

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України (м. Львів).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Сибірний Андрій Андрійович,
Інститут біології клітини НАН України, директор,
завідувач відділу молекулярної генетики і біотехнології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Осташ Богдан Омелянович,
Львівський національний університет ім. І. Франка,
професор кафедри генетики та біотехнології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
заступник директора з наукової роботи.

Захист відбудеться «27» жовтня 2015 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розісланий «25» вересня 2015 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Глутатіон (GSH) є основним компонентом загальної стресової відповіді майже у всіх живих організмів, зокрема і людини (Meister and Anderson, 1983). На практиці GSH широко застосовується у медичній та косметичній промисловості, а також використовується як харчова добавка (Li et al., 2004; Bachhawat et al., 2009). Метаболізм GSH та його регуляція добре досліджені на моделі пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Penninckx, 2002; Voer et al., 2003), 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 ген *GSH2*, що кодує перший фермент біосинтезу GSH, γ -глутамілцистеїнсинтетазу (γ GCS) (Ubiyvovk et al., 2002). 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 (Sahm, 1977; Jones and Bellion, 1991), 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 (Gellissen, 2002). 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 *H. 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 *H. polymorpha*. 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 *H. 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 (Gellissen and Veenhuis, 2001). 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, глікозилуванні білків, цілісності клітинної стінки і секреції» (2002-2004 рр.) та Collaborative NATO Linkage Grant LST.CLG 979872 «Генетичний контроль метаболізму глутатіону у метилотрофних дріжджів *H. 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 γ GCS, відповідно. Дослідити активність γ GCS 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 (γ GT). З'ясувати роль γ GT у деградації глутатіону як екзогенного джерела сірки в *H. polymorpha* та дослідити регуляцію активності γ GT джерелами азоту та сірки.

4. З'ясувати чи γ GT 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 рGSH2-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 фрагмента ДНК полімеразами або нуклеазами, дефосфорилування 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 факторів та ін.). У роботі також широко використовували методи комп'ютерного аналізу та комп'ютерні бази даних відомих генів та білків.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше ідентифіковано ген *GSH1/MET1* дріжджів *H. 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 γ GT у мутантів з делецією гена *GGT1*. Вперше у дріжджів показано, що γ GT бере участь у деградації кон'югатів глутатіону з електрофільними ксенобіотиками, що підтверджується дефектом відповідних мутантів *H. polymorpha* і *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 N-ацетилцистеїн-ксенобіотик, у зовнішньоклітинному середовищі цих мутантів. Вперше у *H. polymorpha* з'ясовано, що утилізація GSH, як екзогенного джерела сірки, не залежить від γ GT, свідченням чого є здатність мутанта Δ *ggt1* утилізувати екзогенний GSH, як єдине джерело сірки. Вперше у *H. polymorpha* показано, що активність γ GT регулюється джерелами азоту та сірки, свідченням чого є зниження активності γ GT

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 γ GCS, про що свідчить неушкоджена активність цього фермента у точкового *gsh1* та делеційного *gsh1/met1* мутантів *H. polymorpha* та лише незначні коливання значень γ GCS 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 *H. polymorpha* 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. Пеннінksom 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 симпозиумі по дріжджах ISSY «Biochemistry,

Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)» (Львів, Україна, 2001), Науково-практичній конференції Біофорум-ІІ (Лодзь, Польща, 2001), 9-му Міжнародному симпозиумі 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 симпозиумі корейського товариства мікробіології і біотехнології (Даегу, Корея, 2004), Міжнародній конференції «Генетика в Росии 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. У 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. На основі аналітичного огляду наукової літератури обґрунтовано необхідність та перспективність проведення досліджень за темою дисертації.

Матеріали і методи досліджень. У роботі було використано штами дріжджів: *H. polymorpha* дикого типу генетичних ліній NCYC495, CBS4732 і DL-1, точкові мутанти *gsh1* і *gsh2* (Убийвовк и др., 2002), Gsh^+ трансформанти, отримані автором делеційні мутанти $\Delta gsh1/met1$, $\Delta gsh2$ і $\Delta ggt1$ та штамп CBS4732 *prGSH2-AOX*, а також мутант $\Delta met4$ та мультікопійні трансформанти *mcMET4* і *mcGSH2* з колекції проф. Канг Г.А.; *S. cerevisiae* штами дикого типу L3262-Y і BY4742 та мутанти $\Delta met1$, $\Delta met4$ і $\Delta cis2$ люб'язно надані проф. Канг Г.А. та проф. Пеннінksom М. Штами дріжджів вирощували за температури 28 °C та 37 °C у багатому середовищі (YPD, 1% дріжджовий екстракт, 1,5-2% пептон, 1-2% глюкоза 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. В роботі також були використані азот-дефіцитне та сірко-дефіцитне синтетичні середовища, синтетичне середовище А (Ubiyovok et al., 2006) та сірко-дефіцитне середовище Б (Cherest and Surdin-Kerjan, 1992). Амінокислоти додавались до середовища в концентрації 75-250 мг/л, GSH – 0,1 мМ, якщо не вказано інакше. Агаризовані середовища містили 2% агар.

Методи культивування бактерій *Escherichia coli* та використані молекулярно-генетичні методи описані в Sambrook et al., 1989. Електротрансформацію дріжджів *H. polymorpha* проводили згідно Faber et al., 1994, мітотичну стабільність дріжджових трансформантів визначали як описано в Cregg et al., 1985, отримання безклітинних екстрактів і визначення активності алкогольоксидази (АОХ) проводили за Sibirny et al., 1990 і Titorenko et al., 1995, γ GCS – за Kistler et al., 1990 з деякими модифікаціями, γ GT – за Payne and Payne, 1984 з деякими модифікаціями, концентрацію білка визначали за методом Лоурі, вміст глутатіону визначали згідно Brehe and Burch, 1976 з деякими модифікаціями, флуоресцентну мікроскопію, транспорт електрофільних сполук з клітин дріжджів проводили як описано в Ubiyovok et al., 2006, визначення фітохелатинів і глутатіону, вивчення акумуляції іонів кадмію, транспорт іонів кадмію в дріжджові клітини описано в Blazhenko et al., 2006. Статистичний аналіз експериментальних даних здійснено за допомогою статистичної програми SigmaPlot 11.0. В роботі широко використовували методи комп'ютерного аналізу і комп'ютерні бази відомих генів та білків.

Результати досліджень та їх обговорення

Ідентифікація та функціональний аналіз гена *GSH1/MET1 H. polymorpha*

Молекулярне клонування гена *GSH1/MET1 H. polymorpha*, що функціонально комплементує мутацію *gsh1*. Трансформанти, що відновлювали ауксотрофний дефект за GSH точкового мутанта *gsh1*, який був виділений як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (MNNG) резистентний та кадмій-чутливий клон, були попередньо отримані шляхом функціональної комплементачії бібліотекою генів *H. polymorpha* (Убийвовк и др., 2002). Подальші дослідження встановили, що відновлення Gsh⁺-фенотипу відбувається за рахунок фрагмента геномної ДНК *H. polymorpha* розміром 8,6 т.п.н. Визначення нуклеотидної послідовності даного фрагмента геномної ДНК та її наступний комп'ютерний аналіз виявили присутність принаймні чотирьох відкритих рамок трансляції (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.); ВРТ3 – до гена, що кодує СDP-алкоголь фосфатидилтрансферазу (286 а.з.) *S. cerevisiae*, яка бере участь у метаболізмі фосфоліпідів; ВРТ4 – до гена *MET1 S. cerevisiae*, що кодує SUMT (527 а.з.), яка відповідає за біосинтез сірогому (рис. 1). Щоб з'ясувати, яка з вказаних ВРТ може комплементувати Gsh⁻ фенотип точкового мутанта *gsh1*, було сконструйовано набір плазмід, що містили субфрагменти розміром 4,4 т.п.н. (ВРТ2 і ВРТ3) та 5,3 т.п.н. (ВРТ4). Трансформація мутанта *gsh1 H. polymorpha* сконструйованими плазмідами показала, що відновлення дикого фенотипу стосовно росту на GSH-дефіцитному синтетичному середовищі, рівня клітинного глутатіону, чутливості до MNNG та резистентності до іонів кадмію спостерігали лише у

трансформантів *pG1-36* та *pG1-47*, що містили ВРТ4-вмісні плазміди (див. рис. 1).

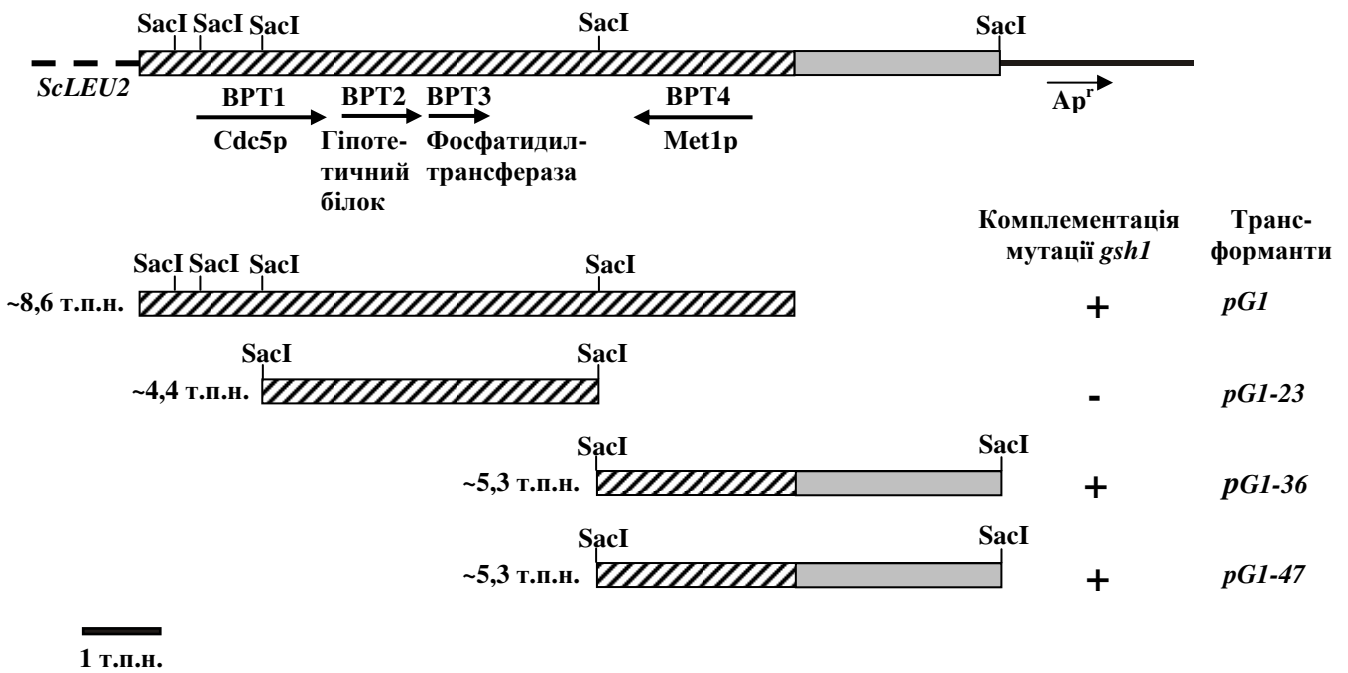


Рис. 1. Субклонування фрагмента геномної ДНК величиною 8,6 т.п.н., що містить ген *GSH1/MET1 H. polymorpha*

Дослідження мітотичної стабільності цих трансформантів показало, що обидві ВРТ4-вмісні плазміди підтримувалися автономно у клітинах дріжджових трансформантів. ВРТ4 довжиною 1539 п.н., позначена як ген *GSH1/MET1*, кодує білок розміром 513 а.з. з молекулярною масою 58 кДа. Порівняльний аналіз білкових баз даних виявив суттєву подібність між С-кінцевою послідовністю білка Gsh1p/Met1p (243-472 а.а.) *H. polymorpha* та послідовностями білків, що містять уропорфіриноген III трансметилазний домен. Білком з найвищою подібністю виявилась ймовірна уропорфірин-3 С-метилтрансфераза з *Candida albicans* (51% ідентичності, 70% подібності). Аналіз доменної структури білка Gsh1p/Met1p *H. polymorpha* виявив у його С-кінцевій послідовності тетрапіролметилазний мотив (243-452 а.з.), і на короткій ділянці, уропорфіриноген метилтрансферазний мотив (247-261 а.з.), а в N-кінцевій ділянці – унікальну “coiled-coil” структуру (156-198 а.з.).

Конструювання штамів з делецією гена *GSH1/MET1 H. polymorpha*. З метою додаткового підтвердження того, що клонована з бібліотеки генів ВРТ є власне геном *GSH1/MET1* отримано мутантні штами з делецією у цьому гені. Для цього спочатку сконструйовано плазмиду р Δ Нр*GSH1/MET1* (рис. 2, а), в якій кодуючу послідовність амінокислотних залишків (1-178) гена *GSH1/MET1 H. polymorpha* заміщено фрагментом ДНК, що містив ген *LEU2 S. cerevisiae*. Отриману плазмиду гідролізовано ендонуклеазами HindIII та SacI для вивільнення делеційної касети *Hprgsh1/met1::ScLEU2*, яку трансформовано у штами *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1 ade11*, CBS4732 *leu2-2 ura3-20* та CBS4732 *leu2-2 met2-2* методом електропорації. Селекцію Leu⁺ трансформантів проводили на мінімальному

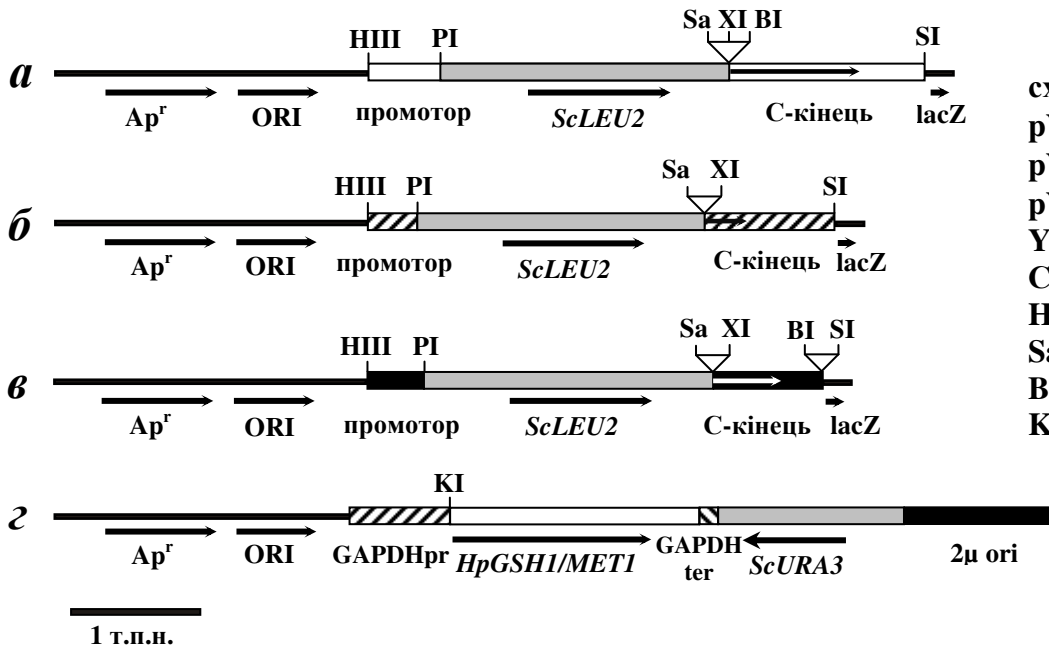


Рис. 2. Лінійні схеми плазмід: pYΔHrGSH1/MET1 (а), pYΔHrGSH2 (б), pYΔHrGGT1 (в), YEр_HrGSH1/MET1 (г). Сайти рестрикції: HIII, HindIII; PI, PstI; Sa, Sall; XI, XbaI; BI, BamHI; SI, SacI; KI, KpnI

середовищі без лейцину і далі аналізували на Gsh⁻ фенотип методом відбитків. Відібрано декілька трансформантів нездатних до росту на мінімальному середовищі без GSH. Коректне заміщення гена дикого типу на мутантний алель підтверджено за допомогою ПЛР аналізу. Схрещування точкового мутанта *gsh1 leu1-1* з делеційними мутантами *Δgsh1/met1 ade11*, *Δgsh1/met1 ura3-20* і *Δgsh1/met1 met2-2* показало, що всі отримані прототрофні диплоїдні клітини виявляли Gsh⁻ фенотип. Це свідчить, що алелі *Δgsh1/met1* та *gsh1* є мутантними щодо одного й того ж гена.

Отримання делеційних мутантів *Δgsh2 H. polymorpha*. Для отримання штамів з делецією гена *GSH2 H. polymorpha*, що кодує перший фермент біосинтезу GSH, γGCS, сконструйовано плазмиду pYΔHrGSH2 (див. рис. 2, б), в якій кодуючу послідовність амінокислотних залишків (1-574) гена *GSH2 H. polymorpha* замінили фрагментом ДНК, що містив ген *LEU2 S. cerevisiae*. Плазмиду pYΔHrGSH2 гідролізували по сайтах HindIII і SacI для вивільнення делеційної касети *Hrpgsh2::ScLEU2*, яку трансформували у штами *H. polymorpha* NCYC495 *leu1-1 ade11* та CBS4732 *leu2-2 met2-2* методом електропорації. Селекцію Leu⁺ трансформантів проводили на мінімальному середовищі без лейцину і далі аналізували на Gsh⁻ фенотип. Відібрано декілька трансформантів нездатних до росту на мінімальному середовищі без GSH. Коректність делеції гена *GSH2 H. polymorpha* підтверджено за допомогою ПЛР аналізу. Схрещування делеційних мутантів *Δgsh2 ade11* та *Δgsh2 met2-2* з точковим мутантом *gsh2 leu1-1* виявило, що всі прототрофні диплоїдні клітини здатні до росту на мінімальному середовищі лише за присутності екзогенного GSH, вказуючи на те, що гібридизовані мутанти належать до однієї генетичної групи.

Функціональний аналіз гена *GSH1/MET1 H. polymorpha*. Клонований ген *GSH1/MET1* може бути залучений у реакції сірогем-залежного відновлення сульфїту у шляху асиміляції сульфату і, відповідно, у шляхах біосинтезу сірковмісних амінокислот та GSH. У зв'язку з цим, було досліджено вплив різних джерел сірки на GSH-залежний фенотип точкового *gsh1* та *Δgsh1/met1* мутантів *H. polymorpha*.

Показано, що мутант *Δgsh1/met1* не ріс у мінімальному середовищі з сульфатом і сульфідом, проявляв лише незначну здатність до асиміляції метіоніну і S-аденозилметіоніну (SAM), та знижену ростову активність на S-аденозилгомоцистеїні і гомоцистеїні, як єдиному джерелі сірки (рис. 3, а, б). У сірко-

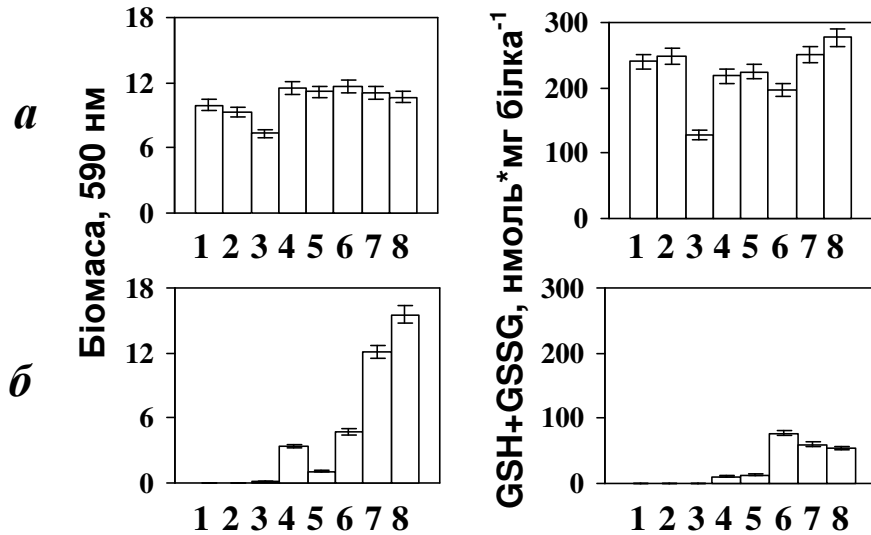


Рис. 3. Ріст та клітинний рівень глутатіону у *H. polymorpha* штама дикого типу (а) і мутанта *Δgsh1/met1* (б) в залежності від джерела сірки: 1 - сульфат, 2 - сульфід, 3 - S-аденозилметіонін, 4 - S-аденозилгомоцистеїн, 5 - метіонін, 6 - гомоцистеїн, 7 - цистеїн, 8 - глутатіон. Ростові дані представлені на 5 добу

дефіцитному середовищі забезпеченому цистеїном або GSH мутант *Δgsh1/met1* проявляв повне відновлення росту. Поряд з цим, точковий мутант *gsh1* проявляв відсутність росту на неорганічних джерелах сірки (сульфат, сульфід), незначну ростову активність на SAM і менш виражене зниження росту на метіоніні, S-аденозилгомоцистеїні і гомоцистеїні. Клітинний рівень глутатіону частково відновлювався у мутанта *Δgsh1/met1* за росту в присутності гомоцистеїну, цистеїну або GSH, порівняно з відповідними показниками штама дикого типу (див. рис. 3, а, б). Таким чином, активність Gsh1p/Met1p *H. polymorpha*, подібно до Met1p *S. cerevisiae* (Thomas et al., 1992), є абсолютно необхідною для росту на сульфаті та сульфіді. Пошкодження гена *HpGSH1/MET1* частково порушує здатність до росту на S-вмісних сполуках з метильного циклу. Щоб з'ясувати чи ген *GSH1/MET1* *H. polymorpha* комплементує мутацію *met1* *S. cerevisiae* сконструйовано плазмід, в якій ВРТ гена *HpGSH1/MET1* клоновано у промоторну та термінаторну ділянки гена *GAPDH* *S. cerevisiae* (див. рис. 2, з). Трансформація мутанта *Δmet1* *S. cerevisiae* сконструйованою плазмідом відновлювала його ріст на мінімальному середовищі з іонами сульфату, як єдиним джерелом сірки. Отже, ген *GSH1/MET1* *H. polymorpha* є гомологом гена *MET1* *S. cerevisiae*, що кодує SUMT. Аналіз молекулярної структури білка HpGsh1p/Met1p вказує на те, що даний білок, на додачу до SUMT активності, залученої в сірогем-залежному відновленні сульфіді в шляху асиміляції сульфату, і відповідно, синтезі цистеїну, який є субстратом γ GCS, може виконувати й певну регуляторну роль. Оскільки, γ GCS є ключовим ферментом в біосинтезі GSH досліджено ймовірну участь білка HpGsh1p/Met1p в регуляції синтезу γ GCS у дріжджів *H. polymorpha*. Показано, що активність γ GCS в обох точкового і делеційного *gsh1/met1* мутантів була на рівні штама дикого типу (табл. 1), тоді як мутантний штам *Δgsh2* *H. polymorpha* з делецією гена, що кодує γ GCS, проявляв

Активність γ GCS (нмоль*год⁻¹*мг білка⁻¹) дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу та мутантних штамів в залежності від джерела сірки

Штам	Джерело сірки		
	SO ₄ ²⁻	GSH	Cys
NCYC495 <i>leu1-1</i>	281±12,6	291±11,2	262±9,17
<i>gsh1 leu1-1</i>	-	-	256±9,5
Δ <i>gsh1/met1 ade11</i>	-	-	342±13,7
Δ <i>gsh2 ade11</i>	-	44±0,4	-

Примітка. (-) – визначення не проводили

лише залишкові рівні γ GCS активності (див. табл. 1). Окрім цього, було з'ясовано, що активність γ GCS у дріжджів *H. polymorpha* не регулюється такими джерелами сірки як іони сульфату, цистеїн та GSH (див. табл. 1).

Також оцінено вплив мутації *gsh1* на ріст дріжджів *H. polymorpha* за присутності різних стресових факторів у порівнянні з штамом дикого типу, точковим та делеційним *gsh2* мутантами. Показано, що як точкові, так і делеційні, *gsh1* та *gsh2* мутанти були більш чутливими до метанолу, формальдегіду, органічного пероксиду та іонів кадмію, порівняно з штамом дикого типу. Оскільки, GSH відіграє центральну роль в оксидативній стресовій відповіді, можна припустити, що чутливий фенотип мутантів *gsh1/met1*, до вищезгаданих факторів, пов'язаний із порушенням біосинтезом цистеїну, і відповідно, GSH, а у випадку мутантів *gsh2* – з пошкодженням біосинтезом GSH. Оскільки, вбудовування сульфідів у комплекси Cd(GS)₂ у дріжджів *S. pombe* та *C. glabrata* суттєво підвищувало їх Cd-зв'язуючу здатність, а також підвищувало детоксикаційний ефект (Dameron et al., 1989; Hunter et al., 1998), ймовірна нестача утворення сульфідів у мутанта *gsh1/met1* може також вносити свій вклад у підвищену чутливість до кадмію. Обидва мутанти *gsh1* і Δ *gsh1/met1* також проявляли підвищену чутливість до іонів хромату, порівняно з мутантами *gsh2* та штамом дикого типу. Відомо, що аніони сульфату і хромату використовують спільну систему асиміляції для їх транспорту і подальшого відновлення в клітині (Pereira et al., 2008). Можна припустити, що підвищена чутливість мутантів *gsh1/met1* може бути пов'язана з надакумуляцією найтоксичнішого проміжного інтермедіату Cr(V) замість менш токсичної форми Cr³⁺ завдяки пошкодженню у сірогем-залежній сульфитредуктазній реакції.

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

Конструювання рекомбінантного штама CBS4732 *prGSH2-AOX H. polymorpha* та дослідження експресії гена *GSH2 H. polymorpha* у відповідь на дію іонів кадмію. Аналіз молекулярної організації промотора гена *GSH2 H. polymorpha* виявив ймовірні сайти зв'язування транскрипційних факторів Yap1, Skn7, Atf1 та Cbf1, що може передбачати складну регуляцію даного гена у відповідь на різні стресові фактори. В геномі *H. polymorpha* ідентифіковано гени, що кодують згадані транскрипційні фактори. Для зручного моніторингу експресії гена *GSH2 H. polymorpha* сконструйовано репортерну касету *prGSH2-AOX*, в якій регуляторна

ділянка гена *GSH2* розміром 1,832 т.п.н. злита зі структурною та термінаторною ділянками гена *AOX*. Репортерна касета, схема якої представлена на рис. 4, була трансформована у клітини *H. polymorpha* штамів NCYC495 *leu1-1* і CBS4732 *leu2-2*. Рекомбінантні штами CBS4732 *prGSH2-AOX* відбирали на мінімальному середовищі без лейцину і тестували на активність *AOX* в контрольних та кадмій-індукованих (50 мкМ, 4 год.) умовах. Відомо, що ген *AOX*, який експресується за наявності метанолу в середовищі, підлягає катаболітній репресії глюкозою та етанолом.

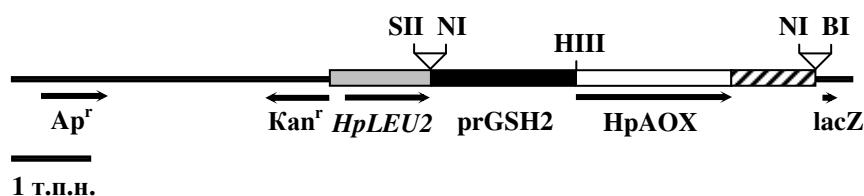


Рис. 4. Лінійна схема плазмиди *prGSH2-AOX*. Сайти рестрикції: SII, SacII; NI, NotI; HIII, HindIII; BI, BamHI

Особливістю сконструйованої касети *prGSH2-AOX* є здатність експресувати ген *AOX* за вирощування на середовищі з глюкозою чи етанолом, як єдиним джерелом вуглецю, тоді як нативний ген зарепресований. Показано, що іони кадмію призводять до незначних або відсутніх змін в експресії гена *GSH2* *H. polymorpha*, на відміну від сильної індукції експресії гомологічного гена *GSH1* *S. cerevisiae*. Отримані дані добре узгоджуються з результатами RT-PCR аналізу, які свідчать про відсутність змін в рівнях мРНК гена *GSH2* в нормі та за інкубації з іонами кадмію (Song MJ, Kang HA, неопубліковані дані). Висловлено припущення, що підвищення вмісту загального клітинного глутатіону за кадмієвого стресу у *H. polymorpha* ймовірно не контролюється на рівні транскрипції гена *GSH2*.

Дослідження взаємозв'язку між вмістом клітинного глутатіону, активністю γ -глутамілцистеїнсинтетази та чутливістю до іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. Показано, що генетична лінія NCYC495 характеризується найнижчим, а лінія DL-1 – найвищим рівнем клітинного глутатіону (рис. 5), що корелює з резистентністю до іонів кадмію. Однак, зростання рівнів

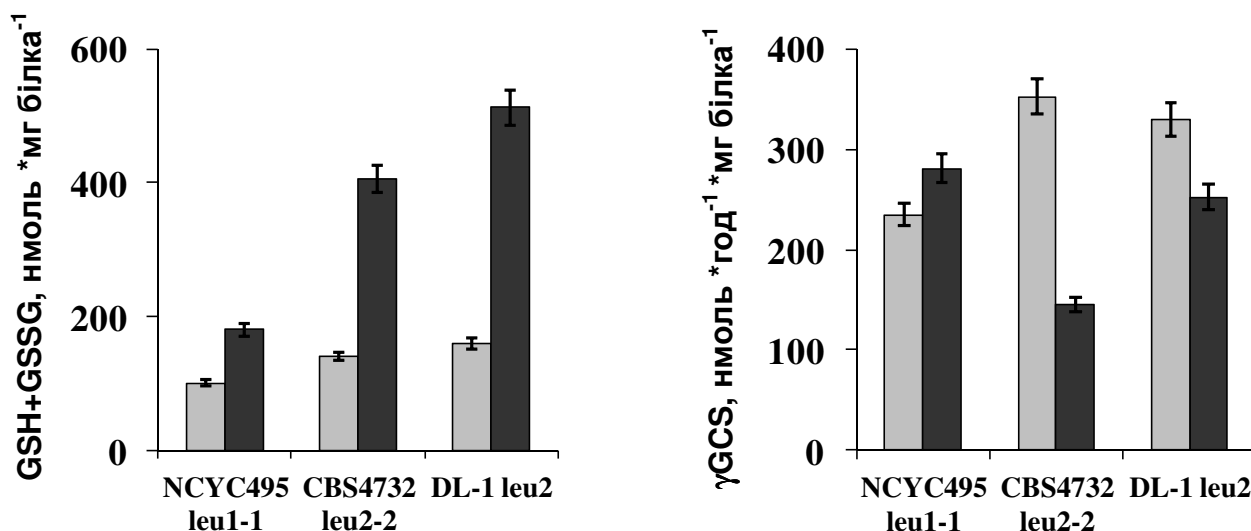


Рис. 5. Рівень клітинного GSH+GSSG та активність γ GCS у дріжджів *H. polymorpha* штамів дикого типу NCYC495 *leu1-1*, CBS4732 *leu2-2* і DL-1 *leu2* в залежності від фази росту: ■ логарифмічна фаза, ■ стаціонарна фаза

клітинного глутатіону у стаціонарній фазі росту, порівняно з логарифмічною фазою, не корелює із зростанням активності γ GCS (див. рис. 5), яку вважають лімітуючим ферментом у біосинтезі глутатіону.

Вивчення ролі γ -глутамілтрансферази у процесах метаболізму глутатіону та його кон'югатів у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. З метою вивчення процесу катаболізму глутатіону у клітинах дріжджів *H. polymorpha* геном цього виду дріжджів було проаналізовано на присутність гена, що кодує γ GT. На основі гомології до гена *CIS2/ECM38/YLR299w* *S. cerevisiae* виявлено два гени *HpGGT1* та *HpGGT2*. Порівняльний аналіз білкових послідовностей виявив суттєву подібність між γ GT1р *H. polymorpha* та Cis2р *S. cerevisiae* (43% ідентичності, 60% подібності), і незначну подібність між γ GT2р *H. polymorpha* та Cis2р *S. cerevisiae* (21% ідентичності, 38% подібності).

Отримання та фізіолого-біохімічний аналіз делеційного мутанта *Δggt1* *H. polymorpha*. Для конструювання мутантного алеля *Hpggt1::ScLEU2* кодууючу послідовність амінокислотних залишків (4-480) гена *GGT1* *H. polymorpha* замінили фрагментом ДНК, що містив ген *LEU2* *S. cerevisiae*. Сконструйовану плазмиду р Δ HpGGT1 (див. рис. 2, в) гідролізували по сайтах HindIII і SacI для вивільнення делеційної касети *Hpggt1::ScLEU2*, яку було трансформовано у штам *H. polymorpha* CBS4732 *leu2-2 ura3-20* методом електропорації. Селекцію Leu⁺ трансформантів проводили на мінімальному середовищі без лейцину. Коректне заміщення гена дикого типу на дизруптивний ген було підтверджено за допомогою ПЛР аналізу використовуючи праймери для дикого *HpGGT1* та мутантного *Hpggt1* генів. Показано, що активність γ GT 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 (табл. 2). У мутанта *Δggt1* активність γ GT суттєво знижена на всіх досліджуваних середовищах (див. табл. 2). Рісткові експерименти свідчать, що мутант *Δggt1*, так само як і штам дикого типу здатний утилізувати екзогенний GSH, як єдине джерело сірки (рис. 6, а,б). Таким чином, деградація GSH як екзогенного джерела сірки відбувається у γ GT-незалежний спосіб. Наявність в геномі *H. polymorpha* генів *DUG1*, *DUG2* і *DUG3* та високий

Таблиця 2

Ефект джерел сірки та азоту на активність γ GT (мкмоль*год⁻¹*мг білка⁻¹) дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу та мутанта *Δggt1*

Джерело поживної речовини		Штам	
		CBS4732 <i>leu2-2 ura3-20</i>	<i>Δggt1 ura3-20</i>
сірка	-S	0,23±0,01	0,003±0,001
	GSH	0,044±0,002	0,009±0,002
	SO ₄ ²⁻	0,048±0,003	0,011±0,002
азот	-N	0,069±0,005	0,009±0,002
	GSH	0,044±0,005	0,003±0,001
	NH ₄ ⁺	0,010±0,004	0,004±0,001
	Glu	0,043±0,004	0,015±0,001

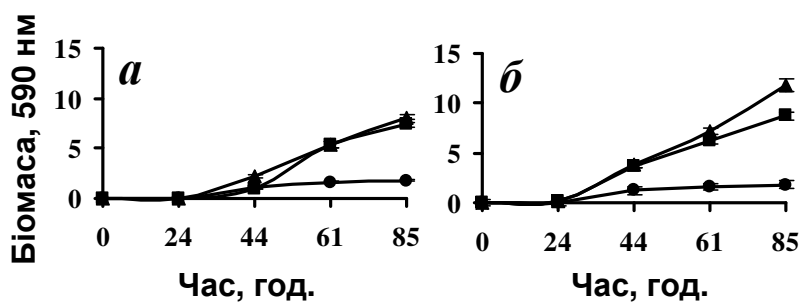


Рис. 6. Ріст дріжджів *H. polymorpha* штама дикого типу (а) та мутанта $\Delta ggt1$ (б) в залежності від джерела сірки: (а, б) сірко-дефіцитне NH_4^+ -вмісне середовище (кружечки), за присутності 0,1 мМ GSH (квадратики) або 26,5 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (трикутники)

сіркою з глутатіону. Дослідження чутливості до стресових факторів показало, що мутант $\Delta ggt1$ *H. polymorpha* більш чутливий до калькофлуору білого, агенту, що призводить до пертурбації полімерів клітинної поверхні, та органічного пероксиду, але не до іонів кадмію, етанолу, метанолу та формальдегіду.

Вивчення метаболізму флуоресцентних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*. З метою з'ясування можливих шляхів детоксикації електрофільних ксенобіотиків у дріжджів проведено флуоресцентно-мікроскопічне дослідження вакуолярної акумуляції флуоресціюючого GS-біман кон'югату та зникнення вакуолярної флуоресценції клітинами штамів дикого типу і мутантів $\Delta ggt1$ *H. polymorpha* та $\Delta cis2$ *S. cerevisiae* з відсутньою активністю γGT . Після 3 годин росту в середовищі з електрофілом монобромобіманом (3 год-0) вихідну GS-біман вакуолярну флуоресценцію спостерігали як у *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу, так і мутантів $\Delta ggt1$ та $\Delta cis2$ (рис. 7). Подальша стабільна GS-

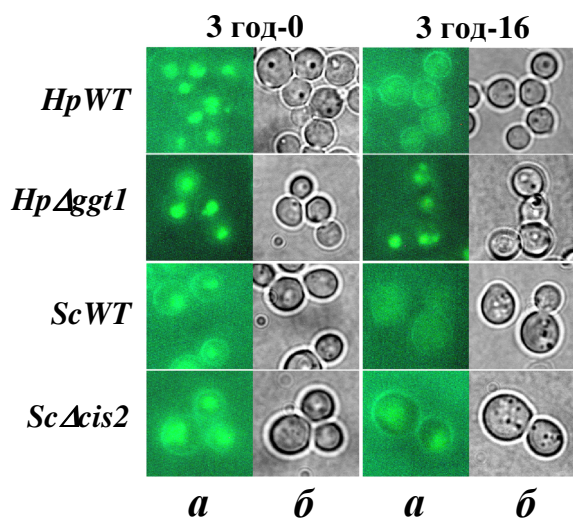


Рис. 7. Флуоресцентна (а) та фазово-контрастна (б) мікроскопія дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу (*HpWT*, *ScWT*) і мутантів з пошкодженою γGT (*HpΔggt1*, *ScΔcis2*)

ступінь подібності між білковими продуктами цих генів та гомологічними білками Dug1p, Dug2p і Dug3p з *S. cerevisiae* дає можливість припустити існування у дріжджів *H. polymorpha*, подібно до *S. cerevisiae* (Kumar et al., 2003; Ganguli D. et al., 2007), альтернативного γGT -незалежного шляху деградації GSH для забезпечення клітин

$\Delta cis2$ *S. cerevisiae* після 16 годин інкубації у Na-фосфатному буфері (3 год-16) на противагу до швидкого зникнення вакуолярної флуоресценції у *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу з дифузним розподілом флуоресценції у цитозоль (рис. 7). Висловлено припущення, що цитозольна флуоресценція в основному може бути представлена кон'югатами монобромобіману з тільними інтермедіатами шляху меркаптурових кислот: цистеїніл-гліцином, цистеїном і N-ацетилцистеїном. 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.

Вивчення транспорту електрофільних похідних з клітин дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae*. Дослідження зовнішньоклітинної екструзії похідних монобромобіману та N-[1-піреніл]малеїніміду проводили у зовнішньоклітинному середовищі дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* штамів дикого типу та мутантів $\Delta ggt1$ і $\Delta cis2$. Показано, що ВЕРХ пік, що відповідає цистеїн-біману відсутній у зовнішньоклітинному середовищі мутантів $\Delta ggt1$ *H. polymorpha* і $\Delta cis2$ *S. cerevisiae*, інкубованих впродовж 1-ї години у 0,1 М Na-фосфатному буфері і попередньо навантажених монобромобіманом протягом 3-ох годин, порівняно із зовнішньоклітинним середовищем штамів дикого типу (рис. 8, а). Висловлено припущення, що детектований цистеїн-біман кон'югат може бути ймовірним продуктом γ GT-залежної деградації GS-біману, який був видалений у зовнішньоклітинне середовище. Також не виявлено похідних цистеїн-N-[1-піреніл]малеїніміду і/або N-ацетилцистеїн-N-[1-піреніл]малеїніміду (обидва компоненти показують дуже подібний час затримки на ВЕРХ колонці) у зовнішньоклітинному середовищі клітин мутантів $\Delta ggt1$ *H. polymorpha* та $\Delta cis2$ *S.*

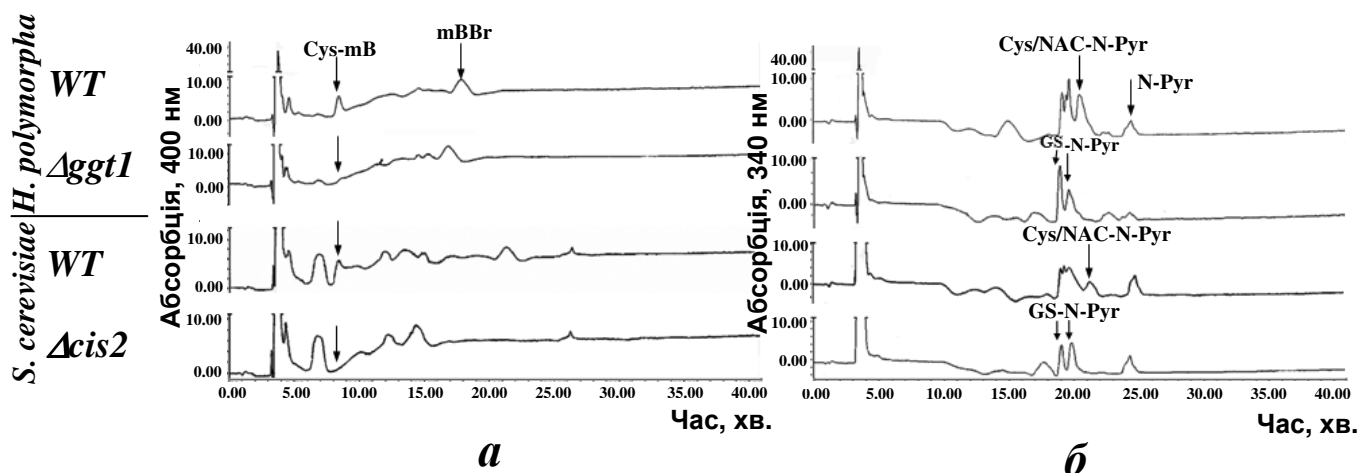


Рис. 8. ВЕРХ профілі зовнішньоклітинних похідних монобромобіману (mBBBr) (а) і N-[1-піреніл]малеїніміду (N-Pyr) (б), які експортуються клітинами дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*, штамів дикого типу (WT) і мутантів з пошкодженою γ GT (*HpΔggt1*, *ScΔcis2*). Клітини інкубували з 30 мкМ mBBBr або 20 мкМ N-Pyr впродовж 3-ох та 1-ї години, відповідно. Кон'югати цистеїну з mBBBr (Cys-mB) і глутатіону, цистеїну або N-ацетилцистеїну з N-Pyr (GS-N-Pyr, Cys/NAC-N-pyr), відповідно

cerevisiae, інкубованих впродовж 1 години з N-[1-піреніл]малеїнімідом, порівняно із зовнішньоклітинним середовищем штамів дикого типу. Очевидно, мутантні клітини здатні до екструзії лише кон'югатів GSH з N-[1-піреніл]малеїнімідом, на відміну від клітин штамів дикого типу, які можуть видаляти два типи кон'югатів (рис. 8, б). Можна припустити, що метаболізм електрофільних ксенобіотиків у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* здійснюється у γ GT-залежному шляху детоксикації ксенобіотиків з утворенням, як кінцевих продуктів, сполук типу цистеїн-ксенобіотик і/або N-ацетилцистеїн-ксенобіотик. Підсумовуючи варто зазначити, що нами вперше у дріжджів показано, що γ GT залучена у детоксикації електрофільних ксенобіотиків.

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

Ідентифікація специфічних хелаторів іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*. З метою ідентифікації специфічних хелаторів іонів кадмію у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*

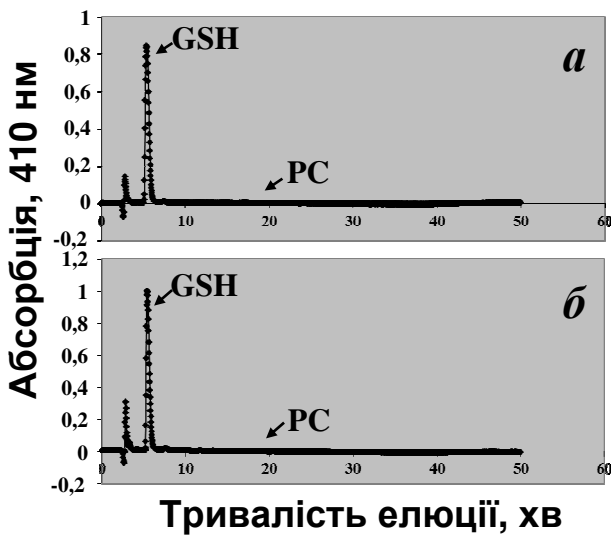


Рис. 9. ВЕРХ профілі SH-вмісних компонентів для клітин дріжджів *H. polymorpha*, штама дикого типу NCYC495 *leu1-1*, вирощеного у середовищі YNB з 1% глюкозою за контрольних (а) та кадмій-індукованих (0,1 мМ; 16 год.) умов (б)

клітини штамів дикого типу, трьох різних генетичних ліній, NCYC495, CBS4732 і DL-1 проаналізовано на здатність продукувати SH-вмісні компоненти після їх інкубації в середовищі без або з іонами кадмію. Встановлено, що на відміну від *S. pombe* та *C. glabrata* (Tomsett, 1993), дріжджі *H. polymorpha* не продукують фітохелатини (PC), 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.). Ці дані узгоджуються з відсутністю в геномі дріжджів *H. polymorpha* гена, що кодує фітохелатинсинтазу. Типові ВЕРХ профілі SH-вмісних компонентів з клітин *H. polymorpha* представлені на рис. 9.

Вивчення акумуляції іонів кадмію. Вміст іонів кадмію визначали у штамів дикого типу та рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*, інкубованих у середовищі без або з глюкозою, а також за додавання 1 мМ азиду натрію. Акумуляцію іонів кадмію вираховували як різницю абсорбції іонів кадмію клітинами, інкубованими з глюкозою (енергізовані клітини), і без джерела вуглецю (неенергізовані клітини). Встановлено, що внутрішньоклітинна акумуляція іонів кадмію у *H. polymorpha* є енергозалежним процесом (табл. 3). Абсорбція іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* є значно вищою, ніж у *S. cerevisiae* (див. табл. 3), особливо коли порівнювати клітини, що голодують за глюкозою. Це вказує на потенційну біотехнологічну важливість дріжджів *H. polymorpha* для сорбції іонів кадмію з розчинів, включаючи стічні води. Показано, що у *H. polymorpha* пошкодження біосинтезу GSH у мутантів $\Delta gsh2$ призводить до деякого підвищення акумуляції іонів кадмію, а пошкодження деградації GSH і/або його кон'югатів у мутанта $\Delta ggt1$ та шляхів асиміляції сульфату у мутанта $\Delta gsh1/met1$ і обох мутантів $\Delta met4$ *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* – до зниження енерго-залежної акумуляції іонів кадмію (див. табл. 3). Висловлено припущення, що поглинання іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* регулюється Cd-GSH комплексом, як це було показано для *S. cerevisiae* (Gomes et al., 2002), а гени *GSH1/MET1* і *MET4* залучені у дозрівання, тоді як ген *GGT1* – у метаболізм клітинного Cd-GSH комплексу. Узагальнену гіпотетичну схему детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у

Акумуляція іонів кадмію ($\text{мкг} \cdot \text{мг сухої ваги клітин}^{-1}$) штамами дикого типу та рекомбінантними штамами дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae*

Штам		Абсорбція іонів Cd^{2+} $\text{мкг} \cdot \text{мг сухої ваги клітин}^{-1}$		Акумуляція іонів Cd^{2+}
		+ГЛЮКОЗА	-ГЛЮКОЗА	
<i>HpWT</i>	NCYC495 <i>leu1-1</i> + NaN_3	-	$0,5 \pm 0,011$	-
	NCYC495 <i>leu1-1</i>	$1,45 \pm 0,131$	$1,2 \pm 0,085$	0,25
	CBS4732 <i>leu2-2</i>	$1,42 \pm 0,014$	$1,12 \pm 0,024$	0,3
	DL-1 <i>leu2</i>	$1,54 \pm 0,064$	$1,26 \pm 0,021$	0,28
<i>ScWT</i>	L3262-Y <i>ura3 his4</i>	$0,56 \pm 0,014$	$0,2 \pm 0,021$	0,36
<i>HpΔgsh2</i>	$\Delta gsh2$ NCYC495	$1,56 \pm 0,021$	$1,79 \pm 0,184$	-0,23
	$\Delta gsh2$ CBS4732	$1,2 \pm 0,134$	$0,86 \pm 0,028$	0,34
	$\Delta gsh2$ DL-1	$1,36 \pm 0,035$	$0,95 \pm 0,049$	0,41
<i>HpΔgsh1</i>	$\Delta gsh1$ NCYC495	$1,63 \pm 0,136$	$1,63 \pm 0,156$	0
	$\Delta gsh1$ CBS4732	$2,37 \pm 0,141$	$2,62 \pm 0,035$	-0,25
<i>HpΔggt1</i>	$\Delta ggt1$ CBS4732	$1,18 \pm 0,115$	$1,31 \pm 0,115$	-0,13
<i>HpΔmet4</i>	$\Delta met4$ DL-1	$0,22 \pm 0,014$	$0,13 \pm 0,007$	0,09
<i>HpmcMET4</i>	<i>mcMET4</i> DL-1	$0,39 \pm 0,014$	$0,27 \pm 0,007$	0,12
<i>HpmcGSH2</i>	<i>mcGSH2</i> DL-1	$0,26 \pm 0,007$	$0,42 \pm 0,021$	-0,16
<i>ScΔmet4</i>	$\Delta met4$ L3262-Y	$0,29 \pm 0,013$	$0,31 \pm 0,013$	-0,02

метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* представлено на рис. 10.

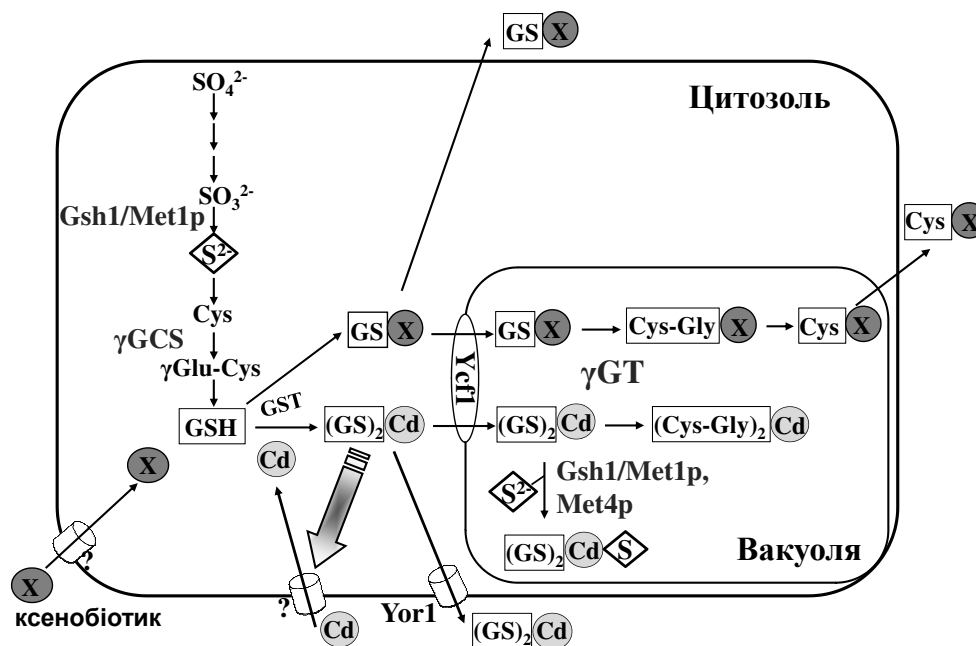


Рис. 10. Узагальнена гіпотетична схема детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* за участі білкових продуктів генів *GSH2*, *GGT1*, *GSH1/MET1* і *MET4*

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 γ GT-залежну детоксикацію електрофільних ксенобіотиків та механізми детоксикації кадмію у дріжджів *H. polymorpha*, 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 γ -глутамілцистеїнсинтетазу (γ GCS) та γ -глутамілтрансферазу (γ 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 γ GCS. Водночас, активність γ GT 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 γ GT залучена у детоксикації електрофільних ксенобіотиків. Однак, з'ясовано, що γ GT 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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* / O. V. Blazhenko, M. Zimmermann, H. A. Kang, G. Bartosz, M. J. Penninckx, V. M. Ubiyvovk, A. A. Sibirny // *Biometals*. – 2006. – V. 19, № 6. – P. 593–599. (Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь в отриманні матеріалу, експериментальній роботі та написанні статті).

2. Role of gamma-glutamyltranspeptidase in detoxification of xenobiotics in the yeasts *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* / V. M. Ubiyvovk, O. V.

Blazhenko, D. Gigot, M. Penninckx, A. A. Sibirny // *Cell Biol. Int.* – 2006. – V. 30, № 8. – P. 665–671. (Дисертант брав участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні статті. Дисертантом особисто отримано мутанти з делецією гена *GGT1* *H. polymorpha*).

3. 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, M. J. Sohn, H. A. Kang // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2011. – V. 83, № 5. – P. 67–81. (Дисертант опрацював дані літератури та власні результати, йому належить участь в отриманні матеріалу, експериментальній роботі та написанні статті. Дисертантом особисто отримано мутанти з делеціями генів *GSH1/MET1* і *GSH2* *H. polymorpha* та проведено їх молекулярно-генетичний і фізіолого-біохімічний аналіз).

4. 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. (Дисертант особисто отримав делеційні штами і дослідив їх властивості, провів аналіз літературних даних і власних результатів, написав та оформив статтю).

5. 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. (Дисертант отримав рекомбінантний штамп та дослідив його властивості, проаналізував і узагальнив джерела літератури та отримані дані, написав та оформив статтю).

6. Блаженко О. Делеція гена *MET4* знижує толерантність до іонів кадмію та їх акумуляцію у клітинах дріжджів *Hansenula polymorpha* і *Saccharomyces cerevisiae* / О. Блаженко // *Вісник Львів. Ун-ту, серія біологічна.* – 2014. – Вип. 64. – С. 200–205. (Дисертант здійснив фізіолого-біохімічні дослідження, проаналізував і узагальнив джерела літератури, експериментальні дані, написав та оформив статтю).

7. Biosynthesis of glutathione and resistance of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to heavy metals / V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko, O. G. Stasyk, O. Mahola A. A. Sibirny // 21st 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.

8. 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, L. Magola, A. A. Sibirny // *Bio-Forum II*, Lodz (Poland), May 10-11 2001. – Lodz (Poland), 2001. – P. 94–95.

9. Genetic control of glutathione metabolism in yeasts / A. A. Sibirny, V. M. Ubiyvovk, T. Y. Nazarko, O. G. Stasyk, O. V. Blazhenko, M. J. Sohn, H. A. Kang // 9-th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Gyeongju (Korea), 1-5 July 2002. – Gyeongju (Korea), 2002. – P. 84.

10. 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, A. Sibirny, M. J. Sohn, H. A. Kang // *The XXIst International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*, Gothenburg (Sweden), 7-12 July 2003. – Yeast, 2003. – P. 181.

11. 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, O. V. Stasyk, D. J. Maszewski, G. Bartosz, A. A. Sibirny // 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana (Slovenia), 29 June-3 July 2003. – Ljubljana (Slovenia), 2003. – P. 95.

12. 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, A. Sibirny, J. Maszewski, G. Bartosz, M. J. Sohn, H. A. Kang // First (Inaugural) Ukrainian Congress for Cell Biology, Lviv, 25-28 April 2004. – Lviv, 2004. – P. 45.

13. Functional Analysis of the *HpGSH2* gene Involved in Glutathione Biosynthesis in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 / V. Ubiyvovk, M. W. Kim, M. J. Sohn, S-J. Kim, C.-H. Kim, O. Blazhenko, A. Sibirny, S. K. Rhee, H. A. Kang // International Symposium, Daegu (Korea), 21-23 June 2004. – Daegu (Korea), 2004. – P. 33.

14. Ген *GGT1* *Hansenula polymorpha* кодируючий γ -глутамилтрансферазу вовлечен в детоксификацию ксенобиотиков и тяжелого металла кадмия / А. В. Блаженко, В. М. Убийвовк, М. Пеннинскс, Д. Жигот, А. А. Сибирный // 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.

15. Blazhenko O. V. Transcriptional regulation of the *Hansenula polymorpha* *GSH2* gene, encoding gamma-glutamylcysteine synthetase, in response to cadmium treatment / O. V. Blazhenko, A. V. 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.

16. Blazhenko O. V. Glutathione Deficiency Leads to Riboflavin Oversynthesis in the Yeast *Pichia guilliermondii* / O. V. Blazhenko, O. V. Levytska // 26-th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Frankfurt/Main (Germany), 29 August - 3 September 2013. – Yeast. – 2013. V. 30, № S1 – P. 234-235.

АНОТАЦІЯ

Блаженко О.В. Роль генів початкових етапів метаболізму глутатіону у захисті від стресу у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2015.

У дисертації ідентифіковано і з'ясовано роль генів *GSH1/MET1* і *GGT1* в початкових етапах метаболізму глутатіону (GSH) та його попередника, цистеїну; досліджено участь цих генів та генів *GSH2* і *MET4* у захисті від електрофільного і/або кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Шляхом функціональної комплементатії GSH-залежного фенотипу мутанта *gsh1* *H. polymorpha* клоновано ген *GSH1/MET1*, який виявився гомологом гена *MET1*

S. cerevisiae, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген (III) трансметилазу. Показано, що білок HpGsh1p/Met1p та такі джерела сірки як іони сульфату, цистеїн чи GSH не впливають на активність першого і лімітуючого фермента біосинтезу GSH, γ -глутамілцистеїнсинтетазу (γ GCS). Ідентифіковано ген *GGT1* *H. polymorpha*, що кодує γ -глутамілтрансферазу (γ GT). З'ясовано, що γ GT не ініціює деградацію GSH як екзогенного джерела сірки у *H. polymorpha*. Водночас, вперше у дріжджів показано, що γ GT залучена у деградацію кон'югатів GSH з електрофільними ксенобіотиками. Вивчення механізмів детоксикації кадмію показало, що дріжджі *H. polymorpha* не синтезують фітохелатини, але містять GSH, як основний хелатор іонів кадмію. Іони кадмію спричиняють лише незначні зміни в експресії гена *GSH2* *H. polymorpha*, що кодує γ GCS. З'ясовано, що акумуляція іонів кадмію у *H. polymorpha* є енергозалежним процесом. Висловлено припущення, що поглинання іонів кадмію у *H. polymorpha* регулюється Cd-GSH комплексом, а гени *GSH1/MET1* і *MET4* залучені у дозрівання, тоді як ген *GGT1* – у метаболізм клітинного Cd-GSH комплексу. Запропоновано гіпотетичну схему детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Ключові слова: глутатіон, метилотрофні дріжджі, *Hansenula polymorpha*, *GSH1/MET1*, *MET4*, γ -глутамілцистеїнсинтетаза, γ -глутамілтрансфераза, кадмій, електрофільні сполуки.

АННОТАЦІЯ

Блаженко А.В. Роль генів начальных етапов метаболізма глутатиона в защите от стресса у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

У диссертации идентифицировано и выяснено роль генів *GSH1/MET1* и *GGT1* в начальных этапах метаболізма глутатиона (GSH) и его предшественника, цистеина; исследовано участие этих генів и генів *GSH2* и *MET4* в защите от электрофильного и/или кадмиевого стресса у метилотрофных дрожжей *H. polymorpha*.

Путём функциональной комплементации GSH-зависимого фенотипа мутанта *gsh1* *H. polymorpha* клонирован ген *HpGSH1/MET1*, который оказался гомологом гена *MET1* *S. cerevisiae*, кодирующего S-аденозил-L-метионин уропорфириноген III трансметилазу. Показано, что белок HpGsh1p/Met1p и такие источники серы как ионы сульфата, цистеин или GSH не влияют на активность первого и лимитирующего фермента биосинтеза GSH, γ -глутамілцистеїнсинтетазу (γ GCS). Ідентифіковано ген *GGT1* *H. polymorpha*, що кодує γ -глутамілтрансферазу (γ GT). Вияснено, що γ GT не ініціює деградацію GSH як екзогенного джерела сери у *H. polymorpha*. В то же время, впервые у дрожжей показано, что γ GT вовлечена у деградацію кон'югатів GSH с електрофільними ксенобіотиками. Изучение механизмов детоксикации кадмия показало, что дрожжи *H. polymorpha* не синтезируют фітохелатини, но содержат GSH, как главный хелатор ионов кадмия.

Ионы кадмия вызывают только незначительные изменения в экспрессии гена *GSH2* *H. polymorpha*, что кодирует γ GCS. Выяснено, что аккумуляция ионов кадмия у *H. polymorpha* является энергозависимым процессом. Высказано предположение, что поглощение ионов кадмия у *H. polymorpha* регулируется Cd-GSH комплексом, а гены *GSH1/MET1* и *MET4* вовлечены в созревание, тогда как ген *GGT1* – у метаболизм клеточного Cd-GSH комплекса. Предложено гипотетическую схему детоксикации кадмия и электрофильных ксенобиотиков у метилотрофных дрожжей *H. polymorpha*.

Ключевые слова: глутатион, метилотрофные дрожжи, *Hansenula polymorpha*, *GSH1/MET1*, *MET4*, γ -глутамилцистеинсинтетаза, γ -глутамилтрансфераза, кадмий, электрофильные соединения.

SUMMARY

Blazhenko O.V. The role of initial-stage glutathione metabolism genes in the defense against stress in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* – Manuscript.

Thesis for a Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology by speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Science of Ukraine, Kiev, 2015.

First the thesis describes identification and elucidation of the role of *GSH1/MET1* and *GGT1* genes in initial metabolism stages of glutathione (GSH) and its precursor, cysteine; second it describes participation of these genes as well as *GSH2* and *MET4* genes in the defence against electrophilic and/or cadmium stress in the methylotrophic yeast *H. polymorpha*.

The *HpGSH1/MET1* gene complementing GSH-deficient phenotype (i.e., the growth on minimal GSH-deficient medium, normal glutathione level, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine sensitivity, and cadmium resistance) of *H. polymorpha gsh1* mutant was cloned and characterized. It was shown that the *H. polymorpha GSH1/MET1* gene has homology to *S. cerevisiae MET1* gene encoding S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase, which is responsible for the biosynthesis of sulfite reductase cofactor, sirohaem. A mutant with the deleted *GSH1/MET1* gene was constructed. It was observed that the *H. polymorpha Δ gsh1/met1* mutant restores its growth and partially restores its cellular glutathione content in synthetic medium supplemented with cysteine or GSH as a sole sulfur source, but not with methionine or S-adenosylmethionine or inorganic (sulfate, sulfite) sources of sulfur. Besides, *Δ gsh1/met1* mutant, similarly to point *gsh1* mutant, displays increased sensitivity to methanol, formaldehyde, organic peroxide, cadmium, and chromium ions. It was shown that *H. polymorpha GSH1/MET1* gene complements *met1* mutation of *S. cerevisiae* regarding the growth on sulfate as a sole sulfur source. Bioinformatical analysis of HpGsh1p/Met1p protein in addition to tetrapyrrole methylase and uroporphyrinogen III methyltransferase motifs revealed the unique “coiled-coil” structure. This suggests that HpGsh1p/Met1p protein could be involved not only in sirohaem-dependent sulfate assimilation and cysteine supply for GSH biosynthesis, but could fulfill some regulatory role. It is generally accepted that the regulation of GSH biosynthesis occurs at the first step, which in *H.*

polymorpha is controlled by *GSH2* gene encoding γ -glutamylcysteine synthetase (γ GCS). The effect of different sulfur sources and the HpGsh1p/Met1p protein on γ GCS activity was estimated. It was shown that γ GCS activity is not impaired in *H. polymorpha* point *gsh1* and Δ *gsh1/met1* mutants and does not depend on such sources of sulfur as sulfate ions, cysteine, or GSH. Besides, it was found that γ GCS activity does not correlate with the increased cellular glutathione content in *H. polymorpha* wild type strains of different genetic lines.

It was established that *H. polymorpha* *GGT1* gene appears to be a homologue of *S. cerevisiae* *CIS2/ECM38* gene encoding γ -glutamyltransferase (γ GT). Obtained Δ *ggt1* mutant is impaired in γ GT activity. It was shown that γ GT activity in *H. polymorpha* is regulated by nitrogen and sulfur sources. The highest γ GT values were observed under sulfur and nitrogen starvation, and the lowest value was observed in the presence of ammonium ions. Utilization of GSH as an exogenous sulfur source is not initiated by γ GT in *H. polymorpha*. However, it has been found for the first time in yeasts that γ GT is involved in detoxification of electrophilic xenobiotics (monobromobimane and N-[1-pyrene]maleimide). It was hypothesized that metabolism of electrophilic xenobiotics in the yeasts *H. polymorpha* and *S. cerevisiae* occurs through γ GT-dependent pathway of GSH-xenobiotic detoxification with cysteine-xenobiotic and/or N-acetylcysteine-xenobiotic formation as the end products.

The elucidation of the molecular mechanisms of cadmium detoxification in yeast *H. polymorpha* reveals that this yeast produces only one type of cadmium intracellular chelators, glutathione, which suggests that sequestration of this heavy metal occurs differently than in *S. pombe* and *C. glabrata*, which both synthesize phytochelatins. To estimate the effect of cadmium ions on the expression of *H. polymorpha* *GSH2* gene, encoding γ GCS, a recombinant strain was constructed, harbouring a reporter system, in which *GSH2* gene promoter fused to structural and terminal regions of alcohol oxidase gene. It was observed that cadmium ions cause minor changes in the expression of *H. polymorpha* *GSH2* gene, in contrast to the strong induction of expression of homological *GSH1* gene of *S. cerevisiae*. The yeast *H. polymorpha* was also studied for intracellular cadmium ion accumulation. Cadmium ion uptake in *H. polymorpha* appeared to be an energy dependent process. It was found that impairment of the first step of GSH biosynthesis in Δ *gsh2* mutants leads to elevated cadmium ion uptake into the cells, while impairment of sulfate assimilation in Δ *gsh1/met1* and Δ *met4* mutants and of GSH catabolism or its conjugates in Δ *ggt1* mutant results in inability of intracellular cadmium ion accumulation. Apparently *H. polymorpha*, similarly to *S. cerevisiae*, forms a Cd-GSH complex in cytoplasm, which in turn regulates cadmium uptake. It was hypothesized that *H. polymorpha* *GSH1/MET1* and *MET4* genes are involved in maturation, while *GGT1* gene is involved in metabolism of cellular Cd-GSH complex. A hypothetical scheme of cadmium and electrophilic xenobiotics detoxification in the methylotrophic yeast *H. polymorpha* was proposed.

Key words: glutathione, methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*, *GSH1/MET1*, *MET4*, γ -glutamylcysteine synthetase, γ -glutamyltransferase, cadmium, electrophilic compounds.