

На правах рукописи

**МЕДЕНЦЕВ АЛЕКСАНДР ГРИГОРЬЕВИЧ**

**Биосинтез нафтохинонов и цианидрезистентное  
дыхание в ответе микроскопических грибов (*Fusarium*,  
*Verticillium* и *Yarrowia*) на стрессовые воздействия**

**(03.00.07.- микробиология)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Пушино, 2004



Работа выполнена в Лаборатории анаэробного метаболизма микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор В.К. Акименко

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор Ю.А. Троценко  
Доктор биологических наук, профессор Е.П. Феофилова  
Доктор биологических наук В.Ю. Любимов

**Ведущая организация:**

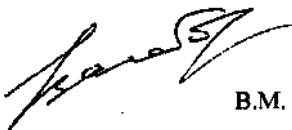
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится 25 ноября 2004 г. в \_\_\_9<sup>00</sup>\_\_\_  
на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Институте  
биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН  
по адресу: 142290, г. Пушкино, Московской обл., проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Автореферат разослан «22» октября 2004 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
доктор биологических наук



**В.М. Варабов**

2005-4  
18851

906382

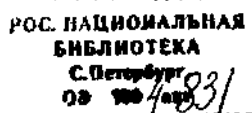
1

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Микроорганизмы, в отличие от высших организмов, ограничены в выборе своего микроокружения. Но они реализуют потенциальную возможность включать специальные реакции в ответ на изменения окружающей среды, что обеспечивает им выживание и конкурентоспособность по отношению к другим организмам. В природе выживание под действием стрессовых факторов - достаточно распространенный факт. Однако механизмы адаптации и способы выживания грибов до настоящего времени остаются мало изученными.

В широком понимании, к неблагоприятным стрессовым факторам, приводящим к частичному или полному торможению роста, относят следующие: недостаток элементов питания; не оптимальные рН, температура, ионная сила; высокие концентрации этанола, ионов тяжелых металлов; высушивание; воздействие активных форм кислорода, токсичных метаболитов растительного, микробного и антропогенного происхождения. Под действием стрессовых факторов в клетках микроорганизмов происходит изменение внутриклеточных сигналов, прямо или опосредованно действующих на экспрессию генов. Это, в свою очередь, приводит к изменению ферментного аппарата, проявлением чего является биосинтез вторичных метаболитов, развитие устойчивости к метаболитам, образуемым другими организмами, изменение переносчиков дыхательной цепи митохондрий, дифференцировка и др. Исследование адаптационных механизмов микроорганизмов представляется особенно актуальным, поскольку именно в стрессовых условиях они способны осуществлять процессы, важные для человека, такие как детоксикация вредных соединений, синтез и накопление различных метаболитов (антибиотиков, токсинов, пигментов и др.). Изучение ответных реакций микроорганизмов на воздействие стрессовых факторов важно для решения многих проблем, в том числе и вопросов, касающихся взаимодействия грибов с другими видами в природных и искусственных экосистемах.

Наличие высокой конкуренции в процессе межвидового взаимодействия в природном окружении приводит к появлению у грибов специфических механизмов, повышающих их способность к выживанию (Великанов и Сидорова, 1980). Типичным примером такого взаимодействия могут служить взаимоотношения фитопатогенных грибов и пастений. Известно Ebel and Mithofer. 19981. что инвазия



фитопатогенных грибов в растительную клетку приводит к защитным реакциям, включающим образование активных форм кислорода (супероксид-радикалы, и  $H_2O_2$ ), синтез фитоалексинов, цианогенных и серусодержащих гликозидов, при гидролизе которых происходит образование цианида и  $H_2S$ , ингибирующих дыхательную цепь. Грибы, в свою очередь, способны адаптироваться к этим воздействиям. Так, в ответ на воздействие оксидантов они увеличивают активность каталазы, супероксиддисмутазы, повышают синтез метаболитов, участвующих в детоксикации активных форм кислорода (восстановленный глутатион, НАД(Ф)Н и др). В качестве ответной реакции грибы в стрессовых условиях способны осуществлять синтез различных вторичных метаболитов, в том числе соединений нафтохиноновой природы. Нафтохиноновые пигменты широко распространены в живой природе и обнаружены не только у грибов, но и у высших растений и актиномицетов (Thomson, 1971).

Актуальность исследования нафтохиноновых пигментов грибов обусловлена тем, что эти соединения проявляют широкий спектр биологического действия, включая фитотоксическое, инсектицидное, антибиотическое и фунгицидное (Kern, 1978; Baker et al, 1990). Некоторые из нафтохинонов действуют как цитостатические и антиканцерогенные реагенты (Kurobane et al, 1986; Osorio et al, 2003).

К началу настоящей работы, исследования, связанные с изучением нафтохинонов у грибов, имели прикладной характер и заключались в получении (наработке) пигментов в количествах, необходимых для изучения их структуры. Установлена структура более 100 нафтохиноновых метаболитов, продуцируемых 63 видами грибов (Medentsev and Akimenko, 1998). Как правило, в исследованиях по биосинтезу пигментов для выращивания грибов использовались богатые органические среды со сложным и неопределенным составом. Природа фактора, вызывающего синтез нафтохинонов, оставалась неизвестной. Оставались нерешенными также вопросы о механизме токсического действия нафтохинонов и устойчивости грибов к собственным метаболитам, хотя именно эти аспекты являются наиболее важными в решении задачи о физиологической роли синтезируемых пигментов для продуцента.

У микроорганизмов в зависимости от условий культивирования обнаружено также наличие множественных форм терминальных оксидаз, среди которых у грибов особое место занимает цианидрезистентная альтернативная оксидаза. Альтернативная оксидаза локализована в

митохондриях и катализирует перенос электронов от восстановленного убихинона (коэнзима Q) на кислород в обход основной цитохромной дыхательной цепи.

Актуальность изучения цианидрезистентного дыхания определяется, прежде всего, тем, что это явление носит общебиологический характер. Альтернативная оксидаза обнаружена у простейших одноклеточных представителей животного мира, высших растений и грибов (Siedow and Umbach, 1995; Меденцев с соавт., 1999; Veiga et al, 2003). Несмотря на определенные успехи в изучении альтернативной оксидазы на молекулярном уровне, ее физиологическая роль остается неясной.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы - исследование ответных реакций грибов на воздействие стрессовых факторов, а именно: изучение биосинтеза и роли вторичных метаболитов (нафтохинонов) у грибов и выявление факторов, контролирующих появление и активность альтернативной цианидрезистентной оксидазы.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить качественный и количественный состав синтезируемых нафтохинонов грибами родов *Fusarium* и *Verticillium* в зависимости от вида стрессовых воздействий, включая окислительный стресс, экстремальные значения pH, лимитирование роста источниками азота и фосфора, воздействие ингибиторов дыхания (антимидин А, цианид) и некоторых фитоалексинов.
2. Изучить механизм антибиотического и фитотоксического действия нафтохинонов.
3. Исследовать механизмы устойчивости гриба *Fusarium decemcellulare* к действию собственных токсических метаболитов.
4. Определить факторы, контролирующие появление цианидрезистентной альтернативной оксидазы у грибов. Изучить изменение дыхательной активности и содержания адениновых нуклеотидов у грибов при появлении цианидрезистентного дыхания.
5. Исследовать механизм регуляции активности альтернативной оксидазы у грибов и определить факторы, контролирующие ее вклад в общее дыхание клеток.
6. Выяснить роль альтернативной цианидрезистентной оксидазы в поддержании роста грибов и процесса биосинтеза нафтохиноновых пигментов.

**Научная новизна.** Изучены ответные реакции грибов на действие различных стрессовых факторов. Впервые показано, что прекращение роста грибов рода *Fusarium* и *Verticillium* при воздействии таких стрессовых факторов, как экстремальные значения pH, недостаток источников азота, фосфора, окислительный стресс, добавление ингибиторов дыхания (антимидин А, цианид) сопряжено с биосинтезом нафтохинонов. Среди выделенных и идентифицированных 13-ти метаболитов обнаружено 3 новых соединения, структура которых установлена с помощью физико-химических методов. Определены факторы, регулирующие качественный состав синтезируемых нафтохинонов. Впервые показано, что, в зависимости от условий культивирования, гриб *F. decemcellulare* синтезирует внеклеточные нафтохиноны нафтазариновой структуры или внутриклеточный димерный нафтохинон - аурофузарин. Установлено, что основным фактором, определяющим природу конечного продукта, является pH среды культивирования. Обнаружено, что некоторые защитные метаболиты растений - фитоалексины (госсипол, кверцетин, кумарины), подавляют биосинтез пигментов.

Изучен механизм антибиотического и фитотоксического действия нафтохинонов. Впервые показано, что в основе этого механизма лежит «хиноновый редокс-цикл», в котором нафтохиноны в качестве аутооксидабельных соединений, при участии флавин-зависимых дегидрогеназ, катализируют в клетках растений, грибов и бактерий окисление НАД(Ф)Н с образованием активных форм кислорода (супероксидрадикал,  $H_2O_2$ ) и радикальных форм самих пигментов, обладающих мощным цитотоксическим действием.

Впервые изучен механизм устойчивости гриба-продуцента к собственным нафтохинонам. Установлено, что основу защитного механизма составляет реакция деметилирования 7-метокси-группы хинонового кольца нафтохинонов, в результате чего нафтохиноны утрачивают способность акцептировать восстановительные эквиваленты с флавиновых НАД(Ф)Н-зависимых дегидрогеназ. Кроме того, в присутствии собственных нафтохинонов у грибов-продуцентов увеличивается активность супероксиддисмутазы и каталазы, основных ферментов против окислительного стресса.

Показано, что в условиях окислительного стресса, а также в присутствии ингибиторов дыхания (антимидина А) у гриба *F. decemcellulare* наблюдается появление цианидрезистентного дыхания (альтернативной оксидазы). Альтернативная оксидаза в этих условиях

выполняет функцию единственной терминальной оксидазы, обеспечивающей рост гриба и биосинтез нафтохинонов. Показано, что у *Yarrowia lipolytica* альтернативная оксидаза присутствует в митохондриях наряду с полноценной цитохромной цепью. Впервые изучен механизм распределения электронов между двумя путями окисления. Исследованы факторы регуляции и свойства альтернативной оксидазы. Установлено, что ее основная функция состоит в поддержании окислительной активности клеток в условиях нарушения переноса электронов по основному цитохромному пути.

**Практическая значимость.** Полученные результаты вносят существенный вклад в представление о механизмах адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям среды обитания и роли этих механизмов в эволюционных процессах. Представленные данные можно рассматривать не только как пример реакции биологической системы на неблагоприятные факторы внешней среды, но и как часть модельной системы взаимоотношений грибов с другими видами в природных экосистемах. Результаты исследования регуляции биосинтеза нафтохиноновых пигментов грибами могут быть использованы как основа при разработке эффективных технологий синтеза различных вторичных метаболитов (антибиотиков, пигментов и др.).

Установлено, что некоторые нафтохиноны являются микотоксинами. Совместно с НИИ птицеводства (Украина, г. Харьков) проведено исследование состава зерна, пораженного грибами рода *Fusarium*, которое при скармливании курам - несушкам вызывало признаки синдрома ухудшения качества яйца, проявляющегося в снижении оплодотворяемости яйца и выводимости цыплят. Установлено, что проявление указанного синдрома обусловлено наличием в зерне димерного нафтохинона ауурофузарина. Разработан метод анализа содержания ауурофузарина в зерне. Результаты изучения биосинтеза нафтохинонов и их токсического действия могут использоваться при решении практических задач сельского хозяйства (контроль качества зерна).

**Апробация работы.** Основные материалы диссертации были представлены и обсуждались на 2-м Международном Симпозиуме «Сверхсинтез микробных продуктов» (Прага, 1988), на 2-м съезде биохимического общества (Пушино, 1997), на Международном

симпозиуме «Современные проблемы микробной биохимии и биотехнологии» (Пушино, 2000), на конференции «От современной фундаментальной биологии к новым наукоёмким технологиям». (Пушино, 2001), на Международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Волгоград - Пермь, 2001), на 3-й Международной конференции по *Yarrowia lipolytica*, «Биология клетки и биотехнология нетрадиционных дрожжей» (Дрезден, Германия, 2002), на 1-м Международном конгрессе европейских микробиологических обществ Любляна 2003, на 11-м Международном конгрессе по дрожжам (Рио де Жанейро, Бразилия, 2004).

Работа по теме диссертации была поддержана грантами РФФИ: «Роль фитоалексинов в развитии фитоиммунитета при взаимодействии грибов и растений (96-04-50222); «Развитие и условие функционирования цианидрезистентного пути окисления у дрожжей и грибов» (98-04-48148); «Адаптация фитопатогенных грибов к окислительному стрессу» (99-04-48872); «Изучение факторов, контролирующей активность цианидрезистентного пути окисления в митохондриях дрожжей» (01-04-48680).

**Публикации.** Материалы диссертации представлены в более чем 40 публикациях, в том числе - 2 обзора и свыше 30 научных статей.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на страницах машинописного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы (главы 1,2), материалы и методы исследования (глава 3), результаты (главы 4,5), обсуждение результатов (глава 6), выводы и список литературы (387 источников). В тексте представлено 42 рисунка и 19 таблиц.

**Благодарность.** Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному консультанту д.б.н., профессору В.К. Акименко за многолетнюю помощь и поддержку при выполнении этой работы; сотрудникам лаборатории анаэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН, принимавших участие в проведении исследований, к.б.н. Головченко Н.П., к.б.н. Трутко СМ., к.б.н. Аринбасаровой А.Ю., лаборантам Казаковой М.Д. и Пайвиной З.В., ст. лаб. Смирновой Н.М. Особую благодарность выражаю сотрудникам ИБФМ РАН Баскунову Б.П., Нефедовой М.Ю., к.б.н. Сахаровскому В.Г. за снятие масс-, ИК- и н-ЯМР-спектров и их интерпретацию.



## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** включает две главы, содержащие описание истории и современное состояние вопроса по биосинтезу нафтохиноновых метаболитов микроскопическими грибами (глава 1), условиям появления и свойствам цианидрезистентной альтернативной оксидазы у высших растений и грибов (глава 2).

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ** (глава 3).

В работе изучались микроскопические грибы рода *Fusarium* (*F. decemcellulare* F-1179, *F. bulbigenum*, *F. graminearum*), *Verticillium* (*V. dahliae*), *Yarrowia* (*Y. lipolytica* Y-155), полученные из ВКМ РАН. Выращивание проводили на солевой среде Ридер и среде Чапека.

**Выделение и очистку нафтохинонов** осуществляли с помощью препаративной тонкослойной хроматографии на пластинках (Si-60, «Merck») в системе хлороформ: уксусная кислота: метанол (96:2:2).

**Идентификацию** и изучение структуры метаболитов проводили с помощью ИК, <sup>1</sup>H-ЯМР, УФ- и масс-спектрометрии. Спектры поглощения пигментов регистрировали на спектрофотометре UV-160 «Shimadzu» (Япония). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Finnigan MAT-8430. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре FTJR-1710 «Perkin Elmer», в таблетках КВг. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР пигментов регистрировали в CDC1<sub>3</sub> на спектрометре типа WPTO S9 «Brucker» (Германия) с тетраметилсилианом (ГМС) в качестве внутреннего стандарта. Температуру плавления кристаллов метаболитов определяли на плавильном столике «Nagema».

**Потребление кислорода** нативными клетками грибов и субклеточными фракциями измеряли полярографическим способом с использованием закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода типа Кларка. Восстановление феррицианида регистрировали на спектрофотометре С-356 «Hitachi» (Япония) при двух длинах волн 420-470 нм.

**Выделение субклеточных фракций** из клеток грибов и проростков гороха осуществляли методом дифференциального центрифугирования, после разрушения клеточной стенки грибов улиточным ферментом, а растений - в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Активность ферментов измеряли спектрофотометрически. За единицу активности принимали превращение 1 мкмоль субстрата или образование 1 мкмоль продукта за 1 мин 1 мг белка или 1 мг сухих клеток.

**Экстракцию** адениновых нуклеотидов и **цАМФ** из грибов осуществляли 5%-ной хлорной кислотой. Для определения цАМФ использовали стандартный набор фирмы Amersham. Концентрации АТФ, АДФ, АМФ определяли на флуориметре MPF-4 («Hitachi», Япония) по флуоресценции НАДФН с гексокиназой, пируваткиназой и миокиназой (Estabrook et al, 1967). Аденилатный энергетический заряд рассчитывали по формуле:

$$([\text{АТФ}] + 0,5 [\text{АДФ}]) / ([\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] [\text{АМФ}]).$$

**Образование супероксид-радикала** регистрировали по осстановлению цитохрома *c* при 550 нм на спектрофотометре Hitachi-356 (McCord and Fridovich, 1969).

**Супероксиддисмутазную активность** определяли на спектрофотометре UV-160 «Shimadzu» (Япония), по степени ингибирования восстановления цитохрома *c* (550 нм) супероксидрадикалом, регенерируемым в процессе окисления ксантина (0,5 мМ) ксантиноксидазой (1.0 Е) фирмы (Serva) (McCord and Fridovich, 1969).

**Каталазную активность** регистрировали по изменению поглощения перекиси водорода при 240 нм (Beers and Sizer, 1952).

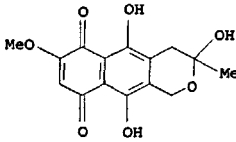
**Глюкозу** определяли полярографически с помощью глюкозооксидазы.

**Концентрацию белка** митохондрий, субмитохондриальных частиц (СМЧ) и других фракций определяли с помощью биуретового реактива.

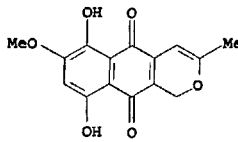
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

### НаФтохиноновые метаболиты (глава 4)

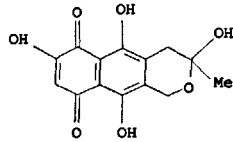
**Биосинтез нафтохинонов.** В результате скрининга более 30 культур. В результате скрининга более 30 культур грибов были обнаружены грибы *F. decemcellulare*, *F. graminearum*, *F. bulbigenum* и *V. dachliae*, синтезирующие вторичные метаболиты нафтохиноновой природы в условиях прекращения роста при воздействии различных стрессовых факторов. Было выделено и идентифицировано 13 нафтохиноновых пигментов (рис. 1). Среди указанных метаболитов - три не известных ранее соединения: о-деметил-фузарубин (3), о-деметил-яваницин (6) и о-деметил-бострикоидин (8). Их структура была установлена с помощью ИК, <sup>1</sup>Н-ЯМР, УФ- и масс- спектрометрии, (табл. 1 и 2).



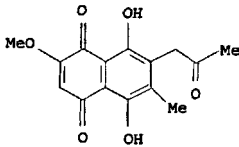
1. Фузарубин  
(*F. decemcellulare*)



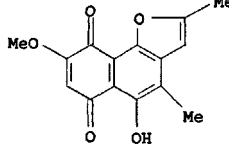
2. Ангидрофузарубин  
(*F. decemcellulare*)



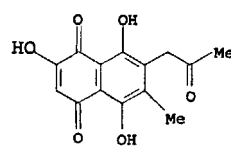
3. o-Деметил-фузарубин  
(*F. decemcellulare*)



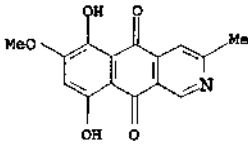
4. Яваницин  
(*F. decemcellulare*)



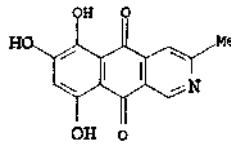
5. Ангидрояваницин  
(*F. decemcellulare*)



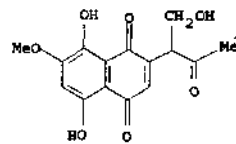
6. o-Деметил-яваницин  
(*F. decemcellulare*)



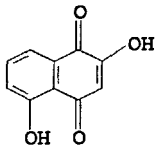
7. Бострикоидин  
(*F. decemcellulare*)



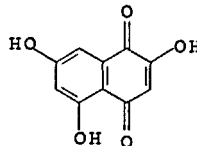
8. o-Деметил-бострикоидин  
(*F. decemcellulare*)



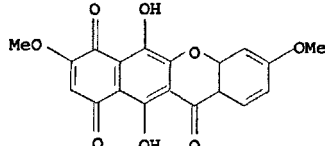
9. Новарубин  
(*F. decemcellulare*)



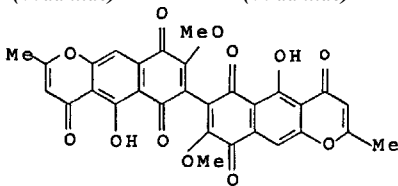
10.2-оксиглон  
(*V. dahliae*)



11. Флавиолин  
(*V. dahliae*)



12. Бикаверин  
(*F. bulbigenum*)



13. Ауруфузарин (*F. decemcellulare*, *F. graminearum*)

Рис. 1. Нафтохиноновые пигменты грибов *Fusarium* и *Verticillium*.  
3,6, 8- Новые метаболиты

Таблица 1. Физико-химические характеристики яваницина, фузарубина, бострикоидина и их о-деметильных производных

Пигмент (условия кристаллизации; температура плавления; $R_f^*$ )	$\lambda_{\text{макс}}$ в УФ и видимой областях, нм		ИК-спектр $\nu_{\text{макс}}$ , $\text{см}^{-1}$ . таблетки КВг	Основные интенсивные пики в масс-спектре, m/z, %
	этанол	этанол (NaOH)		
Яваницин (красные иглы из ацетона; 206—207°; 0,65)	230, 305, 475, 505, 540	230,305, 520,551, 588	2940,2840, 1740, 1635	290(69), 291(13), 249(13), 248(100), 247(23), 236(12)
о-Деметил-яваницин (красные кристаллы из гексана, 154–155°, 0,35)	230,310, 475, 505, 544	230,310, 500,535, 570	3425,2940, 2870,1740, 1635	276(48), 277(8), 235(15), 234(100), 233(11), 206(18), 205(15)
Фузарубин (красные кристаллы из ацетона; 195– 198°, 0,29)	227, 303, 475,498, 535	227,305, 510**, 546, 580	3380,1620, 1575	306(27), 289(6), 288(30), 273(14), 247(16), 246(100), 245(9), 235(9)
о-Деметил-фузарубин (красные кристаллы из гексана; 195–197°, 0,20)	227, 306, 475,498, 535	227,306, 498,528, 565	3450,3300**, 1620,1575	292 (17), 275 (16), 274 (100), 273 (7), 259 (5), 246 (16), 233 (10)
Бострикоидин (темно- коричневые кристаллы из ацетона; 238 - 242°; 0,43)	252, 322, 478, 500, 532	260,310, 510**, 542,575	1628,1590 1477	285(100), 286(10), 267(10), 255(10), 242 (10), 239(8), 214(11)
о-Деметил-бострикоидин (темно-коричневые кристаллы из этанола; 221 - 223°; 0,38)	252,340, 476,496, 530	230,290, 485**, 525,556		271(100), 272(17), 253 (4), 243(12), 225 (4), 219(3), 197(5)

\* Система - хлороформ : метанол : уксусная кислота = 96 : 2 : 2 (v : v : v).

\*\* -плечо

Для более детального дальнейшего исследования был выбран гриб *F. decemcellulare*, образующий более 10 метаболитов. Оказалось, что в зависимости от вида стрессового воздействия спектр синтезируемых метаболитов менялся (табл. 1). Так, при торможении роста гриба, обусловленном снижением pH среды роста ниже 4,0 происходило накопление внеклеточных растворимых нафтохинонов (рис. 1, соединения 1,2,4,5,7,9). Напротив, при торможении роста, обусловленном повышением pH среды культивирования до 8,0 и выше,

**Таблица 2. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР фузарубина, яваницина и их о-деметильных производных (S, м.д. относительно ТМС).**

<sup>1</sup> H	Фузарубин	о-Деметил-фузарубин	<sup>1</sup> H	Яваницин	о-Деметил-яваницин
H-1	3,00	2,96	9-CH <sub>3</sub>	2,24	2,25
H-1	2,68	2,68	10-CH <sub>3</sub>	2,28	2,29
H-4	4,90	4,91	12-CH <sub>3</sub>	3,90	3,90
H-4	4,80	4,85	7-ОСН <sub>3</sub>	3,94	—*
H-8	6,17	6,34	H-6	6,21	6,34
3-CH <sub>3</sub>	1,62	1,65	1-ОН	13,23	13,32
3-ОН	2,20	2,20	4-ОН	12,85	12,06
7-ОСН <sub>3</sub>	3,95	—*			
5-ОН	12,65	13,01			
8-ОН	12,99	11,88			

—\* - Нет сигнала.

ТМС—тетраметилсилан.

**Таблица 3. Стрессовые воздействия и синтезируемые метаболиты**

Стрессовые воздействия на гриб <i>F. decemcellulare</i>	Нафтохиноны
pH < 4,0	Растворимые внеклеточные
Ингибиторы дыхания (антимидин А или KCN), pH 4,0-3,0	Растворимые внеклеточные
pH > 8,0	Внутриклеточный димерный (аурофузарин)
Лимит по азоту (pH 5,5-6,5)	Аурофузарин
Лимит по фосфору (pH 5,5-6,5)	Аурофузарин
Ингибиторы дыхания (антимидин А или KCN), pH 5,5-6,5	Аурофузарин
Окислительный стресс (H <sub>2</sub> C>2, юглон* - как супероксид-генерирующий агент)	Аурофузарин
Фитоалексины (госсипол, кверцетин, кумарины)	Ингибирование биосинтеза

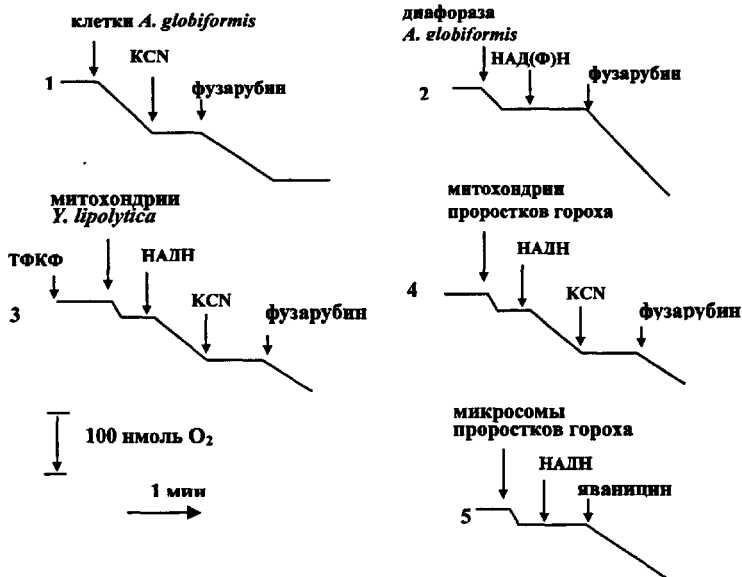
\*юглон - 2 - гидроксинафтохинон.

наблюдался биосинтез единственного внутриклеточного димерного нафтохинона - аурофузарина (соединение 13). Накопление этого соединения происходило также при лимитировании роста источниками азота или фосфора при pH 5.5-6.5 и в условиях окислительного стресса (при воздействии перекиси водорода или юглона как супероксидгенерирующего агента).

В результате изучения влияния условий культивирования на биосинтез пигментов было выявлено закономерности, определяющие природу и свойства образуемых соединений. Оказалось, что основным фактором, определяющим природу конечного продукта, является pH среды культивирования.

Важным моментом в понимании регуляции биосинтеза нафтохинонов являются данные по влиянию на этот процесс ингибиторов дыхания — цианида калия и антимицина А (табл. 1). Указанные ингибиторы, тормозили рост гриба, однако не подавляли биосинтез нафтохинонов. Кроме того, в их присутствии у гриба *F. decemcellulare* наблюдалось появление альтернативного цианидрезистентного пути окисления, который обеспечивает рост и биосинтез пигментов.

**Механизм антибиотического и фитотоксического действия нафтохинонов.** Нафтохиноновая природа исследуемых пигментов и их способность к циклическому изменению окраски, под действием восстановителей (дитионита) и окислителей (кислорода воздуха) позволили предположить, что эти соединения взаимодействуют с окислительно-восстановительными ферментами клеток в качестве акцепторов электронов. Для проверки этого предположения было изучено влияние пигментов на дыхательную активность интактных бактериальных клеток, а также субклеточных фракций грибов и проростков гороха: митохондрий, растворимой цитоплазматической фракция (диафоразы) и микросом. Дыхание бактерии *Arthrobacter globiformis* после подавления его цианидом реактивировалось при добавлении нафтохинонов (на примере фузарубина) (рис. 2, кривая 1). Фузарубин катализировал потребление кислорода растворимой цитоплазматической фракцией бактерий (кривая 2). Необходимо отметить, что пигменты катализировали потребление кислорода диафоразами в присутствии не только НАДН, но и НАДФН. Аналогичные результаты по активации потребления кислорода



**Рис. 2.** Влияние пигментов на потребление кислорода интактными клетками и субклеточными фракциями.

1 - интактные бактериальные клетки; 2 - растворимые цитоплазматические фракции (диафоразы) бактерий; 3 - митохондрии грибов; 4 - митохондрии проростков гороха; 5 - микросомы проростков гороха.

Добавки: цианид, НАД(Ф)Н - 1 мМ, фузарубин - 70 мкМ, ангидрофузарубин - 10 мкМ, диафоразы - 0,35 мг белка/мл, мембраны - 0,5 мг/мл, клетки - 1,8-2,0 мг/мл.

фузарубином получены при исследовании митохондрий *Y. lipolytica* (рис. 2, кривая 3), а также митохондрий и микросомальной фракции проростков гороха (рис. 2, кривые 4 и 5).

Оказалось, что катализируемое пигментами потребление кислорода сопровождалось образованием супероксид-радикала (рис. 3). Реакция заметно подавлялась супероксиддисмутазой (кривая 1). Таким образом, растворимые внеклеточные нафтохиноны способны функционировать в качестве аутооксидабельных соединений в клетках бактерий, растений и грибов, в том числе и самих продуцентов.

В целом механизм действия аутооксидабельных нафтохиноновых метаболитов можно представить в виде схемы (рис. 4), в которой необходимо выделить два основных аспекта. Во-первых, попадая в

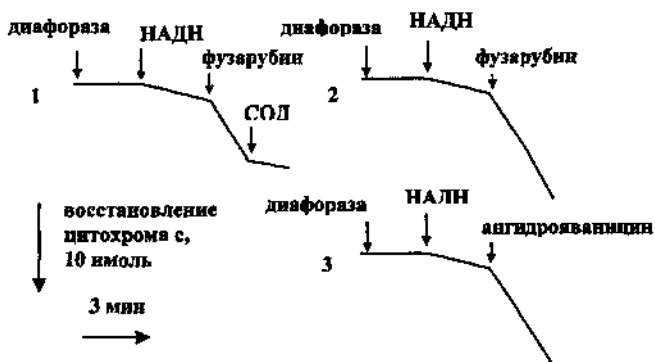


Рис. 3. Образование супероксид-радикала нафтохиновыми пигментами.

1 - коммерческий препарат диафоразы (0,085 мг/мл) (Boeringer); 2,3 - диафоразы *A. globiformis* (0,25 мг/мл). НАДН - 1 мМ, супероксиддисмутаза (СОД) - 5 мкг/мл, фузарубин - 20 мкМ, ангидрояваницин - 10 мкМ.

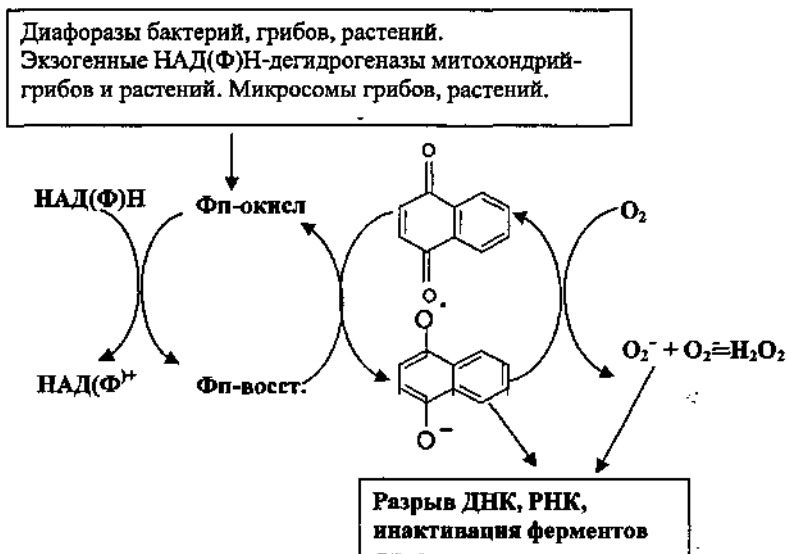
клетку, нафтохиноны вызывают нарушение конструктивного и энергетического обмена клеток из-за неконтролируемого окисления НАДН и НАДФН. Во-вторых, в результате хинонового редокс-цикла происходит постоянная генерация высокотоксичных форм кислорода ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ) и свободнорадикальных форм самих нафтохинонов, обладающих мощным цитотоксическим действием.

Для полноты картины механизма действия нафтохинонов необходимо добавить, что некоторые из нафтохинонов проявляли ингибирующее действие на НАДН : феррицианид-редуктазную активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий и глутатионредуктазную активность (Bironaite et al, 1991). Более того, оказалось, что супероксидгенерирующие нафтохиноны (1,2-, 1,4-нафтохиноны) способны подавлять активность супероксиддисмутазы - фермента, ответственного за снижение концентрации супероксидных радикалов (Vefar and Sies, 1963; Smith et al, 1985).

В целом, механизм токсического действия нафтохинонов можно считать универсальным. В природе существует огромное количество соединений хиноновой природы (нафтохиноны, бензохиноны, антрахиноны и др.), образуемых грибами, растениями, бактериями и актиномицетами. Эти соединения проявляют аутооксидабельные свойства и при попадании в живые клетки способны вызывать окислительный стресс и их гибель. Очевидно, что способность к



образованию нафтохинонов повышает устойчивость и конкурентоспособность грибов-продуцентов в природном окружении.



**Рис. 4. Схема механизма действия нафтохиноновых метаболитов грибов.** Нафтохиноны взаимодействуют с НАД(Ф)Н-зависимыми флавиновыми ферментами митохондрий, макросом и диафоразами (Фп-флавопротеины) с образованием свободнорадикальных форм, которые взаимодействуют с кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК) - супероксидных радикалов и перекиси водорода. АФК и свободнорадикальные формы пигментов способны инактивировать ДНК, РНК и ферменты.

**Устойчивость к собственным метаболитам.** Важным моментом для понимания физиологической роли нафтохинонов для продуцента является вопрос о механизме устойчивости к собственным токсическим соединениям. Литературные данные свидетельствуют о том, что устойчивость достигается двумя путями (Vinning, 1986): изменением чувствительности мишени или полным ее отсутствием в клетках, либо изменением токсичности метаболита путем его трансформации в неактивную форму через фосфорилирование, ацетилирование и др.

В настоящей работе при исследовании механизмов устойчивости гриба *F. decemcellulare* к собственным нафтохинонам было

установлено, что в условиях, оптимальных для роста (рН 5.5 - 6.5), добавление нафтохинонов приводило к торможению роста гриба, о чем свидетельствовало заметное увеличение лаг-фазы (от 6 до 22 часов) (рис. 5). К началу активного роста гриба пигменты на 80 - 90% были трансформированы (рис. 5). По данным масс-, ИК-, УФ-, и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, трансформация была связана с деметилированием 7-метокси группы хинонового кольца (рис. 6).



Рис. 5. Влияние яваницина на рост гриба - продуцента.

1 - накопление биомассы в отсутствие яваницина, 2 - накопление биомассы в присутствии яваницина (75 мкМ), 3 - общее содержание яваницина, 4 - содержание яваницина.

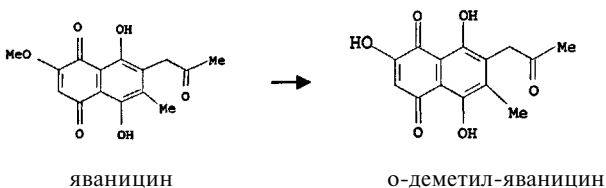
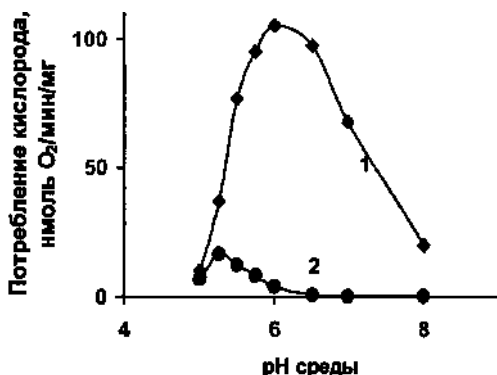


Рис. 6. Трансформация яваницина грибом-продуцентом.

Оказалось, что у о-деметильных производных нафтохинонов снижается способность акцептировать восстановительные эквиваленты с флавиновых НАД(Ф)Н-зависимых дегидрогеназ грибов и бактерий (рис. 7). Снижение акцепторных свойств, вероятно, обусловлено снижением величины их редокс потенциала, как это отмечено для других нафтохинонов (Hodnett et al, 1983).



**Рис. 7.** Влияние яваницина (1) и его деметилного производного (2) на скорость потребления кислорода диафоразой в зависимости от pH. Цитрат-фосфатный буфер (50 мМ), диафоразы (0,8 Е), НАДН (1 мМ), нафтохиноны (25 мкМ).

В литературе до сих пор продолжаются дискуссии о функциях вторичных метаболитов для организмов - продуцентов. Детальное обсуждение предполагаемых функций вторичных метаболитов с аргументацией «за и против» приведено в ряде представительных обзоров и монографий (Калакуцкий и Агре, 1977; Теофилова, 1998, Dimain 1999; Muller, 2001; Firm and Jones, 2000). Так, полагают, что вторичные метаболиты представляют собой антибиотические соединения, запасные вещества, факторы дифференцировки или просто случайные конечные метаболиты - продукты метаболизма клеток в отсутствие роста.

В данной работе сделана попытка решить вопрос о физиологической роли пигментов с позиции их высокой биологической активности и развития механизмов устойчивости у грибов-продуцентов к собственным антибиотическим соединениям при смене условий культивирования. В условиях, неблагоприятных для роста, например, при снижении pH среды культивирования, включается синтез пигментов с образованием 7-окси-производных (Gatenbeck and Bentley, 1965), не токсичных для продуцента. Экскреция пигментов из клетки сопровождается их активированием путем метилирования. В результате образуются 7-метокси-производные, обладающие высокой

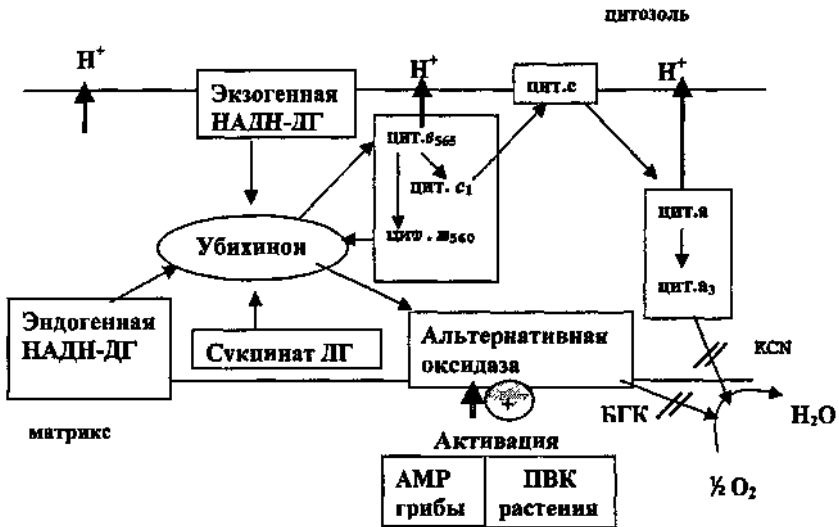
биологической активностью. Нами показано также, что при низких значениях pH синтезируемые пигменты не проникают в клетки гриба и не оказывают токсического действия. В условиях, благоприятных для роста (pH 5,5-6,5), собственные нафтохиноны тормозят развитие гриба-продуцента. В качестве ответной реакции у продуцента увеличивается внутриклеточная активность каталазы и супероксиддисмутазы и включается процесс инактивации пигмента путем деметилирования 7-метокси-группы хинонового кольца.

Сопоставление представленных результатов не позволяет рассматривать пигменты в качестве запасных веществ (не потребляются из среды грибами в условиях лимита по углероду), продуктов детоксикации (накапливаемые пигменты являются более токсичными, чем промежуточные соединения, из которых они синтезируются), а также метаболитов, принимающих участие в процессе дифференциации (накопление пигментов в среде не сопряжено с образованием у грибов специализированных клеточных форм при культивировании в жидкой среде).

Более вероятно, что нафтохиноновые пигменты функционируют в качестве химических агентов, обеспечивающих избирательное преимущество продуценту в конкуренции с другими организмами за выживание в природных экосистемах. Как можно, например, объяснить, что синтезируемый неактивный метаболит активируется в процессе экскреции из клетки в условиях, неблагоприятных для роста, и затем инактивируется при наступлении оптимальных условий? Случайный ли это процесс или закономерное явление? С нашей точки зрения, биологическая активность вторичных метаболитов является не случайной, а, напротив, специально отобраным в процессе эволюции свойством, направленным против цели во внеклеточном окружении. Касаясь вопроса о физиологической роли нафтохиноновых метаболитов для грибов-продуцентов, способных поражать широкий круг растений, можно отметить, что представленный выше механизм действия позволяет отнести их к неспецифическим факторам вирулентности, так называемым «супрессорам», подавляющим защитные реакции растений (например, «реакцию сверхчувствительной гибели») и превращающим устойчивые ткани в восприимчивые.

### Альтернативная оксидаза (глава 5).

Другим ответом грибов на воздействие неблагоприятных факторов является цианидрезистентное дыхание, обусловленное появлением в митохондриях альтернативной оксидазы (рис. 8).



**Рис. 8.** Схема дыхательной цепи митохондрий грибов.

Альтернативная оксидаза ответвляется от основной фосфорилирующей дыхательной цепи на уровне убихинона. Перенос электронов по альтернативному пути не ингибируется цианидом, антимицином А и СО, но специфически подавляется производными бензгидроксамовой кислоты (БГК). Продуктом восстановления кислорода цианидрезистентной оксидазой является вода, а не супероксид-радикал или Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Культивирование гриба *F. decemcellulare* в условиях закисления среды (рис. 9А, кривая 1), сопровождалось торможением роста и накоплением внеклеточных нафтохинонов (кривая 4). Дыхание гриба в этих условиях оставалось высокочувствительным к цианиду (рис. 9Б, кривая 1). Добавление ингибитора дыхания антимицин А (анти-А) в начале логарифмической фазы приводило к торможению роста гриба (рис 9А, кривая 3), появлению цианидрезистентного пути окисления (рис. 9Б) и синтезу пигментов (рис. 9А, кривая 5). Дыхание гриба становилось устойчивым к цианиду, а бензгидроксамовая кислота

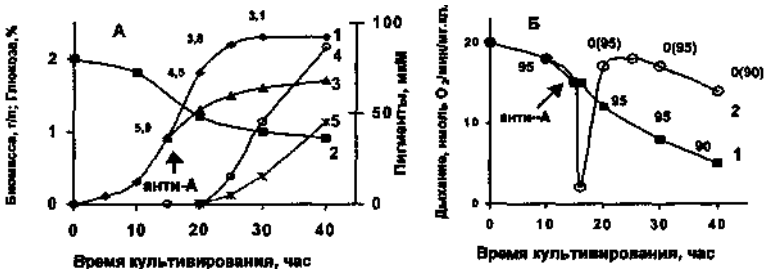


Рис. 9. Влияние антимицина А на рост, дыхание и биосинтез нафтохинонов у гриба *F. decemcellulare*.

Внесение антимицина А (анти-А), указано стрелкой. А. 1,3 — накопление биомассы в отсутствие (1) и в присутствии (3) антимицина А; 2-потребление глюкозы; 4,5 - накопление пигментов в отсутствие (4) и присутствии (5) антимицина А. Цифрами на кривой 1 указано рН среды.

Б. 1,2 - дыхание гриба в отсутствие (1) и в присутствии (2) антимицина А.

Цифрами на кривых указан % ингибирования дыхания 1 мМ цианида; в скобках - % ингибирования дыхания 5 мМ БГК.

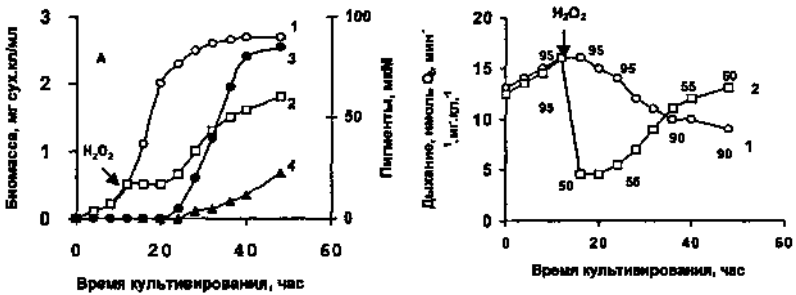


Рис. 10. Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  на рост, биосинтез нафтохинонов и дыхательную активность гриба *F. decemcellulare*.

Добавление  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,25 мМ) указано стрелкой.

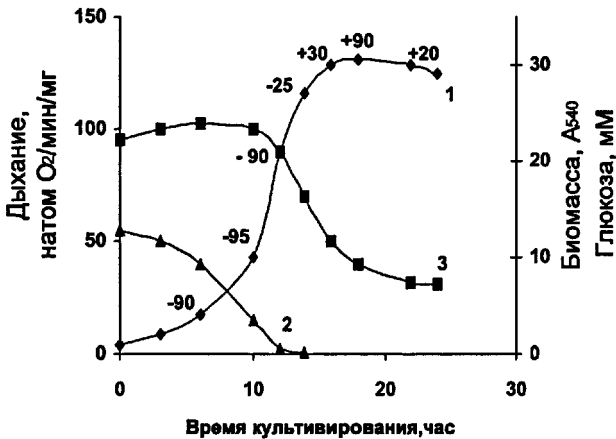
А. 1-накопление биомассы в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 2 - накопление биомассы после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3 - накопление пигмента в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4 - накопление пигмента после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Б. 1 -дыхание гриба в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 2 -дыхание гриба после добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Цифрами на кривых указана чувствительность (%) дыхания к 1 мМ цианида.

(БГК), ингибитор альтернативной оксидазы, в отсутствие цианида полностью (90-95%) ингибировала дыхание. В присутствии БГК синтез нафтохинонов не наблюдался.

Появление альтернативной оксидазы у грибов отмечалось также в условиях окислительного стресса (рис. 10). Добавление перекиси водорода приводило к торможению роста гриба и снижению активности дыхания. Дыхание на 50% становилось резистентным к цианиду. Добавление цианида и БГК полностью подавляло потребление кислорода, что указывало на появление альтернативной оксидазы.

Таким образом, в условиях окислительного стресса, а также при ингибировании переноса электронов по дыхательной цепи альтернативная оксидаза является единственной терминальной оксидазой, обеспечивающей рост гриба и биосинтез нафтохиноновых пигментов.



**Рис. 11. Рост *Y. lipolytica* на глюкозе, скорость эндогенного дыхания и его чувствительность к цианиду.**

1 - накопление биомассы; 2 - потребление глюкозы; 3 - эндогенное дыхание.

Цифрами на кривой 1 указано стимулирующее (+) и ингибирующее (-) действия цианида (1 мМ) на дыхание (%).

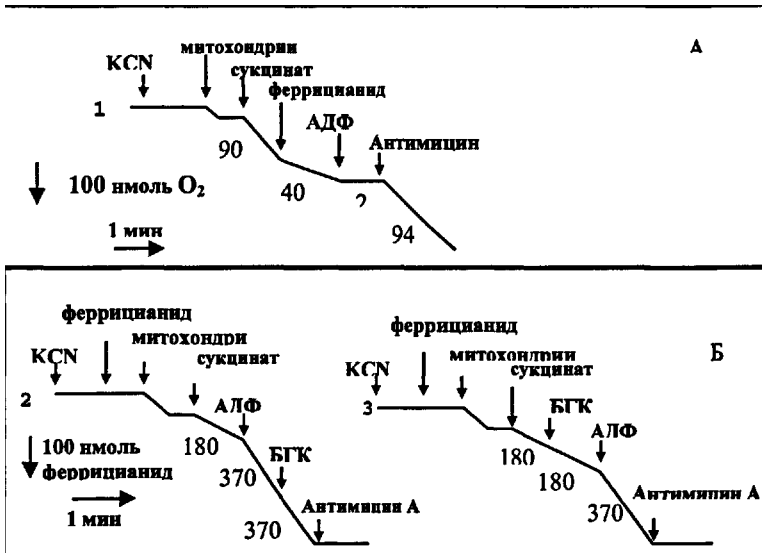
У *Y. lipolytica* появление альтернативной оксидазы наблюдалось при переходе в стационарную фазу роста, обусловленном истощением

глюкозы (рис. 11). Дыхание клеток стационарной фазы роста не только не ингибировалось цианидом, но ускорялось в его присутствии. В этих условиях альтернативный цианидрезистентный путь присутствует в митохондриях наряду с полноценной цитохромной дыхательной цепью. В связи с этим, возникали закономерные вопросы: какова физиологическая роль альтернативной оксидазы в этих условиях и каков механизм распределения электронов между альтернативной оксидазой и цитохромной дыхательной цепью. Для ответа на эти вопросы были изучены пути регуляции альтернативной оксидазы.

**Механизм распределения электронов между цитохромной цепью и альтернативной оксидазой.** Поскольку оба пути катализируют восстановление кислорода до воды, то по измерению конечного продукта невозможно определить долю участия каждого из них в общем дыхании митохондрий. Чтобы преодолеть эту трудность была использована оригинальная методика, в которой в качестве акцептора электронов в цитохромной цепи использовали феррицианид (цитохромоксидазу ингибировали цианидом). Так как феррицианид не проникает через внутреннюю мембрану митохондрий, то в случае окисления сукцината он будет акцептировать электроны только от цитохрома *c*. В присутствии феррицианида активность цитохромной цепи может быть измерена спектрофотометрически по восстановлению феррицианида, а активность альтернативного пути - по потреблению кислорода. Потребление кислорода митохондриями, окисляющими сукцинат в контролируемом состоянии дыхательной цепи (состояние 4 по Чансу) тормозится при внесении феррицианида (рис.12, кривая 1). Активация цитохромного пути (переход в состояние 3 по Чансу) добавлением АДФ или разобщителя окислительного фосфорилирования трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразоном (ТФКФ) вызывало полное торможение потребления кислорода (альтернативная оксидаза не функционировала). Это свидетельствовало о том, что активация дыхательной цепи приводила к переключению потока электронов от альтернативной оксидазы к основной дыхательной цепи (на цит. *c* и далее - на феррицианид). Измерение скорости восстановления феррицианида показало, что ингибирование альтернативного пути БГК не изменяло скорости переноса электронов по цитохромному пути как в контролируемом, так и в активном состоянии дыхательной цепи (рис. 12, кривые 2 и 3). Эти данные указывают на то, что ингибирование альтернативной оксидазы



не приводит к увеличению потока электронов по цитохромному пути. Следовательно, альтернативный путь не способен конкурировать за электроны с цитохромным путем.



**Рис. 12.** Скорость потребления кислорода (А) и скорость восстановления феррицианида (Б) митохондриями при окислении сукцината в присутствии АДФ и БГК.

Добавки: митохондрии - 0,5 мг/мл, KCN - 1 мМ, БГК - 1 мМ, феррицианид - 1 мМ, АДФ - 1 мМ, ТФКФ - 1 мкМ, антимицин А - 2 мкМ. Цифрами на кривых указана скорость потребления кислорода и скорость восстановления феррицианида, нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> белка.

Еще одним доказательством того, что альтернативный путь переноса электронов не функционирует в условиях, когда цитохромный путь находится в активном состоянии, могут служить данные определения эффективности фосфорилирования цианидрезистентных митохондрий (табл. 4). Такой подход возможен в связи с тем, что перенос электронов непосредственно по альтернативному пути не сопряжен с синтезом АТФ (Moore et al. 1978). Следовательно, определение отношения АТФ/О в присутствии БГК и без нее, позволит оценить вклад цианидрезистентной оксидазы в

потребление кислорода митохондриями. Как следует из результатов, представленных в табл. 4, коэффициенты АТР/О при окислении сукцината и  $\alpha$ -глицерофосфата, в присутствии БГК, были равны соответственно 1,64 и 1,71. В отсутствие ингибитора, когда альтернативная оксидаза и дыхательная цепь потенциально активны - 1,62 и 1,69. При окислении митохондриями пирувата + малата коэффициенты АТР/О были равны соответственно 2,65 и 2,63 как в присутствии БГК, так и без нее. Отсутствие заметного снижения АТР/О указывало на то, что в активном состоянии митохондрий практически все восстановительные эквиваленты поступают на кислород по цитохромной дыхательной цепи.

**Таблица 4. Влияние ингибиторов на синтез АТР митохондриями.**

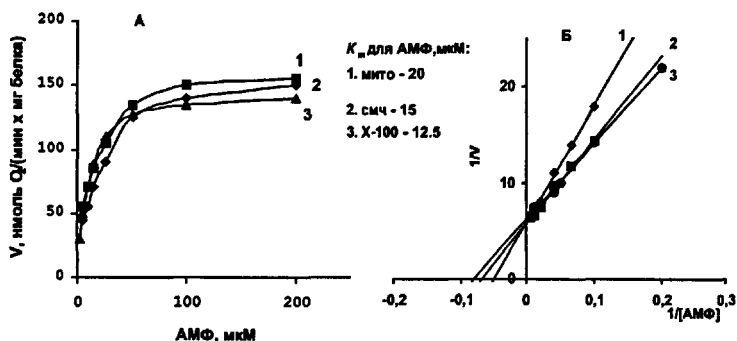
Субстрат	Ингибитор	Потребление кислорода, нмоль $O^2$	Образование АТР, нмоль	АТР/О
Пируват + малат	Без	187±18	492 ± 46	2.63±0.07
	KCN	182 ± 16	188±17	1.03±0.12
	ВНА	152 ± 15	402 ± 38	2.65±0.07
Сукцинат	без	147 ± 14	235 ± 21	1.62 ± 0.12
	KCN	98 ± 9	3.92 ± 0.3	0.04 ± 0.006
	ВНА	154±15	250 ± 22	1.62 ± 0.11
$\alpha$ -глицерофосфат	без	219±22	370 ± 35	1.69 ± 0.06
	KCN	229±23	11.5±0.9	0.05±0.008
	ВНА	198±18	310±30	1.71 ± 0.12

Ингибиторы и субстраты использовались в следующих концентрациях: KCN -1 мМ, БГК — 5 мМ, пируват + малат - по 5 мМ, сукцинат - 25 мМ,  $\alpha$ -глицерофосфат -25 мМ.

В таблице представлены средние значения 3-х независимых измерений.

Таким образом, результаты, полученные в опытах с феррицианидом как акцептором электронов дыхательной цепи, а также данные измерения АТР/О, являются экспериментальным подтверждением того, что вклад альтернативной оксидазы в общее потребление кислорода цианидрезистентными митохондриями регулируется активностью основной дыхательной цепи. По альтернативному пути на кислород переносится та часть восстановительных эквивалентов, которая является избыточной для основной дыхательной цепи.

**Активация альтернативной оксидазы 5'-АМФ.** Нативные изолированные митохондрии показывают высокую активность цианидрезистентной оксидазы. Однако обработка митохондрий ультразвуком, фосфолипазой А, детергентами (ДОХ, тритон-Х-100) или инкубация при 25° в течение 3-5 часов приводила к инактивации альтернативной оксидазы. Оказалось (рис. 13), что ее активность может быть восстановлена при добавлении АМФ и азолектина (фосфатидил-холин сои). Это предполагает, что процесс инактивации альтернативной оксидазы обусловлен нарушением структуры митохондриальной мембраны и удалением АМФ. Были определены  $K_m$ -активации оксидазы АМФ (рис. 13). Данные показывают, что альтернативная оксидаза абсолютно зависит от АМФ, а  $K_m$  активации не зависит от способа разрушения митохондрий.



**Рис. 13.** Влияние 5'-АМФ на активность альтернативной оксидазы *Y. lipolytica* после различных воздействий на митохондрии.

1-после инкубации митохондрий при 25°(в течение 5 часов), 2-после обработки ультразвуком (4 x 30 сек), 3- после воздействия тритона X-100 (детергент/белок= 1/4, мг/мг). Измерение дыхания митохондрий (мито-0.5 мг/мл) проводили в присутствии НАДН (1 мМ), KCN (1 мМ), азолектина (5 мг/мл).

**Факторы, контролирующие появление альтернативной оксидазы.** Как было показано выше (рис. 11), альтернативная оксидаза у *Y. lipolytica* появляется в процессе перехода в стационарную фазу роста, обусловленном истощением в среде глюкозы. Переход в стационарную фазу сопровождался заметным снижением эндогенного

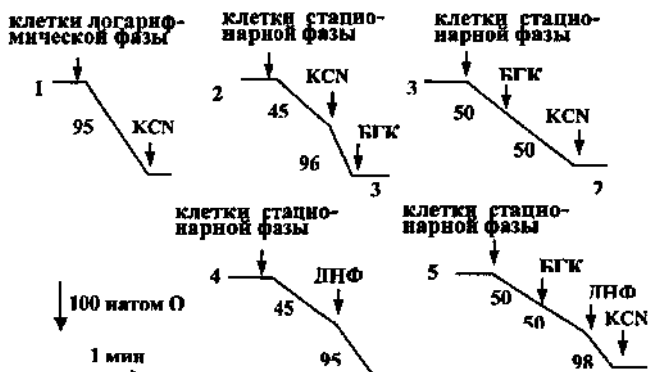


Рис. 14. Влияние цианида, БГК и 2,4-ДНФ на дыхание *K lipolytica*.

1 - клетки логарифмической фазы (0,5 мг/мл), 2,3,4,5 - клетки стационарной фазы (1 мг/мл). Добавки: БГК- 5 мМ, цианид-1 мМ, 2,4-ДНФ - 0,25 мМ. Цифрами на кривых указано дыхание, натов О/мин на мг сухих клеток.

дыхания, причем, дыхание клеток активировалось при добавлении цианида (рис. 11 и 14, кривая 2). Совместное действие цианида и БГК приводило к полному ингибированию дыхания (рис. 14, кривые 2 и 3). Ингибитор альтернативной оксидазы (БГК), в отсутствие цианида практически не оказывал влияния на дыхание клеток (кривая 3). Этот факт указывает на то, что альтернативная оксидаза в этих условиях не вносит заметного вклада в потребление кислорода клетками. На рис. 14 также видно, что эндогенное дыхание цианидрезистентных клеток заметно активировалось 2,4-динитрофенолом (2,4-ДНФ), разобщителем окислительного фосфорилирования (кривая 4). Стимулирующее действие ДНФ проявлялось также на фоне БГК (кривая 5). Это прямо указывает на то, что падение скорости эндогенного дыхания обусловлено снижением активности основной дыхательной цепи. Стимулирующее действие ДНФ поднимает вопрос: почему альтернативный путь окисления, перенос электронов по которому не контролируется мембранным потенциалом, не поддерживает максимально возможный уровень дыхания? С этим вопросом связан также вопрос о механизме стимулирующего действия цианида на дыхание цианидрезистентных клеток.

Таблица 5. Содержание адениновых нуклеотидов и аденилатный энергетический заряд в клетках *Y. lipolytica* логарифмической и стационарной фаз роста

Условия инкубации	Содержание адениновых нуклеотидов*, нмоль/мг сухих клеток			Сумма адениновых нуклеотидов	Аденилатный энергетический заряд
	АТФ	АДФ	АМФ		
логарифмическая фаза					
Без добавок	7,10 ± 0,65	2,10 ± 0,2	0,80 ± 0,10	10,0	0,81
1 мМ KCN	0,20 ± 0,02	3,00 ± 0,25	3,50 ± 0,30	6,70	0,24
стационарная фаза					
Без добавок	3,60 ± 0,40	0,95 ± 0,10	0,40 ± 0,05	4,95	0,82
1 мМ KCN	1,00 ± 0,10	1,70 ± 0,20	2,20 ± 0,25	4,90	0,37
5 мМ БГК	3,50 ± 0,50	0,90 ± 0,10	0,40 ± 0,05	4,90	0,81
KCN+БГК	0,10 ± 0,01	1,50 ± 0,16	2,30 ± 0,25	3,90	0,21

- Экстракцию нуклеотидов из клеток осуществляли через 5 мин после внесения ингибиторов.

Для решения этих вопросов было изучено содержание адениновых нуклеотидов в клетках дрожжей логарифмической (цианидчувствительные клетки) и стационарной (цианидрезистентные клетки) фаз роста. Как следует из данных таблицы 5, в клетках дрожжей стационарной фазы роста наблюдалось снижение уровня АТФ, АДФ, АМФ и падение общего пула адениновых нуклеотидов на 50%, по сравнению с клетками логарифмической фазы. При этом, однако, аденилатный энергетический заряд оставался практически постоянным. Добавление цианида к "цианидчувствительным" клеткам приводило к резкому падению содержания АТФ и увеличению содержания АДФ и АМФ. Общий уровень адениновых нуклеотидов снижался на 35%, а аденилатный энергетический заряд - на 70%. Добавление цианида к клеткам дрожжей стационарной фазы роста также сопровождалось падением уровня АТФ, увеличением уровня АДФ, АМФ и снижением аденилатного энергетического заряда (более 50%). При добавлении к клеткам стационарной фазы роста БГК (ингибитора альтернативной оксидазы), количественный и

качественный состав адениновых нуклеотидов оставался практически неизменным.

Эти данные согласуются с результатами, демонстрирующими отсутствие ингибирования дыхания БГК, и указывают на то, что присутствие цианидрезистентной оксидазы в клетках практически не отражается на их энергетических параметрах. При одновременном добавлении цианида и БГК энергетические параметры клеток стационарной фазы сходны с таковыми логарифмических клеток в присутствии одного цианида (табл. 5).

Для понимания стимулирующего действия цианида на дыхание клеток стационарной фазы роста следует особо выделить данные по увеличению в клетках уровня АДФ (в 2 раза) и АМФ (более, чем в 5 раз). Принимая во внимание, что активность альтернативной оксидазы абсолютно зависит от АМФ, можно полагать, что наблюдаемое увеличение скорости эндогенного дыхания в присутствии цианида обусловлено активацией цианидрезистентной оксидазы АМФ. Кроме того, из-за увеличения содержания АДФ, ускоряется перенос восстановительных эквивалентов через первый пункт сопряжения до убихинона и далее - по альтернативному пути на кислород.

Следовательно, альтернативная оксидаза синтезируется и присутствует в клетках при переходе в стационарную фазу, но находится в латентном, неактивном состоянии. Активация оксидазы происходит в стрессовых условиях под действием факторов, снижающих активность цитохромного пути и приводящих к увеличению уровня АМФ.

## ВЫВОДЫ

1. Изучен адаптивный ответ грибов на воздействие различных стрессовых факторов, включая экстремальные значения рН, окислительный стресс, недостаток в среде источников углерода, азота, фосфора, действие ингибиторов дыхания и фитоалексинов. Показано, что одним из ответов грибов на стрессовые воздействия является биосинтез пигментов нафтохиноновой природы. Выделено и идентифицировано 13 метаболитов. Определена структура трех новых соединений. Впервые показано, что в зависимости от стрессового воздействия гриб *Fusarium decemcellulare* синтезирует внеклеточные нафтохиноны нафтазариновой структуры (яваницин, ангидрояваницин, нор-яваницин, фузарубин, ангидрофузарбин, бострикоидин, новарубин), или внутриклеточный

димерный нафтохинон - аурофузарин. Выявлены факторы, определяющие природу конечного продукта.

2. Изучен механизм антибиотического и фитотоксического действия нафтохинонов. Впервые показано, что в основе этого механизма лежит «хиноновый редокс-цикл», в котором нафтохиноны в качестве аутооксидабельных соединений, при участии флавин-зависимых дегидрогеназ, катализируют в клетках растений, грибов и бактерий окисление НАД(Ф)Н с образованием активных форм кислорода (супероксид-радикал,  $H_2O_2$ ) и радикальных форм самих пигментов, обладающих мощным цитотоксическим действием.

3. Впервые изучен механизм устойчивости гриба-продуцента к собственным нафтохинонам. Установлено, что основу защитного механизма составляет реакция деметилирования 7-метокси группы хинонового кольца нафтохинонов. Образующиеся в результате *o*-деметильные производные нафтохинонов утрачивают способность акцептировать восстановительные эквиваленты с флавиновых НАД(Ф)Н-зависимых дегидрогеназ.

Высокая биологическая активность нафтохинонов и «специализированная» устойчивость к ним обеспечивают преимущество продуценту в конкуренции с другими организмами в природном окружении.

4. Установлено, что одним из компонентов сложного адаптивного ответа грибов является появление цианидрезистентного дыхания (альтернативная оксидаза). На примере *F. decemcellulare* впервые показано, что у альтернативная оксидаза может выполнять функцию единственной терминальной оксидазы, обеспечивающей рост гриба и биосинтез нафтохинонов. Показано, что у *Yarrowia lipolytica* альтернативная оксидаза может присутствовать в митохондриях наряду с полноценной дыхательной цепью.

5. Изучены факторы регуляции альтернативной оксидазы и ее свойства. Впервые определен механизм распределения электронов между основной дыхательной цепью и альтернативной оксидазой. Доказано, что цианидрезистентный путь окисления не способен конкурировать за электроны с основной цитохромной дыхательной

цепью, а переносит на кислород только избыточные восстановительные эквиваленты. Впервые показано, что появление цианидрезистентной оксидазы сопряжено со снижением в клетках уровня АТФ и циклического АМФ. Установлено, что альтернативная оксидаза локализована во внутренней мембране митохондрий и активируется АМФ. АМФ-связывающий компонент альтернативной оксидазы расположен с внутренней стороны внутренней мембраны митохондрий. Основная функция альтернативной оксидазы состоит в поддержании окислительной активности клеток в условиях нарушения переноса электронов по основному цитохромному пути.

### **Список основных работ, опубликованных по материалам диссертации**

#### **Обзоры**

1. Medentsev A.G., Akimenko V.K. (1998) (Review) Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*, 47,935-959.
2. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. (1999) Регуляция и физиологическая роль цианидрезистентной оксидазы у грибов и растений. *Биохимия*, 64, 1457-1472.

#### **Экспериментальные статьи**

3. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1988) Нафтазариновые пигменты грибов *F. decemcellulare* и их влияние на потребление кислорода дрожжевыми и бактериальными микроорганизмами. *Биохимия*, 53,289-296.
4. Меденцев А.Г., Баскунов Б.П., Акименко В.К.(1988) Образование нафтохиноновых пигментов грибами *F. decemcellulare* и их влияние на метаболизм продуцента. *Биохимия*, 53,413-423.
5. Меденцев А.Г., Баскунов Б.П., Акименко В.К. (1989) Механизм устойчивости грибов *F. decemcellulare* к собственным пигментам. *Биохимия*, 54, 619-628.
6. Меденцев А.Г., Акименко В.К.(1989) Механизм цитотоксического действия 2-оксиюглона и флавиолина - метаболитов фитопатогенных грибов *Verticillium dahliae*. *Биохимия*, 54, 1904-1912.
7. Меденцев А.Г., Маслов А.Н., Акименко В.К. (1990) Нафтохиноновые метаболиты грибов рода *Fusarium* и *Verticillium*. Механизм фитотоксического действия. *Биохимия*, 55, 1766-1772
8. Меденцев А.Г., Файн М.Э., Айтхожина Н.А., Никитина Е.Т. (1991) Выделение и изучение пигмента бикаверина, образуемого при аномалии развития *Fusarium bulbigenum*. *Вестник Каз-АН*, 12, 70-73.



9. Medentsev A.G., Akimenko V.K. (1992) Mechanism of phytotoxic action of naphthoquinone pigments of the fungus *Fusarium decemcellulare*. *Phytochemistry*, 31, 77-79.
10. Bironaite D.A., Cenas N.K., Kulys J.J., Medentsev A.G., Akimenko V.K. (1991) The inhibition of glutathione reductase by quinones. *Z. Naturforsch.*, 46, 966-968.
11. . Меденцев А.Г., Баскунов Б.П., Ступарь О.С., Нефедова М.Ю., Акименко В.К. (1989) Пигменты *Frankia sp.* Anp 190107. Влияние на перенос электронов в дыхательной цепи бактерий и митохондрий дрожжей. *Биохимия*, 54,926-932.
12. Bironaite D.A., Cenas N.K., Kulys J.J., Medentsev A.G., Akimenko V.K. Anusevichus Z.J., Usanov S.A. (1992) The fungal quinone pigments as oxidizers and inhibitors of mitochondrial NADH : ubiquinone reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 297,253-257.
13. Меденцев А.Г., Акименко В.К., Никитина Е.Т., Файн М.Э., Айтхожина Н.А. (1992) Особенности энергетического обмена *Fusarium bulbigenum* в процессе перехода от мицелиального роста к дрожжеподобному. *Биохимия*, 57,389-397.
14. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1992) Влияние условий культивирования на биосинтез нафтохиноновых метаболитов грибами *Fusarium* факторами внешней среды. *Микробиология*. 61, 824-829.
15. Меденцев А.Г., Котик А.Н., Труфанова В.А., Акименко В.К. (1993) Идентификация аурофузарина в изолятах *Fusarium graminearum*, вызывающих у кур синдром ухудшения качества яйца. *Прикл. биохимия и микробиология*, 29, 542-546.
16. Головченко Н.П., Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1978) Обратный перенос электронов на уровне цитохрома С в цианидрезистентных митохондриях дрожжей *Candida lipolytica*. *Биохимия*, 43, 1665-1669.
17. Akimenko V.K., Golovchenko N.P., Medentsev A.G. (1979) The absence of energy conservation coupled with electron, transfer via the alternative pathway in cyanide resistant yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 545,398-403.
18. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1980) Регуляция альтернативного пути переноса электронов в митохондриях дрожжей *Candida lipolytica*. *Биохимия*, 45,1068-1073.
19. Акименко В.К., Меденцев А.Г. (1981) Причины утраты активности альтернативного пути переноса электронов в цианидрезистентных митохондриях дрожжей *Candida lipolytica*. *Биохимия*, 49, 140-146
20. Akimenko V.K., Trutko S. M., Medentsev, A.G., Korobov V. P. (1983) Distribution of cyanide resistant respiration among yeast and bacteria and its relation to oversynthesis of metabolism. *Arch. Microbiol.*, 136 234-241.

21. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1994) Локализация цианидрезистентной оксидазы в митохондриях дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Микробиология, 63,417-423.
22. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1996) Нафтохиноновые метаболиты грибов. Прикладная биохимия и микробиология. 32. 10-32.
23. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1997) Влияние вторичных метаболитов и ингибиторов переноса электронов на биосинтез нафтохинонов грибом *Fusarium decemcellulare*. Микробиология, 66, 773-778.
24. Солодовникова Н.Ю., Меденцев А.Г., Шарышев А.А., Финогенова Т.В. (1998) Изменение содержания адениновых нуклеотидов в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях сверхсинтеза органических кислот. Микробиология, 67,35-40.
25. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1999) Ингибирование переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий грибов вторичными метаболитами растений. Микробиология, 68,14-18.
26. Меденцев А.Г., Акименко В.К. (1999) Развитие и активация цианидрезистентного дыхания у дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Биохимия, 64,1123-1131.
27. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. (2001) Содержание цАМФ в условиях индукции альтернативной оксидазы в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Микробиология, 70,29-33.
28. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. (2001) Адаптация фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* к окислительному стрессу. Микробиология 70,34-38.
29. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. (2002) Дыхательная активность и образование нафтохиноновых пигментов у гриба *Fusarium decemcellulare* в условиях окислительного стресса. Микробиология, 71,176-182.
30. Medentsev A.G, Arinbasarova A.Y., Golovchenko N.P., Akimenko V.K. (2002) Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. FEMS Yeast Research 2, 519-524.
31. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Смирнова Н.М., Акименко В.К.(2003) Альтернативная оксидаза дрожжей не способна конкурировать за электроны с цитохромным путем. Микробиология, 72, 453-458.
32. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Смирнова Н.М., Акименко В.К. (2004) Активация цианидрезистентной оксидазы дрожжей *Yarrowia lipolytica* аденозин 5'-монофосфатом. Микробиология, 73,149-156.

33. Medentsev A.G, Arinbasarova A.Y., Akimenko V.K (2004) Reactivation of the Alternative Oxidase of *Yarrowia lipolytica* by Nucleoside Monophosphates FEMS Yeast Research (FEMSYR 1703).



**№20761**

РНБ Русский фонд

2005-4

18851

Подписано в печать 14 октября 2004 г.

Заказ 445. Формат 60 х 90/16.

Тираж 100 экз.

Отпечатано в салоне оперативной печати АртПолиграф  
Москва, Б. Якиманка, 13, оф. 410 Тел 778-97-47