittenberg [et al.] // Cell. – 2000. – V. 102. – P. 303–314.
- 126. Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain / K. Flick, I. Ouni, J. A. Wohlschlegel [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2004. – V. 6. – P. 634–641.
- 127. Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast / E. E. Patton, A. R. Willems, D. Sa [et al.] // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 692–705.

- 128. SCF(Met30) –mediated control of the transcriptional activator Met4 is required for the G(1)-S transition / E. E. Patton, C. Peyraud, A. Rouillon [et al.] // EMBO J. – 2000. – V. 19. – P. 1613–1624.
- 129. Sizemore S. T. Cloning and characterization of scon-3+, a new member of the Neurospora crassa sulfur regulatory system / S. T. Sizemore, J. V. Paietta // Eukaryot. Cell. 2002. V. 1, № 6. P. 875–883.
- 130. Сибирный А. А. Некоторые аспекты регуляции метаболизма метанола у дрожжей / А. А. Сибирный // Биохимия животных и человека: Биотехнология. К.: Наук. думка, 1987. № 11. С. 52–63.
- 131. Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> are non-essential for energy supply of yeast methylotrophic growths / A. A. Sibirny, V. M. Ubiyvovk, M. V. Gonchar [et al.] // Arch. Microbiol. – 1990. – V. 154. – P. 566–575.
- 132. Yap1-regulated glutathione redox system curtails accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris* / T. Yano, E. Takigami, H. Yurimoto, Y. Sakai // Eukaryot. Cell. 2009. V. 8, № 4. P. 540–549.
- 133. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes / A. P. Gasch, P. T. Spellman, C. M. Kao [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2000. – V. 11. – P. 4241–4257.
- 134. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes / H. C. Causton, B. Ren, S. S. Koh [et al.] // Mol. Biol. Cell. 2001. V. 12. P. 323–337.
- 135. Goldman G. H. The DNA damage response in filamentous fungi / G. H. Goldman, S. L. McGuire, S. D. Harris // Fungal Genet. Biol. 2002. V. 35. P. 183–195.
- 136. Jamieson D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*/ D. J. Jamieson // Yeast. 1998. V. 14. P. 1511–1527.
- 137. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. C.

Gutteridge. – [4th ed.]. – Oxford: Oxford University Press, 2007. – 888 p.

- 138. Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast Saccharomyces cerevisiae / D. Greetham, J. Vickerstaff, D. Shenton [et al.] // BMC Biochem. 2010. V. 11, № 3. P. 1–10.
- 139. Yamada K. Schizosaccharomyces pombe homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant / K. Yamada, C. W. Nakagawa, N. Mutoh // Yeast. – 1999. – V. 15. – P. 1125–1132.
- 140. Inoue Y. Oxidative stress response in *Hansenula mrakii*: a new type of glutathione peroxidase in yeast / Y. Inoue, A. Kimura // Recent Res. Dev. Agric. Biol. Chem. 1998. P. 29–39.
- 141. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* / Y. Inoue, T. Matsuda, K.-I. Sugiyama [et al.] // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 27002–27009.
- 142. Avery A. M. Saccharomyces cerevisiae expresses three phopholipid hydroperoxide glutathione peroxidases / A. M. Avery, S. V. Avery // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – P. 33730–33735.
- 143. Redox control and oxidative stress in yeast cells / E. Herrero, J. Ros, G. Bellí, E. Cabiscol // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780, № 11. P. 1217–1235.
- 144. Carmel-Harel O. Role of the Glutathione- and Thioredoxin-dependent Reduction Systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* Responses to Oxidative stress / O. Carmel-Harel, G. Storz // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – V. 54. – P. 439–461.
- 145. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily / D. Sheehan, G. Meade, V. M. Foley [et al.] // Biochem. J. 2001. V. 360. P. 1–16.
- 146. Amstrong R. N. Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an

archetypal detoxification enzyme / R. N. Amstrong // Adv. Enzymol. – 1994. – V. 69. – P. 1–44.

- 147. Vuilleumier S. The elusive role of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes / S. Vuilleumier, M. Pagni // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 138–146.
- 148. Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from Schizosaccharomyces pombe / H. G. Kim, K. N. Park, Y. W. Cho [et al.] // Biochem. Biophys. Acta. – 2001. – V. 1520. – P. 179–185.
- 149. Chio J. H. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J. H. Chio, W. Lou, A. Vancura // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 29915–29922.
- 150. N-acetylation of the glutamate residue of intact glutathione conjugates in rats: a novel pathway for the metabolic processing of thiol adducts of xenobiotics / W. Yin, G. A. Doss, R. A. Stearns [et al.] // Drug Metab. Dispos. 2004. V. 32. P. 43–48.
- 151. Disposition of glutathione conjugates in rats by a novel glutamic acid pathway: characterization of unique peptide conjugates by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/NMR / A. E. Mutlib, J. Shockcor, R. Espina [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – V. 294. – P. 735–745.
- 152. Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates /
  A. Beck, K. Lendzian, M. Oven [et al.] // Phytochemistry. 2003. V. 62, № 3.
   P. 423–431.
- 153. Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates / R.
  Blum, A. Beck, A. Korte [et al.] // Plant J. 2007. V. 49, № 4. P. 740–749.
- 154. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump / Z. S. Li, M. Szczypka, Y. P. Lu [et al.] // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 6509–6517.
- 155. ATP-dependent transport of organic anions in secretory vesicles of

Saccharomyces cerevisiae / M. V. St-Pierre, S. Ruetz, L. F. Epstein [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91. – P. 9476–9479.

- 156. Zadzinski R. Transport of glutathione-Sconjugates in the yeast Saccharomyces cerevisiae / R. Zadzinski, J. Maszewski, G. Bartosz // Cell Biol. Int. – 1996. – V. 20. – P. 325–330.
- 157. Vacuolar accumulation and extracellular extrusion of electrophilic compounds by wild-type and glutathione-deficient mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* / V. M. Ubiyvovk, J. Maszewski, G. Bartosz [et al.] // Cell Biol. Int. – 2003. – V. 27. – P. 785–789.
- 158. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium / Z. S. Li, Y. P. Lu, R. G. Zhen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 90. P. 42–47.
- 159. Jelinsky S. A. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent / S. A. Jelinsky, L. D. Samson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1486–1491.
- 160. Bae W. Proteomic Study for the Cellular Responses to Cd<sup>2+</sup> in Schizosaccharomyces pombe Through Amino Acid-coded Mass Tagging and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / W. Bae, X. Chen // Mol. Cell. Proteomics. – 2004. – V. 3, № 6. – P. 596–607.
- 161. Valko M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress / M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin // Curr. Med. Chem. – 2005. – V. 12. – P. 1161–1208.
- 162. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination / L. Jarup // Br. Med. Bull. 2003. V. 68. P. 167–182.
- 163. Satarug S. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke / S. Satarug, M. R. Moore // Environ. Health Perspect. – 2004. – V. 112. – P. 1099–1103.
- 164. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms

of tolerance in plants / S. Clemens // Biochimie. – 2006. – V. 88. – P. 1707– 1719.

- 165. Role of glutathione transferases in cadmium stress / P. D. B. Adamis, D. S. Gomes, M. L. C. C. Pinto [et al.] // Toxicology Letters. 2004. V. 154. P. 81–88.
- 166. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals / A. Martelli, E. Rousselet, C. Dycke [et al.] // Biochimie. 2006. V. 88. P. 1807-1814.
- 167. Tomsett A. B. Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi / A. B. Tomsett // Stress tolerance of fungi; ed. D. H. Jennings. NY, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1993. P. 69–95.
- 168. Stohs S. J. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions / S. J. Stohs, D. Bagghi // Free Radic. Biol. Med. 1995. V. 18, № 2. P. 321–336.
- 169. Blackwell K. J. Metal cation uptake by yeast: a review / K. J. Blackwell, I. Singleton, J. M. Tobin // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 43. P. 579–584.
- 170. Biosorption of Cadmium Ions by Different Yeast Species / E. Breierova, I. Vajczikova, V. Sasinkova [et al.] // Z. Naturforch. 2002. V. 57. P. 634–639.
- 171. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae BSD2* gene / X. F. Liu, F. Supek, N. Nelson [et al.] // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 11763–11769.
- 172. A Cytosolic Domain of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter is Required for Its Post-translational Inactivation in Response to Zinc and Cadmium / R. S. Gitan, M. Shababi, M. Kramer [et al.] // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 39558–39564.
- 173. Yen J. L. The Yeast Ubiquitin Ligase SCF<sup>Met30</sup> Regulates Heavy Metal Response / J. L. Yen, N.-Y. Su, P. Kaiser // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. P. 1872–

1882.

- 174. Heavy metal transporters in Hemiascomycete yeasts / J. F. Diffels, M.-L. Seret,
  A. Goffeau [et al.] // Biochimie. 2006. V. 88. P. 1639–1649.
- 175. The cadmium-resistant gene, *CAD2*, which is a mutated putative coppertransporter gene (*PCA1*), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae* / E. Shiraishi, M. Inouhe, M. Joho [et al.] // Curr. Genet. – 2000. – V. 37. – P. 79–86.
- 176. Perego P. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast / P. Perego, S. B. Howell // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997. V. 147. P. 312–318.
- 177. Silver S. Bacterial heavy metal resistance: new surprises / S. Silver, L. T. Phung
  // Annu. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 753–789.
- 178. Vande Weghe J. G. Accumulation of metal-binding peptides in fission yeast requires hmt2+ / J. G. Vande Weghe, D. W. Ow // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 42. – P. 29–36.
- 179. Dominance of Metallothionein in Metal Ion Buffering in Yeast Capable of Synthesis of (gamma EC)nG Isopeptides / W. Yu, V. Santhanagopalan, A. K. Sewell [et al.] // J. Biol. Chem. 1994. V. 269, № 33. P. 21010–21015.
- 180. Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification / Z. Nagy,
  C. Montigny, P. Leverrier [et al.] // Biochimie. 2006 . V. 88, № 11. P.
  1665-1671.
- 181. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein / D. F. Ortiz, T. Ruscitti, K. F. McCue [et al.] // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 4721–4728.
- 182. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites / C. T. Dameron, R. N. Reese, R. K. Mehra [et al.] // Nature. 1989. V. 338. P. 596–597.
- 183. Dameron C. T. Peptide-mediated formation of quantum semiconductors / C. T.

Dameron, D. R. Winge // Trends Biotechnol. – 1990. – V. 8, № 1. – P. 3-6.

- 184. Dameron C. T. Characterization of Peptide-Coated Cadmium-Sulfide Crystallites / C. T. Dameron, D. R. Winge // Inorg. Chem. – 1990. – V. 29. – P. 1343-1348.
- 185. Bae W. Properties of glutathione- and phytochelatin-capped CdS bionanocrystallites / W. Bae, R. K. Mehra // J. Inorg. Biochem. – 1998. – V. 69, № 1-2. – P. 33–43.
- 186. Glutathione as a matrix for the synthesis of CdS nanocrystallites / L. Nguyen, R. Kho, W. Bae, R. K. Mehra // Chemosphere. 1999. V. 38, № 1. P. 155-173.
- 187. Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in Schizosaccharomyces pombe / D. M. Speiser, D. F. Ortiz, L. Kreppel [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 1992. – V. 12. – P. 5301–5310.
- 188. Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: A second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe /* A. Al-Lahham, V. Rohde, P. Heim [et al.] // Yeast. 1999. V. 15. P. 385–396.
- 189. Coblenz A. The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / A. Coblenz, K. Wolf // FEMS Microbiol. Rev. – 1994. – V. 14. – P. 303–308.
- 190. Vande Weghe J. G. A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation / J.
  G. Vande Weghe, D. W. Ow // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 13250– 13257.
- 191. Hunter T. C. A role for *HEM2* in cadmium tolerance / T. C. Hunter, R. K. Mehra
  // J. Inorg. Biochem. 1998. V. 69. P. 293–303.
- 192. Adamis P. D. B. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis / P. D. B. Adamis, A. D. Panek, E. C. A. Eleutherio // Toxicol. Lett. – 2007. – V. 173. – P. 1–7.

- 193. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism / P. D. Adamis, S. C. Mannarino, C. J. Riger [et al.] // Biometals. – 2009. – V. 22, № 2. – P. 243–249.
- 194. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* / D. S. Gomes, L. C. Fragoso, C. J. Riger [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1573. P. 21–25.
- 195. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand / M. Fauchon, G. Lagniel, J. Aude [et al.] // Mol. Cell. 2002. V. 9. P. 713–723.
- 196. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter encoding gene, *YCF1* / J. A. Wemmie, M. S. Szczypka, D. J. Thiele, W. S. Moye-Rowley // J. Biol. Chem. 1994. V. 269, № 51. P. 32592–32597.
- 197. Shumilla J. A. Inhibition of NF-κB binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc, and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism / J. A. Shumilla, K. E. Wetterhahn, A. Barchowsky // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 349. P. 356–362.
- 198. Chrestensen C. A. Acute cadmium exposure inactivates thiolreductase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis / C. A. Chrestensen, D. W. Starke, J. J. Mieyal // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275. – P. 26556–26565.
- 199. Клонирование генов GSH1 и GSH2 комплементирующих дефект биосинтеза глутатиона у метилотрофных дрожжей / В. М. Убийвовк, Т. Ю. Назарко, Е. Г. Стасык, А. А. Сибирный // Микробиология. 2002. Т. 71, № 6. С. 829–835.
- 200. Deficiency in frataxin homologue YFH1 in the yeast Pichia guilliermondii leads to missregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation / Y. V. Pynyaha, Y. R. Boretsky, D. V. Fedorovych [et al.] // Biometals. – 2009. – V. 22, № 6. – P. 1051–1061.

- 201. Blazhenko O. V. Glutathione Deficiency Leads to Riboflavin Oversynthesis in the Yeast *Pichia guilliermondii* / O. V. Blazhenko // Curr. Microbiol. 2014. V. 69, № 1. P. 10–18.
- 202. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology:
  [in 2 volumes] / [ed. F. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham et al.]. –[2 ed.]. –
  Washington: ASM Press, 1996. 2822 p.
- 203. The Hansenula polymorpha PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation / X. Tan, H. R. Waterham, M. Veenhuis [et al.] // J. Cell Biol. – 1995. – V. 128. – P. 307–319.
- 204. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1 / J. H. Sohn, E. S. Choi, H. A. Kang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 51, № 6. – P. 800–807.
- 205. Nakayama K. Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, with GDPmannose-4, stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose / K. Nakayama, Y. Maeda, Y. Jigami // Glycobiology. – 2003. – V. 13, № 10. – P. 673–680.
- 206. Cherest H. Genetic Analysis of a New Mutation Conferring Cysteine Auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of the Sulfur Metabolism Pathway / H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan // Genetics. – 1992. – V. 130. – P. 51– 58.
- 207. Current Protocols in Molecular Biology: [in 2 volumes] / [ed. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al.]. NY: Interscience, Greene Publishing Association at Wiley, 1990.
- 208. Highly–efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* / K.
  N. Faber, P. Haima, W. Harder [et al.] // Curr. Genet. 1994. V. 25, № 4. P. 305–310.
- 209. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch,
  T. Maniatis. [2nd ed.]. NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 694 p.

- 210. Kelley L. A. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server / L. A. Kelley, M. J. Sternberg // Nat. Protoc. 2009. V. 4, № 3. P. 363-371.
- 211. Lemmon A. R. The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation / A. R. Lemmon, M. C. Milinkovitch // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99, № 16. P. 10516–10521.
- 212. Helaers R. MetaPIGA v2.0: maximum likelihood large phylogeny estimation using the metapopulation genetic algorithm and other stochastic heuristics / R. Helaers, M. C. Milinkovitch // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11, № 379. doi: 10.1186/1471-2105-11-379.
- 213. Pichia pastoris as a host system for transformations / J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler [et al.] // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. P. 3376–3385.
- 214. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. 1951. V. 193, № 1. P. 265–275.
- 215. Brehe J. Enzymatic assay of glutathione / J. Brehe, H. B. Burch // Anal. Biochem. 1976. V. 74. P. 189–197.
- 216. Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* / V. I. Titorenko, I. Keizer, W. Harder, M. Veenhuis // J. Bacteriol. 1995. V. 177, № 2. P. 357–363.
- 217. Kistler M. Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae / M. Kistler, K. Maier, F. Eckardt-Schupp // Mutagenesis. – 1990. – V. 5, № 1. – P. 39–44.
- 218. Physiological characterization of a cadmium-resistant mutant in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / C. Wunderlich, Q. Zhao, M. Zimmermann [et al.]
  // Microbiol. Res. 1995. V. 150. P. 233–237.
- 219. Fedorovich D. Iron uptake by the yeast Pichia guilliermondii. Flavinogenesis

and reductive iron assimilation are co-regulated processes / D. Fedorovich, O. Protchenko, E. Lesuisse // Biometals. – 1999. – V. 12, № 4. – P. 295–300.

- 220. Biosynthesis of glutathione and resistance of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to heavy metals and drugs / V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko, O. G. Stasyk [et al.] // Bio-Forum II, Lodz (Poland), May 10-11 2001. Lodz (Poland), 2001. P. 94–95.
- 221. Biosynthesis of glutathione and resistance of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to heavy metals / V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko, O. G. Stasyk [et al.] // 21<sup>st</sup> International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001) "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)", Lviv, 21-25 August 2001. Lviv, 2001. P. 99.
- 222. Glutathione-dependent defence of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* against stresses caused by peroxides, electrophiles and heavy metals / V. M. Ubiyvovk, O. V. Blazhenko, T. Y. Nazarko [et al.] // 1<sup>st</sup> FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana (Slovenia), 29 June-3 July 2003. Ljubljana (Slovenia), 2003. P. 95.
- 223. Novel Cysteine-Centered Sulfur Metabolic Pathway in the Thermotolerant Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha* / M. J. Sohn, S. J. Yoo, D. B. Oh [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – V. 9, № 6. – doi: 10.1371/journal.pone.0100725.
- 224. Nakayama K. Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, with GDP-mannose-4, stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose / K. Nakayama, Y. Maeda, Y. Jigami // Glycobiology. 2003. V. 13, № 10. P. 673-680.
- 225. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations / H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura // J. Bacteriol. 1983. V. 153, № 1. P. 163–168.
- 226. Dameron C. T. Glutathione-coated cadmium-sulfide crystallites in *Candida glabrata* / C. T. Dameron, B. R. Smith, D. R. Winge // J. Biol. Chem. 1989. V. 264, № 29. P. 17355–17360.

- 227. Chromate causes sulfur starvation in yeast / Y. Pereira, G. Lagniel, E. Godat [et al.] // Toxicol. Sci. 2008. V. 106, № 2. P. 400-412.
- 228. Cloning and functional analysis of the GSH1/MET1 gene complementing cysteine and glutathione auxotrophy of the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha / V. M. Ubiyvovk, O. V. Blazhenko, M. Zimmermann [et al.] // Ukr. Biokhim. Zh. 2011. V. 83, № 5. P. 67–81.
- 229. The role of *GSH1/MET1* and *GSH2* genes in cadmium, chromate and methanol tolerance in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* / O. Mahola, V. Ubiyvovk, T. Nazarko [et al.] // The XXI<sup>st</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Gothenburg (Sweden), 7-12 July 2003. Yeast, 2003. P. 181.
- 230. Genetic control of glutathione metabolism in yeasts / A. A. Sibirny, V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko [et al.] // 9-th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju (Korea), 1-5 July 2002. Gyeongju (Korea), 2002. P. 84.
- 231. The role of glutathione in cellular stress defence caused by electrophiles and heavy metals (cadmium and chromate) in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* / O. Blazhenko, V. Ubiyvovk, T. Nazarko [et al.] // First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology, Lviv, 25-28 April 2004. Lviv, 2004. P. 45.
- 232. He X. J. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* / X. J. He, J. S. Fassler // Mol. Microbiol. 2005. V. 58, № 5. P. 1454–1467.
- 233. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors / Y. Fujii, T. Shimizu, T. Toda [et al.] // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7, № 10. P. 889–893.
- 234. Chen G. AhR/Arnt:XRE interaction: Turning false negatives into true positives in the modified yeast one-hybrid assay / G. Chen, J. A. Shin // Anal. Biochem. 2008. V. 382, № 2. P. 101–106.

- 235. Characterization of the mouse Cyp1B1 gene. Identification of an enhancer region that directs aryl hydrocarbon receptor-mediated constitutive and induced expression / L. Zhang, U. Savas, D. L. Alexander, C. R. Jefcoate // J. Biol. Chem. 1998. V. 273, № 9. P. 5174–5183.
- 236. Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via Ca<sup>2+</sup> homeostasis and calcineurin activation in the yeast *Hansenula polymorpha* / C. Rodríguez, P. Tejera, B. Medina [et al.] // J. Biol. Chem. 2010. V. 285, № 48. P. 37551-37560.
- 237. Reconstruction of sulfur metabolism pathway in *Hansenula polymorpha* based on transcriptome and metabolite analysis / M. J. Sohn, V. M. Ubiyvovk, D. B. Oh [et al.] // 12-th International Congress on Yeasts, Yeasts for Human Progress, Kiev, 11-15 August 2008. Kiev, 2008. P. 125.
- 238. Sohn M. J. Global transcriptional response of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to environmental stress and its application: effects of Cd treatment and sulfur limitation: Master's thesis / Min Jeong Sohn. Daejeon, Korea, 2006. 70 p.
- 239. Jez J. M. Arabidopsis thaliana Glutamate-Cysteine Ligase: functional properties, kinetic mechanism and regulation of activity / J. M. Jez, R. E. Cahoon, S. Chen // J. Biol. Chem. 2004. V. 279, № 32. P. 33463–33470.
- 240. Structural Basis for the Redox Control of Plant Glutamate-Cysteine Ligase / M. Hothorn, A. Wacher, R. Gromes [et al.] // J. Biol. Chem. 2006. V. 281, № 37. P. 27557–27565.
- 241. Thiol-Based Regulation of Redox-Active Glutamate-Cysteine Ligase from Arabidopsis thaliana / L. M. Hicks, R. E. Cahoon, E. R. Bonner [et al.] // Plant Cell. - 2007. - V. 19, № 8. - P. 2653-2661.
- 242. Блаженко О. В. Транскрипційна регуляція гену GSH2 Hansenula polymorpha у відповідь на дію іонів кадмію / О. В. Блаженко, А. Б. Котлярчук, В. М. Убийвовк // Укр. біохім. журн. 2014. Т. 86, № 1. С. 75–84.
- 243. Blazhenko O. V. Transcriptional regulation of the *Hansenula polymorpha GSH2* gene, encoding gamma-glutamylcysteine synthetase, in response to cadmium treatment / O. V. Blazhenko, A. B. Kotlyarchuk, V. M. Ubiyvovk // Матеріали I міжнародної науково-технічної конференції "Сучасні проблеми фізики, хімії та біології. ФізХімБіо-2012", Севастополь, 28-30 листопада 2012 р. С.: Севастопольський національний технічний університет, 2012. С. 129–131.
- 244. Functional Analysis of the *GSH2* gene Involved in Glutathione Biosynthesis in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 / V. Ubiyvovk, M. W. Kim, M. J. Sohn [et al.] // International Symposium, Daegu (Korea), 21-23 June 2004. Daegu (Korea), 2004. P. 9.
- 245. Kumar C. Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway / C. Kumar, R. Sharma, A. K. Bachhawat // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – V. 219. – P. 187–194.
- 246. Убийвовк В. М. Выделение и характеристика глутатиондефицитных мутантов метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* / В. М. Убийвовк, Я. В. Телегус, А. А. Сибирный // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 1. – С. 33–39.
- 247. Meister A. Glutathione metabolism / A. Meister // Methods Enzymol. 1995. V. 251. P. 3–7.
- 248. Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast / J. Wünschmann, M. Krajewski, T. Letzel [et al.] // Phytochemistry. 2010. V. 71, № 1. P. 54–61.
- 249. Блаженко А. В. Ген *GGT1 Hansenula polymorpha* кодирующий γглутамилтрансферазу вовлечен в детоксификацию ксенобиотиков и тяжелого метала кадмия / А. В. Блаженко, В. М. Убийвовк, М. Пеннинскс [и др.] // Материалы Международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н.И.

Вавилова РАН, Москва, 28 июня – 2 июля 2006 г. – Москва, 2006. – С. 16.

- 250. Role of gamma-glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* / V. M. Ubiyvovk,
  O. V. Blazhenko, D. Gigot [et al.] // Cell Biol. Int. 2006. V. 30, № 8. P. 665–671.
- 251. Cobbett C. S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification / C. S. Cobbett // Curr. Opin. Plant. Biol. 2000. V. 3. P. 211–216.
- 252. Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*/ A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, H. Preud'homme [et al.] // Plant Cell Environ.
   2011. V. 34, № 12. P. 2071–2082.
- 253. Pal R. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification / R. Pal,
  J. P. Rai // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 160, № 3. P. 945–963.
- 254. Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in Saccharomyces cerevisiae / J. Wünschmann, A. Beck, L. Meyer [et al.] // FEBS Lett. – 2007. – V. 581, № 8. – P. 1681–1687.
- 255. Heterologous expression and characterization of Schizosaccharomyces pombe vacuolar carboxypeptidase Y in Saccharomyces cerevisiae / K. Takegawa, S. Tokudomi, M. S. Bhuiyan [et al.] // Curr. Genet. 2003. V. 42, № 5. P. 252–259.
- 256. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* / S. B. Ha, A. P. Smith, R. Howden [et al.] // Plant Cell. – 1999. – V. 11, № 6. – P. 1153–1164.
- 257. Zhao H. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a highaffinity uptake system induced by zinc limitation / H. Zhao, D. Eide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. – P. 2454–2458.
- 258. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula*

*polymorpha* DL-1 / V. M. Ubiyvovk, V. M. Ananin, A. Y. Malyshev [et al.] // BMC Biotechnol. – 2011. – V. 11, № 8. – P. 1–12, doi:10.1186/1472-6750-11-8.

- 259. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae* / L. Ojeda, G. Keller, U. Muhlenhoff [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281. – P. 17661–17669.
- 260. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* / N. Pujol-Carrion, G. Belli, E. Herrero [et al.] // J. Cell Sci. 2006. V. 119. P. 4554–4564.
- 261. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis / J. C. Rutherford, L. Ojeda, J. Balk [et al.] // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 10135–10140.
- 262. Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula* polymorpha / O. V. Blazhenko, M. Zimmermann, H. A. Kang [et al.] // Biometals. 2006. V. 19, № 6. P. 593–599.
- 263. Блаженко О. В. Делеція гена *MET4* знижує толерантність до іонів кадмію та їх акумуляцію у клітинах дріжджів *Hansenula polymorpha* / О. В. Блаженко // Вісник Львів. Ун-ту. Серія біологічна. – 2014. – Вип. 64. – С. 200–205.
- 264. Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity / A. Serero, J. Lopes, A. Nicolas, S. Boiteux // DNA Repair. – 2008. – V. 7, № 8. – P. 1262-1275.
- 265. A genome-wide screen of genes involved in cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* / P. J. Kennedy, A. A. Vashisht, K. L. Hoe [et al.]
  // Toxicol Sci. 2008. V. 106, № 1. P. 124-139.
- 266. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress / D. Chen, W. M. Toone, J. Mata [et al.] // Mol. Cell Biol. – 2003. – V. 14. – P. 214– 229.

## додатки

## Додаток А

## Загальна схема досліджень виконаних в роботі



Примітка. Клонований ген та штами *H. polymorpha* отримані у нашій лабораторії до початку даної дисертаційної роботи виділено сірим фоном. *H. polymorpha (Hp), S. cerevisiae (Sc)* і *P. guilliermondii (Pg); WT* – штами дикого типу, ЕТФ – електротрансформація