

**ДЕЛЕЦІЯ ГЕНА *MET4* ЗНИЖУЄ ТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ІОНІВ КАДМІЮ
ТА ЇХ АКУМУЛЯЦІЮ У КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*
І *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

О. Блаженко

*Інститут біології IV – Мікробіологія і генетика – RWTH Аахен
Воррінгервег, 1, Аахен D-52056, Німеччина
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com*

Досліджено участь центрального регуляторного гена метаболізму сірки *MET4* у внутрішньоклітинній акумуляції іонів кадмію та у забезпеченні толерантності до іонів кадмію. Показано, що делеція гена *MET4 Hansenula polymorpha* підвищує чутливість мутанта $\Delta met4$ до іонів кадмію, тоді як надекспресія даного гена у трансформанта *mcMET4* підвищує його резистентність до кадмію. Дослідження акумуляції іонів кадмію виявило, що трансформант *mcGSH2 H. polymorpha* з надекспресією гена першого етапу біосинтезу глутатіону й обидва мутанти $\Delta met4$ дріжджів *H. polymorpha* та *Saccharomyces cerevisiae* проявляли знижену глюкозозалежну адсорбцію іонів кадмію порівняно з відповідними штамми дикого типу. Висловлено припущення, що ген *MET4* залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу, який, у свою чергу, регулює поглинання іонів кадмію.

Ключові слова: MET4, кадмій, Hansenula polymorpha, Saccharomyces cerevisiae.

Приблизно 13 000 тонн кадмію виробляється щорічно у світі для нікель-кадмієвих батарей, пігментів, хімічних стабілізаторів, покриття і сплавів металів [21]. Він є побічним продуктом видобування і виплавки цинку та свинцю. У минулому столітті різко зросла емісія кадмію, однією з причин чого є кадмійвмісні продукти, які рідко рециркулюють і часто викидаються з домашнім сміттям [15]. Незважаючи на те, що кадмій не потрібен для нормального метаболізму клітини, він дуже швидко поглинається коренями рослин, а це призводить до його акумуляції у продуктах харчування з потенційною загрозою здоров'ю людини [9]. Цигарковий дим також є джерелом поширення кадмію [18]. Щоб подолати токсичні ефекти кадмію, живі організми повинні суворо обмежувати надходження іонів кадмію в клітину або виробити механізми контролю його внутрішньоклітинного рівня. Ключовим механізмом детоксикації кадмію у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* є хелатування іонів кадмію за участю глутатіону з утворенням комплексів Cd-GSH, які надалі транспортуються у вакуолю за допомогою транспортерів ABC типу Ycf1 та Bpt1 [17, 16] або назовні клітини за участю білка Yor1 [12]. Наявність комплексу Cd-GSH у цитозолі контролює поглинання кадмію у клітину [13]. Відповідно, чим вища концентрація комплексу в цитоплазмі, тим нижча абсорбція кадмію, і навпаки. Вважають, що ізоформа Gtt2 глутатіон-S-трансферази залучена у формуванні комплексу Cd-GSH у дріжджів *S. cerevisiae* [1], тоді як γ -глутамілтрансфераза й амінопептидаза Lar4 залучені у його вакуолярній деградації [2, 3]. Значні кількості глутатіону, необхідні для забезпечення толерантності до кадмію у дріжджів *S. cerevisiae*, досягаються за рахунок зниження утилізації сірки для синтезу білків, посиленого відтоку сірки в глутатіоновий шлях, неосинтезу ферментів сіркового шляху та зниження деградації глутатіону [7, 22]. Ключову роль у відповіді на кадмієвий стрес відіграє глобальний регулятор сіркового метаболізму білок Met4 *S. cerevisiae*. Активність даного транскрипційного фактора регулюється убіквітинуванням і залежить від сіркового статусу клітини. Однак дія іонів кадмію пошкоджує як залежне, так і неза-

лежне від деградації Met4 убіквітинування, шляхом дисоціації Met30 з кору SCF комплексу [6, 24], що, у свою чергу, призводить до індукції експресії генів асиміляції сульфату, сірко-вмісних амінокислот і біосинтезу глутатіону. Толерантність до іонів кадмію у *S. cerevisiae* також підтримується транскрипційним фактором Yap1, який позитивно регулює експресію гена *YCF1*, а також генів *GSH1* і *GLR1*, що кодують g-глутамілцистеїнсинтетазу (γ GCS) і глутатіонредуктазу, відповідно [23]. Подібно до білка Met4 *S. cerevisiae*, Zip1 є основним фактором, необхідним для транскрипційної відповіді дріжджів *Schizosaccharomyces pombe* на кадмієвий стрес. Клітини мутанта *zip1 S. pombe* виявляють надмірну чутливість до кадмію, подібно до кадмій-чутливих мутантів Δ met4 *S. cerevisiae* [6, 14, 24]. У відповідь на дію іонів кадмію *S. pombe* продукує суттєво підвищені рівні неорганічного сульфідру для іммобілізації клітинного кадмію у формі нанокристалів CdS, хелатованих глутатіоном і/або фітохелатинами [5]. Показано, що всі три компоненти, GSH, полімерні похідні глутатіону, фітохелатини та неорганічний сульфід (S^{2-}) є важливими для високої толерантності до кадмію у *S. pombe*, оскільки мутанти, які потребували хоча б одного з трьох компонентів, виявляли значно підвищену чутливість до іонів кадмію, порівняно з диким типом [4, 10, 19].

У наших попередніх дослідженнях було показано, що мутанти *Agsh2 Hansenula polymorpha* з пошкодженням першого етапу біосинтезу глутатіону характеризувалися підвищенням акумуляції іонів кадмію, в той час як мутанти *Agsh1/met1* і *Aggt1 H. polymorpha* з пошкодженням асиміляції сульфату і деградації глутатіону відповідно, втрачали здатність до внутрішньоклітинної акумуляції іонів кадмію [8].

Метою даної роботи було дослідити участь центрального регуляторного гена метаболізму сірки *MET4* у внутрішньоклітинній акумуляції іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* та у забезпеченні толерантності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*.

Матеріали та методи

Штами дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae*, використані у даній роботі, представлені у табл. 1 і походять з колекції проф. Н. А. Kang (Корейський Дослідний Інститут Біологічних наук і Біотехнології, м. Даеджон, Корея). Клітини дріжджів вирощували за температури 28°C у багатому середовищі YPD (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) та мінеральному середовищі YNB (0,67% дріжджова азотиста основа, 0,5% $(NH_4)_2SO_4$ і 1-2% глюкоза). Згідно з ауксотрофними потребами штамів, до 1 л ростового середовища було додано 79 мг урацилу, 150 мг гістидину та 80 мг триптофану. Агаризовані середовища містили 2% агар. Вміст іонів кадмію визначали на полумінемовому атомному абсорбційному спектрофотометрі (Perkin-Elmer 1100B) при 228 нм, як попередньо описано в роботі [8]. Акумуляцію іонів кадмію вираховували як різницю сорбції іонів кадмію клітинами, інкубованими з глюкозою (клітини забезпечені енергією) і без джерела вуглецю (клітини не забезпечені енергією), на мг сухої ваги.

Таблиця 1

Штами дріжджів *H. polymorpha* (*Hp*) та *S. cerevisiae* (*Sc*), використані у цій роботі

Позначення	Генотип
Штами дикого типу (<i>WT</i>)	
<i>HpWT</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2::HpLEU2</i> (pGLG61)
<i>ScWT</i>	L3262-Y <i>MATa, ura3-52, 112 his4-34, leu2::ScLEU2</i> (YEр351)
Мутантні штами	
<i>HpΔmet4</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2, Δmet4::LEU2</i>
<i>ScΔmet4</i>	L3262-4 <i>MATa, ura3-52, leu2-3, 112 his4-34, Δmet4::ScLEU2</i>
Мультикопійні трансформанти	
<i>HpmcMET4</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2::mcMET4::HpLEU2</i> (pGLG61- <i>HpMET4</i>)
<i>HpmcGSH2</i>	DL-1 <i>Aura3, Atrp1::URA3, leu2::mcGSH2_{CBS}::HpLEU2</i> (pGLG61- <i>HpGSH2</i>)

Результати і їхнє обговорення

Попередньо нами було показано, що акумуляція іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* залежить від метаболізму внутрішньо- та зовнішньоклітинних джерел енергії, в тому числі глюкози [8]. Вміст іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* визначали в клітинах, інкубованих у середовищі без або з глюкозою. Відомо, що у *S. cerevisiae* поглинання іонів кадмію в клітину регулюється наявністю комплексу Cd-GSH в цитоплазмі, який запобігає наакумуляції металу [13]. Очевидно, подібна регуляція акумуляції іонів кадмію Cd-GSH комплексом спостерігається й у дріжджів *H. polymorpha*, оскільки GSH-дефіцитні мутанти *Agsh2* з пошкодженням першого ферменту біосинтезу глутатіону γ GCS характеризувалися наакумуляцією іонів кадмію в клітини [8]. У цій роботі показано, що трансформант *mcGSH2 H. polymorpha*, що містив додаткові копії гена *GSH2*, який кодує γ GCS, демонстрував сильно знижену акумуляцію іонів кадмію, порівняно зі штамом дикого типу (табл. 2). Наявність додаткових копій гена *GSH2* у даного трансформанта зумовлює суттєве підвищення рівнів внутрішньоклітинного глутатіону, порівняно зі штамом дикого типу [20]. Відтак сильне зниження акумуляції іонів кадмію у мультикопійного трансформанта *mcGSH2* може бути наслідком зростання концентрації Cd-GSH комплексу в клітині.

Таблиця 2

Акумуляція іонів кадмію штамми дикого типу та рекомбінантними штамми дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* залежно від присутності глюкози

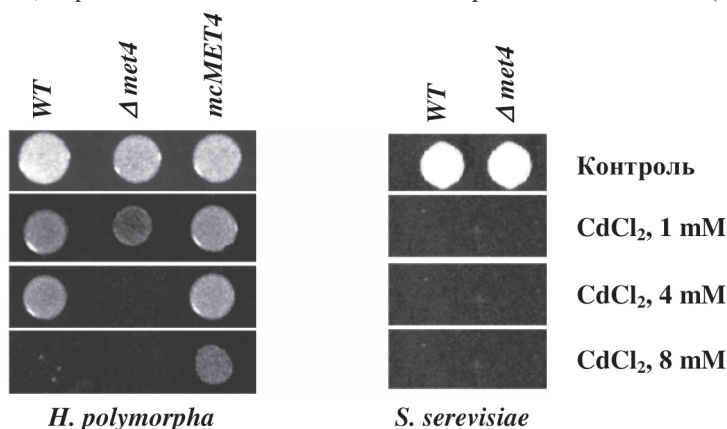
Штами	Cd ²⁺ , мкг мг сухої ваги ⁻¹		
	Cd _{glc}	Cd _{w/o glc}	Cd _{glc} - Cd _{w/o glc}
<i>HpWT</i>	0,32	0,15	0,17
<i>HpΔmet4</i>	0,22	0,13	0,09
<i>HpmcMET4</i>	0,39	0,27	0,12
<i>HpmcGSH2</i>	0,26	0,42	-0,16
<i>ScWT</i>	0,56	0,2	0,36
<i>ScΔmet4</i>	0,29	0,31	-0,02

Примітки. Cd_{glc} – акумуляція іонів кадмію в середовищі з глюкозою (2%); Cd_{w/o glc} – без глюкози.

Дослідження акумуляції кадмію у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* із делецією транскрипційного регулятора шляху асиміляції сірки, білка Met4, показало, що обидва мутанти характеризувалися зниженням глюкозозалежної адсорбції іонів кадмію, порівняно з відповідними штамми дикого типу (див. табл. 2). Дані результати добре узгоджуються з попередньо отриманими даними для мутанта *Agsh1/met1 H. polymorpha* з пошкодженням шляху асиміляції сульфату, який також проявляв знижену акумуляцію іонів кадмію [8]. Оскільки у дріжджів *S. pombe* і *C. glabrata* комплекс Cd-GSH може включати S²⁻ іони, утворюючи CdS-GSH нанокристали, що посилює детоксикаційний ефект [5, 11], висловлено припущення, що ген *MET4*, подібно до гена *GSH1/MET1*, залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу і в цей спосіб також регулює поглинання іонів кадмію. Водночас, надекспресія гена *MET4 H. polymorpha* призводила лише до часткового відновлення акумуляції іонів кадмію трансформантом *mcMET4* (табл. 2), що можна пояснити підвищеним внутрішньоклітинним рівнем глутатіону у даного трансформанта [20] і відповідно зростанням концентрації Cd-GSH комплексу в клітині.

Також було досліджено толерантність рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* з делецією та надекспресією гена *MET4* до іонів кадмію. Показано, що мутант *Δmet4 H. polymorpha*, подібно до мутанта *Δmet4 S. cerevisiae* [6], більш чутливий до іонів кадмію, порівняно зі штамом дикого типу (рис. 1). Поряд із цим штам *H. polymorpha*, що

містив додаткові копії гена *MET4*, проявляв підвищену резистентність до іонів кадмію, порівняно з відповідним мутантом $\Delta met4$ і штамом дикого типу (див. рис. 1). 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* проявляли значно вищу толерантність до іонів кадмію, порівняно з відповідними штамми дріжджів *S. cerevisiae* (див. рисунок).



Чутливість штамів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* дикого типу (*WT*) й мутантів $\Delta met4$ і мультикопійного трансформанта *mcMET4* до різних концентрацій іонів кадмію (0–8 mM) у середовищі YNB за наявності 0,1 mM метіоніну і 0,1 mM глутатіону. Клітини дріжджів були вирощені у YPD середовищі протягом ночі, відмиті водою та доведені до OD₅₉₀ 0,3 перед нанесенням 4 мкл суспензії клітин на чашки. Ріст оцінювали на четвертий день інкубації за температури 28°C.

Таким чином, у результаті проведених досліджень показано, що ген *MET4* залучений у підтриманні резистентності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*. З'ясовано, що мультикопійні трансформанти дріжджів *H. polymorpha* з надекспресією генів *GSH2* та *MET4*, а також мутанти $\Delta met4$ дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* характеризувалися зниженою акумуляцією іонів кадмію порівняно з відповідними штамми дикого типу. Висловлено припущення, що ген *MET4* залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу.

Автор висловлює подяку Dr. M. Zimmermann за технічну підтримку та за надану можливість проводити дослідження на базі Інституту біології IV- Мікробіологія і генетика - університету RWTH Аахен, а також проф. H.A. Kang і к.б.н. В.М. Убийвовк за надані штами дріжджів. Дана робота була виконана за підтримки NATO Collaborative Linkage Grant LST.CLG 979872.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adamis P. D. B., Gomes D. S., Pinto M. L. C. C. et al. Role of glutathione transferases in cadmium stress // *Toxicol. Lett.* 2004. Vol. 154. P. 81–88.
2. Adamis P. D. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis // *Toxicol. Lett.* 2007. Vol. 173. P. 1–7.
3. Adamis P. D., Mannarino S. C., Riger C. J. et al. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism // *Biometals.* 2009. Vol. 22. N 2. P. 243–249.
4. Al-Lahham A., Rohde V., Heim P. et al. Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: A second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe* // *Yeast.* 1999. Vol. 15. P. 385–396.

5. Bae W., Chen X. Proteomic Study for the Cellular Responses to Cd²⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* Through Amino Acid-coded Mass Tagging and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry // Mol. Cell. Proteomics. 2004. Vol. 3. P. 596–607.
6. Barbey R., Baudouin-Cornu P., Lee T. A. et al. Inducible dissociation of SCF^{Met30} ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium // EMBO J. 2005. Vol. 24. P. 521–532.
7. Baudouin-Cornu P., Lagniel G., Kumar C. et al. Glutathione Degradation Is a Key Determinant of Glutathione // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. N 7. P. 4552–4561.
8. Blazhenko O. V., Zimmermann M., Kang H. A. et al. Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Biometals. 2006. Vol. 19. N 6. P. 593–599.
9. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochimie. 2006. Vol. 88. P. 1707–1719.
10. Coblenz A., Wolf K. The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // FEMS Microbiol. Rev. 1994. Vol. 14. P. 303–308.
11. Dameron C. T., Reese R. N., Mehra R. K. et al. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites // Nature. 1989. Vol. 338. P. 596–597.
12. Diffels J. F., Seret M.-L., Goffeau A. et al. Heavy metal transporters in Hemiascomycete yeasts // Biochimie. 2006. Vol. 88. P. 1639–1649.
13. Gomes D. S., Fragoso L. C., Riger C. J. et al. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1573. P. 21–25.
14. Harrison C., Katayama S., Dhut S. et al. SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast // EMBO J. 2005. Vol. 24. P. 599–610.
15. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination // Br. Med. Bull. 2003. Vol. 68. P. 167–182.
16. Klein M., Mamnun Y. M., Eggmann T. et al. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast // FEBS Letters. 2002. Vol. 520. P. 63–67.
17. Li Z. S., Lu Y. P., Zhen R. G. et al. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1 -catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 90. P. 42–47.
18. Satarug S., Moore M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke // Environ. Health Perspect. 2004. Vol. 112. P. 1099–1103.
19. Speiser D. M., Ortiz D. F., Kreppel L. et al. Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* // Mol. Cell. Biol. 1992. Vol. 12. P. 5301–5310.
20. Ubiyvovk V. M., Ananin V. M., Malyshev A. Y. et al. 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 // BMC Biotechnol. 2011. Vol. 11 N 8. doi: 10.1186/1472-6750-11-8.
21. Valko M., Morris H., Cronin M. T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr Med Chem. 2005. Vol. 12. N 10. P. 1161–1208.
22. Vido K., Spector D., Lagniel G. et al. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 8469–8474.
23. Wemmie J. A., Szczycka M. S., Thiele D. J., Moye-Rowley W. S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1 // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. N 51. P. 32592–32597.
24. Yen J. L., Su N.-Y., Kaiser P. The Yeast Ubiquitin Ligase SCF^{Met30} Regulates Heavy Metal Response // Mol. Biol. Cell. 2005. Vol. 16. P. 1872–1882.

Стаття: надійшла до редакції 05.09.13

доопрацьована 07.10.13

прийнята до друку 15.10.13

**DELETION OF *MET4* GENE DECREASES TOLERANCE TO CADMIUM IONS
AND THEIR ACCUMULATION IN YEAST CELLS OF *HANSENULA POLYMORPHA*
AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

O. Blazhenko

*Institute of Biology IV – Microbiology and Genetics RWTH Aachen
1, Worringerweg, Aachen D-52056, Germany
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com*

The participation of the central regulatory gene of sulfur metabolism, *MET4*, in intracellular cadmium ion accumulation and in maintenance of cadmium ion tolerance was examined. It was shown that deletion of *Hansenula polymorpha MET4* gene increased sensitivity of $\Delta met4$ mutant to cadmium ions, while overexpression of this gene in *mcMET4* transformant increased its resistance to cadmium. Cadmium ion accumulation study revealed that *H. polymorpha mcGSH2* transformant, with overexpressed gene of the first step of glutathione biosynthesis, and both $\Delta met4$ mutants of yeasts *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* exhibited decreased glucose-dependent absorption of cadmium ions, compared to the correspondent wild type strains. It was hypothesized that *MET4* gene is involved in maturation of cellular Cd-GSH complex, which in turn regulates cadmium ion uptake.

Keywords: MET4, cadmium, Hansenula polymorpha, Saccharomyces cerevisiae.

**ДЕЛЕЦИЯ ГЕНА *MET4* СНИЖАЕТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИОНАМ КАДМИЯ
И ИХ АККУМУЛЯЦИЮ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*
И *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

А. Блаженко

*Институт биологии IV – Микробиология и генетика – RWTH Аахен
Воррингервег, 1, Аахен D-52056, Германия
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com*

Исследовано участие центрального регуляторного гена метаболизма серы *MET4* во внутриклеточной аккумуляции ионов кадмия и в обеспечении толерантности к ионам кадмия. Показано, что делеция гена *MET4 Hansenula polymorpha* повышает чувствительность мутанта $\Delta met4$ к ионам кадмия, тогда как сверхэкспрессия этого гена у трансформанта *mcMET4* повышает его резистентность к кадмию. Исследование аккумуляции ионов кадмия обнаружило, что трансформант *mcGSH2 H. polymorpha*, со сверхэкспрессией гена первого этапа биосинтеза глутатиона, и оба мутанта $\Delta met4$ дрожжей *H. polymorpha* и *Saccharomyces cerevisiae* проявляли пониженную глюкозозависимую адсорбцию ионов кадмия, по сравнению с соответствующими штаммами дикого типа. Высказано предположение, что ген *MET4* вовлечен в созревание клеточного Cd-GSH комплекса, который, в свою очередь, регулирует поглощение ионов кадмия.

Ключевые слова: MET4, кадмий, Hansenula polymorpha, Saccharomyces cerevisiae.