

**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

Москва - 2007

И.С. Кулаев (03.00.07-),

Т.С. Калбина (03.00.03-)

Т.А. Белозерская,

Н.В. Потехина

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

13 2007 15 .30 .
.501.001.21 : 119992,
, 1, , .12, , . -1.

2006 .

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

(),

(),

(Kandler, König, 1993; Klis, 1994;

, 2001).

:

(, 1994),

(),

(, 1997).

Цели и задачи исследования.

Halobacterium salinarium
Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha Candida utilis.

1. *Halobacterium salinarium Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha Candida utilis.*
2. *Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha Candida utilis*
- 3.

Halobacterium salinarium, Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha Candida utilis.

Научная новизна работы.

H. polymorpha C. utilis
Clostridium histolyticum.

H. salinarium

S. cerevisiae

H. polymorpha C. utilis

()

()

H. salinarium

S.

cerevisiae, H. polymorpha C. utilis

Практическая значимость работы.

H. salinarium H. polymorpha C. utilis

DL1-L - (,
), *Δbgl2p* , Bgl2p
- ; *Candida utilis* -
Y-174 (,).
H. salinarium. *H. salinarium*
: (25%(4,3)
NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O)
. (25%(4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2%
MgSO₄x7H₂O) 3 , 4 .
280 . (Mescher, Strominger, 1976).

(Sigma). - 1 0.05 -HCl
7.5 4 CaCl₂, 3 1% , 3 1% NaCl, 3
0.05 -HCl 7.5 4 CaCl₂.
, ,
, ,
LKB Biochrom Ultrospec II
UV/Visible 280 . 4 0.05
-HCl (7.5) (Mendoza, Villanueva, 1963; , 1998) .

: -
LOMO;
- () 5%
5% , 1% OsO₄
(Zubatov *et. all.*, 1979) ()
H. salinarium 4,3 NaCl (Stoeckenius., Rowen, 1967
)) -
Hitachi-IIF. , ,
(CFW) (Sigma),
(Brutt *et. all.*, 1989)
Axioskop 40 FL Zeiss.

SDS-
, 5 . 100 (Mrsa

et.al.,1999), 0,2 -HCl, pH 7,6, 6% SDS, 10% - ,20%
0,02 (Laemmli, 1970).
, SDS-
. NaOH-
Beckman (4000 \ . 1 .) 50
NaOH 4° . -
SDS- (1,3
(Sigma) 0.1 M Na- , pH 5.5 37° 4
(Mrsa et.al.,1999).
_____. () -
8-12% (Laemmli, 1970).
“Amersham Pharmacia Biotech”,
(kDa): (220), b (97),
(66), (45), (30),
(20,1), (14,3).
_____.
Cl. histolyticum «Serva»
4° 170 7
(, 1989).
() (, 1989).
_____.
(ICN) - 1 1 . . (D540) ;
Cl. histolyticum «Serva» - 10 0,05 -HCl
0,025% CaCl₂ (pH 7,6) 1 . . (D540) .
50 - =8,0, 10 / NHS-LC-
(-6-()) (ICN) (Mrsa,1997).
, ,
(, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

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

H.

salinarium *S. cerevisiae*, *H. polymorpha* *C. utilis* .

histolyticum (Nordwig *et. all.*,1971) «Serva».

Clostridium

H. salinarium ,
(25% (4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O)

NaCl –

NaCl 3

H. salinarium

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

(König, 1988).

Halobacterium

(Kandler, König 1993).

(Wieland 1988).

H. salinarium.

salinarium,

H. salinarium

-1001.

()

H. salinarium

(25%(4,3) NaCl, 0,2%

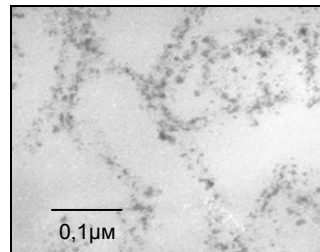
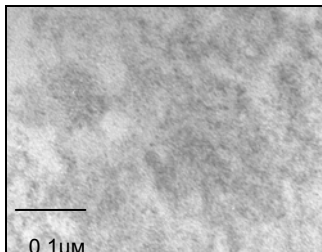
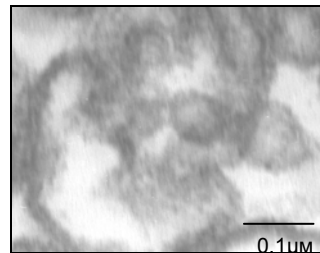
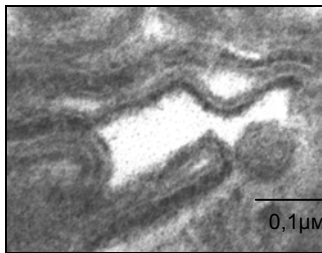
KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O).

(.1)

(.1)

(Mescher,

Strominger, 1974; Mescher, Strominger, 1976).



. 1.

Halobacterium salinarium.

- ;
 - ;
 0,05 HCl (25%(4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O)
 2+ (. « »);
 - ;
 0,05 HCl (25%(4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O)
 2+ 20 . 37 , 30 . 45 0,05 HCl
 (.);
 - ;
 0,05 HCl (25%(4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3% Na, 2% MgSO₄x7H₂O)
 2+ 20 . 37 , 30 .
 45 (.).

(25%(4,3) NaCl, 0,2% KCl, 0,3%

Na, 2% MgSO₄·7H₂O) *H. salinarium*

(.1).

(. 1)

()

(. 1).

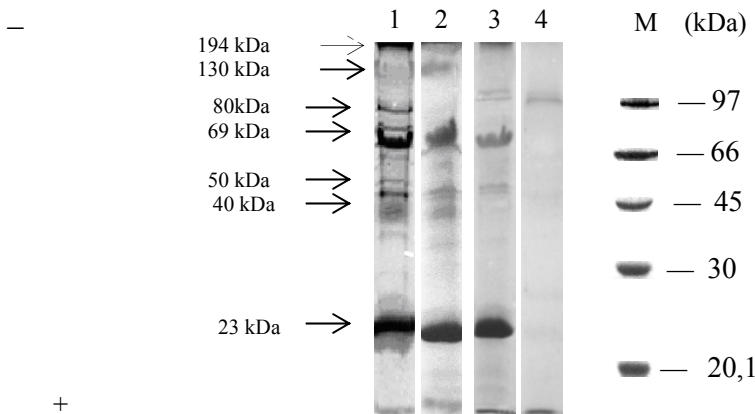
(. 1)

194

kDa (Mescher, Strominger, 1974),

1001 *H. salinarium*.

2 .



. 2.

Halobacterium salinarium

1001,

1 -

2 -

3 -

4 -

M -

“Amersham Pharmacia Biotech”,
(. « »).

H.

salinarium

(Mescher ,Strominger , 1974; Mescher,

Strominger, 1976a)

()

194 kDa

(. 2 (1)),

(Mescher , Strominger , 1974).

H.

salinarium

(Mescher , Strominger , 1976a).

(2 (2)) .

80, 69, 50 40 kDa,

1 (. 2 (1)).

130 23 kDa

(. 2 (2)).

(2),

130 23 kDa.

) (. 2 (2))

(

)

(. 2 (3))

H. salinarium.

23 kDa

130 kDa.

(130 kDa).

H. salinarium

H. salinarium

«

» (VNG),

VNG0361C (3).

(3).

VNG0361C (333aa)

241 pglriylyfv ipmplwlatg lfaaysifvs gtggigaggy aqlah**laglg igllygalkk**

301 regarapnel qf**gggpgggm gpgggpgpg** rrr

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

. 3.

Halobacterium salinarium,
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

3

(333)

130 kDa,

(. 1).

VNG0361C (3)

H. salinarium.

H. salinarium (194 kDa)

N-

(König , 1988; Paul *et. al.* 1986).

1.2. Идентификация коллагеноподобных последовательностей в белках клеточной стенки дрожжей.

(, ,),
(, ,).

(Wosten, 2001).

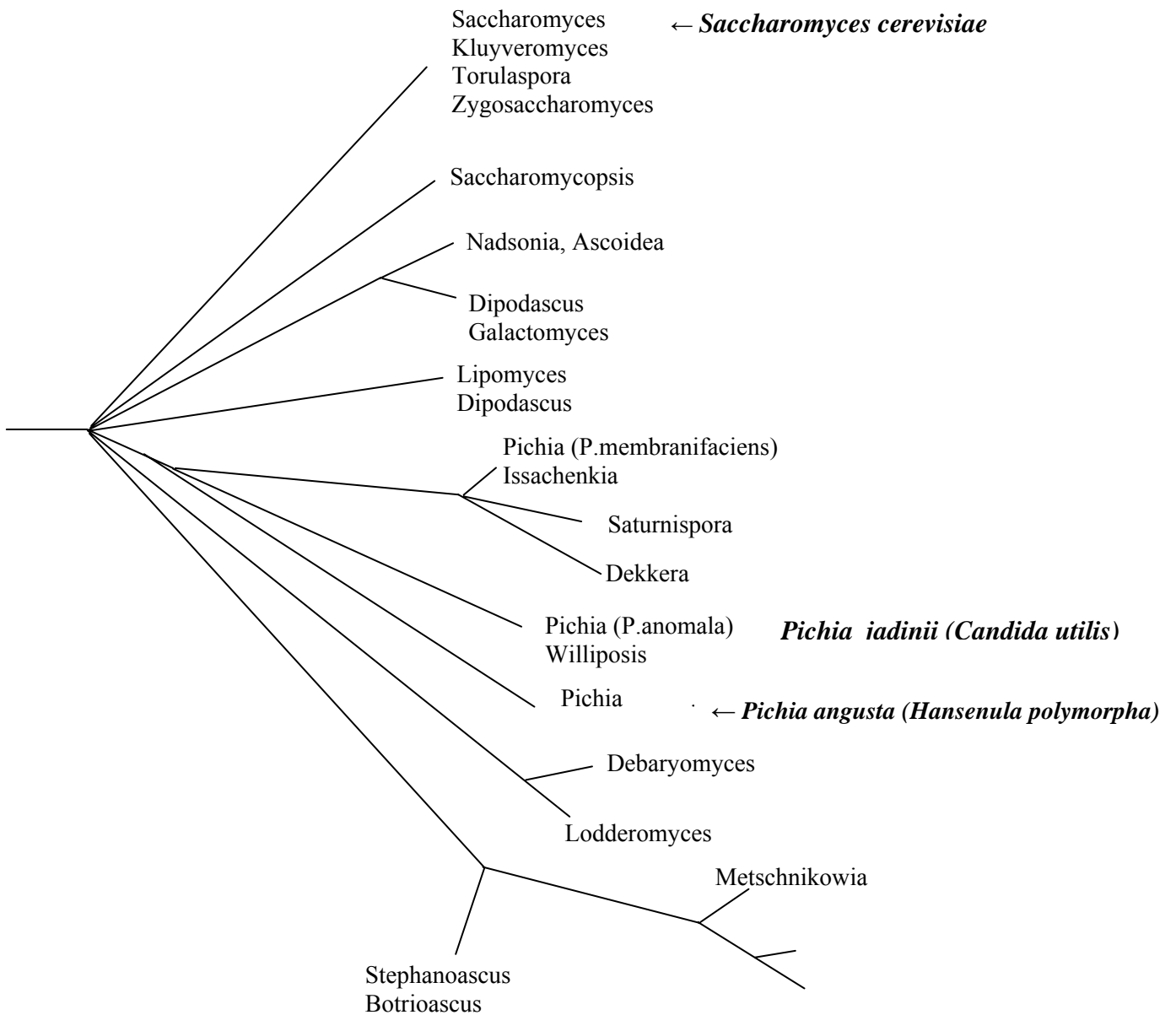
Saccharomyces cerevisiae.

Pichia,
(. 4).

Pichia angusta (Hansenula polymorpha)

Pichia jadinii (Candida utilis)

S. cerevisiae (. 4).



. 4.

(Kurtzman , Robnett , 1998).

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

C. utilis (Nurminskaya et. al., 1993).

H. polymorpha *S. cerevisiae*
Clostridium histolyticum.

5.

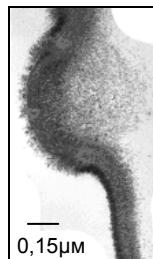
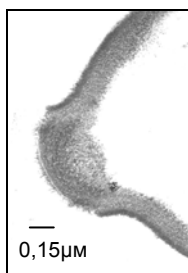
cerevisiae.

H. polymorpha,

5

polymorpha

Clostridium histolyticum



5. *cerevisiae*() *Hansenula polymorpha* ().

Saccharomyces

(, , 2001).

GPI- PIR-

(.5) GPI-

C. utilis
polymorpha

GPI-

, PIR-

H.

S. cerevisiae, H. polymorpha

PIR-

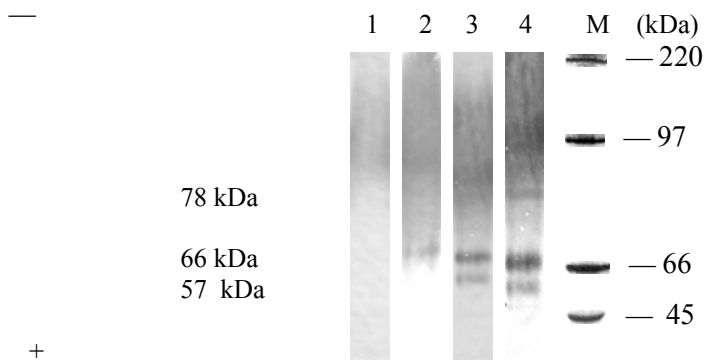
H. polymorpha .

PIR-

PIR-

H. polymorpha

(.6).



.6 - PIR- *Hansenula polymorpha*,
10% ;
1 - t = 4 30 ;
2 - t = 4 6 ;
3 - t = 37 30 ;
4 - t = 37 6 .
M - “Amersham Pharmacia Biotech”,
(.» »)

PIR- t=4

(.6 (1)).

PIR- *H. polymorpha*

t=4 (, 1996),

PIR-

220 60 kDa

(. 6 (2)). PIR- 37 30

57 kDa (. 6 (3)) , 6

78 kDa (. 6 (4)).

66

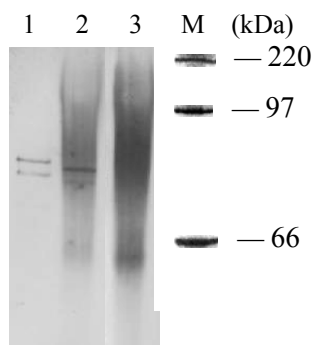
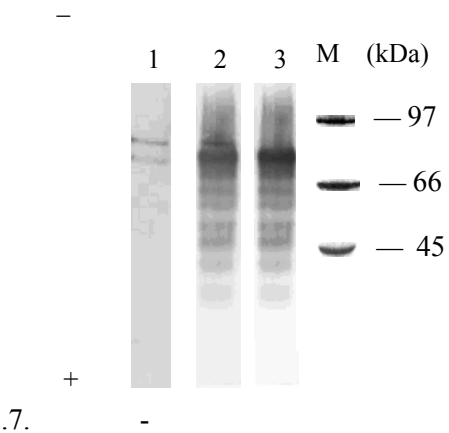
PIR- *H. polymorpha*

PIR-

PIR-

H. polymorpha

(. 7).



.7.

Saccharomyces cerevisiae () *Hansenula polymorpha* (B).

1 - ;

2 - PIR- , 4 37 2 45

(

); 4 37 2 45

3 - PIR- ,

M - “Amersham Pharmacia Biotech”,
(. « »)

PIR- 7%

PIR- *H. polymorpha*

PIR- *S. cerevisiae*

(
).

H. polymorpha

PIR2p, Sed1p Tip1p

(.8).

PIR2p

(Sumita *et al.*, 2005). Sed1p Tip1p

PIR2p (aa)

241 kkegalamtl kdgilydseg rigsivanrq fqf**dgppppqa** gaiyadgws i spdgylaign

301 dtifyqclsg tfynlydqsi ggqcnkvhlk avelvdc

Sed1p (131 aa)

61 gattlitdc pctkkkvitt ttvttipaks staassvaas sapvistaen agak**vgaagi**

121 aal**agaa**af l

↑ ↑

Tip1p (283 aa)

181 assahvhsh aaestsaves tsaahshaae sssahshav essahvhs haaesssaah

241 sha**agss**saa snssghistf **sgagaklavg agagiv**glaa llm

8.

Hansenula polymorpha

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi.CMD=search&DB=protein>).

8

PIR- *H. polymorpha*,

5, 7 8,

H. polymorpha,

PIR-

PIR-

C. utilis

C. utilis,

C. utilis, , PIR- ,

H. polymorpha *C. utilis*

2003).

H. polymorpha (Bruin *et. al.* 2002),

Pichia pastoris (Pakkanen *et. al.*

S. cerevisiae,

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

(, 1996),

S. cerevisiae, *C. utilis* *H. polymorpha*

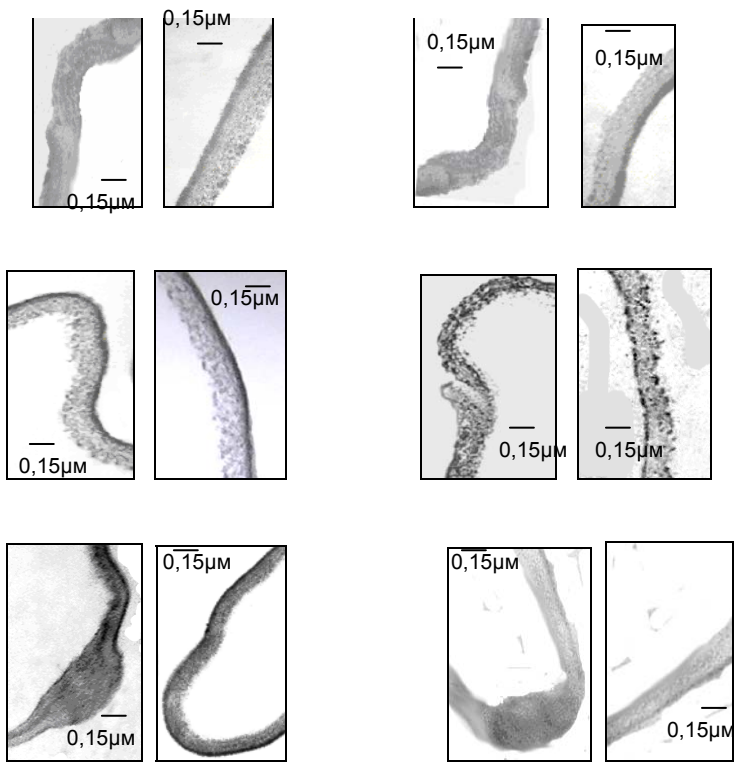
K-X, R-X

(, 1996).

polymorpha

S. cerevisiae, *C. utilis* *H.*

9



9. *Saccharomyces cerevisiae* (), *Candida utilis* () (*C. utilis* (ICN)), *Hansenula polymorpha* (), *S. cerevisiae* (9).

HCl , pH 7.8. 37°

* , .9 . . . 1 . . . 2 . . . 0.05 . . .

C. utilis *H. polymorpha*, ((9)).

H. polymorpha

C. utilis . . . *S. cerevisiae*, *C. utilis*

H. polymorpha . . .

S. cerevisiae , *H. polymorpha* *C. utilis*.

polymorpha

S. cerevisiae.

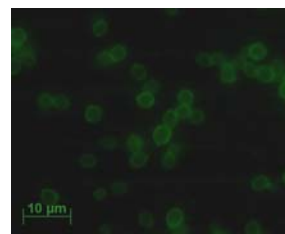
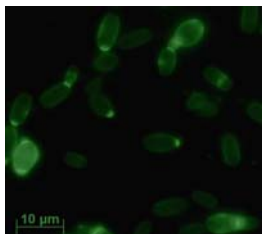
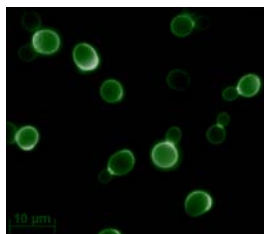
C. utilis

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

60 %

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

S. cerevisiae,
H. polymorpha *C. utilis*.
 10
 (CFW) (CFW –
).
S. cerevisiae *H.*
polymorpha *C. utilis*.



10.
Hansenula polymorpha ()

Saccharomyces cerevisiae (), *Candida. utilis* ()

H. polymorpha *C. utilis* .
C. utilis ,
 (. 10).
 (. 9).
C. utilis (9), *H.*
polymorpha (9).
C. utilis (10).
 . 9 10
S. cerevisiae, *C. utilis* *H.*
polymorpha,

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

S. cerevisiae ,
 Bgl2p (Kalebina *et.*
all.,2002).
 Bgl2p
H. polymorpha *S. cerevisiae*.
BGL2 *H.*
polymorpha *bgl2p* ,
 DL-1 (. 11).

DL-1



bgl2p



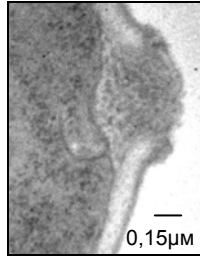
12,

DL-1 $\Delta bgl2p$ -

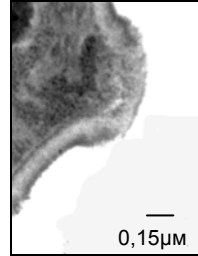
BGL2

H. polymorpha.

DL-1



bgl2p



. 12.

BGL2 ($\Delta bgl2p$)

Hansenula polymorpha.,

DL-1

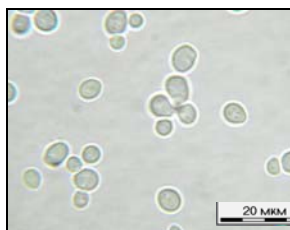
(.12).

Bgl2p,

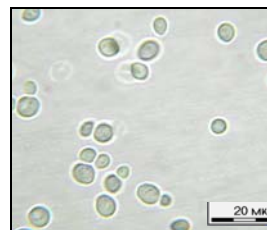
H. polymorpha

S. cerevisiae.

DBY 746



bgl2



. 13.

DBY 746 -

, *bgl2* -

Saccharomyces cerevisiae .

Bgl2p.

bgl2p *S. cerevisiae.*
(DBY746) *BGL2*

bgl2, (. 13).

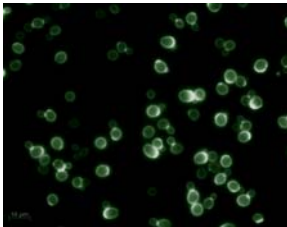
(14).

bgl2p

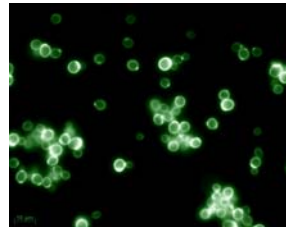
S.

cerevisiae

DBY 746



$\Delta bgl2p$



. 14.

Saccharomyces cerevisiae . DBY 746 –
Bgl2p.

(CFW)

bgl2 –

BGL2

S. cerevisiae

DBY746

15,

DBY746 (. 15).

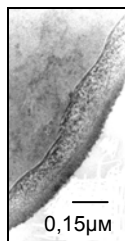
(.15),

14,

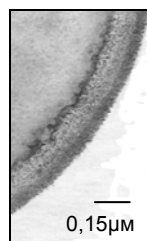
S. cerevisiae

S. cerevisiae

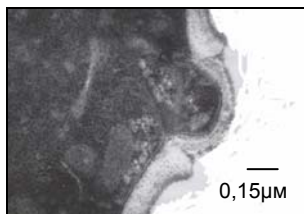
DBY 746



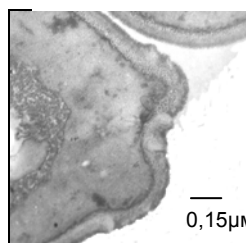
$\Delta bgl2p$



DBY 746



$\Delta bgl2p$



15.

BGL2 ($\Delta bgl2p$)

Saccharomyces cerevisiae.

DBY746

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

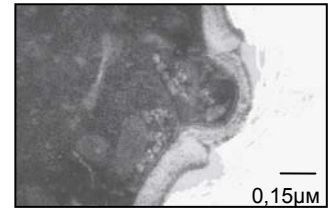
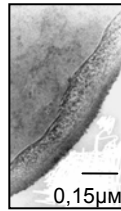
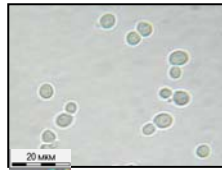
Bgl2p
S. cerevisiae,
(*CHS3*), . . ,
Δbgl2pΔchs3 *S. cerevisiae*
Δbgl2p *H. polymorpha*,
(. . , 2000).
, *Δchs3 S. cerevisiae*,
(
) (.16),
(. 16).
Δbgl2pΔchs3-
(16).

(16),

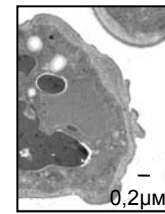
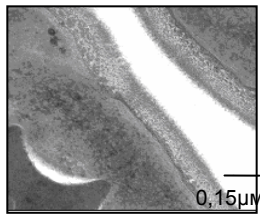
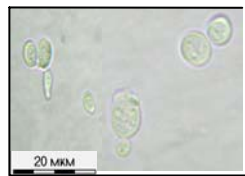
Δbgl2p H. polymorpha (.12).

S. cerevisiae.

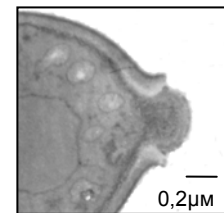
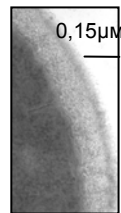
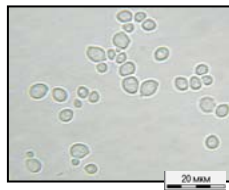
DBY 746



Δchs3



Δbgl2pΔchs3



. 16.

Saccharomyces cerevisiae:

S. cerevisiae

H. polymorpha

H. salinarium

(Oshima,1994).

H. salinarium,

(),

ВЫВОДЫ.

1.

Clostridium histolyticum

Halobacterium salinarium *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* *Candida utilis*

2.

Clostridium histolyticum

Halobacterium salinarium

3.

Hansenula polymorpha *Candida utilis*

Saccharomyces cerevisiae

4.

Saccharomyces cerevisiae,

Bgl2p,

« »

Hansenula polymorpha

