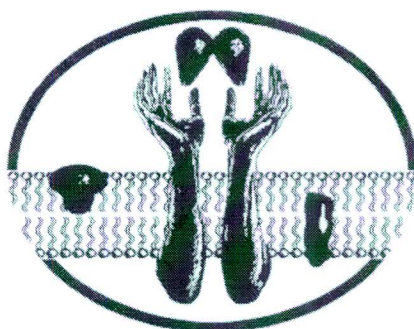


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК  
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

## РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

27–30 мая 2013 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 2

Под редакцией  
В.П. Зинченко, А.В. Бережнова

Пушино  
2013



# СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕАЛИЗАЦИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА НА ОГРАНИЧЕНИЕ ПИТАНИЯ У БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES MAXIMA*

*Кляйн О.И.<sup>1</sup>, Исакова Е.П.<sup>1</sup>, Дерябина Ю.П.<sup>1</sup>,  
Куликова Н.А.<sup>1,2</sup>, Королева О.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, РФ

Известно, что высокий уровень активных форм кислорода (АФК) в грибной клетке провоцирует значительные изменения клеточной физиологии и биохимии, которые характеризуются массовым окислением белков и их последующей деградацией, гликозилированием и карбонилированием белков, окислением глутатиона, изменением уровня восстановленности пиридиновых нуклеотидов, возрастанием клеточной KCN-резистентности [1]. Образование АФК является конечным проявлением большинства стрессорных воздействий (температурный стресс, УФ-облучение, осмотический шок, истощение субстратов, воздействие оксидантов и ксенобиотиков, радиации, и т.д.) [2]. Одним из ключевых компонентов в реализации ответа клетки на окислительный стресс являются митохондрии, однако, характер взаимоотношений участников каскада клеточного сигналинга, генерации АФК и функционирования компонентов дыхательной цепи митохондрий в настоящее время остается до конца невыясненным. Известно, что возрастание доли цианид-резистентного дыхания, связанного с переносом электронов от убихинона дыхательной цепи митохондрий непосредственно на  $O_2$  с образованием  $H_2O$  при участии альтернативной оксидазы (АО), является одним из ответов грибов и дрожжей на действие окислительного стресса [3]. Этот путь переноса электронов, не связан с запасанием энергии, и предположительно, приводит к снижению образования АФК в дыхательной цепи, уменьшая последствия стрессового воздействия на клетку. Существуют данные, что АО митохондрий активируется в клетках в ответ на возрастание уровня клеточных АФК [5]. Согласно современным представлениям, АО может рассматриваться как еще один элемент антиоксидантной защиты клетки. Однако, особенности регуляции ее индукции остаются до конца неизученными. Уровень экспрессии этого белка регулируют различные стимулы – в случае, когда сигналинг приводит к перераспределению митохондриальных функций с последующей трансдукцией сигнала из митохондрий в ядро, этот путь называется ретроградным ответом. Однако, если стимул действует на экспрессию гена АО без воздействия



на митохондриальные функции, этот ответ называется антероградным. Предполагают, что в случае переключения митохондриальной цепи на альтернативные пути происходит увеличение альтернативной дыхательной активности, снижение уровня генерируемых митохондриями АФК и затухание массивных апоптоз-промотирующих сигналов в клетке.

Задача представленной работы – исследовать возможную сигнальную роль АФК и компонентов митохондриальной дыхательной цепи в реализации адаптивного ответа на ограничение питания у базидиомицета *Trametes maxima*.

**Методы.** Объектом исследования служил штамм *Trametes maxima* 0275 из коллекции культур Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН.

Культивирование *T. maxima* осуществляли, как описано ранее [7] в течение 7 сут. на полной и лимитированной (аналогичного состава, но без глюкозы) питательных средах.

Для оценки интенсивности дыхания использовали дезинтегрированную суспензию клеток гриба. Для получения клеточной суспензии 1 г мицелия разрушали в гомогенизаторе Поттера, в течение 1 мин на холоду. Анализ дыхательной активности клеток гриба производили на многоканальной микроэлектродной установке с системой сбора информации и программой Record-4 (ИБК РАН).[8]. Измерения интенсивности клеточного дыхания проводили при 25°C. Среда инкубации клеточной суспензии содержала: 1,2 М сорбита, 10 мМ ПEPES-буфер, pH=7,5; 0,5% БСА. Удельную скорость дыхания нормировали на сухой вес мицелия. Определение сухого веса клеточной суспензии проводили при помощи высушивания определенного объема суспензии клеток при 105°C до постоянного веса.

Для оценки динамики АФК в клетке использовали DCFH-DA – флуоресцентный краситель. В клеточную суспензию добавляли 40 мкМ раствора DCFH-DA (Sigma, США) в среде инкубации и экспонировали в течение 30 мин в темноте, после чего дважды промывали буфером. Измерение флуоресценции производили при длине волны возбуждения 485 нм. В каждую лунку вносим по 200 мкл гомогената+иницирующее/ингибирующее вещество KCN (4 мМ), SHAM (2 мМ). Измерения проводили каждые 30 мин.

**Результаты и их обсуждение. Дыхательная активность и индукция АО.** В исследованиях были использованы 2 экспериментальные модели – культивирование базидиомицета в условиях лимитированной среды (без глюкозы), имитирующей природные условия, и выращивание микроорганизма в классических лабораторных условиях (1% глюкозы). Анализ параметров дыхательной активности выявил стабильно высокий уровень эндогенного клеточного дыхания, практически



нечувствительный к внесению в среду исследования экзогенного субстрата (1% глюкозы), у обоих вариантов культивирования штамма (таблица). Известно, что в митохондриях у большинства видов растений, грибов и дрожжей имеет место альтернативный путь переноса электронов, который индуцируется в присутствии ингибиторов основного (цитохромного) пути – KCN, азида, антимицина А [9-11]. Переключение электронного потока происходит на уровне восстановленного убухинона и специфически ингибируется производными бензгидроксиамовой кислоты. Индукция этого пути является способом, помогающим клетке избежать избыточной генерации АФК при развитии окислительного стресса. Выявление возможной индукции альтернативных путей дыхания в наших исследованиях показало, что она имеет место как в случае лимитирования по субстрату, так и на полной среде, содержащей глюкозу. Для оценки активности альтернативного KCN-резистентного пути переноса электронов исследовалось влияние этих ингибиторов на скорость дыхания всех исследуемых вариантов (таблица).

**Таблица.** Ингибиторный анализ дыхания протопластов гриба-базидиомицета *T. taxitza*.

Параметр	Модель выращивания гриба	
	Минимальная среда	Полная среда
Скорость эндогенного дыхания, $\mu\text{г-атом O на 1 г сухого веса}$	291±37	398±57
KCN резистентность, %	71	38
<b>Ингибирование общего дыхания, %</b>		
KCN, 2 мМ	29±2	62±5
SHAM, 2 мМ	71±10	56±7
KCN+SHAM	97±2	95±5

Ингибиторный анализ показал, что дыхательная активность клеточной суспензии гриба в присутствии блокаторов электрон-транспортной цепи подавлялась, и степень ингибирования зависела от варианта культивирования гриба. Как видно, при выращивании грибов на лимитированной среде, KCN-резистентность в присутствии 2 мМ ингибитора составляла около 70%. В то же время на богатой среде этот показатель уменьшался до 38%. Для всех вариантов последующая добавка салицилгидроксиамовой кислоты (SHAM) в концентрации 2 мМ приводила к практически полному ингибированию дыхательной активности. Полученные результаты кажутся вполне логичными, если принять во внимание повышенное стрессовое давление внешней среды, обусловленное ограничением по субстрату в случае культивирования без глюкозы, приводящее к индукции АО в клетках грибов [12]. Интересно отметить, что дыхательная активность мицелия *T. taxitza* блокировалась



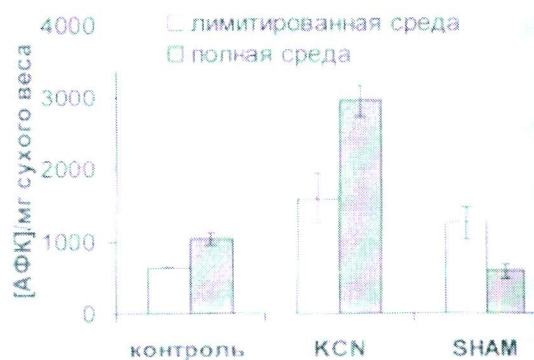
2 мМ SHAM на 60-80% и 50-60% соответственно в условиях лимитированной и полной сред выращивания (таблица). Это могло свидетельствовать о конститутивной индукции фермента в ходе роста и развития гриба.

Индукция АО митохондрий в ответ на стрессовые условия среды может быть обусловлена избыточной генерацией АФК в клетке [5]. Функционально поврежденные митохондрии [13] и АФК выступают в качестве сигналов для увеличения экспрессии АО у целого ряда грибных видов, таких как *Magnaporthe grisea* [14], *Neurospora crassa* [4], *Aspergillus fumigatus* [15], *Candida albicans* [16], и *Paracoccidioides brasiliensis* [10]. АО защищает клетки от окислительного стресса, о чем свидетельствует низкий уровень восстановленного убихинона, поддерживаемый активностью АО [17-19] Angelova и соавторы [20], используя 12 видов грибов, показали положительное влияние АФК-генерирующих агентов параквата и перекиси водорода на индукцию альтернативных дыхательных путей. Поэтому следующим этапом работы являлось определение генерации АФК в мицелии *T. maxima* в условиях ингибирования основного (цитохромного) и альтернативного путей переноса электронов в митохондриях гриба.

**Генерация АФК в клетках мицелия *T. maxima*.** Исследование уровня генерации АФК в клетках *T. maxima* с использованием специфического флуоресцентного зонда H<sub>2</sub>DCF-DA показало, что этот показатель также существенным образом зависел от состава питательной среды. Продукция АФК на лимитированной среде была примерно на 50% ниже, чем в условиях полной среды

(рисунок). Эти на первый взгляд неожиданные результаты можно объяснить тем, что индукция АО в условиях лимитированной среды защищает клетки грибов, предотвращая сверхпродукцию АФК. 2 мМ цианид, добавленный к суспензии протопластов, увеличивал уровень АФК более чем в 2 раза в случае обеих экспериментальных моделей (рисунок). Ингибитор альтернативного пути 2 мМ SHAM

вызывал увеличение уровня АФК более чем в 2 раза на лимитированной среде и в той же степени снижал этот параметр в условиях полной среды (рисунок). Эти данные продемонстрировали полное соответствие степени индуцирования альтернативного пути в исследуемых экспериментальных моделях (таблица). Низкий уровень активности АО на полной среде соответствовал более высокой активации генерации АФК в присутствии



**Рисунок.** Пероксид-радикал-индуцированное окисление H<sub>2</sub>DCF-DA до DCF в мицелии *T. maxima*.



KCN, что вполне согласовывалось с защитной функцией этого фермента в клеточном адаптивном ответе грибов на недостаток питания [12]. В то же время, более низкая генерация АФК на лимитированной среде в присутствии ингибитора основного пути переноса электронов может быть связана с активацией АО в этих условиях. Аналогичным образом можно объяснить противоположный эффект на генерацию АФК ингибитора альтернативной оксидазы SHAM.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать предварительное заключение, что у базидиомицета *T. maxima* АО выполняет функцию защиты клеток от разрушительного действия АФК в условиях стресса, вызванного лимитированием субстрата. В свою очередь, можно предположить, что АФК, генерируемые преимущественно в митохондриальном компартменте клетки, в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды, могут выполнять роль сигнальных молекул в реализации ретроградного ответа клетки на стресс, мишенью которого могут быть компоненты дыхательной цепи митохондрий и, в частности, АО [5].

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8111.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гесслер Н.Н. и др. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 1342-64.
2. Scandalios J.G. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 995-1014.
3. Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C. // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 95. P. 364-71.
4. Tanton L.L. et al. // Genet. Biol. 2003. V. 39. P. 176-90.
5. Aken O.V., Giraud E., Clifton R., Whelan J. // Physiologia Plantarum. 2009. V. 137. P. 354-61.
6. Lushchak V.I. // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2011. V. 153. P. 175-90.
7. Koroljova-Skorobogat'ko O.V. et al. // Biotec. Appl. Biochem. 1998. 28. P. 47-54.
8. Шольц К.Ф., Островский Д.Н. // Методы современной биохимии. М.: Наука. 1975. С. 52-8.
9. Меденцев А.Г. и др. // Биохимия. 1999. Т. 64. № 11. С. 1457-72.
10. Martins V.P. et al. // J. Bioenerg. Biomembr. 2011. V. 43. P. 81-8.
11. Li Q. et al. // Biotechnol. Lett. 2011. V. 33. № 3. P. 457-67.
12. Ferretti A.C. et al. // Mol. Genet. Metab. 2012. V. 105. № 2. P. 186-92.
13. Chae M.S., Nargangf E. // Physiol. Plant 2009. V. 137. P. 407-18.
14. Yukioka H. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 8. P. 161-9.
15. Magnani T. et al. // J. Bioenerg. Biomembr. 2009. V. 40. P. 631-6.
16. Hwang C.S. et al. // Yeast. 2003. V. 20. P. 929-41.
17. Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. // PNAS USA. 1999. V. 6. P. 8271-6.
18. Moller I.M. // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 561-91.
19. Rhoads D.M., Subbaiah C.C. // Mitochondrion. 2007. V. 7. P. 177-94.
20. Angelova M.B. et al. // Mycol. Res. 2005. V. 109. № 2. P. 150-8.