

УДК 567.8.095.1

**СИНТЕЗ БЕЛКОВ ТЕРМОШОКА У МЕЗОФИЛЬНОГО ШТАММА
ДРОЖЖЕЙ CANDIDA MALTOSE И ЕГО ТЕРМОТОЛЕРАНТНОГО
МУТАНТА**

Е. С. СИНАНЫН, Е. Г. ДАВИДОВА, М. А. ДАВТЯН, Е. Р. ДАВИДОВ

(Кафедра применения изотопов и радиации в сельском хозяйстве)

Методом радиоактивных индикаторов с использованием ^{35}S -метионина показано, что кратковременное повышение температуры на 4—5°C выше оптимальной приводит к появлению 8 групп новых белков у мезофильных дрожжей *C. maltosa* и 2 групп у термотолерантного мутанта. Определена молекулярная масса этих белков.

У всех организмов при стрессовых воздействиях индуцируется синтез нескольких групп новых белков. Наиболее подробно синтез белков изучен при термическом воздействии, появляющиеся при этом белки

названы белками термошока. Результаты многочисленных исследований данных белков обобщены в ряде обзоров [1, 2, 8]. Белкам термошока приписываются защитная роль и функция регуляторов метаболизма в период восстановления после стресса, хотя их функция у различных микроорганизмов полностью не выяснена. Имеются сообщения, в которых авторы указывают на присущие этим белкам ферментативные активности: АТФ-азную и алькагольдегидрогеназную [2]. Появление белков термошока, как правило, сопровождается подавлением синтеза других белков и значительными изменениями в метаболизме [5]. В клетках *Sacch. cerevisiae*, которые в рассматриваемом аспекте по сравнению с другими дрожжами наиболее исследованы, при различных стрессах появляется 8 групп белков [7].

Целью настоящей работы явилось исследование синтеза белков термошока у штамма мезофильных дрожжей *S. maltosa*, имеющего оптимум температуры 30—32 °С, и его термотолерантного мутанта с оптимумом температуры 32—40 °С.

Методика

Исследовали аспорогенные мезофильные дрожжи *Candida maltosa* и его термотолерантный мутант¹. Дрожжи поддерживали на агаризованной среде с сусло-агаром при комнатной температуре. Для экспериментов использовали культуры дрожжей, выращенные в течение 48 ч при температуре 32 и 40 °С соответственно для дикого штамма и его термотолерантного мутанта. Дрожжи выращивали на жидкой среде в колбах на качалках при тех же температурах. Данные о минеральном составе среды приведены ранее [3], источником углерода служила глюкоза в концентрации 1%.

Скорость синтеза белков термошока оценивали по скорости включения ³⁵S-метионина (в концентрации до 30 мкМ) в ТХУ-нерастворимую высокополимерную фракцию после инкубации в 1,5 мл пробирках аликвоты дрожжевой суспензии с радиоактивным метионином в течение 2—40 мин при выбранной температуре. По окончании инкубации к суспензии добавляли раствор немеченого метионина, количество которого в 100 раз превышало его содержание в среде, и 50% раствор ТХУ до конечной ее концентрации 7—8%. Суспензию прогревали на кипящей бане 10 мин, замораживали при —40 °С и на следующий день осадки, нерастворимые в 7% ТХУ, переносили на фильтр из стекловолокна типа GF/C (фирма «Ватман», Великобритания), предварительного смоченный 5% раствором метионина в 7% ТХУ. Осадки на фильтрах промывали тем же раствором ТХУ и пе-

реносили во флаконы с диоксидным сцинтиллятором. Уровень радиоактивности образцов определяли на сцинтилляционном счетчике Марк-2 (фирма «Сэрл», Голландия) с последующим расчетом абсолютной радиоактивности.

Определение количества биомассы проводили в аликвоте суспензии дрожжей, перенесенной на мембранный фильтр и высушенной в СВЧ-печи.

Клетки дрожжей для экстракции водорастворимых белков разрушали в дезинтеграторе типа MSK (фирма «Браун Мензунген», ФРГ) с буссами баллотони размером 0,4 мм в трис-буфере, содержащем следующие компоненты: трис-буфер — pH 7,2; 0,1 М; 2 мМ ЭДТА; 1 мМ PMSF.

Экстракт для осаждения структурных компонентов клеток центрифугировали в течение 60 мин при 165 000 g, надосадочную жидкость концентрировали ПЭГ-6000 в целлофановых мешках с размером пор 3000—5000 Да. Концентрат белка использовали для электрофореза в 10% полиакриламидном геле с SDS по методу [7]. Разделенные белки перед радиоавтографией переносили электроблоттингом на нитроцеллюлозные фильтры (фирма «Биорад», США) по методу [8]. Идентификацию полюс радиоактивных белков на мембранном фильтре проводили радиоавтографически с использованием незкранированной рентгеновской пленки РТ-2. Содержание белка определяли по методу Лоури [6]; стандартом служил сывороточный альбумин.

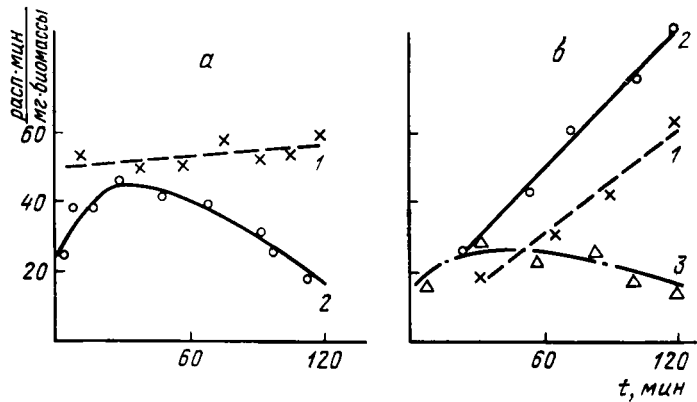
Результаты

При сравнительном исследовании исходного штамма дрожжей и его термотолерантного мутанта было установлено, что инкубация дрожжей в течение 180 мин при температуре 32—40 °С не вызывает изменений скорости включения ³⁵S-метионина в полимерную фракцию биомассы и лишь при 40 °С скорость поступления метки резко подав-

¹ Исходный штамм и его термотолерантный мутант были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником ВНИИсинтезбелок З. Н. Робышевой, за что авторы приносят глубокую благодарность.

Рис. 1. Включение ^{35}S -метионина в ТХУ-нерастворимую фракцию клеток дрожжей при температуре 32° (1), 40° (2) и 44° С (3).

а — исходный мезофильный штамм; б — термотолерантный мутант.



ляется (рис. 1, б), а у исходного штамма включение аминокислоты ингибируется уже при повышении температуры до 37—38°С (рис. 1, а). Повышение температуры инкубации исходного штамма приводит также к остановке роста клеток при 37°С, скорость дыхания начинает снижаться только после 1-го часа инкубации (рис. 2).

Для термотолерантного мутанта повышение температуры от 32 до 40,6°С приводило в течение 2 ч инкубации к заметному изменению

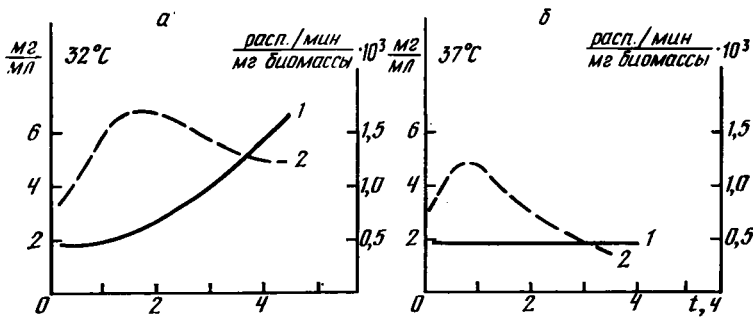


Рис. 2. Влияние температуры инкубации 32°С (а) и 37°С (б) на скорость роста (1) и дыхание (2) мезофильного штамма.

скорости дыхания и роста клеток и лишь при 43°С отмечены остановка роста и быстрое подавление скорости дыхания (рис. 3). На основании данных, полученных в этих экспериментах, скорость включения ^{35}S -метионина в полимерную фракцию исходного мезофильного штамма исследовали при температуре 32 и 37°С, а для термотолерантного мутанта — при 40 и 44°С.

О включении метки в белковые фракции в течение 5—20-минутной инкубации ^{35}S -метионина можно судить по электрофореграмме и радиоавтографе этой же фореграммы, приведенной на рис. 4.

Засвеченные пятна на радиоавтографе указывают на интенсивное включение ^{35}S -метионина в определенные классы белков, которые синтезируются при шоковой температуре. Совершенно очевидно, что наиболее быстрое включение ^{35}S -метионина при повышенной температуре у мезофильного штамма происходит преимущественно в 8 групп с соответствующими молекулярными массами 28, 46, 61, 74, 79, 85, 89 и 102 кДа, тогда как у термотолерантного штамма — только в 2 группы белков с молекулярными массами около 74 и 79 кДа.

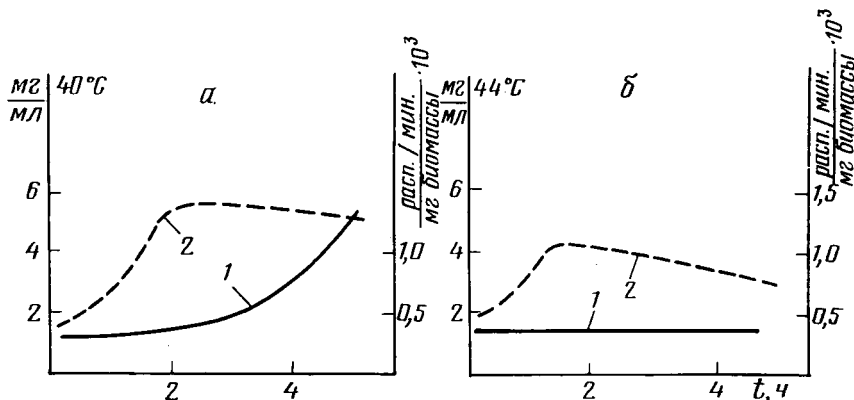


Рис. 3. Влияние температуры инкубации 40° (а) и 44°С (б) на скорость роста (1) и дыхание (2) термотолерантного штамма.

Описанный в данной работе спектр белков, синтезируемых в клетках мезофильного штамма, совпадает со спектром, характерным для других эукариотов [1]. В многочисленных исследованиях указано, что

синтезированные при стрессах белки обладают энзиматической активностью, хотя физиологический смысл ее остается неясным. Обнаруженные различия в спектрах белков термошока у мезофильного штамма и его термотолерантного мутанта позволяют предположить, что в механизм, непосредственно обеспечивающий устойчивость клеток к высокой температуре, вовлекается не весь набор вновь синтезируемых белков, хотя индукция их синтеза происходит под воздействием температуры, которая ниже температуры, переносимой дрожжевой клеткой (рост мезофильного штамма прекращается при температуре 37°С). Мы полагаем, что непосредственно защитную функцию выполняют только 2 группы белков, которые синтезируются и у термотолерантного мутанта при температуре 44°С, т. е. при термошоке. Поскольку в клетках мутанта отсутствует 6 групп белков термошока, они нечувствительны даже к температуре 40°С. Возможно, однако, что термотолерантный мутант не является дефицитным по отношению к указанным белкам. Происходят лишь изменения в регуляции синтеза этих белков, что отражается на пределе температуры, при которой они индуцируются. Не исключено, что функциональное значение белков, отсутствующих у мутанта, заключается в обеспечении нового роста при последующем понижении температуры культивирования мезофильного штамма до нормальной. Это и будет являться предметом наших дальнейших исследований.

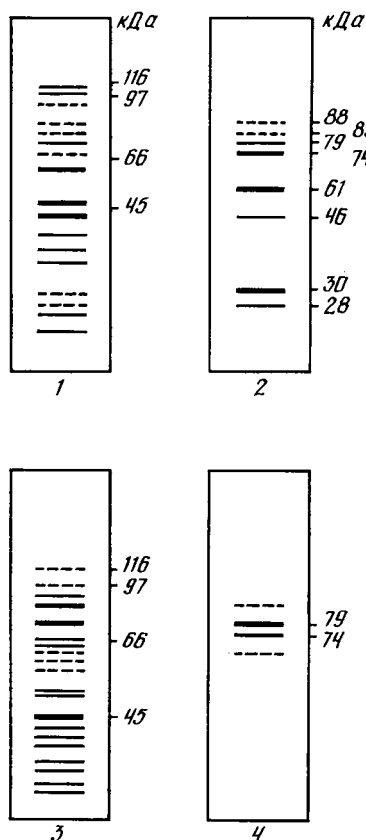


Рис. 4. Электрофореграмма препаратов белков дрожжей, меченных в течение 5 мин ^{35}S -метионином и разделенных в полиакриламидном геле с SDS [1, 3].

Радиоавтографы тех же фореграмм после перенесения белков на нитроцеллюлозные фильтры электроблоттингом. 1 и 2 — белки из мезофильного штамма; 3 и 4 — белки из термотолерантного мутанта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войников В. К., Иванова Г. Г. Физиологический стресс и регуляция активности генома клеток эукариотов. — Успехи современной биологии, 1988, т. 105, № 1, с. 3. — 2. Bardon R. H. — Biochem J., 1986, vol. 240, p. 313—324. — 3. Davidov E. G., Demanova N. F., Gololobov A. D. — Asta biotechnol., 1982, vol. 2, p. 213—225. — 4. Laemmli U. K. — Nature, 1970, vol. 227, p. 680—685. — 5. Lindquist S. — Ann. Rev. Biochem., 1986, vol. 55, p. 115—191. —
6. Loury O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. G. — G. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—278. — 7. Miller M. J., Nguyen—Huu Xuong, Geiduschek E. P. — J. Bacteriol., 1982, vol. 151, p. 311—327. — 8. Milton J. Schlesinger. — J. Cell. Biol., 1986, vol. 103, p. 321—325. — 9. Sutton R., Wrigley C., Baldo B. A. — J. Immunol. Methods., 1982, vol. 52, p. 183—194.

Статья поступила 15 июня 1988 г.

SUMMARY

It is shown by radioactive indicator technique with the use of ^{35}S -methionine that short-term increase in temperature by 4—5°C higher than optimum one results in appearance of 8 groups of new proteins in mesophilic yeast, and of 2 groups in thermotolerant mutant. Molecular mass of these proteins has been defined.