



УДК: 546.221.1+582.282.232:576.31

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БІЛКОВИЙ СКЛАД КЛІТИННОЇ СТІНКИ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А. А. Галушка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: a_halushka@mail.ru

Досліджено вплив гідроген сульфідів на склад білків клітинної стінки дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що H_2S значною мірою руйнує зовнішній манопротеїновий шар клітинної стінки. За умов вирощування дріжджів протягом однієї доби за наявності 10 мМ гідроген сульфідів значно зменшується вміст більшості ковалентно зв'язаних білків клітинної стінки дріжджів, зокрема, білків із молекулярною масою 17, 24, 32, 37 та 53 кДа. За наявності гідроген сульфідів в середовищі зростає вміст редуруючих цукрів. За 20 і 30 мМ концентрацій H_2S не виявлені ковалентно зв'язані білки клітинної стінки.

Серед нековалентно зв'язаних білків клітинної стінки *S. cerevisiae* за впливу 10 мМ гідроген сульфідів протягом однієї доби відбувається зростання вмісту білків із молекулярними масами 110, 64, 51, 49, 26, 25, 23 та 16 кДа і зменшується вміст білків із молекулярною масою 42, 40, 29 і 27 кДа. За короткотривалої (1 год) дії H_2S у різних концентраціях спостерігали збільшення кількості білків із молекулярною масою 98, 94, 84, 78, 71, 68, 61, 42, 40 і 32 кДа та зменшення вмісту білка з молекулярною масою 49 кДа.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, гідроген сульфід, клітинна стінка.

ВСТУП

Гідроген сульфід виявляє негативний вплив на біоту, в тому числі й людину, в якій ця сполука спричиняє респіраторні, неврологічні, серцево-судинні, метаболічні, репродуктивні порушення й ураження органів зору. За високих концентрацій H_2S виявляє летальну дію на живі організми [17].

Вважають, що дія гідроген сульфідів полягає у взаємодії з метало- та дисульфідвмісними білками. Також було показано токсичну дію цієї речовини на цитохром с-оксидазу (КФ 1.9.3.1) клітин головного мозку [17]. Окрім цього, гідроген сульфід пригнічує β -окиснення жирних кислот, виявляє канцерогенну дію на хребетних тварин, зокрема, спричиняє рак товстого кишечника [16, 17]. У тесті з ДНК-кометами показано його генотоксичну дію [9].

Механізми дії гідроген сульфідів на клітини мікроорганізмів досліджені недостатньо. Встановлено, що в порівняно невисоких концентраціях він пригнічує лю-

мінесценцію в бактерій *Vibrio fischeri* (більше 0,1 мМ) [21], окиснений фотосинтез у ціанобактерій (від 5 мкМ) [14, 15, 24]. Гідроген сульфід знижує швидкість поглинання кисню, що може свідчити про інгібування дихального метаболізму цією сполукою, та пригнічує активність ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41) у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia guilliermondii* [1]. Підвищені концентрації H_2S спричиняють зниження вмісту бактеріохлорофілів і каротиноїдів у клітинах бактерій *Chlorobium limicola*, втрату зв'язку хлоросом із цитоплазматичною мембраною та їхнє руйнування [3]. Досить стійкими до дії гідроген сульфідів виявилися археї, що може бути пов'язане з їхньою здатністю утворювати біоплівки у природних умовах [23, 29].

Клітинна стінка дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* складається з внутрішнього глюканового шару, який надає їй міцності, та зовнішнього манопротеїнового шару, що має захисну функцію [20]. Манопротеїни утворюють зовнішній електронно-щільний фібрилярний шар клітинної стінки. Вони складаються з олігосахаридної частини, утвореної залишками манози, та білка. За типом зв'язку з олігосахаридом розрізняють N-глікозилзовані й O-манозильзовані білки [22].

Промислове видобування сірки на Яворівському сірковому родовищі відкритим способом призвело до утворення великих техногенних водойм і до значних змін у перетворенні сполук сульфуру у водах і ґрунтах цього регіону. Однією з цих змін є нагромадження у великих кількостях сульфатів і їхнє відновлення сульфат-відновлювальними бактеріями до гідроген сульфідів. Концентрація останнього у водоймах цього регіону сягає 20–80 мг/л, що в тисячі разів перевищує гранично допустиму концентрацію [7].

Попередніми дослідженнями на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка встановлено, що гідроген сульфід спричиняє порушення структури клітинної стінки у дріжджів і бактерій [2]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити вплив гідроген сульфідів на білковий склад клітинної стінки дріжджів *S. cerevisiae* як можливої модельної системи для вивчення механізму дії H_2S на клітину.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом досліджень були дріжджі *S. cerevisiae* D-1-S із колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Дріжджі вирощували до середини експоненційної фази росту в середовищі Беркгольдера [10] з 20 г/л глюкози за умов аерації. У експериментах із визначення вмісту редуруючих цукрів замість глюкози вносили таку ж масу сахарози або гліцеролу. Клітини обробляли гідроген сульфідом у концентрації 10 мМ протягом однієї доби за аеробних умов без перемішування, а також у концентраціях 10, 20 і 30 мМ протягом 1 год за умов аерації. Джерелом H_2S слугував натрій сульфід.

Зміни у структурі клітин вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Для цього двічі відмиті стерильною дистильованою водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5% розчині калій перманганату. Фіксовані клітини зневоднювали у розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу і пропілен оксиду та переносили в епоксидну смолу Епон 812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікротомі УМТП-6 і контрастували плумбум цитратом за Рейнольдсом [27]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорючій напрузі 75 кВ.

Екстракцію білків клітинних стінок проводили за Везесом зі співавт. [30] із модифікаціями, які полягали в тому, що клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-2Т (22 кГц, 5 хв), а для розчинення клітинних стінок використовували 10 од./мл літикази з *Arthrobacter luteus* (Sigma). Маса клітин у контрольних і дослідних зразках була однаковою. Біомасу визначали фотоелектроколориметрично на КФК-3 при 540 нм у кюветі з оптичним шляхом 3 мм.

Білки розділяли методом вертикального гел'електрофорезу [8, 25]. У лунку поліакриламідного гелю вносили по 20 мкг сумарного білка. Для визначення молекулярних мас білків використовували набір стандартних білків (Fermentas) із молекулярною масою 10, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 та 170 кДа. Визначення молекулярної маси білків та їхньої кількості здійснювали з використанням програми „Gel-Pro Analyzer 3.1”. У результатах досліджень наведена маса білків у гелі.

Концентрацію редуруючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона [4]. Перед цим гідроген сульфід, наявний у середовищі культивування, осаджували в'єсмут нітратом.

Усі досліди проводили у трикратній повторності. Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми „Origin 6.1”. Достовірність даних і різниці між ними оцінювали за коефіцієнтом Ст'юдента при рівні достовірності $P < 0,05$ [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Під час вирощування дріжджів *S. cerevisiae* за наявності 10 мМ гідроген сульфід спостерігали зміни в ультраструктурі клітин *S. cerevisiae*. Ці зміни передусім стосуються зовнішнього манопротеїнового шару клітинної стінки, який стає менш електроннощільним (рис. 1).

Клітинна стінка дріжджів приблизно на 40% складається з білків. Це ковалентно та нековалентно зв'язані білки. Нековалентно зв'язані білки можна екстрагувати детергентами або тіоловими реагентами при нагріванні. Для екстракції ковалентно зв'язаних білків клітинні стінки обробляють ферментними препаратами, зокрема, літиказою [5]. Літиказа – це комплексна ендоглюканаза, що руйнує β -1,3- та β -1,6-глікозидні зв'язки у клітинній стінці дріжджів [18]. Дані літератури щодо кількості білків у клітинній стінці дріжджів суперечливі [5, 19, 31].

Ми отримували фракцію клітинних стінок *S. cerevisiae*, із якої екстрагували білки двома способами: за допомогою натрій додецилсульфату (екстракт А) і літикази (екстракт Б). Білки розділяли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Виявилось, що на електрофореграмі, отриманій із екстракту А з клітин *S. cerevisiae*, не оброблених гідроген сульфідом, міститься понад 30 смуг білків із молекулярними масами від 17 до 170 кДа і 1 смуга, що відповідає білку з молекулярною масою понад 170 кДа (рис. 2).

Було показано, що за умов впливу H_2S на клітини дріжджів *S. cerevisiae* в екстрактах клітинних стінок вміст білків із молекулярною масою 42, 40, 29 і 27 кДа зменшувався (рис. 2, 3, А). Поясненням такого ефекту може бути наявність дисульфідних зв'язків, які стабілізують структуру цих білків і руйнуються гідроген сульфідом [17]. Ці протеїни також можуть бути представниками так званих „транзиторних” білків, які, залежно від умов культивування дріжджів, можуть включатися в клітинну стінку або екскретуватися з клітини [5]. Вміст білків із молекулярною масою 110, 64, 51, 49, 26, 25, 23 та 16 кДа, навпаки, збільшувався. Інших помітних змін у білковому складі цього екстракту не виявлено.

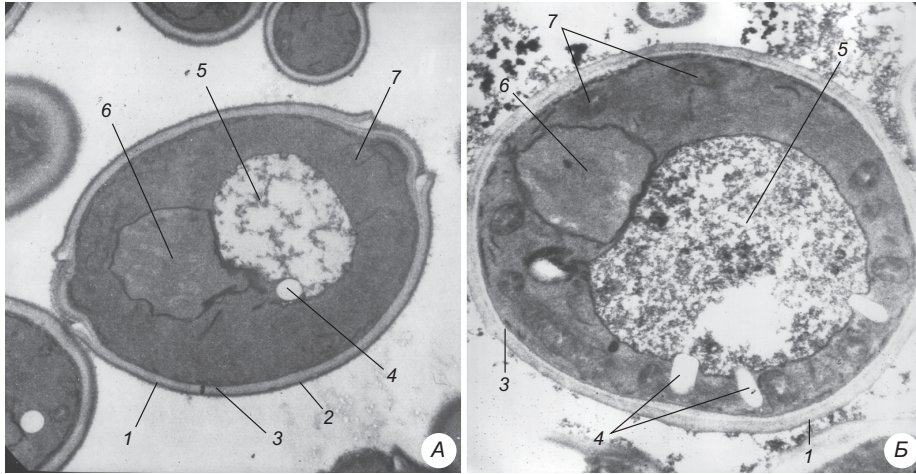


Рис. 1. Електронні мікрофотографії клітин дріжджів *S. cerevisiae* (×6000): А – вирощених без гідроген сульфід (контроль), Б – вирощених за концентрації H_2S 10 мМ
Умовні позначення: 1 – клітинна стінка, 2 – манопротейновий шар клітинної стінки (на рис. Б не позначений, оскільки не виявлений), 3 – цитоплазматична мембрана, 4 – включення жиру, 5 – вакуоля, 6 – ядро, 7 – мітохондрії

Fig. 1. Electronic microphotographs of *S. cerevisiae* yeasts cells (×6000): А – grown without hydrogen sulfide, Б – grown with 10 mM of hydrogen sulfide
Symbols: 1 – cell wall, 2 – mannoprotein layer of the cell wall (is not marked on fig. Б, because is not detected there), 3 – cytoplasm membrane, 4 – fat incorporations, 5 – vacuole, 6 – nucleus, 7 - mitochondria

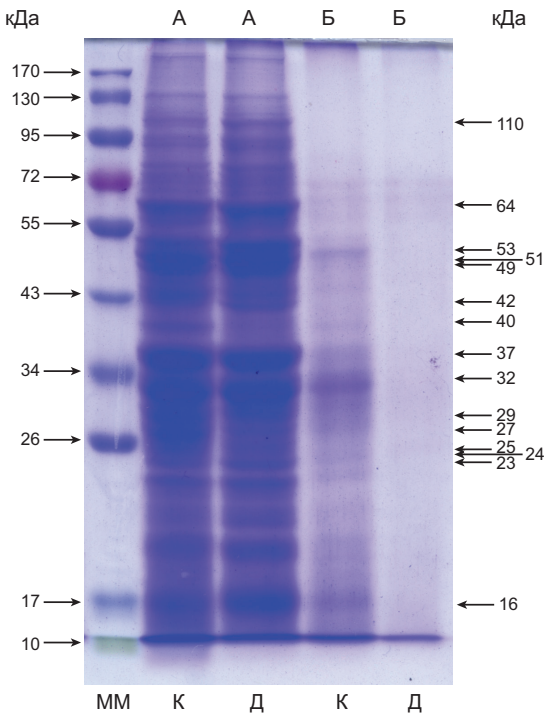


Рис. 2. Електрофореграма білків клітинної стінки дріжджів *S. cerevisiae* за впливу H_2S у концентрації 10 мМ: А – екстракт А; Б – екстракт Б; ММ – маркери молекулярної маси; К – контроль; Д – дослід (10 мМ H_2S)

Fig. 2. Electropherogram of *S. cerevisiae* cell wall proteins under the influence of 10 mM H_2S : А – extract А; Б – extract В; ММ – markers of molecular weight; К – control; Д – eperiment 10 mM H_2S

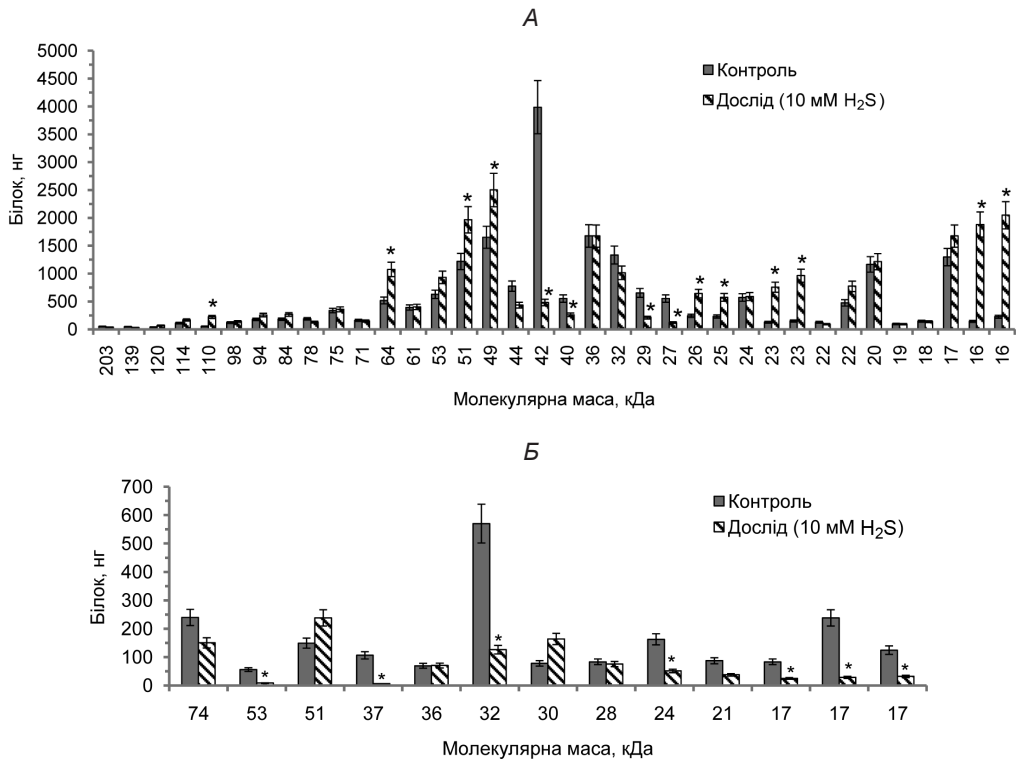


Рис. 3. Вміст білків у клітинній стінці дріжджів *S. cerevisiae* за впливу H₂S у концентрації 10 мМ: А – екстракт А; Б – екстракт Б; * – достовірно відмінні від контролю результати

Fig. 3. *S. cerevisiae* cell wall proteins content under the influence of 10 mM H₂S: А – extract А; Б – extract В, * – reliably different from control results

До білків, які екстрагуються з клітинних стінок детергентами й тіоловими реагентами при нагріванні, належать переважно ферменти (інвертаза (КФ 3.2.1.26), енолаза (КФ 4.2.1.11), кисла фосфатаза (КФ 3.1.3.2), екзо-β-(1,3)-глюканази тощо) [5, 12, 13]. На думку Калєбіної та Кулаєва [4], до цієї групи не входять структурні білки, за винятком білка Bg12p із молекулярною масою 31,5–34 кДа, який у значній кількості наявний у клітинних стінках багатьох видів дріжджів.

Зміни білкового складу екстракту Б, отриманого з клітинних стінок дріжджів *S. cerevisiae*, вирощених за наявності гідроген сульфїду, були більш значними (рис. 2, 3, Б). У ньому значно зменшився вміст більшості білків, зокрема, із молекулярною масою 53, 37, 32, 24 та 17 кДа. Наявність невеликої кількості білків можна пояснити тим, що багато з них не завжди присутні на поверхні клітин, а, очевидно, секретуються і вбудовуються у клітинну стінку у строго визначені періоди клітинного циклу [11, 25] або за певних умов культивування дріжджів [5].

Як уже зазначалося, за досліджуваної концентрації гідроген сульфїд спричиняє зміни в манопротейновому шарі клітинної стінки *S. cerevisiae* (рис. 1). Відсутність більшості білків у цьому екстракті, очевидно, пов'язана з повним або частковим руйнуванням зовнішнього манопротейнового шару клітинної стінки дріжджів за дії гідроген сульфїду.

Це припущення підтверджується результатами експериментів із визначення концентрації редукуючих цукрів у середовищі культивування дріжджів із 10 мМ H_2S . За цих умов у середовищі зі сахарозою вміст редукуючих цукрів зростає майже удвічі, а в середовищі з гліцеролом – майже у 20 разів (табл. 1). Можливо, більшу частину цих цукрів становить маноза, яка утворилася в результаті руйнування манопротеїнів клітинної стінки.

Таблиця 1. Концентрація редукуючих цукрів у середовищі культивування дріжджів *S. cerevisiae* за дії гідроген сульфїду

Table 1. Concentration of reducing sugars in *S. cerevisiae* growth medium under the influence of hydrogen sulfide

Умови	Концентрація редукуючих цукрів, мкМ
Сахароза, контроль	4,02±0,10
Сахароза, 10 мМ H_2S	7,83±1,59
Гліцерол, контроль	0,12±0,08
Гліцерол, 10 мМ H_2S	2,34±0,17

Порівняно висока концентрація редукуючих цукрів у контрольному варіанті зі сахарозою може бути пов'язана з тим, що вона розщеплюється до глюкози й фруктози, які є редукуючими цукрами, поза клітиною, і лише після цього моносахариди транспортуються всередину клітини. За умов вирощування дріжджів у середовищі з гліцеролом зазначені моносахариди в середовищі відсутні, і всі виявлені в середовищі редукуючі цукри – це, очевидно, маноза, утворена в результаті руйнування манопротеїнів клітинної стінки. Під час вирощування дріжджів *S. cerevisiae* у середовищі зі сахарозою індуються транспортери гексоз [28], зокрема низькоафінні, які здатні, окрім глюкози та фруктози, транспортувати манозу, утворену в результаті руйнування зовнішнього шару клітинної стінки. За умов культивування клітин у середовищі з гліцеролом індубельна транспортерна система гексоз не функціонує, тому цукри нагромаджуються в культуральній рідині та їхній вміст зростає значно більше, ніж у середовищі зі сахарозою.

Відсутність суттєвих змін білкового складу екстракту, отриманого за допомогою натрій додецилсульфату (рис. 2), можливо, пов'язана з розміщенням цих білків у товщі чи на внутрішній поверхні клітинної стінки.

У подальших експериментах дріжджі, вирощені до середини експоненційної фази, обробляли гідроген сульфідом у концентраціях 10, 20 і 30 мМ і культивували ще протягом 1 год за умов аерації. За умов оброблення клітин гідроген сульфідом у концентраціях 10, 20 і 30 мМ в екстракті А спостерігали зростання вмісту білків із молекулярною масою 94, 78, 61 і 40 кДа (рис. 4, 5, А). Вміст білків із молекулярною масою 98 і 42 кДа підвищувався лише за концентрацій H_2S 20 і 30 мМ, а білків із молекулярною масою 84, 71, 68 і 32 кДа – за наявності 30 мМ гідроген сульфїду. Вміст білка з молекулярною масою 49 кДа зменшувався за наявності H_2S .

В екстракті Б у контрольному варіанті виявлені білки з молекулярною масою 170, 97, 84, 83, 54 та 53 кДа (рис. 4, 5, Б). Вміст білка з молекулярною масою 53 кДа дещо зменшився за концентрації H_2S 10 мМ. Інші білки за впливу гідроген сульфїду не виявлені. За наявності 20 і 30 мМ H_2S у досліджуваному екстракті білків не виявлено.

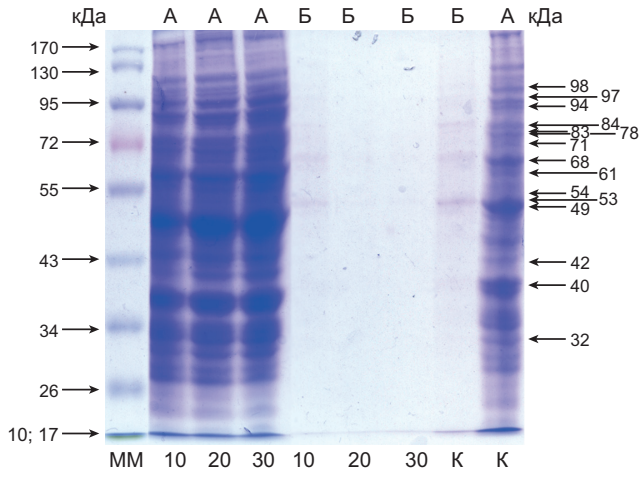


Рис. 4. Електрофореграма білків клітинної стінки дріжджів *S. cerevisiae* за впливу H_2S протягом 1 год за умов аерації: А – екстракт А; Б – екстракт Б; ММ – маркери молекулярної маси; К – контроль, 10, 20, 30 – концентрації гідроген сульфїду, мМ

Fig. 4. Electrophoregram of *S. cerevisiae* cell wall and cytoplasm membrane proteins under the influence of hydrogen sulfide during 1 h with aeration: A – extract A; Б – extract B; MM – markers of molecular weight; K – control, 10, 20, 30 – concentrations of hydrogen sulfide, mM

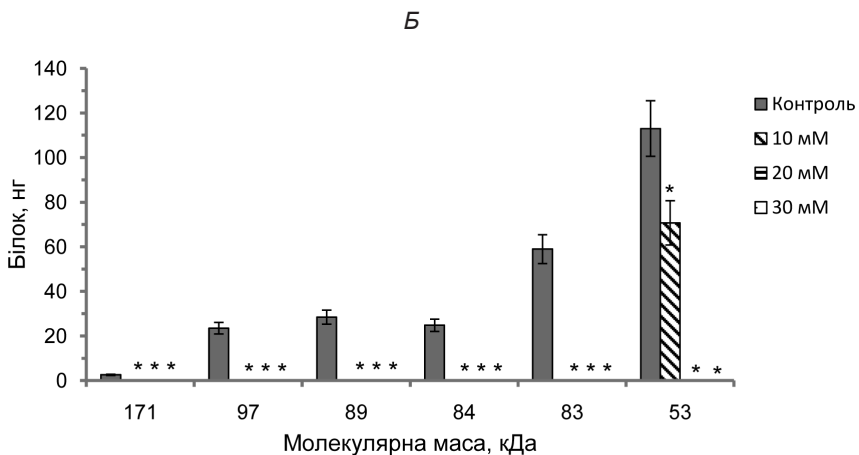
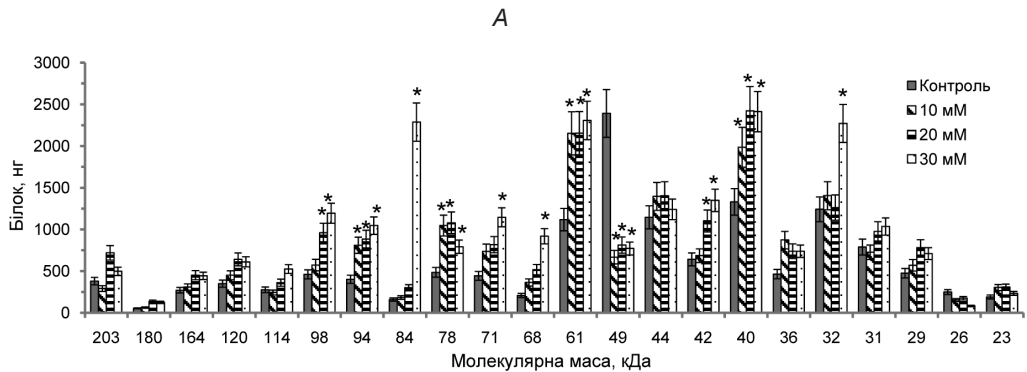


Рис. 5. Вміст білків у клітинній стінці дріжджів *S. cerevisiae* за впливу H_2S протягом 1 год за умов аерації: А – екстракт А; Б – екстракт Б; * – достовірно відмінні від контролю результати

Fig. 5. *S. cerevisiae* cell wall proteins content under the influence of hydrogen sulfide during 1 h with aeration: A – extract A; Б – extract B; * – reliably different from control results

Отримані результати свідчать, що за дії гідроген сульфід у першу чергу відбувається руйнування манопротеїнового шару клітинної стінки дріжджів.

ВИСНОВКИ

Культивування дріжджів *S. cerevisiae* у присутності гідроген сульфід призводить до зниження вмісту більшості ковалентно зв'язаних білків клітинної стінки дріжджів *S. cerevisiae*. Очевидно, це пов'язано з частковим або повним руйнуванням її зовнішнього шару. Серед нековалентно зв'язаних білків клітинної стінки за дії H_2S відбувається зростання вмісту більше, ніж 5 білків та зниження вмісту щонайменше 1–4 білків залежно від концентрації гідроген сульфід у тривалості його дії.

ПОДЯКИ

Висловлюємо подяку за фінансову підтримку Західно-Українському біомедичному дослідницькому центру (WUMBRС).

1. Галушка А., Гудзь С. Вплив гідроген сульфід на поглинання кисню і активність ізоцитратдегідрогенази й алкогольдегідрогенази дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia guilliermondii*. **Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2009; 51: 199–205.
2. Галушка А.А., Гудзь С.П. Структурно-функціональні зміни в клітинах мікроорганізмів при дії гідроген сульфід. **Біологічні студії / Studia Biologica**, 2009; 3(2): 141–148.
3. Галушка А.А., Горішний М.Б., Кулачковський О.Р. та ін. Вплив гідроген сульфід на фотосинтезувальний апарат бактерій *Chlorobium limicola* IMB K-8. **Мікробіологія і біотехнологія**, 2012; 1: 39–46.
4. Гудзь С.П., Билинская И.С., Кузнецова Р.А. и др. **Методические указания к лабораторным работам по большому практикуму (Цитология и биохимия дрожжей) для студентов биологического факультета**. Львов: ЛГУ, 1990. 36 с.
5. Калебина Т.С., Кулаев И.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей. **Успехи биол. химии**, 2001; 41: 105–130.
6. Лакин Г.Ф. **Биометрия**. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
7. Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С. Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища. **Мікробіол. журнал**, 2006; 68(5): 84–91.
8. Сибірна Н.О., Гончар М.В., Бродяк І.В. та ін. **Хімія білка / за ред. Н.О. Сибірної**. Львів: Вид. центр Львів. ун-ту, 2010. 394 с.
9. Attene-Ramos M.S., Wagner E.D., Plewa M.J. et al. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. **Mol. Cancer Res**, 2006; 4(1): 9–14.
10. Burkholder P. Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by yeasts. **Arch. Biochem**, 1943; 1(1): 121–130.
11. Caro L.H.P., Smits G.J., Van Egmond P. et al. Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. **FEMS Microbiol. Lett**, 1998; 161: 345–349.
12. Chaffin W.J., Lopez-Ribot J.L., Casanova M. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 1998; 62: 130–180.
13. Cid V.J., Duran A., del Rey F. et al. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Reviews**, 1995; 59(3): 345–386.
14. Cohen Y., Jorgensen B.B., Revsbech N.P. et al. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Appl. Env. Microbiol**, 1986; 51(2): 398–407.
15. Espie G.S., Miller A.G., Canvin D.T. Selective and reversible inhibition of active CO_2 transport by hydrogen sulfide in a cyanobacterium. **Plant Physiol**, 1989; 91: 387–394.

16. Huycke M.M., Gaskins H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. **Experimental Biology and Medicine**, 2004; 229: 586–597.
17. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53. Geneva, 2003. Online article available at: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
18. Jose C., Klein N., Wyss S. et al. **Arthrobacter lyticase as an effector molecule for para-transgenic control of Chagas disease** [Electronic resource]. ASTMH 59th annual meeting. Online article available at: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?mID=2625&sKey=5e0da339-7c75-4b05-98ba-e029c44df5f2&cKey=ccf2812a-3686-4d03-8b52-251663d10e4e&mKey=8ccce7ea-36cd-4b75-8b34-e799dc76f535#>.
19. Klis F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, 1994; 10: 851–869.
20. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 2006; 23: 185–202.
21. Kuster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna*. **Environ. Toxicol. Chem**, 2005; 24(10): 2621–2629.
22. Lesage G., Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 2006; 70(2): 317–343.
23. Lloyd K.G., Edgcomb V.P., Molyneaux S.J. et al. Effects of dissolved sulfide, pH, and temperature on growth and survival of marine hyperthermophilic Archaea. **Appl. Env. Microbiol**, 2005; 71(10): 6383–6387
24. Miller S.R., Bebout B.M. Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. **Appl. Env. Microbiol**, 2004; 70(2): 736–744.
25. Osterman L.A. **Methods for proteins and nucleic acids investigations: electrophoresis and ultracentrifugation (practical recommendations)**. Moscow: Nauka, 1981. 288 p.
26. Ram A.F.J., Van Den Ende H., Klis F.M. Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett**, 1998; 162: 249–255.
27. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol**, 1963; 17: 208–212.
28. Rintala E., Weibe M. G., Tamminen A. et al. Transcription of hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by change in oxygen provision [Electronic resource]. **BMC Microbiology**, 2008; 8: 53. Online article available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/53>
29. Schrenk M.O., Kelley D.S., Delaney J.R et al. Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. **Appl. Environ. Microbiol**, 2003; 69: 3580–3592.
30. Veses V., Casanova M., Murgui A. et al. *ABG1*, a Novel and Essential *Candida albicans* Gene Encoding a Vacuolar Protein Involved in Cytokinesis and Hyphal Branching. **Eukaryotic Cell**. 2005; 4(6): 1088–1101.
31. Zupan J., Mavri J., Raspor P. Quantitative cell wall protein profiling of invasive and non-invasive *Saccharomyces cerevisiae* strains. **J. Microbiol. Methods**, 2009; 79: 260–265.

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON THE COMPOSITION OF CELL WALL PROTEINS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST

A. A. Halushka, T. B. Peretyatko, S. P. Gudza

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: a_halushka@mail.ru

Influence of hydrogen sulfide on the cell wall proteins composition of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts is investigated. H₂S considerably destroys the outer mannopro-

tein layer of the cell wall. The content of most of the covalently bound cell wall proteins, particularly, proteins with molecular weight 17, 24, 32, 37 and 53 kDa, is considerably decreased during yeasts' cultivation with 10 mM of hydrogen sulfide for one day. The content of reducing sugars in the medium increased at the presence of hydrogen sulfide. At H₂S concentration 20 and 30 mM none of the covalently bound cell wall proteins were observed.

Among the non-covalently bound cell wall proteins of *S. cerevisiae*, the increase of proteins with molecular weight 110, 64, 51, 49, 26, 25, 23 and 16 kDa content and the decrease of proteins with molecular weight 42, 40, 29 and 27 kDa content is observed under the influence of 10 mM of hydrogen sulfide during one day. Under the short-term (1 hour) influence of H₂S at different concentrations, the increase of proteins with molecular weight 98, 94, 84, 78, 71, 68, 61, 42, 40 and 32 kDa content and the decrease of protein with molecular weight 49 kDa content was observed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, hydrogen sulfide, cell wall.

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А. А. Галушка, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: a_halushka@mail.ru

Исследовано влияние сероводорода на состав клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Установлено, что H₂S в значительной мере разрушает внешний маннанопротеиновый слой клеточной стенки. При культивировании дрожжей в течение суток в присутствии 10 mM сероводорода существенно уменьшается содержание большинства ковалентно связанных белков клеточной стенки дрожжей, в частности, белков с молекулярной массой 17, 24, 32, 37 и 53 кДа. В присутствии сероводорода в среде увеличивается количество редуцирующих сахаров. При концентрациях H₂S 20 и 30 mM ковалентно связанные белки клеточной стенки не обнаруживаются.

Среди нековалентно связанных белков клеточной стенки *S. cerevisiae* под влиянием 10 mM сероводорода на протяжении 1 суток происходит увеличение содержания белков с молекулярной массой 110, 64, 51, 49, 26, 25, 23 и 16 кДа и уменьшается содержание белков с молекулярной массой 42, 40, 29 и 27 кДа. При краткосрочном (1 час) действии H₂S в различных концентрациях наблюдали увеличение количества белков с молекулярной массой 98, 94, 84, 78, 71, 68, 61, 42, 40 и 32 кДа и уменьшение содержания белка с молекулярной массой 49 кДа.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, сероводород, клеточная стенка.

Одержано: 18.10.2012