

РОЛЬ БЕЛКОВ В ФОРМИРОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ

© 2001 г. Т. С. КАЛЕБИНА, И. С. КУЛАЕВ

Биологический факультет

*Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Белки клеточной стенки дрожжей — общая характеристика и разнообразие. III. Строение клеточной стенки дрожжей и роль белков в формировании и поддержании ее молекулярной организации. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Клеточная стенка (рис. 1) целиком покрывает дрожжевую клетку, нарушая монотонность своего строения только в области, где образуется и отделяется дочерняя клетка. У дрожжей, размножающихся почкованием (в частности у наиболее интенсивно изучаемых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*), эта область носит название зоны почкования. От цитоплазматической мембраны клеточная стенка отделена периплазматическим пространством.

Общая масса клеточной стенки дрожжей может достигать 25% от массы всей клетки, толщина ее колеблется в пределах 1000—2500 Å. Она состоит на ~40% из маннопротеинов и на 2% — из хитина; остальное приходится на полимер глюкозы — глюкан (табл. 1).

Глюкан является важным структурным компонентом клеточной стенки, ответственным за поддержание ее прочности. Под термином «дрожжевой глюкан» в настоящее время объединяют несколько типов молекул полисахарида, образованных в основном β-1,3- и β-1,6-связанными остатками глюкозы. Глюкан локализован как в латеральной клеточной стенке, так и в зоне почкования, которая по составу отли-

Принятые сокращения: КС — клеточная стенка; EDTA — этилендиаминтетраацетат; SDS — додецилсульфат натрия; DTT — дитиотреитол; β-Met — β-меркаптоэтанол, *EndoH* — N-ацетилглюкозаминидаза H; *EndoF* — пентидил-N-глюкозидаза F.

Адрес для корреспонденции: Kalebina@protein.bio.msu.ru

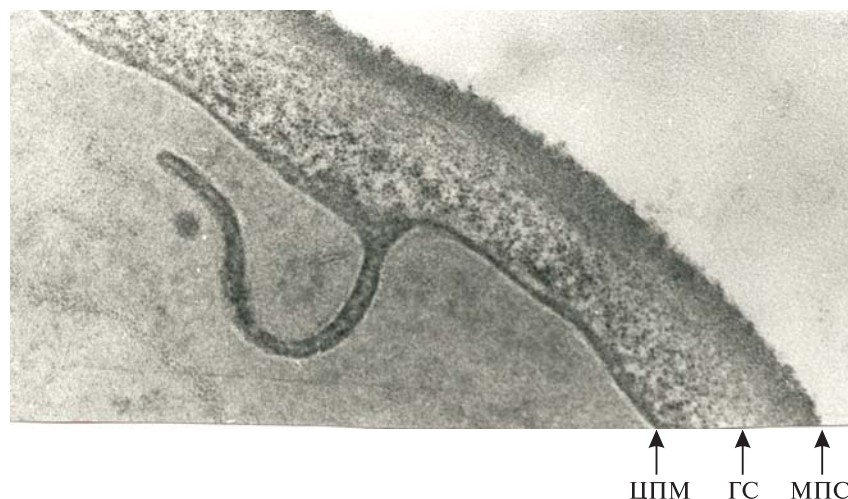


Рис. 1. Электронная фотография клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ($\times 100000$).

МПС — маннопротеиновый слой; ГС — глюкановый слой; ЦПМ — цитоплазматическая мембрана.

Таблица 1
Компоненты клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [51]

Компоненты клеточной стенки	Количество (% от КС)	Основной тип связи	Степень полимеризации	Мг (кДа)	Число молекул $\times 10^6$ на клетку
Маннопротеины	40	$\alpha 1,6 + \alpha 1,3 + \alpha 1,2$		от <10 до >450	2,6
Глюкан					
- щелочерастворимый	20	$\beta 1,3^a$	1500	243	2,5
- щелоче/кислото-нерастворимый ^б	35	$\beta 1,3^a$	1500	243	4,3
- щелоченерастворимый, кислоторастворимый	5	$\beta 1,6^a$	140	23	6,6
Хитин	2	$\beta 1,4$			

а – Как правило, β -1,3-глюкан содержит некоторое количество β -1,6-связей. В свою очередь, в β -1,6-связанном глюкане присутствуют β -1,3-связанные остатки глюкозы.

б – Данный тип глюкана в КС дрожжей, по-видимому, ковалентно связан с хитином, что обуславливает его устойчивость к воздействию кислоты и щелочи.

чается от остальной поверхности главным образом высоким содержанием хитина.

Хитин — минорный, но чрезвычайно важный компонент клеточной стенки дрожжей — представляет собой полимер с β -1,4-связанными остатками N-ацетилглюкозамина. Примерно 90% этого соединения находится в области образования и отделения дочерних клеток — почек. В этой зоне хитин участвует в построении первичной перегородки — септы между материнской и дочерней клетками и образует жесткое кольцо, защищающее канал между ними. В латеральной клеточной стенке локализовано примерно 10% хитина.

Маннопротеиновый компонент клеточной стенки долгое время считали пептидоманнаном, а саму клеточную стенку представляли как инертную структуру, состоящую в основном из полисахаридов, основная роль которой сводится к защите протопласта от механических повреждений.

В последнее время наметился существенный прогресс в развитии наших представлений о строении и функциях клеточной стенки дрожжей. Показано, что она представляет собой динамичную, полифункциональную и физиологически активную органеллу, которая отвечает за осуществление всего комплекса взаимоотношений между микроорганизмом и окружающей средой. Клеточная стенка выполняет функцию наружного скелета. В КС располагаются рецепторы и она играет важную роль в иммунологических реакциях, и, кроме того, участвует в осуществлении контроля метаболических процессов факторами внешней среды. Во многом прогресс исследований связан с успехами, достигнутыми в последние годы в области изучения структуры и функций белков различной степени гликозилирования, которые формируют маннопротеиновый компонент этой органеллы.

Еще не так давно весьма спорным вопросом было само существование белков в клеточной стенке дрожжей. Многие исследователи полагали, что как ферменты, так и структурные белки, выделяемые из препаратов клеточной стенки, являются примесями внутриклеточного содержимого. Совершенствование методов биохимии и молекулярной биологии привело к резкому увеличению объема информации о структуре белков клеточной стенки дрожжей и той роли, которую они играют в формировании молекулярного ансамбля этой органеллы. Накопленный фактический материал позволяет более полно представить не только роль белков в молекулярной организации клеточной стенки дрожжей, но и саму структуру КС.

В данном обзоре сделана попытка обобщить и проанализировать имеющиеся к настоящему времени данные о роли белков в формировании клеточной стенки дрожжей.

II. БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ — ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И РАЗНООБРАЗИЕ

Экстракция белков. При изучении белков весьма важной является проблема их экстракции из клеточной стенки — сложной и прочной структуры, в формировании которой принимают участие различные типы связей: как ковалентные, так и нековалентные.

В некоторых случаях способ экстракции лежит в основе классификации выделяемых белков. Белки из КС дрожжей можно экстрагировать, применяя EDTA, SDS, восстанавливающие реагенты (DTT, β -Met) в сочетании с нагреванием [18, 23, 72, 98, 99], или же такие химические агенты как NaOH, NaCl и мочевины [7, 15, 64, 66, 67].

Могут быть использованы также гидролазы с различной субстратной специфичностью: индивидуальные ферменты (протеиназы, β -глюканызы, маннозидаза) [3, 36, 87, 95], препараты, содержащие несколько ферментов (как правило смесь глюканызы с протеиназами — зимолиаза, литиказа) или же такие комплексные литические препараты, как, например, хеликаза (желудочный сок виноградной улитки) [2, 23, 37, 72, 98].

Перечисленные реагенты применяются для получения белков как из изолированных клеточных стенок, так и с поверхности целых клеток. Использование ферментов позволяет выделять белки, которые не экстрагируются химическими реагентами, однако применение этого метода имеет ограничения, связанные с необходимостью строго контролировать чистоту используемых гидролаз, так как неконтролируемые примеси могут сильно изменить характеристики выделяемых белков.

Часто возникает опасность загрязнения белков, выделяемых из клеточных стенок, белками внутриклеточного содержимого [17, 22]. Недавно был разработан метод, позволяющий частично решить данную проблему. Метод основан на использовании производного биотина, который по данным Казановы с соавт. способен метить только поверхностные белки клеточной стенки дрожжей [22].

Гликозилирование. Как уже упоминалось, подавляющее большинство белков клеточной стенки дрожжей являются гликопротеинами. Лишь в нескольких работах сообщается о наличии в клеточной стенке негликозилированных белков [8, 9, 21, 32]. К настоящему моменту обнаружено 3 типа гликозилирования белков клеточной стенки дрожжей.

1. О-маннозилирование. Многие белки содержат короткие неразветвленные маннозные цепи, которые присоединены к молекуле белка при помощи О-гликозидной связи между остатком маннозы и гидроксильной группой серина или треонина [84, 85]. Эта связь разрушается при действии слабой щелочи (β -элиминирование). О-связанные по-

лисахаридные цепочки содержат от одного до пяти (как правило четыре—пять) маннозных остатков (рис. 2).

Количество О-связанных маннозных цепей на одну молекулу белка может быть достаточно велико, поэтому количество маннозы, присоединенной к белкам таким способом может составлять около 12% от общего числа маннозных остатков в маннопротеинах клеточной стенки дрожжей [91]. Остатки маннозы связаны между собой α -1,3- и α -1,2- связями. Олигосахариды такого типа локализуются преимущественно в *Ser/Thr*-богатых областях белков, которые, возможно, имеют жесткую (негибкую) и вытянутую конформацию [40].

2. N-маннозилирование.

Разветвленные маннозные цепи присоединяются к белку через хитобиозный мостик при помощи N-гликозидной связи между остатком N-ацетилглюкозамина [11, 70] и β -амидным азотом аспарагина (рис. 3). N-гликозидсвязанный полисахарид стабилен в щелочи, но может быть удален под действием специфических ферментов — *EndoH-EndoF*-гликозидаз.

Гликозилирование данного типа происходит при участии остатков аспарагина, входящих в состав трипептида *Asn-X-Ser/Thr*, где — X это любая аминокислота за исключением *Pro* [55]. Показано, что у дрожжей используется для гликозилирования не более трети таких потенциальных сайтов [93].

В результате генетического и химического анализов удалось установить, что высокоразветвленные маннозные цепи неоднородны по строению и состоят из внутренней части — так называемого кора, в который входит 12—15 маннозных единиц и вариабельной по своим размерам внешней цепи. Последняя, в свою очередь, образована остатками маннозы, соединенными α -1,6-связью в центральной цепи к которой присоединены короткие олигосахариды с α -1,2- и α -1,3-связями. [78]. В некоторых случаях у дрожжей находят гиперманнози-

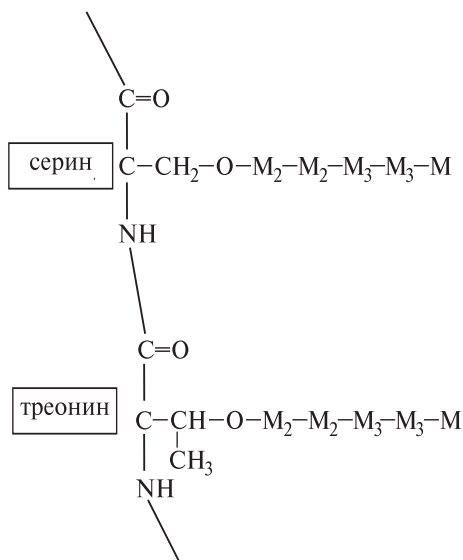


Рис. 2. Структура О-связанных олигосахаридных цепей гликопротеинов клеточной стенки дрожжей.

Здесь и на других рисунках М, М₂, М₃ и т.д. означает маннозу и соответствующую гликозидную связь [51].

честве сайта расщепления для последующего присоединения GPI-якоря), полярного домена (пять—десять аминокислот) и гидрофобного домена (пятнадцать—двадцать аминокислот). У ряда белков наличие GPI-якоря было подтверждено экспериментально [46].

С помощью такого «якоря» белки могут закрепляться в цитоплазматической мембране. Показано, также, что остатки глюкозы, определяемые в составе гликопротеинов с данным типом гликозилирования закрепленных в клеточной стенке, а не в цитоплазматической мембране, не могут быть удалены с помощью *Endo H* (*Endo F*)-дегликозилирования, чувствительны к периодатному расщеплению и практически полностью удаляются в результате действия β -1,6-глюканазы [59, 98a].

Сочетание методов энзиматического гидролиза β -1,6-глюканазой и расщепления фосфоэфирных связей фтористоводородной кислотой показало, что данные белки в клеточной стенке присоединены к глюкану посредством фосфоэтаноламин — маннозного мостика [46, 52, 60].

По-видимому в первичной структуре белков клеточной стенки, несущих GPI-якорь, которые закреплены в мембране, и тех, которые ковалентно связаны с глюканом клеточной стенки, существуют различия [34, 96]. Однако этот вопрос исследован еще крайне мало.

В литературе принято деление белков по способу их экстракции на три группы:

1 — белки, экстрагируемые из клеточных стенок детергентами и тиоловыми реагентами при нагревании.

2 — белки, выделенные из КС после удаления SDS/ β -Met-фракции под действием глюканаз. Это так называемые «глюканазо-экстрагируемые» белки.

3 — белки, которые могут быть выделены из КС (после удаления SDS/ β -Met-фракции) при действии щелочи. Так называемые «щелочезэкстрагируемые» белки.

Такое деление, в свою очередь, отражает способ закрепления молекул белков в толще клеточной стенки и отчасти позволяет сгруппировать белки по характеру осуществляемых ими функций.

Белки, экстрагируемые детергентами и тиоловыми реагентами при нагревании. В первую группу входят белки, обладающие в основном ферментативной, а иногда и иной метаболической активностью и, по-видимому, не входят белки, выполняющие структурную функцию (возможно, за одним исключением на котором мы остановимся позднее). Способ их экстракции свидетельствует о том, что они закреплены либо нековалентно, либо посредством дисульфидных мостиков, образуемых между цистеинами соседних белковых молекул.

Кроме того, в этой группе возможно присутствуют так называемые «транзитные» белки, которые в зависимости от условий выращивания дрожжей либо могут быть инкорпорированы в клеточную стенку, либо после кратковременного пребывания в ней могут выходить в среду культивирования, образуя группу секретируемых белков. Существуют, однако, данные, свидетельствующие о том, что секреторные белки, первоначально движутся по общему секреторному пути, а на поздней стадии секреции делятся на два потока — периферийный и экспортный. В связи с этим секретируемые во внешнюю среду ферменты, возможно, не попадают в клеточную стенку, а проходят через нее особым, до конца не ясным путем [61].

Расхождения в оценке количества белков, входящих в данную фракцию, весьма велик [51]. На первых этапах исследования белков, входящих в состав КС дрожжей, большой прогресс был достигнут в области изучения именно ферментов. Однако и в этом направлении работы шли весьма медленно. Основной трудностью, с которой сталкивались исследователи при изучении структуры ферментов, ассоциированных с клеточной стенкой и способа их встраивания, была проблема их экстракции без потери активности, и наличие адекватных доказательств истинной принадлежности выделяемых ферментов клеточной стенке. Так, например, фермент инвертазы, ранее упоминавшийся в качестве типичного представителя ферментов КС [48, 54, 82], в последнее время по-видимому исключен из этого перечня [24, 25].

Результаты одних исследований говорят о весьма ограниченном количестве белков этой группы, принадлежность которых клеточной стенке можно считать строго доказанной [66]. Согласно противоположной точке зрения к таким белкам может быть отнесен большой набор ферментов и белков с иной метаболической активностью, в число которых входят такие типично внутриклеточные ферменты как, например, енолаза [24, 25, 30].

Исследователи объясняют факт наличия такого рода ферментов в КС дрожжей изменением (или дополнением) функций этих ферментов в том случае, если они локализируются на поверхности клетки. Так, например, предполагается, что алкогольдегидрогеназа на поверхности клеток дрожжей *C. albicans* служит в качестве рецептора фибронектина животных клеток хозяина [73]. Есть и еще примеры подобного рода [24, 42].

Поскольку клеточная стенка является компартментом, в котором начинается расщепление питательных субстратов, кажется вполне оправданным наличие в ней такого рода ферментов как кислая фосфатаза (табл. 2). Высказывалось предположение, что конститутивная форма кислой фосфатазы является структурным элементом КС и может участвовать в ее построении у дочерней клетки дрожжей [6].

Таблица 2
Гидролитические ферменты клеточной стенки дрожжей*

Фермент	Комментарии
Экзо- β -(1,3)-глюканазы	конститутивные и индуцибельные ферменты, присутствуют в КС дрожжей различной таксономической принадлежности (в частности, <i>Candida</i> и <i>Saccharomyces</i>), участвуют в морфогенезе КС.
Экзоглюканаза (споруляционная)	локализована в КС аскоспор.
β -1,3-глюкан трансфераза	конститутивный фермент (Bgl2p) присутствует в КС дрожжей различной таксономической принадлежности (в частности, <i>Candida</i> и <i>Saccharomyces</i>), участвует в сборке КС.
Хитиназы	участвуют в морфогенезе КС.
Фосфолипазы	у дрожжей рода <i>Candida</i> могут являться фактором вирулентности.
Кислая фосфатаза	возможно является структурным элементом КС.
Гемолитический фактор	обнаружен у дрожжей рода <i>Candida</i> .
Металлопептидаза	—
Трегалаза	—

* В таблице суммированы данные обзоров [24, 25].

Примечательной особенностью клеточной стенки дрожжей является наличие в ее составе большого количества ферментов, известных в литературе как «гидролазы субстратов клеточной стенки» (табл. 2). Известно, что многие из этих ферментов присутствуют в КС в большом количестве и практически на всех стадиях жизненного цикла. Несмотря на то, что о наличии в КС целого ряда ферментов, гидролизующих глюкан, известно достаточно давно [38] до сих пор нет отчетливого представления о том, как эти ферменты встроены в клеточную стенку и как происходит регуляция их активности.

Вторую и третью группы составляют белки, ковалентно связанные с элементами полисахаридного каркаса КС дрожжей. В последнее время появилась тенденция именно эти белки рассматривать в качестве истинных белков клеточной стенки. Данные группы белков сформированы двумя отличающимися друг от друга типами молекул. Функции их по-видимому различны.

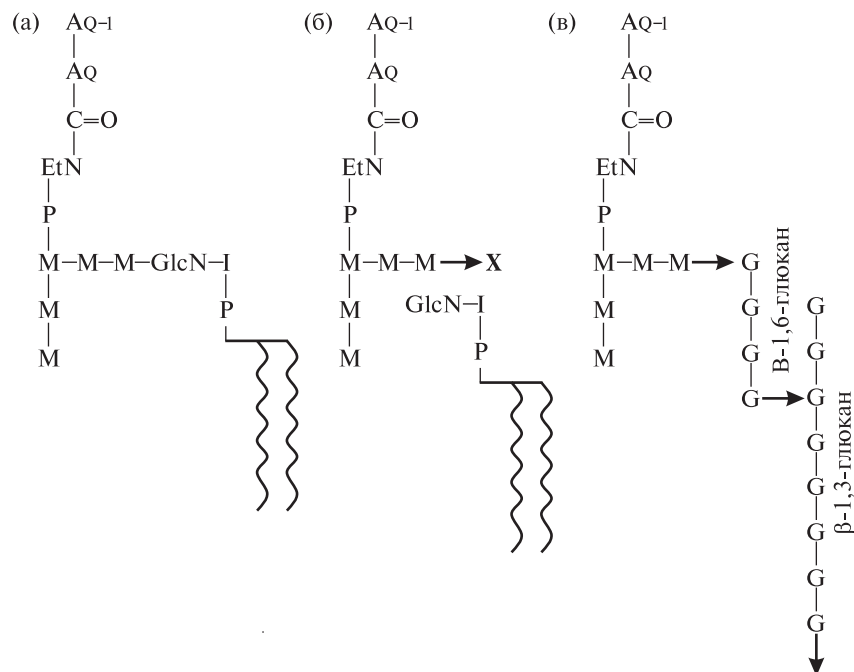


Рис. 5. Схема предполагаемого встраивания GPI-белков в клеточную стенку дрожжей [59].

(a) GPI-якорь: EtN – этаноламин, P – фосфат, M – маноза, GlcN – глюкозамин, I – инозитол, Aq – аминокислота. К инозитолу через фосфат присоединен фосфолипид.

(б) Расщепление гликана GPI-якоря. Стрелкой отмечен редуцирующий конец, «X» – гипотетический комплекс с белком или другим «активатором».

(в) Формирование гликозидной связи с глюканом. G – глюкоза.

Белки, экстрагируемые глюканазами. Эти белки характеризуются высоким содержанием серин- и треонин-богатых областей и гликозил-фосфоинозитольным якорем на С-конце полипептидной цепи. Их присоединение к глюкану клеточной стенки осуществляется за счет связывания маннозного остатка GPI-якоря с β -1,6-глюканом (рис. 5); данная связь была продемонстрирована как химически так и генетически [46, 76, 86, 101]. Другие связи, по-видимому, не участвуют в закреплении этих белков в клеточной стенке. Удаление у этих белков С-концевого фрагмента, необходимого для присоединения GPI-якоря, приводит к тому, что данные белки начинают секретироваться в среду [101].

GPI-белки могут быть экстрагированы из КС в результате обработки β -1,3- и β -1,6-глюканазами, однако именно β -1,6-глюкан играет ключевую роль в закреплении данных белков в клеточной стенке [59]. Функции большинства «глюканазоэкстрагируемых» белков, несущих GPI-якорь, описаны весьма неполно. Ниже приведен перечень белков данной группы [13, 39, 44, 46]: Ag α 1p (α -агглютинин), Swp1p (продукт гена YKL096w), Swp2p (возможно стрессовый белок небольшого размера), Flo1p (участвует во флокуляции), Sed1p, Tip1p (белок, индуцируемый холодовым шоком), Tif1p (возможно стресс-белок, реагирует на анаэробноз), Flo5p (флокулин), Flo11p (флокулин), семейство агглютинин-подобных белков.

К одним из первых работ, свидетельствующих о возможной роли белков, (в настоящее время относящихся к группе «глюканазоэкстрагируемых»), относятся исследования так называемой флокуляционной агрегации клеток дрожжей [14]. Необратимую утрату способности флокулировать под действием протеолитических ферментов описали Эдди и Рудин [29], а также Лионс и Хоу [62, 63]. Эти авторы предположили, что именно белок, располагающийся на поверхности клеточной стенки дрожжей, играет, по-видимому, важную роль в процессе флокуляции.

В настоящий момент наиболее изученным объектом в этой группе может служить α -агглютинин. Данный белок секретируется на поверхность клеток под воздействием феромонов дрожжей противоположного типа спаривания. Белок состоит из единственной субъединицы, кодируемой геном AG α 1 [56, 57, 58], обогащен серином и треонином и, по-видимому, интенсивно O-маннозилирован. Удаление C-концевого фрагмента влечет за собой секрецию α -фактора в среду культивирования [100].

Не во всех случаях можно с уверенностью утверждать, что тот или иной GPI-белок локализован именно в клеточной стенке, а не в цитоплазматической мембране, однако для приведенных выше первых семи белков присоединение к β -1,6-глюкану биохимически доказано [46].

Было отмечено, что GPI-белки, закрепленные в КС, в отличие от GPI-белков, закрепленных в цитоплазматической мембране таких, например, как Gas1p, предположительно катализирующий трансглюкозилазную реакцию [75] и аспартильная протеиназа Yap3p [10], несут в C-концевой области молекулы дополнительные сигналы [34, 96]. В то же время для белка Kre1p, вовлеченного, по-видимому, в сборку β -1,6-глюкана в КС, предполагается наличие двух форм — мембраносвязанной и связанной с клеточной стенкой [77].

Анализ генома дрожжей *S. cerevisiae* позволяет предполагать, что список GPI-заякоренных белков неполон. Однако, широкому перечню

этих белков несколько противоречат данные, полученные в самое последнее время с использованием производного биотина, связывающегося с белками, расположенными на поверхности клетки [66]. Авторы этих исследований насчитывают не более 5 глюканазоэкстрагируемых белков, выделяемых из клеточной стенки дрожжей (после экстракции детергентом и β -меркаптоэтанолом при нагревании) в результате действия глюканазы. Одним из объяснений данного противоречия может служить тот факт, что многие GPI-заякоренные белки не всегда присутствуют на поверхности клеток, а, по-видимому, секретируются и встраиваются в КС в строго определенные моменты жизненного цикла [76, 20] или же в конкретных условиях выращивания культуры. Так, например, транскрипция TIR1 индуцируется повышением или понижением температуры и условиями анаэробнобиоза [28, 53, 69], транскрипция TIR1 увеличивается в условиях анаэробнобиоза [28, 69]. Существуют различия в экспрессии GPI-заякоренных белков в культурах, растущих на разных средах и в различных условиях выращивания [19, 27, 49, 103]. Данное утверждение с полным основанием может относиться к таким белкам, как агглютинины и флоккулины. Сказанное еще раз подтверждает необычайно высокую зависимость состава и строения клеточной стенки от факторов внешней среды, условий выращивания и стадии роста дрожжей.

Белки, экстрагируемые щелочью. Обнаружение этого типа белков явилось существенным прогрессом, достигнутым в последние годы на пути исследований структуры КС дрожжей. Данные белки характеризуются наличием внутренних повторов, высокой степенью О-маниозилирования (39–73 потенциальных сайта большинство из которых, по-видимому, гликозилировано) и отсутствием GPI-якоря на С-конце [66, 67]. Наличие повторов в молекулах этих белков отразилось в их названии: PIR–белки (protein with internal repeats) [66].

Следует отметить, что гены, кодирующие данные белки, были известны ранее [94]. Количество повторов в белках варьирует от двух (у белка Csw5) до десяти (у белка Csw7). Некоторые из этих белков содержат один потенциальный сайт для N-гликозилирования [66]. Они могут быть экстрагированы из клеточной стенки дрожжей в результате воздействия 30мМ NaOH в течение ночи после того, как будет удалена основная масса SDS/ β Me-экстрагируемых белков. Все эти белки характеризуются наличием специфической N-концевой последовательности с Kex2p сайтом, которая отщепляется в результате процессинга (рис. 6) [66]. Однако, в отсутствие данного процессинга, эти белки, по-видимому, тоже встраиваются в клеточную стенку [66].

Ccw 8 **MQYKKPLVVS** **ALAATSLAA**. ...YAPKDPW STLTPSATYK GGITDYSSSF
 Ccw 6 **MQYKKSLVAS** **ALVATSLAA**. ...YAPKDPW STLTPSATYK GGITDYSSSF
 Ccw 11 **MQFKNVALAA** **SVAALSATAS** **A**EGYTPGEPW STLTPGSGIS CGAAEYTTTF
 Ccw 7 **MQYKKTLVAS** **ALAATTLAA**. ...YAPSEPW STLTPATYIS GGVTDYASTF

Ccw 8 GIAIEAVATS ASS.....VA SSKAKRAA.. SQIGDGQVQA ATTTAAVSKK
 Ccw 6 GIAVEPIATTA SSKAKRAAAI SQIGDGQIQA TT.....K
 Ccw 11 GIAVQAI...T SSKAKRDV.I SQIGDGQVQA
 Ccw 7 GIAVQPISTT SSASSAATTA SSKAKRAA.. SQIGDGQVQA ATTTASVSTK

Ccw 8 STAAAVSQIT DGQVQA.AKS TAAAVSQITD GQVQA..... .AKSTAAAVS
 Ccw 6 TTAAAVSQIG DGQIQATTKT KAAAVSQIGD GQIQATTKTT SAKTTAAAVS
 Ccw 11 .TSAATAQAT DSAQAATTTA TPTSSEKISS S.....
 Ccw 7 STAAAVSQIG DGQIQATTKT TAAAVSR..D GQIQATTKTT SAKTTAAAVS

Ccw 8 QITDGQVQA. A.....KSTA AAVYQITDGQ VSSCQVYCCR CLSD.SDGQV
 Ccw 6 QIGDGQIQAT T.....KTKA AAVSQIGDGQ IQATTKTTAA AVSQIGDGQI
 Ccw 11
 Ccw 7 QISDGQIQAT TTTLAPKSTA AAVSQIGDGQ VQATTKTTAA AVSQIGDGQV

Ccw 8 QATTSTKAAA .SQITDGQIQ ASKTTSGA.. SQVSDGQVQA T.....
 Ccw 6 QATTKTTAAA VSQIGDGQIQ ATTNTTVAPV SQITDGQIQ TLTLYATIIP
 Ccw 11 ASKTSTNATS SSC.....
 Ccw 7 QATTKTTAAA VSQIGDGQVQ ATTKTTAAAV SQIGDGQVQA TTKTTAAAVS

Ccw 8AEVKDA NDPVDVVSNC NNSTLSMSLS KGILTDKGR IGSIVANRQF
 Ccw 6 SPAPAPITNG TDPVTAETCK SSGTLEMNFP GGILTDGKGR IGSIVANRQF
 Ccw 11A TPSLKDSSCK NSGTLELTLK DGVLTDAKGR IGSIVANRQF
 Ccw 7 QITDGQVQAT TKTTQAASQV SDGQVQATTA WLLVTMMSST NVCPVLSTTC

Ccw 8 QFDGPPPQAG AIYAAGWSIT PEGNLALGDQ DTFYQCLSGD FYNLYDKHIG
 Ccw 6 QFDGPPPQAG AIYAAGWSIT PEGNLAIGDQ DTFYQCLSGD FYNLYDEHIG
 Ccw 11 QFDGPPPQAG AIYAAGWSIT EDGYLALGDS DVFYQCLSGD FYNLYDQNV
 Ccw 7 ...TTNTLVV NVLQSTWKLS I.....

Ccw 8 SQCHEVYLQA IDLIDC
 Ccw 6 TQCNVHLQA IDLLNC
 Ccw 11 EQCSAHLA VSLVDC
 Ccw 7

Рис. 6. Аминокислотные последовательности некоторых PIR-белков [66].

Сигнальные последовательности выделены жирным шрифтом, последовательности, расщепляемые протеиназой Kex2 подчеркнуты.

Условия, при которых PIR-белки экстрагируются из КС дрожжей, являются условиями β -элиминирования в щелочных условиях коротких О-связанных маннозных цепей в молекулах маннопротеинов. Это может означать, что связь PIR-белков с полисахаридным каркасом клеточной стенки осуществляется благодаря маннозным цепям данного типа. Роль О-связанных маннозных цепей для закрепления PIR-белков в матриксе КС частично подтверждается в экспериментах с мутантными штаммами дрожжей, лишенных способности полноценного О-маннозилирования [66]. Предполагается [46], что в закреплении этих белков принимают участие те О-связанные маннозные цепи белка, которые содержат фосфорилированный остаток маннозы (М2). Имеются, однако, факты, свидетельствующие о том, что в некоторых случаях белки данного семейства могут быть экстрагированы из клеточной стенки после воздействия дитиотреитола, а не щелочи [18], или же секретироваться в среду [66], что еще раз подтверждает отсутствие ясных представлений о способе закрепления этих белков в КС дрожжей.

Недавно получены свидетельства о существовании этого типа белков у дрожжей *C. albicans* [43].

III. СТРОЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ И РОЛЬ БЕЛКОВ В ФОРМИРОВАНИИ И ПОДДЕРЖАНИИ ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Несмотря на то, что строение клеточной стенки дрожжей является предметом многочисленных исследований [24, 25, 31, 68, 80, 82, 90], до сих пор структура этой органеллы не выяснена до конца. Схемы строения КС дрожжей до последнего времени носили формальный характер и демонстрировали лишь возможную компоновку маннопротеинового и глюканового слоев без учета разнообразных функций, выполняемых этой органеллой. Подобную ситуацию отчасти можно объяснить недостаточным уровнем наших знаний о структурной роли белков в стенке дрожжей. Совершенно очевидно, что без их участия невозможно представить устройство и функционирование такой динамичной структуры, какой является клеточная стенка.

Первыми свидетельствами важной роли белков в качестве структурного элемента, явились данные о лизисе КС дрожжей протеолитическими ферментами [41, 71]. Именно этот факт позволил японским исследователям еще в 1977 году предложить свою модификацию известной схемы строения КС дрожжей, в которой белкам отводилась роль связующего звена между полисахаридными блоками. Однако в

течение ряда лет существовали лишь косвенные доказательства того, что белок играет важную структурную роль.

В последние годы достигнуты большие успехи в исследованиях молекулярной организации клеточной стенки дрожжей. В значительной степени это связано с прогрессом в области изучения роли белков в формировании ее молекулярного ансамбля, причем, следует отметить, что эта роль может реализовываться в двух, отличающихся друг от друга, аспектах:

1. Белок может скреплять отдельные молекулы полисахаридов, с которыми он связан ковалентными связями, или даже крупные полисахаридные блоки в единую структуру клеточной стенки. Он может также служить местом закрепления других белков КС, соединенных с ним дисульфидными или иными типами связей.

2. Роль белка целиком обуславливается его ферментативной активностью. Известно, что как единый молекулярный ансамбль, клеточная стенка формируется за пределами цитоплазматической мембраны. В этой связи ферменты, осуществляющие окончательное включение синтезированных заново элементов в клеточную стенку, играют важную структурную роль. Не исключено, также, что один и тот же белок может выступать в двух перечисленных выше качествах — фермента и «структурного модуля» клеточной стенки.

Критериями, позволяющими оценивать вклад белка как структурного элемента КС дрожжей, являются, на наш взгляд, количество данного белка в клеточной стенке и степень его «конститутивности». Очевидно, что даже незначительное количество фермента при достаточной его активности на требуемой стадии роста и развития позволяет клетке не испытывать дефицита его действия. В то же время важный в структурном отношении белок скорее всего должен быть мажорным белком, который всегда (или практически всегда) присутствует в составе КС дрожжей.

Согласно современным представлениям клеточная стенка дрожжей имеет слоистое строение. В большинстве случаев число слоев равно трем, однако, в зависимости от стадии роста, условий выращивания и способа фиксации, вида и даже штамма дрожжей оно может колебаться в широких пределах [1, 92]. Подобная морфологическая гетерогенность в первую очередь объясняется химической неоднородностью стенки дрожжей.

Как правило на электронных микрофотографиях клеток в КС отчетливо видно наличие двух окаймляющих электронноплотных слоев (наружный из которых представлен маннопротеинами), а также третьего менее плотного промежуточного слоя, который, в основном,

содержит глюкан (рис. 1). Внутренний электронноплотный слой иногда отождествляют с периплазмой, к которой непосредственно примыкает плазмалемма. В некоторых случаях поверхность дрожжевых клеток бывает покрыта слоем фибриллярного электронноплотного материала, по-видимому, маннопротеиновой природы [16, 74, 100]. Описанное строение клеточной стенки клетки дрожжей имеет на всей своей поверхности за исключением мест образования и отделения дочерних клеток — почек.

В настоящее время опубликовано два варианта схемы строения КС для дрожжей *S. cerevisiae* [82, 83] и *C. albicans* [24]. Несмотря на внешние отличия в целом схемы не противоречат, а дополняют друг друга, позволяя представить как общий план строения клеточной стенки (более четко выявлен на схеме для дрожжей *S. cerevisiae*, рис. 7) так и детали взаимодействия отдельных участников ансамбля (схема клеточной стенки *C. albicans*, рис. 8).

Из множества белков, присутствующих в клеточной стенке дрожжей, далеко не все могут претендовать на роль структурных элементов. С использованием протеиназ с различной субстратной специфичностью было показано, что большинство детергент-экстрагируемых белков за исключением, возможно, глюкантрансферазы Bgl2p, не играет существенной структурной роли. Все белки, обнаруживаемые в данной группе, закреплены в клеточной стенке таким образом, что

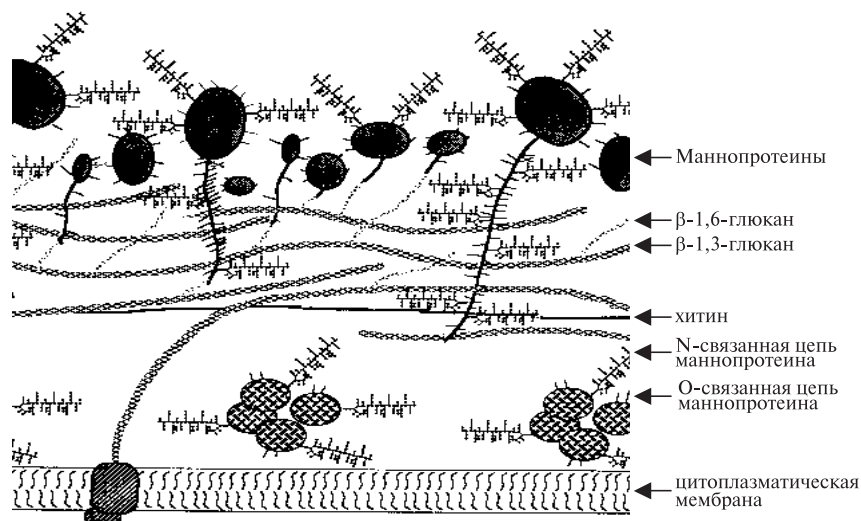
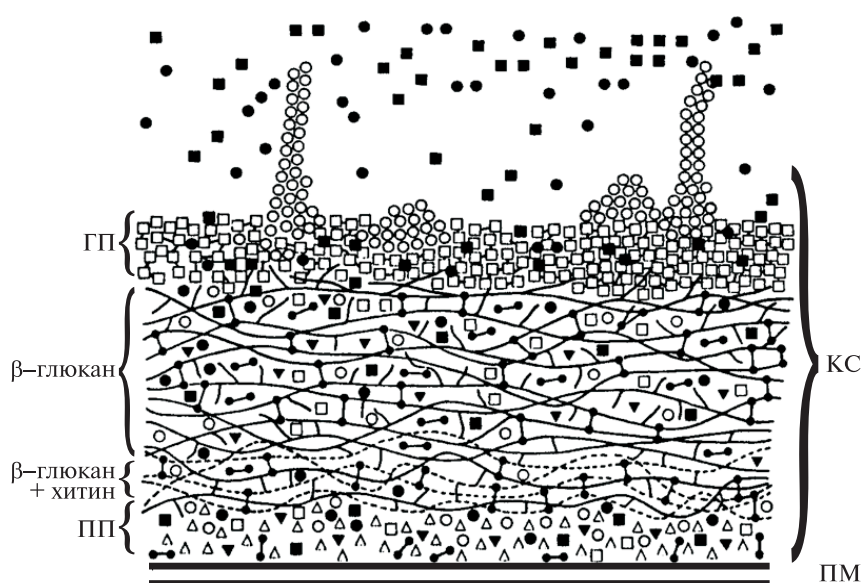


Рис. 7. Схема строения клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* [82, 83].

Bgl2p — небольшой (31,5–34 кДа), консервативный, мажорный белок, присутствие которого в КС показано для многих дрожжей, причем белок, по-видимому, присутствует в большом количестве на



○, □ — белки и гликопротеины внешних слоев клеточной стенки;
●, ■ — секретируемые белки и гликопротеины;
▲ — ферменты периплазматического пространства;
▼ — белки, функционально ассоциированные с глюканом (хитином);
●—● — белки, ковалентно связанные с глюканом (хитином);
— — β-глюкан;
..... — хитин;

ГП — гликопротеиновый слой;
β-глюкан — глюкановый слой;
β-глюкан + хитин — слой хитина, ковалентно связанного с β-глюканом;
ПП — периплазматическое пространство;
ПМ — плазматическая мембрана;
КС — клеточная стенка.

всех стадиях роста культуры. Молекула Bgl2p имеет один N-связанный олигосахарид небольшого размера (приблизительно 2,5 кДа). Данный белок сначала считали экзоглюканазой [50], затем эндоглюканазой [65]. Позднее *in vitro* было показано, что при низких концентрациях глюкозо-содержащих олигосахаридов может наблюдаться глюканазная активность, а при более высоких преобладает глюкозилтрансферазная активность. Возможно данный фермент переносит β -1,3-глюкановые олигосахариды от донора (β -1,3-глюкана) к акцептору (β -1,3-глюкану), формируя линейный полимер, обогащенный β -1,6-связями. У дрожжей рода *Candida* у Bgl2p была обнаружена активность «ветвящего» фермента, ответственного за трансформацию исходно линейного β -1,3-глюкана в разветвленный β -1,3- β -1,6-глюкан [23, 25, 32a, 35, 102].

Было показано, что сверхэкспрессия белка Bgl2p в клетках дрожжей приводит к снижению скорости их роста [65]. Выполнен ряд работ [4, 50, 81], в которых было проведено нарушение гена, кодирующего белок Bgl2p. Значительных фенотипических проявлений в этом случае не было обнаружено и функция Bgl2p оставалась невыясненной, однако интерес к исследованию данного белка не снижается.

Следует отметить, что отсутствие важных для жизнеспособности клеток фенотипических проявлений, при нарушении генов, кодирующих белки, которые непосредственно участвуют в процессах биосинтеза и сборки КС дрожжей, является скорее правилом, чем исключением. Клетка успешно компенсирует делеции подобного рода, причем в большинстве случаев одним из первых компенсационных ответов является увеличение активности хитин-синтетаз и повышение количества хитина, синтезируемого ими. Не исключено, что подобный ответ указывает на важное значение хитина для клеток дрожжей на ранних этапах эволюции этих микроорганизмов (как это можно наблюдать у большинства современных мицелиальных грибов). С течением времени структурная роль хитина была утрачена дрожжами, однако клетки «вспоминают» о хитине, как о важнейшем структурном полимере и, возможно, используют его в качестве репарирующего компонента при нарушениях КС [5, 46, 97].

Значительными фенотипическими проявлениями характеризуются, как правило, мутации или делеции генов, кодирующих белки с регуляторной функцией, под контролем которых находится процесс биосинтеза и сборки клеточной стенки в целом. Описанная ситуация сильно усложняет процесс изучения структуры КС дрожжей и той роли, которую играют составляющие ее полимеры [71a].

В последнее время появилась версия, из которой следует, что роль Bgl2p в некоторой степени аналогична роли белка Gas1 [75]. Gas1

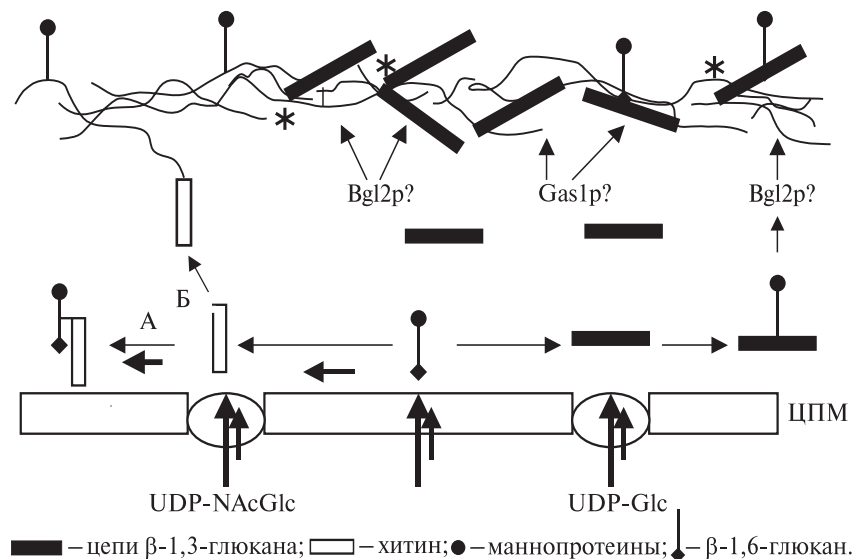


Рис. 9. Модель сборки маннопротеинов и глюканов в клеточной стенке дрожжей с участием белков Bgl2p и Gas1p [75].

Звездочкой (*) обозначены β -1,6-связи, формируемые Bgl2p (для Gas1p неизвестны). ЦПМ — цитоплазматическая мембрана.

является мембранным, GPI-заякоренным гликопротеином, который, очевидно, обладает трансгликозилазной активностью и ему, по-видимому, принадлежит значительная роль в сборке полисахаридного каркаса в единую сеть. Наиболее интересным аспектом функционирования Bgl2p, согласно этой версии (смотри схему на рис. 9) является его возможное участие в присоединении гликозилированных (возможно GPI-заякоренных белков) КС к β -1,3-глюкану, формирующему каркас клеточной стенки [75].

Данная схема является весьма гипотетичной и оставляет много вопросов. В частности, она находится в некотором противоречии с результатами, свидетельствующими о том, что делеция гена, кодирующего белок Bgl2p, компенсирует одновременную делецию генов двух глюканаз КС, относящихся к группе ДТТ-экстрагируемых ферментов [18].

Данное противоречие, а также отмеченные ранее значительное количество Bgl2p в клеточной стенке, высокий консерватизм его молекулы и, по-видимому, конститутивный характер синтеза заставляют рассматривать его в качестве еще одного претендента на роль важного в структурном отношении белка, значение которого до настоящего времени не выяснено.

Описанная недавно группа PIR-белков по своей молекулярной характеристике выглядит наиболее привлекательно с точки зрения их возможной структурной роли в КС дрожжей [47, 67]. Последовательная делеция генов, кодирующих эти белки, показала, что полное исключение белков этого семейства проявляется в значительном ослаблении структуры клеточной стенки, увеличении размеров клетки, нерегулярном изменении ее формы и увеличении чувствительности к ингибиторам роста — калькофлюору и конго-красному. Делетирование генов отдельных белков этой группы не оказывало какого-либо заметного влияния на прочность КС. Механизм встраивания PIR-белков в клеточную стенку и точное место локализации в настоящий момент не ясны. Возможно данные белки локализованы в толще глюканового слоя КС [67, 44]. Можно предположить, что данные белки, обогащенные повторами аналогично молекулам коллагена высших эукариот, составляют семейство структурных белков. Не исключено также, что они выполняют роль «посадочных площадок» для ферментов, в частности тех из них, которые могут включать путем реакции трансгликозилирования вновь синтезированные молекулы полисахаридов в каркас клеточной стенки (например Bgl2p), однако комплексное исследование роли PIR-белков не проводилось.

Несколько особняком, в плане изучаемого вопроса стоит группа глюканазоэкстрагируемых белков клеточной стенки. Результатом делеции генов некоторых из них явилось незначительное увеличение чувствительности к конго-красному, калькофлюору и литическому ферменту — зимолиазе и уменьшение толщины внешнего электрон-плотного слоя клеточной стенки [87, 95].

Необычный белок — Sed1p [86], который содержит сигнал для присоединения GPI-якоря, шесть цистеинов и семь сайтов для N-гликозилирования, обнаружен недавно в клеточной стенке дрожжей. Отсутствие данного белка приводит к повышению чувствительности клеток к зимолиазе на поздних стадиях роста культуры. На основании данного факта сделано предположение о принципиально важном значении данного белка в качестве структурного элемента дрожжей на поздних стадиях роста культуры.

Клеточная стенка является весьма мобильной структурой, снабженной большим количеством обходных путей, позволяющих компенсировать как незначительные, так и весьма существенные нарушения в биосинтезе и встраивании ее компонентов. Тот факт, что одним из компенсаторных ответов КС на нарушение биосинтеза β -1,3-глюкана является увеличение количества GPI-белков, устойчивых к действию β -1,3-глюканазы (то есть, по-видимому, связанных с хитином непосредственно через β -1,6-глюкан), может являться

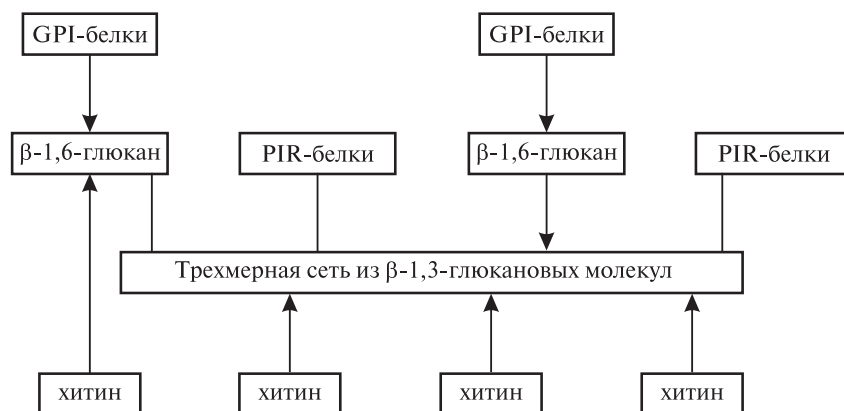


Рис. 10. Молекулярная архитектура КС дрожжей *S. cerevisiae* и *C. albicans* [44]. Стрелки отмечают ориентацию полисахаридов (от нередуцирующего конца молекул к редуцирующему). Зрелые GPI-белки, встроенные в КС, теряют свою липидную часть, и поэтому не являются прикрепленными к плазматической мембране.

свидетельством их особой важности как элементов стрессовых ситуаций [44, 59]. Не исключено также, что этот аспект их функций перекликается с функцией самого хитина, который, как мы упоминали ранее, можно рассматривать как основной репарирующий компонент клеточной стенки. В целом, по-видимому, данные белки несут некоторую структурную нагрузку в КС дрожжей, однако это достаточно разнородная группа и, возможно, следует говорить о структурной роли отдельных белков, входящих в данную группу, а не о всей группе в целом [46, 68, 90, 103]. Недавно получены свидетельства о том, что GPI-белки могут быть присоединены к глюкану клеточной стенки щелочелabile связями, характерными для PIR-белков [45]. В целом данный вопрос изучен весьма слабо и необходимы дальнейшие исследования, которые прояснят роль глюканазоэкстрагируемых белков в формировании молекулярного ансамбля КС дрожжей.

Недавно сделана еще одна попытка в наиболее общем виде представить структуру КС дрожжей и способ встраивания основных известных групп белков (рис. 10) [44]. Появление такой схемы символизирует возрастающий интерес исследователей к изучению роли белков КС в формировании и поддержании ее молекулярной структуры и представляется нам весьма важным (хотя и безусловно проме-

жуточным) шагом на пути развития представлений о строении клеточной стенки дрожжей.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активные исследования роли белков в формировании молекулярного ансамбля клеточной стенки дрожжей начаты сравнительно недавно и достигли в настоящее время значительных результатов. За короткий период было выявлено большое количество новых белков, локализованных в КС дрожжей. Получены свидетельства того, что они играют важную структурную роль в данной органелле. Произошла настоящая революция в представлениях о белковом компоненте клеточной стенки — от пептидоманнана до маннопротеинов, которые в настоящее время принято делить на три большие группы: белки, экстрагируемые детергентами, щелочекстрагируемые, и белки, экстрагируемые глюконазами. Появление новой информации о структуре и функциях белков КС сопровождалось существенным углублением знаний о строении самой клеточной стенки. Предложены новые модели строения КС дрожжей, более полно соответствующие разнообразию функций, выполняемых этой органеллой и каждого входящего в нее компонента. Идет активное накопление экспериментальных фактов, однако, несмотря на достигнутый прогресс, большая часть вопросов, касающихся структуры, функций, а также локализации белков КС дрожжей еще весьма далека от своего разрешения.

Пока еще отсутствует стройная концепция того, как устроена и как функционирует клеточная стенка, схемы строения КС дрожжей носят формальный характер и описывают лишь возможную компоновку маннопротеинового и глюканового слоев без учета разнообразных функций, выполняемых этой органеллой. Дальнейший прогресс в этой области, по всей вероятности, будет связан в первую очередь с развитием исследований строения и функции белков клеточной стенки дрожжей.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 0015—97851 и 00—04—48356.

VI. ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюзова В.И. // Ультраструктурная организация дрожжевой клетки. М. Изд. Наука. 1993. 224 стр.
2. Вагабов В.М. // Биосинтез углеводных компонентов клеточной стенки дрожжей. 1988. Пушино ОНТИ НЦБИ АН СССР. 198 С.
3. Калебина Т.С., Нурминская М.В., Чжан С., Чертов О.Ю., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Кулаев И.С. // Биоорг. Химия. 1994. Т. 20. С. 627—634.
4. Калебина Т.С., Лауринавичюте Д.К., Шевелев А.Б., Фоминов Г.В., Левитин Е.И., Алексеева О.А., Чжан С., Панькова Н.В., Ксензенко В.Н., Степанов В.М., Кулаев И.С. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1668—1674.
5. Лауринавичюте Д.К., Бовин Н.В., Насонов В.В., Моренков О.С., Калебина Т.С., Кулаев И.С. // Докл. Акад. Наук. 2000. Т. 372. С. 407—409.
6. Шнырева, Егоров С.Н. // Микробиология. 1990. Т. 59. С. 948—955.
7. Aguado C., Ruiz-Herrera J., Sentandreu R., Mormeneo S. // Res. Microbiol. 1998. Vol. 149. P. 327—338.
8. Alloush H.M., Lopez-Ribot J.L., Masten B.J., Chaffin W.L. // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 321—330.
9. Angiolella L., Facchin M., Stringaro A., Maras B., Simonetti N., Cassone A. J. // Infect. Dis. 1996. Vol. 173. P. 684—690.
10. Ash J., Dominguez M., Bergeron J.J.M., Thomas D.Y., Bourbonnais Y. // J. Biochem. 1995. Vol. 270. P. 20847—20854.
11. Ballou C.E. // Adv. Enzymol. 1974. Vol. 40. P. 233—270.
12. Ballou C.E. // Meth. Enzymol. 1990. Vol. 185. P. 440—470.
13. Bidard F., Blondin B., Dequin S., Vezinhet F., Barre P. // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 196—201.
14. Bony M., Barre P., Blondin B. // Yeast. 1998. Vol. 14. P. 25—35.
15. Brawner D.L., Cutler J. E. // Infect. Immun. 1984. Vol. 43. P. 966—972.
16. Cabib E. // Ann. Rev. Microbiol. 1975. Vol. 29. P. 191—205.
17. Calderone R.A., Braun P.C. // Microbiol. Rev. 1991. Vol. 55. P. 1—20.
18. Cappellaro C., V. Mrsa, Tanner W. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 5030—5037.
19. Caro L.H.P., Tettelin H., Vossen J.H., Ram A.F.J., Van Den Ende H., Klis F.M. // Yeast. 1997. Vol. 13. P. 1477—1489.
20. Caro L.H.P., Smits G.J., Van Egmond P., Chapman J.W., Klis F.M. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol. 161. P. 345—349.
21. Casanova M., Chaffin W.L. // Infect. Immun. 1991. Vol. 59. P. 808—813.
22. Casanova M., Lopez-Ribot J.L., Martinez J.P., Sentandreu R. // Infect. Immun. 1992. Vol. 60. P. 4898—4906.
23. Chaffin W.J., Stocco D. // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 1438—1444.
24. Chaffin W.J., Lopez-Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D., Martinez J.P. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. P. 130—180.
25. Cid V.J., Duran A., del Rey F., Snyder M.P., Nombela C., Sanchez M. // Microbiol. Reviews. 1995. Vol. 59. P. 45—386.
26. Conzelmann A., Reizman H., Desponds C., Bron. C. // EMBO J. 1988. Vol. 7. P. 2233—2240.
27. DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. // Science. 1997. Vol. 278. P. 680—686.
28. Donzeau M., Bourdineaud J.P., Lauquin G.J.M. // Mol. Microbiol. 1996. Vol. 20. P. 449—459.
29. Eddy A.A., Rudin A.D. // J. Inst. Brew. 1958. Vol. 64. P. 19—21.
30. Edwards S.R., Braley R., Chaffin W.L. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 177. P. 211—216.
31. Farkas V. // The fungal cell wall. In: Fungal protoplasts / Eds. Peberdy J.F., Ferenczy L. N.-Y. Basel. 1985. Vol. 6. P. 3—29.

32. *Gin-Navarro I., Gil M.L., Casanova M., Martinez J.P., Gozalbo D.* // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179. P. 4992—4999.
- 32a. *Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capobianco J.O.* // Eur. J. Biochem. 1995. Vol. 227. P. 372—378.
33. *Grinna L.S., Tschopp J.F.* // Yeast. 1989. Vol. 5. P. 107—115.
34. *Hamada K., Fukuchi S., Arisawa M., Baba M., Kitada K.* // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 258. P. 53—59.
35. *Hartland R.P., Emerson G.W., Sullivan P.A.* // Proc. R. Soc. London. Ser. B. 1991. Vol. 246. P. 155—160.
36. *Hernando F.L., Estevez J.J., Cebrian M., Poulain D., Ponton J.* // J. Med. Vet. Micol. 1993. Vol. 31. P. 227—237.
37. *Herrero E., Sanz P., Sentandreu R.* // J. Gen. Microbiol. 1987. Vol. 133. P. 2895—2903.
38. *Hien N.H., Fleet G.H.* // J. Bacteriol. 1983. Vol. 156. P. 1204—1213.
39. *Hoyer L.L., Scherer S., Shatzman A.R., Livi G.P.* // Mol. Microbiol. 1995. Vol. 15. P. 39—54.
40. *Jentoft N.* // Trends Biochem. Sci. 1990. Vol. 15. P. 291—294.
41. *Kalebina T.S., Rudenskaya G.N., Sel'yakh I.O., Khodova O.M., Chestukhina G.G., Stepanov V.M., Kulaev I.S.* // Appl. Microbiol. 1988. Vol. 28. P. 531—536.
42. *Kalo A., Segal E., Sahar E., Dayan D.* // J. Infect. Dis. 1988. Vol. 157. P. 1253—1256.
43. *Kandasamy R., VEDIYAPPAN G., Chaffin W.L.* // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 186. P. 239—243.
44. *Kapteyn J.C., Hoyer L.L., Hecht J.E., Muller W.H., Andel A., Verkleij A.J., Makarow M., Van Den Ende H., Klis F.M.* // Mol. Microbiol. 2000. Vol. 35. P. 601—611.
45. *Kapteyn J.C., Ter Riet B., Vink E., Blad S., De Nobel H., Van Den Ende H., Klis F.M.* // Mol. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 469—480.
46. *Kapteyn J.C., Van Den Ende H., Klis F.M.* // Biochem. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1426. P. 373—383.
47. *Kapteyn J.C., Van Egmond P., Sievi E., Van Den Ende H., Makarow M., Klis F.M.* // Mol. Microbiol. 1999. Vol. 31. P. 1835—1844.
48. *Kessler G., Nickerson W.J.* // J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. P. 2281—2285.
49. *Kitagaki H., Shimoi H., Itoh K.* // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 249. P. 343—349.
50. *Klebl F., Tanner W.* // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 6259—6264.
51. *Klis F. M.* // Yeast. 1994. Vol. 10. P. 851—869.
52. *Kollar R., Reinhold B.B., Petrakova E., Yeh H.J.C., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J.C., Klis F.M., Cabib E.* // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 17762—17775.
53. *Kondo K., Inouye M.* // J. Biochem. 1991. Vol. 266. P. 17537—17544.
54. *Lampen J.O.* // Ant. Van Leeuwenhoek. 1968. Vol. 34. P. 1—18.
55. *Lehle L., Bause E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 799. P. 246—251.
56. *Lipke P.N., Wojchiechowicz D.* // Biochim. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 161. P. 46—51.
57. *Lipke P.N., Wojchiechowicz D., Kurjan J.* // Mol. Cell. Biol. 1989. Vol. 9. P. 3155—3165.
58. *Lipke P.N., Kurjan J.* // Microbiol. Rev. 1992. Vol. 56. P. 180—194.
59. *Lipke P., Ovalle R.* // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 3735—3740.
60. *Lo W.S., Dranginis A.M.* // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. P. 7144—7151.
61. *Lupashin V.V., Kononova S.V., Ratner E.N., Tsiomenko A.B., Kulaev I.S.* // Yeast. 1992. Vol. 8. P. 157—169.
62. *Lyons T.P., Hough J.S.* // J. Inst. Brew. 1970. Vol. 76. P. 564—571.
63. *Lyons T.P., Hough J.S.* // J. Inst. Brew. 1971. Vol. 77. P. 300—305.
64. *Mormeneo S., Marcilla A., Iranzo M., Sentandreu R.* // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 123. P. 131—136.

65. *Mrsa V., Klebl F., Tanner W.* // J. Bacteriol. 1993. Vol. 175. P. 2102–2106.
66. *Mrsa V., Seidl T., Gentzsch M., Tanner W.* // Yeast. 1997. Vol. 13. P. 1145–1154.
67. *Mrsa V., Tanner W.* // Yeast. 1999. Vol. 15. P. 813–820.
68. *Mrsa V., Ecker M., Strahl-Bolsinger S., Nimtz M., Lehle L., Tanner W.* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 3076–3086.
69. *Munoz-Dorado J., Kondo K., Inouye M., Sone H.* // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 560–568.
70. *Nakajima T., Ballou C.E.* // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 7685–7694.
71. *Obata T., Iwata M., Namba Y.* // Agr. Biol. Chem. 1977. Vol. 41. P. 2387–2394.
- 71a. *Packeiser A.N., Urakov V.N., Polyakova Y.A., Shimanova N.I., Shcherbukhin V.D., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D.* // Yeast. 1999. Vol. 15. P. 1485–1501.
72. *Pastor J., Valentin E., Herrero E., Sentandreu R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 802. P. 292–300.
73. *Pendark M.L., Klotz S.A.* // FEMS Microbiol. Lett. 1995. Vol. 129. P. 103–114.
74. *Phaff H.J.* // In: The Yeast physiology and biochemistry. N.-Y.–London, Acad. Press. 1971. Vol. 2. P. 135–210.
75. *Popolo L., M. Vai* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1426. P. 385–400.
76. *Ram A.F.J., Van Den Ende H., Klis F.M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol. 162. P. 249–255.
77. *Roemer T., Bussey H.* // Mol. Gen. Genet. 1995. Vol. 249. P. 209–216.
78. *Rosenfeld L., Ballou C.E.* // Carbohydr. Res. 1974. Vol. 32. P. 287–298.
79. *Rouwenhorst R.J., Hensing M., Verbakel J., Scheffers W.A., Van Dijken J.P.* // Appl. Env. Microbiol. 1990. Vol. 56. P. 3337–3345.
80. *Sanz P., Herrero E., Sentandreu R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 924. P. 193–203.
81. *Sarthy A.V., McGonigal T., Coen M., Frost D.J., Meulbroek J.A., Goldman R.C.* // Microbiology. 1997. V.143. P. 367–376.
82. *Schekman R., Novick P.* // The secretory process and yeast cell-surface assembly. In: Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. The molecular biology of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression / Eds. J. N. Strathern, Cold Spring Harbor Lab. N.-Y. 1982. P. 361–393.
83. *Schreuder M.P.* // In: Targeting of proteins to the cell wall of yeast and possible applications. 1994. P. 109.
84. *Sentandreu R., Northcote D.H.* // J. Biochem. 1968. V. 109. P. 419–432.
85. *Sentandreu R., Northcote D.H.* // Carbohydr. Res. 1969. Vol. 10. P. 584–585.
86. *Shimoi H., Iimura Y., Obata T.* // J. Biochem. 1995. Vol. 118. P. 302–311.
87. *Shimoi H., Kitagaki H., Ohmori H., Iimura Y., Ito K.* // J. Bacteriol. 1998., Vol. 180. P. 3381–3387.
88. *Sipos G., Puoti A., Conzelmann A.* // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 2789–2796.
89. *Sipos G., Puoti A., Conzelmann A.* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 19709–19715.
90. *Staab J.F., Sundstorm P.* // Yeast. 1998. Vol. 14. P. 681–686.
91. *Strahl-Bolsinger S., Gentzsch M., Tanner W.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. P. 297–307.
92. *Suomalainen H., Nurminen T., Oura E.* // Progress in Industrial Microbiol. 1973. Vol. 12. P. 109–127.
93. *Tanner W., Lehle L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 906. P. 81–99.
94. *Toh-e, A., Yasunaga S., Nirogi H., Tanaka K., Oguchi T., Matsui Y.* // Yeast 1993. Vol. 9. P. 481–494.
95. *Van Der Vaart M., Caro L.H.P., Chapman J.W., Klis F.M., Verrips C.T.* // J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. P. 3104–3110.
96. *Van Der Vaart M., Biesebeke R., Chapman J.W., Toschka H.Y., Klis F.M., Verrips C.T.* // Appl. Env. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 615–620.

97. *Valdivieso M.H., Ferrario L., Vai M., Duran A., Popolo L.* // J. Bacteriol. 2000. Vol. 182. P. 4752—4757.
98. *Valentin E., Herrero E., Pastor J., Sentandreu R.* // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 1419—1428.
- 98a. *Van Rinsum J., F. M. Klis, H. Van den Ende* // Yeast. 1991. Vol. 7. P. 717—726.
99. *Vediyappan G., Bikandi J., Braley R., Chaffin W.L.* // Electrophoresis. 2000. Vol. 21. P. 956—961.
100. *William J.S.* // J. Inst. Brew. 1970. Vol. 76. P. 524—527.
101. *Wojchiechowicz D., Lu C.-F., Kurjan J., Lipke P.N.* // Mol. Cell. Biol. 1993. Vol. 13. P. 22554—22563.
102. *Yu L., Goldman R., Sullivan P.A., Walker G.F., Fesik S.W.* // J. Biomol. NMR. 1993. Vol. 3. P. 429—441.
103. *Yun D.-J., Zhao Y., Pardo J.M., Narasimhan M.L., Damsz B., Lee H., Abad L.R., Paino D'Urzo M., Hasegawa P.M., Bressan R.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 7082—7087.