

На правах рукописи

**СОФЬЯНОВИЧ ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА**

**Изучение генетических основ синтеза  $\gamma$ -глутамильных ди- и  
трипептидов  
в *Saccharomyces cerevisiae* на примере  $\gamma$ -глутамил-валина и  $\gamma$ -  
глутамил-валил-глицина**

03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в Лаборатории №2 Акционерного Общества «научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)

**Научный руководитель:** **Серебряный Всеволод Александрович**,  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник АО «АГРИ»,  
г. Москва

**Официальные оппоненты:** **Манухов Илья Владимирович**,  
доктор биологических наук,  
заведующий лаборатории молекулярной генетики;  
Московский физико-технический институт,  
г. Москва

**Лавров Константин Валерьевич**,  
кандидат биологических наук,  
начальник лаборатории молекулярной биотехнологии;  
НИЦ "Курчатовский институт - ГосНИИГенетика"  
г. Москва

**Ведущая организация:** **Федеральный исследовательский центр**  
**«Фундаментальные основы биотехнологии»**  
**Российской академии наук, г. Москва**

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Горячева И.И.

# 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## 1.1. Актуальность проблемы

Глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – одно из основных внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, синтезирующихся почти во всех эукариотических и некоторых прокариотических клетках. Этот трипептид является первым известным  $\gamma$ -глутамильным соединением, которое было обнаружено в дрожжевом экстракте в конце 19 века. После открытия GSH было найдено и охарактеризовано множество других  $\gamma$ -глутамильных соединений. К  $\gamma$ -глутамильным соединениям относят разнородную группу веществ, в которых остаток L-глутамата через  $\gamma$ -карбоксыльную группу присоединен к акцептору. Акцепторами могут быть аминокислоты, короткие пептиды и другие соединения. Накопление информации о существовании такого рода соединений происходило в 1940-1970 годах и, как оказалось, они широко представлены в живых организмах и спектр их химического состава довольно разнообразен. Например, в 1949 году из листьев чая был выделен теанин ( $\gamma$ -глутамилэтиламид) (Sakato, 1949), содержание которого составляло 50% всех свободных аминокислот растения (Vuong et al., 2011). В 1956 году из хрусталика глаз телят была выделена офтальмовая кислота ( $\gamma$ -глутамил- $\alpha$ -амино-*n*-бутирилглицин), содержание которой доходило до 20 мг на 100 г хрусталика (Waley, 1956).

В настоящее время к  $\gamma$ -глутамильным соединениям появился особый высокий интерес в связи с их участием во вкусовой рецепции. Оказалось, что многогранность вкусового восприятия многих продуктов питания (лук, сыр, чеснок, бобовые, вино и т. д.) зависит от содержания в них  $\gamma$ -глутамильных соединений, в том числе и пептидов. Такие соединения были названы «кокуми», что на японском языке означает «очень вкусный» (Ueda et al, 1990). Более того, в 2010 году было показано, что к агонистам кальций-чувствительного рецептора человека CaCR относятся 46  $\gamma$ -глутамильных пептидов. Скрининг таких пептидов показал, что  $\gamma$ -глутамил-валил-глицин ( $\gamma$ -EVG) является потенциально интересным усилителем вкуса с сенсорной активностью в 12,8 раз выше, чем у GSH (Ohsu et al, 2010). Таким образом, создание продуцентов новых и эффективных  $\gamma$ -глутамильных пептидов со

свойствами «кокуми» открывает возможности с одной стороны разнообразить рацион при диетах с ограниченным набором продуктов питания, с другой – уменьшить количество жиров и соли без значительной потери вкусовых свойств пищи.

В связи с этим, исследование путей образования  $\gamma$ -глутамильных пептидов, и, в частности,  $\gamma$ -EVG, представляется важной практической задачей. Использование *Saccharomyces cerevisiae* в качестве штамма-продуцента выглядит перспективно, так как известно, что экстракт этих дрожжей широко используется в качестве вкусовой добавки в пищевой промышленности (Lin et al, 2012).

К настоящему времени про пути синтеза  $\gamma$ -глутамильных пептидов известно немного, но, имеющиеся данные позволяют заключить, что эти соединения образуются в клетках часто как побочные продукты биосинтеза GSH или как продукты его деградации. Таким образом, помимо описанного выше практического значения, изучение биосинтеза  $\gamma$ -глутамильных пептидов позволяет получить новую информацию о свойствах ферментов, участвующих в метаболизме GSH.

## 1.2. Цели и задачи работы

Целью настоящей работы являлось:

1. Создание инструментария для многократной замены промоторов целевых генов для получения штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК;
2. Определение путей образования  $\gamma$ -глутамильных пептидов в *S. cerevisiae* на примере дипептида  $\gamma$ -глутамил-валина ( $\gamma$ -EV) и трипептида  $\gamma$ -EVG.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

- Создать генетический инструментарий для замены промоторов целевых генов в *S. cerevisiae*, основанный на комбинировании гомологической рекомбинации и системы селекции-контрселекции.
- Экспериментально подтвердить накопление  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV в клетках *S. cerevisiae*.
- Определить пути биосинтеза  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV и транспорта  $\gamma$ -EVG внутрь клеток у *S. cerevisiae*.

- Изучить возможности сверхсинтеза  $\gamma$ -EVG в *S. cerevisiae*.

### 1.3. Научная новизна и практическая ценность работы

В настоящей работе создан генно-инженерный инструментарий, позволяющий проводить многократную замену промоторов целевых генов с получением штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК.

Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что синтез  $\gamma$ -EVG из различных предшественников может проходить в *S. cerevisiae* по двум механизмам: 1) синтетическому, в процессе которого задействованы ферменты синтеза GSH и 2)  $\gamma$ -глутамилтрансферазному, при переносе  $\gamma$ -глутамильной группы на валил-глицин (VG).

Продемонстрировано, что за синтез  $\gamma$ -EVG из  $\gamma$ -EV отвечает ген *GSH2*, кодирующий глутатионсинтетазу (Gsh2), а предшественник  $\gamma$ -EV может образовываться двумя путями. За реализацию первого пути отвечает ген *GSH1*, кодирующий  $\gamma$ -глутамил-цистеин лигазу (Gsh1). За синтез  $\gamma$ -EV по второму пути отвечают гены *DUG2* и *DUG3*, кодирующие комплекс белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>, и/или *ECM38*, кодирующий  $\gamma$ -глутамилтрансферазу (Ecm38), которые способны перенести  $\gamma$ -глутамильную группу на L-валин.

Получены данные, показывающие, что синтез  $\gamma$ -EVG из предшественника VG осуществляется в результате переноса  $\gamma$ -глутамильной группы комплексом белков (Dug2-Dug3).

Получены данные, показывающие, что GSH является донором  $\gamma$ -глутамильной группы при реализации  $\gamma$ -глутамилтрансферазного механизма образования  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG. Показано, что сверхэкспрессия генов синтеза GSH, *GSH1* и *GSH2*, приводит к увеличению синтеза  $\gamma$ -EVG.

Установлено, что за деградацию VG отвечает ген *DUG1*, кодирующий белок Dug1, ранее аннотированный как дипептидаза, расщепляющая цистеинил-глицин (CG).

Показано, что за импорт  $\gamma$ -EVG отвечает ген *HGT1*, кодирующий транспортер олигопептидов и GSH в *S. cerevisiae*, Hgt1.

### 1.4. Положения, выносимые на защиту

1. В данной работе создан генетический инструментарий, который позволяет конструировать штаммы *S. cerevisiae* с измененной экспрессией генов, не оставляя при этом в геноме чужеродной ДНК.

2. В *S. cerevisiae*  $\gamma$ -EVG может образовываться двумя путями: 1) посредством присоединения глицина к  $\gamma$ -EV Gsh2 и 2) в результате переноса  $\gamma$ -глутамильной группы GSH на VG комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>.

3. Дипептид  $\gamma$ -EV может образовываться двумя путями. При реализации первого пути,  $\gamma$ -глутамильная группа GSH может переноситься на L-валин комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и/или Ecm38. Синтез  $\gamma$ -EV по второму пути способен осуществляться Gsh1 посредством соединения L-глутамата с L-валином.

4. За деградацию VG в *S. cerevisiae* отвечает ген *DUG1*, кодирующий фермент Dug1.

5. За импорт  $\gamma$ -EVG внутрь клетки отвечает ген *HGT1*, кодирующий транспортер GSH и олигопептидов, Hgt1.

### **Публикации и апробации работы**

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патентная заявка. Апробация работы проводилась на межлабораторном семинаре АО «Научно-исследовательского Института Аджиномото-Генетика».

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из 6 разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 131 странице, включая 29 рисунков и 15 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 268 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

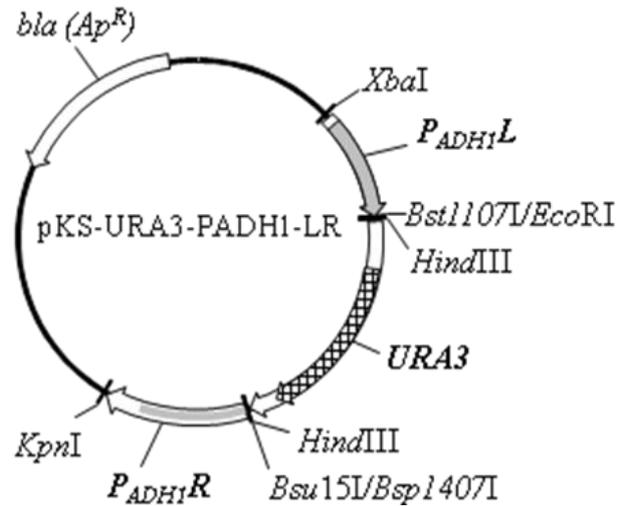
### 1. Разработка методического подхода для изучения синтеза $\gamma$ -EVG

#### 1.1. Создание генетического инструментария для обеспечения конститутивной экспрессии генов в штаммах-продуцентах *S. cerevisiae*

При создании штаммов-продуцентов, особенно для пищевой промышленности, в арсенале необходимо иметь генно-инженерный инструментарий, позволяющий конструировать штаммы, не содержащие чужеродной ДНК («self-cloning» штаммы).

Изменение уровня экспрессии целевых генов – одно из важных условий для успешного конструирования высокопродуктивных промышленных штаммов. Поэтому, для того чтобы была возможность контролировать экспрессию целевых генов, в нашей лаборатории был разработан простой метод замены промоторов для конструирования «self-cloning» штаммов. Данный метод основан на известном принципе комбинирования гомологичной рекомбинации и системы селекции-контрселекции *URA3<sup>+</sup>* и 5-ФОА (5-фторооротовая кислота).

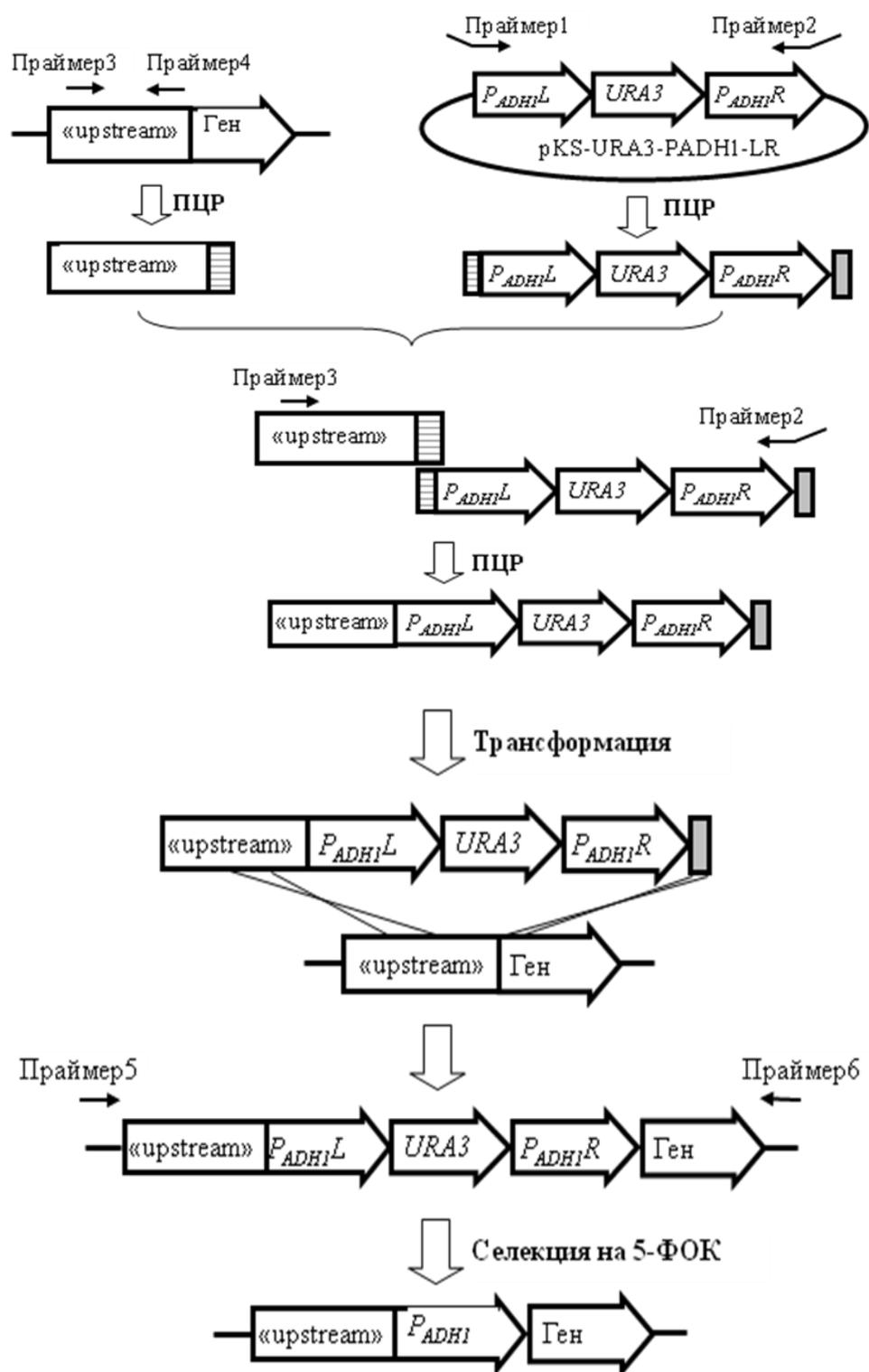
Для создания конструкции, позволяющей заменять промоторы целевых генов, была сконструирована плазида *pKS-URA3-P<sub>ADH1</sub>-L,R* (Рисунок 1). В качестве модельного промотора был выбран промотор гена *ADH1*, являющийся сильным и обеспечивающим конститутивную транскрипцию. Данная плазида была получена в результате тандемного клонирования двух фрагментов промотора *ADH1* разной длины (550 и 700 п.н.) по обе стороны от селективного маркерного гена *URA3*. При этом промоторные области клонировались таким образом, чтобы праймеры для синтеза конструкции с помощью ПЦР «отжигались» только на 5'-конце фрагмента промотора, расположенного слева от маркерного гена, и на 3'-конце фрагмента промотора, расположенного справа от маркерного гена. Также, праймеры для амплификации конструкции содержали последовательности для рекомбинации с целевым локусом.



**Рисунок 1 – Схема плазмиды pKS-URA3-PADH1-L,R.**  $P_{ADH1R}$  и  $P_{ADH1L}$ , фрагменты промотора *ADH1*, серым цветом обозначены перекрывающиеся области. Фрагмент *URA3 S.cerevisiae*, клонированный по HindIII-HindIII, штриховкой обозначена кодирующая область гена

После интеграции подобной конструкции в целевой локус и последующей контрселекции на минимальной среде с добавлением 5-ФОА, маркер элиминируется благодаря гомологичной рекомбинации между двумя tandemно расположенными повторами промотора *ADH1*, в результате чего в заданном месте генома остается одна копия промотора *ADH1* и отсутствует чужеродная ДНК.

Для увеличения частоты интеграции кассеты в целевой локус, возможно присоединение к ней протяженных участков, гомологичных целевому локусу, с помощью ПЦР. Схема замены промотора, основанная на синтезе конструкции с удлиненным участком для целевой рекомбинации и трансформации с последующей контрселекцией, изображена на Рисунке 2.

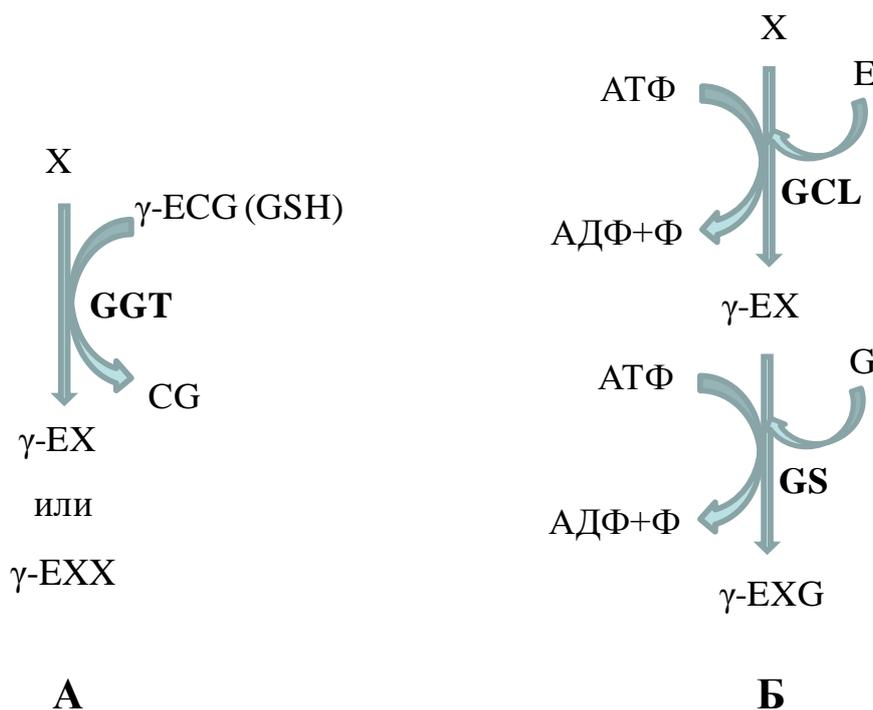


**Рисунок 2 – Схема замены промотора, основанная на синтезе конструкции для замены промоторов, трансформации и контрселекции**

В настоящей работе все штаммы с измененной экспрессией генов были получены с помощью описанного метода.

## 1.2. Образование пептидов $\gamma$ -EVG и $\gamma$ -EV в клетках *S. cerevisiae* в условиях ферментации с добавлением предшественников

Согласно литературным данным (Soga et al, 2006, Suzuki et al, 2007, Nakayama et al, 1981, Oppenheimer et al, 1979),  $\gamma$ -глутамильные пептиды, отличные от GSH, могут синтезироваться благодаря относительно широкой субстратной специфичности ферментов, участвующих в метаболизме GSH. Соответственно, процесс их синтеза может проходить по одному из двум путей: 1) в результате переноса  $\gamma$ -глутамилтрансферазой (GGT)  $\gamma$ -глутамильной группы GSH на аминокислоту/пептид (А); 2)  $\gamma$ -глутамилцистеинлигаза (GCL) или другой фермент, может образовывать  $\gamma$ -глутамильную связь между глутаматом и аминокислотой. В результате такой реакции образуется  $\gamma$ -глутамильный дипептид, который GS (глутатион синтетаза) может использовать в качестве субстрата (Б). Предполагаемые механизмы образования  $\gamma$ -глутамильных пептидов, аналогов GSH, представлены на Рисунке 3.

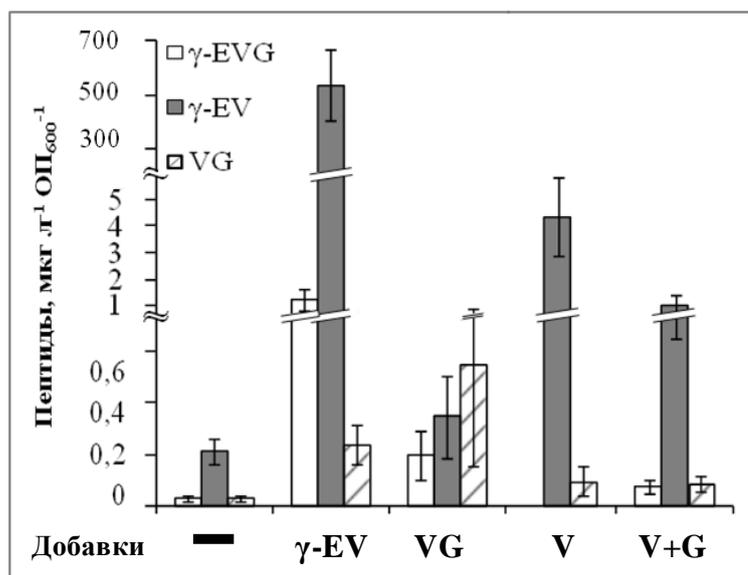


**Рисунок 3 – Механизмы образования  $\gamma$ -глутамильных пептидов.** Механизм реализуемый через  $\gamma$ -глутамилтрансферазную реакцию (А), механизм образования через лигазную реакцию, опосредованную GCL (Б)

Для изучения возможных путей синтеза  $\gamma$ -EVG в *S. cerevisiae* по предполагаемым механизмам, в первую очередь необходимо было проверить способность образования пептида в диком штамме. Для этих целей мы

провели ферментацию штамма дикого типа в SD (минимальная среда, содержащая соли, витамины, глюкозу и сульфат аммония в качестве источника азота).

Анализ результатов ферментации показал (Рисунок 4), что при культивировании клеток в минимальной среде образуется около 0,03 мкг ( $\text{л}^{-1} \text{ОП}_{600}^{-1}$ )  $\gamma$ -EVG и почти в 10 раз больше  $\gamma$ -EV. Из полученных данных видно, что  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV синтезируются в штамме дикого типа при росте на минимальной среде, но уровень  $\gamma$ -EVG в данных условиях близок к нижнему пределу детектирования. По этой причине была проведена ферментация штамма дикого типа в минимальной среде с добавлением потенциальных предшественников для синтеза  $\gamma$ -EVG – глутамата, валина, глицина,  $\gamma$ -EV и VG.



**Рисунок 4 – Образование  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV при культивировании штамма дикого типа SOA4 в минимальной среде с добавлением  $\gamma$ -EV, VG, валина, валина и глицина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

Анализ пептидных продуктов в результате культивирования клеток в SD с добавлением валина (Рисунок 4) показал, что накопление  $\gamma$ -EV в среде с валином увеличилось в 20 раз, а в случае культивирования клеток в SD с валином и глицином увеличились концентрации и  $\gamma$ -EV, и  $\gamma$ -EVG.

В результате ферментации клеток в SD с добавлением  $\gamma$ -EV (Рисунок 4) концентрации  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV увеличились в 50 и 2500 раз, соответственно.

Полученные данные согласуются с механизмом образования  $\gamma$ -глутамильных соединений, приведенным на Рисунке 3Б.

Анализ экстрактов, полученных в результате культивирования в SD с добавлением VG, показал, что концентрация  $\gamma$ -EVG увеличилась почти в 10 раз по сравнению с накоплением пептида при культивировании в SD. Полученные результаты согласуются с механизмом, представленным на Рисунке 3А.

Внесение L-глутамата в среды не влияло на изменение концентраций исследуемых пептидов. Видимо, как и в случае синтеза GSH из предшественников (Wang et al, 2012), пул внутриклеточного глутамата находился в избытке, поэтому при добавлении его в среду культивирования концентрация GSH не увеличивалась. По этой причине результаты ферментаций с добавлением глутамата не приведены в настоящей работе.

Таким образом, мы продемонстрировали, что синтез  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG увеличивается при добавлении в среду культивирования предшественников, соответствующих обоим известным путям синтеза  $\gamma$ -глутамильных пептидов. В дальнейшей работе мы исследовали, какие ферменты принимают участие в синтезе  $\gamma$ -EVG, а также в синтезе дипептида  $\gamma$ -EV, который также был обнаружен в клетках *S. cerevisiae*.

## **2. Изучение путей образования $\gamma$ -EVG из различных предшественников**

### **2.1. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе $\gamma$ -EVG из $\gamma$ -EV**

Главным претендентом на синтез  $\gamma$ -EVG из  $\gamma$ -EV являлся второй фермент синтеза GSH, GS, кодируемый геном *GSH2*. Для проверки данного предположения, мы изучили влияние усиления экспрессии и инактивации гена *GSH2* на уровень накопления  $\gamma$ -EVG в условиях ферментации в среде SD с добавлением  $\gamma$ -EV.

Для этой цели были сконструированы производные штамма SOA4, содержащие делецию гена *GSH2* или замену промотора *GSH2* на сильный конститутивный промотор *ADH1*. Таким образом, были получены штаммы *gsh2* $\Delta$  и *P<sub>ADH1</sub>-GSH2*, соответственно. Увеличение числа копий мРНК в штамме *P<sub>ADH1</sub>-GSH2* было подтверждено ПЦР в реальном времени. Также, было продемонстрировано, что замена промотора *GSH2* на промотор *ADH1* увеличивала активность Gsh2 (Таблица 1).

Таблица 1 – Изменение экспрессии *GSH2* и активности Gsh2

Штамм	Относительная концентрация мРНК <i>GSH2</i>	Относительная активность Gsh2
WT	1	1
<i>P<sub>ADHI</sub>-GSH2</i>	7 ± 1	14

После ферментации полученных штаммов в минимальной среде с добавлением  $\gamma$ -EV, экстракты анализировались на накопление  $\gamma$ -EVG. Как можно видеть на Рисунке 5, в штамме с инактивированным геном *GSH2* образование  $\gamma$ -EVG существенно ниже, чем у контрольного штамма SOA4. Штамм, в котором ген *GSH2* был сверхэкспрессирован, напротив, показал увеличение уровня накопления  $\gamma$ -EVG в 25 раз выше по сравнению с контрольным штаммом.

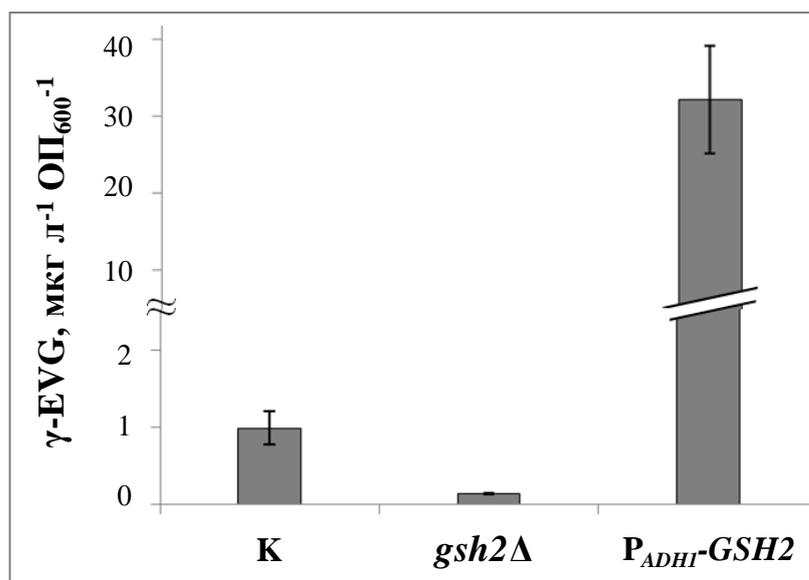


Рисунок 5 – Влияние инактивации и сверхэкспрессии гена *GSH2* на синтез  $\gamma$ -EVG из  $\gamma$ -EV (К – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, полученные данные указывают на то, что Gsh2 является основным ферментом, синтезирующим  $\gamma$ -EVG из  $\gamma$ -EV.

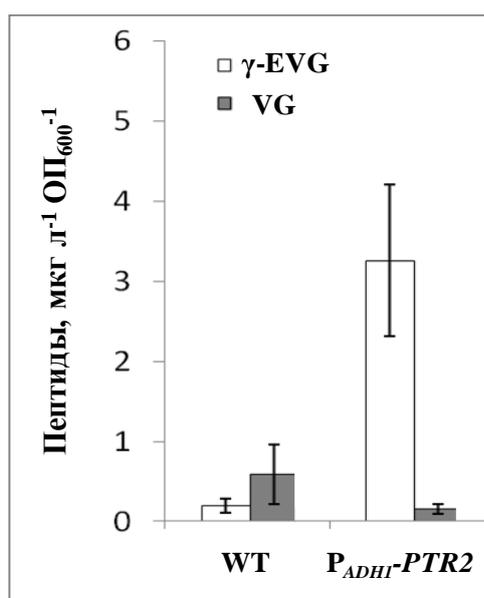
## 2.2. Идентификация ферментов, участвующих в синтезе $\gamma$ -EVG из VG

### 2.2.1. Факторы, влияющие на образование $\gamma$ -EVG из VG

#### 2.2.1.1. Влияние импорта VG на синтез $\gamma$ -EVG

Согласно литературным данным, ионы аммония ингибируют транспорт пептидов внутрь клеток (Hauser et al, 2001). Более того, известно, что импорт дипептидов подвергается N-правилу, согласно которому, пептиды, входящие в класс N-концевых, через каскад событий способствуют деградации белка Cup9, который является репрессором главного транспортера дипептидов *PTR2*. N-концевыми пептидами называют пептиды, содержащие в N-концевой области дестабилизирующие аминокислоты (Turner et al, 2000). L-валин не относится к дестабилизирующим аминокислотам, поэтому транспортер дипептидов *PTR2* находится в клетках, культивируемых на среде с добавлением VG, в репрессированном состоянии.

Для того чтобы убрать влияние перечисленных выше факторов и усилить импорт VG в клетку, мы заменили нативную регуляторную область *PTR2* на конститутивный и сильный промотор гена *ADHI1*. По результатам ферментации в среде SD+VG полученного штамма *P<sub>ADHI1</sub>-PTR2* (Рисунок 6) можно видеть, что при конститутивной экспрессии *PTR2*, концентрация  $\gamma$ -EVG увеличилась почти в 3,5 раза по сравнению с экспрессией *PTR2* под нативным промотором.



**Рисунок 6 – Влияние конститутивной экспрессии *PTR2* на накопление  $\gamma$ -EVG (К – WT).** Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, в условиях данного эксперимента нам удалось показать, что усиление импорта VG увеличивает накопление  $\gamma$ -EVG.

### 2.2.1.2. Влияние деградации VG на синтез $\gamma$ -EVG

Для последующего изучения синтеза  $\gamma$ -EVG из VG в качестве предшественника, необходимо было доказать является ли VG акцептором  $\gamma$ -глутамильной группы или источником валина и глицина, так как в описанном выше эксперименте, несмотря на увеличение накопления  $\gamma$ -EVG штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*, уровень накопления VG не увеличивался (Рисунок 6), что косвенно указывает на деградацию дипептида в клетках. Для решения этого вопроса, необходимо было идентифицировать пептидазы, способные деградировать VG, и определить влияние их инактивации на синтез  $\gamma$ -EVG.

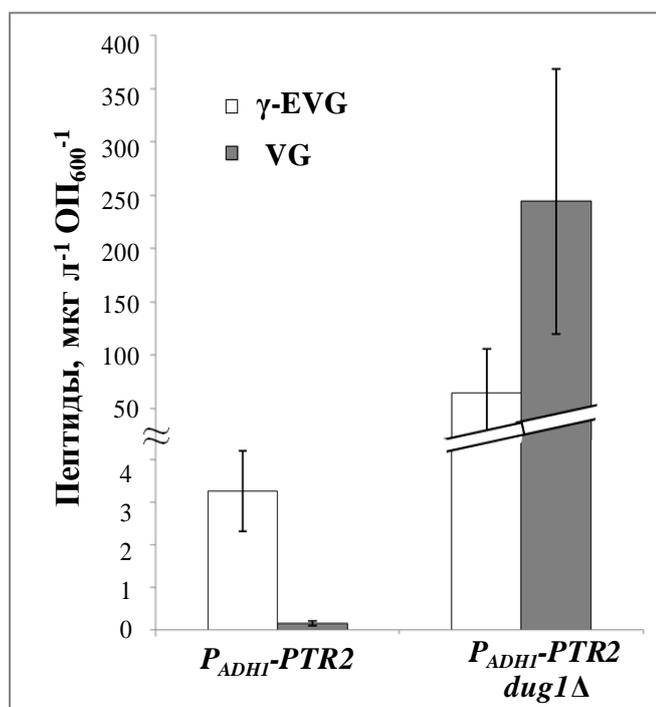
В качестве пептидаз, способных деградировать VG, рассматривались аннотированные белки, обладающие пептидазной или протеазной активностью. В результате поиска были отобраны тринадцать ферментов потенциально способных деградировать VG. Так же мы включили в список выбранных пептидаз белки, участвующие в альтернативном пути деградации GSH, – Dug1, Dug2 и Dug3. Для анализа накопления VG была использована коллекция штаммов дрожжей *S. cerevisiae* BY4741, содержащих одиночные делеции всех генов. Ферментацию штаммов с инактивированными генами выбранных пептидаз проводили в минимальной среде с добавлением пролина в качестве источника азота (выше было отмечено о влиянии источника азота на импорт пептидов) и 100 мг/л VG.

Анализ данных, полученных после проведения ферментации штаммов из коллекции одиночных делеций генов, выявил, что в штамме с инактивированным геном *DUG1* накопление VG в 3000 раз выше, чем в исходном штамме. Более того, концентрация  $\gamma$ -EVG в этом штамме увеличилась в 500 раз по сравнению с исходным штаммом. Кроме того, мы обратили внимание на то, что штаммы с делециями генов *DUG2* и *DUG3* не образуют  $\gamma$ -EVG (Таблица 2). Дальнейшее исследование роли белков Dug2 и Dug3 в синтезе  $\gamma$ -EVG будет описано в Главе 2.2.2.

**Таблица 2** – Влияние инактивации пептидаз на накопление VG и  $\gamma$ -EVG

Инактивированный ген	VG, мкг л <sup>-1</sup> ОП <sub>600</sub> <sup>-1</sup>	$\gamma$ -EVG, мкг л <sup>-1</sup> ОП <sub>600</sub> <sup>-1</sup>
-	0,2	0,7
<i>aap1</i>	0,02	1,5
<i>dap2</i>	0,02	1,9
<i>ecm14</i>	0,07	1,3
<i>omal</i>	0,02	1,8
<b><i>dug1</i></b>	<b>597,4</b>	<b>354,7</b>
<i>sdd3</i>	0,02	1,9
<i>yta12</i>	0,13	1,1
<i>lap4</i>	0,05	1,8
<i>prc1</i>	0,05	2,1
<i>dug3</i>	0,02	<0,05
<i>pep4</i>	0,03	2,7
<i>pim1</i>	0,02	1,9
<i>prb1</i>	0,02	2,0
<i>cym1</i>	0,05	2,4
<i>ape3</i>	0,05	2,5
<i>dug2</i>	0,05	<0,05

Для подтверждения влияния делеции *DUG1* на накопление VG и  $\gamma$ -EVG, мы инактивировали этот ген в штамме *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*. Ферментацию штаммов *P<sub>ADHI</sub>-PTR2* и *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 dug1 $\Delta$*  проводили в SD с добавлением VG. Как показано на Рисунке 7, накопление VG штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 dug1 $\Delta$*  увеличилось в 1000 раз, а накопление  $\gamma$ -EVG более, чем в 10 раз по сравнению с исходным штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*.



**Рисунок 7 – Влияние делеции гена *DUG1* на накопление VG и  $\gamma$ -EVG штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2* в SD с добавлением VG. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

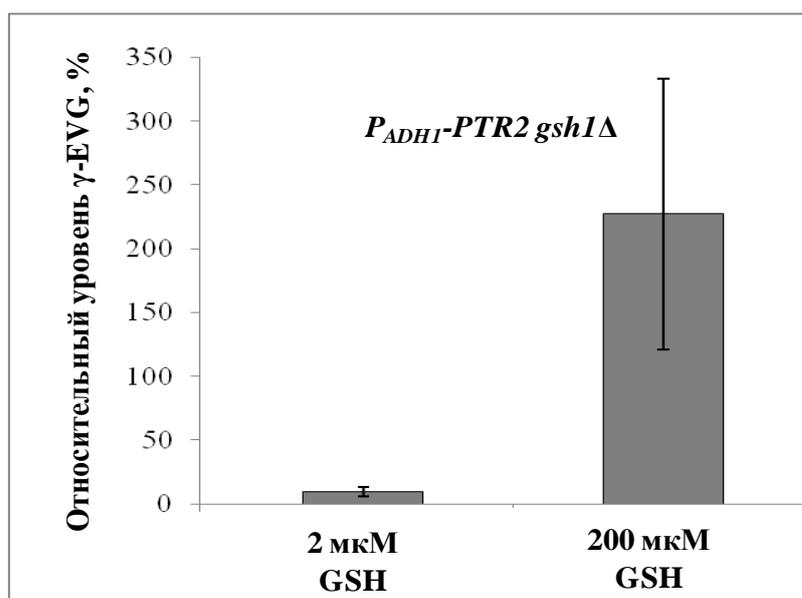
Таким образом, полученные данные указывают на то что, во-первых, Dug1 обладает пептидазной активностью *in vivo* в отношении VG. Ранее, было продемонстрировано, что Dug1 проявляет высокую субстратную специфичность в отношении дипептида CG (Kaur et al, 2009). Во-вторых, VG при добавлении его в питательную среду, а не валин и глицин, является предшественником  $\gamma$ -EVG.

### 2.2.1.3. Влияние GSH на синтез $\gamma$ -EVG из VG

Для того чтобы подтвердить, что донором  $\gamma$ -глутамильной группы при синтезе  $\gamma$ -EVG из VG является GSH, мы изучили влияние концентрации GSH на образование  $\gamma$ -EVG. Для этих целей первый ген синтеза GSH *GSH1* был инактивирован в штамме *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*. Для полученного штамма *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* была подобрана концентрация GSH (2мкМ), ограничивающая рост культуры до ОП<sub>600</sub> 4 о.е. (*S. cerevisiae* является ауксотрофом по GSH в результате инактивации *GSH1*). В качестве нелимитирующей концентрации GSH использовали концентрацию 200 мкМ, которая обеспечивала рост штамма *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* до ОП<sub>600</sub> родительского штамма. После подбора

условий, клетки штамма *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* культивировались в SD+VG с концентрациями GSH 2 мкМ и 200 мкМ.

Как можно видеть из Рисунка 8, штамм *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* при росте в среде с добавлением 2 мкМ GSH накапливал всего 10%  $\gamma$ -EVG по сравнению с исходным штаммом, а при росте в среде с добавлением 200 мкМ GSH уровень накопления  $\gamma$ -EVG был такой же или выше, чем в исходном штамме. Из проведенного опыта можно сделать вывод, что синтез  $\gamma$ -EVG из VG зависит от концентрации GSH в ферментационной среде.



**Рисунок 8 – Влияние концентрации GSH на образование  $\gamma$ -EVG из VG.** За 100% взято образование  $\gamma$ -EVG при культивировании *P<sub>ADHI</sub>-PTR2* в минимальной среде без добавления GSH. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для доказательства того, что при росте на лимитирующей и нелимитирующей концентрациях GSH существует разница во внутриклеточном его накоплении, мы измерили концентрацию GSH в условиях ферментации штамма *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* в SD с добавлением 2 мкМ (0,6 мг/л) и 200 мкМ (60 мг/л) GSH (Таблица 3).

**Таблица 3 – Накопление GSH штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ***

GSH в минимальной среде, мг/л	GSH внутриклеточный, мг л <sup>-1</sup> ОП <sub>600</sub> <sup>-1</sup>
0,6	НД*
60	0,58 ± 0,04

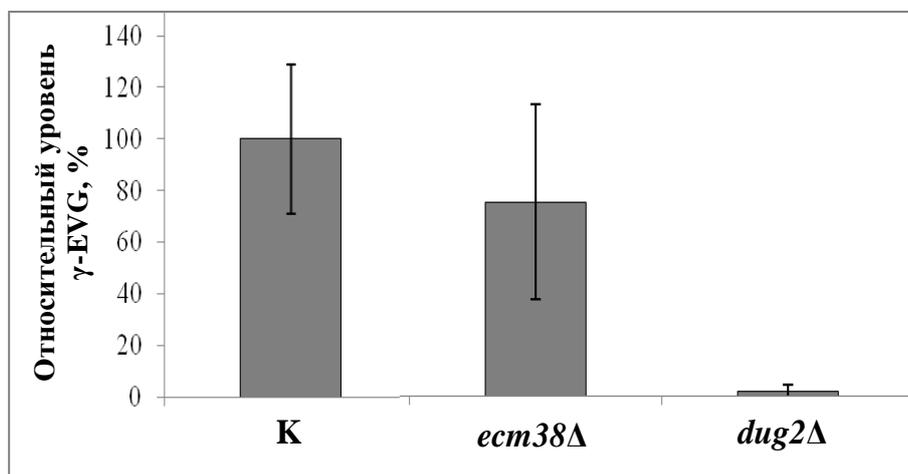
\* - не детектируется, ниже предела количественного обнаружения (<0,1 мг/л/ ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>)

Из представленных данных видно, что при росте штамма *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 gsh1Δ* в минимальной среде с лимитирующей концентрацией GSH, его накопление ниже предела количественного обнаружения (<0,1 мг/л/ ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>).

Таким образом, полученные результаты согласуются с нашим предположением, что GSH является донором  $\gamma$ -глутамильной группы при синтезе  $\gamma$ -EVG из VG.

### 2.2.2. Исследование путей синтеза $\gamma$ -EVG из VG

Для исследования путей синтеза  $\gamma$ -EVG из VG нами было выбрано два направления. Сначала мы решили проверить возможный вклад фермента GGT, имеющего довольно широкую субстратную специфичность, в образование  $\gamma$ -EVG из VG. Для этой цели мы инактивировали ген *ECM38*, кодирующий GGT, в штамме *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*. Полученный штамм *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 ecm38Δ* анализировали на накопление  $\gamma$ -EVG после ферментации в среде SD+VG. Как видно из Рисунка 9, штамм *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 ecm38Δ* не показал значительного изменения уровня  $\gamma$ -EVG по сравнению с исходным штаммом *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*.

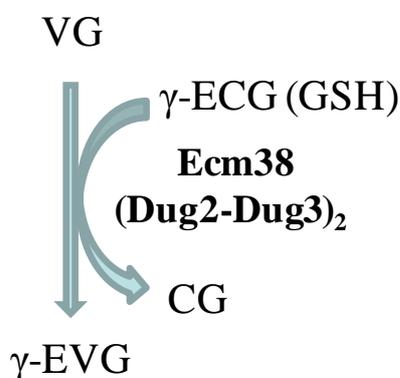


**Рисунок 9 – Образование  $\gamma$ -EVG из VG в условиях конститутивной экспрессии *PTR2* и инактивации генов *ECM38* и *DUG2* (К – *P<sub>ADHI</sub>-PTR2*). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

Из полученных данных можно сделать вывод, что инактивация *ECM38* не оказывала существенного влияния на уровень накопления  $\gamma$ -EVG в том случае, когда VG служил акцептором  $\gamma$ -глутамильной группы.

При поиске пептидаз с активностью по отношению к VG мы заметили, что штаммы BY4741 *dug3* $\Delta$  и BY4741 *dug2* $\Delta$  при культивировании клеток в среде с добавлением VG не образуют  $\gamma$ -EVG (см. Таблицу 2). Поэтому в качестве второго направления в исследовании пути синтеза  $\gamma$ -EVG из VG, мы решили проверить возможность образования  $\gamma$ -EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>. Для данного эксперимента мы инактивировали ген *DUG2* в штамме *P<sub>ADHI</sub>-PTR2* и полученный штамм *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 dug2* $\Delta$  культивировали в среде SD с добавлением VG. Анализ проведенной ферментации показал, что накопление  $\gamma$ -EVG в штамме *P<sub>ADHI</sub>-PTR2 dug2* $\Delta$  не происходило (Рисунок 9), из чего следует, что образование  $\gamma$ -EVG из VG осуществляется в основном благодаря комплексу белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>. Таким образом, полученные данные указывают на то, что комплекс белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> обладает  $\gamma$ -глутамилтрансферазной активностью.

На Рисунке 10 представлена схема образования  $\gamma$ -EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>.



**Рисунок 10 – Схема образования  $\gamma$ -EVG из VG комплексом белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38**

## **2.3. Идентификация ферментов участвующих в синтезе $\gamma$ -EV**

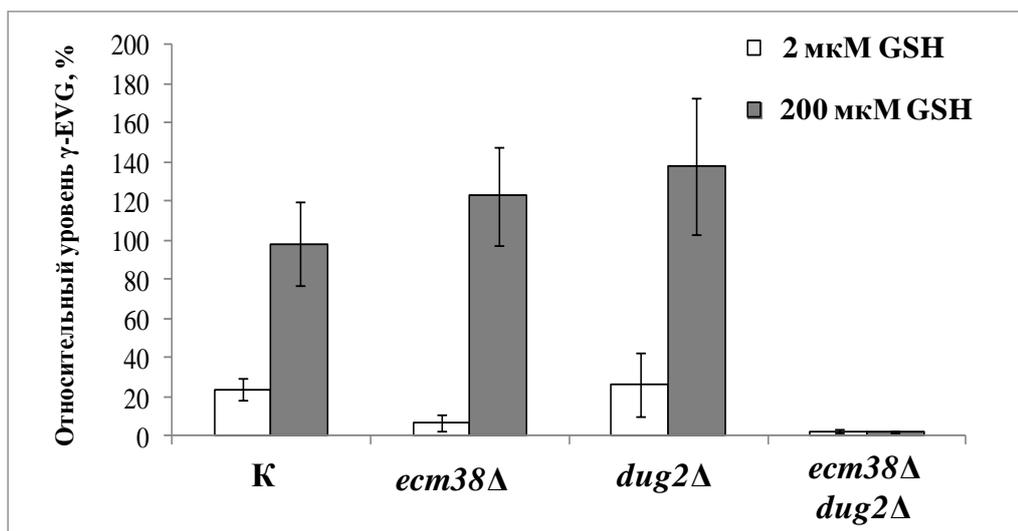
### **2.3.1. Синтез $\gamma$ -EV ферментами деградации GSH**

Как было отмечено выше, образование  $\gamma$ -глутамильных пептидов может происходить в результате метаболизма GSH двумя способами: благодаря  $\gamma$ -глутамилтрансферазной активности ферментов деградативного пути GSH и посредством ферментов синтеза GSH.

Для того чтобы исследовать образование  $\gamma$ -EV ферментами деградационного пути, мы сконструировали штамм с инактивированным геном *GSH1*. Далее была проведена ферментация штамма *gsh1* $\Delta$  в условиях культивирования в среде SD с добавлением 1 г/л валина и лимитирующей и нелимитирующей рост клеток концентрациями GSH, 2 мкМ и 200 мкМ, соответственно. Как видно из Рисунка 11, штамм с инактивированным геном *GSH1* в условиях роста с добавлением валина и нелимитирующей концентрации GSH имел тот же уровень накопления  $\gamma$ -EV, что и исходный штамм (SOA4 при росте в SD с добавлением 1 г/л валина). В условиях культивирования штамма *gsh1* $\Delta$  в среде SD с валином и лимитирующей рост концентрацией GSH уровень накопления  $\gamma$ -EV составил 20% от накопления родительским штаммом. Этот результат подтверждает предположение о том, что в описанных условиях образование  $\gamma$ -EV происходит ферментами деградационного пути, и донором  $\gamma$ -глутамильной группы является GSH.

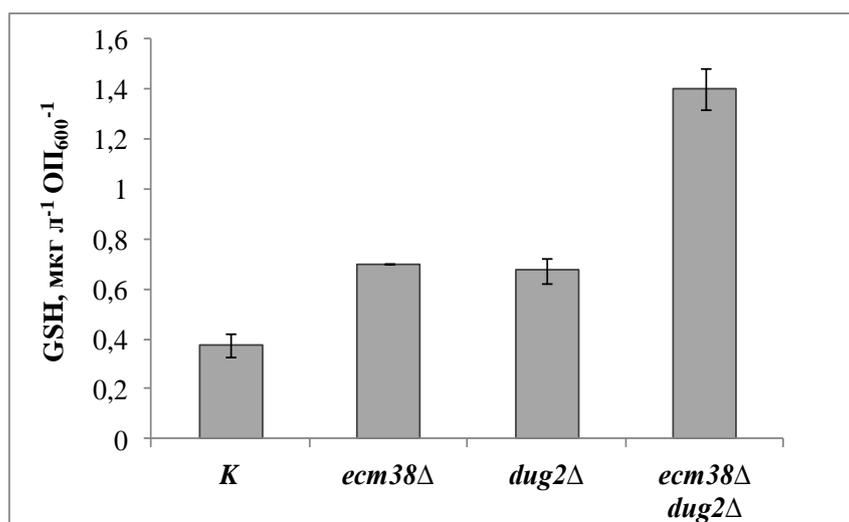
Для того чтобы исследовать вклад ферментов деградационного пути, комплекса белков (*Dug2-Dug3*)<sub>2</sub> и *Ecm38*, в синтез  $\gamma$ -EV из валина, мы ввели в штамм *gsh1* $\Delta$  следующие модификации: делеции генов *ECM38* и *DUG2* по отдельности, а также совместили делеции этих генов в одном штамме. Таким образом, были сконструированы штаммы *gsh1* $\Delta$  *ecm38* $\Delta$ , *gsh1* $\Delta$  *dug2* $\Delta$  и *gsh1* $\Delta$  *ecm38* $\Delta$  *dug2* $\Delta$ . Ферментацию полученных штаммов проводили в условиях, описанных выше для штамма *gsh1* $\Delta$ .

По результатам ферментации штаммов в среде SD с добавлением валина и лимитирующей и нелимитирующей концентрациями GSH (Рисунок 11) можно видеть, что накопление  $\gamma$ -EV значительно снижалось только в штамме *gsh1* $\Delta$  *ecm38* $\Delta$  *dug2* $\Delta$ . В штаммах с инактивированными генами *ECM38* и *DUG2* по отдельности уровень накопления  $\gamma$ -EV был как минимум не ниже, чем в исходном штамме. Таким образом, полученные данные указывают на то, что синтез  $\gamma$ -EV осуществляется и *Ecm38*, и комплексом (*Dug2-Dug3*)<sub>2</sub>. Кроме того, поскольку одиночные делеции *ECM38* и *DUG2* не влияли на уровень  $\gamma$ -EV, можно предположить, что при достижении определенной внутриклеточной концентрации дипептида, начинается его деградация.



**Рисунок 11 – Влияние делеций *DUG2* и *ECM38* на синтез  $\gamma$ -EV в условиях блокировки синтеза GSH *in vivo* (K – *gsh1Δ*). За 100% взято образование  $\gamma$ -EV при культивировании WT в среде SD с добавлением 1 г/л валина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

Для дополнительного доказательства того, что комплекс (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> и Ecm38 используют именно GSH в качестве донора  $\gamma$ -глутамильного остатка при синтезе  $\gamma$ -EV, мы измерили концентрацию GSH в штаммах *gsh1Δ*, *gsh1Δ ecm38Δ*, *gsh1Δ dug2Δ* и *gsh1Δ ecm38Δ dug2Δ*. Исследуемые штаммы культивировались в среде SD с нелимитирующей концентрацией GSH (200 мкМ). Результаты ферментации приведены на Рисунке 12.



**Рисунок 12 – Изменение концентрации GSH в условиях блокировки синтеза GSH *in vivo* при инактивации генов *ECM38* и *DUG2* (K – *gsh1Δ*). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

Можно видеть, что в штаммах, которые содержат одиночные делеции генов *ECM38* и *DUG2* концентрация GSH увеличилась в два раза по сравнению с исходным штаммом. В то же время в штамме, в котором инактивированы оба гена *ECM38* и *DUG2*, концентрация GSH стала больше почти в 4 раза по сравнению с родительским штаммом, что указывает на наличие суммарного эффекта двух делеций.

Полученный результат подтверждает предположение о том, что GSH является донором  $\gamma$ -глутамильного остатка для синтеза  $\gamma$ -EV комплексом (*Dug2-Dug3*)<sub>2</sub> и *Ecm38* в условиях, когда *GSH1* инактивирован.

### 2.3.2. Образование $\gamma$ -EV ферментами синтеза GSH

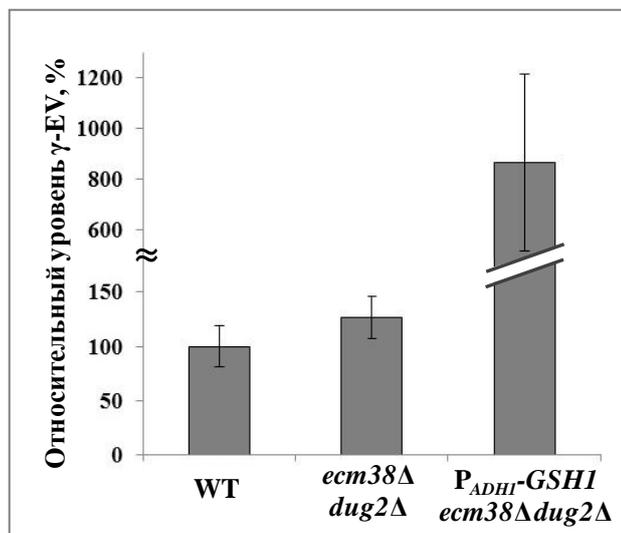
Для того чтобы исследовать возможность образования  $\gamma$ -EV под действием первого фермента синтеза GSH, *Gsh1*, был проведен следующий опыт. Мы инактивировали гены *ECM38* и *DUG2* в штамме дикого типа DAG29. Полученный штамм *ecm38Δ dug2Δ* культивировали в среде SD с добавлением 1г/л валина. По результатам ферментации (Рисунок 13) видно, что штамм *ecm38Δ dug2Δ* накапливал столько же  $\gamma$ -EV, сколько исходный штамм. Этот факт указывает на то, что при данном генотипе  $\gamma$ -EV образуется в результате соединения глутамата и валина, катализируемого ферментом *Gsh1*, так как выше было показано, что при инактивации генов *ECM38*, *DUG2* и *GSH1* накопление  $\gamma$ -EV отсутствует. Для дополнительного подтверждения того, что образование  $\gamma$ -EV осуществляется *Gsh1* в случае, когда гены *ECM38* и *DUG2* инактивированы, мы заменили нативную регуляторную область гена *GSH1* на конститутивный промотор гена *ADH1*. Увеличение экспрессии *GSH1* было подтверждено ПЦР в реальном времени и измерением активности *Gsh1* (Таблица 4).

Таблица 4 – Изменение экспрессии *GSH1* и активности *Gsh1*

Штамм	Относительная концентрация мРНК <i>GSH1</i>	Относительная активность <i>Gsh1</i>
WT	1	1
<i>P<sub>ADH1</sub>-GSH1</i>	11 ± 1	3.3

Ферментацию штамма *P<sub>ADH1</sub>-GSH1 ecm38Δ dug2Δ* проводили в условиях,

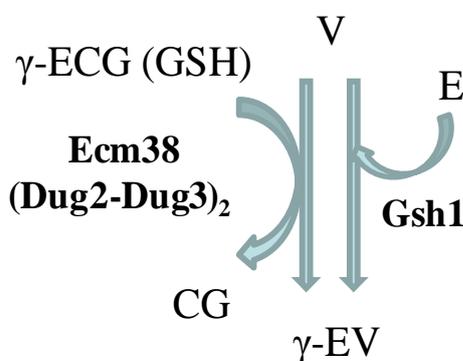
описанных выше для штамма *ecm38Δ dug2Δ*. Как видно из Рисунка 13, накопление  $\gamma$ -EV в штамме  $P_{ADHI-GSH1} ecm38\Delta dug2\Delta$  в 8 раз выше по сравнению с родительским штаммом *ecm38Δ dug2Δ*.



**Рисунок 13** – Влияние инактивации генов *ECM38*, *DUG2* и сверхэкспрессии *GSH1* на образование  $\gamma$ -EV (К – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Таким образом, можно заключить, что синтез  $\gamma$ -EV способен проходить двумя путями. Во-первых, Gsh1 может соединять глутамат с валином с образованием  $\gamma$ -EV. Во-вторых,  $\gamma$ -EV может образовываться в результате активности ферментов деградации GSH, комплекса белков  $(Dug2-Dug3)_2$  и/или Ecm38, которые способны перенести  $\gamma$ -глутамильный остаток GSH на валин.

На Рисунке 14 представлена схема образования  $\gamma$ -EV ферментами метаболизма GSH при использовании валина в качестве предшественника.



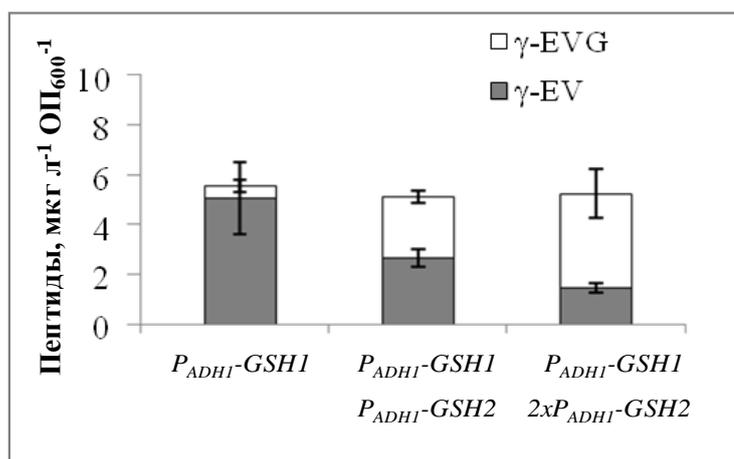
**Рисунок 14** – Схема образования  $\gamma$ -EV из валина ферментами метаболизма GSH

### 3. Синтез $\gamma$ -EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза GSH

Ранее мы показали возможность образования  $\gamma$ -EV ферментом Gsh1 при культивировании штаммов в среде с валином. Также была продемонстрирована способность синтеза  $\gamma$ -EVG белком Gsh2 в процессе культивирования штаммов в среде с добавлением  $\gamma$ -EV.

Для того чтобы исследовать эффективность образования  $\gamma$ -EVG ферментами биосинтеза GSH, мы проанализировали накопление  $\gamma$ -EVG при одновременной сверхэкспрессии генов *GSH1* и *GSH2*. Для этой цели мы заменили промотор гена *GSH2* на конститутивный промотор гена *ADH1* в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1*. Полученный штамм  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2* культивировали в SD с добавлением валина и глицина, так как ранее было продемонстрировано, что присутствие глицина в среде увеличивает накопление  $\gamma$ -EVG (Рисунок 4).

По результатам ферментации (Рисунок 15) можно заключить, что замена промотора *GSH2* на регуляторную область гена *ADH1* в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1* значительно изменила соотношения  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG. Концентрация  $\gamma$ -EVG в штамме  $P_{ADH1}$ -*GSH1*  $P_{ADH1}$ -*GSH2* увеличилась почти в 4 раза по сравнению с исходным штаммом. В то же время конверсия  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG составила только 40%.



**Рисунок 15 – Синтез  $\gamma$ -EVG при усиленной экспрессии генов синтеза GSH.** Штаммы культивировались в среде SD с добавлением валина и глицина. Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений

Для того чтобы подтвердить, что конверсия  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG лимитирована глутатион-синтазной активностью, мы интегрировали вторую

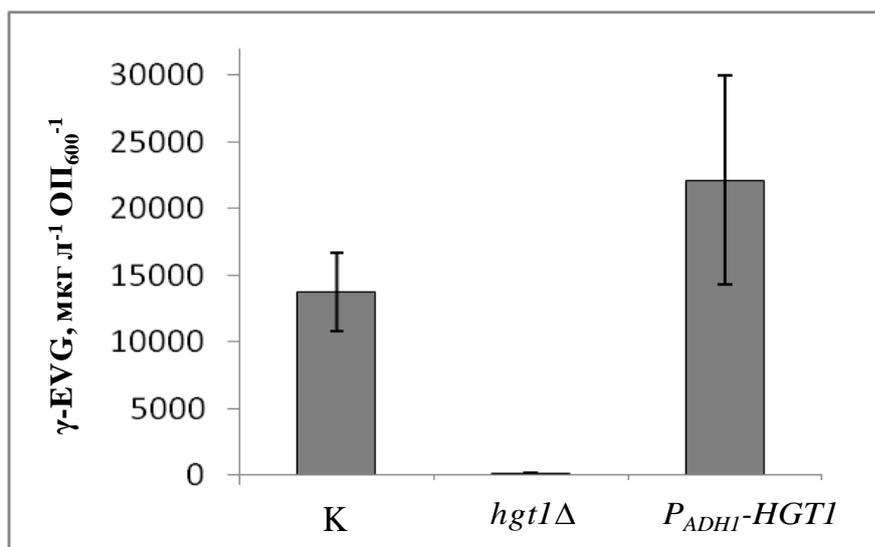
копию *GSH2* под контролем промотора гена *ADH1* в локус *PDC1* штамма  $P_{ADH1-GSH1}$   $P_{ADH1-GSH2}$ . Для накопления  $\gamma$ -EVG полученный штамм  $P_{ADH1-GSH1}$   $2xP_{ADH1-GSH2}$  культивировали в условиях, описанных выше для  $P_{ADH1-GSH1}$  и  $P_{ADH1-GSH1}$   $P_{ADH1-GSH2}$ . По результатам ферментации штамм  $P_{ADH1-GSH1}$   $2xP_{ADH1-GSH2}$  (Рисунок 15) можно видеть, что концентрация  $\gamma$ -EVG увеличилась в 2 раза по сравнению  $P_{ADH1-GSH1}$   $P_{ADH1-GSH2}$ , что составило примерно 80% суммарной конверсии  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG. Таким образом, для более полной конверсии  $\gamma$ -EV, образующегося в результате сверхэксперсии *GSH1*, в  $\gamma$ -EVG необходим более высокий уровень экспрессии *GSH2*.

По-видимому, неполная конверсия даже при амплификации гена *GSH2* под конститутивным промотором, связана с тем, что белок Gsh2 имеет невысокую субстратную специфичность к  $\gamma$ -EV, что не противоречит литературным данным, согласно которым очищенная GS из почечной ткани крыс при измерении *in vitro* показала нулевую или слабую активность по отношению к большинству  $\gamma$ -глутамильных пептидов, кроме  $\gamma$ -глутамил-L-цистеина (102%),  $\gamma$ -глутамил-L-серина (77%) и  $\gamma$ -глутамил-L-аланина (55%). За 100% была взята активность GS по отношению к  $\gamma$ -глутамил-L- $\alpha$ -аминобутирату (Oppenheimer et al, 1979).

Таким образом, можно сделать два вывода. Во-первых, штамм  $P_{ADH1-GSH1}$   $2xP_{ADH1-GSH2}$  (накопление  $\gamma$ -EVG – 4 мкг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>, Рисунок 15) способен более, чем в 40 раз эффективнее образовывать  $\gamma$ -EVG, чем штамм дикого типа в тех же условиях (накопление  $\gamma$ -EVG – менее 0,1 мкг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>, Рисунок 4). Во-вторых, невысокую субстратную специфичность Gsh2 по отношению к  $\gamma$ -EV можно компенсировать путем его дальнейшей амплификации.

#### 4. Поиск импортера $\gamma$ -EVG

Для того чтобы исследовать способность  $\gamma$ -EVG транспортироваться внутрь клетки, мы провели ферментацию штамма дикого типа SOA4 в среде SD с добавлением 100 мг/л  $\gamma$ -EVG. Как видно из Рисунка 16, WT накапливал 13 мг л<sup>-1</sup> ОП<sub>600</sub><sup>-1</sup>  $\gamma$ -EVG, что указывает на наличие интенсивного поглощения  $\gamma$ -EVG из среды. В качестве главного претендента, способного к переносу  $\gamma$ -EVG внутрь клетки, исследовался известный транспортер олигопептидов и GSH, Hgt1.



**Рисунок 16 – Образование  $\gamma$ -EVG в условиях инактивации и конститутивной экспрессии гена *HGT1* (К – WT). Приведены усредненные значения (доверительный интервал 95%) не менее 3-х независимых определений**

Для проверки предположения, что Hgt1 является транспортером  $\gamma$ -EVG внутрь клетки, мы изучили влияние сверхэкспрессии и инактивации гена *HGT1* в условиях ферментации клеток с добавлением  $\gamma$ -EVG. Для этих целей в штамме дикого типа был удален ген *HGT1* и полученный штамм *hgt1Δ* культивировался в среде SD с добавлением 100 мг/л  $\gamma$ -EVG. По результатам ферментации (Рисунок 16) видно, что накопление  $\gamma$ -EVG в штамме *hgt1Δ* снизилось более чем в 100 раз, что указывает на то, что Hgt1 является основным транспортером  $\gamma$ -EVG в клетку.

Для дальнейшего подтверждения влияния *HGT1* на уровень накопления  $\gamma$ -EVG мы обеспечили этот ген конститутивной экспрессией. Для этих целей в штамме SOA4 заменили промоторную область гена *HGT1* на промотор гена *ADHI*, который является сильным и конститутивным. Полученный штамм *P<sub>ADHI</sub>-HGT1* культивировали способом, описанным выше для штамма *hgt1Δ*. Как видно из Рисунка 16, замена промотора *HGT1* на промотор *ADHI* увеличила накопление  $\gamma$ -EVG.

Таким образом, из представленных данных видно, что за транспорт  $\gamma$ -EVG внутрь клетки отвечает *HGT1*, кодирующий импортер GSH и олигопептидов.

## Выводы

1. Создан генетический инструментарий для многократной «бесшовной» замены промоторов целевых генов *S. cerevisiae*.
2. Впервые изучен биосинтез  $\gamma$ -глутамильных трипептидов, аналогов GSH, на примере трипептида  $\gamma$ -EVG, обладающего ценными вкусовыми свойствами, в клетках *S. cerevisiae*. Показано, что добавление в среду культивирования дипептидов  $\gamma$ -EV и VG, а также свободных аминокислот, валина и глицина, повышает синтез  $\gamma$ -EVG.
3. Продемонстрировано, что за синтез  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG в клетках *S. cerevisiae* отвечают гены синтеза и деградации GSH.
4. Впервые получены данные, указывающие на то, что отщепляющий  $\gamma$ -глутамильную группу глутатиона комплекс (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>, участвует в переносе  $\gamma$ -глутамильной группы на VG и валин.
5. Впервые продемонстрировано, что ген *DUG1*, кодирующий пептидазу, специфичную к CG, отвечает за деградацию дипептида VG.
6. Впервые продемонстрировано, что ген *HGT1*, кодирующий импортер олигопептидов и глутатиона, отвечает за транспорт  $\gamma$ -EVG внутрь клетки.
7. Показано, что сверхэкспрессия генов синтеза глутатиона, *GSH1* и *GSH2*, приводит к увеличению синтеза  $\gamma$ -EVG у *S. cerevisiae*.

## Список публикаций

1. Нисиути Х., Хосино В., Мизукоши Т., Серебряный В.А., Софьянович О.А. и Чешев Д.А. Дрожжевой экстракт, содержащий гамма-Glu-X или гамма-Glu-X-Gly, и способ его получения. RU 2496864 С2 (Дата подачи заявки №2010127403: 05.07.2010).
2. Sofyanovich O.A., Nishiuchi H., Yamagishi K., Maekawa K., Serebryanyy V.A. (2011). A new method for repeated "self-cloning" promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol.* 48(3): 218-27.
3. Sofyanovich O.A., Nishiuchi H., Yamagishi K., Matrosova E.V., Serebryanyi V.A. (2019). Multiple pathways for the formation of the  $\gamma$ -glutamyl peptides  $\gamma$ -glutamyl-valine and  $\gamma$ -glutamyl-valyl-glycine in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 14(5): e0216622.