

**Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова**

Биологический факультет

На правах рукописи

Карпова Елена Витальевна

**Сравнительное изучение роли белка и полисахаридов в
молекулярной организации клеточной поверхности археи
Halobacterium salinarium и клеточной стенки некоторых видов
дрожжей.**

03.00.07 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2007

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор, чл.-корр. РАН
И.С. Кулаев (03.00.07-микробиология),
доктор биологических наук
Т.С. Калебина (03.00.03-молекулярная биология)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Т.А. Белозерская,
доктор биологических наук
Н.В. Потехина

Ведущая организация **Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН**

Защита состоится 13 февраля 2007 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан ____декабря 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из важнейших компартментов клетки микроорганизмов является клеточная поверхность (КП), в состав которой входит клеточная стенка (КС), цитоплазматическая мембрана и, в некоторых случаях, периплазматическое пространство. КС представляет собой внешнюю часть КП. Она играет роль наружного скелета клетки, выполняет защитную функцию и осуществляет комплекс взаимоотношений клетки с окружающей средой. Таким образом, КС является важной и многофункциональной органеллой клетки, которая отражает основные особенности микроорганизма, в зависимости от условий его обитания и принадлежности к той или иной филогенетической группе. Это делает КС весьма интересным объектом для изучения.

Основными структурными компонентами КС микроорганизмов являются белки различной степени гликозилирования и полисахариды. Следует отметить, однако, что компонентный состав КС микроорганизмов различной видовой и таксономической принадлежности может существенно отличаться (Kandler, König, 1993; Klis, 1994; Калебина, Кулаев, 2001).

Белки выполняют двоякую функцию в КС: ферментативную, участвуя во встраивании структурных компонентов в КС и функцию структурного модуля. Для исследователей белки КС, также, могут являться важным маркером для изучения процессов эволюции. Последнее можно отнести, например, к белкам, относящимся к семейству коллагенов. Как известно, именно коллагены являются важными структурными белками высших эукариот животного происхождения. В связи с этим интересно было бы проследить, присутствуют ли белки с коллагеноподобными последовательностями в белках КС микроорганизмов, находящихся на разных стадиях эволюционного развития. Основанием для поиска таких белков в составе КП микроорганизмов явились работы М.В. Нурминской (Нурминская и др., 1994), выполненные в нашей лаборатории. Помимо этого, сравнительное исследование белкового состава КС микроорганизмов, относящихся к разным филогенетическим группам, даст возможность проследить основные этапы эволюции КС у разных микроорганизмов.

Другой структурный компонент КС - полисахариды служат опорным материалом жестких клеточных стенок (хитин, глюкан, целлюлоза); выполняют защитные функции (капсульные полисахариды), а также служат в качестве энергетического резерва клетки (Вагабов, 1997). Гидрофильные полисахариды способствуют поддержанию водного баланса клеток. Особенно важную роль играют полисахариды в образовании клеточных поверхностей, характеризующихся набором различных типов молекул полисахаридов,

входящих в их состав. Так, например, КС грибов - оомицетов состоят, в основном, из целлюлозы и глюкана, а не хитина, как у большинства других мицелиальных грибов.

Таким образом, сравнительное изучение роли основных структурных компонентов в молекулярной организации КП микроорганизмов из разных филогенетических групп является важной и актуальной в настоящее время задачей. Особенно актуальным является изучение КП архей, сравнительно недавно охарактеризованного домена живых существ, в первую очередь, в контексте сравнения присутствующих на их поверхностях белков и полисахаридов с компонентами КС дрожжей – представителей низших эукариот.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы явилось сравнительное изучение роли основных структурных компонентов, а именно белков и полисахаридов, в молекулярной организации КП археи *Halobacterium salinarium* и КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis*.

В работе были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Поиск коллагеноподобных последовательностей в белках КП археи *Halobacterium salinarium* и КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis*.
2. Сравнительный анализ роли белка и полисахаридов КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis* в поддержании ее прочности.
3. Выявление возможности существования близких структурных мотивов в построении молекулярного ансамбля клеточной поверхности археи *Halobacterium salinarium*, и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis*.

Научная новизна работы. Показано присутствие в белках КП археи *H. salinarium* и КС дрожжей *H. polymorpha* и *C. utilis* сайтов для гидролиза клостридиопептидазой *Clostridium histolyticum*. В результате сравнительного анализа вклада белковых и полисахаридных компонентов в формирование структурной целостности КС дрожжей продемонстрировано, что в КС дрожжей *S. cerevisiae* более значимую роль играют полисахариды, тогда как в клеточной стенке дрожжей *H. polymorpha* и *C. utilis* основная структурная роль принадлежит белкам. Полученные результаты могут свидетельствовать о возможном существовании в клетках архей (древних прокариот) и некоторых дрожжей (низших эукариот) коллагеноподобных последовательностей, столь характерных для коллагенов высших эукариот животного происхождения. Проведенное в рамках данной работы исследование структурных компонентов КП археи *H. salinarium* и КС дрожжей *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* и *C. utilis* позволяет лучше понять основные принципы строения их клеточных оболочек.

Практическая значимость работы. Выявление присутствия коллагеноподобных последовательностей в белках КП археи *H. salinarium* и КС дрожжей *H. polymorpha* и *C. utilis* является весьма важным для прикладной фармакологии и медицины. Исследование

строения и свойств коллагеноподобных модулей в КС дрожжей позволит эффективнее бороться с дегенеративными заболеваниями млекопитающих, связанными с нарушением структуры коллагеновых волокон. Кроме того, это будет способствовать более интенсивному использованию дрожжей в биотехнологических процессах, в частности, при производстве «клонированного коллагена». Применяемый в данной работе высокоспецифичный тест с использованием бактериальной клостридиопептидазы *Cl. histolyticum* позволяет быстро и эффективно выявить присутствие коллагеноподобных последовательностей в белках КП археи *H. salinarium* и КС дрожжей *H. polymorpha* и *S. utilis*. Этот тест может существенно облегчить работу по идентификации коллагеноподобных белков в КС других микроорганизмов, а также позволит более детально проследить эволюцию коллагенов.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на конференциях: «Ломоносов – 2000» международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам; Международный симпозиум в Пущино, 2000; Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, University of Washington, Seattle, USA 2000; I Съезд микологов России, Москва, 2002; III съезд Российского биохимического общества, Санкт-Петербург, 2002; Yeast Genetics @ Molecular Biology Meeting, University of Wisconsin, Madison, 2002; FEMS Congress of European Microbiologists, Slovenia, 2003.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Объем работы составляет 134 стр., включая 54 рисунка и 7 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Культуры микроорганизмов. В качестве объекта исследования использовали следующие микроорганизмы: архея *Halobacterium salinarium* штамм ET-1001 (Институт биохимии им. Макса Планка, лаборатория проф. Остерхельда, Германия); дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - штамм DBY746 – любезно предоставлен чл.-корр. РАН М.Д. Тер-Аванесяном (Кардиологический центр, Москва), штамм DBD8 (*Δbgl2p*) с делетированным геном, кодирующим глюкантрансферазу Bgl2p – ранее получен в нашей лаборатории Даниэлой Лауринавичюте, штамм YB110 (*Δchs3*) с делетированным геном, кодирующим хитинсинтетазу Chs3 - любезно предоставлен Б. Сантос (Йельский университет, США), штамм (*Δbgl2p Δchs3*) с двумя делетированными генами, кодирующими глюкантрансферазу Bgl2p и хитинсинтетазу Chs3 - любезно предоставлен Г. Фоминовым (Кардиологический центр, Москва) ; дрожжи *Hansenula polymorpha* -

штамм DL1-L - любезно предоставлен М.О. Агафоновым (Кардиологический центр, Москва), штамм *Δbgl2p* с deletированным геном, кодирующим глюкантрансферазу Bgl2p – получен в нашей лаборатории Дмитрием Соболевым; дрожжи *Candida utilis* - штамм ВКМ У-174 (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов, ИБФМ РАН, Пущино).

Приготовление препаратов КП *H. salinarium*. Клетки археи *H. salinarium* разрушали двумя способами: с помощью постепенного понижения концентрации солей (25%(4,3M) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) и в растворе солей того же состава с использованием стеклянных шариков баллотини. Далее полученный препарат КП промывали основным раствором солей (25%(4,3M) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) 3 раза, хранили при температуре 4 °C . Степень чистоты полученного препарата КП контролировали с помощью светового микроскопа и измеряя оптическую плотность при 280 нм. (Mescher, Strominger, 1976 с некоторыми модификациями).

Приготовление препаратов КС дрожжей. Клетки дрожжей разрушали с помощью стеклянных шариков баллотини (Sigma). КС дрожжей отмывали - 1 раз 0.05 М трис-HCl pH 7.5 буфером с 4 mM CaCl₂ , 3 раза раствором 1% сахарозы, 3 раза раствором 1% NaCl, 3 раза 0.05 М трис-HCl буфером pH 7.5 с 4 mM CaCl₂. Все процедуры разрушения клеток проводили при охлаждении, клеточные стенки от внутриклеточного содержимого отделяли центрифугированием, степень чистоты полученного препарата клеточных стенок контролировали с помощью светового микроскопа, а также измеряя оптическую плотность промывного раствора на спектрофотометре LKB Biochrom Ultrospec II UV/Visible при длине волны 280 нм. Препарат КС хранили при температуре 4 °C в 0.05 М трис-HCl буфере (pH 7.5) (Mendoza, Villanueva, 1963; Калебина и др., 1998) .

Микроскопические методы. В работе использовали методы: фазово-контрастного изображения клеток с использованием светового микроскопа фирмы LOMO; электронной микроскопии – клетки (клеточные стенки) фиксировали 5% глutarовым альдегидом в присутствии 5% диметилсульфоксида, с последующей фиксацией 1% OsO₄ (Zubotov *et. all.*, 1979 с некоторыми модификациями) (обработку клеточных стенок археи *H. salinarium* проводили в присутствии 4,3 М NaCl (Stoeckenius., Rowen, 1967 с модификациями)) – исследование полученных образцов проводили на электронном микроскопе Hitachi-11F. Использовали, также, метод прижизненного окрашивания клеток дрожжей калькофлуором белым (CFW) (Sigma), взаимодействующим с хитиновыми фибриллами (Brutt *et. all.*, 1989) с последующим исследованием их на световом микроскопе Axioskop 40 FL фирмы Zeiss.

Выделение белков из клеточных стенок. SDS-экстрагируемую фракцию белков получали, прогревая образец в течении 5 мин. при 100°C с буфером Лэмли (Mrsa

et.al.,1999), содержащим 0,2 М трис-HCl, pH 7,6, 6% SDS, 10% β-меркаптоэтанола, 20% глицерина и 0,02 М ЭДТА (Laemmli, 1970).

Фракции белков, ковалентно связанные с КС получали после полного удаления SDS-экстрагируемой фракции. NaOH-экстрагируемую фракцию получали обрабатывая полученный на центрифуге *Beckman* (4000 об./мин. в течении 1 мин.) осадок 50 мМ NaOH в течение ночи при 4°C. Ламиarinaзо-экстрагируемую фракцию белков получали гидролизуя КС после удаления SDS-экстрагируемой фракции ламиarinaзой (β1,3 глюканазой (Sigma) в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5 при 37°C в течении 4 часов (Mrsa et.al.,1999).

Анализ белков. Белки КС (КП) анализировали ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях в 8-12% геле (Laemmli, 1970). При электрофоретическом анализе белков использовался маркер фирмы “Amersham Pharmacia Biotech”, состоящий из белков с определенной молекулярной массой (kDa): миозин (220), фосфоорилаза b (97), альбумин бычьей сыворотки (66), овальбумин (45), карбоангидраза (30), ингибитор трипсина (20,1), лизоцим (14,3).

Получение очищенного препарата клостридиопептидазы. Очистку коммерческого препарата клостридиопептидазы из *Cl. histolyticum* фирмы «Serva» проводили с помощью электрофореза в не денатурирующих условиях при 4°C и напряжении 170В в течение 7 часов (Балаевская, 1989). В полученных препаратах фермента определяли протеолитическую (с казеином) и коллагеназную активности (Балаевская, 1989).

Другие методы. Для обработки КС использовали следующие ферменты: трипсин (ICN) - 1мг фермента на 1 о.е. (D540) КС; очищенный препарат клостридиопептидазы из *Cl. histolyticum* фирмы «Serva» - 10 мкл раствора фермента в 0,05 М трис-HCl буфере с добавлением 0,025% CaCl₂ (pH 7,6) на 1 о.е. (D540) КС. Биотинилирование белков осуществляли в 50мМ калий-фосфатном буфере pH=8.0, содержащем 10 мг/мл NHS-LC-биотина (сульфосукцинимидил-6-(биотинамидо)гексонат) (ICN) (Mrsa,1997). После электрофореза белки, в зависимости от задачи, либо окрашивали с помощью нитрата серебра, либо идентифицировали с помощью Вестерн-блот анализа по стандартной методике (Михайлов и Смирский, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Использование клостридиопептидазы *Clostridium histolyticum* для выявления коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной поверхности (клеточной стенки) микроорганизмов.

На первом этапе наших исследований нами были проведены эксперименты по выявлению присутствия коллагеноподобных последовательностей в белках КП археи *H.*

salinarium и КС дрожжей *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* и *C. utilis*. Для этого нами был использован высокоспецифичный тест - бактериальная кlostридиопептидаза *Clostridium histolyticum* (Nordwig *et. all.*, 1971) фирмы «Serva». Перед использованием в экспериментах данный коммерческий препарат кlostридиопептидазы подвергался электрофоретической очистке от примесных протеолитических ферментов, присутствующих в нем. Далее проводили процедуру проверки качества очистки выделенного препарата коллагеназы. В наших экспериментах использовали только те препараты коллагеназы, в которых детектировали коллагеназную активность, но не было обнаружено неспецифической протеолитической активности.

В связи с тем, что одним из следующих этапов нашей работы была обработка КП галофильной археи *H. salinarium*, выращиваемой в среде с повышенным содержанием солей (25%(4,3M) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) препаратом коллагеназы, была проведена проверка активности этого фермента в буферах с разной концентрацией NaCl – препарата соли с наибольшей концентрацией в используемом буфере.

В результате этого эксперимента было показано, что активность коллагеназы в буфере с содержанием NaCl в концентрации 3M и более значительно снижается.

В связи с этим при подготовке препаратов КП *H. salinarium* для обработки их коллагеназой необходимо провести процедуру отмывки их от солей.

1.1. Идентификация коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной поверхности археи *Halobacterium salinarium*.

Археи, и в частности галобактерии, сочетают в себе признаки как прокариотических так и эукариотических клеток. С прокариотами их объединяет отсутствие ядра и митохондрий, а также некоторое сходство в строении поверхностных слоев, с эукариотами – сходство строения рибосом (König, 1988). Кроме того, одним из белков КП облигатно-галофильных архей рода *Halobacterium* является мажорный гликопротеин, по способу гликозилирования и по составу олигосахаридов подобный гликопротеинам эукариотической, в частности животной, клетки. Особенно интересно, что в молекуле этого гликопротеина присутствует кластер треониновых остатков гликозилированных дисахаридами по типу, характерному для молекул коллагена животных клеток (Kandler, König 1993). Помимо этого, было показано, что полная структура галобактериального мажорного поверхностного гликопротеина напоминает эукариотические протеогликан-коллагеновые комплексы (Wieland 1988). Данный факт позволил предполагать, что сходство с коллагеном может быть обнаружено не только в способе гликозилирования данного гликопротеина, но и в самих аминокислотных последовательностях белков, формирующих КП *H. salinarium*. Это, в свою очередь, могло

бы свидетельствовать о возможном эволюционном родстве архей, в частности *H. salinarium*, с клетками эукариот.

Таким образом, целью этой части работы был поиск коллагеноподобных последовательностей в белках КП археи *H. salinarium* штамм ET-1001. Для этого мы провели эксперимент по воздействию высокоспецифичного в отношении коллагена фермента клостридиопептидазы на изолированные клеточные поверхности (КП) этого микроорганизма.

Как было сказано ранее, перед обработкой КП археи *H. salinarium* клостридиопептидазой необходимо отмыть препарат КП от солей (25%(4,3М) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O). При сравнении фотографий электронной микроскопии препарата КП, приготовленного без отмытки от солей (Рис.1 А) и отмытых от них (Рис.1 Б) можно видеть, что при понижении солевой концентрации происходит лизис КП. Этот факт подтверждается данными, описанными в литературе (Mescher, Strominger, 1974; Mescher, Strominger, 1976).

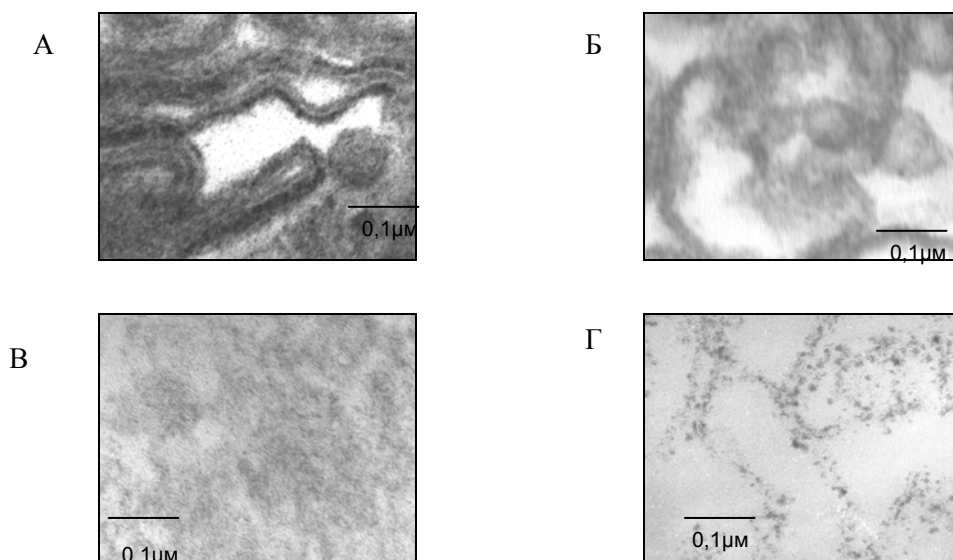


Рис. 1. Электронная микроскопия клеточных поверхностей археи *Halobacterium salinarium*.

А- препарат КП , полученный путем механического разрушения клеток с помощью стеклянных шариков баллотини в растворе солей;

Б – препарат КП , полученный путем механического разрушения клеток с помощью стеклянных шариков баллотини и отмытый от солей (25%(4,3М) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) 0,05 М трис HCl буфером с добавлением Ca²⁺ (см. «Материалы и методы»);

В – препарат КП , полученный путем механического разрушения клеток с помощью стеклянных шариков баллотини , отмытый от солей (25%(4,3М) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) 0,05 М трис HCl буфером с добавлением Ca²⁺ и проинкубированный в 0,05 М трис HCl буфере с добавлением Ca²⁺ 20 мин. при 37 °С , затем 30 мин. при 45 °С без добавления клостридиопептидазы (условия инкубации КП микроорганизмов с клостридиопептидазой были разработаны в нашей лаборатории к. б. н. О.В. Алексеевой);

Г -препарат КП , полученный путем механического разрушения клеток с помощью стеклянных шариков баллотини , отмытый от солей (25%(4,3М) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) 0,05 М трис HCl буфером с добавлением Ca²⁺ и проинкубированный 20 мин. при 37 °С , затем 30 мин. при 45 °С в присутствии клостридиопептидазы (условия инкубации КП микроорганизмов с клостридиопептидазой были разработаны в нашей лаборатории к. б. н. О.В. Алексеевой).

В результате обработки отмытых от солей (25%(4,3M) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% цитрат Na, 2% MgSO₄·7H₂O) КП *H. salinarium* клостридиопептидазой в них происходят существенные структурные нарушения (Рис.1 В и Г). КП опытного образца выглядит более деструктурированной (рис. 1Г) по сравнению с контрольным (без коллагеназы) образцом (рис. 1В). В среде инкубации (рис. 1Г) накапливались сильно фрагментированные элементы КП.

Поскольку, как было сказано в обзоре литературы, главным структурным компонентом КП данного вида архей является гликопротеин с молекулярной массой 194 kDa (Mescher, Strominger, 1974), мы предположили, что в результате действия клостридиопептидазы именно этот белок подвергается лизису. Для проверки этого предположения нами был проведен электрофоретический анализ белкового состава КП используемого в этой работе штамма ET1001 *H. salinarium*. Результаты этого анализа представлены на рисунке 2.

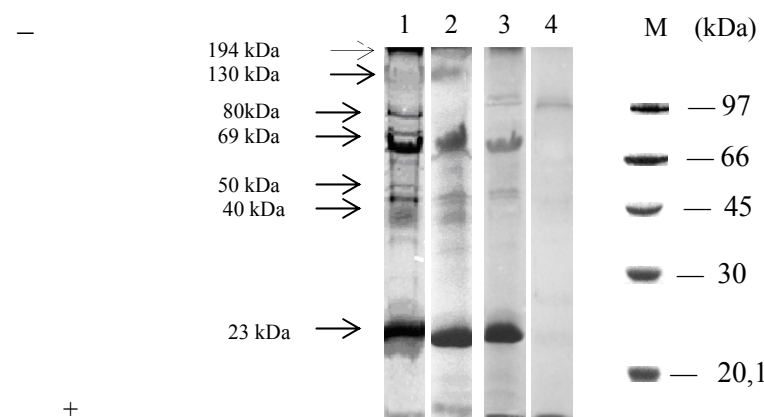


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ белков, экстрагированных из клеточной поверхности *Halobacterium salinarium* штамм ET1001, отмытых от солей :

- 1 – без обработки клостридиопептидазой, хранящиеся при 4 °С;
- 2 - без обработки клостридиопептидазой, инкубация 20 мин. при 37 °С , затем 30 мин. при 45 °С;
- 3 – после обработки клостридиопептидазой, инкубация 20 мин. при 37 °С, затем 30 мин. при 45 °С;
- 4 – препарат клостридиопептидазы.

М - маркер фирмы “Amersham Pharmacia Biotech”, состоящий из белков с определенной молекулярной массой (см. «Материалы и методы»).

При сравнении электрофореза белков КП используемого нами штамма *H. salinarium* с данными представленными в литературе (Mescher ,Strominger , 1974; Mescher, Strominger, 1976a) нами было обнаружено, что высокомолекулярный белок (гликопротеин) с молекулярной массой 194 kDa подвергся гидролизу эндогенными ферментами в процессе выделения КП без солей (Рис. 2 (1)), поскольку на дорожке ПААГ появляются дополнительные полосы белка, не описанные в работе Мешер и Стромингер (Mescher , Strominger , 1974). Факт гидролиза этого мажорного гликопротеина КП *H. salinarium* в данных условиях был описан в литературе (Mescher , Strominger , 1976a). При

инкубации препарата КП в буфере, не содержащем солей, по-видимому, происходит подобный гидролиз (рис 2 (2)) . Это можно предположить, поскольку в препарате уменьшается количество белков с молекулярными массами 80, 69, 50 и 40 kDa, представленных на дорожке 1 (рис. 2 (1)). Количество же белков с молекулярными массами 130 и 23 kDa не уменьшается (рис. 2 (2)). Это еще раз подтверждает тот факт, что сочетание понижения концентрации солей и повышения температуры при нашем способе получения препарата КП приводит к гидролизу некоторых белков КП. Таким образом, исследовать действие клостридиопептидазы можно в дальнейшем только на те белки, которые не подвергаются самопроизвольной деградации. Этими белками, по результатам наших исследований (рис 2), являются белки с молекулярной массой 130 и 23 kDa.

Далее нами было проведено сравнение белков контрольного (не обработанного клостридиопептидазой) (рис. 2 (2)) и опытного (обработанного клостридиопептидазой) (рис. 2 (3)) образцов, полученных из КП *H. salinarium*. В результате этого сравнения было показано, что при действии клостридиопептидазы количество белка с молекулярной массой 23 kDa остается неизменным и исчезает белок с молекулярной массой 130 kDa. Полученные результаты позволяют предположить наличие коллагеноподобных последовательностей в данном белке (130 kDa).

Следующим этапом нашей работы был анализ аминокислотных последовательностей белков КП *H. salinarium* в компьютерной базе данных. В результате поиска коллагеноподобных фрагментов среди известных на настоящее время аминокислотных последовательностей белков археи *H. salinarium* было обнаружено, что в геноме этого вида археи присутствует белок с неизвестной локализацией и функциями, так называемый «гипотетический белок» (VNG), а именно VNG0361C (рис 3). При анализе аминокислотной последовательности этого белка было обнаружено, что она содержат потенциальные сайты для гидролиза клостридиопептидазой (рис 3).

VNG0361C (333aa)

```

241 pglriylyfv ipmplwlatg lfaaysifvs gtggigaggv aqlahlaglg igllygaklk
301 regarapnel qfgggpgggm gpgpgpgpg gtr
      ↑   ↑   ↑   ↑   ↑           ↑   ↑   ↑

```

Рис. 3. Фрагменты аминокислотной последовательности белка археи *Halobacterium salinarium*, обнаруженного в компьютерной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Стрелками обозначены сайты для возможного гидролиза клостридиопептидазой. В скобках указано количество аминокислот, входящих в состав белка.

В настоящее время точных данных о локализации белка, представленного на рисунке 3 нет. Сказанное позволяет предположить, что данный белок, возможно, локализован в толще КП. В этом случае, в свою очередь, можно сделать предположение,

что, либо представленный в базе данных фрагмент (333 aa) белка является частью обнаруженного нами белка с молекулярной массой 130 kDa, либо данная последовательность принадлежит присутствующему в КП эндогенному ферменту, например, протеиназе, которая активизируется после действия клостридиопептидазы. Дальнейшая активность гипотетической протеиназы в свою очередь может являться причиной значительных структурных изменений (Рис. 1).

Таким образом, можно предположить, что белок, содержащий коллагеноподобную последовательность, а именно VNG0361C (рис 3) локализован в КП. Следовательно, представленные в этой главе данные свидетельствуют в пользу наличия коллагеноподобных последовательностей в белках КП *H. salinarium*. Этот факт является весьма важным как для характеристики самих белков, так и с эволюционной точки зрения.

Кроме того, при прослеживании эволюционных отношений интересным также является то, что полисахаридная часть гликопротеина КП *H. salinarium* (194 kDa) имеет мотивы, напоминающие хитин, входящий в состав КС эукариот. Высокомолекулярная гликозаминогликановая цепь, входящая в состав этого гликопротеина состоит из повторяющихся сульфатированных пентасахаридных блоков, включающих *N*-ацетил-глюкозамин (König, 1988; Paul *et. al.* 1986).

На основании представленных выше фактов для прослеживания эволюционных отношений между прокариотическими и эукариотическими микроорганизмами логичным и весьма интересным было бы провести исследования роли белка и полисахаридов в молекулярной организации КС низших эукариот.

1.2. Идентификация коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной стенки дрожжей.

На первом этапе работы логичным и весьма интересным было бы провести поиск коллагеноподобных последовательностей в белках КС низших эукариот.

При выборе объекта такого рода исследований мы остановились на микроорганизмах, относящихся к царству грибов. Это обусловлено тем, что грибы имеют своеобразное строение клетки, сочетающее, как особенности растительной клетки (наличие клеточной стенки, вакуолей, способность к синтезу витаминов), так и животной (наличие хитина в КС, запасных углеводов в форме гликогена и трегалозы).

Особое положение среди грибов занимают дрожжи, которые широко используются в научных исследованиях как модель эукариотической клетки. В последнее время в литературе появились весьма интересные факты, говорящие о том, что по структуре и способам встраивания белки КС некоторых видов дрожжей напоминают фибриллярные

белки высших эукариот (Wosten, 2001). На начальном этапе выполнения данной работы была сделана попытка решить вопрос о присутствии белков с коллагеноподобными последовательностями в КС дрожжей.

В наших экспериментах по идентификации коллагеноподобных белков мы использовали хорошо изученную группу аскомицетных дрожжей, наиболее ярким представителем которой являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

В качестве объекта для сравнения мы использовали дрожжи, принадлежащие к роду *Pichia*, а именно *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*) и *Pichia jadinii* (*Candida utilis*) (рис. 4). В скобках приведены традиционные названия дрожжей. Как известно, эти виды дрожжей достаточно далеко удалены на филогенетическом древе от *S. cerevisiae* (рис.4).

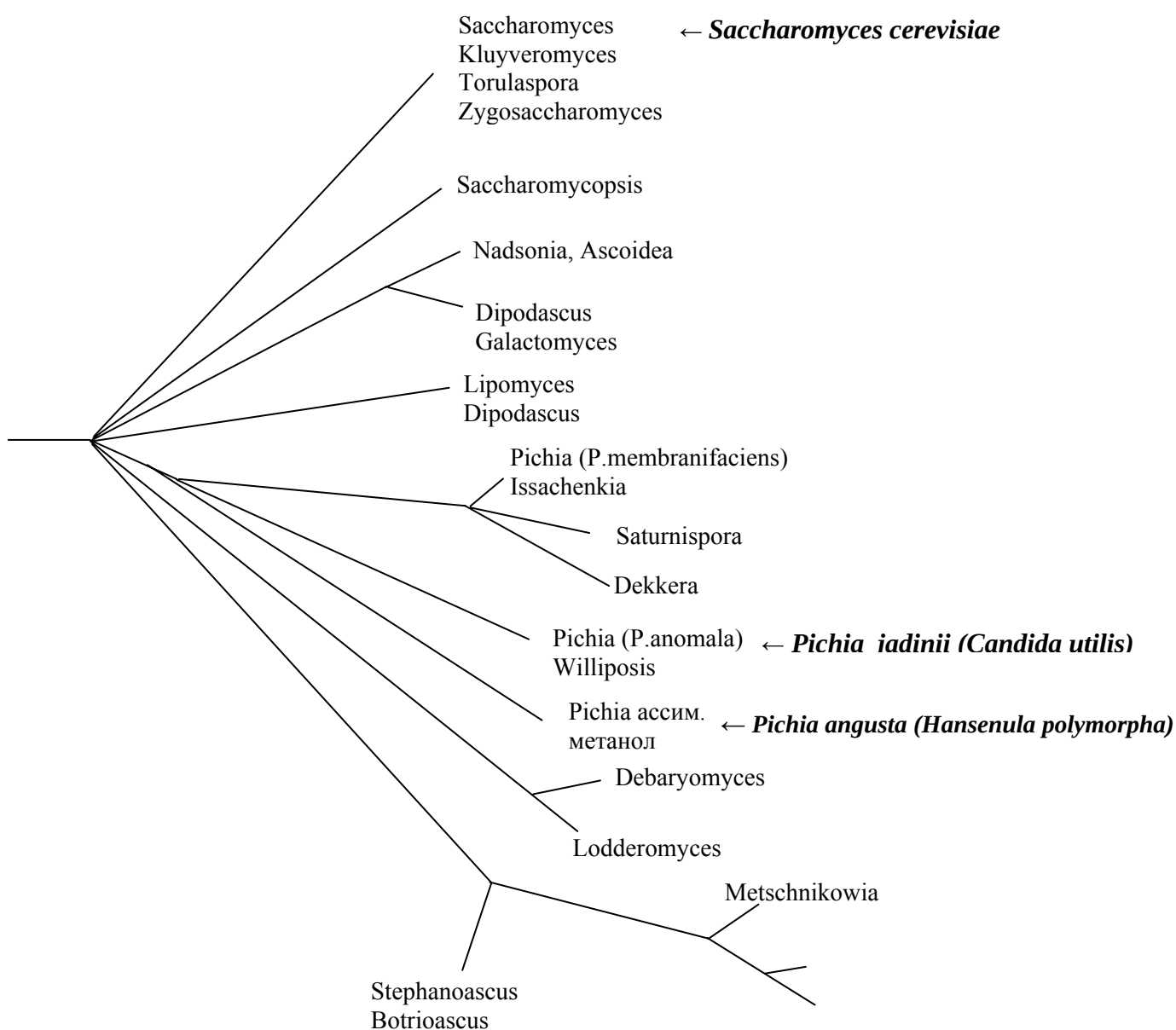


Рис. 4. Обобщенное филогенетическое древо аскомицетных дрожжей, построенного по результатам, представленным в статье Куртзмана и Робнета (Kurtzman , Robnett , 1998).

1.2.1. Идентификация коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis*.

Ранее в нашей лаборатории были проведены опыты по обработке изолированных КС дрожжей *C. utilis* клостридиопептидазой (Nurminskaya et. al., 1993). В результате этих экспериментов было показано, что клостридиопептидаза нарушает структуру КС этого вида дрожжей, что свидетельствует в пользу наличия в этой структуре коллагеноподобных последовательностей.

В связи с этим весьма интересным было бы провести эксперимент по воздействию на изолированные КС дрожжей *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* высокоспецифичного для коллагена фермента клостридиопептидазы из *Clostridium histolyticum*. Результаты этого опыта продемонстрированы на рисунке 5.

На этом рисунке видно, что клостридиопептидаза не влияет на структуру КС *S. cerevisiae*. Однако, в результате действия этого высокоспецифичного в отношении коллагена фермента происходят изменения в КС *H. polymorpha*, которые связаны с гидролизом этой органеллы клетки в области почечного рубца. Изменений же в латеральной КС этого вида дрожжей не наблюдалось.

Таким образом, представленный на рисунке 5 результат может свидетельствовать о присутствии белков с коллагеноподобными последовательностями в КС дрожжей *H. polymorpha* в первую очередь в зоне почечного рубца.

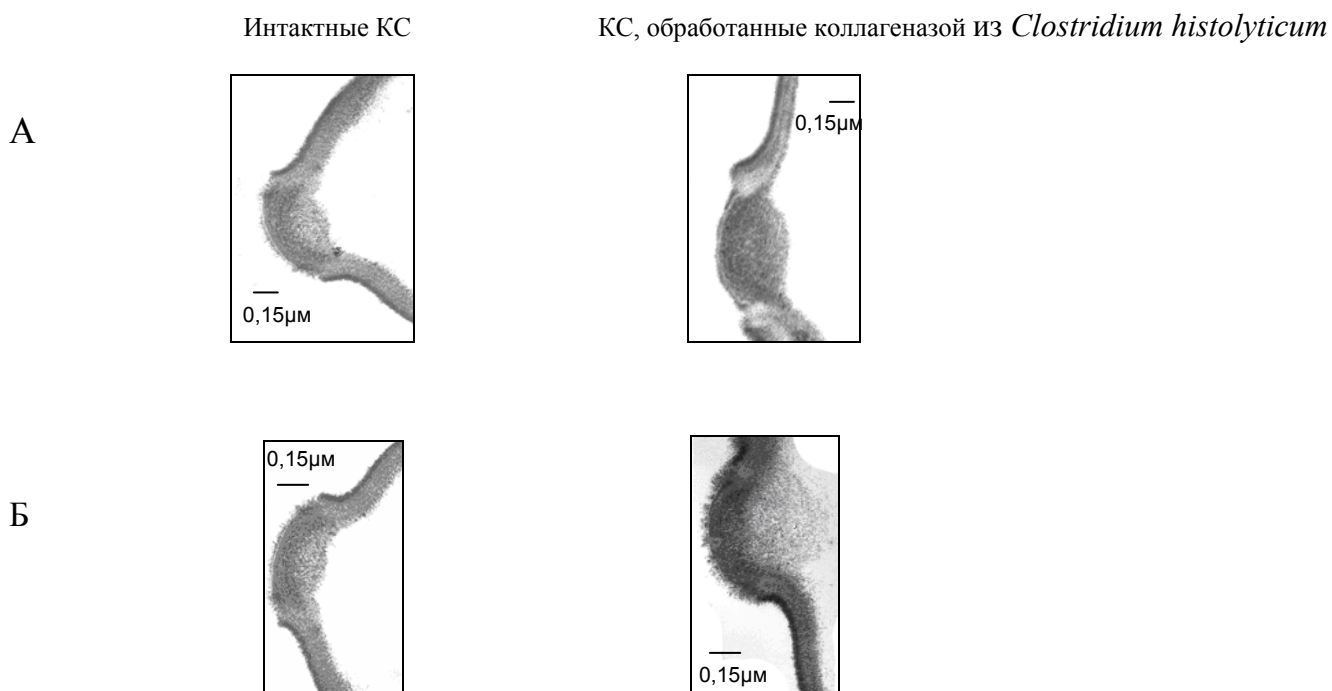


Рис. 5. Электронные микрофотографии клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*(А) и *Hansenula polymorpha* (Б).

По имеющимся на сегодняшний день данным, важными структурными компонентами КС дрожжей являются белки ковалентно связанные с полисахаридным каркасом клетки (Калебина, Кулаев, 2001). К такой группе относятся белки GPI- и PIR-семейств. Однако, как следует из результатов предыдущего опыта (рис.5) GPI-белки не должны являться предметом нашего исследования при поиске коллагеноподобных последовательностей, поскольку они составляют основной матрикс наружного электронно-плотного слоя КС, который не разрушается под действием клостридиопептидазы.

Кроме того, при сравнении белковых фракций КС дрожжей *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* и *C. utilis* было обнаружено, что в отличие от GPI-белков, PIR-белки КС дрожжей *H. polymorpha* при электрофорезе в ПААГ выглядят единой окрашенной зоной, соответствующей совокупности белков, не выявляемых в виде отдельных полос. Одним из объяснений такого нерасхождения PIR-белков при электрофорезе может быть более высокая степень маннозилирования белков КС *H. polymorpha*. Однако, можно также предположить, что существует и другое объяснение этого факта. Вероятным является то, что белки PIR-семейства способны собираться в комплексы, подобные комплексам сетчатого коллагена высших эукариот.

С целью проверки последнего предположения мы провели эксперимент по сравнительному анализу степени расхождения фракции PIR-белков КС *H. polymorpha* при разных условиях инкубации (рис. 6).

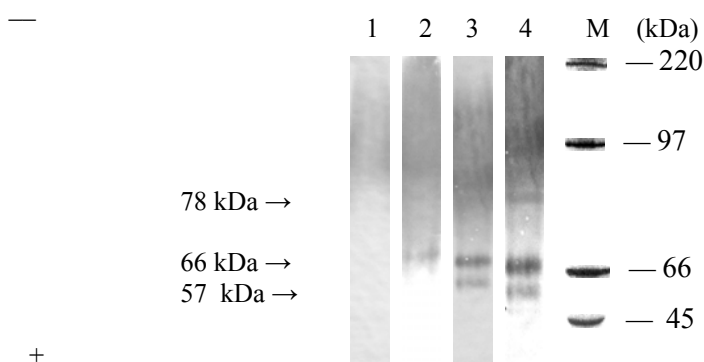


Рис. 6 Вестерн-блот анализ PIR-белков клеточной стенки дрожжей *Hansenula polymorpha*, разделенных электрофоретически в 10% ПААГ:

- 1 – инкубация при $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течении 30 минут;
- 2 - инкубация при $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течении 6 часов;
- 3 - инкубация при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течении 30 минут;
- 4 - инкубация при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течении 6 часов.

М - маркер фирмы “Amersham Pharmacia Biotech”, состоящий из белков с определенной молекулярной массой (см.»Материалы и методы»)

На картине электрофореза можно видеть, что при инкубации PIR-белков при $t=4^{\circ}\text{C}$ на дорожке ПААГ индивидуальные полосы белков практически отсутствуют (рис. 6 (1)). Это

может быть связано с тем, что PIR-белки КС дрожжей *H. polymorpha* вероятно имеют своеобразную конфигурацию, подобную фибриллярным белкам. Как известно, такая конфигурация белка не способна раскручиваться при $t=4^{\circ}\text{C}$ (Степанов, 1996), а значит и входить в гель. При увеличении времени инкубации PIR-белков при той же температуре на дорожке ПААГ можно видеть совокупность белков, не выявляемых в виде отдельных полос и формирующих окрашенную зону в области молекулярных масс от 220 до 60 kDa (Рис. 6 (2)). Инкубация же PIR-белков при 37°C в течение 30 минут приводит к появлению на дорожке ПААГ отдельных белковых полос с молекулярными массами 66 и 57 kDa (рис. 6 (3)), а в течение 6 часов и еще одной отдельной полосы белка с молекулярной массой 78 kDa (рис. 6 (4)).

Таким образом, результаты этого эксперимента позволяют сделать предположение о способности PIR-белков КС *H. polymorpha* собираться в комплексы, возможно напоминающие комплексы сетчатого коллагена. Следовательно, целесообразно было бы провести поиск коллагеноподобных последовательностей в белках PIR-семейства КС этого вида дрожжей.

Для этого следующим этапом нашей работы являлось выделение PIR-белков из КС дрожжей *H. polymorpha* и воздействие на них клостридиопептидазой (рис. 7).

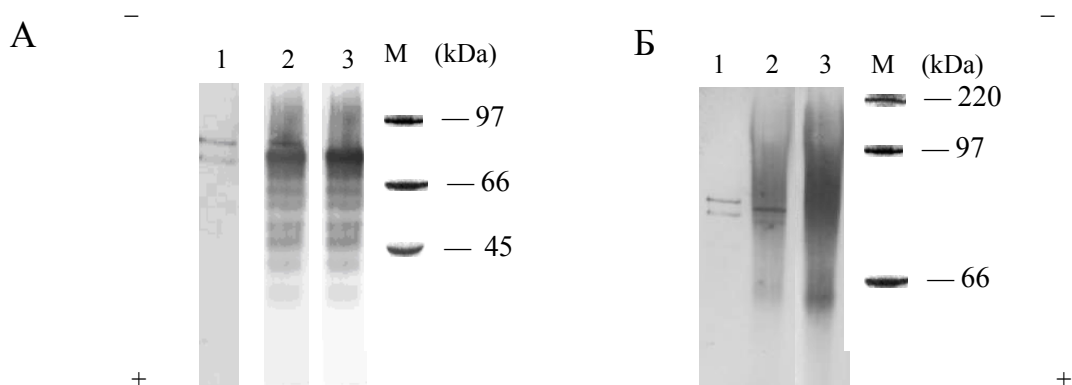


Рис.7. Вестерн-блот анализ обработанных и необработанных клостридиопептидазой PIR-белков клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (А) и *Hansenula polymorpha* (Б).

- 1 – клостридиопептидаза;
 - 2 - препарат PIR-беков, проинкубированный в течение 4 часов при 37°C и затем 2 часа при 45°C в присутствии клостридиопептидазы (условия инкубации белков с клостридиопептидазой были разработаны в ходе выполнения данной работы);
 - 3 – препарат PIR-беков, проинкубированный в течение 4 часов при 37°C и затем 2 часа при 45°C без добавления клостридиопептидазы;
- М - маркер фирмы “Amersham Pharmacia Biotech”, состоящий из белков с определенной молекулярной массой (см. «Материалы и методы»)
 Электрофоретическое разделение PIR-белков проводилось в 7 % ПААГ.

Можно видеть, что при действии клостридиопептидазы на PIR-белки *H. polymorpha* подвергается гидролизу представленная на электрофореграмме неразрывная совокупность белков. Гидролиза PIR-белков КС дрожжей *S. cerevisiae* под действием клостридиопептидазы не происходит, что подтверждается результатами компьютерного

анализа генома этого вида дрожжей в банке данных (в этом геноме коллагеноподобных последовательностей не выявлено).

В результате поиска коллагеноподобных последовательностей в компьютерной базе данных дрожжей *H. polymorpha* выяснилось, что в белках PIR2p, Sed1p и Tip1p присутствуют сайты для возможного гидролиза клостридиопептидазой (рис.8). Локализация белка PIR2p в зоне почечного рубца КС следует из литературных данных (Sumita *et al.*, 2005). Белки Sed1p и Tip1p являются белками КС.

PIR2p (aa)

241 kkegalamtl kdgilydseg rigsivanrq fqfdgppppqa gaiyadgws i spdgylaig n
301 dtifyqclsg tfynlydqi ggqcnkvhlk avelvdc

Sed1p (131 aa)

61 gattltitdc pctkkkvitt ttvttipaks staassvaas sapvistaen agakvgaagl
121 aalagaafl l

Tip1p (283 aa)

181 asssahvhsh aaestsaves tsaahshaae sssaaahshav esssaahvhs haaesssaah
241 shaagsssa ssnssghistf sgagaklavg agagivglaa llm

Рис. 8. Фрагменты аминокислотных последовательностей белков клеточной стенки дрожжей *Hansenula polymorpha* обнаруженных в компьютерной базе данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein>). Стрелками обозначены сайты возможного гидролиза клостридиопептидазой.

Представленные на рисунке 8 последовательности крайне не продолжительны и с трудом могут рассматриваться как коллагеноподобные. Однако, сведения о последовательностях PIR-белков *H. polymorpha*, представленные в базах данных этого вида дрожжей достаточно скудны. Это позволяет предположить, что обнаруженные нами первичные последовательности белков, гидролизующих клостридиопептидазой еще не определены.

Таким образом, результаты исследований, представленные на рисунках 5, 7 и 8, свидетельствуют в пользу наличия сайтов для возможного гидролиза клостридиопептидазой в белках КС дрожжей *H. polymorpha*, в том числе и во фракции PIR-белков КС этого вида дрожжей.

Следует отметить, что при использовании клостридиопептидазы для гидролиза PIR-белков дрожжей *C. utilis* также было обнаружено гидролизующее действие этого фермента. Однако, поиск аминокислотных коллагеноподобных последовательностей для белков КС *C. utilis*, производимый во время выполнения данной работы, не дал результатов. Несмотря на это, с определенной долей вероятности можно предположить,

что в белках КС дрожжей *C. utilis*, в частности, в PIR-белках, также присутствуют коллагеноподобные последовательности.

Итак, для КС близкородственных видов дрожжей *H. polymorpha* и *C. utilis* были получены данные, свидетельствующие в пользу присутствия в них белков с коллагеноподобными последовательностями. Кроме всего прочего, этот факт может являться подтверждением родства этих микроорганизмов.

Необходимо сказать, что результаты, описанные выше, находят своё логическое подтверждение в данных, представленных в недавнее время в литературе. Эти данные свидетельствуют о присутствии коллагеноподобных последовательностей как в аминокислотной цепи одного из белков клетки дрожжей *H. polymorpha* (Bruin *et. al.* 2002), так и в последовательности нуклеотидов генома дрожжей *Pichia pastoris* (Pakkanen *et. al.* 2003).

Следует также отметить, что у белков *S. cerevisiae*, геном которых известен полностью, коллагеноподобные последовательности отсутствуют и случаев гидролиза этих белков кlostридиопептидазой не обнаружено. Это говорит о высокой специфичности используемого нами теста с кlostридиопептидазой на присутствие коллагеноподобных последовательностей в исследуемых белках.

1.2.2. Проверка чувствительности клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* и *Hansenula polymorpha* к протеолитической деградации с использованием фермента трипсина.

В связи с тем, что главной функцией коллагена является образование нерастворимых фибрилл высокой прочности (Степанов, 1996), можно предположить, что и белки, содержащие коллагеноподобные последовательности, обладают такими свойствами и подобной конфигурацией. Основываясь на этом предположении и с целью подтверждения экспериментов, описанных в предыдущей главе, было бы целесообразно провести обработку изолированных КС дрожжей *S. cerevisiae*, *C. utilis* и *H. polymorpha* протеолитическим ферментом трипсином. Как известно, этот фермент гидролизует связи К-Х, R-Х в аминокислотной цепи белка и не способен гидролизовать белки, образующие высоко прочные фибриллы, в которых сайты для гидролиза трипсином не доступны для этого фермента (Степанов, 1996).

Итак, далее мы определили чувствительность КС *S. cerevisiae*, *C. utilis* и *H. polymorpha* к протеолитической деградации с использованием трипсина. На рисунке 9 продемонстрированы результаты воздействия этого фермента на КС дрожжей с использованием метода электронной микроскопии.

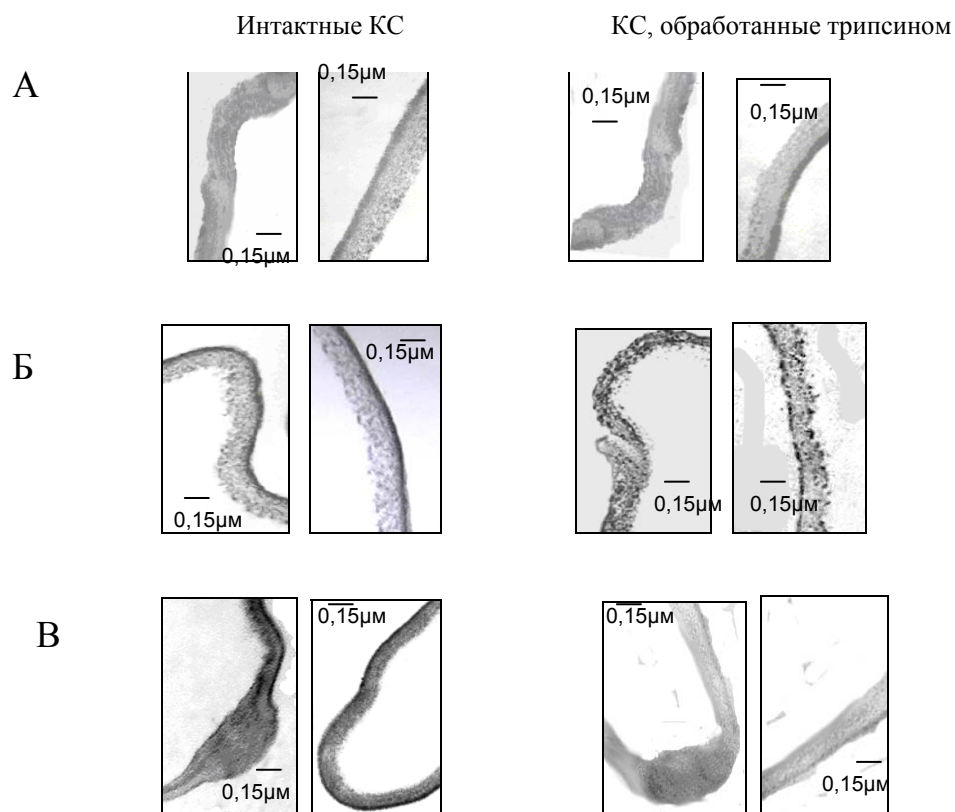


Рис.9. Электронные микрофотографии клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (А), *Candida utilis*(Б) и *Hansenula polymorpha* (В), до и после обработки трипсином . Обработку KC трипсином (ICN) проводили из расчета 1мг фермента на 1 о.е. KC в 0.05М Трис-НСl буфере, рН 7.8. Полученную суспензию инкубировали при 37°С в течении 2 часов.

* Фотографии, представленные на рис.9Б предоставлены О.В. Алексеевой.

На электронных микрофотографиях можно видеть, что внешний вид KC *S. cerevisiae* после обработки трипсином в целом не сильно отличается от интактных KC (рис 9А). Однако, в KC дрожжей *C. utilis* и *H. polymorpha*, обработанных этим ферментом, произошли достаточно серьезные изменения ((рис 9 Б и В). Электронноплотный внешний маннопротеиновый слой этой органеллы клетки у данных видов дрожжей становился тоньше, а глюкановый матрикс KC – становился более рыхлым. Следует, также, обратить внимание на то, что в KC дрожжей *H. polymorpha* после действия трипсина не наблюдается ярко выраженной слоистости, присущей интактной KC. Однако, в KC *C. utilis* подобные нарушения менее выражены. Таким образом, на основании этого эксперимента можно сказать, что действие трипсина на KC дрожжей *S. cerevisiae*, *C. utilis* и *H. polymorpha* различно. Это, вероятно, может свидетельствовать о различиях и в структурной организации KC этих видов дрожжей, что подтверждают результаты экспериментов по поиску коллагеноподобных последовательностей в белках KC дрожжей *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* и *C. utilis*.

Кроме того, основываясь на результатах эксперимента, представленного на рис.9, можно говорить о более значимой роли белков в поддержании структуры KC *H.*

polymorpha по сравнению с дрожжами *S. cerevisiae*. КС дрожжей *C. utilis* в этом смысле, по-видимому, занимает промежуточное положение.

2. Изучение роли полисахаридных компонентов клеточной стенки дрожжей в ее структурной организации.

Еще одним важным структурным компонентами КП микроорганизмов являются полисахариды и их производные. Особенно важную роль играют углеводные цепи, которые присутствуют в КС дрожжей и составляют около 60 % от всей массы КС. Однако, у разных видов дрожжей количество и качество этих структурных компонентов в КС может отличаться. В связи с этим интересно было бы проследить значимость полисахаридных компонентов в КС дрожжей, принадлежащим разным филогенетическим группам.

2.1. Сравнительный анализ уровня хитина в клеточных стенках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida. utilis* и *Hansenula polymorpha*.

На первом этапе исследования роли полисахаридов в структурной организации КС дрожжей мы остановились на сравнительном анализе уровня хитина в КС *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* и *C. utilis*.

На рисунке 10 представлены результаты флуоресцентной микроскопии окрашенных калькофлуором белым (CFW) клеток дрожжей (CFW – флуоресцентный краситель, который, связываясь с хитином, не вводится в клетку, поэтому его удобно использовать для прижизненного окрашивания клеток). Анализируя представленные данные можно сказать, что в КС дрожжей *S. cerevisiae* уровень хитина существенно выше, чем в КС *H. polymorpha* и *C. utilis*.

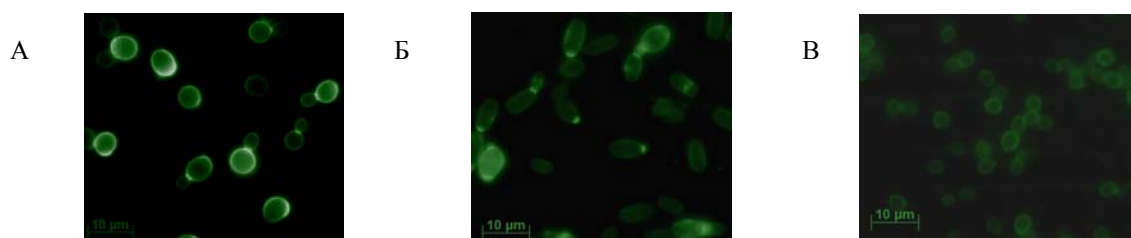


Рис. 10. Сравнение штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (А), *Candida. utilis* (Б) и *Hansenula polymorpha* (В) по результатам флуоресцентной микроскопии после обработки этих клеток специфическим для хитина флуоресцентным красителем калькофлуором белым.

Помимо этого, при сравнительном анализе фотографий флуоресцентной микроскопии клеток дрожжей *H. polymorpha* и *C. utilis* обнаружился интересный факт. В КС дрожжей *C. utilis* наблюдается свечение в зоне почечного рубца, что говорит о повышенном количестве хитина в этой области КС (рис. 10). Этот результат хорошо согласуется с данными экспериментов, по действию трипсина на КС этих видов дрожжей (рис.9). По результатам экспериментов, представленных на этом рисунке белковые компоненты КС дрожжей *C. utilis* равномерно распределены по КС (рис 9 Б), тогда как в КС дрожжей *H. polymorpha* они в основном сосредоточены в зоне почечного рубца (рис 9 В). Следовательно, можно предположить, что меньшее количество белка в почечном рубце КС дрожжей *C. utilis* компенсируется хитином (рис 10 Б).

Таким образом, результаты, представленные на рис. 9 и 10 говорят как о разной компоновке структурных компонентов в КС дрожжей *S. cerevisiae*, *C. utilis* и *H. polymorpha*, так и о различной их роли в КС этих видов дрожжей.

2.2. Изучение роли глюкантрансферазы Bgl2p в формировании молекулярной структуры клеточных стенок дрожжей *Hansenula polymorpha* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Ранее в нашей лаборатории на примере дрожжей *S. cerevisiae* было показано, что структурный модуль КС – полисахарид-белковый комплекс, в состав которого входят хитин и белки, встраивается в КС с участием глюкантрансферазы Bgl2p (Kalebina *et. al.*, 2002). На основании этого, на следующем этапе работы были проведены сравнительные исследования роли глюкантрансферазы Bgl2p в формировании молекулярной структуры КС дрожжей *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*.

Анализируя клетки родительского и мутантного по гену *BGL2* штамма дрожжей *H. polymorpha* можно видеть, что форма клеток мутанта $\Delta bgl2p$ более округлая, чем у родительского штамма DL-1 и имеет неровные очертания (рис. 11). Этот факт может свидетельствовать о том, что при нарушении механизма сборки полисахарид-белкового комплекса КС теряет свою жесткость, вследствие чего клетка изменяет форму.

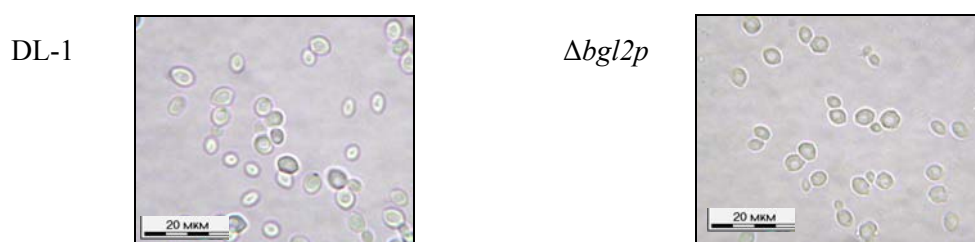


Рис. 11. Фазово-контрастное изображение клеток дрожжей *Hansenula polymorpha*.

На электронных микрофотографиях, представленных на рисунке 12, можно видеть различия в структуре латеральной КС родительского штамма DL-1 и $\Delta bgl2p$ -мутанта, которые связаны с увеличением количества белка в КС при делеции гена *BGL2* у дрожжей *H. polymorpha*. Это проявляется в увеличении электронной плотности в этих зонах КС у мутантного штамма.

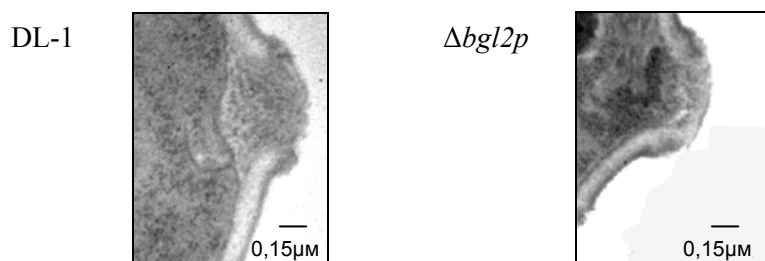


Рис. 12. Электронные микрофотографии материнского рубца клетки родительского штамма DL-1 и штамма с делетированным геном *BGL2* ($\Delta bgl2p$) дрожжей *Hansenula polymorpha*.

Кроме того, заметны существенные различия в структуре почечного рубца. У родительского штамма хорошо выражен плотный почечный рубец, имеющая фибрильную структуру и отделенный от цитоплазмы мембраной. В клетке же мутантного штамма рубец практически отсутствует и наблюдается разрастание цитоплазматического содержимого, окруженного мембраной, в пространство, занимаемое в норме материалом вторичной септы (Рис.12). Эти результаты еще раз подтверждают значимость полисахарид-белкового комплекса, в формировании которого принимает участие глюкантрансфераза Bgl2p, как в структурной организации КС, так и в процессе почкования клеток этого вида дрожжей.

В связи с представленными выше результатами о роли белка в организации КС дрожжей *H. polymorpha* весьма интересно было бы проследить роль изучаемого нами полисахарид-белкового комплекса в молекулярной организации КС *S. cerevisiae*. Это связано с тем, что этот вид дрожжей находится на другой ветви филогенетического древа аскомицетных дрожжей.

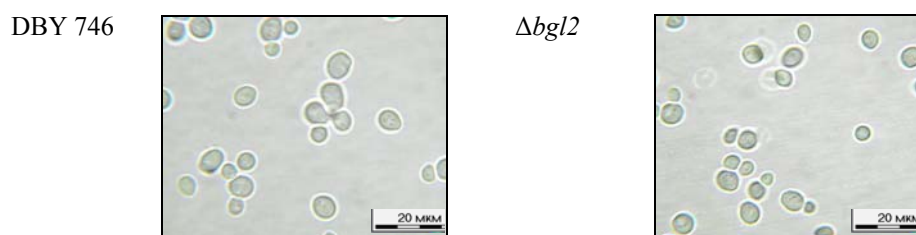


Рис. 13. Фазово-контрастное изображение клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. DBY 746 – родительский штамм, $\Delta bgl2$ – мутантный штамм, лишенный глюкантрансферазы Bgl2p.

Для этого нами был исследован мутантный штамм *Δbgl2p* дрожжей *S. cerevisiae*. При микроскопическом исследовании родительского (DBY746) и мутантного по гену *BGL2* штаммов с использованием фазового контраста можно видеть, что у этих штаммов не происходит существенных изменений в размере и форме клеток мутантного штамма *Δbgl2*, по сравнению с родительским (Рис. 13).

С помощью метода флуоресцентной микроскопии с использованием специфичного для хитина красителя калькофлуора белого, удалось выявить, что в КС мутанта *Δbgl2p* происходит повышение уровня хитина (рис 14). Этот результат подтверждается биохимически. Следовательно, при нарушении встраивания глюкана в КС дрожжей *S. cerevisiae* включается хитиновый механизм компенсации, количество этого полисахарида увеличилось у мутанта.

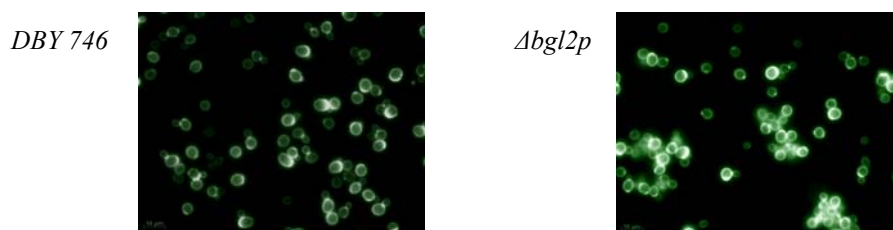


Рис. 14. Флуоресцентная микроскопия окрашенных калькофлуором белым (CFW) клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. DBY 746 – родительский штамм, *Δbgl2* – мутантный штамм, лишенный глюкантрансферазы Bgl2p.

Сравнительный анализ скорости роста родительского штамма DBY746 и мутантного по гену *BGL2* штамма дрожжей *S. cerevisiae* не выявил существенных отличий.

Электронно-микроскопическое исследование этих штаммов, представленное на рисунке 15, показало, что КС мутанта по сравнению с родительским штаммом имеет менее плотную структуру, как внешнего маннопротеинового слоя, так и внутреннего глюканового. Подобный эффект наблюдается и в области почечного рубца клетки. Помимо этого, как КС мутантной клетки, так и слой, покрывающий её почечный рубец, обладает большей электронной плотностью по сравнению с родительским штаммом DBY746 (рис. 15). Это может свидетельствовать об увеличении количества белка в этих клеточных структурах, выявляемого при электронной микроскопии КС дрожжей как более электронно-плотный слой.

Таким образом, результаты электронно-микроскопического исследования (рис.15), в совокупности с результатами флуоресцентной микроскопии, представленными на рисунке 14, говорят о том, что при нарушении встраивания исследуемого нами полисахарид-белкового комплекса в КС дрожжей *S. cerevisiae* происходит заметная реорганизация этой клеточной органеллы. Происходящее при этом повышение уровня хитина в КС способствует поддержанию формы клетки. Однако, можно предположить, что в

результате такого повышения количества хитина в КС нарушаются жизненно-важные процессы в клетке этого вида дрожжей, т. е., происходит как бы репарация мутантных клеток дрожжей *S. cerevisiae* хитином.

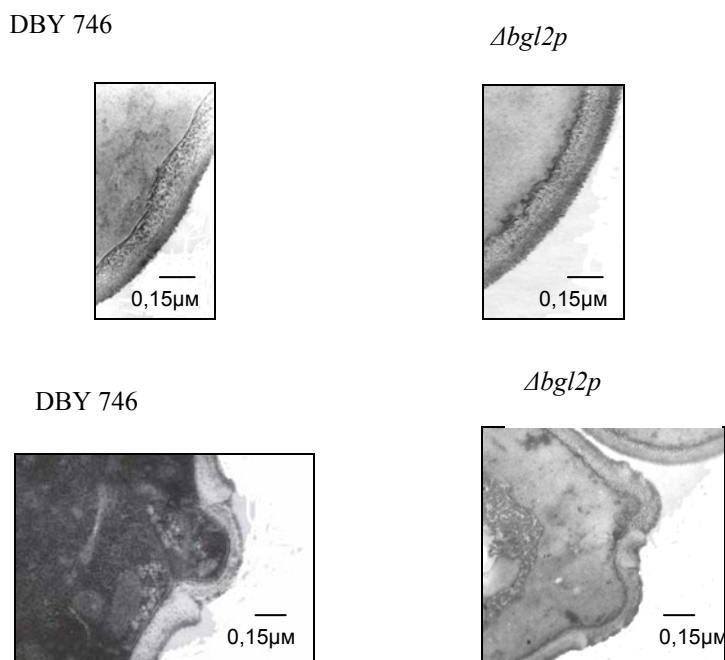


Рис. 15. Электронные микрофотографии клеток родительского штамма DBY746 и штамма, мутантного по гену *BGL2* ($\Delta bgl2p$) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Исследование морфологии двойного мутанта по генам *BGL2* и *CHS3* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

На основании описанного в предыдущей главе результата интересно было бы проследить значимость глюкантрансферазы Bgl2p для поддержания молекулярного ансамбля КС дрожжей *S. cerevisiae*, у мутанта не только лишено гена *BGL2*, но и с нарушенным синтезом хитина (геном *CHS3*), т. е., у двойного мутанта $\Delta bgl2p\Delta chs3$.

Другими словами штамм $\Delta bgl2p\Delta chs3$ дрожжей *S. cerevisiae* сравним со штаммом $\Delta bgl2p$ дрожжей *H. polymorpha*, поскольку эти дрожжи лишены возможности компенсировать отсутствие важных структурных компонентов КС за счет повышения уровня хитина (Лауринавичюте и др., 2000).

На фоне того, что в клетках дрожжей $\Delta chs3$ *S. cerevisiae*, лишенных возможности синтезировать хитин латеральной КС происходят серьезные нарушения (уродливая форма клеток, нарушения структуры КС, нарушение процесса почкования) (рис.16), клетки двойного мутанта имеют правильную форму (рис. 16 А). Однако при детальном рассмотрении латеральная КС $\Delta bgl2p\Delta chs3$ -мутанта отличается более аморфной структурой и имеет большую толщину по сравнению с родительским штаммом (рис 16 Б).

Помимо этого, в КС двойного мутанта происходят серьезные нарушения в зоне почечного рубца (рис 16 В), сравнимые с таковым в клетках штамма *Δbgl2p H. polymorpha* (рис.12). Этот результат говорит о существовании серьезных перестроек в КС двойного мутанта дрожжей *S. cerevisiae*.

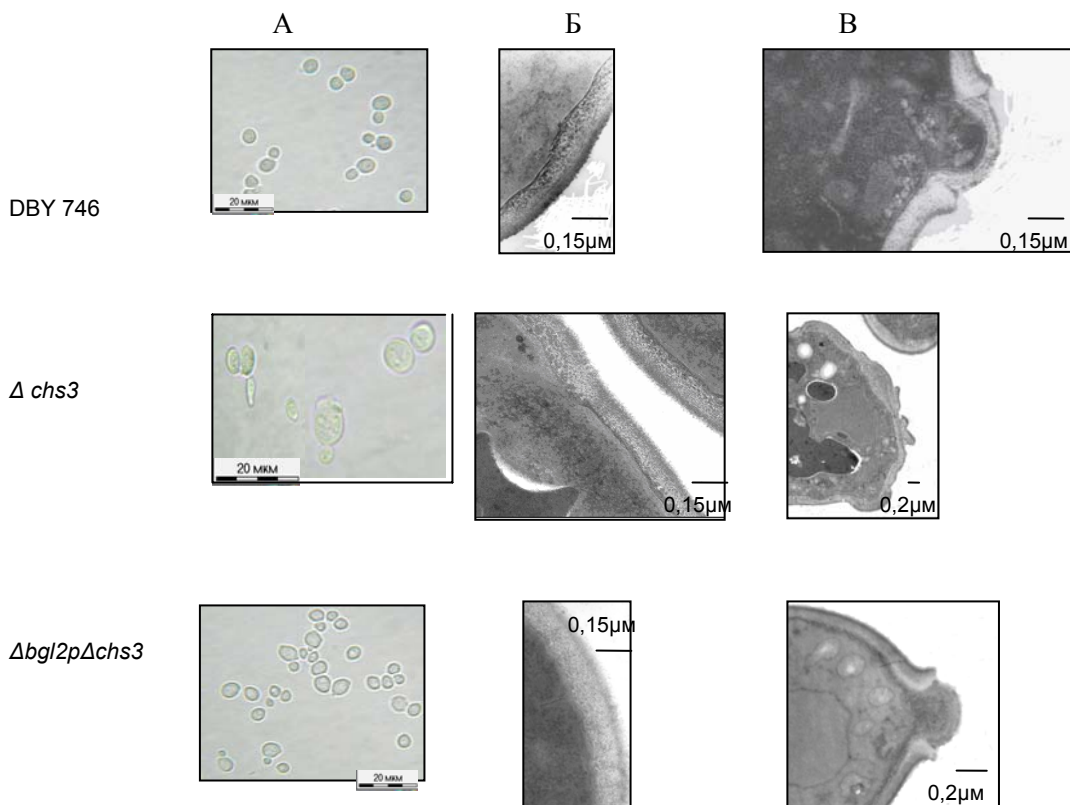


Рис. 16. Микроскопическое исследование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: А – фазовая микроскопия клеток; Б – электронная микроскопия латеральной клеточной стенки; В – электронная микроскопия почечного рубца клетки.

Описанное выше наблюдение еще раз подтверждает высказанное предположение о том, что в клетках дрожжей *S. cerevisiae* по сравнению с дрожжами *H. polymorpha* хитин имеет большее значение для формирования молекулярного ансамбля КС.

В результате проведенных в рамках этой работы исследований было выявлено, что прокариотический микроорганизм - облигатно-галофильная архея *H. salinarium* имеет некоторые общие черты строения клеточной поверхности с низшими эукариотами. Несмотря на простоту строения КС этого микроорганизма, в её состав входят элементы таких структурных компонентов, как коллаген и хитин, характерных для высших эукариот. Эти данные еще раз подтверждают современные представления о том, что именно археи (по крайней мере, некоторые из них) являются предками эукариотических клеток (Oshima, 1994).

В отличие от архей *H. salinarium*, дрожжи имеют более сложноорганизованную КС, в состав которой входят как белковые (гликопротеиновые), так и полисахаридные компоненты. Соотношение этих компонентов КС у разных видов дрожжей различно.

Таким образом, по-видимому, у древних архей и у низших эукариот важную роль в молекулярной организации КС, несмотря на малое количество, играют белки с коллагеноподобными последовательностями и хитин соответственно. Причем у дрожжей с низким содержанием хитина коллагеноподобные последовательности также выявлены и играют важную структурную роль. До сих пор эти соединения считали важными компонентами клеток, в основном, высших эукариот животного происхождения.

ВЫВОДЫ.

1. Воздействие высокоспецифичного в отношении фибриллярного белка коллагена фермента клостридиопептидазы *Clostridium histolyticum* на клеточные поверхности микроорганизмов, в частности, архей *Halobacterium salinarium* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis* является простым и эффективным методом для выявления присутствия коллагеноподобных последовательностей в белках этой части клетки.

2. С помощью клостридиопептидазы *Clostridium histolyticum* в белках клеточной поверхности облигатно-галофильной архей *Halobacterium salinarium* обнаружены коллагеноподобные последовательности. Этот факт является важным как для характеристики самих белков, так и с эволюционной точки зрения.

3. С использованием высокоспецифичного теста – бактериальной клостридиопептидазы было продемонстрировано, что в клеточных стенках дрожжей с низким содержанием хитина, а именно *Hansenula polymorpha* и *Candida utilis* присутствуют белки с коллагеноподобными последовательностями, которые не были обнаружены в белках клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с относительно высоким содержанием хитина.

4. Нарушения структуры клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванные делецией глюкантрансферазы Bgl2p, компенсируются хитином, в то время, как «хитиновая» компенсация при подобных нарушениях в клеточной стенке дрожжей *Hansenula polymorpha* отсутствует.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Карпова Е.В., Калебина Т.С., Кулаев И.С. Обнаружение коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной поверхности *H. salinarium*. // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов – 2000”, Выпуск 4, с.33.
2. Karpova E.V., Kalebina T.S. Identification of collagen-like sequences in cell envelope proteins of *Halobacterium salinarium*. // International symposium, Pushchino, 2000, (program and abstracts), p. 67.
3. Kalebina T.S., Laurinavichiute D.K., Karpova E.V., Nasonov V.V., Bovin N.V., Kulaev I.S.// On the role of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p in the formation of the cell wall molecular assembly. Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, University of Washington, Seattle, USA 2000, (program and abstracts) p.82.
4. Калебина Т.С., Карпова Е.В., Кулаев И.С. Идентификация коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной оболочки *Halobacterium salinarium*. // Микробиология. 2001, Т.70, № 4 с. 574-575.
5. Карпова Е.В., Лауринавичюте Д.К., Соколов С.С., Агафонов М.О., Калебина Т.С. Электронно-микроскопический и биохимический анализ изменений в клеточной стенке, обусловленный мутациями в генах *BGL2* и *CHS3* *S. cerevisiae* и *PMT1* *H. polymorpha*. // I Съезд микологов России (тезисы докладов), Москва, 2002. с.164.
6. Карпова Е.В., Алексеева О.В., Аверина Т.А., Федорова Н.В., Назимов И.В., Моренков О.С., Баратова Л.А., Калебина Т.С. Новый подход к изучению локализации и структурной роли белков клеточной стенки дрожжей *Candida utilis*. // III съезд биохимического общества (тезисы научных докладов), Санкт-Петербург, 2002, с 79.
7. Karpova E.V., Kalebina T.S., Suzina N.E., Laurinavichiute D.K., Duda V.I., Kulaev I.S. The compensating effect of the *BGL2* disraption in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking *CHS3*. // Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, University of Washington, Madison(program and abstracts), 2002, p.113.
8. Karpova E.V., Kalebina T.S., Kulaev I.S. Revealing of collagen-like sequences in the microorganisms of different taxonomic groups. // FEMS Congfess of European Microbiologists, Slovenia (Abstract book), 2003, p. 174.
9. Калебина Т.С., Плотникова Т.А., Карпова Е.В., Кулаев И.С. Новое фенотипическое проявление делеции гена глюкантрансферазы Bgl2p клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Микробиология. 2006, Т. 75, №5, с. 717-719.