

**Список використаних джерел:**

1. Сетков Н.А. Анатомия биологических терминов тезаурус биолога (лексический максимум для студентов) / Н.А. Сетков. Анатомия биологических терминов тезаурус биолога (лексический максимум для студентов) // Красноярск: СФУ, 2013. – 863 с.
2. Антимикробные пептиды из опарышей [Электронный ресурс] // I-MEDIC.–2017. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.vechnayamolodost.ru/articles/biomeditsina/antimikrobnye-peptidy-iz-oparyshey/>
3. Мікробіологія харчових продуктів. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» ден. та заоч. форм навчання / Уклад.: С.М. Тетеріна, Н.М. Грегірчак. – К.: НУХТ, 2013. – 97 с.
4. Препарати, що застосовуються для очищення ран від омертвілих тканин [Електронний ресурс] // I-MEDIC. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: <http://medserver.com.ua/preparati-shho-zastosovuyutsya-dlya-ochishhennyra-ran-vid-omertvilix-tkanin>

**Dyachyshyn M.Y.**

*Student,*

*Lviv National Ivan Franko University*

**INFLUENCE OF DELETIONS IN THE C-TERMINAL SITE GLUCOSE  
SENSOR GENE GSS1 METHYLOTROPHIC YEAST  
(KOMAGATAELLA PHAFFII) PICHIA PASTORIES  
ON THE DETERIORATION OF THE PEXOPHAGY PROCESS**

Autophagy is a conservative and complex process in eukaryotic cells that provides recycling of intracellular components (e.g. proteins or organelles) and allows the cell to adapt to the environmental changes. The molecular mechanisms of autophagic degradation of cellular material are under extensive investigations. Non-specific and selective types of autophagy are known [1]. Pexophagy is a type of selective autophagic degradation of abundant peroxisomes in response to carbon source shift. Frequently, pexophagy in yeasts is monitored after the shift of the cells grown in the medium with peroxisome proliferators (oleate, methanol, methylamine) to the medium with glucose or ethanol [2]. Studies of pexophagy often use the model of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* despite the advantages of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). In baker's yeast, peroxisome proliferation is induced only by oleate. However, both oleate and methanol induce peroxisome proliferation in *P. pastoris*; indeed methanol induces much larger peroxisomes. Additionally, *P. pastoris* possesses macropexophagy and micropexophagy, induced by glucose, that why we used *P. pastoris* for autophagy research [3].

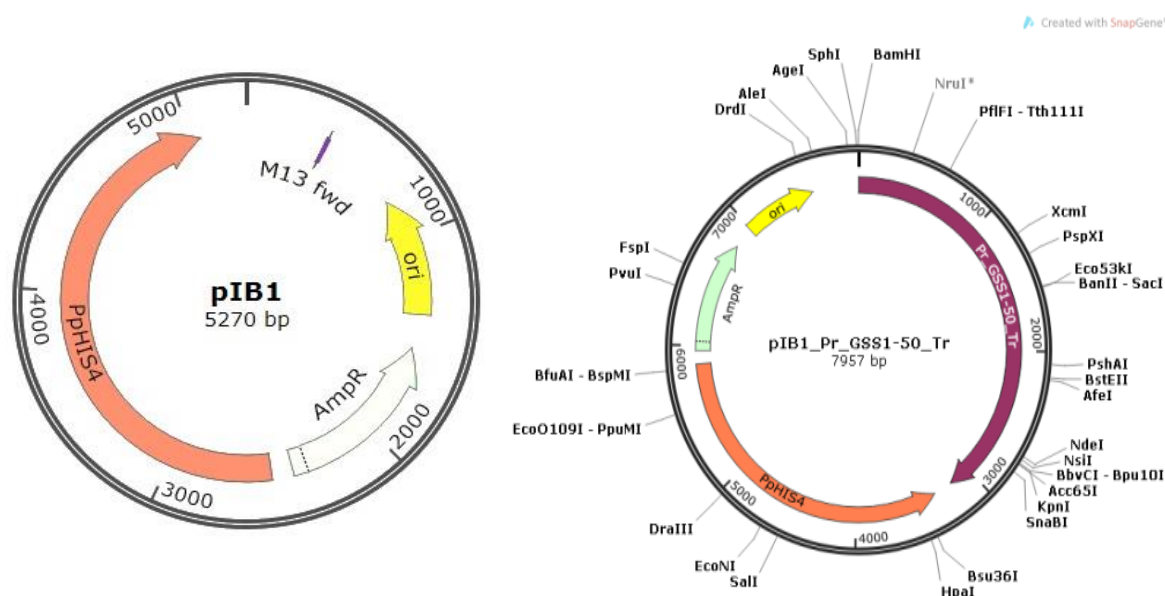
It was shown that simultaneous deletion of two glucose sensors, *Snf3* and *Rgt2*, which encode high and low-affinity glucose sensors, led to strong pexophagy deficiency in the yeast *S. cerevisiae*. In other studies was shown, that deletion of genes *Gcr1* and *Hxs1* sensors *Hansenula polymorpha*, which are orthologs of

Snf3/Rgt2 *S. cerevisiae*, letdown glucose-induced pexophagy, glucose sensing and transporting [4; 5].

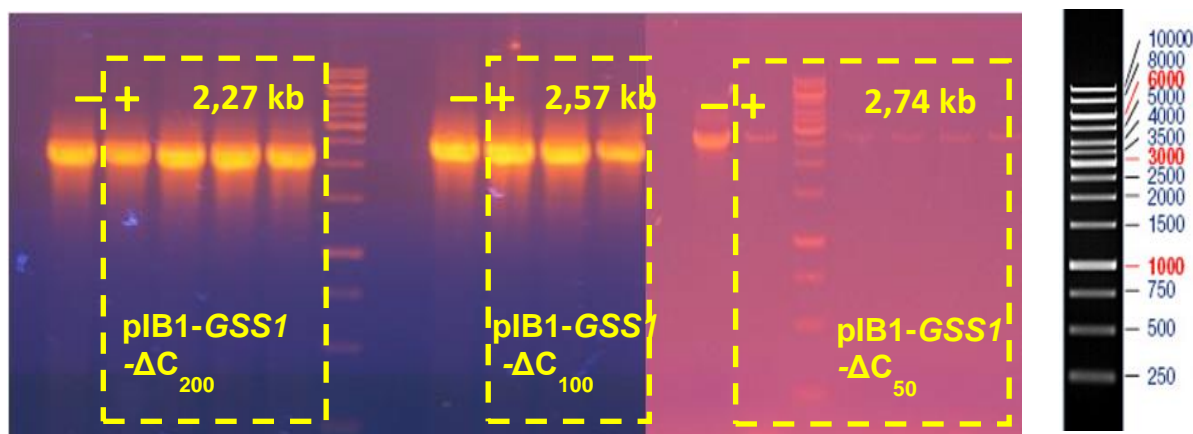
*P. pastoris* Gss1 is the ortholog of *S. cerevisiae* Snf3/Rgt2 and *H. polymorpha* Gcr1 and Hxs1 sensors and is involved in pexophagy and glucose catabolite repression in this yeast. It was shown that KNOCK-OUT of Gss1 gene leads to complete absence of pexophagy and glucose catabolite repression. PpGss1 is high and low-affinity glucose sensor (accept high 2% and low 0,1% concentration of glucose) which located in cell plasmatic membrane and have 12 transmembrane domains and long C-terminal cytoplasmic «tail», that can be involved in glucose sensing. However Gss1 isn't involved in Cvt-pathway (cytoplasm to vacuole targeting) and non-specific macroautophagy [6].

Our task was to find out, if C-terminal cytoplasmic «tail» really take part in glucose sensing and how it will affect pexophagy and catabolite repression if «tail» will be reduced by 50, 100 and 200 amino acids.

To accomplish task we constructed plasmid DNA molecule that included Gss1 gen but with reduced number of nucleotide bases on C-terminal site (-150, -300, -600 NB). As an outgoing plasmid DNA we used pIB1 molecule (Fig. 1, A) and confirmed the expected results with PCR-reaction and DNA-electrophoresis (Fig. 2).

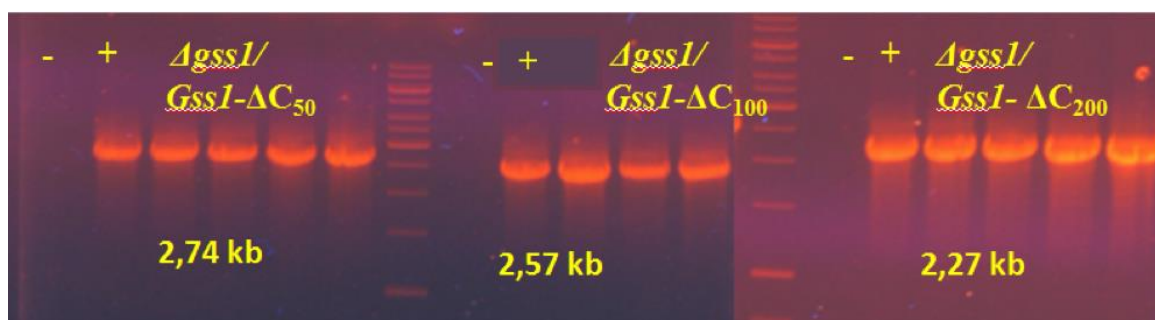


**Fig. 1. Physical map of outgoing plasmid pIB1 (A) and example of constructed plasmid pIB1-PrGSS1-GSS1- $\Delta$ C50-Tr (B) that includes gen Gss1 that will code protein but without last 50 amino acids from C-terminal site**



**Fig. 2. Confirmation of construction plasmid DNA with shortened Gss1 gen, using DNA-electrophoresis of PCR sensitized plasmid fragments that should include modified Gss1 gen**

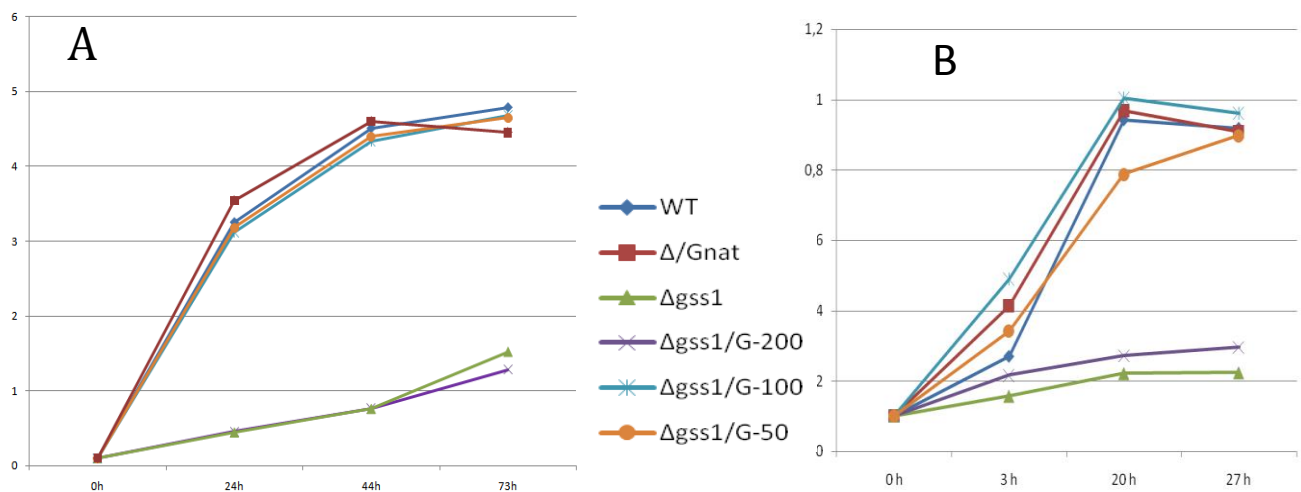
After constructing vectors, we inserted plasmid DNA in *P. pastoris* cells, that have knocked-out Gss1 gen, using electroporation. We used PCR and DNA-electrophoresis to confirm that we received mutants with modified Gss1 gen (Fig. 3).



**Fig. 3. DNA-electrophoresis of PCR synthesized fragments of gen Gss1, that were extracted from mutant yeast cells *P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-50, *P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-100, *P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-200**

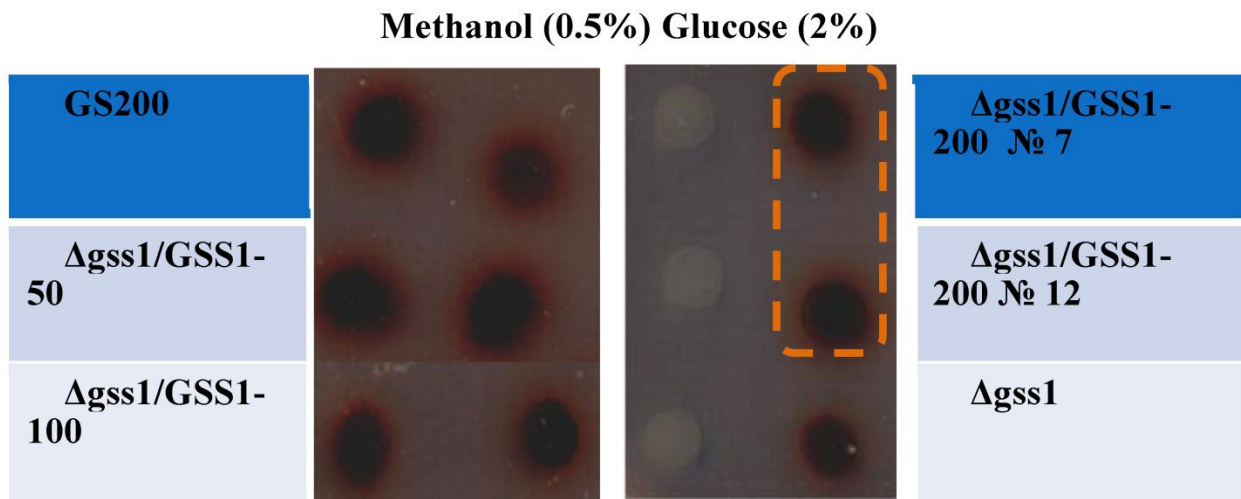
To confirm, that pexophagy isn't functioning normally, we made following experiment: we incubated mutant yeasts *P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-50,  $\Delta$ gss1/GSS1-100,  $\Delta$ gss1/GSS1-200, *P. pastoris*, *P. pastoris* GS200 (WT his4, arg4) and mutant with knocked-out gen Gss1 (*P. pastoris*  $\Delta$ gss1) on methanol for 24h. After that, we moved them to other environments with 0.1% and 2% glucose. We discovered that:

*P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-200 is growing much slowly, than mutant Gss1 (*P. pastoris*  $\Delta$ gss1). Other mutants are growing normally (Fig. 4).



**Fig. 4. Mutant cells growth rate in environments with low (0.1%) (A) and high (2%) (B) concentration of glucose**

Also we figured out, that AOX activity remains high, after incubation in environment with glucose, in mutant yeasts *P. pastoris*  $\Delta$ gss1/GSS1-200 as well as in *P. pastoris*  $\Delta$ gss1 (Fig. 5). We assume that pexophagy isn't functioning



**Fig. 5. Remaining activity of AOX in environment with 0.5% methanol and 2% glucose**

We can assume that peroxisomes aren't recycled, that's why remaining AOX activity is high and mutants  $\Delta$ gss1/GSS1-200 and  $\Delta$ gss1 have slow growth.

Gss1 protein is involved in glucose sensing. Main role in this process take C-terminal tail. A small and medium deletion doesn't cause problems with glucose signaling and pexophagy dysfunction. Large deletion have similar effect as a gen knock-out. Following researches required to understand, if Gss1 is involved is

sensing of other hexoses and if small mutations in at the beginning of the C-terminal «tail» can cause pexophagy dysfunctions and suppression of catabolic repression.

### References:

1. Kelekar A. Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1066:259–71.
2. Nazarko VY, Futej KO, Thevelein JM, Sibirny AA. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy* 2008a;4(3):381–4.
3. Neigeborn L, Schwartzberg P, Reid R, Carlson M. Null mutations in the SNF3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. *Molecular and Cellular Biology* 1986;6(11):3569–74.
4. Stasyk O.V, Stasyk O.G, Komduur J, Veenhuis M, Cregg J.M, Sibirny A.A. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(9):8116–25.
5. Polupanov A.S, Nazarko V.Y, Sibirny A.A. Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012) 1906–1918.

**Козак Т.П.**

*студентка,*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка*

*Науковий керівник: Лихова О.О.*

*кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник,*

*Інститут патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького*

## РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У ПРОЦЕСІ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДУ ПУХЛИННИХ КЛІТИН

Програма епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) – природний процес трансдиференціювання, який обумовлює епітеліально-мезенхімальну пластичність епітеліальних клітин і здатний направити розвиток епітеліальних клітин в бік мезенхімальних для набуття здатності до метастазування [1]. Сьогодні добре відома роль стромальних клітин в контролі фенотипу і поведінки пухлинних клітин [2], однак роль клітин кісткового мозку мало вивчена, хоча кістковий мозок є осередком значної кількості клітин різного рівня диференціювання та комітованості. Ці клітини є активними продуцентами цитокінів, що впливають на пухлинні клітини, приймаючи участь у процесах ЕМП.

З метою визначення можливої ролі деяких розчинних компонентів мікрооточення (цитокінів) кісткового мозку (КМ) у модифікації імунофенотипу пухлинних клітин епітеліального (лінія MCF-7) та мезенхімального (лінія MDA-MB-231) фенотипу проводили дослідження впливу мононуклеарів КМ хворих на рак молочної залози (РМЗ) людини *in vitro* з використанням моделі мультиорганної клітинної системи (МОС) [3]. В експерименті клітини КМ