

УДК 577.322.9

GPI-МОДИФИЦИРУЕМЫЕ БЕЛКИ, НЕКОВАЛЕНТНО ЗАКРЕПЛЕННЫЕ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2019 В.В. Рекстина¹, А.А. Быкова¹, Р.Х. Зиганшин², Т.С. Калебина^{1*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kalebina@gmail.com

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.03.2019

После доработки 05.08.2019

Принята к публикации 06.08.2019

GPI-белки клеточной стенки дрожжей лишены липидной части якоря и с помощью остатков маннозы ковалентно присоединены к высокомолекулярным полисахаридам глюкану и/или хитину. Они выполняют множество функций, включая участие в формировании молекулярного ансамбля клеточной стенки и обеспечении устойчивости клетки к стрессовым воздействиям. В данной работе показано, что в клеточной стенке присутствует пул белков, относящихся к группе GPI-модифицируемых, несвязанных ковалентной связью с высокомолекулярными структурными полисахаридами, однако прочно закрепленных в клеточной стенке. Предположено, что эти белки являются промежуточной формой в процессинге GPI-белков клеточной стенки, поскольку уже лишились липидной части GPI-якоря и при экстракции по Фолчу не обнаруживаются во фракции липопротеинов, но еще не встроились в клеточную стенку путем присоединения ковалентной связью к высокомолекулярным полисахаридам, поскольку экстрагируются в воду при нагревании из делипидизированных клеточных стенок. Эта группа белков, о наличии которой ранее известно не было, по-видимому, может присутствовать в клеточной стенке в виде липид-ассоциированных микрокомпарментов. Таковыми являются обнаруженные недавно у дрожжей транспортные везикулы. Нековалентно связанные с высокомолекулярными полисахаридами GPI-модифицируемые белки обнаружены в клеточной стенке как родительского штамма, так и у дрожжей, лишенных глюканозилтрансглюкозилазы Bgl2, что свидетельствует о независимом от функций данного белка пути их встраивания в клеточную стенку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, клеточная стенка, GPI-белки, липид-ассоциированный микрокомпармент.

DOI: 10.1134/S0320972519120108

Клеточная стенка (КС) и плазматическая мембрана, разделенные периплазматическим пространством, представляют собой два важнейших компартмента клетки дрожжей, формирующих в совокупности их клеточную оболочку. За последнее десятилетие активные исследования выявили роль КС как наружного скелета дрожжей, от которого зависит поддержание формы клетки и ее устойчивость к внешним воздействиям, а также как физиологически активной органеллы, в которой закрепляются рецепторы, воспринимающие сигналы из внешней среды, и антигены, определяющие иммунологические свойства микроорганизма. Кроме того, недавно были опубликованы данные о том, что в КС дрожжей могут присутствовать везикулы, вероятно, участвующие в процессе транспорта различных соединений, в первую очередь, белков из цитоплазмы во внешнюю

среду [1]. КС является компартментом клетки, в котором начинается расщепление питательных субстратов [2, 3]. Было показано, что КС весьма динамична: перестройками в ее молекулярной структуре сопровождаются такие процессы, как флокуляция, спаривание и переход к псевдогифальному росту [4]. Известно, что как единый молекулярный ансамбль, клеточная стенка формируется за пределами цитоплазматической мембраны [5–7]. Клетка располагает большим количеством обходных путей, позволяющих компенсировать как незначительные, так и весьма существенные нарушения в биосинтезе и встраивании ее компонентов [2, 8]. Без детального изучения участников, путей и механизмов регуляции процесса сборки клеточной стенки дрожжей, формирования и функционирования ее молекулярного ансамбля невозможно установление молекулярного строения и изучения биогенеза динамичного, многокомпонентного и полифункционального компартмента клетки

* Адресат для корреспонденции.

дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — клеточной стенки. В настоящее время эти вопросы далеки от разрешения.

КС целиком покрывает дрожжевую клетку и, в основном, состоит из белков-маннопротеинов (~40%), глюкана (~50%) и хитина (~5%). Считается, что полисахариды КС дрожжей связаны ковалентными связями в единую сеть.

Белки-маннопротеины, ответственные за осуществление клеточной стенкой перечисленных выше функций, в настоящее время принято делить на три группы [5, 6]: 1) группа SE-белков (SDS-extractable proteins), которые могут быть экстрагированы из клеточных стенок детергентами и тиоловыми реагентами при нагревании; в большинстве — это ферменты, которые не связаны ковалентной связью с высокополимерными полисахаридами клеточной стенки и могут быть соединены дисульфидными связями с молекулами маннопротеинов других групп; 2) глюканазо-экстрагируемые GPI-заякоренные белки (glycosylphosphatidylinositol anchored proteins). Общий план строения этих белков в различных организмах одинаков. Однако на поверхности клеток дрожжей присутствуют два типа GPI-заякоренных белков. Первые локализуются в плазматической мембране и содержат липидный компонент [9]. Вторые присутствуют в КС, они лишены липидного компонента в результате процессинга и закреплены в КС с помощью ковалентной связи через остатки маннозы с фрагментом β -1,6-глюкана и далее с высокополимерным β -1,3-глюканом и/или хитином. Эти белки могут быть выделены из клеточной стенки с помощью глюканаза после того, как из КС будут удалены SE-белки [10]; 3) ASL-белки (proteins with alkali-soluble linkage) могут быть выделены из клеточной стенки при действии щелочи после удаления SE-белков. Ковалентно закрепленные ASL-белки КС часто характеризуются наличием внутренних повторов, высоким содержанием *O*-связанных маннозных цепей [11] и отсутствием GPI-якоря. Показано, что ASL-белки образуют щелочно-лабильные сложноэфирные связи между γ -карбоксильными группами глутаминовых кислот и гидроксильными группами глюкозы цепей β -1,3-глюкана. Такая реакция может осуществляться на клеточной поверхности [12].

В группу глюканазо-экстрагируемых GPI-белков КС входят такие важные в функциональном отношении белки, как глюканозилтрансглюкозилазы, α -агглютинин альфа-клеток [3, 13], Swp1 — маннопротеин КС, локализованный в дочерних «шрамах» [3, 14, 15], Tir1 — белок холодового шока [2, 16], Sed1 — мажорный стресс-индуцируемый структурный GPI-заяко-

ренный маннопротеин, который может быть ассоциирован с транслирующими рибосомами и способен влиять на секрецию белков (в т.ч. Bgl2) [17], Ecm33 — GPI-заякоренный белок, вовлеченный в TORC1-сигналинг, а также необходимый для сборки КС [18, 19], и некоторые другие, например, хитинтрансглюкозилазы Crh1 и Crh2, необходимые для присоединения хитина к β -1,3- и β -1,6-глюкану [20].

Ковалентная связь с полисахаридами клеточной стенки делает эти белки маломобильными. Столь прочное их закрепление в полисахаридном каркасе не оставляет возможности этим белкам для латерального перемещения по КС, а в случае наличия у них ферментативной активности оставляет открытым вопрос о возможности ее регуляции клеткой. В то же время строгая регуляция активности таких ферментов, как глюканозилтрансглюкозилазы, входящих в состав этой группы, представляется жизненно необходимой для клетки. Эти ферменты располагаются в непосредственном окружении своего субстрата — глюкана, а основной их функцией является перестройка этого мажорного структурного полисахарида КС в процессе роста и деления клетки. Их бесконтрольная активность с неизбежностью должна приводить к лизису клеток.

За встраивание GPI-белков в КС могут отвечать другие глюканозилтрансглюкозилазы, например, SE-белок Bgl2. Делеция гена, кодирующего данную глюканозилтрансглюкозилазу, приводит к нарушению встраивания GPI-белков в КС и отсутствию ряда из них в глюканазо-экстрагируемой фракции белков КС [21]. Интересно отметить, что подобное нарушение не вызывает значительных изменений в скорости роста дрожжей в относительно стабильных условиях эксперимента, проводимого в стандартных лабораторных условиях выращивания дрожжей. Значительным снижением скорости роста дрожжи, лишенные Bgl2, характеризуются только в условиях выращивания при повышенной температуре или высушивании, что может быть следствием отсутствия в КС самого белка Bgl2 [22], а не нарушениями во встраивании им других белков. Известно, что Bgl2 является мажорным и конститутивным белком КС, обладающим амилоидными свойствами [23, 24], и, согласно данным литературы, может рассматриваться как самостоятельный кандидат на выполнение протекторных функций при высушивании и нагреве клеток.

Сказанное позволило нам предположить, что описанный способ ковалентного встраивания GPI-белков в полисахаридный каркас КС не является единственно возможным. Учитывая опубликованные недавно данные о том, что в

КС дрожжей могут присутствовать липидные компартменты, например, обнаруженные недавно везикулы или иные, но в данный момент еще неохарактеризованные [1], было высказано предположение, что указанные белки могут присутствовать в КС в виде липид-ассоциированных микрокомпартментов, например, как содержимое везикул. Данная статья посвящена проверке высказанного предположения и выявлению закрепленных нековалентно на высокомолекулярных полисахаридах КС липид-ассоциированных GPI-белков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы дрожжей и условия их выращивания.

В данной работе были использованы штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: BY4742 Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 («Invitrogen», США) (далее в работе будет обозначаться как «дикий тип» или «wt»); BY4742 с делецией гена *BGL2* Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; bgl2::LEU2 (получен ранее методом гомологичной рекомбинации [22], далее будет обозначаться как «bgl2 Δ »). Дрожжи выращивали в жидкой среде YPD (1%-ный дрожжевой экстракт, 2%-ный пептон, 2%-ная глюкоза) при 30 °C и качании 200 об/мин.

Выделение КС дрожжей. Клетки дрожжей, выращенные до поздней логарифмической фазы (19 ч роста), пересеивали в 200 мл (2%-ный инокулят) среды и выращивали также 19 ч. Осаждение клеток проводили центрифугированием 5 мин при 1650 g при 20 °C. Осадки промывали один раз дистиллированной водой, затем один раз 0,05 М калий-фосфатным буфером pH 8,0. Разрушение клеток проводили на шейкере с помощью стеклянных шариков в присутствии 5 mM PMSF и 5 mM ЭДТА (при охлаждении на льду). Степень разрушения клеток контролировали с помощью светового микроскопа. Далее использовали препараты КС, содержащие не более 1% неразрушенных клеток. Суспензию отделяли от стеклянных шариков, после чего КС центрифугировали при 2580 g 5 мин при 4 °C. Полученный препарат клеточных стенок промывали один раз водой, два раза 1%-ной сахарозой, два раза 1 М NaCl, два раза 1% -ным NaCl, один раз водой при 4 °C.

Отмывка и получение КС. Полученный препарат КС обрабатывали при перемешивании в течение 1 ч при 37 °C 1%-ным SDS. Далее КС осаждали центрифугированием, промывали 5 раз 0,2 М натрий-ацетатным буфером pH 5,6 и один раз водой. Затем КС в течение 15 мин инкубировали со смесью бутанол : вода в соотно-

шении 0,7 : 1 (по объему) и осаждали центрифугированием. Эту процедуру повторяли три раза. Полученный препарат КС трижды промывали водой. Количество КС оценивали по оптической плотности при 540 нм. На следующем этапе КС промывали раствором 0,1 М Tris (в соотношении 1 о.е. суспензии КС на 10 μ l 0,1 М Tris) 2 раза по 1,5 ч и 3 раза Milli-Q H₂O, после чего КС инкубировали 2 ч в 6 М гуанидингидрохлориде pH 5,6 (в соотношении 1 о.е. суспензии КС на 10 μ l 6 М гуанидингидрохлорида) при 30 °C. Процедуру проводили при качании 200 об/мин, после чего дважды центрифугировали в течение 5 мин при 12 000g на центрифуге Minispin («Eppendorf»).

Экстракцию липидов и липопротеинов проводили по Фолчу [25] с модификациями и последующей экстракцией белков из КС в горячую воду. КС 8 раз промывали Milli-Q H₂O, центрифугировали 5 мин при 12 000 g на центрифуге Minispin. К осадку клеточных стенок добавляли смесь хлороформ : метанол в соотношении 2 : 1 (v/v) (к 20 о.е. КС 1 мл смеси), тщательно перемешивали, инкубировали 1 ч при 200 об/мин и 30 °C, затем центрифугировали при 12 000 g. КС промывали водой до полного исчезновения хлороформа под осадком. Затем добавляли Milli-Q H₂O, так чтобы произвести экстракцию из КС в отношении 1 о.е. к 10 μ l при нагревании до 100 °C в течение 5 мин. Полученные таким способом экстракты были исследованы с помощью LC-MS/MS анализа.

Биотинилирование белков в растворе. К полученным экстрактам добавляли сульфо-NHS-LC-биотин («Pierce», США) до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 1 ч при 4 °C [10].

Электрофорез белков в денатурирующих условиях. Белки анализировали в полиакриламидном геле [26]. В качестве белкового маркера использовали набор «Thermo Scientific», США. После проведения электрофореза в денатурирующих условиях гель окрашивали Кумасси и серебром по стандартным методикам.

Вестерн-блот анализ. После электрофореза гель промывали в воде, затем проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham Protran», 0,45 мкм) в буфере, содержащем 100 mM Tris-HCl, 192 mM глицина с добавлением 20%-ного изопропанола в течение 1–1,5 ч при силе тока 110 mA. После окончания процедуры проводили визуализацию белков с помощью антител к Bgl2 по стандартной методике. Процедуру ECL проводили согласно [27] в темной комнате. В случае биотинилированных образцов мембрану в течение 1 ч инкубировали в буфере TBS, содержащем 0,05%-ный Tween-80 («Ferah», США), 1%-ный казеин и стрептавидин

(1 : 2000, «Sigma», США), отмывали и визуализировали в буфере 100 мМ Tris-HCl (pH 9,0) с 10 мМ MgCl₂, содержащем 0,692 мМ BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate) и 0,734 мМ NBT (nitro-blue tetrazolium).

Подготовка проб для LC-MS/MS-анализа. К экстрактам из КС добавляли Tris, pH 8,5, дезоксихолат и ДТТ до конечной концентрации 0,1 М, 1% и 10 мМ, соответственно. Затем кипятили в течение 10 мин и охлаждали при комнатной температуре. Экстракты хранили при 4 °С. Дальнейшую подготовку проб, жидкостную хроматографию и масс-спектрометрический анализ проводили по методу [28] с некоторыми модификациями.

Статистическая обработка данных LC-MS/MS-анализа. Статистический анализ применяли для оценки разброса количества уникальных пептидов GPI-белков, выявленных в липид-ассоциированной фракции в трех биологических повторях. Доверительный интервал был посчитан с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первоначально было проведено выявление белков в экстракте в воду при нагреве делипидизированных КС штамма дикого типа. Выбор методического подхода определялся тем, что в статьях, опубликованных ранее, практически единственным SE-белком, закрепленным нековалентно и экстрагируемым при нагреве в воде до 100 °С КС, отмываемых 1%-ным SDS при 37 °С, является Bgl2 [23, 24]. Авторы указанных статей, однако, не исследовали вопроса о том, влияет ли процедура делипидизации КС на изменение набора белков, экстрагируемых в воду при нагревании. Иными словами, вопрос о том, можно ли обнаружить нековалентно закрепленные на высокомолекулярных полисахаридах белки (помимо Bgl2) в КС после процедуры делипидизации, исследован не был.

С помощью денатурирующего электрофореза с последующим окрашиванием Кумасси G-250 (рис. 1, дорожка 1) или нитратом серебра (рис. 1, дорожка 2) белки нам выявить не удалось. Использование методов биотинилирования и блоттинга со стрептавидином позволило обнаружить белки в данной фракции, однако не позволило их идентифицировать (рис. 1, дорожка 3). Единственным белком, идентификация которого была доступна, была глюканозилтрансгликозилаза Bgl2, поскольку этот фермент был выявлен с использованием антител (рис. 1, дорожка 4). Для идентификации белков полученная фракция была проанализирована методом LC-MS/MS.

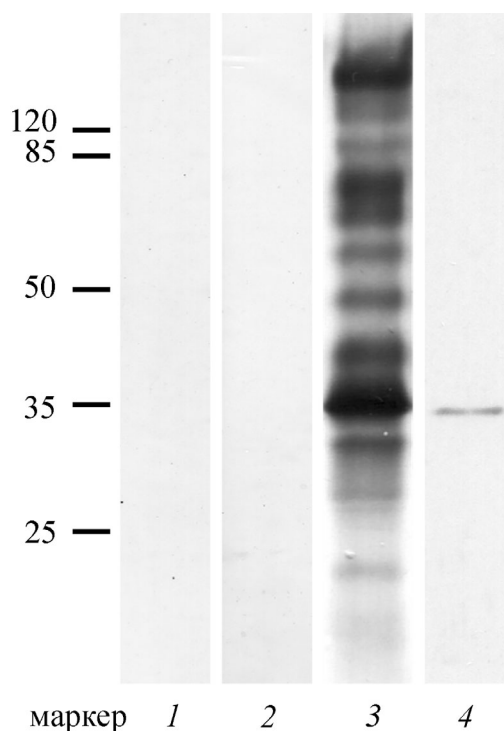


Рис. 1. Выявление белков в экстракте в воду при нагреве до 100 °С делипидизированных КС штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа. Электрофоретическое разделение в ПААГ, окрашивание Кумасси (дорожка 1) и нитратом серебра (дорожка 2). Вестерн-блот анализ предварительно биотинилированных белков экстракта с окрашиванием стрептавидином (дорожка 3) и окрашиванием антителами к Bgl2 (дорожка 4)

Количественная представленность определяемых белков из делипидизированных КС штамма дикого типа дана на рис. 2, а. Белок считали присутствующим во фракции в том случае, если в трех повторях он был определен не менее чем по 10 пептидам. Все белки, выявленные в клеточной стенке дрожжей штамма дикого типа, также присутствовали в клеточной стенке дрожжей штамма *bgl2Δ*, лишенного глюканозилтрансгликозилазы Bgl2 (рис. 2, б).

Описание белков, идентифицированных методом LC-MS/MS анализа, обнаруживаемых в экстрактах из делипидизированных КС штаммов дикого типа и *bgl2Δ* в воду при нагревании, представлено в табл. 1. Видно, что все белки относятся к группе GPI-модифицируемых белков. В дрожжах штамма дикого типа также выявляется Bgl2 (рис. 2, а), который, как уже было указано, GPI-белком не является.

Экстракция из КС белков, относящихся к группе GPI-модифицируемых, до делипидизации происходит с весьма низкой эффективностью, и определяемое с помощью LC-MS/MS-анализа количество уникальных пептидов

этих белков нестабильно от эксперимента к эксперименту (данные не приведены). Сказанное относится как к экстракции GPI-модифицируемых белков из КС в воду при нагреве, так и к их экстракции в гуанидингидрохлорид. Обработка

гуанидингидрохлоридом перед делипидизацией КС была проведена для исключения, в первую очередь, возможности закрепления экстрагируемых белков за счет их амилоидных свойств, поскольку недавно в литературе появились све-

Таблица 1. GPI-модифицируемые белки, идентифицированные методом LC-MS/MS анализа в делипидизированных клеточных стенках штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа и *bgl2Δ*

Белок	Краткое описание белка
Cwp1	<i>Маннопротеин КС</i> . Локализован в дочерних «шрамах», присоединен к β -1,3- и β -1,6-глюкану. Штаммы дрожжей, лишенные Cwp1, жизнеспособны, но имеют измененную морфологию КС и вакуолей, сниженную устойчивость к росту на среде с кислым значением pH и в присутствии различных химических стрессовых агентов, однако характеризуются повышенными способностью к формированию биопленок и термоустойчивостью, более интенсивным почкованием и отсутствием программируемой клеточной смерти
Sag1	<i>α-Агглютинин альфа-клеток</i> . N-концевая последовательность гомологична представителям суперсемейства иммуноглобулинов. Штаммы дрожжей, лишенные Sag1, жизнеспособны, но не способны к половому размножению, характеризуются измененной морфологией липидных капель, сниженными скоростью вегетативного роста, скоростью утилизации азота, временем жизни, устойчивостью к росту в присутствии различных химических стрессовых агентов
Crh1	<i>Хитинтрансглюкозилаза</i> . Присоединяет хитин к β -1,3- и β -1,6-глюкану. Локализуется на участках полярного роста. Штаммы дрожжей, лишенные Crh1, жизнеспособны, характеризуются увеличенным временем жизни, измененной морфологией вакуолей, сниженной скоростью утилизации азота. Сверхэкспрессия гена <i>CRH1</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Crh2	<i>Хитинтрансглюкозилаза</i> . Присоединяет хитин к β -1,3- и β -1,6-глюкану. Локализуется в зоне почечного рубца. Штаммы дрожжей, лишенные Crh2, жизнеспособны, характеризуются сниженной устойчивостью к росту в присутствии различных химических стрессовых агентов. Сверхэкспрессия гена <i>CRH2</i> приводит к увеличению скорости инвазивного роста
Gas1	<i>β-1,3-глюканозилтрансглюкозилаза семейства GAS</i> . Показано участие в сайленсинге рДНК и регуляции клеточного цикла. Штаммы дрожжей, лишенные Gas1, жизнеспособны, характеризуются измененной формой клеток, паттернами почкования, морфологией КС и вакуолей, повышенным содержанием хитина в КС, сниженными скоростью вегетативного роста, термоустойчивостью и устойчивостью к росту на среде с щелочным значением pH и в присутствии различных химических стрессовых агентов. Сверхэкспрессия гена <i>GAS1</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Gas3	<i>β-1,3-глюканозилтрансглюкозилаза семейства GAS</i> . Предположительно не проявляет ферментативной активности. Штаммы дрожжей, лишенные Gas3, жизнеспособны, характеризуются измененной морфологией вакуолей и сниженной устойчивостью к голоданию. Сверхэкспрессия гена <i>GAS3</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Gas5	<i>β-1,3-глюканозилтрансглюкозилаза семейства GAS</i> . Штаммы дрожжей, лишенные Gas5, жизнеспособны, характеризуются измененной морфологией вакуолей и сниженной устойчивостью к голоданию. Сверхэкспрессия гена <i>GAS5</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Ecm33	Белок с неизвестной функцией. Возможно, играет роль в апикальном росте. Штаммы дрожжей, лишенные Ecm33, жизнеспособны, характеризуются увеличенным размером клеток, измененной морфологией вакуолей, повышенным содержанием хитина в КС, сниженными скоростью вегетативного роста, термоустойчивостью и устойчивостью к окислительному стрессу. Сверхэкспрессия гена <i>ECM33</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Tir1	Экспрессия гена <i>TIR1</i> происходит в ответ на холодовой шок и анаэробноз. Штаммы дрожжей, лишенные Tir1, жизнеспособны, характеризуются сниженной устойчивостью к окислительному стрессу и к росту на среде в присутствии различных химических стрессовых агентов, сниженным уровнем программируемой клеточной смерти в культуре. Сверхэкспрессия гена <i>TIR1</i> приводит к снижению скорости вегетативного роста
Tip1	Мажорный белок КС с возможной липазной активностью. Транскрипция <i>TIP1</i> индуцируется в ответ на тепловой и холодный шок. Штаммы дрожжей, лишенные Tip1, жизнеспособны, характеризуются сниженными скоростью вегетативного роста, устойчивостью к холоду и голоданию, однако характеризуются повышенной способностью к формированию биопленок

Примечание. Информация для краткого описания белков взята из базы данных *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>).

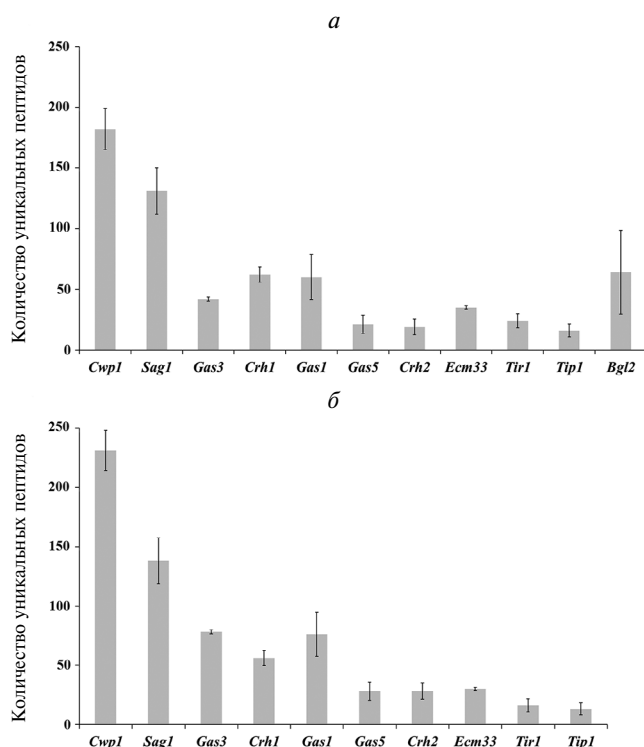


Рис. 2. Представленность GPI-модифицируемых белков и SE-белка Bgl2 в экстракте в воду при нагреве до 100 °C делипидизированных КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штаммов дикого типа (а) и *bgl2Δ* (б) (данные LC-MS/MS анализа)

дения о том, что некоторые GPI-белки, в частности, Gas1, способны формировать структуры типа амилоидных [29]. В то же время Bgl2 является мажорным белком, экстрагируемым в горячую воду из КС как до, так и после делипидизации. Ни GPI-модифицируемые белки, ни Bgl2 не были нами выявлены во фракции липопротеинов при экстракции по методу Фолча даже на уровне единичных пептидов.

Выявлено фосфорилирование ряда аминокислотных остатков GPI-модифицируемых белков, нековалентно закрепленных на высокомолекулярных полисахаридах КС штаммов дикого типа и *bgl2Δ* (табл. 2). Следует отметить, что между ними наблюдаются различия, однако полученные результаты не во всех случаях позволяют однозначно утверждать о фосфорилировании того или иного аминокислотного остатка в идентифицированном пептиде. Для получения более точного ответа необходимо продолжить эти исследования с применением и других подходов для идентификации посттрансляционных модификаций белков КС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, опубликованные в литературе, позволяют сформировать новые представления о

Таблица 2. Фосфорилирование GPI-модифицируемых белков из КС штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа и *bgl2Δ* в постлипидной фракции

Белок	Пептиды wt	Пептиды <i>bgl2Δ</i>
Cwp1	— — — ⁹⁹DGHLNYKSSSGFY[®]AIKDGSSYIFSSK¹²⁴	²⁰DS[®]EEFGLVSIR³¹ ³²S[®]?GS[®]?DLQYLS[®]?VYSDNGTLK⁴⁹ ⁸⁵EGS[®]ESDAATGFSIK⁹⁸ ⁹⁹DGHLNYKSSSGFY[®]AIKDGSSYIFSSK¹²⁴
Crh1	⁴⁵TTGCT[®]PDTALATSFSEDFSSSSKWFTDLK⁷³	⁴⁵TTGCTPDTALAT[®]SFSEDFSSSSKWFTDLK⁷³
Gas1	⁴¹⁵Y[®]GAYSFCTPK⁴²⁵	—
Gas3	²²³YLCQNS[®]LDGNKVNDDLDISK²⁴²	—
Gas5	⁵⁰GVDYQPGGSSNLT[®]DPLADASVCDRDVPVLK⁷⁹ ⁸⁸VYT[®]VDNSQDHSCHMK¹⁰² ²⁰⁷QLAAEY[®]FNCGDEADAR²²² ²⁵⁰LYQDYS[®]VPVFLSEFGCNQVK²⁶⁹	— — — ²⁵⁰LYQDYS[®]VPVFLSEFGCNQVK²⁶⁹

Примечание. Пептиды, в которых фосфорилирование встречается по трем LC-MS/MS определениям, отмечены жирным шрифтом. Пептиды, в которых фосфорилирование встречается по двум LC-MS/MS определениям, отмечены обычным шрифтом. В начале и конце каждого пептида указаны номера аминокислотных остатков последовательности соответствующих белков. Фосфорилирование обозначено значком [®] после аминокислотного остатка. В случае спорного варианта, какой из аминокислотных остатков в пептиде фосфорилируется, использован значок [®]?

роли липидного компонента клеточной стенки в регуляции метаболической активности этой органеллы и показывают значительное взаимодействие клеточной стенки и плазматической мембраны (ПМ), которые в свете исследований последних нескольких лет, включая и наши исследования, более отчетливо предстают единым компартментом клетки дрожжей — клеточной поверхностью. Так, в частности, недавно было показано, что через клеточную стенку осуществляется везикулярный транспорт [1]. Как единый компартмент КС и ПМ функционируют и в процессе формирования ответа клетки дрожжей на стресс [30]. В общем виде последовательность событий в этом случае сводится к восприятию сигнала, как правило, идущего из внешней среды (например, механическое воздействие на клетку, изменение физико-химических факторов внешней среды, отсутствие питательного субстрата и др.), передаче его через клеточную стенку и периплазматическое пространство на мембрану и далее внутрь клетки и ответной реакции, часто сопровождающейся значительными перестройками в КС [2]. В настоящее время идет процесс активного накопления данных о взаимодействии ПМ и КС при осуществлении этих процессов. Появляются (пока еще отдельные) сведения о взаимодействии белков КС и белков ядерного матрикса клетки дрожжей в процессе сайленсинга рДНК [31].

Большим прогрессом на этом пути явилось обнаружение белков, ранее считавшихся внутриклеточными и мембранными, а недавно выявленными за пределами клетки в составе транспортных везикул, экспортирующих метаболически активные соединения из клетки через клеточную стенку дрожжей *Candida albicans* во внешнюю среду [1, 32]. Очевидно, что на одном из этапов этого транспорта везикулы являются составляющей КС. Гипотеза о возможном наличии в КС дрожжей таких структур и предположение об их роли во взаимодействии КС и ПМ ранее были высказаны исследователями неоднократно, и одними из первых были И.С. Кулаев, В.М. Вагабов и А.Б. Циоменко [33, 34]. Есть и другие данные в пользу наличия в КС микрокомпартментов, в состав которых предположительно входят Bgl2, трегалаза и инвертаза [35].

Накопленный фактический материал позволяет более полно представить не только роль белков в молекулярной организации клеточной стенки дрожжей, но и дополнить представления о ее структуре. КС изменяется в зависимости от стадии и условий роста культуры, а также стадии клеточного цикла дрожжей. В то же время она является весьма стабильной структурой, общий план строения и функциональная дееспособ-

ность которой поддерживаются клетками в различных, даже экстремальных условиях. Несмотря на достигнутые успехи, большое количество вопросов, связанных со строением клеточной стенки дрожжей, остаются невыясненными.

В данной работе показано, что в КС дрожжей присутствуют GPI-модифицируемые белки, несвязанные ковалентно с высокомолекулярными полисахаридами, формирующими структурный каркас КС. Они могут быть экстрагированы из КС в воду при нагревании после удаления фракции липидов. О наличии этих белков, присутствующих в КС, но в форме молекул ковалентно связанных с высокомолекулярными полисахаридами остатком GPI-якоря, лишенным липидного компонента, известно давно.

Мы предполагаем, что обнаруженные нами белки уже лишились липидной части GPI-якоря в процессинге, поскольку они не выявляются с помощью LC-MS/MS анализа во фракции липопротеинов, в которую должны были бы экстрагироваться при условии наличия у них столь значительного липидирования. В то же время эти белки еще не прошли процесс встраивания в полисахаридный каркас КС, поскольку экстрагируются в горячую воду при нагревании после делипидизации. Возможность присутствия в КС липидного компонента в виде везикул хорошо объясняет факт удержания в ней изучаемых белков: они не экстрагируются в горячую воду до делипидизации и экстрагируются после делипидизации. Сказанное не исключает присутствия в КС и других липидных микрокомпартментов, ранее в данной органелле не охарактеризованных, например, таких как липидные капли, в составе которых также могли бы находиться обнаруженные нами липид-ассоциированные белки.

Это заключение нуждается в дальнейшей проверке, однако наличие пула нековалентно связанных с высокомолекулярными полисахаридами КС GPI-модифицируемых белков, прочно закрепленных в клеточной стенке дрожжей *S. cerevisiae*, установлено в данной работе. Совокупность полученных результатов позволяет отнести обнаруженный пул белков к промежуточной стадии процессинга GPI-белков КС. Были выявлены Bgl2 и 10 ковалентно незакрепленных на высокомолекулярных полисахаридах КС GPI-модифицируемых белков штамма дикого типа. В везикулах *C. albicans* [1] также обнаружены Bgl2 и GPI-белки адгезин Als4 и хитиназа Cht2, которая является аналогом обнаруженных нами хитинтрансгликозилаз Crh1 и Crh2. На основании сказанного можно предположить, что ковалентно незакрепленные на высокомолекулярных полисахаридах КС GPI-модифициру-

емые белки могут являться содержимым везикул или иных липидных микрокомпарментов. Обнаруженные белки становятся доступными для экстракции из КС после делипидизации.

Следует отметить, что нековалентно связанные с высокомолекулярными полисахаридами GPI-модифицируемые белки выявлены не только в КС родительского штамма, но и в КС дрожжей, лишенных белка Bgl2. Данный факт свидетельствует о том, что путь встраивания обнаруженного пула белков не зависит от функционирования глюканозилтрансглюкозилазы Bgl2, как это было показано ранее для ковалентно закрепленных на высокомолекулярных полисахаридах GPI-белков КС [21]. В свою очередь, обнаруженное в данной работе отсутствие отличий в содержании функционально значимых GPI-белков в КС дрожжей, лишенных Bgl2, и дрож-

жей дикого типа хорошо согласуется с отсутствием значимых отличий в скорости роста при нормальных условиях культивирования клеток этих двух штаммов, что описано во многих работах. Вопрос о встраивании указанных белков в клеточную стенку дрожжей, в том числе в условиях стресса, остается открытым и требует дальнейшего исследования.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (18-34-00915 мол. а).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было исследований с использованием в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vargas, G., Rocha, J.D., Oliveira, D.L., Albuquerque, P.C., Frases, S., Santos, S.S., Nosanchuk, J.D., Gomes, A.M., Medeiros, L.C., Miranda, K., Sobreira, T.J., Nakayasu, E.S., Arigi, E.A., Casadevall, A., Guimaraes, A.J., Rodrigues, M.L., Freire-de-Lima, C.G., Almeida, I.C., and Nimrichter, L. (2015) Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*, *Cell Microbiol.*, **17**, 389–407, doi: 10.1111/cmi.12374.
- Levin, D.E. (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway, *Genetics*, **189**, 1145–1175, doi: 10.1534/genetics.111.128264.
- Orlean, P. (2012) Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *Genetics*, **192**, 775–818, doi: 10.1534/genetics.112.144485.
- Vallejo, J.A., Sánchez-Pérez, A., Martínez, J.P., and Villa, T.G. (2013) Cell aggregations in yeasts and their applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2305–2318, doi: 10.1007/s00253-013-4735-y.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 239–256, doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x.
- Lesage, G., and Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 317–343, doi: 10.1128/MMBR.00038-05.
- Chaffin, W.L. (2008) *Candida albicans* cell wall proteins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 495–544, doi: 10.1128/MMBR.00032-07.
- Kalebina, T.S., Farkas, V., Laurinavichute, D.K., Gorlovoy, P.M., Fominov, G.V., Bartek, P., and Kulaev, I.S. (2003) Deletion of *BGL2* results in an increased chitin level in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **84**, 179–184, doi: 10.1023/A:1026034123673.
- Kinoshita, T., and Fujita, M. (2016) Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling, *J. Lipid Res.*, **57**, 6–24, doi: 10.1194/jlr.R063313.
- Mrša, V., Seidl, T., Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **30**, 1145–1154, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12<1145::AID-YEA163>3.0.CO;2-Y.
- Loibl, M., and Strahl, S. (2013) Protein O-mannosylation: what we have learned from baker's yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2438–2446, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.008.
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V., and Tanner, W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage, *J. Biol. Chem.*, **281**, 11523–11529, doi: 10.1074/jbc.M600314200.
- Zhao, H., Shen, Z.M., Kahn, P.C., and Lipke, P.N. (2001) Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules, *J. Bacteriol.*, **183**, 2874–2880, doi: 10.1128/JB.183.9.2874-2880.2001.
- Zhang, M., Liang, Y., Zhang, X., Xu, Y., Dai, H., and Xiao, W. (2008) Deletion of yeast CWP genes enhances cell permeability to genotoxic agents, *Toxicol. Sci.*, **103**, 68–76, doi: 10.1093/toxsci/kfn034.
- Borovikova, D., Teparić, R., Mrša, V., and Rapoport, A. (2016) Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistance to dehydration, *Yeast*, **33**, 347–353, doi: 10.1002/yea.3164.
- Abe, F. (2007) Induction of DAN/TIR yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature, *FEBS Lett.*, **581**, 4993–4998, doi: 10.1016/j.febslet.2007.09.039.
- Inokuma, K., Bamba, T., Ishii, J., Ito, Y., Hasunuma, T., and Kondo, A. (2016) Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide, *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 2358–2366, doi: 10.1002/bit.26008.
- Umekawa, M., Ujihara, M., Nakai, D., Takematsu, H., and Wakayama, M. (2017) Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast, *FEBS Lett.*, **591**, 3721–3729, doi: 10.1002/1873-3468.12882.
- Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., and Gil, C. (2004) The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*, *Microbiology*, **150**, 3341–3354, doi: 10.1099/mic.0.27320-0.
- Blanco, N., Reidy, M., Arroyo, J., and Cabib, E. (2012) Crosslinks in the cell wall of budding yeast control morphogenesis at the mother-bud neck, *J. Cell. Sci.*, **125**, 5781–5789, doi: 10.1242/jcs.110460.

21. Плотникова Т.А., Селях И.О., Калебина Т.С., Кулаев И.С. (2006) Bgl2p и Gas1p — основные глюкантрансферазы, формирующие молекулярный ансамбль клеточной стенки дрожжей, *Докл. Акад. Наук*, **409**, 828–831.
22. Sabirzyanov, F.A., Sabirzyanova, T.A., Rekstina, V.V., Adzhubei, A.A., and Kalebina, T.S. (2018) C-terminal sequence is involved in the incorporation of Bgl2p glucanotransglycosylase in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **18**, doi: 10.1093/femsyr/fox093.
23. Kalebina, T.S., Plotnikova, T.A., Gorkovskii, A.A., Selyakh, I.O., Galzitskaya, O.V., Bezsonov, E.E., et al. (2008) Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences, *Prion*, **2**, 91–96, doi: 10.4161/pri.2.2.6645.
24. Bezsonov, E.E., Groenning, M., Galzitskaya, O.V., Gorkovskii, A.A., Semisotnov, G.V., Selyakh, I.O., et al. (2013) Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation, *Prion*, **7**, 175–184, doi: 10.4161/pri.22992.
25. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509.
26. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
27. Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting, *Spermatogenesis*, **1**, 121–122, doi: 10.4161/spmg.1.2.16606.
28. Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells, *Nat. Methods*, **3**, 319–324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
29. Ryzhova, T.A., Sopova, J.V., Zadorsky, S.P., Siniukova, V.A., Sergeeva, A.V., Galkina, S.A., Nizhnikov, A.A., Shenfeld, A.A., Volkov, K.V., and Galkin, A.P. (2018) Screening for amyloid proteins in the yeast proteome, *Curr. Genet.*, **64**, 469–478, doi: 10.1007/s00294-017-0759-7.
30. Kock, C., Arlt, H., Ungermann, C., and Heinisch, J.J. (2016) Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signaling, *Cell. Microbiol.*, **18**, 1251–1267, doi: 10.1111/cmi.12635.
31. Koch, M.R., and Pillus, L. (2009) The glucanotransferase Gas1 functions in transcriptional silencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11224–11229, doi: 10.1073/pnas.0900809106.
32. Gil-Bona, A., Lama-Palacios, A., Parra, C.M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2015) Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*, *J. Proteome Res.*, **14**, 142–153, doi: 10.1021/pr5007944.
33. Tsiomenko, A.B., Plekhanov, P.G., Tuymetova, G.P., and Kononova, S.V. (1997) Secretory heat-shock protein of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. Identification and comparative characteristics, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 123–128.
34. Tsiomenko, A.B., Ratner, E.N., Tuymetova, G.P., and Kulaev, I.S. (2000) Localization of the secretory heat-shock protein gp280 in the cell envelope of thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*, *Dokl. Biol. Sci.*, **372**, 325–328.
35. Basu, A., Chaudhuri, P., Malakar, D., and Ghosh, A.K. (2007) Co-purification of glucanase with acid trehalase-invertase aggregate in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 299–304, doi: 10.1007/s10529-007-9535-y.

GPI-MODIFIED PROTEINS NON-COVALENTLY ATTACHED TO *Saccharomyces cerevisiae* YEAST CELL WALL

V. V. Rekstina¹, A. A. Bykova¹, R. H. Ziganshin², and T. S. Kalebina^{1*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kalebina@gmail.com

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

Received March 20, 2019

Revised August 5, 2019

Accepted August 6, 2019

Yeast cell wall GPI proteins lack a lipid part of an anchor and are covalently attached to high molecular weight polysaccharides glucan and/or chitin through mannose residues. They perform many functions, including participation in the cell wall molecular ensemble formation and providing cell resistance to stress. In this work, we identified a pool of GPI-modified proteins firmly bound to the cell wall by non-covalent interactions to high molecular weight structural polysaccharides. We believe that the detected proteins are intermediate form in the processing of GPI proteins of the cell wall, since they have already lost the lipid part of the GPI anchor and are absent in the lipoprotein fraction extracted according to Folch, but were not yet incorporated into the cell wall by the covalent bonding to high molecular weight polysaccharides because they could be extracted into water from delipidized cell walls. This group of previously unknown proteins might be present in the cell wall in the form of lipid-associated microcompartments represented by transport vesicles recently found in yeast. GPI-modified proteins non-covalently attached to high molecular weight polysaccharides were found in the cell wall of both the parent yeast strain and strain devoid of glucanotransglycosylase Bgl2, which indicates that the pathway of their incorporation into the cell wall is independent of the functions of this protein.

Keywords: yeast, cell wall, GPI proteins, lipid-associated microcompartment