

УДК 582.282.23:576.314

РОЛЬ ГЛЮКАНОВ И МАННАНОВ В ФОРМИРОВАНИИ УПРУГИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ

А. С. КАМЕНЕВ, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Дрожжевая клетка окружена толстой клеточной стенкой, на долю которой приходится до 30 % общей ее массы [5]. Клеточная стенка вегетативных клеток дрожжей состоит из двух основных слоев — наружного маннанового и внутреннего глюканового. Микрофибриллы глюкана образуют ригидный скелет, встроенный в аморфный маннановый матрикс [4, 8]. Данные о механических свойствах дрожжевой клетки отсутствуют.

Ранее нами было показано, что при обработке клеток дрожжей нейтральными протеиназами наружный маннановый слой удаляется [2], значительно уменьшается толщина клеточной стенки, существенно меняется и морфология клеток. Этот подход позволяет экспериментально оценить вклад глюканов и маннанов в формирование упругих свойств клеточной стенки дрожжей, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы исследования

Использовалась культура дрожжей *Candida maltosa*, полученная из коллекции ВНИИсинтезбелок. Условия выращивания дрожжей даны в сообщении [1], источни-

ком углерода до окончания экспоненциальной фазы роста служила 1 % глюкоза. Клетки отделяли центрифугированием, дважды промывали водой и один раз трис-HCl буфером, рН 7,8. Обработку клеток протеиназами (Pronase Р. Серва, ФРГ) проводили по методике, описанной в [2].

Препараты контрольных и обработанных протеиназами клеток исследовали с помощью системы анализа изображений (IBAS, Оптон; ФРГ), измеряли максимальный и минимальный диаметр (D_{max} и D_{min}) взрослых клеток с вакуолями в плоскости изображения. Анализу были подвергнуты не менее 100 клеток, при этом рассчитывали основные статистические параметры. Микрофотографии клеток получали на микроскопе Зетопан фирмы «Рейхарт» (Австрия).

Результаты и обсуждение

Удаление с помощью протеиназ наружного маннанового слоя приводит к изменению формы клеток — они становятся более округлыми (рис. 1). Такие клетки в дальнейшем мы предлагаем называть протосферопластами, поскольку значительная часть их оболочки утрачена, но форма клеток не

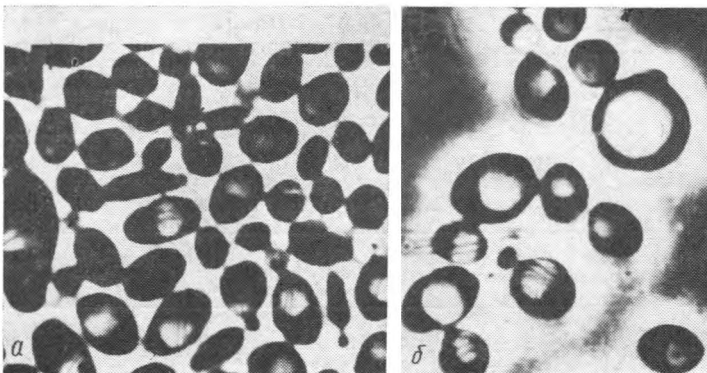


Рис. 1. Микрофотографии клеток дрожжей до (а) и после (б) обработки проназой ($\times 3500$).

идеально сферическая, что подтверждается результатами морфометрического анализа (таблица). Коэффициент формы (отношение D_{max} и D_{min}) изменяется от 1,55 в контроле до 1,12 после обработки протеиназами. Протосферопласты не становятся полностью шаровидными, как сферопласты или протопласты. Очевидно, принять правильную сферическую форму протосферопластам не позволяют почечные рубцы на полюсах клетки [6]. Основным компонентом почечных рубцов является хитин, устойчивый к действию протеиназ [7, 10].

При удалении маннанового слоя значительно меняются не только форма клеток, но и их размеры. Так, D_{min} увеличивается в 1,4 раза (таблица). Объем клеток мы рассчитывали на основании измеренных диаметров, принимая форму клеток за эллипсоид вращения. Объем протосферопласта в среднем был в 2,2 раза больше, чем у интактной клетки (таблица).

Необходимо отметить, что протосферопласты сохраняли жизнеспособность, поскольку скорость окисления ими глюкозы не отличалась от таковой у интактных клеток.

Попытаемся интерпретировать полученные результаты и приближенно оценить механические параметры клеточных стенок при помощи следующей упрощенной модели. Будем считать, что клеточная стенка представляет собой замкнутую сферическую поверхность, состоящую из двух слоев, каждый из которых характеризуется некоторыми механическими параметрами, в частности коэффициентами упругости k_0 и k_1 соответственно для наружного и внутреннего слоев. Предположим также, что все деформации клеточной стенки в процессе получения протосферопластов не выходят за пределы, в которых выполняется закон Гука. Таким образом, в стабильных условиях внутреннее давление клетки уравнивается упругими силами, проявляющимися при растяжении клеточной стенки [3]. Чтобы установить взаимосвязь сил давления с силами упругости, рассмотрим для примера сферу радиуса R с внутренним давлением P , ограниченную напряженной стенкой с поверхностным коэффициентом упругости k в тех пределах, когда $k = \text{Const}$. Выделим бесконечно малую площадку (сферический сегмент) ds , тогда сила натяжения этого участка равна $dF = kds = kR^2d\Omega$, где $d\Omega$ — бесконечно малый элемент телесного угла (рис. 2). Произведя интегрирование в пределах $(0 \div 4\pi)$, находим полную силу, обусловленную упругостью оболочки

$$F_y = k \int_0^{4\pi} R^2 d\Omega = 4\pi R^2 k = Sk, \quad (1)$$

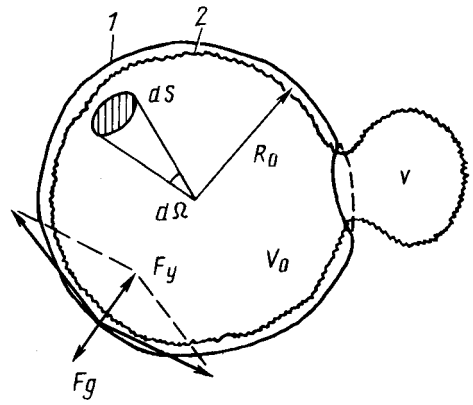


Рис. 2. Схема модели клеточной стенки дрожжей (экспликация в тексте).

1 — маннановый каркас; 2 — гликокановая оболочка

где S — площадь сферы. Энергия, запасенная при растяжении против сил упругости, равна

$$E_y = \int_R dE(R) = \int_{R_1}^{R_2} F_y dR = 4\pi k \int_{R_1}^{R_2} R^2 dR = \\ = \frac{4}{3} \pi k (R_2^3 - R_1^3) = k(V_2 - V_1), \quad (2)$$

где R_i — радиальные пределы деформации; V_i — соответствующие объемы. Внутреннее давление P действует на эту сферическую поверхность с силой $F_g = PS = 4\pi R^2 P$, причем в стабильном состоянии эти силы уравновешены на каждом элементе поверхности (рис. 2), следовательно в пределах выполнимости закона Гука соблюдается условие $k = P$. Энергия, запасенная за счет внутреннего избыточного давления, равна

$$E_g = \int_R F_g(R) dR = \int_0^R 4\pi R^2 P dR = \\ = \frac{4}{3} \pi R^3 P = PV, \quad (3)$$

где R — предел радиального расширения сферы. Таким образом, полная энергия упругой полости равна $E = PV + k(V - V_0)$, и при поступлении вещества (например, осмотические явления) давление внутри нее в изотермических условиях не будет изменяться до тех пор, пока в результате деформации не нарушится условие $k = \text{Const}$, объем же будет увеличиваться соответствующим образом.

При существующей скудости эксперимен-

Морфометрические параметры контрольных клеток и протосферопластов дрожжей *Candida maltosa*

Параметр	Контрольные клетки	Протосферопласты	Параметр	Контрольные клетки	Протосферопласты
D_{max} , мкм	4,29±0,05	4,45±0,09	Коэффициент формы $\left(\frac{D_{max}}{D_{min}}\right)$	1,55±0,07	1,12±0,09
D_{min} , мкм	2,77±0,05	3,99±0,02			
			Объем клетки, мкм ³	17,24±0,65	37,28±0,84

тальных данных о механическом состоянии оболочек клеточной стенки представляется резонным рассмотреть два вполне равноценных варианта.

Первый из них соответствует напряженному состоянию глюканового и маннанового слоев клеточной стенки. Используя свойство аддитивности коэффициентов упругости, запишем энергетический баланс клетки при разрыве внешней маннановой (k_0) оболочки и растяжении внутренней глюкановой (k_1) в изотермических условиях ($E_0 = E_1$, атмосферное давление не учитываем):

$$P_0 V_0 + (k_0 + k_1)(V_0 - v_0) = P_1 V_1 + k_1(V_1 - v_1), \quad (4)$$

где P_0 и V_0 — соответственно начальное давление и объем клетки; P_1 и V_1 — давление и объем для протосферопластов. Но в диапазоне гуковских деформаций выполняются условия

$$P_0 = k_0 + k_1, \quad P_1 = k_1, \quad (5)$$

следовательно, выражение (4) принимает вид (v_0, v_1 — нижний предел деформации оболочек)

$$2(1+n) - \varepsilon_0(1+n) = 2nm - \varepsilon_1 n, \quad (6)$$

где $n = k_1/k_0$, $m = V_1/V_0$, $\varepsilon_i = v_i/V_0$, откуда определяем

$$n_{II} = (2 - \varepsilon_0)[2(m-1) + \varepsilon_0 - \varepsilon_1]^{-1}. \quad (7)$$

Исходя из соотношений (5) и (7), находим давление в протосферопластах ($n < 1$, $P_1 < P_0$)

$$P_1^I = P_0 \frac{n}{n+1} = P_0 \frac{2 - \varepsilon_0}{2m - \varepsilon_1}; \quad m < 1, \quad \varepsilon_0 \geq \varepsilon_1 \quad (8)$$

и поверхностные коэффициенты упругости, выраженные через начальное давление клетки

$$k_0^I = \frac{2(m-1) + \varepsilon_0 - \varepsilon_1}{2m - \varepsilon_1} P_0; \quad k_1^I = \frac{2 - \varepsilon_0}{2m - \varepsilon_1} P_0; \quad k_0^I > k_1^I. \quad (9)$$

Во втором варианте рассмотрим ситуацию, когда внутренний глюкановый слой не испытывает напряжений, а осмотическое давление растворимых компонентов клетки сдерживается жестким наружным маннановым слоем. Рассматриваемый вариант, по-видимому, больше соответствует полученным экспериментальным данным, поскольку эллипсоидальная форма интактной клетки указывает на анизотропию упругих свойств наружной оболочки и весьма значительную жесткость, а сферическая форма протосферопластов и существенное увеличение их объема при освобождении от маннанового каркаса — на изотропность и небольшую упругость глюканового слоя. Энергетический баланс в этом случае можно записать ($v_0 \approx V_0$)

$$P_0 V_0 = P_1 V_1 + k_1(V_1 - V_0) - k_0(V_0 - v_0). \quad (10)$$

Тогда с учетом $P_1 = k_1$, $m = V_1/V_0$, $\varepsilon_0 = v_0/V_0$, $n = k_1/k_0$ получим соотношение

$$2 - \varepsilon_0 = 2mn - n = n(2m - 1), \quad (11)$$

откуда находим

$$n_{II} = (2 - \varepsilon_0) \cdot (2m - 1)^{-1}. \quad (12)$$

Давление в протосферопластах будет равно ($\varepsilon_0 \approx 1$)

$$P_1^I = P_0 \frac{2 - \varepsilon_0}{2m - 1} \rightarrow \frac{P_0}{2m - 1}, \quad (13)$$

а поверхностные коэффициенты упругости, выраженные через начальное давление ($m > 1$), —

$$k_0^{II} = P_0; \quad k_1^{II} = \frac{P_0}{2m - 1}; \quad k_0^{II} > k_1^{II}. \quad (14)$$

Индексы I и II соответствуют двум вариантам модели клеточной стенки. Сравнивая формулы (8), (9) и (13), (14), видим, что давление в протосферопластах и поверхностный коэффициент упругости внутренней оболочки в пределе одинаковы и не зависят от сделанных допущений относительно механического состояния оболочек. Это не противоречит физическим представлениям и экспериментальным данным и свидетельствует в пользу обоих вариантов нашей модели. Однако анализируя форму клеток до и после разрушения маннанового слоя, можно склониться в пользу второго варианта (снаружи — жесткий малодеформируемый ($\varepsilon \approx 1$) маннановый слой, играющий роль каркаса и определяющий форму клеток, внутри — эластичный глюкановый слой, хорошо растягивающийся при нарушении каркаса; это приводит к уменьшению давления в системе, что, вероятно, необходимо для деления клеток).

Запишем энергетический баланс в чисто механическом смысле при почковании клетки в изотермических условиях в каждый момент времени

$$P_0 V_0 = P' V_0 + P' v' + k_1 v', \quad (15)$$

где v' — объем почки, увеличивающийся с течением времени (переменная координата). Тогда с учетом выражения (14) для k_1 давление в системе клетка-почка $P'(P_0, m, v')$ выразится формулой

$$P' = P_0 \frac{2m - 1 - m'}{(2m - 1)(1 + m')}, \quad (16)$$

где $m' = v'/V_0$. На рис. 3 иллюстрируется вышеизложенное в относительных координатах $q = P'/P_0$ и $m' = v'/V_0$ для различных значений k — поверхностного коэффициента упругости внутренней оболочки, который здесь задается коэффициентом относительного увеличения объема m (14). Предложенные модели позволяют адекватно описать экспериментальные результаты, на их основании можно составить целый ряд новых представлений о структуре дрожжевой клеточной стенки. По-видимому, в природе в той или иной степени реализуются обе модели. Так, согласно последним данным, толщина маннанового слоя, удаляемого Z-протеазой, у дрожжей *S. cerevisiae* составляет 30 % толщины стенки [11], причем морфологические изменения протосферопластов выражены гораздо слабее. Наши результаты указывают на существование более мощного наружного слоя маннанов (до 60 % толщины клеточной стенки) у дрожжей *Candida* [2]. Предположение о функции наружного маннанового слоя как регулятора проницаемости клеточной стенки [11] нельзя считать окончательно доказанным, поскольку молекулы полиэлектроли-

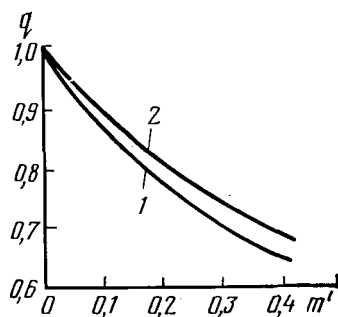


Рис. 3. Изменение относительного давления q в системе клетка — почка при делении в зависимости от относительного объема почки m' для различных $k_1=f(m)$.
1— $m=2$; 2 — $m=5$.

тов с молекулярной массой до 50 000 Дн свободно проникают сквозь клеточную стенку [9]. Кроме того, при росте дрожжей рода *Candida* на углеводородах в клеточной стенке образуются «каналы», размеры которых значительны [1].

Нам представляется наиболее вероятным, что двухслойность клеточной стенки дрожжей обусловлена ее эластичностью и жесткостью. Маннаны представляют собой жесткую малодеформируемую оболочку,

сдерживающую основную часть осмотического давления клетки — $k_0 > k_1$, формулы (9) и (14). Однако такая оболочка затрудняет почкование клеток. Внутренний эластичный глюкановый слой, который легко деформируется, не препятствует образованию почки после лизиса маннанового слоя. Об этом свидетельствует образование хитинового кольца при почковании дрожжей [6, 10].

Кроме того, при действии очищенных глюконаз на дрожжевую клетку происходит лизис дрожжей, так как маннановый слой достаточно хрупок [10, 11].

Полученные математические закономерности были проверены и подтвердились на реальных моделях хлопковой крупноячеистой сетки в качестве наружной оболочки (целлюлоза) и латексной пленки в качестве внутренней оболочки (линейные молекулы с малым числом поперечных швов). Выбранные материалы в силу структурного подобия по деформационному поведению более или менее соответствуют маннанам (целлюлоза) и глюканам (латекс). Поэтому аналогия между моделью и клеточной стенкой представляется нам вполне уместной, полученные соотношения можно рассматривать как первое приближение в описании механических свойств дрожжевой клеточной стенки.

Таким образом, клеточная стенка дрожжей представляет собой систему, удовлетворяющую противоречивым требованиям жизнедеятельности клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Логинова Т. М., Тюрин В. С., Гололобов А. Д. Состав и локализация на клеточной стенке веществ, выделяемых дрожжами при культивировании на среде с углеводородами. — Прикл. биохим. микробиол., 1983, т. 19, № 1, с. 98—103. — 2. Егоренкова Г. Н., Белов А. П. Структурная организация клеточных стенок у дрожжей. — Микробиология, 1984, т. 53, № 2, с. 300—304. — 3. Нобел П. Физиология растительной клетки. — М.: Мир, 1973, с. 35—41. — 4. Феофилова Е. П. Клеточная стенка грибов. — М.: Наука, 1983. — 5. Фихте Б. А., Гуревич Г. А., Кудрявцев А. А. Дезинтеграция микроорганизмов. — В кн.: Итоги науки и техники. Микробиология. М.: ВИНТИ, 1978, с. 5—47. — 6. Штрейблова Е. Архитектоника клеточной стенки дрожжей. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1977, № 3, с. 410—421. — 7. Cabib E., Bowers B. — J. Bacteriol., 1975, vol. 124, N 3, p. 1586—1593. — 8. Farkaš V. Microbiol. Rev., 1979, vol. 43, p. 117—144. — 9. Schlenk F., Lydek-Gueick C. R. — Arch. Biochem. Biophys., 1970, vol. 138, N 1, p. 220—225. — 10. Yeast cell envelopes, biochemistry, biophysics and ultrastructure, vol. 1, CRC Press, Fla. 1981. — 11. Slotnik H., Fernandez M. B., Bowers B., Cabib E. — J. Bacteriol., 1984, vol. 159, N 3, p. 1018—1026.

Статья поступила 5 февраля 1985 г.

SUMMARY

Experimental data have been obtained on the change in cell volume of the yeast *Candida maltosa* under breaking mannane layer of the cell wall with pronase. A model is suggested as a basis for interpreting the results of the experiment and conclusions are drawn on the influence of glucane and mannane layers on mechanical properties of the cell wall (relative coefficients of elasticity and contribution to resistance to intracellular pressure). In this respect a new viewpoint on their role in cell formation is suggested.