

Вgl2p-белок с амилоидными свойствами из клеточных стенок дрожжей: роль в формировании фибриллярных структур внеклеточного матрикса

Выполнила:

Серова Е.С.

Научные руководители:

профессор, д.б.н. Калебина Т.С.

профессор, д.б.н. Камзолкина О.В.

Московский Государственный Университет

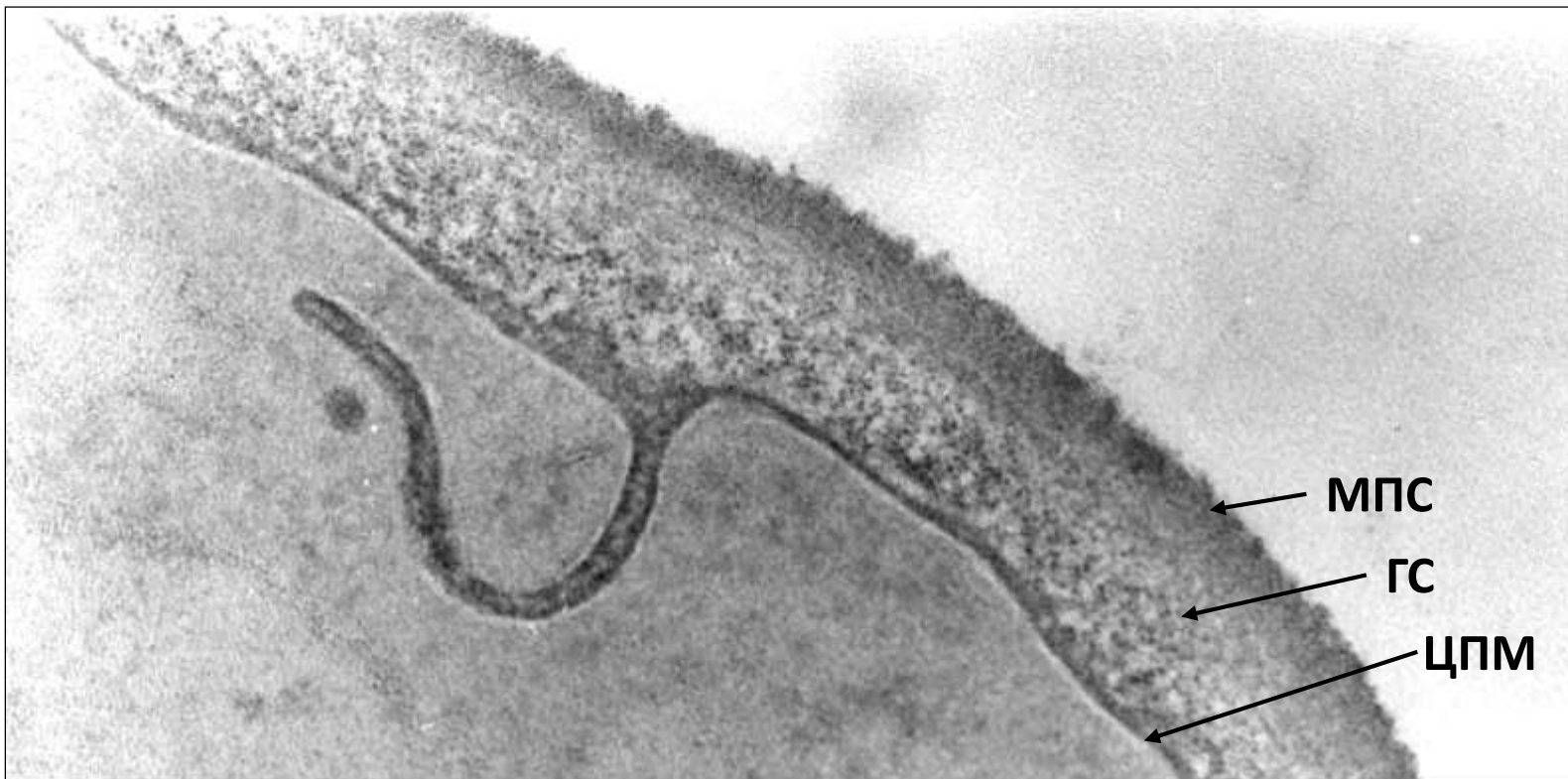
им. М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра микологии и альгологии

Москва-2019

Клеточная стенка дрожжей *S. cerevisiae*

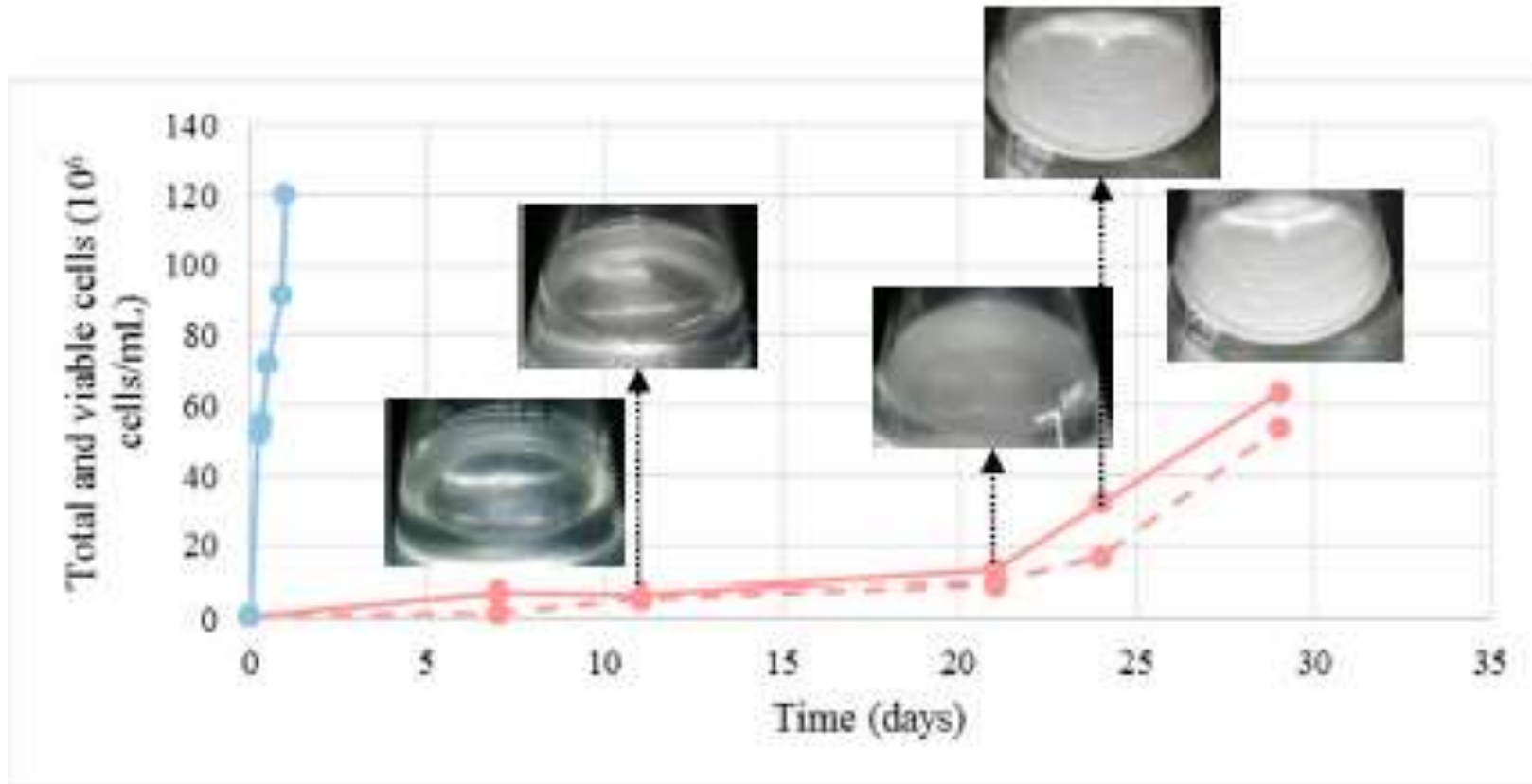


МПС- маннопротеиновый
слой;
ГС - глюкановый слой;
ЦПМ - цитоплазматическая
мембрана;
(x1000000).

Калебина, Кулаев, 2001

Этанольный стресс

Сопровождается формированием биопленок



Синий- в среде NBFC , красный- в среде BFC. Зависимость количества клеток от времени культивирования

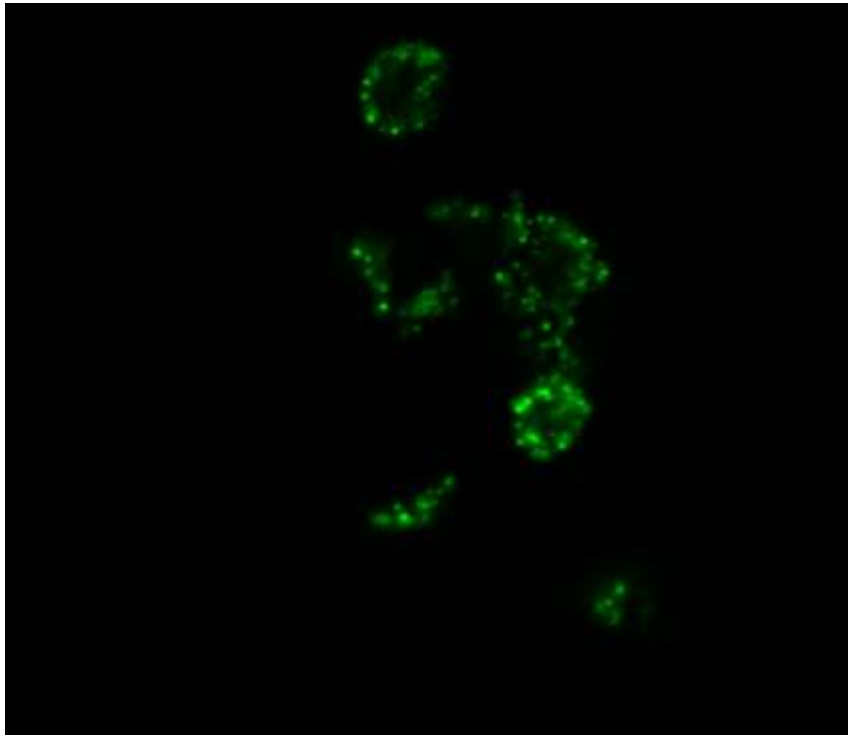
Moreno-Garcia et al., 2017

Bgl2p

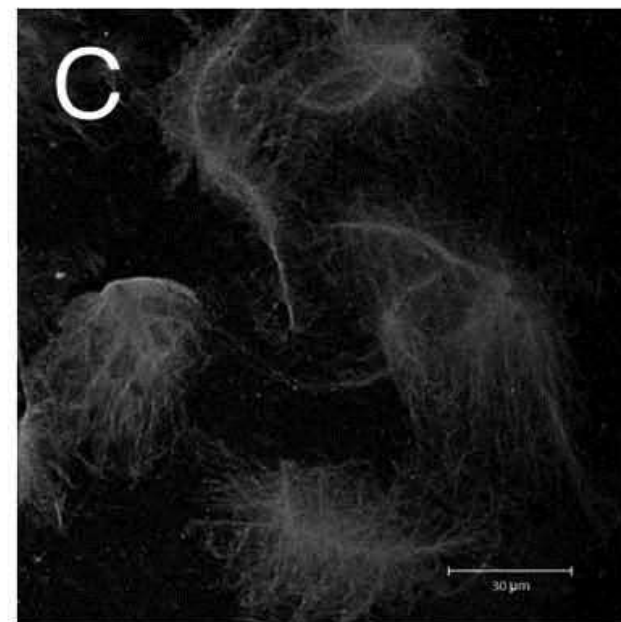
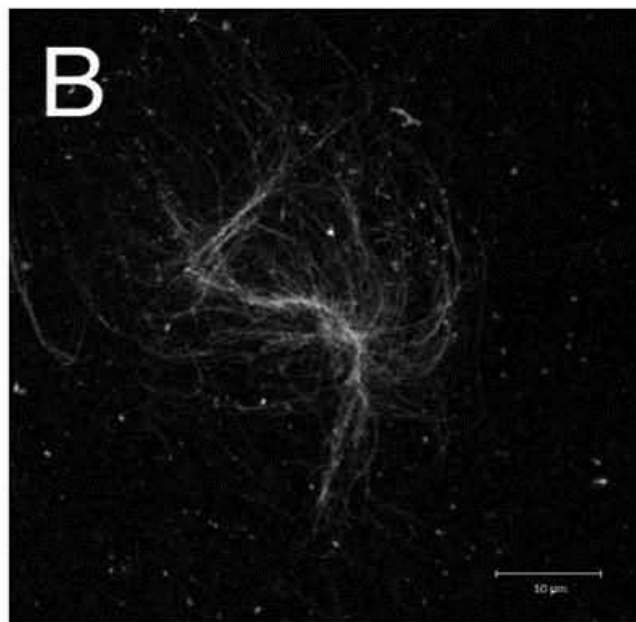
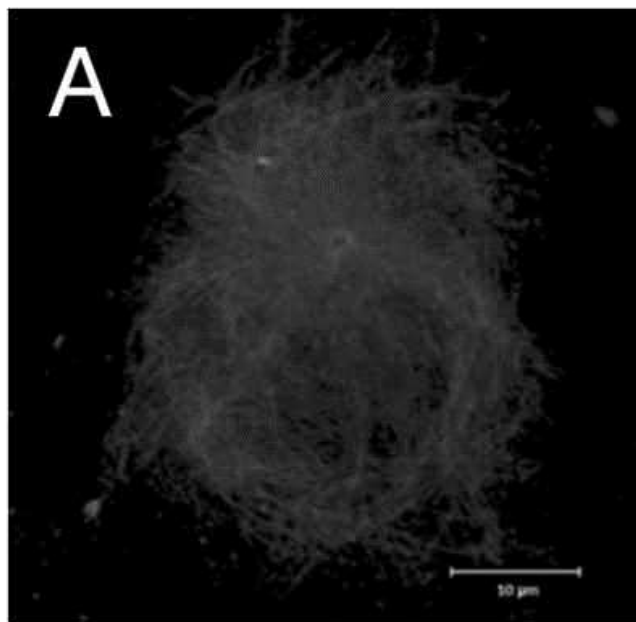
- Bgl2p- мажорный белок КС *S. cerevisiae*
- *Относится к фракции белков, которые экстрагируются детергентами (SDS)*
- *Участствует в ответе на этанольный стресс при изготовлении хересных вин*
- *Имеет амилоидные свойства- способность образовывать фибриллы*

Bezsonov et al., 2013
Klebl and Tanner, 1989
Moreno-Garcia et al., 2017

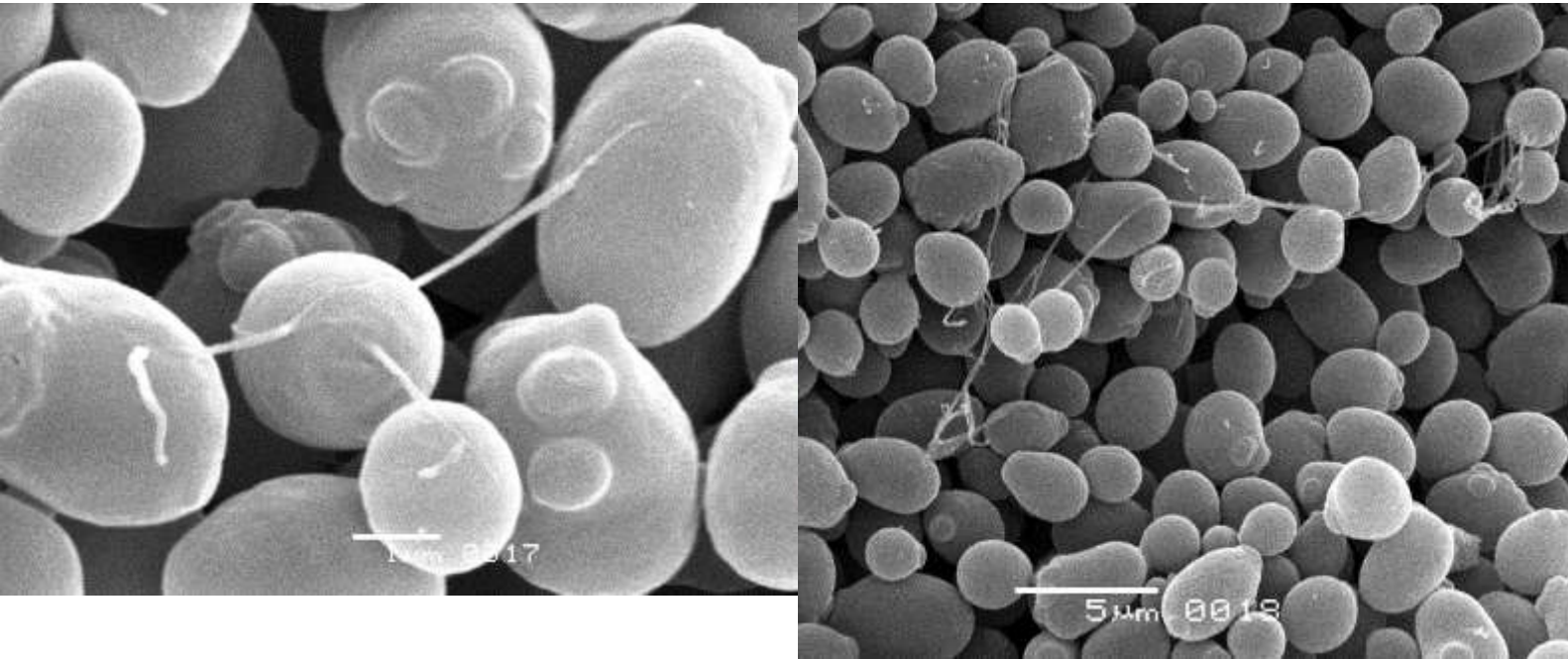
- **Bgl2p формирует микрокомпартменты в КС wt *S. cerevisiae*, выявляемых после обработки в слабощелочных условиях**



- Фибриллы Bgl2p, формируемые *in vitro* (окрашивание антителами)



Клетки дрожжей могут формировать фибриллы в ответ на стресс (к примеру, вызванный наличием в среде 8-оксогуанозина)



Фотографии предоставлены Калебиной Т.С.

- Белок Bgl2p участвует в ответе на этанольный стресс, при этом он выходит из КС обнаруживается в структурах внеклеточного матрикса
- После выделения из КС Bgl2p формирует фибриллы *in vitro*
- Мы предположили, что в процессе ответа на этанольный стресс Bgl2p может образовывать фибриллы во внеклеточном матриксе

Цель и задачи

- *Цель работы:* определить, формируют ли клетки дрожжей *S. cerevisiae* фибриллы *in vivo* в среде с повышенным содержанием спирта, а также проверить, содержится ли Bgl2p в данных структурах
- *Задачи:*
 - 1) Сравнить способность клеток дрожжей *S. cerevisiae* дикого типа и штамма с deletированным геном *BGL2* образовывать фибриллы на среде с повышенным содержанием этилового спирта и изучить динамику формирования фибриллярных структур на средах с различным содержанием этанола.
 - 2) Изучить морфологию формируемых фибрилл.
 - 3) Изучить распределение Bgl2p в КС и во внеклеточном матриксе клеток дрожжей *S. cerevisiae* в стандартных условиях культивирования и при повышенном содержании этанола.

Методы

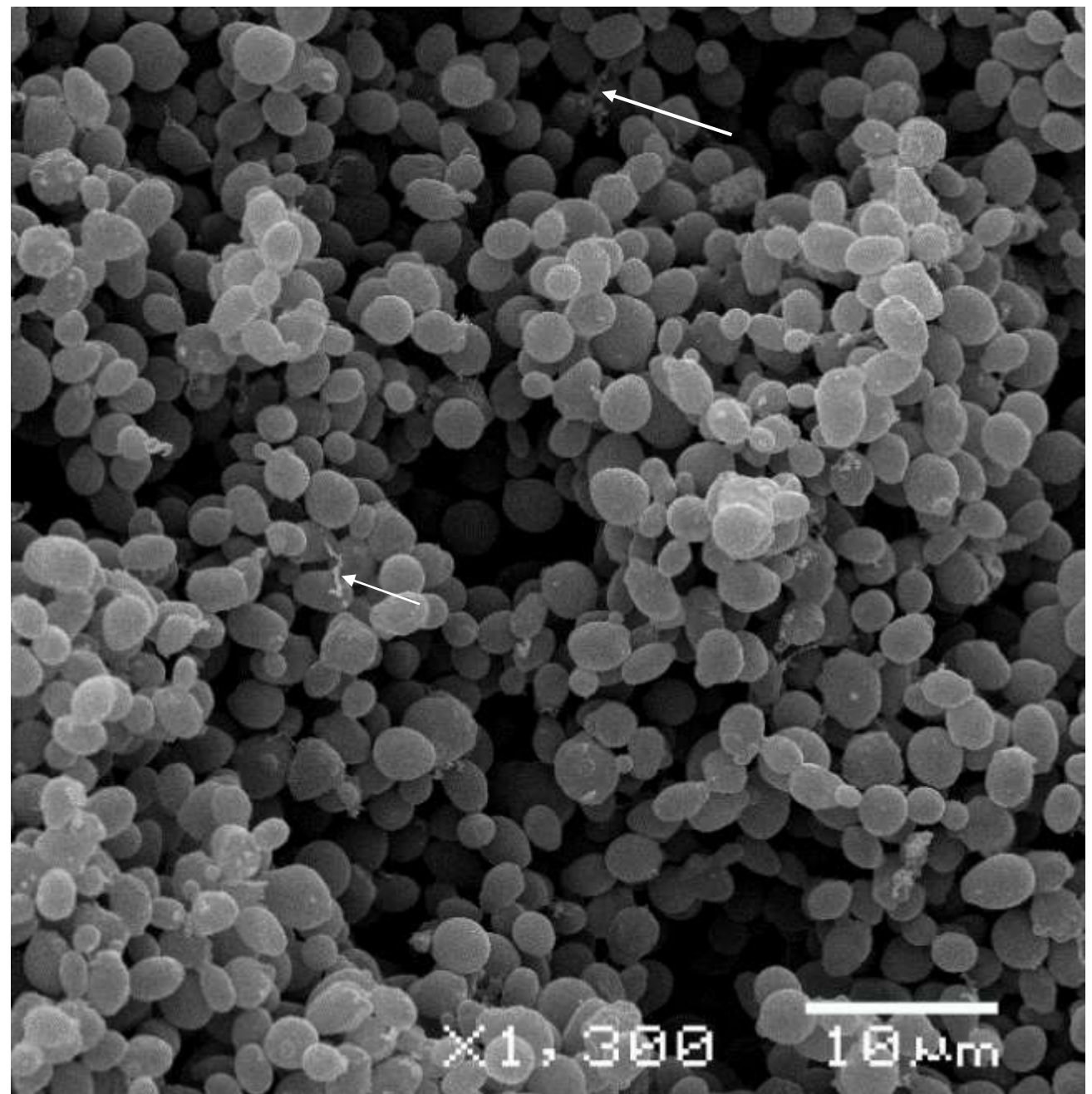
- Культивирование *S. cerevisiae* штамм BY4742 и штамм $\Delta bgl2p$
- Подготовка клеток для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ)
- Подготовка клеток к иммунологическому окрашиванию
- Иммунологическое окрашивание высокоспецифичными антителами к Bgl2p.
- Работа с СЭМ (JEOL-JSM)
- Работа с флуоресцентным микроскопом (Axioskop 40 FL)
- Работа с конфокальным микроскопом (Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM-510 Meta)

Изучение динамики формирования фибрилл

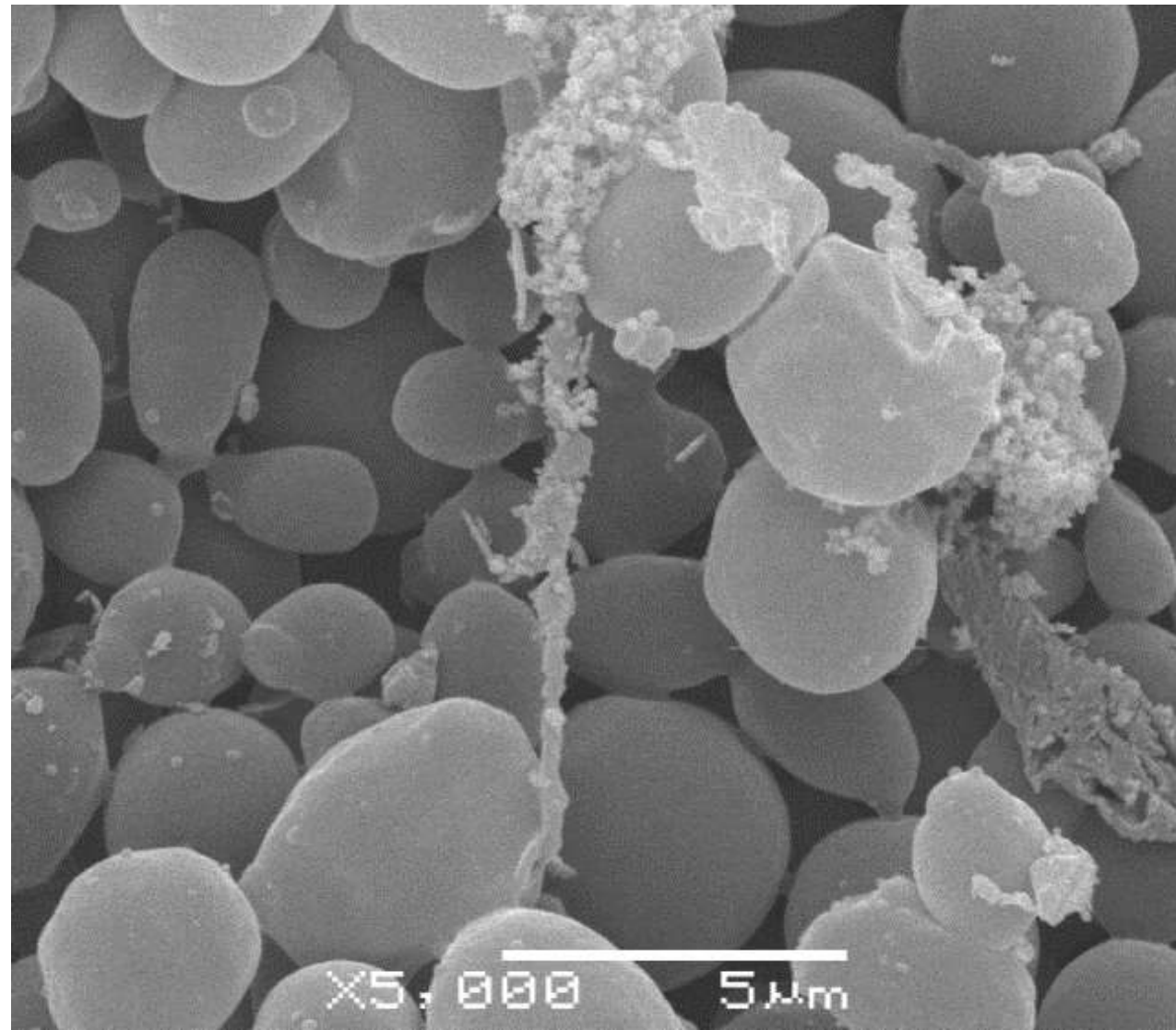
- Таблица 1. Динамика формирования фибрилл клетками wt *S. cerevisiae* («-» - не обнаружены; «±»- встречаются короткие; «+» - встречаются длинные; «++»- присутствуют тяжи)

Концентрация этанола	Время культивирования				
	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя	5 неделя
10 % этанола	-	-	<u>±</u>	+	++
15 % этанола	-	-	<u>±</u>	<u>±</u>	+
20 % этанола	-	-	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>±</u>

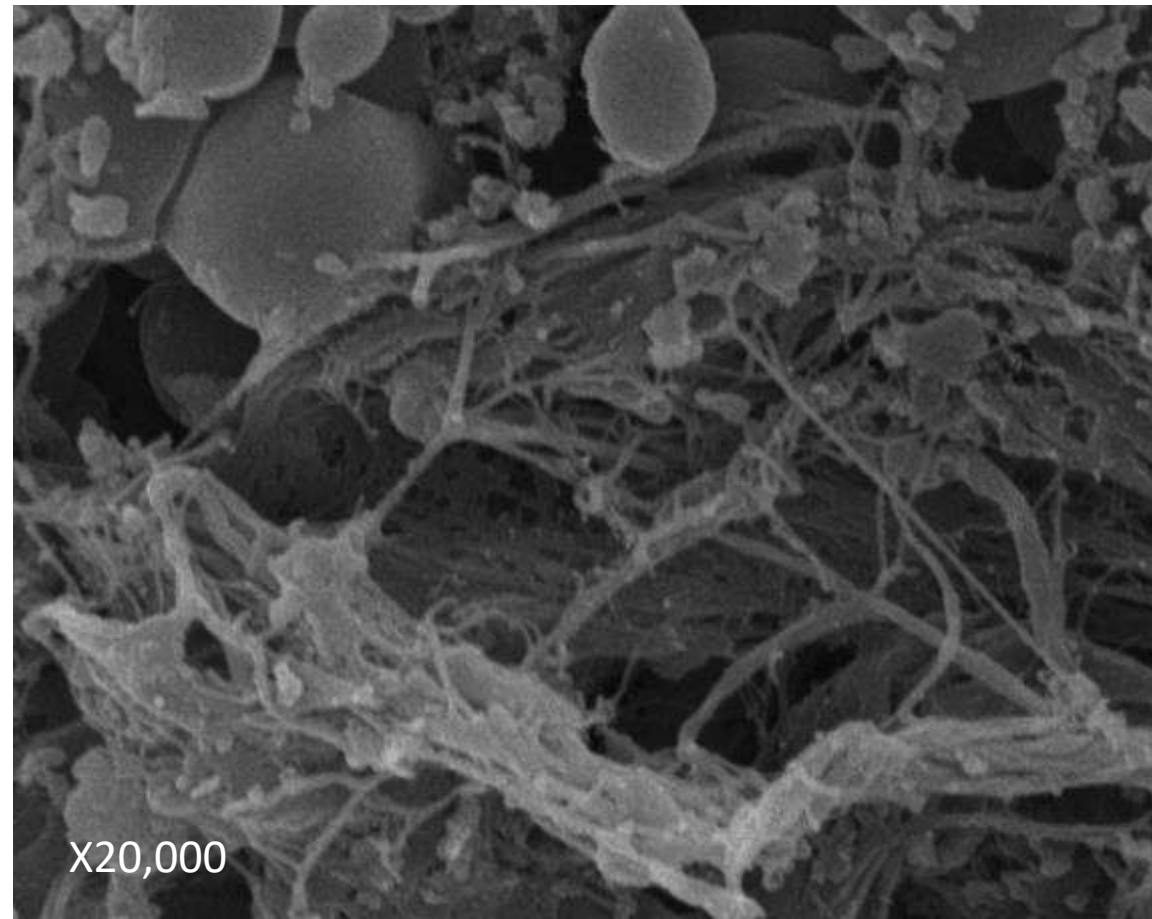
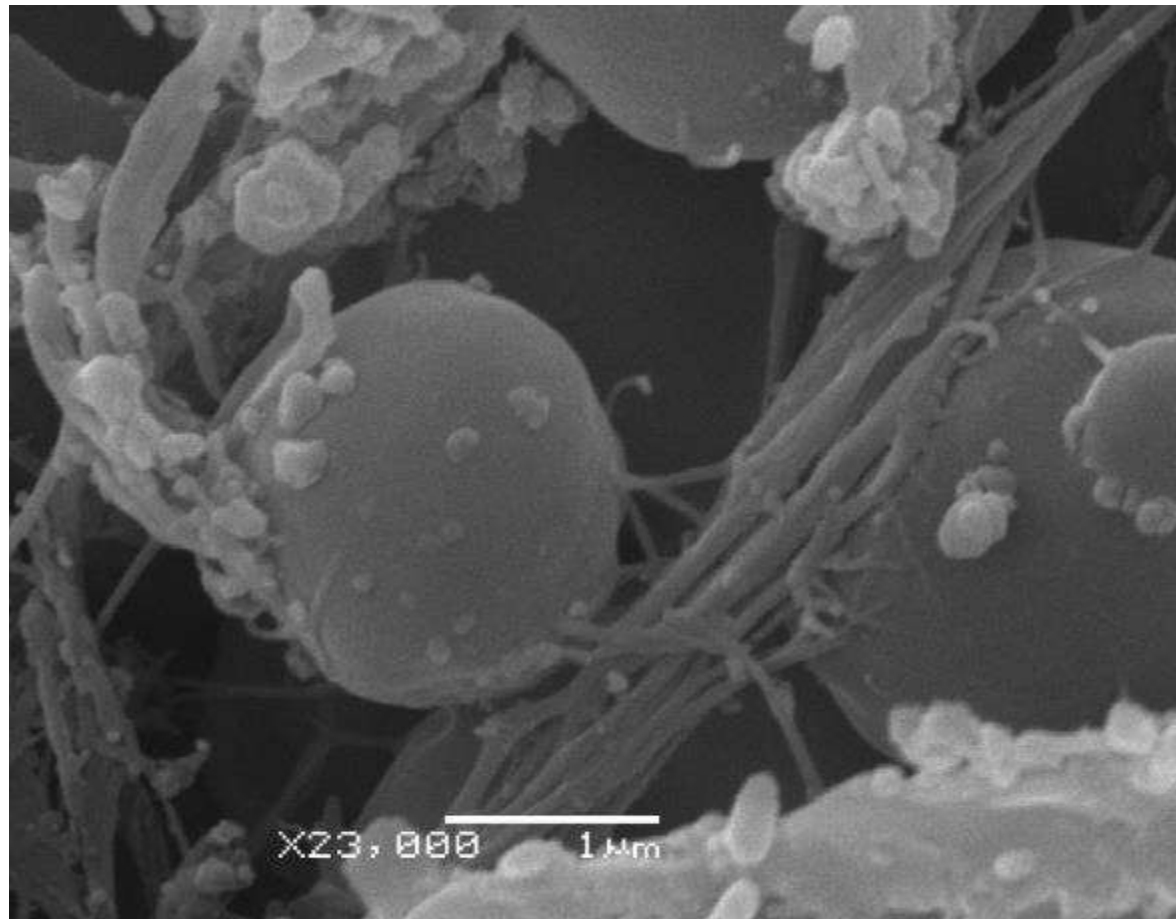
Третья неделя
культивирования wt
S. cerevisiae на среде
BFC
(+ 10 % спирт)



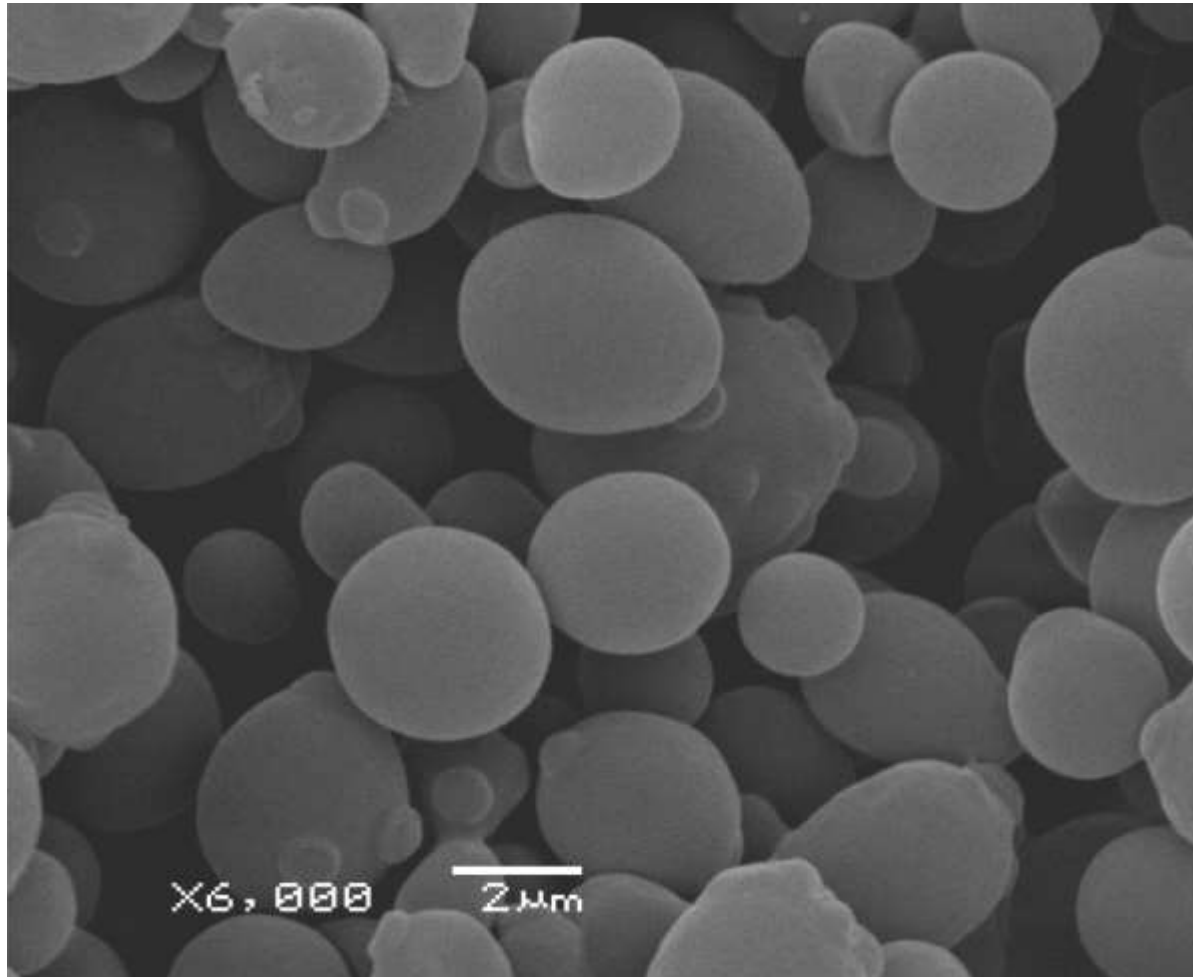
**Четвертая неделя
выращивания wt
S. cerevisiae на среде
BFC
(+ 10 % спирт)**



Пятая неделя выращивания wt *S. cerevisiae* на среде BFC (+ 10% спирт)



- Четвертая неделя выращивания $\Delta bgl2p$ *S. cerevisiae* на среде BFC (+10% спирт)



Фибрилл и структур внеклеточного матрикса не было выявлено при культивировании на среде BFC с разной концентрацией этилового спирта

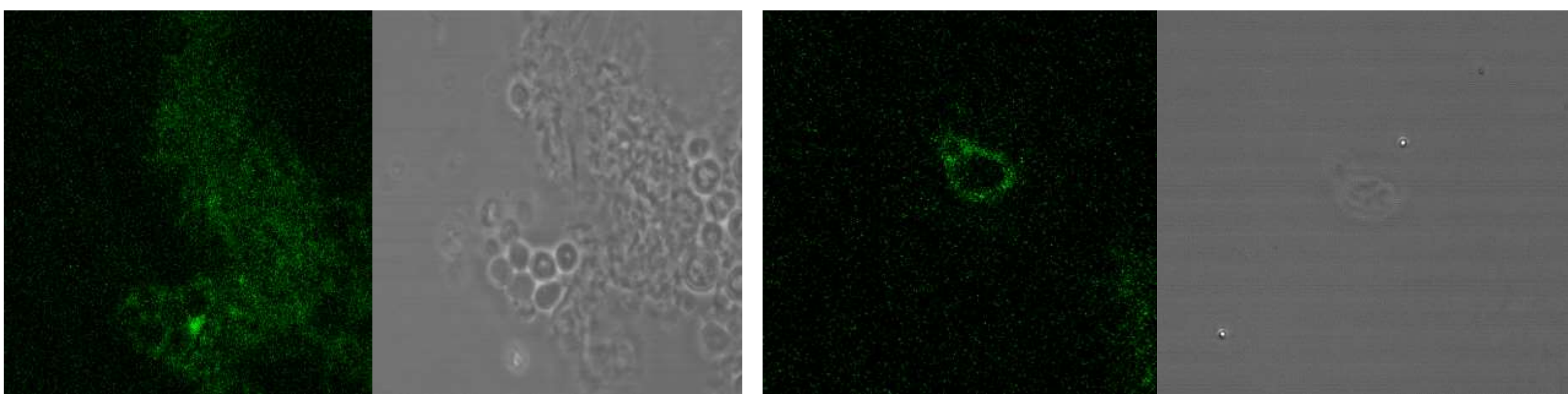
- В отсутствии Bgl2p фибриллярные структуры не формируются.
- Соответственно, для выяснения локализации данного белка было проведено иммунологическое окрашивание высокоспецифичными антителами к Bgl2p клеток дрожжей wt *S. cerevisiae*
- Фотографии были получены с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов

**Bgl2p формирует микрокомпартменты в КС
дрожжей wt *S. cerevisiae* при выращивании в
течение четырех недель на среде NBFC(- спирт)**



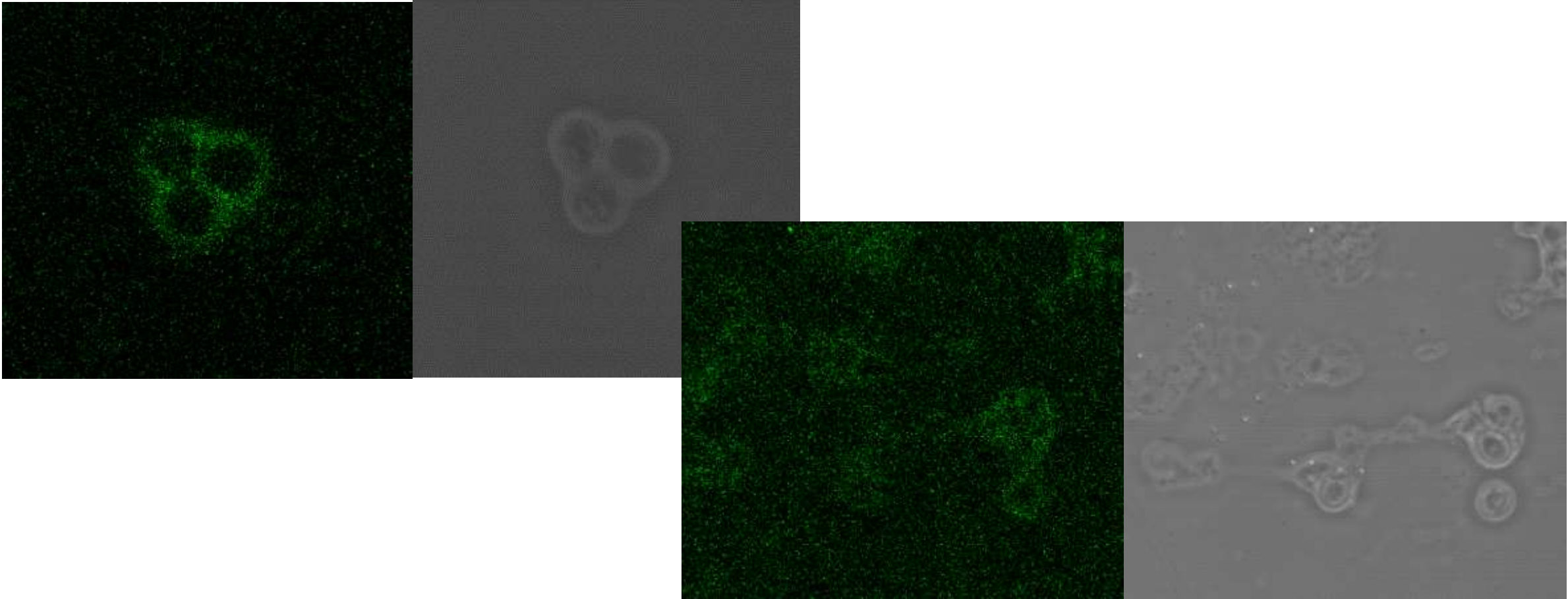
Фотография, полученная при помощи флуоресцентного микроскопа.
Окрашивание специфическими антителами к Bgl2p

- **Выращивание клеток дрожжей wt *S. cerevisiae* в течение четырех недель на среде BFC (+ 10% спирт)**
- Bgl2p по-видимому формирует внеклеточный матрикс вокруг клеток дрожжей. Микрокомпартменты в КС не обнаруживаются



Фотография получены при помощи конфокального микроскопа.
Окрашивание специфическими антителами к Bgl2p

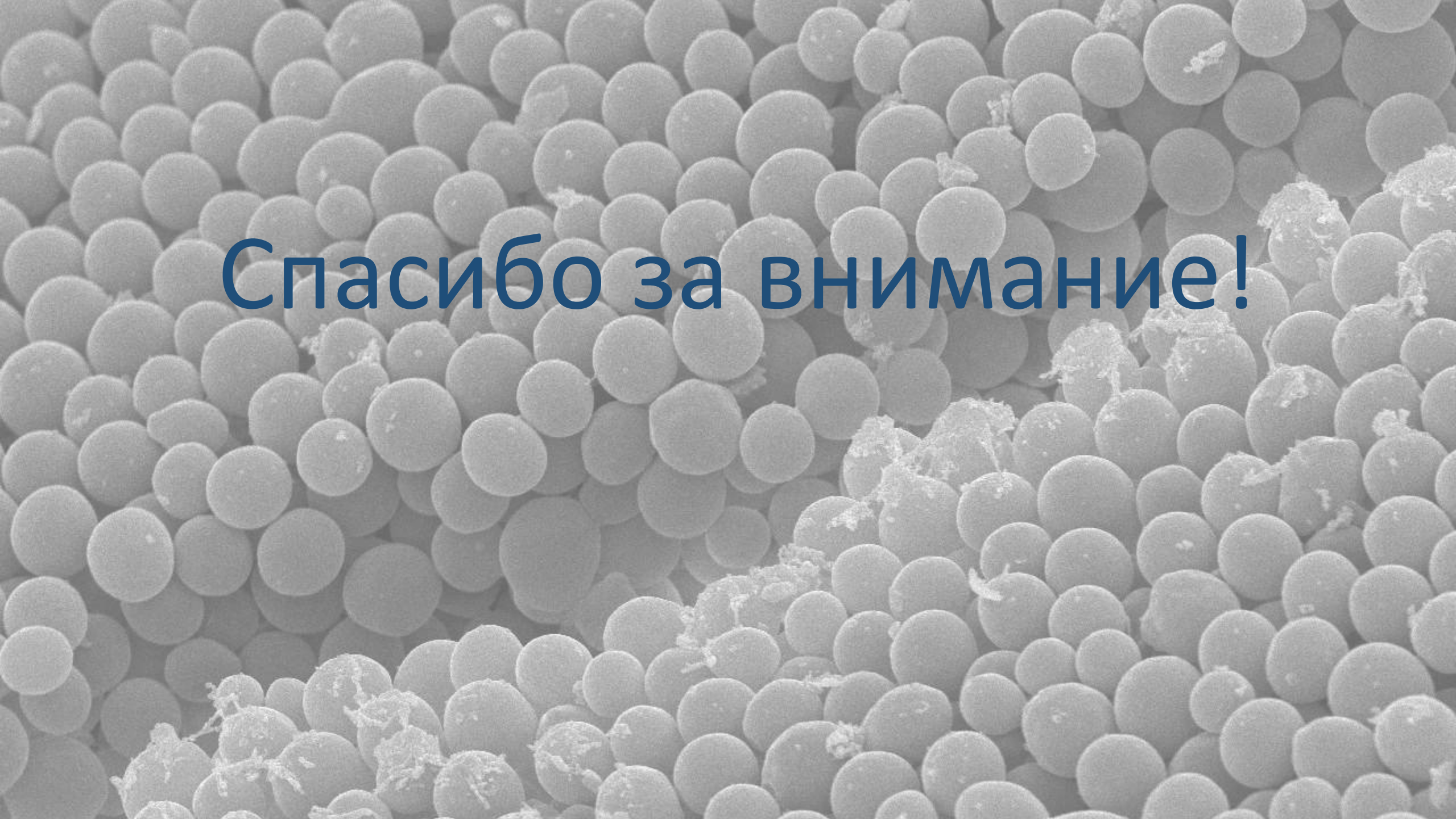
Выращивание клеток дрожжей wt *S. cerevisiae* в течение пяти недель на среде BFC (+10% спирт)



Фотографии получены при помощи конфокального микроскопа
Окрашивание специфическими антителами к Bgl2p

Выводы

- Было показано, что белок Bgl2p важен для фибриллообразования в условиях этанольного стресса: штамм с deletированным геном *BGL2*, $\Delta bgl2p$ фибриллы не образует, тогда как у штамма wt BY4742 эти структуры присутствуют.
- Было показано, что фибриллярные структуры внеклеточного матрикса формируются начиная с третьей недели роста на среде BFC с содержанием этанола 10%. Основной процесс фибриллообразования - четвертая и пятая недели.
- Было показано, что фибриллы на ранних стадиях практически не ветвятся, а в последствии становятся заметно ветвящимися с тенденцией к образованию тяжей.
- В процессе фибриллообразования белок Bgl2p меняет локализацию, и выходит из КС, и обнаруживается во внеклеточном матриксе. В фибриллах, по-видимому, он отсутствует.

The background of the image is a dense field of small, light blue spheres, similar in appearance to beads or microcapsules. Scattered across these spheres are numerous small, irregular white particles and clumps, which could represent dust, debris, or biological matter. The overall effect is a textured, granular surface.

Спасибо за внимание!

- Методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии не удалось выявить большого количества фибриллярных структур, поскольку, скорее всего, конгломераты с фибриллами прикреплялись одной или двумя клетками, а в процессе отмывки большая часть, которая не смогла прикрепиться, отмывалась

Важно отметить, что
внеклеточный матрикс
методом СЭМ выявляется
плохо, однако, при
повышенном содержании
этанола в среде, практически
фибрилл не замечено
Однако, клетки погружены во
внеклеточный матрикс

На фотографии приведены клетки wt *S. cerevisiae* 4 недели роста на среде BFC с
содержанием этанола 15%

