

# О Г Л Я Д И

УДК 577.28 576.342 582.282.23 546.72

## ОБМІН ЗАЛІЗА У ДРІЖДЖІВ

Д. В. ГОСПОДАРЬОВ, В. І. ЛУЩАК

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;  
e-mail: lushchak@pu.if.ua

В работе обобщаются современные данные относительно транспорта, хранения и использования железа в клетках дрожжей, в частности *Saccharomyces cerevisiae*. Отмечено, что перенос железа в клетки обеспечивается высокоаффинной системой, функцию которой выполняет белковый комплекс Fet3–Ftr1, и белком Fet4 с низкой аффинностью к ионам железа. Обе системы используют  $Fe^{2+}$ . На внешнюю сторону плазмалеммы экспонируется также активный центр белка Fre1, который за счёт ферриредуктазной активности делает  $Fe^{3+}$  доступным для клетки. Приводится информация относительно участия в транспорте сидерофоров и металлопротонных обменников плазмалеммы — белков Smf. Особое внимание уделяется регуляции экспрессии генов, кодирующих системы обмена железа, и некоторым аспектам использования железа при синтезе FeS-содержащих ферментов. Делается вывод о том, что помимо всего прочего, дрожжи являются перспективным объектом для изучения механизмов, которые позволяют живым организмам не только избегать токсического действия элемента, являющегося триггером свободнорадикальных процессов, но использовать его для осуществления жизненно важных процессов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, транспорт ионов железа, белки Aft.

Одним із важливих напрямів сучасних біохімічних та молекулярно-генетичних досліджень є вивчення обміну заліза в живих організмах. Увагу до даної проблеми викликано, можливо, переосмисленням на сучасному рівні ролі цього елемента в біологічних системах. Так, відомо, що залізо, з одного боку, є необхідним для функціонування багатьох гемвісних ферментів, зокрема цитохромів, які беруть участь у фотосинтезі та перенесенні електронів у дихальному ланцюзі, а також для численних залізо-сірковмісних білків. З іншого боку, залізо розглядається як потенційно токсичний агент, який спричинює вільнорадикальне пошкодження компонентів клітини. Встановлено, що надлишок іонів заліза у клітинах сприяє розвитку пероксидного окислення ліпідів [1], є причиною деяких ракових захворювань, таких як карциноми нирок та печінки [2]. З порушенням обміну заліза в мітохондріях людини пов'язана така спадкова хвороба, як атаксія Фрідріха [3]. Залізо також причетне до розвитку хвороб Вільсона та Менке [4].

Клітини мають високоспеціалізовані механізми вилучення іонів заліза з навколишнього середовища і подальшого використання їх та накопичення. Для вивчення цих механізмів, а також токсичної дії і причетності заліза до канце-

рогенезу проводяться дослідження на багатьох об'єктах, основними з яких є щурі, миші та кролики. Багато важливої інформації одержано при обстеженні хворих на асбестоз, гемохроматоз, атаксію Фрідріха, а також в експериментах з культурами тканин людини. Зручною модельною системою для подібних досліджень є дріжджі переважно з родів *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* тощо. Зараз ці організми широко використовуються як модельні системи. Це пов'язано з тим, що вони є добре вивченими об'єктами, зокрема в генетичному аспекті. У 1996 році встановлено повну нуклеотидну послідовність геному *Saccharomyces cerevisiae* [5, 6]. У дріжджів вже ідентифіковані і клоновані гени, які задіяні у вилученні іонів заліза з навколишнього середовища. Доведено, що ці гени кодують білки, гомологічні людським [6].

### 1. Транспортування заліза у дріжджів

Регуляція обміну заліза у дріжджів опосередкована, в першу чергу, транспортуванням його іонів через цитоплазматичну мембрану. У дріжджів виділяють дві основні транспортувальні системи, відповідальні за надходження іонів заліза у клітину — системи високоафінного та низькоафінного транспортування [7]. Перша функціонує в аеробних умовах і забезпечує клітини іонами

заліза у разі низької концентрації їх у навколишньому середовищі. Друга система може функціонувати і в анаеробних умовах [8]. За допомогою системи низькоафінного транспортування у клітину надходять двовалентні катіони багатьох перехідних металів, тоді як за допомогою системи високоафінного транспортування — тільки  $\text{Fe}^{3+}$  [9].

Система високоафінного транспортування іонів заліза наведена на рис. 1. У навколишньому середовищі залізо переважно перебуває у формі  $\text{Fe}^{3+}$ , яке за зв'язування з іонами  $\text{OH}^-$  утворює малорозчинний  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Тому транспортування іонів заліза починається з їхнього відновлення [10]. Цей процес здійснюється специфічними ферментами — фериредуктазами, які у *S. cerevisiae* кодуються генами з родини *FRE* (на рис. 1 зображено продукти двох генів цієї родини — білки Fre1 та Fre2) [11]. Трансмімбранне перенесення  $\text{Fe}^{2+}$ , яке утворилося за відновлення  $\text{Fe}^{3+}$ , відбувається за участю комплексу ферментів — фероксидази та пермеази, вбудованих у клітинну мембрану [12]. Ці білки є продуктами генів *FET3* та *FTR1* і позначаються відповідно Fet3 та Ftr1 [4, 7, 9, 12–14]. Показано, що Fet3 є мідьмісним білком, структура якого подібна до структури членів родини мідьмісних оксидаз, таких як церулоплазмін, аскорбатоксидаза, лаказа тощо [15]. Проте лише про Fet3 та церулоплазмін відомо,

що вони окислюють залізо [16]. Втім, фероксидаза Fet3 може окислювати і *para*-фенілендіамін [17]. Важливим моментом транспортування іонів заліза є утворення функціональної форми фероксидази Fet3, яке полягає у включенні в апоформу цього білка чотирьох іонів міді. Цей процес, у свою чергу, тісно пов'язаний з транспортуванням іонів міді у дріжджову клітину і внутрішньоклітинні везикули. Відповідальним за транспортування міді у клітину є зображений на рис. 1 білок-переносник Ctr1, який кодується геном *CTR1* [4, 14]. У внутрішньоклітинні везикули та вакуолі іони міді надходять за допомогою АТФ-ази Р-типу, яка є продуктом гену *Ccc2* [4, 18]. Систему низькоафінного транспортування іонів заліза представлено білком-переносником Fet4, який переносить із зовнішнього середовища двовалентну форму заліза.

На сьогодні кожен з наведених вище компонентів високо- та низькоафінної транспортальних систем добре описаний. Так, вже відомо принаймні дев'ять генів, які кодують фериредуктази [19]. Першими були ідентифіковані гени *FRE1* та *FRE2*, продуктами яких є відповідно білки Fre1 і Fre2 [10, 11]. Білок Fre1 є мембранним білком з молекулярною масою 79 кДа. Його амінокислотна послідовність подібна до субодиниці  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  цитохрому  $b_{558}$  [20], тому вважається, що Fre1 є цитохромом *b*-типу [21]. Активність

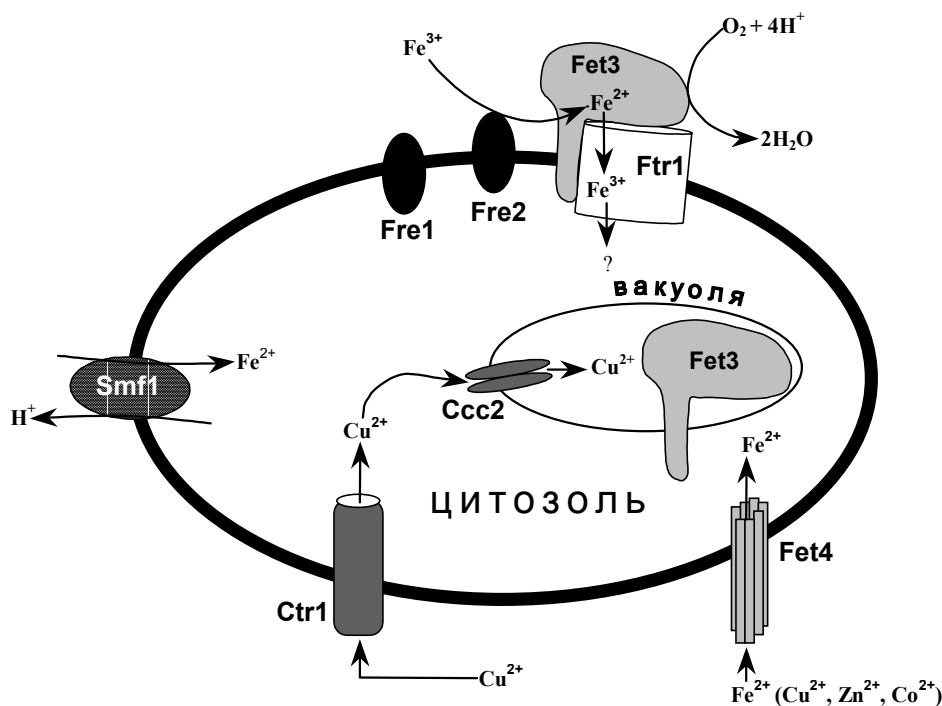


Рис. 1. Системи дріжджів, відповідальні за транспортування іонів заліза та міді (за [4]).

фериредуктаз регулюється потребою клітин у залізі: в умовах надлишку іонів заліза активність ферменту низька, тоді як у разі нестачі заліза — висока [22]. Відновлення іонів заліза аскорбіновою кислотою позбавляє клітину потреби у фериредуктазній активності [23]. Показано, що дефект у гені *FRE1* призводить до пригнічення як активності фериредуктази, так і всього процесу транспортування взагалі. Гомолог гена *FRE1* знайдено у дріжджах, які діляться — *Schizosaccharomyces pombe* — і названий *Frp-1*. Хоча ці гени мають дуже низьку ідентичність (всього 29%), обидва мають аналогічну послідовність нуклеотидів, яка кодує NADH або NADPH-зв'язувальну ділянку [20]. Встановлено, що продукт гену *FRE1* — білок Fre1 — важливий для росту культури на ранній експоненційній фазі, а продукт гену *FRE2* — на пізній експоненційній фазі [7, 11, 14].

Вже доведено, що гени *FRE1* і *FRE2* дуже подібні. Їхні білкові продукти здійснюють одну і ту саму реакцію, однак їхня експресія регулюється по-різному [24]. Експресія гена *FRE1* регулюється нестачею заліза через фактор Aft1 і нестачею міді через фактор Mac1 (транскрипційний регулятор генів, задіяних в обміні міді) [14, 24], як це показано на рис. 2. Експресія гена *FRE2* регулюється тільки фактором Aft1 [14]. Окрім того, білки Fre1 і Fre2 можуть відновлювати мідь [25].

Згодом було виявлено ще сім генів, які кодують білки з фериредуктазною активністю. Ці гени представлено рамками зчитування *YOR381w*, *YNR060w*, *YOR384w*, *YLL051c*, *YOL152w*, *YGL160w* та *YLR047c* [19]. Амінокислотна послідовність

білків, виведена на основі нуклеотидної послідовності зазначених генів, виявилась гомологічною амінокислотній послідовності вже відомих фериредуктаз. На основі цієї гомології перші п'ять генів назвали *FRE3-FRE7*. У цьому ж дослідженні порівняно відомі і щойно відкриті фериредуктази *S. cerevisiae*, а також вивчено характер їхньої експресії. Зараз відомо, що всі ідентифіковані фериредуктази складаються з 570–712 амінокислотних залишків. Їхня молекула побудована з 5–8 трансмембранних доменів і, за виключенням Fre7, *YGL160w* та *YLR047c*, всі вони несуть на N-кінці відщеплюваний сигнальний (лідерний) пептид із 17–20 амінокислот, що є необхідним для транспортування білків до місць їхнього функціонування. Подальший аналіз показав, що ідентифіковані поліпептиди мають у приблизно однаковій позиції ділянку з 6–9 амінокислот — так званий HPFTXXS-бокс — яка характеризує їх як білки-переносники електронів. Окрім того, у всіх досліджених редуктазах знайдено місця для зв'язування NADPH — амінокислотні послідовності GPYG та CGP [19]. Білок Fre1 містить гем. Для утворення біс-гемової структури слугують чотири залишки гістидину [26]. Ці залишки консервативні для всіх членів родини фериредуктаз [27]. Проте з'ясувалося, що білок Fre2, хоча і має зазначений регіон для зв'язування гему, але не містить останнього. Всі дев'ять білків несуть від 6 до 11 місць для N-глікозилювання. І, нарешті, в поліпептиді, який кодується геном *YLR047c*, існує ділянка KPLN, яка, можливо, відповідає за концентрування даного ферменту у вакуолях [23].

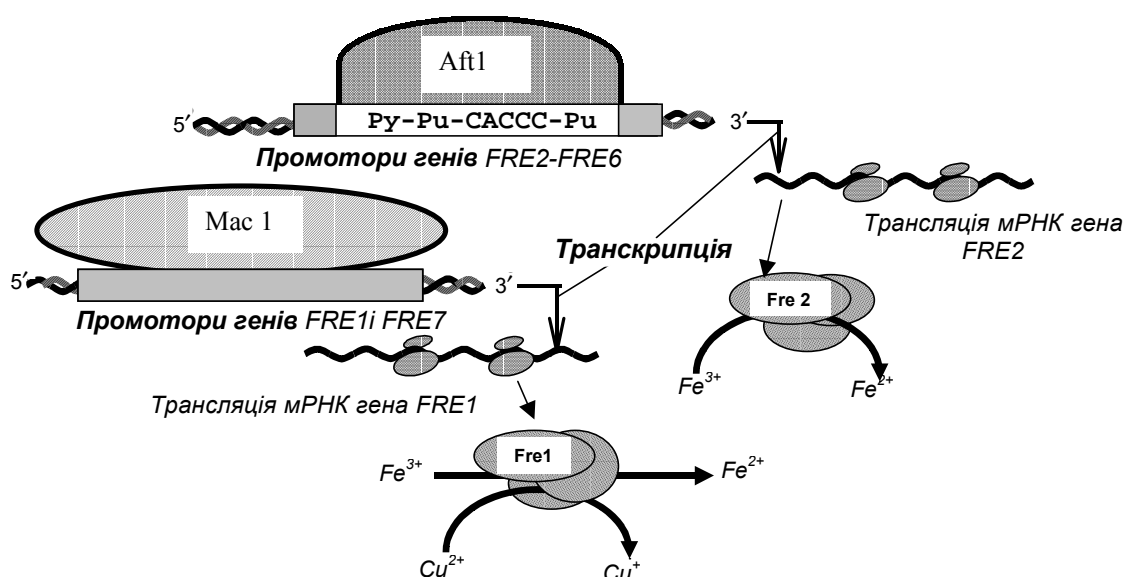


Рис. 2. Регуляція експресії генів факторами Aft1 та Mac1.

Дев'ять генів було поділено на три групи за характером експресії:

1. Гени *FRE2–FRE6*, транскрипція яких індукується в разі нестачі заліза за допомогою регуляторного білка Aft1. Цю групу можна поділити на клас генів *FRE2* та *FRE3*, експресія яких висока за нестачі іонів заліза, і клас генів *FRE4–FRE6*, експресія яких поміркована.

2. Мідьзалежні гени *FRE1* та *FRE7*, експресія яких починається за нестачі іонів міді за допомогою фактора Mac1. Слід зазначити, що експресія гена *FRE1* індукується також через посередництво фактора Aft1 (меншою мірою, ніж у випадку з міддю) у разі зменшення вмісту іонів заліза в середовищі, що не властиво гену *FRE7* (на рис. 2 ген *FRE1* включено в число генів, які регулюються фактором Aft1).

3. Гени *YGL160w* та *YLR047c*, індукція експресії яких не залежить від наявності чи відсутності як заліза, так і міді [19].

Вже багато відомо як про будову білків Ftr1 і Fet3, так і про особливості їхнього функціонування. Фероксидаза Fet3 є інтегральним мембранним глікопротеїдом [16]. Використання фероксидазою молекулярного кисню, як кінцевого акцептора електронів, підтверджується тим фактом, що у дріжджів із заблокованим дихальним ланцюгом за присутності іонів заліза спостерігається залишкове споживання кисню [4]. Стехіометричне відношення окисленого заліза (II) до кисню приблизно дорівнює 4:1. Це означає, що фероксидаза відновлює одну молекулу кисню через приєднання чотирьох електронів, донорами яких є чотири атоми  $\text{Fe}^{2+}$ . Встановлено, що  $K_m$  фероксидази по відношенню до іонів заліза становить 0,15 мкМ. Це значення близьке до  $K_m$  транспортування заліза [28].

Відомо, що білок Fet3 має кілька доменів, один з яких є трансмембранним, і ділянку глікозилювання на зовнішній поверхні мембрани [16, 29]. Білок містить чотири атоми міді, які зв'язані у трьох активних центрах — T1, T2 і T2/T3 [30]. Аналізи свідчать, що мідь у білка Fet3 присутня у трьох спектроскопічних формах. Місце зв'язування T1 з  $\text{Cu}^+$  є акцептором електронів субстрату, тоді як триядерний кластер, в якому мідь знаходиться у формах T2 та T2/T3, розглядається як місце відновлення кисню. Центральна тридоменна структура включає залишки 22–529. Фермент також несе класичну лідерну послідовність амінокислот, складену їхніми залишками 1–21, яка видаляється зі зрілого білка. Залишки амінокислот від 560 по 636 перед трансмембранною та цитоплазматичною ділянками також видаляються. Місце зв'язування міді T1 розташовано в домені 3 навпроти C-кінця. В ньому

типовий для інших мідьвмісних оксидаз метіоніновий ліганд заміщений лейцином 494 (позиція P4). Іншими трьома лігандами міді в цьому місці зв'язування є гістидин (позиція P1), цистеїн (позиція P2) та гістидин у P3-ій позиції [15, 17]. У разі заміщення лейцину 494 на лізин, аланін, ізолейцин, валін або фенілаланін (як це у лаказ грибів) білок втрачає здатність окислювати залізо. Однак заміна лейцину на метіонін (як у аскорбатоксидази) не призводить до втрати ферментативної активності [17]. Кластер T2/T3 знаходиться між “поверхнями” 1-ого і 3-ого доменів, поряд з гістидиновими лігандами, які симетрично відходять від 1-ого і 3-ого доменів. Два гістидинових залишки розміщуються із двох боків цистеїнового ліганду, утворюючи послідовність His-Cys-His. Вона просторово виглядає як Y-подібна “доріжка” завдовжки 13 Å для внутрішньомолекулярного перенесення електронів від відновленого атома міді в ділянці T1 до триядерного кластера, абсолютно необхідного для здійснення каталізу такими оксидазами [29, 30]. Два потенційні ліганди заліза, Glu-185 та Tyr-354, знаходяться в білку Fet3 поблизу T1 в позиціях, гомологічних Glu-272 та His-940 церулоплазміну людини. Glu-185 та Tyr-354, разом з Asp-409, можуть формувати місце для зв'язування іонів заліза в білка Fet3. Така будова подібна до будови аналогічного місця в поліпептидах Fet5 — білка, гомологічного Fet3 і відповідального за транспортування іонів заліза у вакуолі з *S. cerevisiae*, Cafet3 — з *Candida albicans* та Fio-1 — з *S. pombe*. Подібну будову субстратзв'язувальної ділянки виявлено також у аскорбатоксидази, де Trp-163 та Trp-361 (структурні гомологи Glu-185 та Tyr-354) і ліганд His-512 задіяні у зв'язуванні L-аскорбату [15, 17].

Окислене білком Fet3 залізо транспортується мембранним білком, який кодується геном *FTR1*. Білок Ftr1 є мембранною пермеазою з молекулярною масою 45 кДа. Він складається з шести трансмембранних доменів, кожен з яких має місце для зв'язування іонів заліза. Ключова послідовність для зв'язування останніх — REGLE — подібна до амінокислотної послідовності аналогічного місця в L-ланцюзі феритину ссавців. Мутація відповідальної за кодування даного місця ділянки гена *FTR1* позбавляє білок здатності переносити іони заліза [12, 14]. Вважається, що амінокислотні залишки Asp-278 та Asp-279 фероксидази Fet3 можуть забезпечувати електростатичний градієнт для  $\text{Fe}^{3+}$ , звільнених з активного місця, у напрямку негативно зарядженої ділянки, утвореної амінокислотами Asp-312, Asp-315, Asp-319 і Asp-320. Аналіз амінокислотної послідовності білка Ftr1 свідчить про на-

явність позаклітинної негативно зарядженої петлі (залишки 108–146) перед трансмембранним сегментом, який несе ділянку REGLE. Розподіл позитивно заряджених залишків у цій петлі такий, що мав би гарантувати електростатичну взаємовідповідність до вищезгадуваної ділянки Fet3, якщо між двома білками утворюється комплекс [12, 29].

Необхідність утворення комплексу між оксидазою Fet3 та пермеазою Ftr1 доведена багатьма дослідженнями. Білки Fet3 та Ftr1 необхідні один для одного для дозрівання: у разі відсутності Fet3, білок Ftr1 не може локалізуватися на цитоплазматичній мембрані; без Ftr1, білок Fet3 не приєднує мідь і не набуває ферментативної активності [12, 14]. Показано, що оксидаза взаємодіє з пермеазою в апараті Гольджі, внаслідок чого утворюється комплекс Fet3–Ftr1, який потім транспортується до цитоплазматичної мембрани [31].

Гени, гомологічні *FET3* та *FTR1*, знайдено у багатьох дріжджів. Так, гомологами *FET3* у грибів *Arxula adeninivorans*, *C. albicans*, *Pichia pastoris*, *S. pombe* є відповідно гени *AFET3* [32], *CaFET3* [33], *PFET3* [34], *Fio1* [35]. Гомологом гена *FTR1* у *S. pombe* є ген *Fip-1*. Окрім того, у клітинах *S. cerevisiae* вже знайдено гени *FET5* та *FTH1*, ідентичні *FET3* та *FTR1* і відповідальні за синтез комплексу, який транспортує іони заліза у вакуолі [36].

Для оксидази з *A. adeninivorans*, гомологічний білку Fet3, виявлено залежність структурних змін від морфологічного типу клітини. Так, визначено, що експресія гена *AFET3* значною мірою залежить від концентрації іонів заліза, проте не залежить від форми клітин. Однак морфологічні особливості клітини впливають на посттрансляційні модифікації генного продукту: клітини, які брунькуються, мають О- та N-глікозилюваний білок Afet3, тоді як міцеліальні клітини — лише N-глікозилюваний. N-глікозилюваний білок з молекулярною масою 103 кДа дозріває як глікопротеїд з масою 108,5 кДа, фосфорильований по залишках серину. Як N-глікозилювання, так і фосфорилування відбувається при концентраціях іонів заліза у середовищі нижчих 5 мкМ. Зрілий білок Afet3 з молекулярною масою 108,5 кДа рівномірно розподіляється по цитоплазматичній мембрані як міцеліальних клітин, так і клітин, що брунькуються [32]. Подібно до цього описано дві форми Fet3 для *S. cerevisiae* [16], причому одна з них перетворюється в іншу після утворення комплексу з Ftr1 в апараті Гольджі.

Як вже зазначалося, фероксидаза дріжджів Fet3 містить іони міді, а утворення функціонального білка дуже тісно пов'язано з функціонуван-

ням систем, задіяних у транспортуванні іонів міді у клітини та органели, зокрема у вакуолі. Гени *ATX1* (продукт гена — білок Atx1 — транспортує іони міді у вакуолі) та *Scc2* задіяні в постачанні іонів міді та її вбудовуванні у фероксидазу Fet3 [4, 18, 37]. Ген *Scc2* кодує АТР-азу Р-типу, гомологічну АТР-азам, зв'язаним з розвитком хвороб Вільсона та Менке в людини. Ген, мутація якого спричинює хворобу Менке, відповідає за синтез АТР-ази Р-типу, що транспортує іони міді і присутня у всіх типах клітин за виключенням клітин печінки. В культурах клітин, виділених із хворих, спостерігалось нормальне перенесення іонів міді в середину клітини, проте вони були нездатні до експорту цих іонів [38]. Ген, мутація якого спричинює розвиток хвороби Вільсона, також кодує АТР-азу Р-типу, що здійснює транспортування іонів міді. Цей білок експресується переважно у печінці та нирках, відповідаючи за включення міді в церулоплазмін [39].

Іони хлору є алостеричним ефектором у процесі включення міді в апоформу Fet3. Тому в момент синтезу функціонально активної фероксидази необхідна надійна робота внутрішньоклітинних хлоридних каналів. Ген *GEF1* у *S. cerevisiae* кодує білок, який функціонує як хлоридний канал. У мутантів за цим геном одночасно порушено також систему високоафінного транспортування іонів заліза. Дане порушення спричинене неможливістю включення  $\text{Cu}^+$  в апоформу Fet3, яка залежить від присутності  $\text{Cl}^-$ . Інкorporація іонів міді у фероксидазу, яка дозріває, відбувається в кислому середовищі. Проте з'ясовано, що у разі нестачі іонів хлору мідь погано включається у Fet3 за будь-якого рН. Деякі дослідники припускають, що  $\text{Cl}^-$  можуть зв'язуватись із ділянками поблизу триядерного кластеру [40]. Є підстави також вважати, що хлоридні канали підтримують електрохімічний потенціал міхурців Гольджі. Відсутність  $\text{Cl}^-$  може сприяти обмеженню концентрації катіонів, наприклад  $\text{H}^+$ , у везикулах, а це, у свою чергу, призводить до зміни рН і порушення функціонування даних органел [40].

Штами, дефектні за геном *FET3*, можуть виживати, оскільки здатні вбирати іони заліза через систему низькоафінного транспортування. Ця система (рис. 1) також використовує як субстрат  $\text{Fe}^{2+}$ , але, на відміну від системи високоафінного транспортування, вона може переносити також іони інших металів, зокрема міді, цинку та кобальту [41].

Ген *FET4* кодує гідрофобний білок з молекулярною масою 65 кДа. Надлишкової експресії *FET4* було достатньо для забезпечення залізом

клітин, дефектних за геном *FET3*, у разі вирощування на середовищі, збагаченому іонами цього металу. Втім ген *FET4*, окрім забезпечення транспортування іонів заліза за достатнього його вмісту в субстраті, може компенсувати певною мірою нестачу заліза під час порушення системи високоафінного транспортування. Так, за нестачі заліза у клітинах *fet3Δ*-штаму виявлено велику кількість іРНК, транскрибованої із гена *FET4* [42]. Аналіз структури білка Fet4 показав, що останній, подібно до Ftr1, має 6 трансмембранних доменів. На сьогодні не доведено гомологію цього білка з переносниками ABC-типу (на відміну від транспортера заліза в *Escherichia coli* — FeoB [43]); не визначено також наявність місць зв'язування АТР, які б вказували на енергозалежність транспортування, здійснюваного Fet4. Система низькоафінного транспортування у дріжджів на сьогодні залишається, таким чином, однією з найменш вивчених процесів.

Виявленню третьої системи переносу іонів заліза у клітину дріжджів *S. cerevisiae* сприяли дослідження транспортування іонів металів у клітинах ссавців. У кількох незалежних експериментах було ідентифіковано гомологічні гени, які беруть участь у транспортуванні іонів заліза в кишечнику. Ці гени — *Nramp2*, *DMT1* та *DCT1* — кодують олігомерні білки, які транспортують іони металів за рахунок обміну із протонами. У випадку дефектів цих генів спостерігається анемія і порушення процесу всмоктування іонів заліза в шлунково-кишковому тракті в *mk*-мишей та белградських шурів відповідно [44, 45]. За експресії в ооцитах, *DCT1* призводить до збільшеного надходження в них іонів заліза та інших металів [44, 14]. Експресія *Nramp2* у дріжджах також характеризується накопиченням іонів заліза в їхніх клітинах [46]. *S. cerevisiae* мають гени *SMF1* та *SMF2*, гомологічні генам *Nramp*, які спочатку були визначені як ті, що кодують переносники марганцю [47]. Продукти цих генів утворюють третю систему транспортування іонів заліза на поверхні клітини. Аналогічно до переносників родини генів *Nramp*, білок Smf1 здійснює транспортування іонів заліза, спряжене з переносом протонів [48] (рис. 1). Делеції у генах *SMF1* та *SMF2* спричиняють загострення наслідків нестачі заліза у дріжджів, позбавлених генів *FET3* та *FET4* [41].

На даний час з використанням *S. cerevisiae* проведено багато досліджень щодо вивчення транспортування іонів заліза за допомогою сидерофорів. Сидерофори — це низькомолекулярні сполуки, які специфічно зв'язуються з іонами тривалентного заліза. Вони синтезуються та секретуються багатьма бактеріями та грибами. Си-

дерофори мають високу спорідненість до тривалентного заліза. Комплекс сидерофору із залізом може бути захоплений специфічними системами клітинного транспортування. Більшість бактерій та грибів синтезує принаймні один тип сидерофорів, проте може утворювати переносники, специфічні як для сидерофорів, секретованих даним видом, так і для таких, які виділяються іншими видами. Механізми надходження металів за допомогою сидерофорів достатньо широко описано у прокаріотів, але порівняно мало відомо про використання їх еукаріотами. Серед дріжджів сидерофори синтезуються деякими видами з родів *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* та *Sporidiobolus* [49]. Крім того, у дріжджів *Pichia guilliermondii* виявлено речовини пептидної природи з молекулярною масою 1000–1200 Да, здатні зв'язувати  $Fe^{3+}$ , забезпечуючи їхнє поглинання дріжджовою клітиною [50].

Сидерофором дріжджів із роду *Rhodotorula* є родоторулева кислота [51]. За хімічною будовою вона є дипептидом, в якому утворюється дикетопіперазиновий цикл через взаємодію двох залишків  $\delta$ -N-ацетил-L-(S)- $\delta$ -N-гідроксіорнітину. Кожна молекула кислоти виступає лігандом при взаємодії з іонами заліза. Природним є поєднання тривалентного заліза, в якому на два іони заліза припадає три молекули родоторулевої кислоти [52].

Крім родоторулевої кислоти, в кислому середовищі у представників роду *Rhodotorula* за нестачі заліза синтезується ще один сидерофор — 1-гідрокси-3-(S)-аміно-2-піперидон, три молекули якого зв'язують один іон заліза. Показано, що надходження іонів заліза за допомогою як родоторулевої кислоти, так і 1-гідрокси-3-(S)-аміно-2-піперидону є енергозалежним процесом [53].

Залізо, зв'язане із сидерофором, може проникати у клітину кількома шляхами. Так, виділяють шлях надходження заліза, коли воно потрапляє у клітину в комплексі із сидерофором, та шлях, коли іони заліза від'єднуються від сидерофору і переносяться через цитоплазматичну мембрану специфічним білком-переносником. Якщо сидерофор потрапив у клітину, він може знову секретуватись (рециклювання) або руйнуватись у клітині гідролітичними ферментами. Існує також кілька різних видів транспортування іонів заліза, коли сидерофор не входить у клітину. В більшості випадків вилучення іонів заліза, зв'язаних сидерофором, відбувається шляхом їхнього відновлення. Після відновлення іони вивільнюються і приєднуються до білка-переносника, який транспортує їх у клітину. Такий шлях надходження іонів заліза описаний для більшості видів дріжджів і отримав назву редук-

ційного шляху або прямого човникового механізму, або “таксі” (“taxicab”). Виділяють ще непрямий човниковий механізм, за яким іони тривалентного заліза відновлюються в місці, віддаленому від білка-переносника [54, 55].

Експерименти з дріжджами *Rhodotorula pilimanae* та *Rhodotorula gracilis* показали, що в них надходження заліза за допомогою родоторулевої кислоти не відбувається редукційним шляхом, проте і сам сидерофор не потрапляє у клітину. Автори вважають, що в надходженні бере участь процес обміну лігандами, залежний від рН. Низьке рН, яке мають окремі місця цитоплазматичної мембрани, сприяє так званому взаємобміну лігандами, під час якого іони заліза відокремлюються від сидерофору і приєднуються до білка-переносника [53].

Встановлено, що дріжджі *S. cerevisiae* не синтезують власних сидерофорів, хоча було помічено, що в умовах дефіциту заліза *S. cerevisiae* виділяють у середовище флуоресцентні фенольні сполуки (антранілат і гідроксіантранілат), які сприяють транспортуванню іонів заліза у клітини, стабілізуючи їх у середовищі росту і підтримуючи у відновленому стані [56]. Проте *S. cerevisiae* можуть засвоювати залізо, зв’язане із сидерофорами, синтезованими іншими організмами [57, 58]. *S. cerevisiae* мають дві системи транспортування іонів заліза, зв’язаного із сидерофорами: перша залежить від роботи системи високоафінного транспортування заліза, а друга пов’язана з переносниками, які кодуються генами *ARN1* [59], *ARN2/TAF1* [60], *ARN3/SIT1* [61], *ARN4/ENB1* [62] і полегшують надходження іонів заліза, захоплених сидерофорами гідроксаматного та катехолатного типів. Після того, як комплекс заліза і сидерофору проходить крізь клітинну стінку, він зв’язується з білками родини Fit, вбудованими у клітинну стінку, які відповідають за концентрування іонів у периплазматичному просторі. Іони заліза, перенесені сидерофором, виступають субстратом для металоредуктаз клітинної поверхні. Потім вони захоплюються і переносяться у клітину системою високоафінного транспортування. В іншому випадку у клітину переноситься цілий комплекс сидерофору з металом, що забезпечується роботою специфічних пермеаз — продуктів генів з родини *ARN*. Члени цієї родини кодують білки з чотирнадцятьма трансмембранними ділянками, які функціонують як пермеази, що не гідролізують АТР, але, можливо, здійснюють симпорт, переносючи одночасно протони і покриваючи в такий спосіб енерговитрати під час перенесення другого субстрату [57].

Серед продуктів генів *ARN1-4* найкраще вив-

чено білок Arn3, який є феріоксамін-Б-пермеазою. Припускають два можливих шляхи надходження заліза за допомогою Arn3. Перший з них — Arn3, знаходячись на клітинній поверхні, полегшує надходження іонів заліза, зв’язаних із сидерофором. Другий — комплекс заліза з сидерофором може потрапляти у клітину шляхом ендоцитозу, передаючи потім захоплені ендоцитозними міхурцями іони заліза апаратові Гольджі. Комплекс спочатку прикріплюється до білка, а в подальшому, вгинаючись разом з плазматичною мембраною, транслокується в середину клітини. Внаслідок вгинання мембрани в області білка Arn3 формується ендоцитозний міхурець, який, врешті-решт, відшнуровується від поверхні клітини, потрапляючи в цитозоль. При цьому білок разом з комплексом опиняється в середині міхурця. Шлях надходження іонів заліза, подібний до описаного вище, функціонує за постачання залізом тканин ссавців. Так показано, що інтравезикулярне залізо вивільнюється у клітинах ссавців у разі надходження його із трансферином. Трансферин, який переносить іони металу, прикріплюється до трансферинового рецептора на цитоплазматичній мембрані і потім цілий комплекс потрапляє в середину клітини шляхом ендоцитозу. Трансферин віддає іони заліза в ендоцитозному міхурці. Після відновлення іони заліза перетинають мембрану ендосоми за допомогою вищезгаданої пермеази *DMT1* [57].

Згідно з недавніми повідомленнями, у відновленні і надходженні заліза, зв’язаного з феріоксаміном Б, бере участь фериредуктаза Fre3p. Вона необхідна також для росту клітин за присутності ферихрому, триацетилфузариніну С та родоторулевої кислоти за відсутності білків Fre1 та Fre2. Однак для відновлення іонів заліза, зв’язаних з ентеробактином — сидерофором катехолатного типу — потрібна активність фериредуктази Fre1 або Fre2. Фериредуктаза Fre4p полегшує надходження іонів, захоплених родоторулевою кислотою за присутності високих концентрацій даного сидерофору [63].

Для дії транспортера Arn1p доведено механізм рециркулювання. Arn1p та Arn3p експресуються в подібних до ендосом внутрішньоклітинних везикулах. Показано, що за відсутності специфічного субстрату — ферихрому — Arn1p сортується прямо з апарату Гольджі по ендосомах, але не переноситься до цитоплазматичної мембрани. За низьких концентрацій ферихрому Arn1p транспортується до мембрани; за високих — після злиття ендосоми з мембраною і виходу назовні Arn1p швидко вбирається знов у середину клітини шляхом ендоцитозу. Зараз з’ясовано, що Arn1p має два місця з різною афінністю для приєднання

ферихрому. Продемонстровано, що ферихром, разом із захопленими іонами заліза, потрапляє в середину клітини і накопичується в цитозолі (на відміну від вільного від металу ферихрому). Таким чином, ферихром бере участь у запасанні заліза у клітині. В разі потреби залізо легко мобілізується з ферихрому [64].

Нещодавні дослідження показали, що у надходженні зв'язаного із сидерофорами заліза певну роль відіграють також манопротейни клітинної стінки, зокрема ті, що кодується генами *FIT1*, *FIT2* та *FIT3*. Ці білки вбудовані у клітинну стінку через глікозилфосфатидилінозитидну якірну ділянку і беруть участь у проходженні сидерофорів через клітинну стінку та за утримання їх у периплазматичному просторі [65].

Певну роль у забезпеченні дріжджів залізом відіграють проміжні продукти циклу Кребса — лимонна, молочна, янтарна кислоти, які теж можуть утворювати хелати з іонами тривалентного заліза [56]. Засвоєння іонів заліза з комплексів із цитратом, малатом, сукцинатом і оксалоацетатом досліджено у *P. guilliermondii* [66]. Виявлено, що поглинання іонів заліза з комплексу з цитратом є активним транспортуванням. Здатність до поглинання  $Fe^{3+}$  за участю цитрату виявлено також у видів *C. boidinii*, *S. cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *C. utilis*, *Hansenula polymorpha* [67].

Можливість поглинання іонів заліза із комплексів з десферіоксаміном Б, копрогеном, родоторулевою кислотою, а також з ЕДТА описана для *P. guilliermondii*. Найвища швидкість поглинання спостерігається у разі використання феріоксаміну Б та родоторулевої кислоти [67].

Здатність до позаклітинного відновлення заліза, хелатованого сидерофорами, досліджено також у *P. guilliermondii*, *P. pinus*, *C. boidinii*, *D. kloederi*, *C. famata*, *H. polymorpha*, *C. crusei*. Найвища фериредуктазна активність клітин *P. guilliermondii* простежувалась, коли використовували як субстрат  $Fe^{3+}$ -родоторулеву кислоту [68].

## 2. Регуляція транспортування іонів заліза у дріжджів на рівні транскрипції

Фактором, який регулює транскрипцію багатьох генів, пов'язаних із процесом транспортування іонів заліза у клітину, є згаданий вище білок Aft1, який складається з 690 амінокислот і має молекулярну масу 98 кДа. Він кодується геном *AFT1*, що знаходиться у хромосомі VII геному *S. cerevisiae*. Встановлено ідентичність даного гена з геном *RCS1*, відповідальним за регуляцію розміру клітини дріжджів [69].

Спочатку виявили, що Aft1 індукуює експресію генів металоредуктаз *FRE1* і *FRE2* в умовах

дефіциту іонів заліза [70]. Схематично регуляцію експресії генів *FRE1-FRE7* фактором Aft1 представлено на рис. 2. Так, відомо, що Aft1 абсолютно необхідний для активації генів *FRE2* і *FRE3*, тоді як гени *FRE1* і *FRE7* нормально експресуються і за відсутності Aft1, а гени *FRE4-FRE6* тільки частково залежать від даного регулятора [19] (хоч на рисунку ці гени об'єднано разом з *FRE2* і *FRE3*). Втім помічено, що точкові мутації в *AFT1* можуть призводити до постійної експресії гена *FRE1* [71].

Зараз відомо, що за нестачі іонів заліза білок Aft1 зв'язується з нуклеотидною послідовністю  $PyPu-CACCC-Pu$  у промоторі генів, які він регулює (рис. 2). Для генів *FRE2* та *FRE3* зв'язування Aft1 з промотором повне і досконале, тоді як у промоторах *FRE4-FRE6* Aft1 не зв'язується з останнім, пуриновим залишком зазначеної послідовності [19].

Зараз припускається, що іони заліза можуть зв'язуватись безпосередньо з Aft1 за взаємодії з послідовністю Cys-x-Cys. Для підтвердження наводиться факт, що заміна одного з цистеїнових залишків даної послідовності, а саме Cys-291, веде до припинення активації транскрипції. Недавно також показано, що за нестачі заліза в поживному середовищі фактор Aft1, присутній у цитоплазмі, переміщується в ядро, де акумулюється і активує транскрипцію підконтрольних генів (генів-мішеней). Локалізація фактора Aft1 в ядрі регулюється NES-подібним доменом (NES — nuclear export signal) — збагаченою залишками лейцину амінокислотою послідовністю, до якої приєднується білок-експортин. Мутації ділянки гена *AFT1*, яка кодує NES-домен, призводять до затримки транскрипційного фактора в ядрі і, таким чином, до постійної експресії генів-мішеней, яка в цьому випадку відбувається навіть у разі достатньої концентрації іонів заліза [72, 73].

На сьогодні відомо, що у *S. cerevisiae*, окрім генів *FRE2-FRE6*, в Aft1-регулон входять інші гени, причетні до надходження іонів заліза у клітину, а саме: гени, які кодують компоненти системи високоафінного транспортування — *FET3* та *FTR1*; гени, зв'язані з надходженням сидерофорів, — *ARN1-4* та *FIT1-3*, з транспортуванням іонів заліза через вакуолярну мембрану — *FET5* та *FTH1*, з включенням іонів міді в апобілок Fet3 — *Ccc2* та *ATX1*, з утворенням залізо-сірчаних кластерів — *ISU1*, *ISU2* тощо [4, 36, 37, 57, 65, 70, 74, 75]. Нещодавно описано також ефекти, пов'язані з регуляцією білком Aft1 генів високоафінного транспортування іонів заліза. Так, мутантний за *AFT1* штам був нездатний здійснювати дихальний метаболізм, що проявлялось у порушенні його росту на таких субстратах, як



етанол, гліцерол чи піруват. Проте цей штам нормально ріс на середовищах з глюкозою та фруктозою, які можуть засвоюватися шляхом бродіння. Доведено, що така особливість спричинена поганим засвоєнням заліза, оскільки ріст покращувався у разі додавання в поживне середовище іонів двовалентного заліза.

Цікавим спостереженням є те, що надлишкова експресія гена *AFT1* призводить до зупинки клітинного циклу на стадії  $G_1$  [74]. Виявилось, що цей ефект не спричинений токсичністю ані заліза, ані міді через збільшене надходження цих металів. Це свідчить про участь фактора Aft1 в інших, ніж засвоєння заліза, клітинних процесах.

Виявилося також, що у разі вирощування на середовищі з глюкозою мутантні клітини з алелем *aft1-Δ1*, відповідальним за утворення поліпептиду Aft1, позбавленого 250 амінокислотних залишків із С-кінця, більші за розмірами, ніж клітини дикого типу. Причому цей фенотип не спостерігається в мутанта *aft1-Δ5*, в якого Aft1 не синтезується взагалі. Додавання в поживне середовище сульфату заліза разом із хелатором ферозином призводить до зменшення клітин в *aft1-Δ1*-штаму до розмірів, характерних для клітин дикого типу [74]. Раніше було помічено, що сповільнення проходження стадії  $G_1$  клітинного циклу призводить до збільшення розмірів клітини [69]. Повна відсутність іонів заліза спричинює зупинку клітинного циклу на стадії  $G_1$ , так само, як це відбувається за дефіциту таких елементів як азот, фосфор та сірка.

Умови, за яких тимчасово або остаточно зупиняється ріст клітини, зумовлюють фосфорилування Aft1. Фосфорилування також відбувається у разі зміни метаболізму з бродильного типу на дихальний, наприклад за використання клітинами незброджуваних джерел вуглецю. Останнє відбувається по закінченні експоненційного росту культури, коли утилізована майже вся глюкоза із поживного середовища. Фосфорильованим білок залишається до стаціонарної фази. Під час перенесення клітин на етанол-гліцеролове середовище, коли тимчасово призупиняється їхній ріст, Aft1 переходить у гіперфосфорильовану форму з молекулярною масою 100 кДа. В цей момент експресія генів *FRE1*, *FRE2* та *FET3* припиняється. Вона індукується нестачею іонів заліза тільки тоді, коли ріст відновлюється і Aft1 знову дефосфорилується. Ці обставини дозволяють вважати, що фосфорилування може бути основою механізму, за яким відбувається інактивація Aft1. Нещодавно встановлено наявність паралога гена *AFT1*, який кодує продукт із 416 амінокислотних залишків, ідентичний білку Aft1 [74].

Наявність гена *AFT2*, ідентичного *AFT1*, вва-

жають наслідком дуплікації геному предків сучасних *S. cerevisiae* [76]. Так, ген *AFT1* знаходиться у хромосомі VII, тоді як його дуплікатний варіант *YPL202c* (названий *AFT2*) знаходиться у хромосомі XVI. Обидва гени, як вже на сьогодні відомо, виконують різні, але перехресні функції [77].

Встановлено, наприклад, що Aft2p, як і його паралог, фактор Aft1, є активатором транскрипції, який реагує на залізо. Серед генів, експресія яких активується у клітинах з мутантним алелем *AFT2-1<sup>up</sup>*, знайдено гени, які регулюються Aft1 (*FIT1*, *FIT3*, *FTR1*, *FTH1*, *FRE1*, *FET5*, *TIS11*), та гени, які регулюються фактором, чутливим до цинку — Zap1 (*ZRT1* та *YOL154w*) [76]. Виявлено також гени, які не регулюються ані активатором Aft1, ані активатором Zap1 (*MRS4*, *UBC8*, *PRB1*, *ECM4*). Повний перелік генів, про які відомо, що вони активуються продуктом гена *AFT2-1<sup>up</sup>*, наведено в таблиці.

Штам, позбавлений Aft1 та Aft2, є чутливішим до нестачі іонів заліза, ніж штам, позбавлений тільки Aft1 [78]. У тому ж циклі експериментів було показано, що неповні форми білків Aft1 та Aft2 зв'язують той самий фрагмент ДНК *in vitro*. Щоправда, виявлено відмінності у ступені регуляції генів метаболізму заліза білками Aft1 та Aft2. Припускають, що білок Aft2 може відігравати специфічну роль у мобілізації іонів заліза, накопичених у середині клітини, особливо в умовах нестачі останніх у навколишньому середовищі [76].

### 3. Деякі аспекти використання заліза на потреби клітини

Залізо, як відомо, входить до складу багатьох ферментів або є кофактором у ферментативних процесах. У складі ферментів залізо може перебувати у вигляді залізо-сірчаного кластера чи бути включеним у порфіринове кільце гему. До гемвмісних ферментів відносяться каталази, пероксидази, фериредуктази, цитохроми, тощо. У групу Fe-S-білків входять ферменти, які каталізують реакції циклу Кребса (сукцинатдегідрогеназа, аконітаза, фумараза); ті, що беруть участь в синтезі лізину (гомоаконітаза) і метіоніну (ізопропілмалатізомераза), а також інші білки [79].

Як приклад, в даному огляді ми розглянемо лише один зі шляхів утилізації заліза, а точніше деякі аспекти формування залізо-сірчаних центрів у дріжджовій клітині. Так, на сьогодні відомо чимало генів, продукти яких задіяні у формуванні Fe-S-центрів. Це, зокрема, гени *ATM1*, *SSQ1*, *NFS1*, *NFU1*, *ISU1* та *ISU2*, а також *YAH1* [75, 80–83]. Нещодавно було досліджено ще два гени, які беруть участь у цьому процесі — *ISA1*

Гени, які активуються продуктом гена *AFT2-1<sup>up</sup>*

Ген	Продукт або функція
<i>FIT3</i>	Манопротейн клітинної стінки
<i>YOL154</i>	Zn-металопротеаза
<i>ZRT1</i>	Білок-переносник у системі високоафінного транспортування цинку
<i>FIT1</i>	Манопротейн клітинної стінки
<i>ECM4</i>	Структурний білок клітинної стінки
<i>YOL083</i>	Функція невідома
<i>UBC8</i>	Убіхітинкон'югований фермент
<i>YJR087</i>	Фермент, подібний до індоламін-2,3-діоксигенази
<i>MRS4</i>	Член родини мітохондріальних переносників електронів
<i>TIS11</i>	Білок родини <i>TIS</i>
<i>FTR1</i>	Білок-переносник у системі високоафінного транспортування заліза
<i>FTH1</i>	Переносник заліза у вакуолях
<i>LAP4</i>	Вакуолярна амінопептидаза I
<i>PRB1</i>	Вакуолярна протеаза B
<i>GRX1</i>	Глютаредоксин
<i>AHP1</i>	Алкілгідропероксидредуктаза
<i>HCR1</i>	Можливий компонент фактора елонгації трансляції eIF3
<i>FET5</i>	Мідьвмісна оксидаза вакуолей
<i>PEP4</i>	Вакуолярна протеїназа A
<i>YDL124</i>	Функція невідома
<i>FRE1</i>	Металоредуктаза клітинної поверхні
<i>SMF3</i>	Переносник заліза у вакуолях

та *ISA2* [84]. Виявлено, що делеції *ISA1* та *ISA2* ведуть до підвищення концентрації іонів заліза в мітохондріях. Мутанти *isa1Δ* та *isa2Δ* накопичують мутації в мітохондріальній ДНК, що пояснюють підвищенням вмістом вільних іонів заліза у їхніх мітохондріях [84]. При цьому клітини зазнають оксидативного стресу через утворення великої кількості вільних радикалів, що каталізується  $\text{Fe}^{2+}$ . Відгуком вільнорадикального пошкодження мітохондрій може бути також часткове зниження активності малатдегідрогенази, як знайдено у згаданих мутантів [84].

Припускається, що білки *Isa1* та *Isa2* можуть постачати іони заліза в місце синтезу Fe-S-кластерів. Обидва білки мають сигнальну послідовність, за допомогою якої визначається їхня кінцева локалізація у клітині. Доведено, що в *Isa1* та *Isa2* сигнальними є перші 61 або 56 амінокислотних залишків N-кінця відповідно. За транспортування обох білків у матрикс мітохондрій

відповідають амінокислотні залишки 1–31. За відсутності цих залишків білки накопичуються в міжмембранному просторі мітохондрій. Припускається, що *Isa*-білки можуть транспортувати залізо в мітохондрії так, що *Isa2* поступово постачає іони заліза в матрикс мітохондрій за допомогою білка-переносника у внутрішній мембрані, а *Isa1* у матриксі діє як донор іонів заліза, захоплюючи останні і постачаючи їх для збирання Fe-S-кластерів [84].

На користь того, що білки *Isa1* та *Isa2* виступають донорами для збирання залізо-сірчаних центрів, є наявність трьох цистеїнових залишків, знайдених також у гомологічних білках бактерій (білок *IscA* *Azotobacter vinelandii* [85]), нематод, рослин та грибів. Вважається також, що ці залишки утворюють центр для зв'язування іонів заліза.

За аналізу обміну заліза в мітохондріях не можна не торкнутися відкриття гомолога фра-

таксину у дріжджах. Зараз вивчення цього поліпептиду становить один із напрямів досліджень обміну заліза на дріжджовій моделі. Білок фратаксин, знайдений в організмі людини, складається з 210 амінокислотних залишків. Його нестача, зумовлена мутацією в одному з інтронів гена *FRDA*, призводить до розвитку спадкової хвороби — атаксії Фрідріха [6].

Аналіз геному дріжджів дозволив виявити гомолог фратаксину — білок Yfh1, який кодується геном *YFH1* (yeast frataxin homolog). Вже в перших дослідженнях було визначено, що дріжджі, в яких інактивовано *YFH1*, погано ростуть на середовищах із незброджуваними джерелами вуглецю, що свідчить про дефект у мітохондріальному диханні [3, 86, 87].

Фратаксин та білок Yfh1 дріжджів — мітохондріальні білки. Їхню локалізацію встановлено за допомогою як маркера зеленого флуоресцентного білка (в англійських виданнях він позначається як GFP — green fluorescent protein). Для цього робили інсерцію гена, який кодує GFP, у ділянку між *YFH1* та його промотором. Таким чином, при експресії *YFH1* синтезується гібридний білок, який складається з Yfh1p та GFP (флуоресцентна мітка). У клітинах дріжджів гібридний білок локалізується в мітохондріях, тоді як GFP, якщо синтезується окремо від Yfh1p, розподіляється по всій клітині. Гібридний фратаксин-флуоресцентний комплекс у культивованих клітинах також концентрується в мітохондріях [6]. Було також помічено, що клітини дріжджів, позбавлені гена *YFH1*, накопичують у 2–3 рази більше іонів заліза, аніж клітини дикого типу, а їхні мітохондрії містять у 10–20 разів більше заліза [87].

Завдяки нещодавнім дослідженням досягнуто значних успіхів у розумінні функцій білка Yfh1. Так, встановлено, що за присутності кисню та іонів  $\text{Fe}^{2+}$  Yfh1 активується і в кілька стадій збирається в 48-субодиничний мультимер ( $\alpha$ -48), в якому міститься 2400 атомів заліза в центрах розміром 2–4 нм, структурно подібних до залізовмісних центрів феритину [88]. Радіус всього мультимерного комплексу складає близько 11 нм, а його молекулярна маса 840 кДа [89]. Мультимер Yfh1 (позначається як mYfh1) збирається у дві послідовні стадії, поєднані з окисленням іонів заліза. Фероксидазна реакція, що каталізується mYfh1, забезпечує стадію збирання (з виходом субодиниць  $\alpha$  та  $\alpha_3$ ), а далі послідовно відбувається повільне автоокислення іонів заліза, які входять у мультимер. Автоокислення сприяє збиранню олігомерних субодиниць  $\alpha_{48}$ . Залежно від іонного оточення, постадійне збирання призводить до накопичення 50–75 іонів заліза в одній

субодиниці. Показано, що “залізні” центри полімерів фратаксину дріжджів збираються *in vitro* подібно до фратаксину людини і до феритинових центрів. Полімерний фратаксин людини та дріжджів містить феригідрит — біомінеральну сполуку, до складу якої входять октаедри оксиду/гідроксиду заліза. На відміну від феритину, фратаксинові центри складаються з дуже малих кришталіків феригідриту [90].

На перших стадіях збирання mYfh1 залізо, не дуже міцно зв'язане з білком, легко мобілізується хелаторами або ферохелатазою (для синтезу гему). Перенесення іонів заліза, зв'язаних з mYfh1, до активних центрів ферохелатази відбувається за присутності цитрату — фізіологічного хелатора двовалентного заліза [91]. Якщо іони заліза не переносяться якимось лігандом, окислення їх продовжується доти, поки  $\text{Fe}^{2+}$  повністю не перейде у  $\text{Fe}^{3+}$  і стане менш доступним. Таким чином, через здатність до постадійного збирання Yfh1 може функціонувати як залізошаперон або як білок, який запасає залізо [89].

#### 4. Токсичність іонів заліза і механізми її запобігання

Іони заліза можуть спричинювати загибель клітини, коли рівень їх перевищує фізіологічну потребу останньої. Є дані, що накопичення більше ніж 1 наномоль іонів заліза на 1 млн. дріжджових клітин є летальним для останніх [92]. Зараз вважається, що токсичність іонів заліза зумовлена, насамперед, їхньою здатністю сприяти утворенню активованих форм кисню в реакціях Фентона і Габера-Вейса [93, 94]. Тому своєрідним напрямом у дослідженні систем, які керують процесами надходження, розподілу, утилізації, реутилізації та запасання іонів заліза, є з'ясування ролі певних білків у запобіганні у клітині вільнорадикального окислення. Про зв'язок токсичності іонів заліза з активованими формами кисню свідчить вища чутливість дріжджів, дефектних за певними антиоксидантними ферментами, до іонів заліза. Так, Р. Вісьницька зі співавторами показала, що дефект за цитозольною супероксиддисмутазою (СОД) зумовлює гіперчутливість дріжджів до дії  $\text{Fe}^{2+}$  [95]. Проте, ці іони не впливають на виживання дріжджів із дефектами за цитозольною і пероксисомальною каталазами, а також за цитохром-с-пероксидазою. Автори припустили, що у дріжджів, дефектних за Cu/Zn-СОД, вища швидкість відновлення іонів  $\text{Fe}^{3+}$ , яке здійснюється супероксиданіоном [95]. У нашій лабораторії встановлено, що дефектні за цитозольною каталазою дріжджі, вирощені за присутності 500 мкМ сульфату заліза, мають у 2 рази вищу активність СОД і у 2 рази вищий

рівень продуктів пероксидного окислення ліпідів, ніж у контролі [96].

Фенотип штамів, дефектних за певними антиоксидантними ферментами, значно залежить від транспортування іонів заліза. Досліди на дріжджах і бактеріях, дефектних за Cu/Zn-СОД, показали, що супероксид-аніон у підвищеній концентрації мобілізує залізо із вакуолярних запасів [97]. Залізо, вилучене в такий спосіб, не тільки не використовується повторно для біосинтезу, але й здатне брати участь у генерації активованих форм кисню, які пошкоджують компоненти клітини [98]. Наприклад, Л. Корсон та співавт. [99] виявили, що дріжджі, дефектні за цитозольною СОД (*sod1Δ*), мають фрагментовані вакуолі під час вирощування в аеробних умовах. Дослідники припустили, що фрагментація зумовлена окисним пошкодженням вакуолярних білків, каталізованим іонами заліза. Інактивація гена *FET3*, який кодує фероксидазу, задіяну у високоафінному транспортуванні іонів заліза, мала б обмежувати надходження їх у клітину. І дійсно, у подвійного мутанта *sod1Δfet3Δ* були нормальні вакуолі [99].

Доведено, що супероксид-аніон здатний вивільняти іони заліза з Fe-S-кластерів [100]. Сукцинатдегідрогеназа (СДГ) і аконітаза циклу трикарбонових кислот, а також гомоаконітаза, яка бере участь у синтезі лізину — білки з 4Fe-4S-кластерами. Руйнування цих кластерів за дії супероксиданіону призводить до інактивації даних ферментів у дріжджів, дефектних за супероксиддисмутазами. Проте в експериментах *in vitro* супероксид-аніон лише незначною мірою інактивує СДГ [101]. Натомість було показано, що СДГ ефективно інактивується гідроксилрадикалом (цит. за [101]). Припускають, що інактивація СДГ *in vivo* може бути зумовлена не стільки руйнуванням Fe-S-кластерів, скільки гідроксилрадикалом, який утворюється в реакції Фентона. В дефектних за СОД клітинах імовірність реакції Фентона підвищена. Це пояснюється тим, що вивільнення заліза із залізосірчаних кластерів, спричинюване  $O_2^{\cdot-}$ , призводить до зростання у клітині концентрації “вільного” заліза. Його іони можуть брати участь у генерації  $\cdot OH$  в реакції Фентона, що, можливо, і призводить до інактивації СДГ *in vivo*. Окисна інактивація глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) може бути причиною ауксотрофності за метіоніном *sod1Δ*-дефектних дріжджів. Г6ФДГ відіграє важливу роль у синтезі сірковмісних амінокислот (цистеїну та метіоніну) [102]. К. Слекар зі співавт. визначили, що дріжджі, дефектні як за Г6ФДГ, так і за Cu/Zn-СОД є ауксотрофними за метіоніном [103]. Наші дослідження підтверджують можливість

окисної інактивації Г6ФДГ у *S. cerevisiae* *in vivo*, а також *in vitro* [104, 105].

Вважається, що надійне функціонування систем транспортування і утилізації іонів заліза — один із механізмів запобігання оксидативного стресу, розвитку якого сприяє даний метал. Окрім того, є повідомлення, що мідьвмісна оксидаза дріжджів Fet3 бере участь у детоксикації іонів міді, як антиоксидант [31]. Це може бути цілком ймовірним, оскільки відомо, що гомолог даного білка в людини — церулоплазмін — бере участь у ліквідації вільних радикалів [106]. Цікавим є і той факт, що промотори генів фериредуктаз, локалізованих на клітинній поверхні, мають місце для зв'язування транскрипційного фактора Yap1, задіяного у відповіді на оксидативний стрес [74]. Також показано, що білок Atx1, який переносить мідь до внутрішньоклітинної АТРази Csc2, бере участь у захисті клітини від дії  $H_2O_2$  та  $O_2^{\cdot-}$  [93]. Як згадувалося вище, обидва названі білки важливі для збирання і дозрівання функціональної оксидази Fet3 і входять до складу Aft1-регулону.

Цікавим у цьому відношенні є наявність у регулоні Aft2 деяких генів, відповідальних за синтез ферментів антиоксидантного захисту, а саме: *AHP1*, який кодує тіоредоксинпероксидазу II, причетну до стійкості проти  $H_2O_2$  та  $Mn^{2+}$ , і *GRX4*, який кодує глутаредоксин [78].

Оксидативний стрес може бути причиною дихальної недостатності у штамів, дефектних за генами *YFH1* і *ATM1* [80]. Автори вважають, що за відсутності фратаксину залізо накопичується в мітохондріях у формі, недоступній для біосинтетичних процесів. Накопичене в мітохондріях залізо може брати участь в окисних модифікаціях всіх компонентів даних органел, включаючи і ДНК. Ситуація, аналогічна щойно описаній, спостерігається для дріжджів, дефектних за геном *ATM1*, який кодує білок Atm1, що причетний до збирання Fe-S-кластерів [80].

## 5. Підсумки та перспективи

Підсумовуючи сказане вище, слід підкреслити, що важлива роль заліза в окисно-відновних реакціях організму і, поряд з цим, його потенційна токсичність є, ймовірно, причиною надзвичайно складних і тонких механізмів обміну цього металу. Системи надходження, запасання та утилізації іонів заліза побудовані та взаємоузгоджені таким чином, що, з одного боку, запобігають надлишковому накопиченню, а, з іншого, забезпечують утримання їх у нетоксичній формі. Порушення будь-якої ланки даної мережі спричинює, у випадку дріжджів, серйозні дефекти росту та дихання, а у людини — низку спадкових

хвороб, таких як атаксія Фрідріха, хвороба Вільсона, хвороба Менке тощо. Подібність систем, задіяних в обміні заліза у дріжджів і людини, є свідченням їхньої еволюційної давнини, а також ще раз підтверджує зручність і доцільність використання *S. cerevisiae* як модельного об'єкту в дослідженнях цього напрямку. В подальшому слід встановити співвідношення між високо- та низькоафінною системами транспортування іонів заліза, а також участю сидерофорів в обміні заліза. Розуміння тонких механізмів, які попереджують перенакопичення заліза в умовах його надлишку в середовищі, а також задоволення потреб у разі його дефіциту, окрім всього, може бути ключом до розуміння того, як підтримується баланс між цими процесами. Особливо важливою є також проблема регуляції вмісту іонів заліза, здатних брати участь у вільнорадикальних процесах. Тут неможливо переоцінити роль дріжджів як модельного об'єкта для вивчення вільнорадикальних процесів у клітинах еукаріотів, які є досить складними.

Автори щиро вдячні Дж. Каплану, В. Кулотті, Д. Вінге, Т. Білінські, С. Ейвері та Д. Косману за прислані копії їхніх публікацій, а також рецензенту за високопрофесійний і доброзичливий аналіз рукопису, що істотно покращило викладення матеріалу.

## IRON METABOLISM IN THE YEAST

*D. V. Gospodaryov, V. I. Lushchak*

Vassyl Stefanyk Precarpathian National University,  
Ivano-Frankivsk, Ukraine;  
e-mail: lushchak@pu.if.ua

### S u m m a r y

Current data concerning transport, storage and utilization of iron in the yeast cells, particularly *Saccharomyces cerevisiae* are summarized in the paper. It has been marked that iron uptake in the cells provides by high affinity system, its function is carried out by protein complex Fet3-Ftr1, and Fet4, protein with low affinity to iron ion. The both systems utilize Fe(II). Furthermore, the active site of the protein Frl1 is exposed on the outer side of plasmalemma. This protein, due to ferrireductase activity, provides availability of Fe(III) to the cell. The information regards to participation of siderophores and metal-proton plasma membrane exchangers Smf1 in iron transport is brought. Particular attention is given to regulation of expression of the genes, coding the iron metabolic systems. Some aspects of iron utilization for Fe-S-containing enzymes synthesis are lighted. It has been concluded that the yeast is a perspective subject for studying

balance of living organisms between iron essentiality and its ability to trigger free radical reactions.

**Key words:** yeast *Saccharomyces cerevisiae*, iron ion transport, Aft-proteins.

1. Minotti G., Aust S. D. // Lipids. 1992. **27**. P. 219–226.
2. Toyokuni S. // Free Radical Biology & Medicine. 1996. **20**. P. 553–566.
3. Kaplan J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. **96**. P. 10948–10949.
4. De Silva D. M., Askwith C. C., Kaplan J. // Physiol. Rev. 1996. **76**. P. 31–47.
5. Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H. et al. // Science. 1996. **274**. P. 546–567.
6. Kaplan J. // Science and Medicine. 2000. **7**. P. 8–17.
7. Askwith C., de Silva D., Kaplan J. // Mol. Microbiol. 1996. **20**. P. 27–34.
8. Jensen L. T., Culotta V. C. // J. Mol. Biol. 2002. **318**. P. 251–260.
9. Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. **33**. P. 935–939.
10. Georgatsou E., Alexandraki D. // Mol. Cell. Biol. 1994. **14**. P. 3065–3073.
11. Georgatsou E., Mavrogiannis L., Fragiadakis G. et al. // Yeast. 1995. **11**. s155.
12. Stearman R., Yuan D. S., Yamaguchi-Iwai Y. et al. // Science. 1996. **271**. P. 1552–1557.
13. Askwith C., Eide D., Van Ho A. et al. // Cell. 1994. **76**. P. 403–410.
14. Radisky D., Kaplan J. // J. Biol. Chem. 1999. **274**. P. 4481–4484.
15. Messerschmidt A., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1990. **187**. P. 341–352.
16. De Silva D. M., Davis-Kaplan S., Fergestad J. et al. // J. Biol. Chem. 1997. **272**. P. 14208–14213.
17. Askwith C., Kaplan J. // Ibid. 1998. **273**. P. 22415–22419.
18. Yuan D. S., Stearman R., Dancis A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. **92**. P. 2632–2636.
19. Georgatsou E., Alexandraki D. // Yeast. 1999. **15**. P. 573–584.
20. Roman D. G., Dancis A., Anderson G. J. et al. // Mol. Cell Biol. 1993. **13**. P. 4342–4250.
21. Shatwell K. P., Dancis A., Cross A. R. et al. // J. Biol. Chem. 1996. **271**. P. 14240–14244.
22. Hassett R. F., Romeo A. M., Kosman D. J. // Ibid. 1998. **273**. P. 7628–7636.
23. Dancis A., Klausner R. D., Hinnebusch A. G. et al. // Mol. Cell Biol. 1990. **10**. P. 2294–2301.
24. Georgatsou E., Mavrogiannis L. A., Fragiadakis G. S. et al. // J. Biol. Chem. 1997. **272**. P. 13786–13792.

25. Hassett R. F., Kosman, D. J. // *Ibid.* 1995. **270**. P. 128–134.
26. Finegold A. A., Shatwell K. P., Segal A. W. et al. // *Ibid.* 1996. **271**. P. 31021–31024.
27. Dancis A., Roman D. G., Anderson G. J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. **89**. P. 3869–3873.
28. Hassett R. F., Yuan D. S., Kosman D. J. // *J. Biol. Chem.* 1998. **273**. P. 23274–23282.
29. Di Patti M. C. B., Pascarella S., Catalucci D. et al. // *Protein Eng.* 1999. **12**. P. 895–897.
30. Blackburn N. J., Ralle M., Hassett R. et al. // *Biochemistry.* 2000. **39**. P. 2316–2324.
31. Szczypka M. S., Zhu Z., Silar P., Thiele D. // *Yeast.* 1997. **13**. P. 1423–1435.
32. Wartmann T., Stephan U. W., Bube I. et al. // *Ibid.* 2000. **19**. P. 849–862.
33. Eck R., Hundt S., Hartl A. et al. // *Microbiology.* 1999. **145**. P. 2415–2422.
34. Paronetto M. P., Miele R., Maugliani A. et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. **392**. P. 162–167.
35. Askwith C., Kaplan J. // *J. Biol. Chem.* 1997. **272**. P. 401–405.
36. Spizzo T., Byersdorfer C., Duesterhoeft S. et al. // *Mol. Gen. Genet.* 1997. **256**. P. 547–556.
37. Pufahl R. A., Singer C. P., Peariso K. L. // *Science.* 1997. **278**. P. 853–856.
38. Davies K. // *Nature Genet.* 1993. **361**. P. 98.
39. Yamaguchi Y., Heiny M., Gitlin J. D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. **197**. P. 271–277.
40. Davis-Kaplan S. R., Askwith C. C., Bengtzen A. C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. **95**. P. 13641–13645.
41. Li L., Kaplan J. // *J. Biol. Chem.* 1998. **273**. P. 22181–22187.
42. Dix D., Bridgham J., Broderius M., Eide D. // *Ibid.* 1997. **272**. P. 11770–11777.
43. Kammler M., Schon C., Hantke K. // *J. Bacteriol.* 1993. **175**. P. 6212–6219.
44. Canonne-Hegaux F., Fleming M. D., Levy J. E. et al. // *Blood.* 2000. **96**. P. 3964–3970.
45. Yeh K.-Y., Yeh M., Watkins J. A. et al. // *Am. J. Physiol.* 2000. **279**. P. G1070–G1079.
46. Pinner E., Gruenheid S., Raymond M. et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. **272**. P. 28933–28938.
47. Cohen A., Nelson H., Nelson N. // *Ibid.* 2000. **275**. P. 33388–33394.
48. Chen X., Peng J., Cohen A. et al. // *Ibid.* 1999. **274**. P. 35089–35094.
49. Atkin C. H., Neilands J. B., Phaff H. J. // *J. Bacteriology.* 1970. **103**. P. 722–733.
50. Федорович Д. В., Шавловский Г. М., Дедышин Е. Е. // *Микробиология.* 1992. **61**, № 3. С. 347–351.
51. Haas H. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. [Epub. ahead of print].
52. Carrano C. J., Raymond K. N. // *J. Bacteriol.* 1978. **136**. P. 69–74.
53. Muller G., Barclay S. J., Raymond K. N. // *J. Biol. Chem.* 1985. **260**. P. 13916–139620.
54. Crowley D. E., Wang Y. C., Reid C. P. P., Szaniszló P. J. 1991. // *Plant Soil.* **130**. P. 179–198.
55. Winkelmann G. // *In* Iron chelation in plants and soil microorganisms. L. L. Barton, and B. C. Hemming, eds. 1993. Academic Press Inc., San Diego, Calif. P. 219–239.
56. Schwyn B., Neilands J. B. // *Anal. Biochem.* 1987. **160**. P. 47–53.
57. Yun C.-W., Ferea T., Rashford J. et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. **275**. P. 10709–10715.
58. Lesuisse E., Blaiseau P.-L., Dancis A., Camadro J.-M. // *Microbiology.* 2001. **147**. P. 289–298.
59. Heynmann P., Ernst J. F., Winkelmann G. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. **186**. P. 221–227.
60. Heynmann P., Ernst J. F., Winkelmann G. // *Biometals.* 1999. **12**. P. 301–306.
61. Lesuisse E., Simon-Casteras M., Labbe P. // *Microbiology.* 1998. **144**. P. 3455–3462.
62. Heynmann P., Ernst J. F., Winkelmann G. // *Biometals.* 2000. **13**. P. 65–72.
63. Yun C.-W., Bauler M., Moore R. E. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. **276**. P. 10218–10223.
64. Moore R. E., Kim Y., Philpott C. C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. **100**. P. 5664–5669.
65. Protchenko O., Ferea T., Rashford J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. **276**. P. 49244–49250.
66. Федорович Д. В., Шавловский Г. М., Дедышин Е. Е. // *Микробиология.* 1989. **58**, № 3. С. 370–376.
67. Шавловский Г. М., Федорович Д. В., Назарук М. И. // Там же. 1988. **57**, № 1. С. 20–25.
68. Hider R. C. // *In* Structure and Binding. Siderophores from microorganisms and plants. 1987. Berlin-Heidelberg. Springer Verlag. P. 25–58.
69. Gil R., Zueco J., Sentandreu R. et al. // *Yeast.* 1991. **7**. P. 1–14.
70. Yamaguchi-Iwai Y., Dancis A., Klausner R. D. // *EMBO J.* 1995. **14**. P. 1231–1239.
71. Yamaguchi-Iwai Y., Stearman R., Dancis A. et al. // *Ibid.* 1996. **15**. P. 3377–3384.
72. Stadler J. A., Schweyen R. J. // *J. Biol. Chem.* 2002. **277**. P. 39649–39654.
73. Yamaguchi-Iwai Y., Ueta R., Fukunaka A. et al. // *Ibid.* P. 18914–18918.
74. Casas C., Aldea M., Espinet C. et al. // *Yeast.* 1997. **13**. P. 621–637.
75. Garland S., Hoff K., Vickery L. et al. // *J. Mol. Biol.* 1990. **294**. P. 897–907.

76. Rutherford J. C., Jaron S., Ray E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. **98**. P. 14322–14327.
77. Wolfe K.H., Shields D. C. // Nature. 1997. **387**. P. 708–713.
78. Rutherford J. C., Jaron S., Winge D. R. // J. Biol. Chem. 2003. **278**. P. 27636–27643.
79. Lombardo A., Carine K., Scheffler I. E. // Ibid. 1990. **265**. P. 10419–10423.
80. Kispal G., Csere P., Guiard B. et al. // FEBS Lett. 1997. **418**. P. 346–350.
81. Li J., Kogan M., Knight S. A. et al. // J. Biol. Chem. 1999. **274**. P. 33025–33034.
82. Phillips J. D., Guo B., Yu Y. et al. // Biochemistry. 1996. **35**. P. 15704–15714.
83. Muhlenhoff U., Richhardt N., Gerber J. // J. Biol. Chem. 2002. **277**. P. 29810–29816.
84. Jensen L. T., Culotta V. C. // Mol. Cell Biol. 2000. **11**. P. 3918–3927.
85. Zheng L., Cash V. L., Flint D. H. et al. // J. Biol. Chem. 1998. **273**. P. 13264–13272.
86. Babcock M., de Silva D., Oaks R. et al. // Science. 1997. **276**. P. 1709–1712.
87. Chen O. S., Kaplan J. // FEBS Lett. 2001. **509**. P. 131–134.
88. Park S., Gakh O., O'Neill H. A. et al. // J. Biol. Chem. 2003. [Epub. ahead of print].
89. Gakh O., Adamec J., Gacy A. M. et al. // Biochemistry. 2002. **41**. P. 6798–6804.
90. Nichol H., Gakh O., O'Neill H. A. et al. // Ibid. 2003. **42**. P. 5971–5976.
91. Lesuisse E., Santos R., Matzanke B. F. // Hum. Mol. Genet. 2003. **12**. P. 879–889.
92. Wiśnicka R., Krzepilko A., Wawryn I., Bilinski T. // Acta Microbiol. Polon. 1997. **46**. N 4. P. 339–347.
93. Avery S. V. // Adv. Appl. Microbiol. 2001. **49**. P. 111–142.
94. Eaton J. W., Qian M. // Free Rad. Biol. Med. 2002. **32**, N 9. P. 833–840.
95. Wiśnicka R., Krzepilko A., Wawryn I. et al. // Biochem. Mol. Biol. Intl. 1998. **44**, N 3. P. 635–641.
96. Господарьов Д. В., Лушак В. І. // Укр. біохім. журн. 2004. **76**, № 6. С. 100–105.
97. Srinivasan C., Liba A., Imlay J. A. et al. // J. Biol. Chem. 2000. **275**. P. 29187–29192.
98. De Freitas J. M., Liba A., Meneghini R. et al. // Ibid. P. 11645–11649.
99. Corson L. B., Folmer J., Strain J. J. // Ibid. 1999. **274**. P. 27590–27596.
100. Flint D. H., Tumniello J. F., Emptage M. H. // Ibid. 1993. **268**. P. 22369–22376.
101. Longo V. D., Liou L.-L., Valentine J. S., Gralla E. B. // Arch. Biochem. Biophys. 1999. **365**, N 1. P. 131–142.
102. Thomas D., Cherest H., Surdin-Kerjan Y. // EMBO J. 1991. **10**, N3. P. 547–533.
103. Slekar K. H., Kosman D. J., Culotta V. C. // J. Biol. Chem. 1996. **271**. P. 28831–28836.
104. Lushchak V.I., Gospodaryov D. V. // Cell Biol. Intl. 2005. **29**. P. 187–192.
105. Господарьов Д. В., Байляк М. М., Лушак В. І. // Укр. біохім. журн. 2005. **77**, № 1. С. 58–64.
106. Samokyszyn V. M., Miller D. M., Reif D. W. et al. // J. Biol. Chem. 1989. **264**. P. 21–26.

Отримано 29.04.2004