

Селен і дріжджі. Генетичні механізми толерантності дріжджів до сполук селену та їхніх аналогів

М. М. Стенчук¹, Л. Б. Чабан^{1, 2}, М. В. Гончар^{1, 2}

¹ Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

² Львівський національний університет імені Івана Франка
Вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

E. mail: gonchar@biochem.lviv.ua

*Селен (Se) і його сполуки проявляють токсичну і канцерогенну дію на організми людини і тварин, а в малих кількостях цей мікроелемент відіграє суттєву роль для живих істот. Тому важливо встановити молекулярні основи токсичності Se і резистентності клітин до нього. Значну кількість досліджень зазначеної проблеми здійснено на бактеріях. Можливість використання молекулярно-генетичних методів зробила дріжджі (в основному *Saccharomyces cerevisiae*) зручною модельною системою для вивчення механізмів резистентності еукаріотних клітин до селену на молекулярному рівні. Виходячи з цього в огляді підсумовано дані, особливо генетичні, щодо механізмів чутливості/резистентності дріжджів до селенових сполук.*

Ключові слова: дріжджі, селен, толерантність.

Вступ. Селен є життєво необхідним мікроелементом для більшості організмів — від бактерій і водоростей до ссавців. Хоча відкритий він Берцеліусом ще у 1817 році, визнання його як важливого мікроелемента відбулося лише в 1957 році, а до цього основним предметом дослідження була токсичність цього елемента. Вивчення ролі селену в біології, медицині і ветеринарії є яскравим прикладом тісного взаємозв'язку фундаментальних і прикладних досліджень. Селен — елемент VI групи періодичної системи, проявляє як металічні, так і неметалічні властивості. Він утворює сполуки (неорганічні і органічні), аналогічні таким сірки: селеніт (SeO_3^{2-}), селенат (SeO_4^{2-}), селеніди, селенометіонін, селеноцистеїн та ін. Головним джерелом селену для людини і тварин є рослини, які засвоюють цей елемент відповідно до його концентрації,

доступності, форми селену в ґрунті та виду рослин. Найстабільнішими формами селену в ґрунтах є селеніт і селенат. Загальний вміст селену у ґрунтах коливається надзвичайно широко — від 0,000005 до 1,2 г/кг. Такий широкий діапазон веде до негативних наслідків для організмів, які перебувають у місцях крайніх концентрацій, — це потерпання від нестачі селену як мікроелемента та від його надмірної кількості. Тим часом діапазон концентрацій селену від слідових потреб організму до летальності є дуже вузьким. Так, мінімальний кормовий рівень для тварин становить приблизно 0,05—0,10 мг/кг сухого корму, а 2—5 мг уже є токсичними [1]. Для людини допустимими концентраціями селену в продуктах харчування вважають 0,1—1,0 мг/кг, а рекомендованою для профілактики дозою селену є 5 мкг/кг тіла людини [2]. Вузький діапазон між корисними і шкідливими рівнями ускладнює про-

філактику та терапевтичне використання сполук для людини та тварин, і тому особливої уваги заслуговують подальші дослідження механізмів чутливості/резистентності організмів до селенових сполук.

Селен і його сполуки використовують в електронній промисловості при виробництві копіювальних апаратів і фотоелементів, у будівельній індустрії — при виготовленні скляних архітектурних плит, пігментів у складі пластмас і фарб, а тому гострим є питання стосовно методів біоремедіації забрудненого селеном навколишнього середовища, зокрема, з використанням дріжджів та інших мікроорганізмів, які, зрозуміло, повинні бути максимально резистентними до токсичної дії селену. Проблема толерантності виникає також при використанні металоїдвмісних отрут як фунгіцидів та інсектицидів, оскільки часто шкідники і паразити проявляють небажано високу резистентність до металоїдів, що перешкоджає ефективній обробці [3, 4].

Неорганічний селен може асимілюватися всіма видами організмів, хоча ефективність біоутилізації сполук залежить від їхньої хімічної природи і виду організму. Так, асиміляція селенату (головного джерела селену в ґрунті) відбувається як у рослин, так і в дріжджів по шляху відновлення сульфату, оскільки відповідні ферменти не розпізнають сірку і селен: селенат → аденозилфосфоселенат → аденозин-3'-фосфо-5'-фосфоселенат → селеніт → селенід → селеноцистеїн (SeCys) → селенометіонін (SeMet). У архе- і еубактерій (можливо, не в усіх), а також тварин (безхребетних і хребетних) селен може включатися в поліпептидні ланцюги у складі так званої 21-ї амінокислоти SeCys [5]. Отже, синтез цих білків, які прийнято називати селенобілками, повинен включати селеноспецифічні механізми, які б розрізняли селен і сірку. Кодоном, що забезпечує це включення, є UGA, який за інших умов (у кінці гена) виконує функції нонсенс-кодону. Такий спосіб включення селеноцистеїну є специфічним — він стає елементом активних центрів низки селенобілків, таких, наприклад, як форміатдегідрогенази у бактерій чи глутатіонпероксидази і тіоредоксинредуктази в еукаріотів, виконуючи функцію каталітично активного гетероатому. Протягом декількох десятиліть після відкриття селену як важливого мікроелемента ідентифіковано біля 20 еукаріотних і 15 прокаріотних селенобілків, що містять 21-шу білкову амінокислоту — селеноци-

стеїн. Більшість цих білків беруть участь у редокс-реакціях з селеноцистеїном, який діє як важливий компонент каталітичного циклу. Вони відіграють важливу роль у метаболізмі ракових пухлин, у контролі поділу клітин, метаболізмі кисню, детоксикаційних процесах, індукції апоптозу, функціонуванні імунної системи тощо. У дріжджів і вищих рослин селенобілки не виявлено [6, 7].

Другий шлях включення селену у білки є неспецифічним — селен може заміщати сірку з утворенням вільних амінокислот селеноцистеїну і селенометіоніну, які включаються неспецифічно в білки замість цистеїну і метіоніну відповідно. Такі білки не прийнято називати селенобілками. З використанням бактерій як модельних систем показано, що ефект заміщення метіоніну і цистеїну їхніми селеновими похідними залежить від кількості замінів та локалізації їх у поліпептиді — вони можуть посилювати чи послаблювати його функцію навіть до нуля або ж не впливати на неї [8—10]. Подібний механізм працює на всіх рівнях живих систем, зокрема, і в дріжджів незалежно від наявності у них процесів синтезу селенобілків.

Завдяки антиоксидантним властивостям додавання селену у певній концентрації до дієти захищає організм людини від серцевосудинних захворювань, вірусних інфекцій, ревматоїдного артрити, хвороб печінки і деяких форм раку. Присутність селену у кормах в оптимальних концентраціях веде до зменшення частоти появи пухлин у лабораторних тварин. Дослідження протягом 6 років у США за участі 1300 пацієнтів показали, що споживання селену у кількості 200 мкг/день у вигляді збагаченої ним дріжджової біомаси знизило загальну частоту злоякісних пухлин на 50 % [11]. Його дефіцит у продуктах харчування призводить до появи низки захворювань у людини — синдромів Keshan (кардіоміопатія), Kashin-Beck (хондронекроз) та ін. Епідеміологічні дослідження в США виявили взаємозв'язок між низьким рівнем селену в продуктах і збільшеною частотою деяких видів пухлин у людей [11].

Дріжджі як модельний організм у дослідженні асиміляції та токсичності сполук селену. Більш повно роль селену в біології, медицині і ветеринарії викладено в оглядах [1, 5, 6, 11, 12], де йдеться, в основному, про бактерії, рослини і вищі еукаріоти. Метою ж цього огляду є узагальнення результатів досліджень впливу сполук селену на дріжджі. Згадані мікроорганізми є одними з найвивченіших

еукаріотних клітин, які володіють низкою фундаментальних властивостей, спільних з клітинами ссавців. Це дозволяє використовувати їх для вивчення метаболічних процесів, все ще не остаточно з'ясованих як у нижчих, так і вищих еукаріотів. У представленому огляді ми зосередилися на визначальних концепціях фізіології і біохімії селену у дріжджів, головним чином, у *Saccharomyces cerevisiae*, включаючи засвоєння і транспорт селену, питання щодо його ролі для дріжджів, а також механізмів токсичності селену і толерантності клітин дріжджів до нього.

Як уже зазначалося, у дріжджів шлях метаболізму селену, що включає синтез селенобілків, не виявлено. В результаті повного секвенування їхнього геному не знайдено внутрішньогенних опал-кодонів UGA, які б знаходилися всередині гена у рамці з AUG [5]. Зауважимо, що це стосується лише дріжджів-сахароміцетів. Метаболізм селену у неконвенційних дріжджів (несахароміцетів) до недавнього часу не вивчався, і тому не виключено, що дріжджові селенобілки буде виявлено при подальших дослідженнях багаточисельних видів і родів цих мікроорганізмів. Адже ще донедавна вважали, що і в рослин немає селенобілків. Це означало, що або вони втратили відповідний механізм у процесі еволюції, або проаналізовано недостатню кількість матеріалу. Очевидно, вірно останнє, оскільки нещодавно показано, що у *Chlamydomonas reinhardtii* як представника царства рослин глутатіонпероксидаза містить селеноцистеїн, включення якого у поліпептид відбувається завдяки кодону UGA [13].

Дослідження 404 штамів дріжджів, які належать до 40 родів, виявило, що їхня чутливість/резистентність до селенату характеризується широкою варіабельністю. Ріст деяких штамів може пригнічуватися селеном уже за концентрації 0,1 мМ, тоді як інші ростуть у присутності 100 мМ цього металоїду. Загалом аскоміцетні дріжджі більш толерантні до селену, ніж базидіоміцетні. На ступінь їхньої чутливості до цього металоїду впливає тип середовища, зокрема, вміст у ньому сульфату та сульфурвмісних амінокислот [14].

Значну частку експериментальних робіт, присвячених вивченню впливу селену на дріжджі, виконано з використанням селеніту як його джерела. Показано, що цей аналог сульфату діє на ріст *S. cerevisiae* залежно від його концентрації. За наявності у середовищі 1—5 мМ селеніту сповіль-

нюється експоненційний ріст культури, а її вхід у стаціонарну фазу відбувається за меншої концентрації клітин. Життєвий цикл 60 % оброблених селенітом (5 мМ) клітин зупиняється на стадії брунькування, хоча їхня менша доля закінчує поділ з відокремленням дочірніх клітин, що, можливо, свідчить про адаптацію частини культури до токсичної дії селеніту. Селеніт проявляє і летальну дію на клітини *S. cerevisiae* залежно від його концентрації у середовищі. Очевидно, негативний вплив селеніту на ріст дріжджової культури відбувається в основному за рахунок як пригнічення мітозу, так і летальних для клітин концентрацій цієї сполуки [15]. Неконвенційні флавіногенні дріжджі *Pichia guilliermondii* чутливіші до селеніту, ніж *S. cerevisiae*, — їхній ріст у рідкому мінеральному середовищі майже повністю блокується за його концентрації 0,5—1,0 мМ [16]. Клітини ссавців ще більш чутливі — для них селеніт є надзвичайно токсичним уже в мікромольних концентраціях [17].

Імовірно, однією з причин різної чутливості клітин до селеніту є їхня неоднакова здатність до його детоксикації. Клітини *Escherichia coli* знешкоджують селеніт шляхом його відновлення до елементарного селену (Se^0) [18]. Цей процес відновлення веде до появи характерного червоного кольору культури і до утворення H_2O_2 і O_2^- , які, як вважають [19], і спричиняють токсичність селеніту у *Salmonella typhimurium*. Культура *S. cerevisiae* також червоніє під час культивування на середовищі з селенітом внаслідок нагромадження у вакуолях червоної субстанції, яка, на думку авторів [15], являє собою елементарний селен (Se^0). Показано також, що при культивуванні дріжджів *Candida tropicalis* на середовищі з селеном (SeO_2) в їхніх вакуолях накопичуються гранули вільного селену [20, 21].

Про важливу роль вакуолі *S. cerevisiae* у детоксикації металоїдів свідчать результати вивчення мутантів — безвакуолярного, а також двох дефектних за вакуолярною H^+ -АТФазою. Всі три штами проявили збільшену чутливість до телуриту і хромату через накопичення оксіаніонів у цитозолі (цитозольний компартмент). Їхня детоксикація, очевидно, здійснюється за умови інтактної вакуолі, яка бере участь у компартменталізації, а також регуляції цитозольного компартменту для оптимального проявлення механізму детоксикації, тобто відновлення. Знайдено, що мутанти накопичува-

ли менше селену і виявляли більшу толерантність до селеніту, ніж батьківський штам. Цей результат, на думку авторів, вказує на те, що селен накопичується в основному у вакуолі і до цього може бути причетна активність V-H⁺-АТРази [22].

У дріжджів *P. guilliermondii* отримано колекцію резистентних до селеніту (Sit^r) мутантів, характерним для яких, на відміну від батьківського штаму, є швидка зміна кольору їхньої біомаси — від білого до червоного під час росту на середовищах з порівняно низькими концентраціями селеніту [23]. Штам дикого типу також здатний змінювати колір, але тільки на рожевий і тільки після довготривалого (> 7 діб) витримування у присутності сублетальної кількості селеніту. Попередні результати з характеристики індукованої селенітом забарвленої субстанції у клітин *P. guilliermondii* можуть теж свідчити про появу у них червоної форми Se⁰. Однак ці непрямі докази утворення елементарної форми селену як результату відновної детоксикації селеніту у дріжджів необхідно підтвердити прямою ідентифікацією Se⁰ у клітинах.

Селен і сірка мають дуже схожі фізико-хімічні властивості, що дозволяє селену поглинатися і засвоюватися метаболічними шляхами сірки. Органічні комплекси селену і селен-вмісні амінокислоти (біоселенові препарати) вважають найвигіднішими його джерелами для людини і тварин. Дріжджі за відповідних умов можуть накопичувати селен і включати його в ці сполуки. При їхньому культивуванні у середовищі з селенітом за певних умов біля 60 % органічного селену локалізується в структурних компонентах дріжджів — у фракції мікосомних мембран, ендоплазматичному ретикулумі, Гольджі-вакуолях та інших органелах. Значну кількість органічного селену містять мітохондрії. «Орг-селен» знайдено у пептидах, де селен заміщає сірку, в ліпідних фракціях (мембранних і немембранних), глікопротеїнових фракціях клітинної стінки і структурних компонентах зовнішньої поверхні дріжджів. Поки що нема чіткої відповіді на питання, чи залежить ефективність роботи цієї складної біологічної системи від заміни сірки селеном. Наявне, як і в разі ферментів бактерій, ефект буде залежати від кількості та локалізації заміни.

Щодо кількісних співвідношень різних сполук селену у біомасі «селенізованих» дріжджів, то вони обумовлені умовами вирощування культури дріжджів. Одержати збагачені селеном пекарські дріжджі

високої якості можна, коли питома швидкість його асиміляції становитиме 40—50 мг·г⁻¹·год⁻¹. Вміст небажаного неорганічного селену в клітинах можна зменшити до 5—6 %, хоча вихід біомаси при цьому буде на 20 % нижчим [24, 25].

За відповідних умов (рН, температура, аерація, вміст селеніту у середовищі та ін.) клітини *S. cerevisiae* здатні нагромаджувати селен у кількості 1000—2000 мкг/г сухої біомаси, причому понад 80 % селену може бути у формі SeMet. Розподіл неорганічних і органічних селенових сполук у біомасі дріжджів (загальний вміст селену складає 1922 мг/кг сухої біомаси) [28] наведено нижче:

Сполука	%
Селенат	Не виявлено
Селеніт	1
Селеноцистин	0,5
Селеноцистатіонін	1
Se-метилселеноцистеїн	0,5
γ-Глутаміл-Se-метилселеноцистеїн	0,5
Селенометіонін	85
Se-аденозилселеногомоцистеїн	3
Селенолантіонін	1,5
Загальний селен	93

Для створення оптимальних умов вирощування дріжджів вигідно використовувати процеси безперервної ферментації [26, 27].

Вважають, що SeMet є менш токсичним для організмів, ніж неорганічні сполуки селену [1]. Видається, що цей висновок стосується не всіх видів організмів. Так, порівняльне дослідження впливу двох сполук селену — органічної (селенометіонін) і неорганічної (селеніт) на характер росту, життєздатність і антиоксидантний статус клітин *S. cerevisiae* показало, що обидві форми селену із зростанням їхніх концентрацій у середовищі пропорційно зменшували життєздатність та кількість клітин у культурах, хоча і збільшували водночас вміст селену у клітинах, причому дія селенометіоніну при цьому була інтенсивнішою [29].

Дріжджі як джерело селену для людини і тварин. Селенізовані дріжджі є більш засвоюваним, а тому кращим джерелом селену не лише для людини, а й для тварин. Так, оцінюючи доступність різних форм селену для щурів, протягом 4 тижнів самцям (вік 4 тижні, дослідна група) згодували корм, збагачений селеном (0,04; 0,08; 0,16 і 0,32 мкг/г), або у формі селеніту, або як біомасу

дріжджів (SeY). Контрольну групу тримали на безселеновій дієті. Селен не впливав на ріст та біохімічні показники крові і сироватки. Вміст селену і активність глутатіонпероксидази в печінці, сироватці і еритроцитах зростали поступово із збільшенням кількості доданого селену. При низьких дозах селену (0,04 і 0,08 мкг/г) селеніт забезпечував більший, ніж SeY, вміст селену і вищу активність глутатіонпероксидази, але з підвищенням рівня селену (0,32 мкг/г) ці показники були істотнішими у варіанті з SeY. Показано, що біодоступність селену у формі SeY порівняно з селенітом (100 %) у тканинах була на рівні 135–165 %, а за активністю глутатіонпероксидази — на рівні 105–197 %, тобто SeY є кращим джерелом селену для щурів, аніж селеніт [30].

Концентрація селену у печінці свинок, які важили біля 24 кг і яких годували протягом 9 тижнів селенованими дріжджами (0,3 мг селену/кг), була значно вищою, ніж у свинок, котрим до корму додавали селеніт (0,3 мг селену/кг) [31].

При дослідженні здатності селеніту, селенату і SeY збільшувати концентрацію Se у молоці, сироватці і крові корів, показано, що збагачення корму селенітом і селенатом незначно впливало на кількість Se у молоці і не було різниці між ефектами цих двох сполук селену. Натомість дія органічного селену (SeY) у порівнянні з неорганічним була в 2–3 рази ефективнішою щодо зростання вмісту селену в молоці, крові і сироватці [32–34].

Новонароджені ягнята, матерям яких згодовували SeY, мали більшу концентрацію селену і активність глутатіонпероксидази у крові, ніж ягнята від матерів, які отримували селеніт. У овець, яким згодовували SeY, виявлено більшу кількість селену у молозиві, ніж у овець із варіанту «селеніт». Отже, порівняно з селенітом селен дріжджів легше переносився до молозива та плодів кітних овець [35].

Хоча потреба людини і тварин у селені є добре обґрунтованою, однак питання щодо точної форми селену для вживання все ще дебатуються. В ідеалі селен повинен би вживатися у вигляді, в якому він знаходиться у природних продуктах. Оскільки L-ізомер селенометіоніну (SeMet) є головною природною формою селену в продуктах, то синтетичний L-SeMet або збагачене ним продуктове джерело можуть бути додатковими видами селену для людей. Важливо, що це стосується не тільки дорослих, а й дітей. Показано, наприклад, що біодоступність

селену у формі SeY для недоношених дітей вища, ніж інших селенових компонентів. Діти, батьки яких проживали у бідному на селен районі Угорщини, одержували 4,8 мг SeY (5 мкг Se) щоденно протягом перших 14 днів після народження. Автори не виявили якихось ускладнень або побічних ефектів після введення дітям препарату SeY [36, 37]. Проте виникає питання, на яке поки що немає переконливої відповіді — наскільки біологічно активними є інші багаточисельні сполуки селену (органічні і неорганічні)? Можливо, для різних етіологій бажано вживати не лише SeMet, але й інші сполуки селену. Відомо, що селен проявляє множинні антиканцерогенні ефекти, але тільки деякі з них є залежними від глутатіонпероксидази, яка захищає ДНК від дії мутагенів, та регуляторного білка p53 (супресора пухлин), що контролює репарацію ДНК і активність якого може посилюватися селенометіоніном як антиканцерогенним фактором у даному разі [38].

Ще невідомо, чи є інші механізми антиканцерогенної дії селену. Очевидно, вони існують, оскільки в експериментах на вищих еукаріотах показано, що за способом дії на клітину селеносполуки можуть істотно відрізнятися [39–41]. Так, виявлено, що не селенометіонін і не селеноцистеїн, а інші сполуки селену (зокрема, і неорганічна його форма — селеніт) можуть бути більш дієвими у запобіганні розвитку пухлин у щурів. Ефективність антиканцерогенної дії різних селенових сполук у попередженні пухлин молочної залози у щурів [39] можна проілюструвати такими даними:

Компонент	Доза селену (млн ⁻¹) для 50 % -го пригнічення
Селенометилселеноцистеїн	2
Селенобетаїн	2
Метилловий ефір селенобетаїну	2–3
Селеніт	3
Селенометіонін	4–5
Селеноцистеїн	4–5

Цікаво, що селенометилселеноцистеїн, який був одним з ефективних компонентів у цьому експерименті, так само, як і SeMet, синтезується дріжджами, і не виключено, що можна селекціонувати штами дріжджів, біомаса котрих була б збагачена саме цим компонентом, а не SeMet (а, можливо, й обома).

Зазначена проблема важлива ще й тому, що є

дані про наявність у продуктах і кормах, збагачених селеном, якихось факторів (проміжних продуктів метаболізму селену?), які опосередковують дію селену у раковій етіології (може бути, і в інших етіологіях). Серед них є антагоністи селену, що пригнічують антиканцерогенну дію не лише селену, а й інших антиоксидантів — аскорбінової кислоти, ретинолу, β -каротину, α -токоферолу, котрі можуть синергічно взаємодіяти як антиракові препарати [42].

Генотоксичний і мутагенний потенціал селену. Відомо, що в клітинах ссавців селен проявляє два ефекти: у наномолярних концентраціях він стимулює ріст клітин, а в мікромолярних — є надзвичайно токсичним [17]. У дріжджів він також виявляє подвійний ефект, але в більшій на порядок концентрації: в мікромолярній — пригнічує спонтанний мутагенез, а в мілімолярній — стає токсичним, зокрема, і генотоксичним. Так, селеніт у кількості 1—15 мкмоль/чашку повністю супресував спонтанний мутагенез у двох незалежних локусах *his1-7* (міссенс-мутація) і *lys1-1* (амбер-мутація) *S. cerevisiae* [43]. Ступінь супресії залежав від концентрації селеніту, штаму і локусу. Необхідно було у 30 разів більшу концентрацію селеніту, щоб супресувати частоту спонтанних реверсій у гістидиновому локусі порівняно з концентрацією, яка викликала такий же ефект у лізиновому локусі. Обидва локуси реагували також по-різному на два інших неорганічних похідні селену. Спонтанний мутагенез у лізиновому локусі повністю пригнічувався селенітом у концентрації 3 мкмоль/чашку, а гістидинові реверсії супресувалися лише при 30 мкмоль. Селенат супресував реверсії у лізиновому, але не в гістидиновому локусі. Ці результати показують, що додані зовнішні компоненти (у даному разі селенові сполуки) можуть істотно впливати на генетично контрольовану готовність організму відповідати на мутагенез і свідчать про складність таких взаємодій. Механізми пригнічення частоти спонтанних мутацій селеном у дріжджів невідомі. Можливо, сполуки селену діють як антиоксиданти, зменшуючи пул мутагенних вільних радикалів

У більшій концентрації (1—10 мМ) селен діє як мутаген, проявляючи при цьому і токсичність. У *S. cerevisiae* він індукує прямі мутації в локусі *CAN1*, який кодує аргінінпермеазу. Мутанти *can1*^r резистентні до канаваніну і їхній облік легко вести на середовищі з цим токсичним аналогом аргініну.

Частота таких прямих мутацій при обробці клітин високою концентрацією селеніту (10 мМ) зростала у шість разів і становила майже $80 \cdot 10^{-6}$ [15], при цьому вона була близькою до частоти зворотних мутацій, індукованих селенітом [44].

У диплоїдних штамів *S. cerevisiae* селеніт, крім токсичності, виявляв рекомбіногенний і мутагенний ефекти: індукував генну конверсію, мітотичний кросинговер, зворотні мутації і утворення аберантних колоній [44]. Цікаво, що селенометіонін, як і селеніт, у гаплоїдних штамів *S. cerevisiae* залежно від концентрації демонструє мутагенний і антимутагенний ефекти, причому останній проявляється як у стаціонарній, так і в логарифмічній фазах росту. Як мутаген автори використали перекис водню. Активність каталази, супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази була значно більшою в присутності обох сполук селену [45].

Механізми дії селеніту як мутагенного фактора. Оскільки селеніт негативно впливає на ріст *S. cerevisiae* через блокування мітозу, припустили [15], що це могло бути наслідком індукованих селенітом пошкоджень ДНК, репарація яких вимагає попередньої затримки мітозу, котру, як було вже відомо, контролює ген *RAD9*. Дійсно, мутант *rad9* виявився значно чутливішим до селеніту, ніж штам дикого типу. Зроблено висновок, що затримка мітозу під контролем *RAD9* необхідна для репарації індукованих селенітом пошкоджень ДНК. Щоб з'ясувати природу цих пошкоджень, досліджували чутливість до селеніту мутантів, дефектних за різними шляхами репарації ДНК. Оскільки селеніт може мати окисні властивості, то насамперед дослідили чутливість штамів з дефектами репарації окисних пошкоджень ДНК (репарація за рахунок вирізання основ). Жоден з дефектних генів *ogg1*, *ntg1*, *ntg2* і *apn1* не впливав істотно на резистентність до селеніту. Імовірно, викликані селенітом пошкодження ДНК не репаруються продуктами диких алелів цих генів.

Мутації в генах *RAD51* і *RAD52*, які кодують компоненти репарації подвійних розривів ДНК, також істотно не збільшували чутливість до селеніту, який, таким чином, не спричинює згаданих пошкоджень ДНК. Подібний висновок зроблено і стосовно гена *RAD1*, що бере участь у репарації ДНК шляхом ексцизії (вирізання) нуклеотидів. Зрештою з'ясувалося, що лише один з відомих чотирьох шляхів репарації ДНК бере участь у відновленні пошкоджень ДНК, індукованих селе-

нітом, — той, до якого причетна ДНКполімераза ζ [15]. Мутації в гені *REV3*, який її кодує, істотно підвищують чутливість клітин до селеніту. Цей тип репарації є мутагенним, оскільки фермент здійснює реплікацію ДНК на пошкодженій (напевно, і селенітом) матричній нитці ДНК, під час якої імовірність включення в новосинтезовану нитку ДНК некомплементарного нуклеотиду є підвищеною, що й може бути причиною появи мутації у цьому сайті. Оскільки репарація пошкодженої селенітом ДНК відбувається не шляхом ексцизії основ, а за участі гена *REV3*, то автори зробили висновок, що селеніт генерує в ДНК не окислені основи, а великі аддукти, які здатна обійти тільки ДНК-полімераза ζ [15].

Не виключено, що деякі з генотоксичних ефектів селеніту можуть викликатися і перекисом водню, який утворюється внаслідок реакції селеніту з глутатионом [19]. У клітинах пухлин молочної залози мишей селеніт індукує одновитчасті розриви ДНК [40].

Мутанти, резистентні до селенату і хромату. Ефективним методичним підходом до виявлення генів, які визначають чутливість/резистентність клітин до різних факторів, є виділення мутантів зі зміненою толерантністю до них. Генетичний аналіз згаданих факторів при поєднанні з іншими методами дозволяє знаходити специфічні причини стійкості цих мутантів до їхнього впливу. У роботі [46] автори використали селенат і хромат як селективні фактори для виділення мутантів, резистентних до зазначених токсичних аналогів сірки. Відомо [47], що селекція штамів, резистентних до хромату і селенату, веде головним чином до виділення мутантів, дефектних за геном *MET3* (кодує АТР-сульфурилазу). Щоб уникнути цього, як вихідний використано штам з додатковими копіями гена *MET3* на багатокопійній плазміді. Оброблені етилметансульфонатом клітини *S. cerevisiae* висівали на синтетичне середовище, яке містило селенат (2 мМ) або хромат (0,1 мМ), або обидві сполуки одночасно в тих же концентраціях.

Із 39 селекціонованих резистентних мутантів 10 були метіонін-незалежними (фенотип Met^+) і 29 — метіоніновими ауксотрофами (Met^-). Результати комплементаційного аналізу показали, що кожен з 24 Met^- -штамів містив один з уже відомих мутантних алелів *met1*, *met4*, *met14* або *met16*. У одного із штамів знайдено дві мутації — *met22* (уже відому) і *sul3* (мутантний алель нового гена

SUL3). Інші чотири Met^- -штами містили мутантні алелі нового гена *MET28*, який кодує активатор транскрипції.

Серед 10 метіонін-незалежних штамів було відібрано чотири найстійкіших і в результаті подальшого аналізу показано, що два з них несли по одному мутантному алелю нових генів *SUL3* або *SUL2*, а два інших виявилися подвійними мутантами: один — за генами *SUL2* і *SUL1* (уже відомий), другий — за генами *SUL1* і *MET14*. Мутації в гені *SUL3* є домінантними. Зауважимо, що не виявлено якогось взаємозв'язку між кількістю та класами зазначених вище мутацій і типами селективних середовищ, на яких їх відбирали, — з селенатом, хроматом чи їхньою сумішшю.

Швидкість поглинання сульфату клітинами тест-штамів становила ($nmol \cdot xh^{-1} \cdot mg^{-1}$ сухої біомаси): дикий тип — 5,9; *sul1* — 4,4; *sul2* — 3,4; *sul3* — 2,9; *sul1 sul2* — < 0,1; *sul1 sul3* — < 0,1; *sul2 sul3* — 2,3. Отже, хоча в одиничних мутантів швидкість поглинання сульфату не набагато менша, ніж у дикого типу, але цього достатньо для їхньої ідентифікації за резистентністю до аналогів сірки. Лише поєднання двох мутацій — *sul1 sul2* або *sul1 sul3* в одному геномі призводить до значного зменшення ефективності поглинання сульфату клітинами таких штамів — вони нездатні, як дикий тип, рости на середовищі з 1 мМ сульфатом, для росту їм необхідна концентрація цієї сполуки 30 мМ.

Зазначені подвійні мутанти виявилися зручними для клонування *SUL* генів, в результаті якого показано, що ген *SUL1* знаходиться у II хромосомі і кодує білок, який містить 859 амінокислотних залишків і має 11 потенційних трансмембранних доменів. Його структура ідентична такій білка, виявленого в роботі [48]. Ген *SUL2* локалізується в XII хромосомі і кодує білок, що містить 893 амінокислотних залишки. Він включає 10 трансмембранних доменів. Обидва білки мають високу гомологію (62 %).

Наведені вище результати демонструють, що клітини дріжджів містять два високоафінних транспортери сульфату, які кодуються генами *SUL1* і *SUL2*. Залишалася невизначеною функція гена *SUL3*. Нездатність подвійних мутантів *sul1 sul2* і *sul1 sul3* рости на середовищі з 1 мМ сульфатом могла означати, що $Sul3p$ регулює активність $Sul2p$ або експресію гена *SUL2*. Результати дослідження кінетики дерепресії транскрипції генів *SUL1* і

SUL2 у штаму дикого типу та мутанта *sul3* виявили, що Sul3p активує транскрипцію гена *SUL2*. Низький рівень транскрипції *SUL2* у мутанта *sul3* пояснює, чому у подвійних мутантів *sul1 sul2* і *sul1 sul3* один і той же фенотип. Поки що невідомо, чи є у *S. cerevisiae* низькоафінна система транспорту сульфату до клітини. На можливість її існування вказує той факт, що мутант *sul1 sul2* росте на середовищі з високим вмістом сульфату (30 мМ). Неясно також, чому у роботі [45] виділений авторами мутант *sul1* не росте на середовищі, яке містить сульфат у концентрації, меншій за 5 мМ. Можливо, вихідний штам був уже мутантом *sul2*? Ще одна проблема — мутант *sul3* є стійкішим до селенату, ніж штам *sul2*, і тому не виключено, що ген *SUL3* бере участь у регуляції ще якихось генів, залучених до метаболізму сірки.

Селенат-аніон виявився токсичним і для *Schizosaccharomyces pombe*, що дало можливість виділити у цих дріжджів резистентні до селенату мутанти, які не могли засвоювати сульфат і тому вимагали для нормального росту такі джерела сірки, як сульфід, тіосульфат, цистеїн або глутатіон, але не метіонін [49, 50]. Мутанти трансформували геномною бібліотекою *S. pombe*. Ген, що комплементував селенатну резистентність, ідентифікували як такий, що кодує фермент АТР-сульфурилазу, яку у *S. cerevisiae* кодує ген *MET3*. Нездатність мутантів використовувати метіонін як джерело сірки викликана, на думку авторів, відсутністю зворотного шляху транссульфурилювання у цього організму. Як джерело сірки штами дикого типу можуть використовувати метіонін після його деградації з утворенням сульфату. Автори не застосували наведений вище методичний прийом [46], який дозволяє виділяти, окрім *MET3*, і інші мутанти, дефектні по асиміляції сульфату.

Резистентність/чутливість до сульфату. Дослідження механізмів толерантності клітин, зокрема дріжджів, до сульфідів має важливе теоретичне і практичне значення. Сульфіді широко використовують для консервації продуктів, і тому важливо знати умови, за яких їхня дія на мікроорганізми (пригнічують—не пригнічують) буде ефективною. Резистентність до сульфату є важливою ознакою винних штамів *S. cerevisiae*, і вивчення основи цієї властивості і факторів, що впливають на неї, може призвести до кращого менеджменту використання сульфату. Сульфід є потенційно токсичним, але водночас нормальним метаболітом у багатьох тва-

рин, рослин і мікроорганізмів, з чого випливає, що вони повинні мати детоксикаційні механізми, селективні стосовно цього аніону. Важливо знати, які це механізми і чи стосуються вони лише сульфату або є більш загальними і попереджають негативний вплив і інших споріднених метаболітів (наприклад, сполук селену і, передусім, селеніту). Нарешті, мало що відомо про основи гіперчутливості деяких людей до сульфідів, доданих до продуктів і напоїв. Можна очікувати, що результати дослідження шляхів метаболізму сульфідів у дріжджів стануть важливим внеском у розв'язання і цієї важливої проблеми. Хоча метаболізм сульфату у людини і дріжджів відбувається різними шляхами, не виключено, що клітинні мішені для сульфату (білки або інші молекули) можуть бути у них схожими. Результати повного секвенування геномів *S. cerevisiae* і людини показали, що багато чого можна дізнатися стосовно людини, вивчаючи аналогічні процеси у дріжджів.

На початку дослідження у дріжджів розглядалися як можливі, хоча і не виняткові, такі механізми детоксикації сульфату: 1) асиміляція сульфату за рахунок посиленого утворення метіоніну і цистеїну — головних кінцевих продуктів нормального сульфід-генеруючого шляху у дріжджів; 2) підвищений синтез сульфід-зв'язувальних агентів — наприклад, оцтового альдегіду; 3) знижене засвоєння сульфату. На першому етапі досліджень виділяли резистентні, а також чутливі до сульфату варіанти або мутанти, на ріст котрих не впливав би сульфід у концентрації, що є токсичною для батьківського штаму, або, навпаки, є більш токсичною для мутанта, ніж для дикого штаму.

Ген *FZF1*. Колекцію резистентних до сульфату мутантів *S. cerevisiae* вперше виділено і охарактеризовано групою італійських учених [51—53]. Відмітними ознаками цих мутантів були підвищений внутрішньоклітинний вміст глутатіону, більша глутатіонредуктазна активність, менша концентрація позаклітинного глутатіону і збільшена кількість позаклітинного оцтового альдегіду як у присутності, так і за відсутності сульфату. У резистентних штамів значно зменшена здатність акумулювати сульфід.

Не виявлено розбіжностей між резистентними і чутливими штамми за здатністю їхньої гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази реагувати на сульфід або глутатіон. Показано, що у семи мутантів стійкість успадковувалася як одна домінан-

тна мутація і що всі сім мутацій є алельними, тобто локалізуються в одному і тому ж гені, який, на думку авторів, є головним у визначенні чутливості/резистентності *S. cerevisiae* до сульфіту.

Результати клонування і секвенування гена показали, що він ідентичний уже описаному гену FZF1 [54], який кодує білок із п'ятьма цинковими пальцями, три з яких розташовані тандемами на N-кінці. Це вказує на його приналежність до класу транскрипційних факторів, але залишається неясним питання щодо його ролі у метаболізмі сульфіту.

Ген SSU. Нові дані стосовно механізмів чутливості/резистентності дріжджів до сульфіту отримано в результаті дослідження ще однієї колекції мутантів *S. cerevisiae*, яка включала штами двох типів — чутливих і стійких до сульфіту (1–2 мМ) [55]. Генетичний аналіз показав, що мутації, які збільшили чутливість клітин до сульфіту, є рецесивними і локалізуються в чотирьох генах (*SSU1*, *SSU2*, *SSU3*, *SSU4*). Жоден з чутливих мутантів не був дефектним по біосинтезу метіоніну або цистеїну, що виключало втрату сульфіторедуктазної активності як можливої причини чутливості. Вся група мутантів не проявляла чутливості або резистентності до інших, окрім сульфіту, випробуваних антиоксидантів (редуючих агентів): цистеїну, аскорбату, дитіотреїтолу, нітриту, глутатіону і тіосульфату.

Подальші дослідження продемонстрували, що ген *SSU1*, мутантні алелі котрого підвищують чутливість клітин до сульфіту, кодує білок з 458 амінокислотних залишків, який локалізований у мембрані і має 10 потенційних трансмембранних доменів. Зроблено висновок, що *SSU1* кодує транспортер, який бере участь у виведенні сульфіту з клітини, а не в його асиміляції. На користь цього висновку свідчить той факт, що нуль-мутанти за геном *SSU1* акумулювали в клітинах більше сульфіту, а надекспресія гена на багатокопійній плазміді, навпаки, вела до значного зменшення його кількості в клітинах порівняно з клітинами дикого типу. Швидкість виведення з клітин вільного сульфіту була значно інтенсивнішою в разі експресії *SSU1* на багатокопійній плазміді [56].

З'ясувалося, що деякі домінуючі мутації в ідентифікованому раніше гені FZF1 у порівнянні з алелем дикого типу збільшують транскрипцію гена *SSU1* у 8 разів, а *SSU1* у стані багатокопійності підвищує стійкість клітин до сульфіту у 3–8 разів.

Швидкості виведення зв'язаного сульфіту з клітин дикого типу, мутантів *ssu1*, *fzf1* або клітин з активним багатокопійним *SSU1* не відрізнялися суттєво. Це підтверджує висновок про те, що білок Ssu1p підтримує низький (нетоксичний) рівень сульфіту за рахунок виведення з клітин саме вільної форми сульфіту. Ідентифіковано область промотору гена *SSU1*, з якою білок Fzf1p зв'язується *in vitro* і позитивно регулює його транскрипцію [57]. Про роль Fzf1p як активатора *SSU1* свідчить і той факт, що він супресує сульфідну чутливість різних класів мутантів, але не *ssu1*. Таким чином, надекспресія генів *FZF1* або/і *SSU1* є одним з ефективних шляхів збільшення толерантності дріжджів до сульфіту завдяки посиленню дії Ssu1p як «сульфідної помпи» [58].

Подібні транспортери, відомі як Mdr (multidrug resistance) чи Pdr (pleiotropic drug resistance), широко розповсюджені в живій природі — від бактерій до людини [59], проте за структурою і способом дії Ssu1p відрізняється від них. Транспортери Mdr, на відміну від Ssu1p, потребують енергії АТФ для виведення з клітини широкого спектра токсичних речовин.

Чи може Ssu1p, крім сульфіту, виводити з клітини інші токсичні сполуки? Поліфункціональні можливості цього білка як помпи засвідчують дані про посилення експресії генів *SSU1* і *FZF1* у 18 і 5 разів відповідно після обробки клітин алкілюючою сполукою — метилметансульфонатом, котра, як відомо, здатна пошкоджувати нуклеїнові кислоти і білки [60]. Поки що невідомо, чи може Ssu1p розпізнавати і виводити з клітини цей супермутант, але сам факт активації ним експресії обох генів заслуговує на особливу увагу. Очевидно, Ssu1p упізнає і токсичний аналог сульфіту — селеніт, оскільки виявлено підвищення резистентності дріжджів до останнього за умови надекспресії *SSU1* у клітинах [15, 57].

Мутація *ssu2* виявилася алельною уже відомому гену *GRR1* [56], причетному до метаболізму глюкози та інших функцій [61]. Мутація *grr1* є плейотропною: обумовлює зміну морфології клітин, підвищену чутливість до редуючих агентів дитіотреїтолу, нітритів і тіосульфату, зменшує екскрецію оцтового альдегіду і знижує вміст відновленого глутатіону в клітинах. Два останніх метаболіти взаємодіють із сульфідом і це могло би бути способом його детоксикації, однак у незалежно одержаного мутанта з дуже зниженим вмістом

глутатіону чутливість до сульфїту не була зменшеною [55]. Мутанти *grr1* ростуть повільно на глюкозі, можливо, через дефект у високоафїнній системі її поглинання. Однак чутливість до сульфїту мутанта *grr1* обумовлена, напевне, цим дефектом тільки частково, оскільки, як виявилось, підвищена чутливість у нього спостерїгалася і на інших джерелах вуглецю (на галактозі, мальтозі, ацетаті, етанолі і глицерині). Крім цього, супресор дефекту метаболізму глюкози *rgl1* у мутанта *grr1* не пригнїчував цілковито чутливість до сульфїту, хоча ген *FZF1* на багатокопійній плазмїді супресував її повністю [55, 56]. У зв'язку з цим вважають, що головною причиною сульфїтної чутливості клітин мутантів *rgl1* (*ssu2*) є зменшений пул у них оцтового альдегіду, реакція якого з сульфїтом дає нетоксичний продукт — гідроксіетансульфонат. Тобто утворення оцтового альдегіду дріжджами є важливим способом детоксикації сульфїту. На користь цього припущення свідчить уже наведений вище факт екскреції клітинами резистентних до сульфїту мутантів *fz1* (усі мутації — домінантні) значно більших кількостей оцтового альдегіду у порівнянні з клітинами дикого типу [52]. Відомо також, що екзогенний сульфїт індукує екскрецію цього метаболіту клітинами дикого типу *S. cerevisiae* і *S. ludwigii* [62].

Мутації резистентності виявилися домінантними і виникали в одному і тому ж гені, позначеному як *RSU* [55], котрий, як показали подальші дослідження, ідентичний гену *FZF1* [53, 58]. Різниця між рівнями толерантності до сульфїту серед мутантів була незначною. Так, резистентний мутант *RSU1* витримує у три рази більшу концентрацію сульфїту, ніж штам дикого типу, який, у свою чергу, толерантніший до сульфїту у два рази, ніж найчутливіші мутанти. Домінантність мутації *FZF1-4* робить її зручною для використання у селекції промислових і лабораторних штамів *S. cerevisiae* [58].

Досліджуючи молекулярні механізми детоксикації селенїту дріжджовими клітинами, автори роботи [15] вели пошук генів, які б при надекспресії збільшували резистентність до нього. Дикий штам *S. cerevisiae* трансформували геномною бібліотекою на багатокопійній плазмїді. Близько 60000 трансформантів переносили на мінімальне середовище, яке містило 20 мМ селенїт. Відібрано дві плазмїди, що забезпечували збільшену резистентність клітин до селенїту, кожна з яких несла по одному гену —

уже відомий *SSU1*, який внаслідок мутації надає клітинам стійкість [56], і *GLR1*, що кодує NADPH-залежну глутатїонредуктазу. Надекспресія *GLR1*, як і першого гена, підвищувала селенїтну резистентність клітин, а надекспресія обох генів (*SSU1* і *GLR1*) одночасно в одній і тій же клітині спричиняла більшу стійкість до селенїту, ніж у разі надекспресії одного з двох генів.

Отже, обидва гени беруть участь у детоксикації селенїту, взаємодїючи при цьому за адитивним типом. Знайдено також, що надекспресія *SSU1* збільшувала резистентність як штаму дикого типу, так і мутанта *usc1*, тоді як надекспресія *GLR1* впливала на чутливість лише штаму дикого типу, але не *usc1*. Неочікувано мутант *usc1* виявився стійкішим до селенїту у порівнянні зі штамом дикого типу. Можливо, причиною цього було те, що в клітинах дикого типу, на відміну від мутантів *usc1*, відбувається активний транспорт селенодиглутатїону у вакуолю, що призводить до вичерпання пулу відновленого глутатїону у цитозолі, а це, у свою чергу, — до менш ефективного відновлення токсичного селенїту.

Оскільки надекспресія глутатїонредуктази веде до більшої сульфїторезистентності, вивчали, чи впливає селенїт на активність генів, які контролюють відповідь на оксидаційний стрес. Показано, що експресія *TRR1* (кодує цитозольну тіоредоксинредуктазу), *GLR1* і *YCF1* посилюється селенїтом у 14, 4 і 2 рази відповідно, і цей процес є Yap1p-залежним. При цьому на активність *SSU1* селенїт не впливав [15]. Таким чином, щодо дріжджів він поводить себе як активний оксидант, індукуючи гени, що захищають клітину від оксидаційного стресу (*GLR1* і *TRR1*).

Винні дріжджі і *SSU1*. Механізми чутливості/резистентності до сульфїту досліджуються і з використанням винних дріжджів як модельних об'єктів. Протягом тисячолїть ці дріжджі піддавалися селекції для набуття таких властивостей, як здатність швидко і ефективно зброджувати виноградне сусле з високим вмістом цукру, бути резистентними до високих концентрацій етанолу і діоксиду сірки та підвищеної температури. Саме тому вони мають унікальні генетичні і біохімічні характеристики, за якими суттєво відрізняються від інших дріжджів, зокрема, пекарських і пивних. На відміну від лабораторних штамів *S. cerevisiae*, які є або гаплоїдами, або диплоїдами, винні дріжджі в основному є диплоїдами, анеуплоїдами або полі-

плоїдами, гомоталічними і високогетерозиготними [63, 64]. Вони проявляють високий поліморфізм за довжиною хромосом [65, 66] і підвищену частоту мітотичної рекомбінації [67]. Це посилює їхню здатність до реорганізації свого геному і забезпечує їм швидку адаптацію до змін навколишнього середовища.

У зв'язку з вищевикладеним виникло важливе питання щодо ролі в генетичному поліморфізмі винних дріжджів сульфїту, який використовується при виробництві вина як антибактерійний препарат. Один із генів, дослідження якого пов'язане саме з цим, — ген *SSU1*, що, як зазначено раніше, модулює чутливість дріжджів і до селеніту. Показано, що він експресується в клітинах винних штамів із значно більшою інтенсивністю, ніж у лабораторного штаму, і підвищений рівень відповідної мРНК корелював з високою толерантністю аналізованих штамів до сульфїту [68].

Результати клонування з наступним секвенуванням гена *SSU1* виявили, що високу сульфїтну резистентність штамів забезпечував новий алель гена *SSU1*, названий *SSU1-R*. Він виникає через реципрокну транслокацію між VIII і XVI хромосомами, котра є наслідком нерівного кросинговеру між мікрогомолічними областями промоторів генів *ECM34* і *SSU1*, що знаходяться на VIII і XVI хромосомах відповідно. Кожна така коротка область довжиною 76 п. н. (так звана «верхівкова активуюча послідовність» — UAS або ВАП) є сайтом зв'язування активатора транскрипції, у даному разі Fzf1p. На першому етапі перебудови двох хромосом кількість ВАП у промоторі *ECM34* шляхом дуплікації(й) збільшується від однієї до декількох, після чого внаслідок транслокації вони опиняються в промоторі *SSU1*, а одинична ВАП останнього — у промоторі *ECM34*. Зауважимо, що функція *ECM34* поки що не відома [69].

Така перебудова веде, по-перше, до високої поліморфності двох пар гомологічних хромосом відповідного диплоїду: якщо до транслокації кожна з хромосом VIII пари мала довжину 562 тис. п. н., то після транслокації одна з них видовжилася до 921 тис. п. н. Аналогічно, після перебудови одна з гомологічних хромосом XVI пари замість 948 містила лише 599 тис. п. н. По-друге, за рахунок згаданої вище транслокації промотор гена *SSU1* може містити від двох до шести ВАП, внаслідок чого рівень експресії гена *SSU1* різко зростає у порівнянні зі штамом дикого типу. Показано, що

існує висока позитивна кореляція між кількістю ВАП і ступенем сульфїтної резистентності відповідної дріжджової клітини [69].

Описаний вище тип негомолічної (незаконної) рекомбінації є надзвичайно рідкісним явищем у штамів дикого типу. Вважають, що його частота не перевищує $3,5 \cdot 10^{-10}$. Незважаючи на це, у всіх вивчених на сьогодні (понад 10) винних штамів виявлено алель *SSU1-R*, який з'являється внаслідок такої малоїмовірної події, тоді як досліджені штамми дикого типу його не містять [68, 69].

Очевидно, сульфїт у виноградному суслі є одним із важливих селективних факторів, у присутності якого клітини з рідкісною мутацією сульфїтної резистентності мають перевагу за швидкістю росту над батьківськими клітинами, що сприяє їхньому кращому виживанню і, отже, еволюції відповідних штамів винних дріжджів у напрямку стійкості до сульфїту. Зауважимо, що поліморфізм певного штаму за довжиною хромосом, що з'явився після зазначеної вище транслокації, може пришвидшувати подальші структурні перебудови хромосом і, таким чином, сприяти пристосуванню штаму і до інших несприятливих середовищ. У загальному підсумку на сьогодні виявлено понад 20 генів, що модулюють толерантність дріжджів до сполук селену і сульфїту (таблиця). Наскільки повним є цей список?

Дуже ймовірно, що він буде доповнений і іншими, поки що невідомими генами. На користь цього припущення свідчать факти, одержані при дослідженні впливу арсену на дріжджі. Арсену і селену притаманна низка схожих властивостей, оскільки вони є сусідами за розміщенням у четвертому періоді періодичної таблиці, обидва необхідні у слідових кількостях для метаболізму і росту як мікроелементи, але за більших концентрацій є токсичними.

Продемонстровано [70], що обробка клітин *S. cerevisiae* протягом 2 год розчином NaAsO_2 у концентрації 0,1—1,0 мМ слабо впливала на ріст дріжджів, але на досить тривалий час (до 2 год) змінювала в клітинах ступінь експресії 829 генів із 6240 досліджених. Три з них, які є активаторами транскрипції (*MET4*, *MET28* і *YAP1*), індукуються і селеном. Можливо, ці три фактори обумовлюють перехресну чутливість/резистентність клітин до обох металоїдів. Не виключено також, що і селен модулює експресію не десятків, а сотень генів, які контролюють толерантність дріжджів до нього.

Гени, що модулюють толерантність дріжджів до сполук селену та їхніх аналогів

Ген	Функція білка	Фенотип/генотип мутантів	Джерело
<i>S. cerevisiae:</i>			
<i>MET1</i>	Уропорфіриноген-3-метилаза	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46]
<i>MET3</i>	АТФ-сульфурилаза	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46, 47]
<i>MET4</i>	Регуляторний ген	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46]
<i>MET14</i>	Аденозин-5'-фосфосульфаткіназа	Sat ^r Chr ^r Met	[46]
<i>MET16</i>	3'-фосфо-5'-аденілілсульфатредуктаза	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46]
<i>MET22</i>	Дифосфонуکلеоїдфосфогідролаза	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46]
<i>MET28</i>	Активатор транскрипції	Sat ^r Chr ^r Met ⁻	[46]
<i>SUL1</i>	Транспортер сульфату	Sat ^r Chr ^r	[46]
<i>SUL2</i>	Транспортер сульфату	Sat ^r Chr ^r	[46]
<i>SUL3</i>	Активатор транскрипції гена <i>SUL2</i>	Sat ^r , Chr ^r ; всі мутації домінантні	[46]
<i>FZF1 (RSU1)</i>	Активатор транскрипції гена <i>SSU1</i>	Домінантні мутації: Sul ^r ; збільшений вміст глутатіону; підвищена глутатіонредуктазна активність; зменшена кількість позаклітинного глутатіону; збільшена концентрація позаклітинного оцтового альдегіду	[51—54]
<i>SSU1</i>	Транспортер («сульфітна помпа»): виводить сульфід і селеніт з клітини	Рецесивні мутації: Sul ^s . Посилена експресія в клітинах винних дріжджів. Багатокопійність <i>SSU1</i> : → Sul ^r , Sit ^r (3 мМ); <i>ssu1</i> → Sul ^s	[14, 55—58]
<i>SSU2 (GRR1)</i>	Невідома	Мутація <i>grr1</i> плейотропна: Sul ^r , зміна морфології клітини, підвищена чутливість до редукуючих агентів, зменшена експресія оцтового альдегіду, зменшений вміст відновленого глутатіону в клітинах, уповільнений ріст на глюкозі	[55, 56, 61]
<i>SSU3</i>	Невідома	Sul ^s	[55]
<i>SSU4</i>	Невідома	Sul ^s	[55]
<i>ECM34</i>	Невідома	Дуплікація промотору цього гена і його транслокація у промотор <i>SSU1</i> веде до значної експресії останнього і, отже, до Sul ^r фенотипу	[68, 69]
<i>GLR1</i>	NADPH-залежна глутатіонредуктаза	Sit ^r	[15]
<i>REV3</i>	ДНК-полімераза ζ	Sit ^s	[15]
<i>RAD9</i>	Затримка мітозу до завершення репарації ДНК	Sit ^s	[15]
<i>YCF1</i>	Ycf1p — вакуолярний білок, який виконує роль помпи, зокрема, і при детоксикації кадмію	Sit ^r	[15]
<i>TRR1</i>	Цитозольна тіоредоксинредуктаза	Фенотип мутанта невідомий. Селеніт дерепресує синтез білка	[15]
<i>YAP1</i>	Активатор транскрипції <i>TRR1</i> , <i>GLR1</i> , <i>YCF1</i>	Sit ^s	[15]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>			
<i>MET3</i>	АТФ-сульфорилаза	Sat ^r	[49]
<i>Pichia guilliermondii</i>			
<i>SIT1, SIT2</i>	Невідома	Sit ^r	[50]

П р и м і т к а. Позначення фенотипів: Met⁻ — метіонінзалежність; Sat^r, Chr^r — селенат- або хроматрезистентність відповідно; Sul^s, Sul^r — чутливість або резистентність до сульфату відповідно; Sit^s, Sit^r — чутливість або резистентність до селеніту відповідно.

Отже, щоб вижити за несприятливих умов, обумовлених наявністю оксіаніонів селену та їхніх аналогів у навколишньому середовищі, дріжджі розвинули низку механізмів детоксикації згаданих сполук, а саме:

контроль їхнього транспорту у клітину та екскреції з клітини;

відновлення металоїду всередині клітини і метаболізація його до різних форм, менш токсичних для клітин (Se-вмісні органічні сполуки, елементарна форма селену);

компаратменталізація (секвестрування) їхніх похідних в органели;

формування комплексів з клітинним метаболітом з утворенням малотоксичної сполуки;

активація у присутності металоїду транскрипції генів, продукти яких захищають клітину за даних умов (антиоксидантні системи).

M. M. Stenchuk, L. B. Chaban, M. V. Gonchar

Selenium and yeast: genetic mechanisms of the yeast tolerance to selenium compounds and their analogs

Summary

Selenium (Se) and its compounds have toxic and carcinogenic effect on animal and human beings, but in small concentrations this microelement is essential for life. Therefore, it is important to establish the molecular basis of Se toxicity and cell resistance to this metalloid. Many investigations of this problem have been carried out on bacteria. Genetic approaches, available for the yeasts, made these eukaryotic microorganisms, especially *S. cerevisiae*, a convenient model for the investigation of molecular mechanisms of Se tolerance. This review summarizes the knowledge of genetic mechanisms involved in Se tolerance in yeasts.

Key words: yeast, selenium, tolerance.

Н. Н. Стенчук, Л. Б. Чабан, М. В. Гончар

Селен и дрожжи. Генетические механизмы толерантности дрожжей к соединениям селена и их аналогам

Резюме

Селен (Se) и его соединения оказывают токсическое и канцерогенное действие на организмы человека и животных, а в небольших количествах он является существенным микроэлементом для живых существ. Поэтому важно установить молекулярные основы токсичности Se и резистентности к нему клеток. Значительное количество исследований этой проблемы проведено на бактериях. Возможность использования молекулярно-генетических методов сделала дрожжи (в основном *Saccharomyces cerevisiae*) удобной модельной системой для изучения механизмов резистентности эукариотных клеток к селену на молекулярном уровне. Исходя из этого в данном обзоре суммированы данные, особенно генетические, полученные при исследовании механизмов чувствительности/резистентности дрожжей к селеновым соединениям.

Ключевые слова: дрожжи, селен, толерантность.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nakamuro K., Okuno T., Hasegawa T. Metabolism of seleno-amino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity // *J. Health Sci.*—2000.—46.—P. 418—421.
2. Lobinski R., Edmonds J. S., Suzuki K. T., Uden P. C. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials // *Pure Appl. Chem.*—2000.—72.—P. 447—461.
3. Tamas M.-J., Wysocki R. Mechanisms involved in metalloid transport and tolerance acquisition // *Curr. Genet.*—2001.—40.—P. 2—12.
4. [<http://www.nsc.org/library/chemical/selenium.htm>].
5. Birringer M., Pilawa S., Flohe L. Trends in selenium biochemistry // *Nat. Prod. Rep.*—2002.—19.—P. 693—718.
6. Schrauer G. N. Anticarcinogenic effects of selenium // *Cell. Mol. Life Sci.*—2000.—57.—P. 1864—1873.
7. Kohl J., Brigelius-Flohe R., Bock A., Gartner R., Mejer O., Flohe L. Selenium in biology: facts and medical perspectives // *Biol. Chem.*—2000.—381.—P. 849—864.
8. Boles J. O., Cisneros R. J., Weir M. S., Odom J. D., Villafranca J. E., Dunlap R. B. Purification and characterization of selenomethionyl thymidilate synthase from *Escherichia coli*; comparison with the wild-type enzyme // *Biochemistry.*—1991.—30.—P. 11073—11080.
9. Bernard A. R., Wells T. N., Cleasby A., Borlat F., Payton M. A., Proudfoot A. E. Selenomethionine labeling of phosphomannose isomerase changes its kinetic properties // *Eur. J. Biochem.*—1995.—230.—P. 111—118.
10. Huber R. E., Criddle R. S. The isolation and properties of beta-galactosidase from *Escherichia coli* grown in sodium selenate // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1967.—141.—P. 587—599.
11. Ip C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention // *J. Nutr.*—1998.—128.—P. 1845—1854.
12. Снітинський В. В., Антонюк Г. Л. Біохімічна роль селену // *Укр. біохім. журн.* —1994.—66, № 5.—С. 3—16.
13. Fu L.-H., Wang X.-F., Eyal Y., She Y.-M., Donald L. J., Standing K. G., Ben-Hayyim G. A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 25983—25991.
14. Golubev V. I., Golubev N. V. Selenium tolerance of yeast // *Mikrobiologiya.*—2002.—71.—P. 455—459.
15. Pinson B., Sagot I., Daignan-Fornier B. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Microbiol.*—2000.—36.—P. 679—687.
16. Чабан Л., Покровецька О., Стенчук М., Гончар М. Отримання та фізіологічна характеристика селеніт-резистентних мутантів *Pichia guilliermondii* // *Вісн. Львів. ун-ту (Біол. серія).*—2003.—Вип. 34.—С. 92—99.
17. McKeenan W. L., Hamilton W. G., Ham R. G. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1976.—73.—P. 2023—2027.
18. Turner R. J., Weirner J. H., Taylor D. E. Selenium metabolism in *Escherichia coli* // *Biometals.*—1998.—11.—P. 223—227.
19. Kramer G. F., Ames B. N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium* // *Mutat. Res.*—1988.—201.—P. 169—180.
20. Решетникова И. А., Петрикевич С. Б. Люминесцентно-микроскопическое обнаружение селена в дрожжах *Candida tropicalis* // *Микробиология.*—1974.—43, № 1.—С. 159—161.

21. Решетникова И. А., Петрикевич С. Б. Электронно-микроскопическое изучение дрожжей *Candida tropicalis*, выращенных на среде, содержащей селен // Микробиология.—1975.—44, № 5.—С. 556—558.
22. Charieb M. M., Gadd G. M. Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite // Biometals.—1998.—11.—P. 101—106.
23. Chaban L., Stenchuk M., Gonchar M. Genetic analysis of selenite-resistant mutants of the yeast *Pichia guilliermondii* // 1st Ukr. Congr. Cell Biol. (Lviv, April 25—28, 2004): Abstract.—Lviv, 2004.—P. 376.
24. Suhajda A., Hegoczki J., Janzso B., Pais I., Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* // J. Trace Elem. Med. Biol.—2000.—14.—P. 43—47.
25. Ponce de Leon C. A., Bayon M. M., Paquin C., Caruso J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods // J. Appl. Microbiol.—2002.—92.—P. 602—610.
26. Demirci A., Pometto A. L. III. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation // J. Agr. Food Chem.—1999.—47.—P. 2491—2495.
27. Demirci A., Pometto A. L. III, Cox D. J. Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation // J. Agr. Food Chem.—1999.—47.—P. 2496—2500.
28. Kotrebai M., Birringer J. F., Tyson J. F., Block E., Uden P. C. Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents // Analyst.—2000.—125.—P. 71—78.
29. Bansal M. P., Kaur T. Growth characteristic and selenium status changes of yeast cells with inorganic and organic selenium supplementation: selenium, a chemopreventive agent // J. Med. Food.—2002.—5.—P. 85—90.
30. Yoshida M., Fukunaga K., Tsuchita H., Yasumoto K. An evaluation of the bioavailability of selenium in high-selenium yeast // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).—1999.—45.—P. 119—128.
31. Ortman K., Pehrson B. Selenite and selenium yeast as feed supplements to growing fattening pigs // Zentralbl. Veterinarmed. A.—1998.—45.—P. 551—557.
32. Ortman K., Pehrson B. Selenite and selenium yeast as feed supplements for dairy cows // J. Vet. Med. A.—1997.—44.—P. 373—380.
33. Ortman K., Pehrson B. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast // J. Anim. Sci.—1999.—77.—P. 3365—3370.
34. Knowles S. O., Grace N. D., Wurms K., Lee J. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk and casein selenium concentration in grazing cows // J. Dairy Sci.—1999.—82.—P. 429—437.
35. Rock M. J., Kincaid R. L., Carstens G. E. Effects of prenatal source and level of dietary selenium on passive immunity and thermometabolism of newborn lambs // Small Rumin. Res.—2001.—40.—P. 129—138.
36. Bogye G., Alfthan G., Machay T. Bioavailability of enteral yeast-selenium in preterm infants // Biol. Trace Elem. Res.—1998.—65.—P. 143—151.
37. Bogye G., Alfthan G., Machay T., Zubovics L. Enteral yeast-selenium supplementation in preterm infants // Arch. Disease Childhood.—1998.—78.—P. 225—226.
38. Seo Y. R., Kelley M. R., Smith M. L. Selenomethionine regulation of p53 by a refl-1-dependent redox mechanism // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2002.—99.—P. 14548—14553.
39. Whanger P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance // J. Amer. College Nutr.—2002.—21.—P. 223—232.
40. Lu J., Jiang C., Kaeck M., Ganther H., Vadhanavikit S., Ip C., Thompson H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium // Biochem. Pharmacol.—1995.—50.—P. 213—219.
41. Sinha R., Said T. K., Medina D. Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth *in vitro* by different cellular pathways // Cancer Lett.—1996.—107.—P. 277—284.
42. Alaejos M. S., Diaz Romero F. J., Diaz R. C. Selenium and cancer: some nutritional aspects // Nutrition.—2000.—16.—P. 376—383.
43. Rosin M. P. Inhibition of spontaneous mutagenesis in yeast cultures by selenite, selenate and selenide // Cancer Lett.—1981.—13.—P. 7—14.
44. Anjaria K. B., Madhvanath U. Genotoxicity of selenite in diploid yeast // Mutat. Res.—1988.—204.—P. 605—614.
45. Bronzetti G., Cini M., Andreoli E., Caltavuturo L., Panunzio M., Croce C. D. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast // Mutat. Res.—2001.—496.—P. 105—115.
46. Cherest H., Davidian J. C., Thomas D., Benes V., Ansoerge W., Surdin-Kerjan V. Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics.—1997.—145.—P. 627—635.
47. Breton A., Surdin-Kerjan V. Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study // J. Bacteriol.—1977.—132.—P. 224—232.
48. Smith F. W., Ealing P. M., Hawkesford M. J., Clarkson D. T. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 9373—9377.
49. Simonics T., Banszky L., Maraz A. Genetics of sulfate assimilation in *Schizosaccharomyces pombe* (a short review) // Acta Microbiol. Hung.—2002.—49.—P. 279—283.
50. Banszky L., Simonics T., Maraz A. Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants // J. Gen. and Appl. Microbiol.—2003.—49.—P. 271—278.
51. Casalone E., Colella C. M., Ricci F., Polsinelli M. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to sulfate // Yeast.—1989.—5, Spec. No.—P. 287—291.
52. Casalone E., Colella C. M., Daly S., Gallori E., Moriani L., Polsinelli M. Mechanism of resistance to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet.—1992.—22.—P. 435—440.
53. Casalone E., Colella C. M., Daly S., Fontana S., Torricelli I., Polsinelli M. Cloning and characterization of a sulfite-resistant gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast.—1994.—10.—P. 1101—1110.
54. Breitwieser W., Price C., Schuster T. Identification of a gene encoding a novel zinc finger protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast.—1993.—9.—P. 551—556.
55. Xu X., Wightman J. D., Geller B. I., Avram D., Bakalinsky A. T. Isolation and characterization of sulfite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet.—1994.—25.—P. 488—496.
56. Avram D., Bakalinsky A. T. FZF1 (SUL1) suppresses the sulfite sensitivity but not the glucose derepression or aberrant

- cell morphology of a *grr1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*.—1996.—144.—P. 511—521.
57. Park H., Bakalinsky A. T. SSU mediates sulfite efflux in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*.—2000.—16.—P. 881—888.
58. Park H., Lopez N. I., Bakalinsky A. T. Use of sulfite resistance in *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant selectable marker // *Curr. Genet.*—1999.—36.—P. 339—344.
59. Sa-Correia I., Tenreiro S. The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence // *J. Biotechnol.*—2002.—98.—P. 215—226.
60. Jelinsky S. A., Samson L. D. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1999.—96.—P. 1486—1491.
61. Flick J. S., Johnston M. GRR1 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats // *Mol. Cell. Biol.*—1991.—11.—P. 5101—5112.
62. Stratford M., Morgan P., Rose A. H. Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii* // *J. Gen. Microbiol.*—1987.—133.—P. 2173—2179.
63. Bakalinsky A. T., Snow R. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*.—1990.—6.—P. 367—382.
64. Codon A. C., Gasent-Ramirez J. M., Benitez T. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts // *Appl. Environ. Microbiol.*—1995.—61.—P. 630—638.
65. Bidente C., Blondin B., Dequin S., Vezinhet F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.*—1992.—22.—P. 1—7.
66. Rachidi N., Barre P., Blondin B. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. and Gen. Genet.*—1999.—261.—P. 841—850.
67. Puig S., Querol A., Barrio E., Perez-Ortin J. E. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation // *Appl. Environ. Microbiol.*—2000.—66.—P. 2057—2061.
68. Goto-Yamamoto N., Kitano K., Shiki K., Yoshida Y., Suzuki T., Iwata T., Yamane Y., Hara S. SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence // *J. Ferm. Bioengin.*—1998.—56.—P. 427—433.
69. Perez-Ortin J. E., Perez-Ortin J. E., Puig S., Barrio E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains // *Genome Res.*—2002.—12.—P. 1533—1539.
70. Haugen A. C., Kelley R., Collins J. B., Tucker C. J., Deng C., Afshari C. A., Brown J. M., Ideker T., Van Houten B. Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks // *Genome Biol.*—2004.—5.—P. R95.

УДК (579.25 + 579.22):546.23
Надійшла до редакції 11.10.05