

# ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОРОВ НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ *NEUROSPORA CRASSA*

© 2000 г.

В. Ю. СОКОЛОВСКИЙ,  
Т. А. БЕЛОЗЕРСКАЯ

*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Жизненный цикл *N. crassa*. III. Гены *N. crassa*, связанные с процессами дифференцировки. IV. Дифференцировка *N. crassa* при контакте с кислородом воздуха. V. Дифференцировка *N. crassa* при субстратном голодании. VI. Циркадные ритмы у *N. crassa*. VII. Свет и дифференцировка. VIII. Комплексное действие стрессорных агентов на дифференцировку *N. crassa*. IX. Защитные механизмы от действия стрессоров. X. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Механизмы развития грибных организмов, как и других живых организмов, включают регуляцию клеточного деления, миграцию, адгезию, процессы клеточной дифференцировки и апоптоз (программируемая гибель клеток). Как уже неоднократно отмечалось в наших обзорах, низшие эукариоты — грибы, при малом размере генома, сохранении всех морфологических и биохимических особенностей эукариотической клетки и ограниченном числе клеточных типов в онтогенезе, являются удобными объектами для изучения процессов клеточной дифференцировки [9, 18, 133].

Развитие грибных организмов происходит в непосредственном контакте с внешней средой, поэтому они являются постоянными объектами стрессоров физической и химической природы (согласно Webster dictionary P., стресс — это силовая внешняя система, нарушающая состояние равновесия). Такие внешние факторы как голодание, вызванное недостатком или отсутствием какого-либо источника питания, условия освещения и температуры, изменение газового состава среды, механическое повреждение мицелия и запускают процессы дифференцировки у грибов. Обычно в природе организм находится под комплексным воздействием внешних

стрессорных агентов, поэтому при изучении процессов дифференцировки грибов важно вычленить фактор среды, запускающий механизмы развития, а также факторы, сопутствующие ему.

В природных условиях выживание под действием стресса скорее является правилом, чем исключением, поэтому способность дифференцироваться можно рассматривать как адаптацию организма и способ его выживания при неблагоприятных условиях.

В процессе развития под влиянием стрессоров наряду с анатомической дифференцировкой происходит и «химическая дифференцировка», т.е. в ответ на стресс идет формирование новых метаболических путей. Известно, что у многих грибов прекращение роста и переход к стационарной фазе развития сопряжен с биосинтезом вторичных метаболитов таких, как пенициллины, гибберелины, каротиноиды, меланины и ряд других соединений. Они являются производными простых продуктов первичного метаболизма грибов таких как ацетат, жирные кислоты, аминокислоты, органические кислоты цикла Кребса. Вещества вторичного происхождения не свойственны животным, однако присущи микроорганизмам, растениям и грибам. Роль этих соединений до последнего времени была непонятной, тем не менее появляется все больше данных относительно их защитной функции в грибных клетках в процессе развития [28, 53].

Биосинтез вторичных метаболитов представляет собой один из многих процессов, сопровождающих клеточную дифференцировку (о чем на примере биосинтеза каротиноидов у *N. crassa* на генетическом уровне и пойдет, в частности, речь в нашем обзоре). Молекулярные механизмы, лежащие в основе обоих процессов — дифференцировки и синтезе вторичных метаболитов, еще далеко не расшифрованы, но очевидно, что появление вторичных метаболитов является результатом функционирования ферментов, чей синтез и/или активация индуцированы действием стрессорных факторов.

Еще одним способом защиты от деструктивного действия стрессоров является изменение структурных компонентов клеточной стенки [108]. Синтез наиболее важных структурных белков у грибов — гидрофобинов, является результатом индукции экспрессии генов под действием стрессоров.

В обзоре мы рассматриваем молекулярные механизмы дифференциальной экспрессии генов (в частности, генов, ответственных за каротиногенез и появление гидрофобинов) при дифференцировке *N. crassa*, вызванной стрессорными агентами. Кроме того, мы попытались обсудить, какую роль играют каротиноиды и гидрофобины в процессе дифференцировки *N. crassa* и других представителей царства грибов.

## II. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ *NEUROSPORA CRASSA*

*Neurospora crassa* — оранжевая хлебная плесень, с начала 40–х годов, после формулировки Бидлом и Тейтумом гипотезы «один ген — один фермент», является объектом пристального внимания биохимиков, генетиков, молекулярных биологов. Благодаря большому числу продуцируемых спор, обширной генетической информации [202] (в коллекции культур *N. crassa* более 3000 мутантов) и последним достижениям в трансформации грибов и клонировании этого гриба [220, 261], пути дифференцировки *N. crassa* наряду с *Aspergillus nidulans*, являются прекрасными модельными системами для исследования процессов регуляции онтогенеза, в том числе, для исследования регуляции экспрессии генов при дифференцировке [54, 162].

Мицелий *N. crassa* состоит из многоядерных разветвленных гиф, обладающих апикальным полярным ростом. Септальная перегородка с центральной порой до 0,5 мкм в диаметре разделяет гифы на клетки или компартменты (100×20 мкм). Пора проницаема для цитоплазмы, ядер и митохондрий. В ответ на сигналы внешней среды происходит остановка роста и включается программа дифференцировки гриба.

Дифференцировка *N. crassa* может проходить по одному из трех различных путей, ведущих к формированию макроконидий, микроконидий или аскоспор [82, 188, 220, 224, 246]. Процесс макроконидиирования индуцируется при росте на твердой подложке при подсыхании (desiccation), т.е. при контакте с воздушной средой или при истощении источника углерода в среде культивирования. Свет в диапазоне 350—500 нм увеличивает в несколько раз образование макроконидий [142, 189], а CO<sub>2</sub> — ингибирует [231]. Макроконидиирование находится также под контролем внутренних циркадных часов, а мутант гриба *bd* (band) устойчив к действию CO<sub>2</sub> [231].

Методика сканирующей электронной микроскопии позволила выявить различные морфологические этапы процесса конидиирования, причем удалось установить участки действия определенных мутаций на этот процесс (рис. 1). Индукция макроконидииогенеза вызывает изменение ориентации роста гиф в направлении от субстрата, что приводит к формированию массы воздушных гиф перед началом процесса [246]. Показано, что для формирования воздушных гиф необходима адгезия клеток мицелия, контактирующих с субстратом, причем этот процесс происходит быстро (30—40 минут) [257]. Мутации *acon-2* (aconidiate) и *fld* (fluffyoid) предотвращают процесс конидиирования от стадии

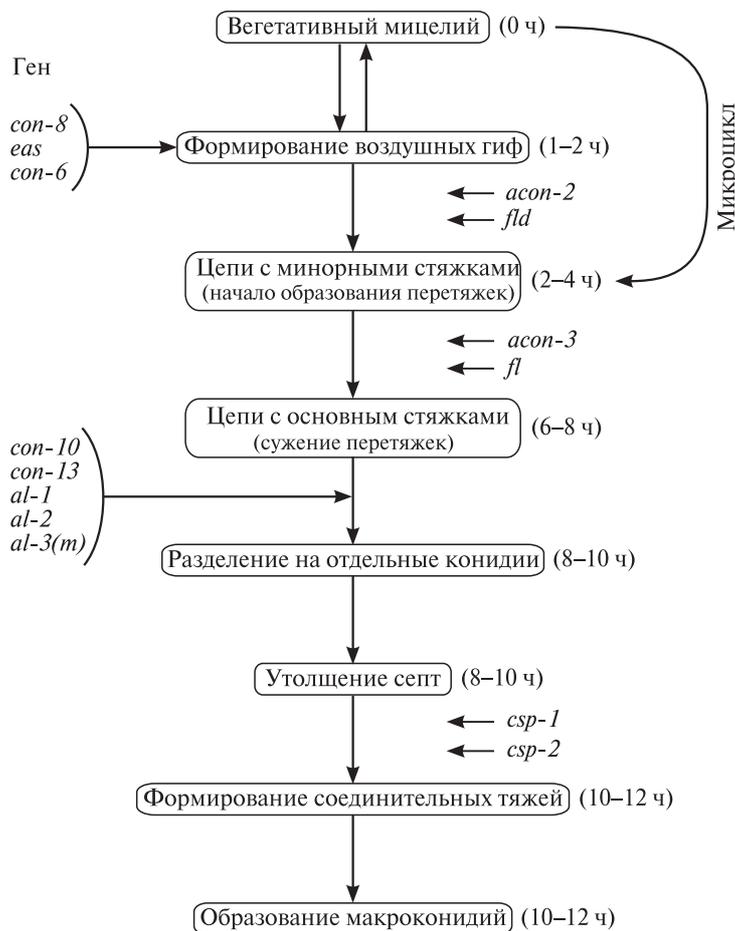


Рис. 1. Схема протекания процесса макроконидирования во времени.

В микроцикле процесса конидирования отсутствует стадия образования воздушных гиф. На схеме отмечены участки действия некоторых мутаций по дифференцировке и участки начала экспрессии некоторых генов.

воздушных гиф (рис. 1) [165, 248]. После роста воздушных гиф мицелия штамма дикого типа в течение нескольких часов апикальное удлинение прекращается и начинается процесс повторного апикального почкования, причем каждая почка, или проконидия, образует одну или две новые почки, что приводит к образованию разветвленной цепи. Каждая проконидия имеет 5–10 мкм в длину.

Первые несколько циклов почкования продуцируют цепи проконидий с очень слабыми межконициальными стяжками; эти цепи называются цепями с минорными стяжками (*minor constriction chains*). Дальнейшее почкование приводит к формированию цепей с основными стяжками (*major constriction chains*), в которых межконициальные соединения значительно меньше и которые составляют большую часть цепей проконидий в конечном счете образуемых в культуре. Большинство проконидиальных цепей состоят из коротких сегментов цепи с минорными стяжками за которыми следует длинная цепь с основными стяжками.

Считается, что стадия роста цепей с минорными стяжками по ряду причин является отдельной стадией развития конидий. Во-первых, мутанты по развитию *acon-3* и *fl* (*fluffy*) блокированы на этой стадии дифференцировки и образуют воздушную массу, состоящую только из цепей с минорными стяжками [248]. Во-вторых, точка, на которой несколько генов *con* (*conidiation*) начинают экспрессироваться в синхронных культурах, соответствует переходу от стадии минорных стяжек к стадии основных стяжек [226]. Наконец, на этапе образования минорных стяжек характер роста может быть изменен как в сторону процесса почкования, так и продолжения элонгации гиф [248]. Воздушные гифы часто имеют фрагменты цепей с минорными стяжками между сегментами гиф. Однако, на этапе образования цепей с основными стяжками рост носит характер почкования и не может вернуться к стадии элонгации гиф.

После остановки почкующегося роста на каждом межконициальном соединении беспорядочно закладываются новые перегородки. Эти перегородки подвергаются процессу утолщения и разделения, при котором средний участок перегородок, по-видимому, перераспределяется для образования хрупких соединительных нитей, которые удерживают вместе вновь отделенные конидии [248].

Свободные макроконидии подвергаются периоду созревания в течение нескольких дней до достижения состояния покоя [234]. Высушенные макроконидии остаются жизнеспособными в течение десятилетий.

Вскоре после разделения конидиальных цепей появляются дополнительные перегородки в районе воздушной гифы, ближайшем к конидиеносцу, которые подвергаются процессу утолщения и разделения, что приводит к отделению фрагментов гиф, которые обнаруживаются в небольших количествах среди макроконидий. Эти фрагменты, называемые артроконидиями, отличаются от большей части макроконидий, называемых бластоконидиями.

Расстояния между дополнительными перегородками, образуемыми в процессе образования артроконидий, становятся больше с увеличением расстояния от конидионосцев.

Кроме упомянутых выше мутаций *acon-2*, *acon-3*, *fld* и *fl* идентифицированы также мутации *csp-1* и *csp-2* (conidial separation), которые предотвращают разделение проконидий и формирование межконидиальных связей [238].

При росте на полноценной жидкой среде конидии не образуются. Мицелий, культивируемый в жидких встряхиваемых культурах, продолжает расти путем элонгации гиф, хотя при истощении питательных веществ в среде происходит формирование небольшого количества цепей с минорными стяжками [248]. Рост мицелия в стационарной жидкой культуре приводит к образованию воздушных гиф на поверхности, которые продуцируют нормальные конидии. Установлены определенные условия, индуцирующие в жидкой среде при встряхивании дифференцировку конидионосцев непосредственно на концах гиф — так называемый, микроцикл конидиирования или педогенез [70, 204]. Микроцикл конидиирования может быть индуцирован при инкубации мицелия в жидкой культуре при 46 °С в течение 15 часов, а затем — при 25 °С [18]. Рост в жидкой среде при встряхивании в условиях недостатка углерода или азота также стимулирует микроцикл конидиирования [104, 175, 204].

Выделен штамм *N. crassa* — *mcb* (microcycle blastoconidiation), осуществляющий микроцикл конидиогенеза при росте в полноценной жидкой среде [161]. Ген *mcb* необходим для установления полярности роста и кодирует регуляторную субъединицу цАМФ-зависимой протеинкиназы [60]. Другой ген гриба — *cot-1* (colonial temperature sensitive), регулирующий полярность роста и ветвление, кодирует каталитическую субъединицу цАМФ-зависимой протеинкиназы [138, 273].

Культуры *N. crassa* дикого типа при определенных условиях образуют микроконидии. Они отличаются от макроконидий по способу формирования на мицелии, размеру и по структурной организации [155].

В условиях азотного голодания при культивировании на твердой среде, вегетативные гифы могут инициировать путь полового воспроизведения [267]. Идентифицировано около 200 мутаций, влияющих на половой цикл развития [202, 210].

Из трех возможных путей споруляции процесс образования макроконидий *N. crassa* охарактеризован наиболее подробно с помощью биохимических и молекулярно-биологических методов исследования.

### III. ГЕНЫ *N. CRASSA*, СВЯЗАННЫЕ С ПРОЦЕССАМИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Благодаря возможности легко изменять направление процесса дифференцировки и контролировать это изменение условиями внешней среды, а также простоте выращивания организма и наличия множества мутантов, с функциональными или структурными нарушениями отдельных этапов в онтогенезе, в последнее десятилетие идентифицировано несколько групп генов, которые представляют интерес в связи с программой развития гриба *N. crassa* (табл. 1).

Таблица 1  
Гены *N. crassa*, экспрессия которых регулируется в процессе дифференцировки

Гены	Функция белка	Регуляторные элементы промотора	Ссылка
Структурные гены			
<i>al-1</i>	Фитоиндегидрогеназа	CRS-B, GATA, CRE	[232]
<i>al-2</i>	Фитоинсинтетаза	CRS-B, GATA, CRE	[233]
<i>al-3</i>	Геранилгеранилпирофосфатсинтетазы	CRS-B, GATA, CRE, APE	[187]
<i>bli-3</i>	Неизвестна	CRE	[85]
<i>bli-4</i>	То же	GATA, CRE	[59]
<i>ccg-1</i>	То же	GATA, CRE	[167]
<i>ccg-2</i>	Гидрофобин наружного слоя конидий	CRS-B, GATA, CRE, APE, ACE	[50, 84]
<i>ccg-4</i>	Неизвестна		[52]
<i>ccg-6</i>	То же		[52]
<i>ccg-9</i>	То же		[52]
<i>con-6</i>	То же	CRS-B, GATA, CRE	[268]
<i>con-8</i>	То же	GATA, CRE	[217]
<i>con-10</i>	То же	CRS-B, GATA, CRE, APE	[216]
<i>con-13</i>	То же	GATA, CRE	[106]
<i>cot-1</i>	Каталитическая субъединица протеинкиназы А	GATA, CRE	[138, 273]
<i>mcb</i>	Регуляторная субъединица протеинкиназы А		[60]
<i>rco-3</i>	Транспортер глюкозы	GATA, CRE	[160]
Регуляторные гены			
<i>fl</i>	Фактор транскрипции типа Gal4p	GATA, CRE	[41]
<i>frq</i>	Компонент циркадных часов, Фактор транскрипции	GATA, CRE	[166]
<i>nit-2</i>	Фактор транскрипции, GATA-фактор	CRE	[99]
<i>nit-4</i>	Фактор транскрипции типа Gal4p		[97]
<i>wc-1</i>	Фактор транскрипции, GATA-фактор	GATA, CRE	[45]
<i>wc-2</i>	То же	GATA, CRE	[149]

## СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ

В первую очередь это группа генов *con*, предпочтительно экспрессирующихся в процессе образования макроконидий [54]. Из 13 выделенных генов *con* к настоящему времени изучена экспрессия и молекулярная организация 5 генов (*con-6*, *con-8*, *con-10*, *con-11* и *con-13*). Ни один из исследованных продуктов генов *con* не имеет значительной гомологии по последовательности с другими известными белками. Полипептиды, кодируемые генами *con-6*, *con-8*, *con-10* и *con-13*, гидрофильны [106, 216, 217, 268], хотя пептид CON13 содержит N-концевой район гидрофобных остатков, что характерно для сигнальной последовательности [106, 247]. Полипептид CON10 локализован в цитоплазме и накапливается в макроконидиях и аскоспорах выполняя, по-видимому, роль клеточного протектора от действия стрессоров [37]. Гены *con-6*, *con-8*, *con-10* и *con-11* экспрессируются в ходе всех альтернативных путей споруляции [249]. Определена кинетика экспрессии этих генов и выявлены мутации, блокирующие экспрессию того или иного гена *con* [217]. К этой же группе можно условно отнести упомянутые выше гены *mcb* и *cot-1*. Необходимо отметить, что локус *cot-1* кодирует две мРНК — *cot-1(l)* (*large*) и *cot-1(s)* (*small*).

Аналогичный подход применен для идентификации генов, специфически экспрессирующихся в процессе полового развития, причем идентифицировано 14 генов *sdv* (sexual development) [187].

Свет играет важную роль в процессах дифференцировки, значительно ускоряя эти процессы и увеличивая количество образующихся макроконидий [142] и протоперитециев (специальных структур мицелия, вмещающих женские органы воспроизведения) [75]. Для клонирования фотоиндуцируемых генов использовалась дифференциальная гибридизация с применением процедуры скрининга, разработанного для определения генов, которые экспрессируются в большей степени после освещения синим светом (350–500 нм) мицелия гриба, культивируемого в темноте [245]. В лаборатории В.Э.А.Руссо выделено 4 клонированных кДНК, которые названы *bli* (blue light inducible) — *bli-3*, *bli-4*, *bli-7* и *bli-13* [245]. Определена нуклеотидная последовательность генов *bli-3* [85], *bli-4* [59] и *bli-7* [50, 84].

В другую группу можно отнести гены, контролируемые три последовательные стадии синтеза каротиноидных пигментов, который происходит при формировании конидий, хотя синтез каротиноидов можно индуцировать и в мицелии, подвергая его действию света и кислорода. Эти гены выделены путем комплементации мутантных штаммов-альбиносов *al-1*, *al-2* и *al-3*

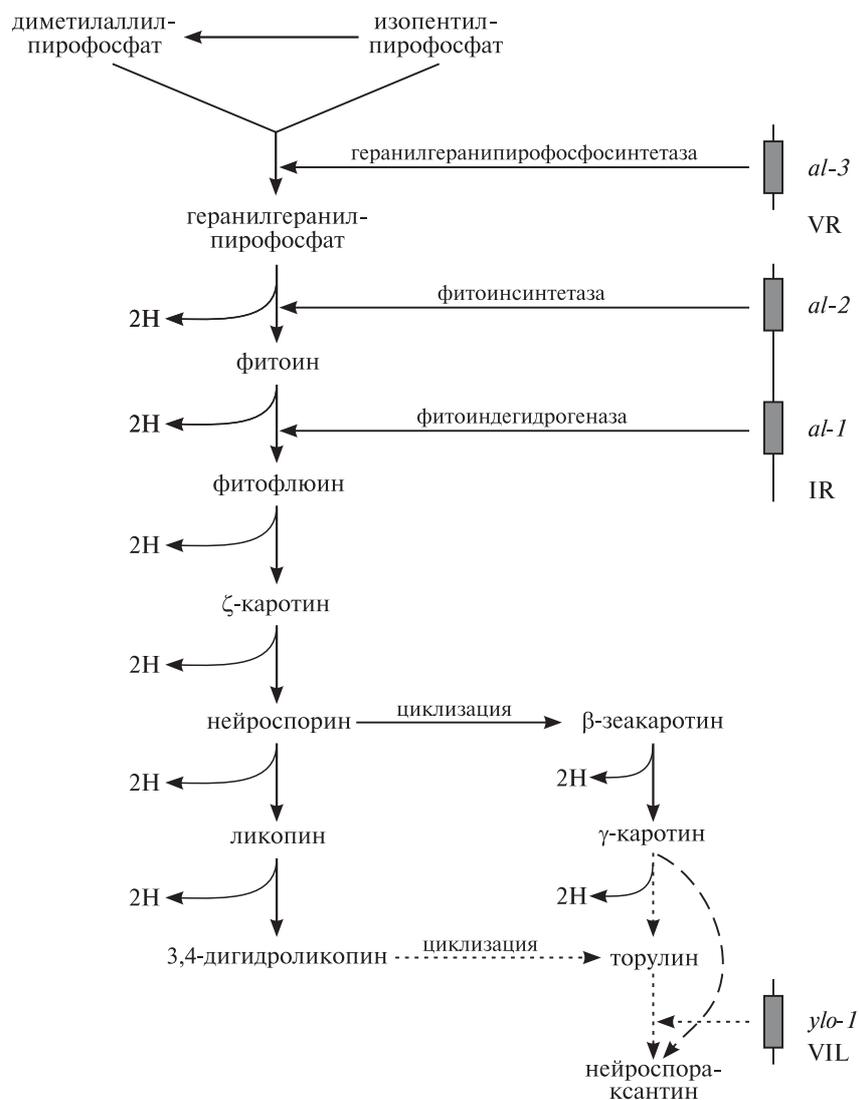


Рис. 2. Схема биосинтеза каротиноидов у *N. crassa* [202].

(albino). Клонированы и секвенированы гены *al-1*, кодирующий фитоиндегидрогеназу [232], *al-2*, кодирующий фитоинсинтазу [233], и *al-3* кодирующий геранилгеранилпирофосфатсинтазу [61, 186], (рис. 2). Локус *al-3* кодирует две мРНК — *al-3(m)* (*mycelial*) и *al-3(c)* (*conidial*).

Программа развития гриба *N. crassa*, направляющая формирование конидий, контролируется эндогенными «часами» [80, 230]. При культивировании в темноте в отсутствие внешних сигналов гриб периодически переключается (для клеток дикого типа период составляет около 21,5 часа) от роста мицелия к формированию конидий. Выделение этих генов проведено с помощью дифференциальной гибридизации и использовании процедуры скрининга, разработанной для выявления генов, которые экспрессируются в мицелии в определенное время суток [154]. Выделено около 10 так называемых генов *csg* (clock controlled genes), часть из которых секвенирована. Оказалось, что ген *csg-1* [154] идентичен (аллелен) гену *grg-1* (glucose repressible gene), выделенному как глюкозо-репрессируемый ген [167]. Другой ген — *csg-2*, оказался аллельным к генам *bli-7* и *eas* (easily wettable) [50, 141] и кодирует основной гидрофобный белок поверхности конидий.

Упомянутые выше гены разделены на группы условно, так как их экспрессия в большинстве случаев индуцируется различными факторами, приводящими к дифференцировке.

#### РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЫ

Кроме генов, экспрессия которых регулируется в процессе дифференцировки, клонированы и секвенированы гены *wc-1* и *wc-2* (white collar) [45, 149], которые осуществляют контроль фотоиндуцируемой экспрессии генов, ген *frq* (frequency), определяющий экспрессию генов в зависимости от «эндогенных часов» [166], а также гены *nit-2* (nitrate nonutilization) [99], *nit-4* [97] и *nmr* (nitrogen metabolite regulation) [274], регулирующие азотный обмен гриба, и ген *fl* (fluffy), необходимый для нормального протекания процесса конидиирования [41]. Сведения о функциональном значении генов, связанных с дифференцировкой, и информация о регуляторных элементах в промоторах этих генов суммированы в табл. 1.

#### IV. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА *N. CRASSA* ПРИ КОНТАКТЕ С КИСЛОРОДОМ ВОЗДУХА (DESICCATION)

##### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ, ВЫЗВАННОЙ КОНТАКТОМ С КИСЛОРОДОМ ВОЗДУХА

Процесс конидиогенеза, индуцированный контактом мицелия с воздухом и подсыханием, в норме завершается за 24 часа независимо от условий освещения. К настоящему времени исследована регуляция более десятка генов в процессе такой дифференцировки.

Характерным для конидий гриба дикого типа, образовавшихся в процессе дифференцировки независимо от условий освещения, является их ярко оранжевый цвет, вызванный присутствием большого количества каротиноидных пигментов. Каротиноиды синтезируются на определенном этапе развития и стимулируются освещением [112]. Гены *al-1*, *al-2* и *al-3*, кодируют ферменты, которые катализируют три последовательных этапа в процессе биосинтеза окрашенных каротиноидов у *N. crassa* [113] (рис. 2).

Исследована экспрессия всех упомянутых выше генов *al* при дифференцировке гриба, опосредованной подсыханием [36, 147, 148]. В отсутствие освещения клетки дикого типа регулируют накопление всех 4 мРНК генов *al* на определенных стадиях развития, но в различной степени. Первые существенные изменения в количестве транскриптов всех *al* генов отмечены через 8 часов развития (рис. 1). Наиболее сильная зависимость от стадии развития отмечена для экспрессии гена *al-1*, количество которого непрерывно увеличивается. Экспрессия гена *al-3(c)* в культурах дикого типа также значительно увеличивается между 8 и 12 часами развития, тогда как экспрессия генов *al-2* и *al-3(m)* мало изменяется. Предполагается, что растущие в темноте клетки гриба накапливают большие количества бесцветного каротиноида фитоина благодаря «leaky»-экспрессии (неполной блокировки функции) генов *al-2* и *al-3*, продукты которых катализируют две последние стадии биосинтеза фитоина [113]. Необходимо отметить, что на всех стадиях дифференцировки в темноте экспозиция культур в течение 30 минут на свету приводит к дополнительной экспрессии генов *al*, за исключением гена *al-3(c)*, экспрессия которого дополнительно увеличивается в ответ на действие света только на ранних стадиях развития (до 8 часов).

В отличие от клеток дикого типа, в культурах мутантов *wc-1* и *wc-2* уровни мРНК всех генов *al* увеличиваются в процессе развития, причем транскрипты появляются на поздних стадиях дифференцировки. Экспозиция на свету темновых культур *wc* не приводит к дополнительной экспрессии генов *al* (см. ниже табл. 5)[147, 148].

Различные мутанты *N. crassa*, блокированные на отдельных этапах онтогенеза, использованы для дальнейшего исследования регуляции каротиногенеза на разных стадиях развития (рис. 1). Полученные результаты указывают на то, что экспрессия генов *al-1*, *al-2* и *al-3(m)* включается на ранних стадиях процесса конидиогенеза и блокируется мутациями по генам *acon-2*, *fld* и *fl*. Интересно, что уровень мРНК *al-3(c)* низок на ранних стадиях

развития в культурах этих мутантов, но увеличивается в процессе дифференцировки. Не исключено, что регуляция экспрессии гена *al-3(c)* осуществляется независимо от путей развития, определяемых мутациями по генам *acon 2*, *fld*, *fl*.

При дифференцировке культуры дикого типа, вызванной подсыханием при постоянном освещении, появляются дополнительные количества мРНК *al-1*, *al-2* и *al-3(m)* с максимумом через 1 час после инициации конидиогенеза. В процессе дифференцировки эти транскрипты постепенно исчезают. В культурах мутантов *acon*, *fld* и *fl* также выявляется дополнительная экспрессия этих генов, тогда как в культурах мутантов *ws* индуцируемое светом накопление транскриптов упомянутых генов *albino* на ранней стадии развития отсутствует [147].

Характерным свойством макроконидий *Neurospora* и спор многих других видов грибов является то, что они покрыты сетью переплетенных белковых структур с выраженными гидрофобными свойствами, называемыми палочками (rodlet). Именно этот слой ответствен за водоотталкивающую природу макроконидий и отсутствует в мутанте *eas* (easily wettable) [47, 237]. Оказалось, что ген *eas* аллелен гену *bli-7*, идентифицированному при исследовании фотоиндуцируемых генов [84], и гену *csg-2*, идентифицированному при исследовании генов, контролируемых циркадными ритмами [50].

В культурах дикого типа экспрессия гена *eas* начинается через 4 часа после индукции конидиогенеза и практически достигает максимума через 8 часов после начала дифференцировки [141], причем этот ген экспрессируется на очень высоком уровне, а начало экспрессии приблизительно соответствует началу экспрессии генов *con-6* и *con-8* (рис. 1). Интересно, что экспрессия гена *eas* нормальна в мутантах по конидиогенезу *acon-2*, *acon-3*, *csp-1* и *csp-2*, но практически отсутствует в мутанте *fl* [141], что соответствует ранним наблюдениям, что воздушные гифы мутанта *fl* гидрофильны, а воздушные гифы других мутантов гидрофобны. Характер экспрессии гена *eas* в процессе дифференцировки похож на экспрессию гена *con-6*, транскрипция которого также блокирована в мутанте *fl*, но не в других мутантах [217].

Как отмечалось выше, в лаборатории Ч. Яновского идентифицирована целая группа генов, последовательно экспрессирующихся в процессе конидиогенеза, вызванного подсыханием [54]. На рис. 1 представлен порядок появления транскриптов генов в процессе конидиогенеза. Экспрессия гена *con-8* не подавляется у мутантов *acon*, *fld* и *fl*., а экспрессия генов *con-6* и *eas* подавляется только мутацией *fl*. Экспрессия генов *con-10*, *con-11* и *con-13* блокируется

мутациями *acon-2*, *acon-3*, *fld* и *fl*, т.е. они функционируют на более поздних стадиях образования конидий, чем гены *con-6*, *con-8* и *eas*.

Интересно, что количество транскрипта *cot(s)*, последовательно уменьшается в процессе конидиогенеза [273].

Путем селекции мутантов, которые экспрессируют гены *con-6* и *con-10* в процессе вегетативного роста [159], получены регуляторы экспрессии генов *con* и морфогенеза макроконидий, а также ряд мутантов, дефектных по конидиогенезу.

Выделены мутанты *rco-1*, которые плейотропны и имеют изменения на стадии вегетативного роста, макроконидиогенеза и полового развития [272]. Одна из аллелей — *rco-1'*, блокирована на стадии перед формированием цепей с минорными стяжками. Ген *rco-1* похож по нуклеотидной последовательности с дрожжевым геном *TUPI*, являющимся частью комплекса репрессии транскрипции [174]. Предполагается, что *rco-1* может действовать прямо или опосредовано через участок репрессии мицелиального роста, идентифицированный в промоторе гена *con-10* [69]. Кроме того, получены данные что белок RCO1 является специфичным к типу клеток репрессором экспрессии гена *con-10* [144].

Клонирован ген *fluffy*. Этот ген кодирует белок FL с С6–цинковым кластером Gal4p–типа, который похож по аминокислотному составу на регулятор азотного обмена у *N. crassa* — NIT4. Предполагается, что белок FL действует как регулируемый процессом развития фактор транскрипции, необходимый для морфогенеза конидиеносцев [41].

При анализе промоторного участка гена *con-6* обнаружена регуляторная нуклеотидная последовательность, определяющая, возможно, процесс формирования конидий, — CRS-B (conidiation regulatory sequence), причем выявлен клеточный белковый фактор, связывающийся с этой последовательностью. Последовательность CRS-B — 5'–GCTGTCAGCATCAT–3', содержит квазипалиндром из девяти нуклеотидов к комплементарной цепи ДНК [268]. Гомологичные последовательности выявлены в промоторных районах генов *al-1*, *al-2*, *al-3*, *eas*, *con-6* и *con-10*.

#### КОНТРОЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГРИБА В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ

Как отмечалось выше, циклы развития у грибов часто контролируются стрессорными факторами внешней среды (голодание, свет, температура, влажность), которые, в свою очередь, изменяют внутриклеточные сигналы (вторичные мессенджеры). Последние соединения могут действовать прямо или опосредовано на факторы транскрипции и через них на экспрессию генов. К настоящему

времени сформулировано две теории относительно механизмов, лежащих в основе дифференцировки грибов. Одна из них принадлежит проф. Барбаре Райт [271], а вторая – проф. Вильгельму Хансбергу [108]. Основное положение первой теории состоит в том, что запуск процессов дифференцировки вызывается субстратным голоданием. Дифференцировка связана с переходом от контакта со средой на метаболическое самообслуживание. Вторая теория, в которой проведена попытка анализа этого перехода, основывается на том, что действие экологических факторов может вести к окислительному стрессу, результатом которого является перестройка метаболизма, приводящая к дифференцировке. В условиях контакта мицелия гриба с кислородом окислительный стресс является наиболее вероятным фактором, инициирующим дифференцировку. Обе теории нашли экспериментальное подтверждение [94, 105].

Хорошо известно, что скорость роста аэробных микроорганизмов зависит от наличия кислорода, лимитирующего рост на полноценной среде. Таким образом, при росте на полноценной среде способность к восстановлению кислорода выше, чем скорость его диффузии в клетку. Однако, при действии нескольких абиогенных стрессорных агентов таких, как субстратное голодание, высушивание, механическое повреждение и освещение, внутриклеточная концентрация кислорода может повышаться в силу ряда причин [108]. Например, при увеличении диффузии кислорода в клетку или при нарушении функционирования дыхательной цепи, внутриклеточная концентрация кислорода может повыситься на 2–3 порядка, и, перейдя рубеж  $10^{-5}$  М [24, 108] приводит к окислительному стрессу [122]. Состояние гиперокисления – окислительный стресс по Хансбергу – нарушение окислительно–восстановительного статуса клетки ввиду того, что количество формирующихся кислородных радикалов превышает способности клетки к их нейтрализации. Хотя не все формы кислорода, образующиеся внутри клетки, являются радикалами, этот термин употребляется в отношении всех внутриклеточных метаболитов кислорода, более реакционно способных, чем молекула кислорода в триплетном состоянии ( $^3\text{O}_2$ ). Это кислород в его возбужденном синглетном состоянии ( $^1\text{O}_2$ ), а также продукты одноэлектронного восстановления кислорода: супероксидный радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), пероксидный радикал ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), пероксидный ион ( $\text{HO}_2^-$ ), перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ). Радикалы и ионы активной формы кислорода (АФК) чрезвычайно нестабильны (время жизни супероксида –  $10^{-6}$  сек, а радикала  $\cdot\text{OH}$  –  $10^{-9}$  сек, однако, ввиду повы-

шенной реакционной способности, они могут окислять мембранные липиды, белки и ДНК [269].

В стабильном состоянии, например, в ходе роста грибного мицелия, уровень кислородных радикалов поддерживается на безопасном уровне благодаря достаточному количеству восстановительных эквивалентов в клетке, а также ввиду функционирования антиокислительных систем, включающих такие мембранно-связанные и цитозольные ферменты как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза и низкомолекулярные соединения (аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол, глутатион и другие), а также ряд других ферментных систем, например, редуктаз, снабжающих клетку недостающими восстановительными эквивалентами.

Показано, что АФК способны играть роль вторичных мессенжеров в клетках бактерий, животных и растений, т.е. опосредовать действие внешних факторов на экспрессию генов [93, 239]. Как медиаторы экспрессии генов АФК модулируют активность факторов транскрипции. У бактерий две разные группы генов стимулируются под действием  $H_2O_2$  и  $O_2^+$  [193, 219]. В патогенезе растений  $H_2O_2$  принимает участие как сигнальная молекула [193]. У *N. crassa* факторы транскрипции WC1 и WC2 могут, по-видимому, подвергаться модификации под действием окислительного стресса (см. ниже).

Другим важным вторичным мессенджером у многих организмов, влияющим на экспрессию генов в ответ на внешние стимулы, является внутриклеточная концентрация циклического 3',5'-АМФ (цАМФ), которая определяется функционированием аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. Изменение внутриклеточной концентрации цАМФ регулирует активность цАМФ-зависимой протеинкиназы (протеинкиназа А). У *N. crassa* установлена связь между уровнем цАМФ в клетке и характером морфогенеза при вегетативном росте гиф [218, 235, 236, 254, 255]. В мицелии колониального мутанта *crisp-1* экзогенный цАМФ репрессирует сверхпродукцию фермента НАД(Ф)<sup>+</sup>-гликогидролазы — фермента, регуляция синтеза которого координированно связана с процессом конидиогенеза [124].

Необходимо отметить, что цАМФ и антиоксиданты увеличивают продолжительность жизни некоторых мутантов *N. crassa* с пониженным конститутивным содержанием цАМФ [184].

Таким образом, при дифференцировке гриба *N. crassa* в условиях контакта с воздухом, сигнал внешнего фактора может, по-видимому, передаваться как через АФК, так и через систему цАМФ, причем эти пути трансдукции сигнала способны функционировать как взаимосвязано, так и независимо друг от друга.

## У. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА *N. CRASSA* ПРИ СУБСТРАТНОМ ГОЛОДАНИИ

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ГРИБА В ПОГРУЖЕННОЙ КУЛЬТУРЕ

Голодание — наиболее распространенный стресс не только у микроорганизмов, но и у растительных и животных клеток, мобилизующий защитные механизмы в целях выживания. Эта форма стресса в большой степени влияет на физиологию клетки, поскольку вызывает изменение ионно-осмотического гомеостаза. Клетка отвечает на длительное голодание включением программы дифференцировки, в результате остановки клеточного цикла и синтеза набора стрессорных белков. Одним из примеров подобной дифференцировки является конидиогенез у *N. crassa*.

Пути дифференцировки этого гриба в значительной степени определяются условиями питания. Так, азотное голодание в жидкой погруженной культуре индуцирует конидиогенез, а на твердой среде ингибирует конидиогенез и индуцирует половой процесс. Недостаток источников углерода индуцирует конидиогенез как в погруженной встряхиваемой культуре, так и на твердой среде [175, 215].

Обнаружено, что при конидиогенезе в темноте, вызванном недостатком источников азота или углерода происходит накопление транскриптов групп генов *al*, *bli*, *con* (табл. 2, 3) [27, 244]. При недостатке азота уровень мРНК всех исследованных нами фоторегулируемых генов (за исключением гена *bli-3*) увеличивался более чем в три раза в клетках дикого типа, росших в жидкой культуре (табл. 2, 3). Более, чем в десять раз увеличивалось количество мРНК генов *al-1* и *eas*, причем увеличение транскриптов последнего гена было наиболее значительным (более, чем в 50 раз) и мРНК гена *eas* после индукции составляло более 0,2% от общего количества РНК [244]. Недостаток азота стимулировал накопление одного из транскриптов гена *al-3* — *al-3(c)*, характерного для конидий [36]. Кроме увеличения числа мРНК структурных генов, голодание по азоту стимулирует накопление мРНК регуляторного гена *nit-2* в 2—4 раза [98].

В условиях недостатка глюкозы уровни мРНК всех исследованных нами фоторегулируемых генов также увеличивались более чем в три раза в клетках дикого типа, при выращивании в погруженной культуре в темноте (табл. 2, 3) [27]. При углеродном голодании усиливалось (относительно условий голодания по азоту) накопление мРНК генов *bli* и *con*, тогда как индукция генов *al-1* и *al-2* была несколько снижена, а индукция экспрессии гена *al-3* задержана на 4 часа [36]. Как и в случае недостатка азота, при голо-

Таблица 2  
**Индукция экспрессии генов у разных штаммов *N. crassa* в ответ на голодание по азоту (N) или углероду (C): дикий тип (WT) и мутанты *wc-1* и *wc-2***

Ген	WT (STa)*		<i>wc-1</i> (4398)		<i>wc-1</i> (4396)		<i>wc-2</i> (4408)		<i>wc-2</i> (R251)	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
<i>al-1</i>	16,2	9,7	24,5	12,1	31,5	12,6	44,7	15,3	15,0	4,7
<i>al-2</i>	5,2	3,8	5,8	2,8	11,7	3,5	9,3	2,9	6,0	1,8
<i>bli-3</i>	1,3	4,6	2,2	17,1	1,7	7,1	3,1	9,0	1,6	6,2
<i>bli-4</i>	3,5	5,1	2,3	3,4	4,6	4,9	3,3	3,2	2,3	1,7
<i>eas</i>	50,2	47,0	98,4	82,9	108,7	95,8	66,6	65,4	103,4	127,6
<i>con-8</i>	3,2	7,5	1,8	3,3	2,3	3,3	1,7	2,9	2,3	4,5
<i>con-10</i>	4,3	24,8	10,2	62,6	7,8	78,5	5,7	33,1	4,1	44,5

В таблице приведены отношения между мРНК гена мицелия *N. crassa* при выращивании в среде с низкой концентрацией азота (2 мМ, NH<sub>4</sub>Cl) или углерода (0,08%, глюкозы, C) и мРНК соответствующего гена при культивировании мицелия в среде с высокой концентрацией азота (50 мМ NH<sub>4</sub>Cl) или углерода (глюкозы, 2%).

Общую РНК выделяли по методу Соколовского и др. [243], а количество мРНК соответствующего гена (в пг на мг общей РНК) определяли по методу Соммера и др. [245].

\* – в скобках приведены номера штаммов в соответствии с каталогом Центра генетики грибов (Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, KS, USA).

Таблица 3  
**Индукция экспрессии генов у различных штаммов *N. crassa* в ответ на голодание по азоту (N) или углероду (C): дикий тип (WT) и мутанты *nit-2* и *nit-4***

Ген	WT (STa)*		<i>nit-2</i> (I 7, 2698)		<i>nit-2</i> (nr 37, 983)		<i>nit-4</i> (nr 15, 985)	
	N	C	N	C	N	C	N	C
<i>al-1</i>	27,3	11,4	5,7	3,3	3,0	12,7	10,5	4,6
<i>al-2</i>	6,8	2,8	1,4	2,1	1,7	3,9	2,6	1,2
<i>bli-3</i>	1,3	11,1	0,09	17,1	0,11	10,9	0,6	9,0
<i>bli-4</i>	2,7	3,3	0,8	6,1	1,5	9,5	1,2	2,1
<i>eas</i>	86,7	81,5	79,7	483,2	22,4	337,6	34,8	40,9
<i>con-8</i>	3,2	7,1	0,4	15,9	0,7	11,6	1,9	6,2
<i>con-10</i>	11,8	114,5	1,2	38,5	2,8	162,9	6,5	65,0

Параметры таблицы и условия измерения те же, что и в табл. 2.

дании по углероду очень сильно повышается количество мРНК гена *eas* (табл. 2, 3). Еще одним геном, мРНК которого быстро (в течение десятков мин) и значительно (приблизительно в 100 раз) увеличивается в условиях углеродного голодания, является ген *scg-1* [167].

Голодание штаммов *sc-1* и *sc-2* по азоту или углероду приводит к такой же индукции экспрессии указанных генов, что и у клеток дикого типа (табл. 2). Можно предположить, что продукты генов *sc-1* и *sc-2* не требуются для регуляции голоданием генов развития [27, 244].

При исследовании влияния мутаций по гену *nit-2*, который кодирует основной белок-регулятор азотного обмена у гриба — NIT2, и гена *nit-4*, который кодирует путь-специфичный регулятор азотного обмена NIT4 [97, 99], на индукцию экспрессии ряда фотоиндуцируемых генов при условиях голодания по источнику азота (табл. 3) выявлен ряд интересных фактов. Так у мутантов *nit-2* при голодании по источнику азота накопление мРНК исследованных генов резко подавляется или полностью ингибируется, а у мутанта *nit-4* подавлена индукция накопления генов *bli*. Эти данные указывают на то, что экспрессия исследованных генов, находится, по-видимому, под контролем азотного цикла гриба — системы генетических регуляторов азотного метаболизма (см. ниже). Интересно, что в условиях голодания по источнику углерода у мутантов *nit-2* и *nit-4* накопление мРНК соответствующих генов практически такое же, как и у клеток дикого типа, что указывает на существование различных путей передачи сигнала при условиях голодания по азоту или углероду.

#### КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У *N. CRASSA* ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ АЗОТА

Рассмотрим возможные пути трансдукции сигнала при голодании по источникам азота или углерода.

Азот является основным компонентом биологических макромолекул, которым принадлежит центральная функциональная роль во всех живых организмах. В связи с этим большинство про- и эукариотических организмов выработали контрольные механизмы, обеспечивающие постоянное поступление азота. Грибы не являются исключением в этом отношении, причем они используют необычайно широкий круг различных соединений в качестве источника азота и способны экспрессировать при необходимости ферменты разных катаболических путей. Обширные исследования метаболизма азота и его регуляции проведены у мицелиальных грибов *Aspergillus nidulans*, *N. crassa* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [111, 112].

У *N. crassa* ограничение по предпочтительным источникам азота, таким как аммоний или глутамин, ведет к увеличенному синтезу различных ферментов, которые необходимы для использования разнообразных вторичных источников азота. Такое переключение метаболических путей контролируется азотным контрольным циклом (nitrogen control circle), одним из глобальных метаболических регуляторных циклов у этого гриба. Этот цикл включает в себя ряд не связанных структурных генов, которые контролируются параллельно как основными, так и минорными регуляторными генами, а также метаболическими индукторами и азотной катаболитной репрессией. Основным ген-регулятором азотного контрольного цикла, позитивно действующий ген *N. crassa* — *nit-2*, кодирует глобальный транс-действующий регуляторный белок NIT2, который относится к факторам транскрипции семейства GATA. Белки семейства GATA являются регуляторными факторами транскрипции у различных организмов, включая позвоночных, беспозвоночных, растения, дрожжи и грибы [163, 164]. GATA-факторы обладают сходным ДНК-связывающим районом, который узнает консенсусную последовательность WGATAR (где W = A/T и R = A/G) и одним или двумя мотивами цинкового кольца с общей конфигурацией Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17(18)</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (где X — любая аминокислота) и соседней последовательностью с преобладанием основных аминокислот. У грибов к GATA-факторам относятся, например, у *N. crassa* (кроме NIT2) белки WC1 и WC2 (см. ниже), белок NRE у *Penicillium chrysogenum* и белок AREA из *A.nidulans*, который необходим для эффективной транскрипции более 100 генов [38], вовлеченных в утилизацию азота.

Мутации по гену *nit-2* у *N. crassa* приводят к частичному или полному ингибированию дерепрессии генов азотного цикла при недостатке первичных источников азота (нитрат, соли аммония, аминокислоты) [164].

Для синтеза ферментов утилизации азота необходима специфическая индукция субстратами или промежуточными продуктами, опосредуемая, так называемыми минорными контрольными генами. Например, в присутствии нитрата белок NIT4, который кодируется путь-специфичным (path-specific) контрольным геном *nit-4*, включает экспрессию структурных генов *nit-3* и *nit-6*, которые кодируют нитрат- и нитритредуктазы [97, 163]. Транскрипция гена *nit-4* не регулируется белком NIT2 [97] и белки NIT2 и NIT4 действуют независимо в активации экспрессии генов, вовлеченных в ассимиляцию нитрата, однако для оптимальной экс-

прессии, например, структурного гена *nit-3* необходимо прямое белок–белковое взаимодействие NIT2 и NIT4 [92].

Глобальный транс–действующий регуляторный белок NIT2 ответствен за селективную индукцию многих и, часто, не связанных генов. Индивидуальные структурные гены могут экспрессироваться на значительно различающихся уровнях или с разной скоростью, что, по–видимому, возможно благодаря различной организации и неодинаковому числу элементов узнавания NIT2 в промоторах регулируемых генов. Нативные NIT2–связывающие участки в промоторных районах различных генов значительно отличаются по ориентации, локализации и нуклеотидной последовательности. Большинство NIT2–связывающих участков содержат два или более близко расположенных копий основного (core) элемента – GATA, который обычно узнается семейством GATA–факторов. Большинство одиночных последовательностей GATA являются участками слабого связывания для NIT2. Два (или более) элемента GATA, локализованные на расстоянии до 30 пар нуклеотидов друг от друга и направленных в одном или противоположных направлениях, составляют участок сильного связывания NIT2. Замена любого из нуклеотидов основного элемента GATA значительно уменьшает или уничтожает связывание NIT2 за одним исключением – последовательность GATT сохраняет около 50% связывающей активности родительского элемента GATA. Все нуклеотиды G, A и T в последовательности GATA и в комплементарной последовательности TATC на противоположной цепи ДНК находятся в близком контакте со связанным белком NIT2 [68].

Глутамин, по–видимому, является основным метаболитом, осуществляющим азотную катаболитную репрессию [65, 208]. Добавление аммония также ведет к сильной азотной репрессии у *N. crassa*, но он действует не сам по себе, так как не вызывает репрессии у мутантов гриба, лишенных глутаминсинтетазы [136]. Внутриклеточный глутамин или его метаболиты ведут к репрессии, однако, сигнальная система, которая чувствует присутствие репрессирующих концентраций глутамин, неизвестна. По–видимому, сам белок NIT2, вспомогательный белок NMR (nitrogen metabolic regulation) или даже гетеродимерный комплекс NIT2–NMR реагируют на изменение концентрации глутамин.

Не исключено, однако, что какой–либо еще неидентифицированный фактор или факторы реагируют на концентрацию глутамин и передают сигнал репрессии к глобальным активирующим белкам. Таким фактором может быть система цАМФ (уровень этого нуклеотида в клетке), так как уровень цАМФ быстро повышается в

клетках *N. crassa* при добавлении к ним аммония [197]. В то же время, внутриклеточный уровень цАМФ понижается при голодании по источнику азота [25]. Опыты с мутантными штаммами *crisp-1* и *pka*, у которых генетически изменен уровень цАМФ в клетках, показали, что у мутантов *crisp-1*, имеющих низкий уровень цАМФ, экспрессия генов в условиях голодания по источнику азота всегда выше (за исключением гена *con-10*), чем у мутанта *pka* (табл. 4), у которого имитирована высокая внутриклеточная концентрация цАМФ благодаря дефекту в регуляторной субъединице протеинкиназы А.

Таблица 4  
**Экспрессия генов у мутантов *N. crassa* при росте на полноценной среде и в средах с недостатком по азоту или углероду: мутанты *crisp-1* и *pka***

Ген	Среда	<i>crisp-1</i> (R188)	<i>crisp-1</i> (R302)	<i>pka</i> (R304)
<i>al-1</i>	ПС	3,9	5,7	1,4
	N	21,2	82,6	15,6
	C	33,5	36,2	17,7
<i>al-2</i>	ПС	0,80	1,28	0,22
	N	3,7	6,1	0,82
	C	3,6	4,3	1,03
<i>bli-3</i>	ПС	7,6	4,6	0,67
	N	11,9	4,9	2,4
	C	78,7	57,8	15,8
<i>bli-4</i>	ПС	2,43	1,93	1,26
	N	7,50	8,53	1,97
	C	10,2	20,1	4,37
<i>eas</i>	ПС	644	460	257
	N	1955	2268	969
	C	3073	3215	1547
<i>con-8</i>	ПС	23,4	19,7	5,6
	N	38,1	41,7	11,3
	C	105	108	35,7
<i>con-10</i>	ПС	0,58	0,25	0,04
	N	1,24	1,13	1,23
	C	1,38	10,7	3,6

В таблице представлены средние значения количеств специфичных мРНК (не менее 3-х независимых экстрактов, в пг на мг общей РНК) в культурах гриба, росших на полноценной среде (ПС), содержащей 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl и 2% глюкозы, и на средах с недостатком по азоту (N, 2 мМ NH<sub>4</sub>Cl) или углероду (C, 0,08% глюкозы).

Не исключено, что система цАМФ и белка NIT2 функционируют независимо друг от друга, хотя наличие в промоторе гена *nit-2* регуляторного CRE-элемента (см. ниже) не исключает возможность регуляции экспрессии белка NIT2 внутриклеточным уровнем цАМФ.

Анализ промоторных последовательностей генов, связанных с дифференцировкой гриба показал присутствие канонических GATA-элементов. Следует отметить, что их число в промоторах всех связанных с дифференцировкой генов, за исключением *bli-3*, в большой степени коррелирует со степенью индукции мРНК этих генов. Очень важно, что среди генов, имеющих такие канонические GATA-элементы, гены *wc-1* и *wc-2*, продукты которых участвуют в фоторецепции, и ген *frq*, кодирующий компонент циркадных часов гриба.

Суммируя представленные литературные данные необходимо отметить, что хотя до последнего времени не проводили исследований по непосредственному взаимодействию белка NIT2 с промоторными последовательностями ДНК генов, связанных с дифференцировкой, можно с большой долей уверенности предположить, что белок NIT2 участвует в регуляции экспрессии этих генов в условиях дифференцировки при ограничении по источнику азота.

#### КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У *N. CRASSA* ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ УГЛЕРОДА

Регуляция экспрессии генов в ответ на вариации концентраций глюкозы, как предпочтительного источника углерода, является распространенным явлением, называемым углеродной катаболитной репрессией. Углеродная катаболитная репрессия относится к механизму, согласно которому репрессирующие источники углерода используются предпочтительно по отношению к более трудно метаболизируемым, что связано со снижением синтеза последних в присутствии первых. Регуляция эукариотических, репрессируемых глюкозой генов подробно исследована у дрожжей и *Aspergillus* [116]. Предполагается, что глюкозная репрессия осуществляется группой регуляторных механизмов, которые отвечают на концентрацию глюкозы в клетках. Для *S. cerevisiae*, например, получены доказательства того, что активация или ингибирование глюкозо-репрессируемых генов определяется степенью фосфорилирования специфических ДНК-связывающих белков [91].

Биохимические исследования *N. crassa* показали, что ряд ферментов гриба репрессируется глюкозой. К ним относятся инвертаза, глюкоамилаза, целлюлаза, эндополигалактуроназа, пектагилаза, пектинлиаза и ксиланаза [205, 206, 242].

Репрессируемые глюкозой гены *N. crassa* исследованы относительно мало. Ярким примером глюкозо–репрессируемого гена у этого гриба является ген *ccg-1* (или *grg-1*, *glucose-repressible gene*), идентифицированный с помощью метода дифференциального скрининга и кодирующий белок с молекулярной массой 7200 Да. мРНК этого гена с трудом определяется в клетках гриба в процессе их роста на среде с глюкозой, но при глюкозном голодании количество мРНК гена *ccg-1* быстро и значительно увеличивается [167].

Известно, что транскрипция гена *ccg-1* контролируется белками, которые связываются с цис–действующими регуляторными участками – NRS (*Neurospora Repression Site*) и CRE (*Cyclic AMP Response Element*) [262]. Показано, что последовательность NRS является цис–действующим регуляторным элементом и впервые обнаружено, что последовательность CRE функционирует в качестве цис–действующего элемента у нитчатых грибов. Оказалось, что ядерные белки гриба связываются с регуляторными участками NRS и CRE гена *ccg-1* независимо от доступности внеклеточной глюкозы, причем выявлены изменения некоторых электрофоретических свойств CRE–связывающего белка при удалении глюкозы из среды [262]. Последовательность CRE, являющаяся палиндромом – 5'–TGACGTCA–3', первоначально охарактеризована как регуляторный элемент в гене соматостатина крыс [32], где он обеспечивает цАМФ–зависимую экспрессию гена. Описан ряд белков, способных связываться с последовательностью CRE. При регуляции транскрипции гена соматостатина крыс увеличение уровня цАМФ ведет к фосфорилированию CRE–связывающего фактора – CREB. В фосфорилированной форме CREB опосредует увеличение транскрипции гена соматостатина, причем CREB является подходящим субстратом для протеинкиназы А.

В отличие от позвоночных, где последовательность CRE действует как усиливающий элемент (*enhancer*) и функционирует в активации транскрипции, у *N. crassa* последовательность CRE функционирует в выключении транскрипции гена *ccg-1* при высокой концентрации глюкозы, т.е. когда внутриклеточная концентрация цАМФ тоже высокая. При понижении уровня глюкозы и, соответственно, при понижении уровня цАМФ, происходит дефосфорилирование белка CREB, его диссоциация от элемента CRE и активация транскрипции гена *ccg-1* [262].

Проведено исследование экспрессии фотоиндуцируемых генов в мутантах *crisp-1* и *pka*, при выращивании этих штаммов как на полноценной среде в отсутствие дифференцировки, так и на средах с пониженным содержанием источников азота или углерода, т.е. в

условиях дифференцировки. У мутантов *crisp-1* содержание цАМФ минимум на порядок ниже, чем у дикого типа благодаря генетическому повреждению аденилатциклазы [20, 134, 198, 218, 240, 254]. У мутанта *pka* дефектна регуляторная субъединица протеинкиназы А, что приводит к частичной имитации повышенного уровня цАМФ [182].

Исследование экспрессии фотоиндуцируемых генов в мутантах *crisp-1* и *pka*, выращенных при различных условиях питания, показало, что экспрессия всех исследованных генов (за исключением гена *con-10*) значительно выше в мутантах *crisp-1*, чем у мутанта *pka* (табл. 4) [27]. Количество транскриптов фотоиндуцируемых генов в клетках дикого типа при тех же условиях занимает промежуточное положение между количеством транскриптов этих же генов у мутантов *crisp-1* и *pka* (неопубликованные данные). Эти результаты, а также то, что добавление глюкозы повышает внутриклеточный уровень цАМФ в клетках *N. crassa* [197], подтверждают предположение относительно участия системы цАМФ в регуляции экспрессии ряда генов гриба в условиях голодания по субстратам, т.е. при дифференцировке.

Анализ промоторных последовательностей различных генов, связанных с дифференцировкой у *N. crassa*, показал, что все гены *al*, *bli* и *con*, а также гены *eas*, *cot-1*, *wc-1*, *wc-2*, *nit-2* и *frq* имеют в промоторных районах одну или более последовательностей, сходных с CRE-элементом (6 и более совпадений нуклеотидов из 8). Очень интересно, что промоторные последовательности регуляторных генов *nit-2* и *frq* содержат участки, полностью совпадающие с CRE-элементом, причем у гена *nit-2* участок CRE находится в той же позиции, что и у гена *ccg-1* (у гена *nit-2* — нуклеотиды -489 — -482, а у гена *ccg-1* — нуклеотиды -494 — -487), только в обратном направлении.

Интересно, что поиск мутантов, у которых транскрипция генов конидиогенеза меняется в зависимости от концентрации глюкозы в среде, привел к идентификации гена, который действует на процесс формирования конидий и глюкозную репрессию — *rco-3* (*regulator of conidiation*), и генов, связанных с измененным характером роста и, по-видимому, с конститутивным конидиогенезом — *nrc-1*, *nrc-2* (*non-repressible conidiation*) и *cnb-1* (*calcineurin B*). Ген *nrc-1* кодирует киназу киназы митоген-активируемой протеинкиназы (МАРККК) и похож на ген *Ste11* из *S. cerevisiae* [130], Ген *nrc-2* кодирует серин/треонин-киназу [130], а ген *cnb-1* — гомолог кальциневрина В [129]. Продукт гена *rco-3* — белок RCO3, по-видимому, функционирует как сенсор глюкозы и передает инфор-

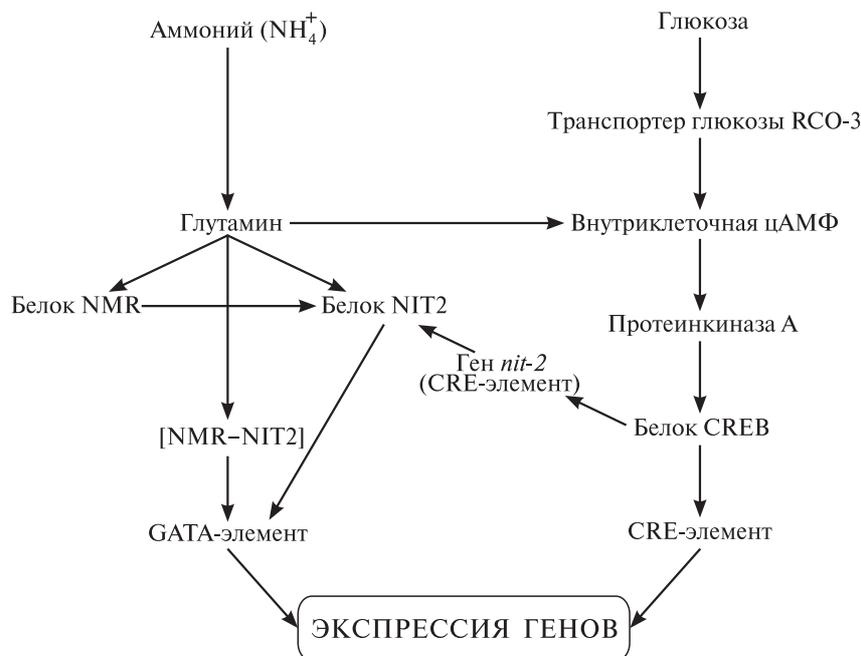


Рис. 3. Возможные пути регуляции экспрессии генов под действием ограничения по источникам азота или углерода с участием цАМФ.

мацию о внеклеточной концентрации глюкозы в клетки таким образом регулируя экспрессию генов и конидиогенез [160].

На рис. 3 представлены возможные пути регуляции экспрессии генов под действием факторов дифференцировки — азотном и углеводном (глюкоза) голодании, с участием системы цАМФ.

### VI. ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ У *NEUROSPORA CRASSA*

Циркадные или биологические ритмы — периодически повторяющиеся изменения интенсивности и характера биологических процессов. Биологические ритмы присущи, по-видимому, всем живым организмам и обнаружены на всех уровнях организации [88]. Эти дневные ритмы, существующие при постоянных условиях окружающей среды, наблюдаются на биохимическом, клеточном, физиологическом и поведенческом уровнях. Сущностью циркадных ритмов является проявление активности к определенному времени дня для координации биологических процессов с экзогенными

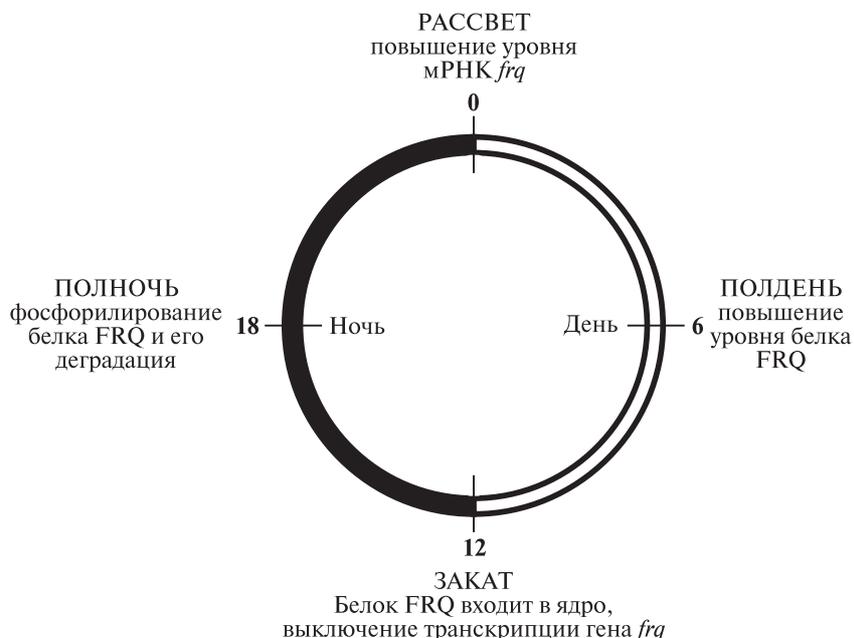


Рис. 4. Модель циркадных часов *N. crassa* [49, 169].

циклами внешней среды. Они подвержены генетическому контролю и являются важнейшими факторами адаптации организмов. Независимые ритмы отдельных клеток способствуют временной упорядоченности биологических процессов и, таким образом, могут служить интегрирующим фактором биологической системы.

Эндогенные биологические ритмы возникают на основе саморегулирующихся процессов с запаздывающей обратной связью. Внешние факторы способны сдвигать фазу циркадных ритмов и менять их амплитуду.

Организмы используют внутренние часы для регуляции биологических активностей так, чтобы они проявлялись в соответствующее время дня [203]. Для этого необходима регуляция генов, вовлеченных в пути ответа, со стороны циркадных часов. Следует отметить, что циркадное время (ЦВ) является условностью, т.е. реальное биологическое время у штамма или организма нормализовано путем деления циркадного цикла на 24 эквивалентных циркадных часа. «Субъективный рассвет», таким образом, определяется как ЦВ0, а «субъективный закат» равнозначен окончанию светового периода, — т.е. ЦВ12 (рис. 4).

У *N. crassa* под контролем циркадных часов находится макроко-нидиогенез. К настоящему времени идентифицировано более 10 генов *N. crassa*, транскрипция которых находится под контролем эндогенных часов гриба. В первую очередь это гены *csg* – *csg-1*, *csg-2*, *csg-4*, *csg-6*, *csg-7*, *csg-8*, *csg-9* и *csg-12*, которые идентифицированы как гены, транскрибируемые только в определенное время суток [52, 154]. Необходимо отметить, что гены *csg-1* и *csg-2* идентифицированы также при исследовании влияния различных стрессорных факторов на дифференцировку гриба как гены *grg-1* и *bli-7(eas)*, соответственно (см. выше). Максимальное накопление транскриптов генов *csg* приходится на период от поздней ночи до раннего утра (от ЦВ18 до ЦВ5), причем стационарный уровень мРНК этих генов различен, а амплитуда количественного изменения их мРНК колеблется от 2 до 11. Интересно, что не все гены, специфически контролируемые часами, вовлечены в процесс развития. Так экспрессия генов *csg-7*, *csg-8* и *csg-12* не индуцируется как в процессе развития, так и под действием света [152]. Кроме генов *csg*, под контролем эндогенных часов находится накопление транскрипта *al-3(c)* [36] и экспрессия генов *con-6*, *con-10* [143] и *frq* [71].

Как же функционирует механизм циркадной ритмичности у *Neurospora* и какие гены участвуют в функционировании этого механизма?

Ген, кодирующий белковый компонент часов, согласно Аронсону и др. [35] должен обладать следующими свойствами: (1) мутации в гене должны вызывать изменения в периоде или приводить к аритмии для всех процессов, находящихся под контролем этих часов; (2) как активность, так и количество белкового продукта должно осциллировать с той же периодичностью, что и общий ритм; (3) предотвращение осцилляции уровня белка должно приводить к аритмии всех процессов, контролируемых часами; (4) сигналы окружающей среды, которые сдвигают фазу часов, должны вызывать быстрые изменения в уровне или активности белкового компонента часов; (5) индуцированные изменения в активности белкового продукта гена должны функционировать по механизму обратной связи для изменения его уровня.

У *N. crassa* обнаружен ген *frq* [81, 90]. Уровень мРНК этого гена и количество белка FRQ циклически изменяются с периодом 22 часа в штаммах дикого типа, при культивировании в темноте. Период их количественных колебаний изменяется соответственно в мутантных штаммах с коротким и длительным периодом ритма [35]. В штаммах гриба, экспрессирующих нециклический ген *frq*, циркад-

ные ритмы отсутствуют. Снижение уровня мРНК *frq* независимо от времени дня, переводит циркадное время к закату (начальной нижней точке в цикле мРНК *frq*). Кроме того, высокий уровень транскриптов *frq* наблюдается во все время дня в штаммах, лишенных функционального белка FRQ, и при репрессии нативного локуса *frq* в штаммах, несущих эктопически сверхэкспрессирующую версию гена *frq*, что указывает на существование петли с отрицательной обратной связью. Таким образом, белок FRQ либо прямо, либо опосредовано регулирует время своего синтеза. Кроме того, для регуляции экспрессии гена *frq* и общей циркадной ритмичности необходима локализация белка FRQ в ядре [156]. В целом, по всем полученным данным ген *frq* полностью удовлетворяет критериям компонента часов.

Биохимическая функция белка FRQ еще не выяснена, однако накапливаются доказательства того, что белок функционирует в регуляции транскрипции. Белок имеет несколько структурных мотивов, характерных для фактора транскрипции: сигнальная последовательность для его локализации в ядре, слабый ДНК-связывающий домен со структурой спираль—поворот—спираль и консервативные районы с преобладанием кислых и основных аминокислот [34, 146, 156].

Полный цикл петли *frq* с обратной связью включает репрессию и дерепрессию (активацию) транскриптов *frq* [168]. На рассвете (ЦВ 0, рис. 4) уровни мРНК *frq* и белка низки, однако количество транскриптов *frq* начинает увеличиваться [101]. Через 4—5 часов уровень мРНК *frq* достигает максимума (перед полуднем) и начинают накапливаться две формы белка FRQ (см. ниже). Между максимальными уровнями мРНК *frq* и белка существует задержка в 4—6 часов, причем уровень мРНК начинает снижаться до достижения максимального накопления белка. Вскоре после начала синтеза белок FRQ попадает в ядро [156] и быстро (в течение 3 часов) подавляет [168], прямо или опосредовано, транскрипцию гена *frq*. В остальное время дня и в течение раннего вечера уровень белка FRQ в ядре остается достаточным для подавления транскрипции. Вскоре после синтеза белок FRQ последовательно фосфорилируется. Нарастание этого процесса приводит к его последующей деградации. Уменьшения количества FRQ ниже критического уровня приводит к его неспособности подавлять транскрипцию и цикл возобновляется [101]. Задержки во времени в молекулярной петле с обратной связью необходимы для достижения стабильного циркадного ритма экспрессии гена.

Таким образом, петля с обратной связью транскрипции/трансляции *frq* является основным компонентом часов у *Neurospora*. Однако, для сохранения нормальных самоподдерживающихся осцилляций внутри или на петлю должны действовать позитивные элементы регуляции. Недавно показано, что гены *wc-1* и *wc-2* необходимы для видимой циркадной ритмичности и для активации экспрессии гена *frq* [71]. Мутации гена *wc-1* полностью блокируют индукцию светом транскрипции *frq*, а мутации *wc-2* допускают только временный фотоответ. Нарушения в каждом из этих генов препятствуют накоплению транскриптов *frq* в темноте и, следовательно, предотвращают сохранение цикличности количества мРНК *frq* и белка. Исследования этих мутантов показали, что ген *wc-2* необходим для функционирования циркадных часов и действует как позитивный элемент в часовом цикле, а ген *wc-1* является позитивно-действующим связанным с часами геном, обеспечивающим необходимую связь между фоторецептором и компонентом осциллятора. По-видимому, белок WC2 действует во время «субъективного рассвета» в каждом цикле для включения транскрипции *frq* [71].

Одним из замечательных свойств часов является то, что они могут нормально функционировать в широком диапазоне физиологических температур. Исследования на *Neurospora* показали, что это явление может быть связано с трансляционной регуляцией белка FRQ, так как температура культивирования определяет количества двух возможных форм белка [151]. Разные формы белка FRQ образуются благодаря альтернативной инициации трансляции: длинная полипептидная цепь из 989 аминокислотных остатков иницируется на первом кодоне ATG, а короткая — 890 аминокислотных остатков — на третьем кодоне ATG. Каждый тип белка может быть достаточным для активности часов при определенных, но не всех, температурах, и удаление одной из форм сужает диапазон температур, допускающих ритмичность. Так, при высоких температурах (около 30 °C) общий уровень белка FRQ повышается и инициация трансляции предпочтительно происходит на первом кодоне ATG, а при низкой температуре (около 18 °C) — на третьем кодоне ATG.

Циркадные часы могут перенастраиваться при помощи внешних сигналов, причем преобладающим и наиболее консервативным стимулом является свет. Уровень мРНК *frq* увеличивается уже через 5 минут после короткого светового импульса, независимо от ингибирования белком FRQ [72]. Наблюдается прямая корреляция между светоиндуцированным уровнем транскрипта *frq* и величиной сдвига фаз ритма конидиогенеза. Эти данные позволяют объяснить как один импульс света может вызывать 2 различных ответа: или

ускорение или задержку фазы ритма в зависимости от времени дня, когда получен световой сигнал. Если световой импульс получен в течение поздней ночи, когда уровни мРНК *frq* низки и только начинают повышаться, то уровень мРНК быстро достигает точки, характерной для середины дня, что и приводит к ускорению цикла. С другой стороны, если световой сигнал получен в течение раннего вечера, когда уровень мРНК *frq* снижается, происходит замедление снижения количества транскрипта и задержка следующего цикла. При получении светового сигнала в середине дня, когда уровень мРНК *frq* максимален, заметных изменений в фазе ритма конидиогенеза не происходит.

Множество фактов говорит о том, что в регуляции функционирования циркадных часов у *N. crassa* и, в частности, в переустановке часов под действием света, участвует система цАМФ. Во-первых, в промоторном районе гена *frq* присутствует несколько последовательностей, сходных с CRE—элементом который, как известно, отвечает за регуляцию транскрипции генов уровнем цАМФ (причем одна последовательность полностью совпадает с CRE—элементом, а три последовательности имеют семь совпадений нуклеотидов из восьми). Во-вторых, обнаружено циркадное изменение уровня цАМФ в клетках *N. crassa* [115], причем оно опережает осцилляцию уровня мРНК *frq* на 4—6 часов. Когда уровень цАМФ в клетках максимален, количество транскриптов *frq* минимально, и *vice versa*, что характерно для участия CRE—элемента в регуляции транскрипции у *N. crassa*. Кроме того, во время интенсивного фосфорилирования белка FRQ уровень внутриклеточного цАМФ повышен, т.е. возможно увеличение активности протеинкиназы А. Под действием света происходит быстрое (1—3 минуты) уменьшение внутриклеточной концентрации цАМФ [20, 115, 134], причем степень уменьшения зависит от времени дня, когда был получен световой сигнал [115]. В то время, когда уровень цАМФ в клетках максимален, а уровень мРНК *frq* минимален, свет вызывает быстрое и значительное (до 50%) понижение уровня цАМФ, ускоряя возможно таким образом, транскрипцию *frq*. Когда уровень транскриптов *frq* максимален или начинает уменьшаться внутриклеточная концентрация цАМФ понижена и свет вызывает небольшое ее уменьшение, хотя такого уменьшения достаточно для некоторого повышения транскрипции [115]. И, наконец, свет и экзогенная цАМФ действуют на сдвиг фазы ритма конидиогенеза в противоположных направлениях [115].

## VII. СВЕТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Для многих гетеротрофных микроорганизмов, включая грибы, видимый свет является экологическим фактором, регулирующим жизненно важные функции. Хорошо известны такие ответы грибов на освещение, как регуляция скорости и вектора роста, контроль над реализацией генетических программ индивидуального развития [17]. К настоящему времени выяснено, что под влиянием света сине-фиолетовой области спектра у *N. crassa* регулируется интенсивность ветвления гиф [142], индуцируется каротиногенез, ускоряются процессы бесполого [142] и полового [76] воспроизведения, сдвигаются или ингибируются циркадные ритмы конидиирования [37, 229], а клювики женских органов полового воспроизведения (протоперитециев) обладают положительным фототропизмом [142]. Кроме того, выделено много мутантов гриба, у которых изменены рецепция и трансдукция светового сигнала. Таким образом, *N. crassa* является удобным объектом для фотобиологических, биохимических и генетических исследований процесса фоторегуляции.

С другой стороны, свет является мощным стрессорным агентом ввиду наличия в грибных клетках большого количества фотосенсибилизаторов, таких как флавины, птерины, порфирины. Возбуждение этих молекул квантом света приводит к формированию в клетках АФК: либо такого сильного окислителя как синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , либо супероксида  $\text{O}_2^+$  (его 1% по сравнению с количеством образовавшегося  $^1\text{O}_2$ ) [16, 225]. Способность АФК к взаимопревращениям усиливает этот эффект. Именно триплетные молекулы фотосенсибилизаторов, синглетный кислород, свободные радикалы и перекиси органических соединений служат инициаторами деструктивных фотодинамических процессов.

Таким образом, действие света приводит к возникновению окислительного стресса и вызывает активацию биосинтеза в клетках *N. crassa* таких, например, соединений, как каротиноиды.

Восприятие светового сигнала зависит от наличия в клетках *N. crassa* фоторецептора, однако, вопрос о его природе до сих пор не решен окончательно. Большая часть данных указывает на то, что в клетках *N. crassa* присутствует фоторецептор с хромофором флавиновой природы [95, 100, 136, 138, 194, 221]. Однако многообразие фотореакций у *N. crassa* заставляет предполагать наличие целой группы фоторецепторных молекул у этого организма, чем объясняются, по-видимому, различия в фоточувствительности гриба и различное воздействие мутаций на процесс фототрансдукции [43, 89, 195].

Из реакций адаптации грибных клеток на действие света уместно упомянуть транзитивное изменение электрических параметров плазмалеммы: входного сопротивления, мембранного потенциала и электрической связи между клетками [см. 4, 145, 207], а также изменение внутриклеточной концентрации цАМФ [20, 134, 198, 218, 240, 254].

#### МУТАЦИИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ВОСПРИЯТИЕ И ПЕРЕДАЧУ (ТРАНСДУКЦИЮ) СВЕТОВОГО СИГНАЛА

Фотоиндукция биосинтеза каротиноидов *N. crassa* является наиболее разработанной моделью для исследования процессов трансдукции светового сигнала, в том числе, выявления мутантов, связанных с процессами рецепции и передачи светового сигнала. Поиски таких мутантов привели к выделению в лаборатории Перкинса мутантов *wc*, которые образуют пигментированные конидии и белый мицелий [76, 199, 201, 202]. Все мутанты *white collar* разделяются на две группы комплементации — *wc-1* и *wc-2* [223]. Эти два генетических локуса неразличимы по фенотипу и находятся, соответственно, в хромосомах VII и I генома *N. crassa*. Мутанты *wc-1* и *wc-2* полностью «слепы» в отношении ответов *N. crassa* на синий свет: у них нарушен биосинтез каротиноидов в мицелии [112] и не наблюдается сдвига циркадного ритма под действием света [222]. Кроме того, у мутантов отсутствует фотостимуляция конидиогенеза [142, 189] и образование протоперитециев, а также и фототропизм их клювика [74, 76, 111]. У мутанта *wc-1* (мутант *wc-2* не исследовался) выявлены конститутивные изменения входного сопротивления, мембранного потенциала и электрической связи между клетками, а также блокированы изменения электрических реакций плазмалеммы под действием света [145]. Таким образом, эти мутанты имеют плейотропный «слепой» фенотип.

В дополнение к *white collar*, выделен целый ряд мутантов с измененной чувствительностью к свету. Митохондриальный мутант *roku* ввиду пониженного уровня цитохрома *b*-типа имеет ослабленную чувствительность к фотоподавлению циркадного ритма конидиогенеза при постоянном освещении [31, 56, 135]. Мутанты *rib-1* и *rib-2* (riboflavin) дефицитны по флавионам и проявляют пониженную чувствительность к фотосупрессии циркадного конидиогенеза при постоянном освещении, ослабленную реакцию на свет в отношении сдвига фазы циркадного ритма, слабую интенсивность каротиногенеза [194]. Из группы мутантов, проявляющих циркадный конидиогенез при постоянном освещении, выделены фотонечувствительные мутанты *lis-1*, *lis-2* и *lis-3* (light insensitive),

которые не чувствительны к действию света на циркадный конидиогенез, однако имеют нормальную чувствительность к свету в отношении сдвига фазы циркадного ритма и интенсивности биосинтеза каротиноидов [195]. Мутанты *blr-1* и *blr-2* (blue light regulator) имеют бледнооранжевый фенотип, указывающий на заниженную индукцию каротиногенеза в мицелии [62]. Оказалось, что у этих мутантов стационарный уровень мРНК всех исследованных фотоиндуцируемых генов ниже, чем у дикого типа [62].

Мутанты *ccb-1* и *ccb-2* (constitutive carotenoid biosynthesis) способны синтезировать каротиноиды конститутивно в темноте, хотя и не обладают избыточным уровнем мРНК светорегулируемых генов [150]. У мутанта *cbr-1* по сравнению с клетками дикого типа повышена экспрессия генов *al-1* и *al-3*, причем по ряду характеристик (морфология, синтез каротиноидов в темноте и на свету, уровень экспрессии генов) этот мутант очень похож на мутант гриба *crisp-1*, т.е. у них изменена клеточная стенка, отсутствуют воздушные гифы и т.д. [27, 62].

Исследование этих мутантов и явилось основанием для предположения о наличии семейства фоторецепторов в клетках *N. crassa* и об их флавопротеидной природе [95, 100, 128, 136, 195].

#### ФОТОРЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У *N. CRASSA*

Экспрессия 60–80 генов *N. crassa* регулируется светом синеволетовой области спектра [185]. К настоящему времени клонировано около двух десятков генов, уровень мРНК которых повышается в ответ на действие света, причем большая часть из этих генов секвенирована. Согласно Соммеру и др. регулируемые синим светом гены могут быть разделены на две группы: ранние, у которых мРНК достигает максимального уровня через 20–30 мин после начала освещения, и поздние, у которых максимальное накопление мРНК наблюдается через 45–120 мин освещения [245]. У первой группы генов, в которую входят гены *al-1*, *al-2*, *al-3*, *bli-3*, *bli-4*, *ccg-4*, *ccg-6*, *con-5*, *con-10*, *cot-1*, *frq* и *wc-1*, лаг-период фотоиндукции экспрессии составляет несколько минут, а количество транскриптов после освещения увеличивается в 10–100 раз (табл. 5) [25, 37, 45, 52, 72, 138, 140, 141, 149, 186, 232, 233, 245]. Фотоспецифическое накопление мРНК генов *bli-13*, *ccg-1*, *ccg-2* (*eas*, *bli-7*), *ccg-9* и *con-8* происходит с лаг-периодом 15–45 мин, а величина индукции экспрессии не превышает 10-ти (табл. 5) [52, 141, 245]. Экспрессия гена *wc-2* под действием света происходит быстро, но количество его мРНК увеличивается только в 2–3 раза [149].

Таблица 5  
**Действие света на экспрессию генов при выращивании различных мутантов *N. crassa* на полноценной среде и на средах с недостатком источника азота или углерода: дикий тип (WT) и мутанты *wc-1* и *wc-2***

Ген	Условия	WT (STa)	<i>wc-1</i> (4398)	<i>wc-1</i> (4396)	<i>wc-2</i> (4408)	<i>wc-2</i> (R251)
<i>al-1</i>	ПС	14,1	1,5	1,1	1,8	0,7
	N	5,6	0,9	1,0	1,2	1,2
	C	10,5	—*	—	—	—
<i>al-2</i>	ПС	14,6	1,0	1,0	1,0	0,8
	N	5,0	0,04	1,0	1,3	1,2
	C	2,2	—	—	—	—
<i>bli-3</i>	ПС	10,6	1,2	0,7	0,7	0,6
	N	2,8	1,0	0,8	1,3	0,7
	C	3,0	—	—	—	—
<i>bli-4</i>	ПС	23,7	1,1	1,4	2,3	0,6
	N	9,0	1,1	1,3	2,0	0,7
	C	6,9	—	—	—	—
<i>eas</i>	GC	1,8	1,0	0,6	0,4	0,6
	N	1,6	0,9	0,9	0,9	1,1
	C	1,0	C	—	—	—
<i>con-8</i>	ПС	3,3	1,2	0,9	0,8	1,1
	N	3,1	0,9	1,0	1,3	0,7
	C	1,5	—	—	—	—
<i>con-10</i>	ПС	33,9	0,6	0,8	1,4	1,0
	N	3,7	0,8	1,1	1,2	0,8
	C	4,0	—	—	—	—

В таблице представлены отношения между количествами специфичных мРНК в мицелии, при культивировании на полноценной среде (ПС) и на средах с ограничением по источнику азота (N) или углерода (C) в течение 24 часов в темноте и освещавшихся после этого в течение 60 мин, и количествами тех же мРНК в мицелии, выращенном в аналогичных условиях в отсутствие освещения.

\* — нет данных.

Длительное освещение может оказывать фотоингибирующее действие на экспрессию генов, как это, например, показано для генов *al-1*, *al-2*, *al-3*, *con-6*, *con-10* и *cot-1* [143, 147–149].

Интересно отметить, что локусы генов *al-3* и *cot-1* кодируют по два транскрипта различной длины. Короткие транскрипты обоих генов — *al-3(m)* (mycelial) и *cot-1(s)* (small), фотоиндуцируемы, а длинные транскрипты — *al-3(c)* (conidial) и *cot-1(l)* (large), по разному отвечают на действие света. Длинный транскрипт гена *al-3*

фотонезависим, но может стимулироваться светом, а длинный транскрипт гена *cot-1* скорее фотоингибируется [61, 138].

Следует подчеркнуть, что все факторы, необходимые для восприятия и передачи светового сигнала, присутствуют в клетках гриба перед освещением. Об этом свидетельствуют эксперименты с актиномицином D и исследование транскрипции в выделенных ядрах *N. crassa* (эксперименты «run-on»), которые показали, что светозависимое повышение уровня мРНК большинства генов связано с регуляцией транскрипции, а не с посттранскрипционными контрольными механизмами [42, 72, 232, 245]. Эти результаты были подтверждены также при исследовании светорегулируемых промоторов *Neurospora* [51, 61, 69, 202a]. Слияние светоиндуцируемых промоторов с кодирующим районом гена-маркера приводит к светозависимой экспрессии этого гена. Кроме того и ингибирование белкового синтеза не подавляет индукцию экспрессии генов, быстро регулируемых светом [42, 72].

Предприняты попытки идентифицировать цис-действующие элементы – последовательности ДНК, которые узнаются факторами транскрипции – контролируемые синим светом, т.е. способные информировать фотоиндуцируемые гены о световом статусе среды. Для этого было использовано два подхода.

Во-первых, проведено прямое сравнение нуклеотидных последовательностей ДНК фотоиндуцируемых генов, лежащих выше не-транслируемых районов. Однако, их анализ не привел к идентификации каких-либо похожих последовательностей ДНК [51, 61, 69].

Альтернативным подходом для идентификации специфичных к синему свету регуляторных цис-действующих элементов транскрипции оказались функциональные исследования. Эксперименты по анализу делеций промотора были проведены для генов *al-3* [61], *ccg-2 (eas)* [51] и *con-10* [69]. Делеционный анализ промотора гена *ccg-2* привел к идентификации двух позитивных цис-элементов (между парами нуклеотидов –1498 и –1079; и –429 и –380) и негативного для световой индукции регуляторного элемента (между парами нуклеотидов –595 и –429) [125]. Позднее было проведено повторное исследование этого промотора и идентифицировано два элемента, отвечающих на действие света, которые локализованы между парами нуклеотидов –102 и –218 и между парами нуклеотидов –460 и –625, причем эти элементы отличаются от описанных ранее [51, 125].

Делеция первого элемента приводила к индукции экспрессии гена, но с измененной кинетикой. Делеция второго элемента полностью подавляла фотоиндукцию накопления мРНК *ccg-2*.

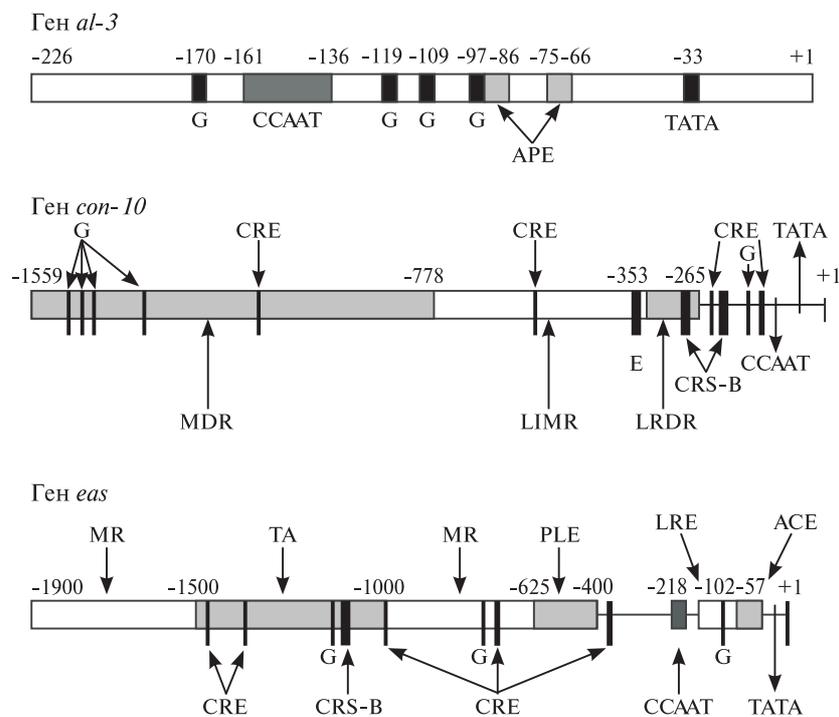


Рис. 5. Локализация регуляторных элементов промоторов генов *al-3* [61], *con-10* [69, 144, 216] и *eas* [49, 50, 84].

На схеме отмечено положение регуляторных последовательностей транскрипции CCAAT, CRE, CRS-B, GATA (G) и TATA. Отмечено положение регуляторных элементов, отвечающих за активацию светом (APE), и циркадными часами (ACE), элементов темновой репрессии в мицелии (MDR), свето-независимой репрессии в мицелии (LIMR), отвечающего на свет участка, регулируемого развитием (LRDR), а также негативного элемента развития (MR), активатора транскрипции (TA), элемента активации светом (PLE) и элемента, отвечающего за действие света (LRE).

Следует подчеркнуть, что кроме светозависимых элементов в промоторе гена *scg-2* обнаружены другие регуляторные элементы, действие которых не связано с ответом на освещение (рис. 5).

Фотоиндуцируемый промотор гена *al-3* исследован с помощью делеций и сайт-специфичного мутагенеза [61]. Участок промотора между парами оснований  $-55$  и  $-226$  обеспечивает реакцию ответа на действие света у гена-маркера. Делеция и мутагенез промоторного участка гена *al-3* между парами оснований  $-98$  и  $-74$  ведет

к полной потере фотоиндукции. В этом участке охарактеризовано два повторяющихся структурных мотива, названных APE (*al-3* proximal element, GAAXXTTGCC, где X означает любые нуклеотиды). Похожие структурные мотивы обнаружены в промоторах генов *al-1*, *ccg-2* и *con-10*.

Коррочано с соотр. использовали слитые конструкции промотора гена *con-10* и гена *lacZ Escherichia coli* для изучения регуляции экспрессии гена *con-10* светом и процессом развития. После делеций и трансформации в *N. crassa* определяли активность  $\beta$ -галактозидазы при различных условиях освещения [69]. В промоторе этого гена не идентифицировано элементов, отвечающих за активацию светом экспрессии генов. Однако обнаружены два участка темновой репрессии, элемент репрессии мицелиального роста, участки активации конидиогенеза и усилительный (enhancer) элемент. Авторы считают, что свет участвует в снятии темновой репрессии у этого гена [69].

Как выяснилось в дальнейшем, действие света выражается не только в регуляции экспрессии генов, но и в изменении состояния фосфорилирования некоторых белков. Под действием света происходит дефосфорилирование белка с молекулярной массой 33 кДа [139], фосфорилирование микросомального белка с молекулярной массой 15 кДа [191] и гиперфосфорилирование комплекса белков WC1 и WC2 [158].

Индукция экспрессии светорегулируемых генов гриба блокирована в мутантах *wc-1* и *wc-2* (табл. 5). Кроме того, экспрессия гена *wc-1* авторегулируется, то есть функциональный белок WC1 необходим для фотоиндуцируемого накопления продукта этого гена [45]. Существует, однако, несколько исключений из этого правила. Так, фотоиндукция экспрессии гена *wc-2* не зависит от присутствия функциональных продуктов генов *wc-1* и *wc-2*, а фотоиндукция экспрессии гена *frq* не зависит от присутствия функционального продукта гена *wc-2* [71, 149]. Интересно, что зависимость фотоиндукции экспрессии гена *ccg-1* от продукта гена *wc-2*, но не от продукта гена *wc-1*, подавляется условной мутацией по гену *cot-1* [37]. Такого эффекта не обнаружено для фотоиндукции экспрессии генов *al-3* и *ccg-2*.

Кроме того, от функционирования белков WC1 и WC2 зависит стимуляция светом фосфорилирования микросомального белка с молекулярной массой 15 кДа, а у мутантов *wc-1* и *wc-2* изменен характер фосфорилирования белка с молекулярной массой 33 кДа [191].

БЕЛКИ WC1 И WC2 КАК ЦЕНТРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ  
СВЕТОВОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У *N. CRASSA*.

Итак, для всех различных ответов клеток гриба *N. crassa* на действие синего света необходимо присутствие функционирующих белков WC1 и WC2, причем мутации по генам, кодирующим эти белки, ведет к полной «слепоте» гриба. Несмотря на интенсивный поиск других локусов white collar обнаружить не удалось. Оба белка являются, по-видимому, факторами транскрипции, специфически вовлеченными в регуляцию синим светом, таким образом представляя последний этап световой трансдукции. Более того, они, по-видимому, также могут служить и элементом передачи светового сигнала. Таким образом, белки WC1 и WC2, по-видимому, являются фундаментальными структурами светоспецифичных транскрипционных комплексов.

Гены *wc-1* и *wc-2* клонированы и секвенированы [45, 149]. Интересно, что промоторные участки этих генов содержат канонические GATA-элементы и районы, подобные цАМФ-регулируемому элементу CRE (шесть-семь совпадений нуклеотидов из восьми), которые, как известно, участвуют в регуляции экспрессии генов в ответ на ограничение по источникам азота или углерода. Белок WC1 состоит из 1168 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 127 кДа, а белок WC2 (54 кДа) состоит из 530 аминокислотных остатков (рис. 6). В предсказанных аминокислотных последовательностях белков WC1 и WC2 обнаружено несколько структурных характеристик, указывающих на то, что эти белки могут выполнять роль факторов транскрипции, вовлеченных в световую регуляцию экспрессии генов.

Несмотря на то, что белки WC1 и WC2 различны по размеру и в аминокислотных последовательностях этих белков отсутствует гомология, они имеют сходную организацию предполагаемых функциональных доменов, включая домен активации (AD), домен

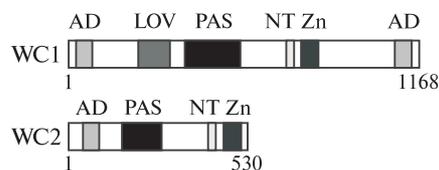


Рис. 6. Структурная организация белков WC-1 и WC-2 [43, 44].

Показана локализация домена активации (AD), домена димеризации (PAS), домена нацеливания в ядро (NT), ДНК-связывающего домена со структурой цинкового «пальца» (Zn) и домена LOV, реагирующего на изменение света, редокс-состояния и энергетического состояния клетки.

димеризации (PAS), домен нацеливания в ядро (NT) и ДНК-связывающий домен со структурой «цинкового пальца» (zinc finger) (Zn) (рис. 6). Кроме того, белок WC1 содержит еще один функциональный район – домен LOV.

Рассмотрим структурную организацию белков WC более подробно. Белки WC1 и WC2 содержат ДНК-связывающие домены со структурой «цинкового пальца», которые очень похожи на ДНК-связывающие домены GATA-факторов. В отличие от GATA-факторов позвоночных, которые содержат два аналогичных домена, белки WC1 и WC2 имеют только по одному такому домену, расположенному в С-конце. Петля «цинкового пальца» белков WC1 и WC2 состоит из 18 аминокислотных остатков, тогда как у других GATA-факторов в этой петле присутствует только 17 остатков. Недавно клонированы факторы транскрипции SRD1 из *S. cerevisiae* и NTL1 из растения табака, которые также содержат 18 аминокислотных остатков в петле «цинкового пальца» [187, 188]. Показано, что районы белков WC1 и WC2, содержащие домен «цинкового пальца», соединенные с глутатиотрансферазой и экспрессированные в клетках *Escherichia coli* способны связываться с APE-элементом фоторегулируемого гена *al-3*, который вовлечен в фотоиндукцию экспрессии гена [61] и содержит два мотива GATA. В трех мутантах *wc-2* выявлены мутации или делеции в домене «цинкового пальца» белка WC2 [57].

В белках WC1 и WC2 обнаружены домены активации транскрипции: N-концевой район белка WC1 содержит участок из 28 остатков глутамин, а в структуре белка WC2 идентифицированы участки, богатые пролином и кислыми аминокислотами. Кроме того, в обоих белках обнаружены сигнальные последовательности способствующие их транспорту в ядро (рис. 6).

В аминокислотных последовательностях белков WC1 и WC2 выявлен так называемый домен димеризации PAS. Белок WC1 имеет участок PAS, состоящий из двух канонических повторов (PAS A и B), тогда как белок WC2 имеет только один повтор PAS. Название PAS является акронимом первых букв белков, у которых были обнаружены аминокислотные последовательности, характерные для доменов PAS. Это белок PER (period) биологических часов *Drosophila*, белок ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) человека и белок SIM (single-minded regulator) *Drosophila* [253]. Домены PAS локализованы в центральном районе обоих белков WC, что указывает на их возможное участие в формировании гомо- и гетеродимеров белков WC (рис. 6). Проведенные исследования подтвердили эту гипотезу – домены PAS белков WC1 и WC2 явля-

ются структурной основой формирования этими белками гомо- и гетеродимеров [44]. Кроме того показано, что комплексы белков WC присутствуют в клетках гриба как в темноте, так и на свету. Интересно, что белок WC2 содержит уникальный домен PAS, имеющий 48% совпадений по аминокислотной последовательности с белком PYP (photoactive yellow protein) — фоторецептором синего света, участвующим в отрицательном фототаксисе у *Ectothiorodospira halophila* [40].

Белки, содержащие домены PAS, участвуют в регистрации изменений интенсивности освещения, окислительно-восстановительного статуса, уровня кислорода и небольших лигандов, а также в оценке энергетического состояния клеток [253]. Домены PAS присутствуют в таких белках как гистидин- и серин/треонин-протеинкиназы, хеморецепторы, фоторецепторы для таксиса и тропизма, белки циркадных ритмов, белки потенциал-зависимых ионных каналов, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, регуляторы ответов на гипоксию и регуляторы эмбрионального развития нервных клеток. Домены PAS связаны с различными регуляторными модулями в мультидоменных белках. В результате спектр клеточных ответов при изменении внешних и внутриклеточных условий контролируется через PAS-содержащие рецепторы, трансдукторы и регуляторы.

Исследована функциональная роль в трансдукции светового сигнала домена LOV (light, oxygen and voltage sensing), идентифицированного только в последовательности белка WC1 (рис. 6) [45]. Последовательность этого домена (аминокислоты 393—504) имеет высокое сходство (42% идентичности и 63% сходства) с последовательностью фактора транскрипции Vat из *Halobacterium halobium*, который необходим для опосредованной кислородом или светом экспрессии гена бактериородопсина [103]. Этот же район белка WC1 имеет сходство по последовательности (45% идентичности и 55% сходства) с белком NPH1 (non-phototropic hypocotyl) из *Arabidopsis*, который, по-видимому, является серин/треонин-киназой [118]. Кроме того, этот же участок имеет сходство (23% идентичности и 53% сходства) с аминокислотной последовательностью белка NifL, который регулирует транскрипцию гена *nif* в ответ на изменения концентрации кислорода в окружающей среде у *Synechocystis sp.*, *Klebsiella pneumonia* и *Azotobacter vinelandii*, причем белок NifL имеет в качестве простетической группы ФМН [117]. Более того, домен LOV сходен (36% идентичности и 60% сходства) с субъединицами потенциал-зависимых калиевых каналов из *Drosophila* и млекопитающих. Показано, что домен LOV не образует димеров с канон-

ническими доменами PAS, но способен к автодимеризации [44]. Выделено три «слепых» штамма *wc-1*, с заменами одиночных аминокислот только в домене LOV, что указывает на важность этого домена для фотоответов у *N. crassa*, причем белки WC1 у этих мутантов способны к самодимеризации, то есть домен LOV, возможно, играет важную роль в трансдукции светового сигнала [189].

Основываясь на полученных данных выдвинута гипотеза, согласно которой белки WC1 и WC2 являются центральными компонентами системы светового сигнала у *N. crassa*, принимая участие в его рецепции, трансдукции, а также регулируя в качестве факторов транскрипции экспрессию фотозависимых генов. Однако эта модель передачи сигнала оставляет невыясненным роль вторичных посредников и фосфорилирования/дефосфорилирования в трансдукции светового сигнала.

#### ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СВЕТОВОГО СИГНАЛА

Суммируя имеющиеся в литературе данные нужно отметить, что присутствие незначительных количеств продуктов генов *wc-1* и *wc-2* в мицелии гриба, росшего в темноте, может индуцировать транскрипцию генов-мишеней в ответ на свет без дополнительной транскрипции этих генов. На это указывают два типа данных. Во-первых, индукция целого ряда фотоиндуцируемых генов *N. crassa* происходит очень быстро и транскрипты определяются уже через несколько минут после светового сигнала, то есть быстрее, чем фотоиндукция экспрессии генов *wc-1* и *wc-2* (около 30 мин). Во-вторых, световая индукция экспрессии гена *al-3*, например, не разобщается при предварительной обработке клеток циклогексимидом [42]. Следовательно, светоиндуцируемая активация транскрипции различных генов может быть результатом запускаемой светом посттрансляционной модификации белков WC1 и WC2.

Каков же механизм, с помощью которого свет активирует быстрый ответ через белки WC1 и WC2?

Одной из возможных систем посттрансляционной модификации является система цАМФ. Для оценки роли системы цАМФ у грибов в физиологических процессах предложен целый ряд критериев, по которым можно судить об участии цАМФ в регуляции исследуемых процессов [198]. Согласно этим критериям получен ряд доказательств о причастности системы цАМФ *N. crassa* к трансдукции фотосигнала грибными клетками, в основном, при фотоиндуцированном синтезе каротиноидов в мицелии.

При освещении клеток мицелия *N. crassa* происходит быстрое, кратковременное и значительное понижение внутриклеточного

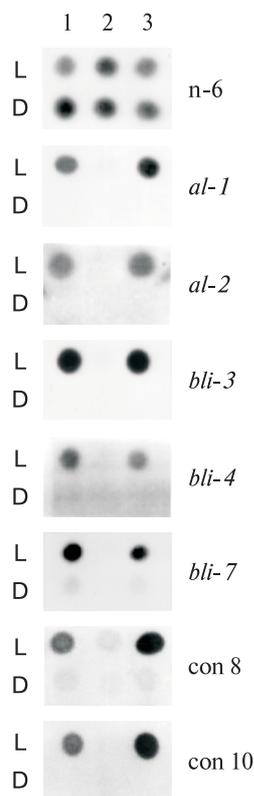


Рис. 7. Влияние цАМФ на фотоиндукцию экспрессии генов *N. crassa*.

Мицелий собирали после роста в темноте (D) или после 30 мин световой индукции (L) (1 — контрольная культура, 2 — +20 мМ цАМФ, 3 — +20 мМ АМФ). Для dot-блот гибридации использовали специфические зонды для каждого гена. Контроль — ген *n-6*, который не индуцируется светом.

уровня цАМФ [20, 25, 115, 126, 134], который может достигать минимального значения в течение 30—600 сек в зависимости от условий освещения и среды культивирования (твердая или жидкая), т. е. снижение уровня нуклеотида происходит раньше индукции экспрессии генов. При фотоиндуцированном каротиногенезе величина уменьшения внутриклеточного уровня цАМФ коррелирует с высокой вероятностью ( $r$  около 0,9) с последующим накоплением каротиноидов [20, 134]. Активность фосфодиэстеразы цАМФ под действием света увеличивается *in vivo*, причем временные характеристики этого увеличения соответствуют кривой изменения внутриклеточного уровня цАМФ [26]. Ингибитор фермента — 3-изобутил-1-метилксантин, и экзогенная цАМФ подавляют фотоответ. Показана возможность фотоактивации фермента из клеток дикого типа в системе *in vitro*, причем возможна частичная реконструкция механизма фоторегуляции активности фосфодиэстеразы цАМФ в бесклеточной системе с участием соединений флавиновой природы (ФАД, ФМН, рибофлавин) [26].

Свет индуцирует дефосфорилирование нескольких белков в течение нескольких минут в мицелии клеток дикого типа. Установлено, что добавление экзогенной цАМФ ингибирует индукцию светом экспрессии светозависимых генов (рис. 7), а также оказывает действие на фазы циркадного ритма гриба, противоположное действию света [103].

Все эти данные, а также наличие нескольких возможных участков фосфорилирования/дефосфорилирования в аминокислотных последовательностях белков WC1 и WC2, связанных с функционированием протеинкиназы А (четыре и два, соответственно) [45, 149] обуславливают весьма вероятное участие системы

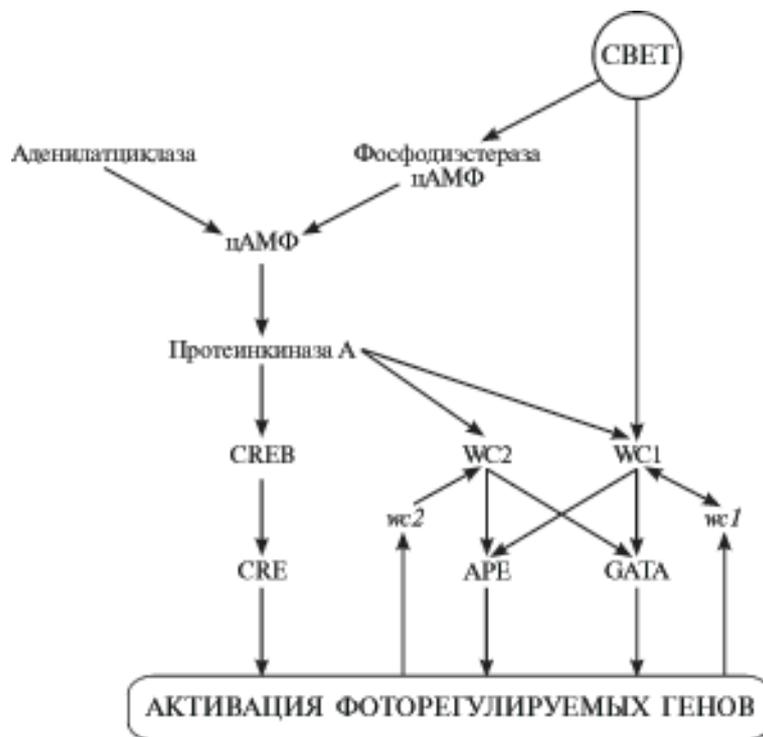


Рис. 8. Предполагаемая схема регуляции светом экспрессии генов с участием системы цАМФ и регуляторных белков WC-1 и WC-2.

В схему включены транс-действующие регуляторные белки CREB, WC-1, WC-2, цис-действующие элементы промоторов генов CRE, APE, GATA и гены *wc-1* и *wc-2*.

цАМФ в рецепции и трансдукции светового сигнала по следующей схеме: фотоактивация фосфодиэстеразы цАМФ → снижение внутриклеточного уровня цАМФ → уменьшение активности цАМФ-зависимой протеинкиназы → дефосфорилирование белков WC1 и WC2 → активация экспрессии фоторегулируемых генов (рис. 8). Нельзя исключить возможности того, что цАМФ может действовать через белки, которые связываются с цис-действующим регуляторным участком CRE в промоторах фотоиндуцируемых генов.

### VIII. КОМПЛЕКСНОЕ ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОРНЫХ АГЕНТОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ *N. CRASSA*

Представленный ранее материал позволяет сделать предположение о существовании альтернативных путей передачи сигнала от разных стрессорных агентов: субстратного голодания и света на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития гриба *N. crassa*. Поскольку в природных условиях грибной организм подвергается комплексному воздействию стрессорных факторов, представляло интерес исследование совместного действия этих факторов на экспрессию генов развития и реакции адаптации *N. crassa*. При исследовании совместного влияния субстратного голодания и света на экспрессию генов каротино- и конидиогенеза у *N. crassa* выяснилось, что голодание по источникам азота или углерода и свет проявляют аддитивное действие на экспрессию фоторегулируемых генов в клетках дикого типа (табл. 5) [6, 27], т.е. после индукции экспрессии этих генов голоданием по источникам азота или углерода освещение вызывает дополнительное накопление их мРНК. Исключение составляет только ген *eas (bli-7)*, экспрессия которого почти максимальна после субстратного голодания и освещение не приводит к увеличению мРНК этого гена.

Для исследования комплексного действия стрессорных агентов на реакции адаптации *N. crassa* был также использован и мутантный штамм *nap* (neutral and acidic amino acid permeability). Штамм является результатом мутации одного гена [120], однако функциональное значение этого гена неизвестно, так как этот ген до сих пор не клонирован. У мутантного штамма на 30–60% снижена скорость транспорта через мембрану аминокислот, уридина и глюкозы [211, 270]. Таким образом, штамм *nap* может служить моделью голодающей культуры *N. crassa*. Дальнейшие исследования с тиоцианатом калия показали, что у этого штамма понижен мембранный потенциал, а также на 50% снижена активность  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны [58]. Кроме того оказалось, что у мутанта снижена скорость роста [9]. Исследования с помощью внутриклеточных микроэлектродов подтвердили снижение величины потенциала покоя на 20% [7]. Тем не менее, также, как и у дикого типа, у мутанта присутствуют две транзитивные последовательные реакции плазматической мембраны на действие синего света – рост входного сопротивления в первые 3–5 мин освещения и гиперполяризация плазматической мембраны с пиком на 30–ой мин освещения [7, 22a]. Природа фотоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы одинакова у транспортного мутанта и дикого типа [7]. Очевидно, таким образом, что снижение потенциала покоя у

мутантного штамма не отражалось на адаптивных реакциях плазмалеммы гриба в ответ на действие синего света. Однако выяснилось, что конститутивное содержание каротиноидных пигментов оказалось у мутанта в два раза выше, чем у дикого типа. Причем распределение по фракциям каротиноидов одинаково у обоих мутантов: превалировал нейроспороксантин, а отдельные компоненты фракции нейтральных каротиноидов распределялись практически одинаково [5, 6].

Интересно, что действие света на клетки транспортного мутанта приводило к значительно большему (в абсолютных количествах) увеличению каротиноидов по сравнению с диким типом; и внутриклеточное содержание АТФ у мутантного штамма также оказалось в полтора раза выше, чем у дикого типа. Известно, что процесс биосинтеза каротиноидов достаточно энергозатратен: на синтез одной молекулы  $C_{40}$  каротиноидов из мевалоновой кислоты в грибных клетках потребляется до 24 молекул АТФ. Таким образом можно предположить, что снижение мембранного транспорта у мутанта, обычно использующего до 50% внутриклеточного АТФ, и дает возможность клеткам накапливать избыточные каротиноиды в условиях голодания по субстратам.

Данные, полученные при исследовании мутанта *nar*, являются еще одним доказательством того, что субстратное голодание стимулирует, по-видимому, экспрессию генов каротиногенеза у *N. crassa*. Кроме того, мутант *nar* является примером аддитивного действия стрессоров — субстратного голодания и освещения — на синтез каротиноидов.

## IX. ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТ ДЕЙСТВИЯ СТРЕССОРОВ

В предыдущих главах рассматривались метаболические сдвиги, предшествующие экспрессии генов на отдельных стадиях дифференцировки *N. crassa*. Эти данные явились основанием для предположения о наличии окислительного стресса, предшествующего каждому дифференцировочному этапу и позволили рассматривать дифференцировку как средство избежать гибели под влиянием стрессорных воздействий.

Классические механизмы антиоксидантной защиты грибной клетки включающие 16 антиоксидантных ферментов [176—181] и целый ряд низкомолекулярных соединений, таких как  $\alpha$ -токоферол, эритроаскорбат, глутатион и др., и их значение в развитии *N. crassa* рассматриваются в ряде статей и обзоров [66, 67, 152, 153, 180, 183, 228, 258]. Нам хотелось бы обсудить защитную роль

каротиноидов и гидрофобинов в ходе дифференцировки *N. crassa* и других представителей царства грибов.

#### СВОЙСТВА КАРОТИНОИДОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Каротиноиды — ярко желтые пигменты, распространенные как у фотосинтетиков, так и не у фотосинтезирующих организмов. Бактерии, грибы и растения синтезируют каротиноиды *de novo*; животные же получают их с пищей и, как правило, модифицируют в процессе окисления. При ферментативном расщеплении каротиноидов образуется ретинол. Ретинол и продукты его окисления играют важную роль в питании, зрении и развитии. При метаболизме некоторых эпокси-ксантофиллов у высших растений образуется абсцизовая кислота — важнейший гормон терпеновой природы. Каротиноидам обязаны своей окраской многие рыбы, птицы, ракообразные [121]. Широкое распространение каротиноидов в живой природе частично объясняется их способностью к изомеризации — возможностью существовать в форме *cis*- и *trans*-изомеров (например,  $\beta$ -каротин, встречающийся часто и у грибов, формирует до 272 изомеров, а  $\alpha$  — до 512). В природе идентифицировано около 600 каротиноидов [192].

#### СТРУКТУРА КАРОТИНОИДОВ

Каротиноиды представляют собой тетратерпеноиды с ветвящимся  $C_{40}$  скелетом, состоящим из восьми  $C_5$  изопреновых единиц. Этот скелет может быть модифицирован путем циклизации на одном или на обоих концах молекулы [57]. Характерным признаком каротиноидов является наличие в молекуле 9—13 конъюгированных двойных связей, которые ответственны за поглощение света. Это основной хромофор каротиноидов.

#### *Химические и физические свойства*

Гидрофобная структура и наличие делокализованной  $\pi$ -электронной системы с низким уровнем триплетного возбужденного состояния определяют биологические свойства каротиноидов, связанные с антиоксидантной активностью и гашением свободнорадикальных процессов в фосфолипидах, липопротеидах и белковых структурах. Однако, в зависимости от парциального давления кислорода, каротиноиды приобретают иногда прооксидантные свойства, формируя новые пероксильные радикалы, запускающие перекисное окисление липидов [132].

Специфическое каталитическое свойство каротиноидов — способность к дезактивации синглетного кислорода, генерируемого в метаболических процессах или фотохимическом взаимодействии возбужденных светом триплетных молекул фотосенсибилизаторов, таких как порфирины, флавины, и т.п. [15, 16, 225]. Каротиноиды, содержащие более 9-ти сопряженных двойных связей, эффективно гасят АФК; при наличии у каротиноидов менее 9-ти сопряженных двойных связей, активность каротиноидов резко снижается [12, 209]. Дезактивирование больше зависит от природы радикалов, чем от структуры каротиноида [173]. Гибель радикалов происходит путем переноса электрона и формирования катион — радикала каротиноида ( $\text{Car}^+$ ); однако пока ничего неизвестно о дальнейшей судьбе этого катиона [132]. Кроме того, каротиноиды способны формировать комплексы с АФК, а АФК могут осуществлять аллильное отщепление атома водорода от молекулы каротиноида [132]. Конечными продуктами этих взаимодействий могут быть такие же летучие карбонильные соединения, как и при ко-окислении каротиноидов липоксигеназой соевых бобов [107, 132].

Установленная, в основном, в опытах *in vitro*, антиоксидантная активность  $\beta$ -каротина и других каротиноидов частично позволяет объяснить их роль в предотвращении перекисного окисления липидов и, таким образом, в предотвращении деструктивных процессов в клетке [12, 86]. Однако, несмотря на большое количество экспериментальных данных относительно антиоксидантных свойств каротиноидов [12, 57, 86, 131, 132, 192] проявление этих свойств *in vivo* еще нуждается в дополнительных доказательствах.

Будучи неполярными соединениями, каротиноиды, в основном, ассоциированы с липофильными клеточными компонентами, включая мембраны [57]. Молекулы каротиноидов могут влиять на такие свойства мембран как толщина, упругость и текучесть, кроме того, они определяют барьерные свойства мембран и проницаемость для кислорода и других молекул [251]. Подобные свойства каротиноидов изучены в основном на бислойных фосфолипидных липосомах [73], концентрация же каротиноидов в мембранах *in vivo* однако намного ниже.

Взаимодействия каротиноидов с белками и липопротеинами могут влиять на физиологические функции, прямо или косвенно регулируя многие внутриклеточные процессы [57]. Наиболее важна роль каротиноидов в барьерной и структурной функции мембран и в межклеточных взаимодействиях. По всей вероятности, структура сопряженных связей полиеновой цепи с делокализованными  $\pi$ -

электронами делает возможным передачу электронов через мембрану и вдоль нее через межклеточные контакты [57].

#### КАРОТИНОИДЫ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У ГРИБОВ

Целый ряд работ, проведенных на клетках грибов, указывает на связь синтеза каротиноидов с защитой организма от фотодинамического действия АФК, образующихся на свету в присутствие кислорода [1, 10, 11, 213]. Действительно, 80% синтезированных каротиноидов *N. crassa* образуется при освещении синим светом (350–500 нм) [13].

Кроме *N. crassa* стимуляция синтеза каротиноидов под действием света сине–фиолетовой области спектра присуща многим представителям царства грибов разных классов и некоторым видам бактерий [17, 28, 213]. Грибные каротиноиды, по–видимому, полифилетического происхождения [28, 121]. Спектр каротиноидов у разных классов грибов различен. Основные каротиноиды грибов — β–каротин, нейроспораксантин и астаксантин [53, 121].

#### ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ У *N. CRASSA*

Каротиноиды у *N. crassa* появляются в ходе реализации онтогенетической программы в процессе формирования конидий на вегетативном мицелии. Компетентность к синтезу каротиноидов мицелий получает при переходе к стационарной фазе роста, т.е. в условиях голодания [18]. Их появление можно стимулировать и в мицелии при культивировании в жидкой среде, подвергая его действию кислорода и света. С одной стороны, экспериментальные данные свидетельствуют, что экспрессия генов каротиногенеза отнюдь не является необходимым предшественником конидиообразования, так как белые (*albino*) мутанты образуют нормальные конидии, не содержащие каротиноидов. Однако, такие конидии менее устойчивы к действию УФ, чем окрашенные конидии дикого типа [256]. Похожие результаты получены для коринобактерий и некоторых других видов бактерий [28].

Фотоиндуцированный синтез и накопление каротиноидных пигментов в клетках мицелия *N. crassa* представляет собой зависимый от кислорода процесс. Аноксигенные условия блокируют его начальные этапы, связанные с рецепцией квантов света хромофором фоторецептора [213]. Оптимальная концентрация кислорода в атмосфере способствующая каротиногенезу составляет 20% [14].

Экспрессия генов каротиногенных ферментов у *N. crassa* может быть опосредована снижением восстановительных эквивалентов в клетке, так как отмечено, что снижение уровня восстановленности

системы НАД·Н/НАД<sup>+</sup> обычно предшествует этому процессу [21]. Сопоставляя эти данные с результатами работ Хансберга [29, 30, 108, 109, 257—259] можно сделать вывод, что биосинтез каротиноидов в мицелии в ответ на освещение и кислород — защитная реакция на окислительный стресс. Кроме того, процесс биосинтеза каротиноидов опосредован изменениями в системе цАМФ [134]. Природа фоторецептора каротиногенеза до сих пор не установлена, однако, по-видимому, у *N. crassa* функционирует фоторецептор криптохромной природы [43]. Свойства фоторецепторной системы, которая контролирует электрические реакции плазмалеммы *N. crassa* и фотоиндуцированный каротиногенез в клетках гриба, достаточно полно охарактеризованы [18, 133].

Следует подчеркнуть, что биосинтез каротиноидов в клетках *N. crassa* ограничен не только определенным этапом в развитии, но и достаточно узким диапазоном температур (культивирование гриба должно проходить в диапазоне 25—28 °С). Отклонение от этого диапазона вызывает снижение способности к накоплению каротиноидов в клетках [2]. Данный факт заставляет думать, что каротиноиды являются лишь одним из многочисленных средств защиты грибной клетки от АФК. Интересно, что у клеток гриба, выращенных при температуре выше 28 °С, при действии света на клетки отсутствует стадия потери клетками восстановительных эквивалентов, наблюдаемая в ходе функционирования фоторецепторной системы клеток, выращенных при 25—28 °С [22]. Кроме того, в отличие от клеток *N. crassa*, выращиваемых при температуре 25—28 °С, повышение ее до 34 °С приводит к изменению электрических характеристик плазмалеммы и, к неспособности плазматических мембран реагировать на действие света изменением их электрических свойств [3].

Процесс биосинтеза каротиноидов, а также качественный и количественный состав этих пигментов у *N. crassa* достаточно хорошо изучен [53, 110, 113, 213]. Путь биосинтеза каротиноидов у *N. crassa*, как и у архебактерий и животных, идет по классическому ацетат—мевалонатному пути, в отличие от эубактерий и зеленых водорослей, у которых образование C<sub>5</sub> предшественника каротиноидов — изопентенилдифосфата — идет, по-видимому, по глицеральдегидтрифосфат/пируватному пути, у растений, очевидно, функционируют оба пути формирования C<sub>5</sub> предшественников каротиноидов [23]. Образование C<sub>5</sub> соединений — (изопентенил- и γ, γ-диметилаллилпирофосфата) — первичное звено в цепи реакций биосинтеза каротиноидов. Вторым этапом является биосинтез C<sub>20</sub> соединений (геранилгеранилпирофосфат) из C<sub>5</sub> единиц. Этот этап

контролируется функционированием гена *al-3* (рис. 2); далее следует образование первичного  $C_{40}$  предшественника (контролируется геном *al-2*) и превращение бесцветных  $C_{40}$  соединений в окрашенные каротиноиды путем реакций дегидрогенизации (под контролем гена *al-1* находится этап дегидрогенизации фитоина) [113]; далее идет процесс циклизации и образование в последующих ферментативных реакциях кислородсодержащих каротиноидов [33, 53]. У нейроспоры, по-видимому, отсутствует полиферментный комплекс из 4-х дегидрогеназ, обнаруженный у *Ph. blakesleanus* [64].

В ходе синтеза каротиноидов у *N. crassa* установлены зависимые от света этапы при дегидрогенизации фитоина [113]. Фитоин накапливается у *N. crassa* и в отсутствии освещения. Нужно отметить, что освещение приводит к дополнительному накоплению фитоина у бесцветных мутантов *N. crassa* (*albino 1*) также как и у бесцветных мутантов *Ph. blakesleanus* (*car b*) [48].

Недостаточно полно изучены последние этапы в процессе биосинтеза нейроспороксантина —  $C_{35}$ -апокаротиноевой кислоты, связанные с функционированием генов *yellow* [201] (см. рис. 2 — пунктирные линии). Впервые нейроспороксантин был обнаружен у дрожжей в 1965 году [28]. В его молекуле 11 конъюгированных двойных связей. На долю нейроспороксантина приходится до 60% каротиноидов, остальные нейтральные каротиноиды *N. crassa* являются промежуточными продуктами его биосинтеза [5, 110].

#### ЛОКАЛИЗАЦИЯ КАРОТИНОИДОВ У ГРИБОВ

Каротиноиды присутствуют у грибов преимущественно в сферосомах или липидных тельцах [121] и гораздо меньше ассоциированы с мембранами. Поскольку сферосомы тесно связаны с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), показано, что синтез их идет в ЭР, а хранение синтезированных каротиноидов *N. crassa* осуществляется в сферосомах. Некоторые авторы считают возможным синтез грибных каротиноидов в пероксисомах, поскольку биосинтез изопреноидов обнаружен в пероксисомах у млекопитающих [121].

Около 80% активности каротиногенных ферментов ассоциировалось у *N. crassa* с фракцией, осаждаемой при 115. 000 g, обогащенной ЭР, но содержащей и фракцию плазмалеммы [170, 171]. Флотирующая липидная фракция содержащая в основном, каротиноиды, демонстрировала следовые активности каротиногенных ферментов. Ферменты биосинтеза каротиноидов распределялись у *N. crassa* следующим образом: AL3 белок, необходимый для синтеза геранилгеранипирофосфата (GGPP) присутствовал в

растворимой фракции. Фитоинсинтетаза — продукт гена *al-2* и фитоиндегидрогеназа — продукт гена *al-1* — выявлялись в осадке.

Ничего, к сожалению, неизвестно о транспорте каротиноидов у грибов, но в животных тканях и плазме каротиноиды транспортируются липопротеинами. Известно, что каротиноиды по-разному доставляются в разные ткани, но мало что известно о регуляции этого процесса [192]. Таким образом, в настоящее время относительно локализации каротиноидов в грибной клетке известно очень немного. Следует лишь упомянуть данные, полученные на *Ph. rhodozyma* методом трансмиссионной электронной микроскопии [121]. Каротиноиды у этого организма обнаружены в липидных гранулах, ассоциированных с плазмалеммой и превалируют в кончике растущей почки. Из данных по *Neurospora* следует упомянуть следующие: дифференцировка мицелия связана со стадией агрегации гиф; только под влиянием кислорода и света в агрегированных гифах обнаруживаются каротиноидные пигменты [4, 108]. У мутанта *wc-1*, не способного синтезировать каротиноиды, нарушена межклеточная связь и светозависимая дифференцировка [4, 9, 145]. Таким образом возможно, что грибов, как и у животных, наличие каротиноидов или их предшественников в клетках способствует их межклеточной коммуникации и нормальной дифференцировке.

#### РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ

На основании имеющихся результатов можно сделать вывод, что регуляция биосинтеза каротиноидов у грибов осуществляется синим светом, кислородом, температурой культивирования и стадией развития. Из рассмотренных в обзоре работ следует, что голодание по источникам азота и углерода стимулирует синтез каротиноидов в клетках *N. crassa*. Первыми эти исследования были начаты в лаборатории Руссо [215]. Известны случаи ингибирования синтеза каротиноидов у микроорганизмов при наличии глюкозы в среде, по-видимому, по типу катаболитной репрессии [28]. Показано, что биосинтез каротиноидов у зеленых водорослей стимулируется стрессами, такими например, как голодание по азоту и высокоинтенсивная радиация [46].

Довольно много работ посвящено исследованию механизмов запуска синтеза кислородсодержащего каротиноида астаксантина (3,3'-дигидрокси- $\beta,\beta$ -каротин-4,4'-дион) базидиомицетными дрожжами *Ph. rhodozyma*, в связи с его промышленным производством [121]. Астаксантин продуцируется вместе с другими кетокаротиноидами и некоторыми зелеными водорослями обычно в ответ на стресс или голодание по субстратам [121]. Основными лимитирующими

моментами в биосинтезе астаксантина являются углеводное голодание и кислород. При скорости аэрирования  $< 30$  мМ  $O_2$ /л/ч *Ph. rhodozyma* в основном, продуцировала  $\beta$ -каротин, а при больших скоростях аэрирования основным каротиноидом был астаксантин. Джонсон и Шроэдер показали, что при переходе к стационарной фазе у этого организма наблюдается переключение дыхания с цианид-чувствительного на цианид-резистентное, ассоциированное со стимуляцией накопления  $O_2$  [121]. Кроме того, было показано, что АФК  $O_2^-$  и  $^1O_2$  являются стимуляторами каротиногенеза у *Ph. rhodozyma* [234a, 234b].

Таким образом, АФК способны стимулировать каротиногенез и регулировать состав каротиноидов у *Ph. rhodozyma*. Однако на сегодняшний день остается неизвестным механизм стимуляции биосинтеза каротиноидов кислородом. Кислород или его производные могли бы прямо реагировать с регуляторами транскрипции, приводя их в окисленную неактивную форму, либо например, через PAS домены рецепторных белков грибных клеток. Что касается *N. crassa*, то рассмотрение комплексного действия света и голодания на дифференцировку гриба, позволило выявить некоторые механизмы каротиногенеза (см.гл. VIII).

#### ГИДРОФОБИНЫ

Клеточные механизмы защиты от воздействия внешних стрессоров включают изменение формы клеток, а также изменение клеточной поверхности [108]. Одним из таких механизмов является образование гидрофобин (ГФ) на поверхности развивающихся гиф — важнейших структурных белков, формируемых грибами. Эти белки открыты относительно недавно [234b, 266]. Изучены биохимические и биофизические свойства грибных ГФ, а также их основные биологические функции [252, 264, 265]. В семейство ГФ входят небольшие секретрируемые белки ( $100 \pm 25$  аминокислотных остатков), содержащие типичную N-концевую последовательность сигнала секреции, но степень консервативности аминокислотных остатков между ГФ невелика [253, 263–265]. Структура ГФ представлена двумя сходными доменами, каждый из которых содержит четыре остатка цистеина, вовлеченных в образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Характерная структура ГФ выглядит следующим образом: Cys-X<sub>3-9</sub>-Cys-Cys-X<sub>3-18</sub>-Gly-X<sub>5-20</sub>-Cys-X<sub>8-23</sub>-Cys-X<sub>5-9</sub>-Cys-Cys-X<sub>2-12</sub>-Gly-X<sub>3-10</sub>-Cys-X<sub>2-13</sub> [83].

Первому остатку цистеина предшествует сигнальная последовательность и слабоконсервативные N-концевые сегменты. Остатки цистеина формируют четыре внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

фидных мостика между остатками цистеина 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, 7 и 8 с образованием двух пар петель, разделенных соединительным районом из 8—ми — 23—х аминокислотных остатков [264]. Слабоконсервативные остатки (X) представлены, в основном, гидрофобными аминокислотами. Размер второй петли более изменчив, но содержит, по крайней мере, один остаток глицина, находящийся обычно рядом с гидрофобной аминокислотой. ГФ разделяют на два класса: ГФ класса I собираются в агрегаты, которые стабильны к действию детергентов и этанола, а ГФ класса II могут диссоциировать до мономеров под действием этих реагентов [83].

Поверхность спор (конидий) многих видов грибов покрыта слоем палочек, толщиной 5—10 нм, который формируется при сборке мономеров ГФ на поверхности клеток [39]. Воздушные гифы и конидии, покрытые палочками ГФ, трудно смачиваются из-за присутствия гидрофобных слоев на наружной поверхности, что способствует как росту воздушных гиф, так и распространению спор грибов в окружающей среде [47]. Внутренняя поверхность гидрофобных слоев, взаимодействующая с клеточной стенкой, гидрофильна. Мицелий мутантов, лишенных палочек ГФ, легко смачивается, что затрудняет их рост в воздушной среде. Момеры ГФ, выделенные из палочек, могут спонтанно собираться в «палочки» на поверхности между гидрофобной и гидрофильной фазами.

Гены, кодирующие ГФ, обнаружены у представителей разных классов грибов. Они могут экспрессироваться на разных этапах жизненного цикла [263]. ГФ нет у гиф, ассимилирующих пищу. Они появляются в процессе формирования воздушных гиф при конидиеобразовании, при адгезии гиф в процессе формирования плодовых тел базидиальных грибов, а также в процессе прикрепления гиф грибов—паразитов к стенке растения—хозяина [83, 265].

К настоящему времени секвенировано более 20 генов грибов, кодирующих ГФ [83]. Большие количества ГФ необходимы для формирования поверхностного слоя грибных гиф или спор, поэтому, неудивительно, что степень экспрессии генов ГФ у грибов высокая. Например, у экспоненциально растущих культур гриба плесени каштана *Cryphonectria parasitica* мРНК крипарина (ГФ у этого гриба) составляет до 27% от общего количества мРНК [266, 275]. Регуляция транскрипции генов ГФ очень сложна, так как их экспрессия контролируется различными внешними стрессорами, включая голодание, свет и циркадные ритмы, а также стадию развития гриба.

Поверхность конидий *N. crassa* также покрыта ГФ, отвечающими за водоотталкивающие свойства конидий. Выделены мутанты гриба

с дефектами гена, кодирующего эти белки, приводящими к потере гидрофобности конидий, что собственно, и дало название фенотипу мутантов – *eas* (easily wettable) [238].

ГФ *N. crassa* – белок EAS, является полипептидом из 108 аминокислотных остатков и рассчитанной молекулярной массой около 11 кДа. Белок содержит сильно гидрофобную N–концевую последовательность (что характерно для сигнальной последовательности), центральный гидрофобный домен из 8–ми остатков цистеина, то есть его структура имеет характерные свойства структур ГФ. Кроме того, полипептид содержит потенциальные участки для фосфорилирования киназой 2 (аминокислоты SIDD, начиная с остатка 36) и протеинкиназой С (аминокислоты SVK, начиная с остатка 83), а также три перекрывающихся участка миристилирования (аминокислоты 70–GCVVGV, 74–GVIGSQ и 77–GSQCGA). Обнаружено, что аминокислотная последовательность белка EAS имеет значительное сходство с последовательностями нескольких низкомолекулярных грибных белков, определяющих гидрофобность клеточных стенок. К этим белкам относятся гидрофобины Sc1, Sc3 и Sc4 из *Schizophyllum commune* [266] и белок RodA из *Aspergillus nidulans*. Таким образом, белки EAS, RodA, Sc1, Sc3 и Sc4, по–видимому, являются членами класса гидрофобных белков поверхностного слоя гиф, обеспечивающих защиту клеток от стресса. Необходимо отметить, что гидрофобный слой конидий *N. crassa* легко удаляется при суспендировании конидий в воде и встряхивании [78], но несмотря на это в погруженных конидирующих культурах гриба может накапливаться значительное количество мРНК *eas*, составляющего до 20% от общего количества мРНК [244].

При исследовании гена *eas* [47, 237] выяснено, что он аллелен гену *bli–7*, идентифицированному при исследовании фотоиндуцируемых генов [245], и гену *csg–2*, идентифицированному при исследовании генов, контролируемых циркадными часами [50]. Принимая во внимание, что количество мРНК *eas* значительно в конидирующих культурах, а конидиогенез у *N. crassa* контролируется как светом, так и циркадными ритмами, не удивительно, что ген *eas* идентифицирован несколько раз в процессе поиска генов, регулируемых различными стрессорами.

Транскрипт гена *eas* присутствует в незначительных количествах в зрелых макроконидиях, прорастающих макроконидиях, росшем в темноте мицелии и в конидирующих культурах гриба в течение первых 4–х часов после индукции конидиогенеза [141]. Значительное количество мРНК *eas* накапливается через 4–8 часов после индукции конидиогенеза, причем уровень мРНК этого гена остается

высоким еще в течение 20–ти часов развития [141]. Накопление мРНК *eas* находится также под световым контролем, причем увеличение уровня транскрипта происходит с длительным лаг–периодом (15–45 мин) и достигает максимума только через 3 часа освещения [141, 245].

Измерены уровни транскрипции гена *eas* в клетках дикого типа и различных морфологических мутантах гриба, блокированных по определенным стадиям развития, в условиях, индуцирующих конидиогенез. Интересно, что в процессе развития морфологических мутантов *acon–2*, *acon–3*, *csp–1* и *csp–2* ген *eas* экспрессируется в той же степени, что и у дикого типа, тогда как в мутантах *fl* и *eas* экспрессия гена практически полностью подавлена [141].

Кроме света и процесса развития на экспрессию гена *eas* влияют условия питания и циркадные ритмы [50, 243]. Так, в условиях голодания по источникам азота или углерода в погруженной жидкой среде происходит сильная индукция экспрессии этого гена (более, чем в 50 раз), хотя индукция происходит с большим лаг–периодом, чем при освещении.

Анализ промоторного района гена *eas* показал его сложную организацию (рис. 5). В промоторе этого гена идентифицировано два генетических сегмента, содержащих элементы, специфически отвечающие на действие света. Один из сегментов локализован между нуклеотидами –460 и –625 и участвует в активации светом транскрипции гена. Второй находится между нуклеотидами –102 и –218 и называется свето–отвечающим элементом (light–responsive element). Кроме того, в позиции –110 в промоторе гена *eas* находится элемент ARE, отвечающий за фоторегуляцию экспрессии гена *al–3* (см. выше), хотя наличие одной копии элемента ARE не достаточно для индукции светом гена *eas* [51].

Кроме того, в промоторе обнаружен регуляторный элемент CRS–B, отвечающий за регуляцию экспрессии гена в процессе развития. В сегменте, локализованном между нуклеотидами –1000 и –1500, находится район активатора транскрипции. В промоторе гена *eas* находится большое количество GATA и CRE элементов, участвующих в активации транскрипции в ответ на голодание по источникам азота или углерода, причем, следует подчеркнуть, что несколько таких элементов находится в районе активатора транскрипции (–1000 и –1500). И, наконец, в сегменте промотора между нуклеотидами –57 и –102 локализован позитивно–действующий элемент циркадных часов ACE (positive–acting clock element), причем он отличается от других элементов, регулирующих экспрессию гена *eas* [51]. Таким образом, в промоторном районе гена *eas*

присутствуют все цис–действующие элементы, необходимые для регуляции экспрессии гена в ответ на внешние стрессоры и внутренние сигналы.

Необходимо отметить, что хотя продукт гена *eas* является важным структурным компонентом поверхностного слоя некоторых морфологических структур гриба, однако ингибирование его синтеза путем мутаций или делеций гена не приводит к изменению функционирования таких механизмов как дифференцировка или циркадные часы. По–видимому, белок EAS не является регулятором дифференцировки, а лишь одним из механизмов защиты от действия стрессоров.

## Х. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексное действие факторов внешней среды – голодания, кислорода и света приводит к дифференцировке грибного организма и формированию органов воспроизведения на вегетативном мицелии, что, по–видимому, является защитной реакцией организма на действие стрессоров. Под действием стрессоров также изменяются внутренние биологические ритмы, которые контролируют макрокониогенез у *N. crassa*.

Переход к формированию органов воспроизведения характеризуется перестройкой в метаболизме, сопровождаемой катаболическими процессами и, на их основе, формированием новых метаболических путей, приводящих, в частности, к синтезу таких защитных молекул, как каротиноиды и гидрофобины. Эти кардинальные изменения в онтогенезе определяются дифференциальной экспрессией нескольких групп генов. Выявлено уже около двух десятков таких генов, часть из которых клонирована и секвенирована. К настоящему времени наиболее подробно охарактеризованы промоторные районы генов *eas* и *al-3* которые кодируют, соответственно, гидрофобин и фермент пути биосинтеза каротиноидов [139], а также гена *con-10*, продукт которого также, по–видимому, выполняет защитные функции [190]. Дальнейшее функциональное исследование промоторных участков, связанных с дифференцировкой генов, поможет выявить пути регуляции их экспрессии на разных этапах онтогенеза гриба.

Необходимо отметить, что различные факторы стресса действуют через альтернативные пути регуляции экспрессии генов. Так, при дифференцировке гриба, определяемой контактом вегетативного мицелия с кислородом воздуха, регуляция экспрессии генов, по–видимому, происходит с участием активных форм кис-

лорода, хотя в этом случае нельзя исключить и влияния голодания, так как поступление питательных веществ может быть ограничено скоростью транспорта от вегетативного мицелия к воздушным гифам [214]. Промежуточные элементы трансдукции стрессорного сигнала неизвестны, однако, характерным для генов, специфически экспрессирующихся при таком пути дифференцировки, является присутствие в их промоторных районах цис-действующего элемента CRS–В [33].

При дифференцировке, вызванной азотным голоданием, основным транс-действующим регуляторным фактором экспрессии генов является белок NIT2, который функционирует через цис-действующие элементы GATA промоторов генов.

Путь регуляции экспрессии генов при дифференцировке, вызванной недостатком глюкозы, включает в себя глюкозный транспортер RCO3, вторичный мессенджер цАМФ, протеинкиназу А, транс-действующий регулятор CREB и цис-действующий элемент промотора CRE.

Сигнал синего света передается, по-видимому, с помощью фоторецептора с хромофором флавиновой природы и важными, если не основными, элементами в цепи трансдукции светового сигнала являются белки WC1 и WC2. Эти белки, наряду с белком FRQ, определяют функционирование биологических часов гриба.

Основным компонентом циркадных часов *N. crassa* является белок FRQ, который действует через неизвестные в настоящее время элементы промотора генов. Для нормального функционирования циркадных часов необходим белок WC2, который способствует экспрессии гена *frq*, а с помощью белка WC1 регулируется сдвиг фазы циркадных ритмов конидиогенеза под действием света.

При передаче альтернативных сигналов с помощью разных регуляторных факторов нельзя исключить того, что эти факторы взаимодействуют, взаимозаменяют или конкурируют друг с другом при определенных условиях (cross-talk). Такие взаимодействия представлены на схеме, которая носит гипотетический характер (рис. 9).

Так, в промоторных районах генов регуляторных белков FRQ, WC1 и WC2 присутствуют регуляторные элементы GATA, что делает возможным регуляцию экспрессии этих генов доступностью источника азота через белок-регулятор NIT2. В промоторах генов, кодирующих регуляторные белки FRQ, NIT2, WC1 и WC2 выявлены регуляторные элементы CRE, то есть экспрессия этих генов может контролироваться уровнем глюкозы через посредство системы цАМФ. Весьма вероятно, что единый ответ клеток (формирование

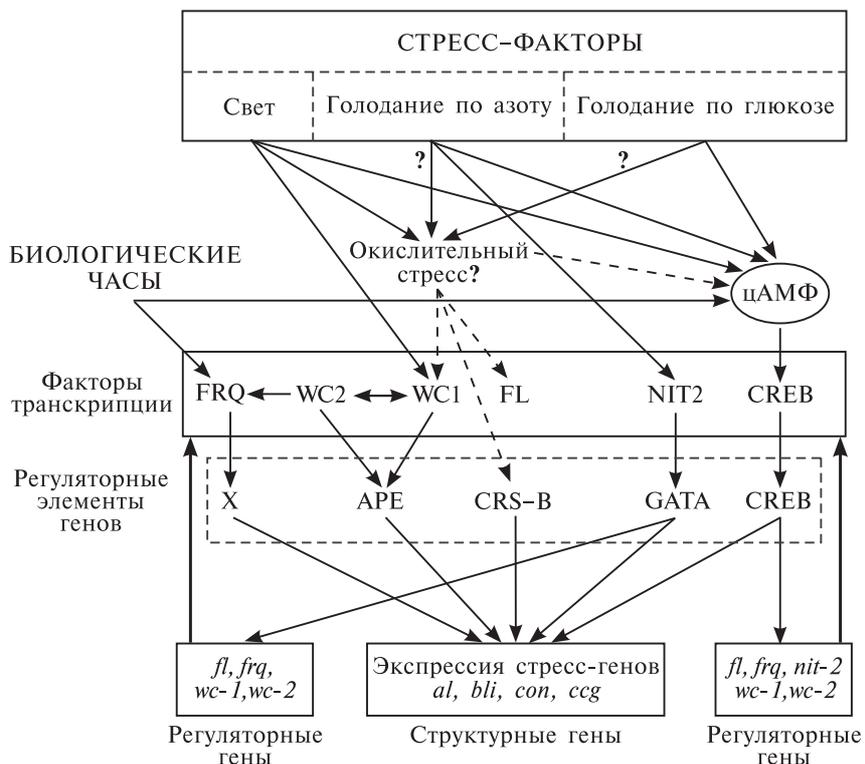


Рис. 9. Предполагаемая взаимосвязь различных путей регуляции экспрессии генов под действием стрессорных факторов.

конидий на мицелии) на различные стимулы связан с тем, что взаимодействие различных путей трансдукции строго координировано и точно выверено. К сожалению, до настоящего времени, исследования в этом направлении не проводились.

Необходимо отметить, что несмотря на наличие в настоящее время обширной информации о путях регуляции экспрессии генов при дифференцировке *N. crassa*, о структуре и функционировании основных регуляторов экспрессии и о структуре других генов, экспрессия которых связана с определенными стадиями развития гриба, остается еще масса вопросов, которые необходимо разрешить в дальнейшем. Во-первых, неизвестна функциональная роль продуктов многих генов, связанных с дифференцировкой. Не выявлена

роль вторичных мессенджеров таких, например, как цАМФ, в путях трансдукции разнообразных стрессорных сигналов у гриба, хотя получены многочисленные данные, указывающие на причастность этого нуклеотида к различным путям дифференцировки. Нельзя исключать и участия таких вторичных мессенджеров, как ионы  $Ca^{2+}$ , инозитолфосфаты и протеинкиназа С в трансдукции сигналов внешней среды у *N. crassa* [43, 214]. Наконец, одним из основных вопросов, остающихся неразрешенным до настоящего времени, является роль процессов посттрансляционной модификации регуляторных белков разнообразных путей трансдукции стрессорных сигналов, например, процессов их фосфорилирования/дефосфорилирования.

Авторы выражают признательность д.б.н. Р.В.Полозову за полезные замечания при прочтении рукописи, д.б.н. Р.С. Шакулову за комментарии по работе и д.б.н. М.С.Крицкому за плодотворные дискуссии в процессе написания обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98—04—48382).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянов А.А., Гужова Н.В., Мочалов В.В. // Микология и фитопатология. 1981. Т. 15. С. 361—365.
2. Афанасьева Т.П., Белозерская Т.А., Филиппович С.Ю., Чернышева Е.К., Крицкий М.С. // Прикл. биохим. микробиол. 1980. Т. 1. С. 156—161.
3. Белозерская Т.А. // Роль  $H^+$ —АТФ-азы грибной клетки в процессах фототрансдукции и дифференцировки. Дисс. ... докт. биол. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. 1995. 136 с.
4. Белозерская Т.А. // Биол. мембраны. 1997. Т. 14. С. 671—677.
5. Белозерская Т.А., Ершов Ю.В., Петрова Н.Э., Дмитровский А.А., Крицкий М.С. // Докл. РАН. 1998. Т. 359. С. 548—550.
6. Белозерская Т.А., Ершов Ю.В., Потапова Т.В., Соколовский В.Ю. // В сб. посвященном 100-летию кафедры микологии и альгологии. М: Изд-во «Муравей». 1998. С. 50—52.
7. Белозерская Т.А., Крицкий М.С., Левина Н.Н., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 1081—1089.
8. Белозерская Т.А., Соколовский В.Ю., Крицкий М.С. // Вопросы биол. и мед. химии. 1994. Т. 40. С. 2—5.
9. Белозерская Т.А., Соколовский В.Ю., Крицкий М.С. // Микробиология. 1995. Т. 64. С. 293—300.
10. Гужова Н.В., Варик О.Я., Рубин Л.Б., Фрайкин Г.Я. // Микология и фитопатология. 1977. Т. 11. С. 467—470.
11. Гужова Н.В., Мочалов В.В., Мерзляк М.Н., Аверьянов А.А., Чивкунова О.Б., Гусев М.В. // Вестник Московского Университета. 1998. Сер. 16. С. 36—40.

12. Капитонов А.Б., Пименов А.М. // Успехи совр. биол. 1996. Т. 116. С. 179—193.
13. Колот Ф.Б., Вакулова Л.А., Веселов И.Я., Самохвалов Г.И. // Успехи совр. биол. 1971. Т. 71. № 1. С. 18—42.
14. Косов Н.А., Чернышева Е.К., Людникова Т.А., Ерыгин Г.Д., Крицкий М.С. // Прикл. биох. микробиол. 1989. Т. 25. С. 565—570.
15. Красновский А.А., мл. // Итоги науки и техники. Современные проблемы лазерной физики. Т. 3. Фотодинамическое воздействие лазерного излучения. М.: ВИНТИ. 1990. С. 63—134.
16. Красновский А.А., мл. // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. С. 530—548.
17. Крицкий М.С. // Успехи микробиологии. 1982. Т. 17. С. 41—62.
18. Крицкий М.С., Афанасьева Т.П., Белозерская Т.А., Соболева И.С., Соколовский В.Ю., Филиппович С.Ю., Чернышева Е.К. // ЖОБ. 1984. Т. 35. С. 552—565.
19. Крицкий М.С., Соболева И.С., Чернышева Е.К. // Прикл. биохим. микробиол. 1980. Т. 16. С. 720—723.
20. Крицкий М.С., Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А., Чернышева Е.К. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 258. С. 759—762.
21. Крицкий М.С., Чернышева Е.К. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. С. 473—476.
22. Крицкий М.С., Чернышева Е.К., Соболева И.С. // Прикл. биохим. микробиол. 1977. Т. 13. С. 901—906.
- 22а. Левина Н.Н. // Изменение электрических свойств плазматической мембраны *Neurospora crassa* под действием света сине-фиолетовой области спектра. Дисс. ... канд. биол. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н.Баха АН СССР. 1987. 165 с.
23. Пасешниченко В.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 2. С. 171—182.
24. Скулачев В.П. // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 3. С. 4—7.
25. Соколовский В.Ю. // Циклические нуклеотиды в регуляции фотоиндуцированного каротиногенеза у *Neurospora crassa*. Дисс. ... канд. биол. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н.Баха АН СССР. 1987. 160 с.
26. Соколовский В.Ю., Крицкий М.С. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 1017—1020.
27. Соколовский В.Ю., Людникова Т.А., Крицкий М.С., Пасешниченко В.А., Руссо В.Э.А. // Прикл. биох. микробиол. 1994. Т. 30. С. 50—56.
28. Феофилова Е.П. // Пигменты микроорганизмов. / М.: Наука. 1974. 218 с.
29. Aguirre J., Hansberg W. // J. Bacteriol. 1986. Vol. 166. P. 1040—1045.
30. Aguirre J., Rodrigues R., Hansberg W. // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 6243—6250.
31. Akins R.A., Lambowitz A.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. P. 3791—3795.
32. Andrisani O.M., Hayes T.F., Roos B., Dixon E. // Nucleic Acids Res. 1987. Vol. 15. P. 5715—5728.
33. Armstrong G.A. // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. P. 4795—4802.
34. Aronson B.D., Johnson K.A., Dunlap J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. vol. 91. P. 7683—7687.
35. Aronson B.D., Johnson K.A., Loros J.J., Dunlap J.C. // Science. 1994. Vol. 263. P. 1578—1584.
36. Arpaia G., Carattoli A., Macino G. // Dev. Biol. 1995. Vol. 170. P. 626—635.
37. Arpaia G., Loros J.J., Dunlap J.C., Morelli G., Macino G. // Mol. Gen. Genet. 1995. Vol. 247. P. 157—163.
38. Arst H.N., Cove P.J. // Mol. Gen. Genet. 1973. Vol. 126. P. 111—141.

39. *Asgeirsdottir S.A., van Wetter M.A., Wessels J.G.H.* // Microbiol. 1995. Vol. 141. P. 1281—1288.
40. *Baca M., Borgstahl G.E., Boissinot M., Burke P.M., Williams D.R., Slater K.A., Getzoff E.D.* // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 14369—14377.
41. *Bailey L.A., Ebbole D.J.* // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 1813—1820.
42. *Baima S., Macino G., Morelli G.* // J. Photochem. Photobiol. 1991. Vol. 11. P. 107—115.
43. *Ballario P., Macino G.* // Trends in Microbiol. 1997. Vol. 5. P. 458—462.
44. *Ballario P., Talora C., Galli D., Linden H., Macino G.* // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 29. P. 719—729.
45. *Ballario P., Vittorioso P., Magrelli A., Talora C., Cabiblo A., Macino G.* // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 1650—1657.
46. *Bar E., Rise M., Vishkautsan M., Arad S.* // J. Plant Physiol. 1995. Vol. 146. P. 527—534.
47. *Beever R.E., Dempsey G.P.* // Nature. 1978. Vol. 272. P. 608—610.
48. *Bejarano E.R., Avalos J., Lipson E.D., Cerda—Olmedo E.* // Planta. 1990. Vol. 183. P. 1—93.
49. *Bell—Pedersen D.* // Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 1699—1711.
50. *Bell—Pedersen D., Dunlap J.C., Loros J.J.* // Genes Dev. 1992. Vol. 6. P. 2382—2394.
51. *Bell—Pedersen D., Dunlap J.C., Loros J.J.* // Mol. Cell. Biol. 1996. Vol. 16. P. 513—521.
52. *Bell—Pedersen D., Shinohara M.L., Dunlap J.C., Loros J.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 13096—13101.
53. *Bennett J.W.* // Secondary metabolism and differentiation in fungi. / Eds. J.W. Bennett, A. Ciegler. N. Y.—Basel: Marsel Decker Inc. 1983. P. 1—32.
54. *Berlin V., Yanofsky C.* // Mol. Cell. Biol. 1985. Vol. 5. P. 849—855.
55. *Bertolucci C., Ming L.J., Gonzalez G., Gilles—Gonzalez M.A.* // Chem. Biol. 1996. Vol. 3. P. 561—566.
56. *Brain R.D., Woodward D.O., Briggs W.R.* // Carnegie Inst. Wash. Publ. 1977. Vol. 76. P. 295—299.
57. *Britton G.* // Faseb J. 1995. Vol. 9. P. 1551—1558.
58. *Brooks K., Addison R., Scarborough G.* // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 13909—13918.
59. *Bruchez J.J.P., Eberle J., Kohler W., Krufft V., Radford A., Russo V.E.A.* // Mol. Gen. Genet. 1996. Vol. 252. P. 223—229.
60. *Bruno K.S., Aramayo R., Minke P.F., Metzzenberg R.L., Plamann M.* // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 5772—5782.
61. *Caratolli A., Cognoni C., Morelli G., Macino G.* // Mol. Microbiol. 1994. Vol. 13. P. 787—795.
62. *Caratolli A., Kato E., Rodrigues—Franco M., Stuart W.D., Macino G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 6612—6616.
63. *Carnedas M.E., Hansberg W.* // J. Gen. Microbiol. 1984. Vol. 130. P. 1733—1741.
64. *Cerda—Olmedo E.* // Phycomyces. / Eds. E. Cerda—Olmedo, E.D. Lipson. Cold Spring Harbour Lab. 1987. P. 199—222.
65. *Chang L.W., Marzluf G.A.* // Mol. Gen. Genet. 1979. Vol. 176. P. 385—392.
66. *Chary P., Dillon D., Schroeder A.L., Natvig D.O.* // Genetics. 1994. Vol. 137. P. 723—730.
67. *Chary P., Natvig D.O.* // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 2646—2652.
68. *Chiang T.Y., Marzluf G.A.* // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 576—582.
69. *Corrochano L.M., Lauter F.—R., Ebbole D.J., Yanofsky C.* // Dev. Biol. 1995. Vol. 167. P. 190—200.
70. *Cortat M., Turian G.* // Arch. Microbiol. 1974. Vol. 95. P. 305—309.

71. *Crosthwhite S.K., Dunlap J.C., Loros J.J.* // Science. 1997. Vol. 276. P. 763—769.
72. *Crosthwhite S.K., Loros J.J., Dunlap J.C.* // Cell. 1995. Vol. 81. P. 1003—1012.
73. *Cruszecki W.I., Sielewiesiuk J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1023. P. 405—412.
74. *Degli—Innocenti F., Chambers J.A.A., Russo V.E.A.* // J. Bacteriol. 1984. Vol. 159. P. 808—810.
75. *Degli—Innocenti F., Pohl U., Russo V.E.A.* // Phorochem. Photobiol. 1983. Vol. 37. P. 49—51.
76. *Degli—Innocenti F., Russo V.E.A.* // J. Bacteriol. 1984. Vol. 159. P. 757—761.
77. *Degli—Innocenti F., Russo V.E.A.* // J. Bacteriol. 1984. Vol. 159. P. 808—810.
78. *Dempsey G.P., Beever R.F.* // J. Bacteriol. 1979. Vol. 140. P. 1050—1062.
79. *Dodge B.O.* // Bull. Torey Bot. Club. 1932. Vol. 59. C. 347—360.
80. *Dunlap J.C.* // Ann. Rev. Physiol. 1993. Vol. 55. P. 683—728.
81. *Dunlap J.C.* // Ann. Rev. Genet. 1996. Vol. 30. P. 579—601.
82. *Ebbole D.J.* // J. Genet. 1996. Vol. 75. P. 361—374.
83. *Ebbole D.J.* // Trends in Microbiol. 1997. Vol. 5. P. 405—408.
84. *Eberle J., Russo V.E.A.* // DNA Seq. 1992. Vol. 3. P. 131—141.
85. *Eberle J., Russo V.E.A.* // Biochem. Mol. Biol. Int. 1994. Vol. 4. P. 737—744.
86. *Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1997. Vol. 41. P. 191—200.
87. *Edgerton M.D., Jones A.M.* // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 8239—8245.
88. *Edmunds L.N.* Cellular and molecular basis of biological clock. N.—Y.: Springer. 1988. 146 p.
89. *Faull A.F.* // Mycologia. 1930. Vol. 22. P. 288—303.
90. *Feldman J.F.* // Annu. Rev. Plant Physiol. 1982. Vol. 33. P. 583—608.
91. *Felenbok B., Kelly J.M.* // The mycota III. Biochemistry Mol. Biology / Eds. R. Brambl, G.A. Marzluf. Berlin—Heidelberg: Springer—Verlag. 1996. P. 369—380.
92. *Feng B., Marzluf G.A.* // Mol. Cell. Biol. 1998. Vol. 18. P. 3983—3990.
93. *Finkel T.* // Curr. Opin. Cell Biol. 1998. Vol. 10. P. 248—253.
94. *Fracella F., Scholle C., Kallies A. Haefker T., Schroder T., Rensing L.* // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 3615—3624.
95. *Fritz B.H., Kasai S., Matsui K.* // Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 51. P. 607—610.
96. *Fu W., Jack R.F., Morgan T.V., Dean D.R., Johnson M.K.* // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 13455—13463.
97. *Fu Y.M., Kueesi J., Marzluf G.A.* // J. Bacteriol. 1989. Vol. 171. P. 4067—4070.
98. *Fu Y.M., Marzluf G.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 8243—8247.
99. *Fu Y.M., Marzluf G.A.* // Mol. Cell. Biol. 1990. Vol. 10. P. 1056—1065.
100. *Galland P., Senger H.* // J. Photochem. Photobiol. 1988. Vol. 1. P. 277—294.
101. *Gercean N.Y., Liu Y., Loros J.J., Dunlap J.C.* // Cell. 1997. Vol. 89. P. 469—474.
102. *Grigg C.W.* // J. Gen. Microbiol. 1960. Vol. 22. P. 662—666.
103. *Gropp F., Betlach M.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 85. P. 4369—4373.
104. *Guignard R., Grange F., Turian G.* // Can. J. Microbiol. 1984. Vol. 30. P. 1210—1215.
105. *Haefker T., Teckel D., Steier G., Rensing L.* // Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 37—43.
106. *Hager K.M., Yanofsky C.* // Gene. 1990. Vol. 96. P. 153—159.

107. *Handelman G.J., van Kuijk F.J.G.M., Chatterjee A., Krinsky N.I.* // Free Rad. Biol. Chem. 1991. Vol. 10. P. 427—435.
108. *Hansberg W., Aguirre J.* // J. Theor. Biol. 1990. Vol. 142. P. 201—221.
109. *Hansberg W., de Groot H., Sies H.* // Free Rad. Biol. Med. 1993. Vol. 14. P. 287—293.
110. *Harding R.W., Huang P.C., Mitchell H.K.* // Arch. Biochem. Biophys. 1969. Vol. 129. P. 696—707.
111. *Harding R.W., Melles S.* // Plant Physiol. 1984. Vol. 72. P. 996—1000.
112. *Harding R.W., Shropshire W., Jr.* // Ann. Rev. Plant Physiol. 1980. Vol. 31. P. 217—238.
113. *Harding R.W., Turner R.V.* // Plant Physiol. 1981. Vol. 68. P. 745—749.
114. *Harris J.L., Howe H.B., Jr., Roth T.L.* // J. Bacteriol. 1975. Vol. 128. P. 1239—1246.
115. *Hasunuma K., Funadera K., Shinohara Y., Furukawa K., Watanabe M.* // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 127—133.
116. *Hesse S.M., Stanford D.R., Hopper A.K.* // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 7. P. 1265—1271.
117. *Hill S., Austin S., Eydmann T., Jones T., Dixon R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 2143—2148.
118. *Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han E.S., Larsen E., Briggs W.R.* // Science. 1997. Vol. 278. P. 2120—2130.
119. *Huang Z.J., Ederly I., Rosbash M.* // Nature. 1993. Vol. 364. P. 7987—7992.
120. *Jacobson E.S., Metzberg R.I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1968. Vol. 156. P. 140—147.
121. *Johnson E.A., Schroeder W.A.* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1996. Vol. 53. P. 120—179.
122. *Jones J.P.* // Oxidative stress / Ed. H.Sies. N. Y.—London: Acad. Press. 1985. P. 151—195.
123. *Jonny J.L., Jarai G., Fu Y.H., Marzluf G.A.* // Mol. Gen. Genet. 1990. Vol. 222. P. 120—128.
124. *Jorge J.A., Terenzi H.F.* // Dev. Biol. 1980. Vol. 74. P. 231—238.
125. *Kaldenhoff R., Russo V.E.A.* // Curr. Genet. 1993. Vol. 24. P. 394—399.
126. *Kallies A., Gebauer G., Rensing L.* // Photochem. Photobiol. 1996. Vol. 63. P. 336—343.
127. *Kawasaki L., Wysong D., Diamond R., Aguirre J.* // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179. P. 3284—3292.
128. *Klemm E., Ninnemann H.* // Photochem. Photobiol. 1979. Vol. 29. P. 629—632.
129. *Kothe G.O., Free S.J.* // Fungal Genet. Biol. 1998. Vol. 23. P. 248—258.
130. *Kothe G.O., Free S.J.* // Genetics. 1998. Vol. 49. P. 117—130.
131. *Krinsky N.I.* // Pure & Appl. Chem. 1979. Vol. 51. P. 649—660.
132. *Krinsky N.I.* // Free radicals, oxidative stress, and antioxidants / Ed. T.Ozben. N. Y.: Plenum Press. 1998. P. 323—332.
133. *Kritsky M.S., Belozerskaya T.A., Sokolovsky V.Yu.* // Sov. Sci. Rev. D. Physico—Chem. Biol. 1994. Vol. 12. P. 99—134.
134. *Kritsky M.S., Sokolovsky V.Yu., Belozerskaya T.A., Chernyshova E.K.* // Arch. Microbiol. 1982. Vol. 133. P. 206—208.
135. *Lambowitz A.M., Bonner W.D.* // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 2886—2890.
136. *Larkin—Thomas P.L., Cote G.G., Brody S.* // Crit. Rev. Microbiol. 1990. Vol. 17. P. 365—416.
137. *Lauter F.—R.* // J. Genet. 1996. Vol. 75. P. 375—386.
138. *Lauter F.—R., Marchfelder U., Russo V.E.A., Yamashiro C.T., Yatzkan E., Yarden O.* // Fungal Genet. Biol. 1998. Vol. 23. P. 300—310.

139. *Lauter F.-R., Russo V.E.A.* // J. Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 5. P. 95–103.
140. *Lauter F.-R., Russo V.E.A.* // Nucleic Acids Res. 1991. Vol. 19. P. 6883–6886.
141. *Lauter F.-R., Russo V.E.A., Yanofsky C.* // Genes Dev. 1992. Vol. 6. P. 2373–2381.
142. *Lauter F.-R., Yamashiro C.T., Yanofsky C.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1997. Vol. 37. P. 203–211.
143. *Lauter F.-R., Yanofsky C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 8249–8253.
144. *Lee K., Ebbole D.J.* // Fungal Genet. Biol. 1998. Vol. 23. P. 269–278.
145. *Levina N.N., Belozerskaya T.A., Kritsky M.S., Potapova T.V.* // Exp. Mycol. 1988. Vol. 12. P. 77–79.
146. *Lewis M.T., Feldman J.F.* // Protein Seq. Data Anal. 1993. Vol. 5. P. 315–323.
147. *Li C., Sachs M.S., Schmidhauser T.J.* // Fungal Genet. Biol. 1997. Vol. 21. P. 101–108.
148. *Li C., Schmidhauser T.J.* // Dev. Biol. 1995. Vol. 169. P. 90–95.
149. *Linden H., Macino G.* // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 98–109.
150. *Linden H., Rodrigues-Franco M., Macino G.* // Mol. Gen. Genet. 1997. Vol. 254. P. 111–118.
151. *Liu Y., Garceau N.Y., Loros J.J., Dunlap J.C.* // Cell. 1997. Vol. 89. P. 477–486.
152. *Lledias F., Rangel P., Hansberg W.* // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 10630–10637.
153. *Lledias F., Rangel P., Hansberg W.* // Free Rad. Biol. Med. 1999. Vol. 26. P. 1396–1404.
154. *Loros J.J., Denome S.A., Dunlap J.C.* // Science. 1989. Vol. 243. P. 385–388.
155. *Lowry R.J., Durkee T.L., Sussman A.S.* // J. Bacteriol. 1967. Vol. 94. P. 1757–1763.
156. *Luo C., Loros J.J., Dunlap J.C.* // EMBO J. 1998. Vol. 17. P. 1228–1235.
157. *Macino G., Arpaia G., Linden H., Ballario P.* // Symp. Soc. Gen. Microbiol. 1998. Vol. 56. P. 213.
158. *Macino G., Ballario P., Talora C., Franchi L., Linden H.* // Abstr. 21st Fungal Genet. Confer. Asilomar. California. 1999. P. 45.
159. *Madi L., Ebbole D.J., White B.T., Yanofsky C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 6226–6230.
160. *Madi L., McBride S.A., Bailey L.A., Ebbole D.J.* // Genetics. 1997. Vol. 146. P. 499–508.
161. *Marzluf G.A.* // The micota III. Biochemistry and molecular biology. / Eds. R. Brambl, G.A. Marzluf. Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag. 1996. P. 357–368.
162. *Marzluf G.A.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. Vol. 61. P. 17–32.
163. *Maheshwari R.* // J. Gen. Microbiol. 1991. Vol. 137. P. 2103–2115.
164. *Marshall M.A., Timberlake W.E.* // Mol. Cell. Biol. 1991. Vol. 11. P. 55–62.
165. *Matsuyama S.S., Nelson R.E., Siegel R.W.* // Dev. Biol. 1974. Vol. 41. P. 278–287.
166. *McClung C.R., Fox B.A., Dunlap J.C.* // Nature. 1989. Vol. 339. P. 558–562.
167. *McNally M.T., Free S.J.* // Curr. Genet. 1988. Vol. 14. P. 545–551.
168. *Merrow M., Garceau N.Y., Dunlap J.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 3877–3882.
169. *Millar A.J.* // Curr. Biol. 1997. Vol. 7. P. R474–R476.
170. *Mitzka-Schnabel U., Rau W.* // Phytochemistry. 1980. Vol. 19. P. 1409–1413.
171. *Mitzka-Schnabel U., Rau W.* // Phytochemistry. 1981. Vol. 20. P. 63–69.

172. *Morris S.A.C., Subden R.E.* // *Mutat. Res.* 1974. Vol. 22. P. 105—109.
173. *Mortensen A., Skibsted L.H.* // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 417. P. 261—267.
174. *Mukai Y., Harashima S., Oshima Y.* // *Mol. Cell. Biol.* 1991. Vol. 11. P. 3773—3779.
175. *Muller B.T., Russo V.E.A.* // *Fungal Genet. Newsl.* 1989. Vol. 36. P. 58—60.
176. *Munkers K.D.* // *Superoxide dismutases* / Ed. L.W.Oberle. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1985. Vol. 3. P. 237—248.
177. *Munkers K.D.* // *Free Rad. Biol. Med.* 1990. Vol. 8. P. 355—361.
178. *Munkers K.D.* // *Free Rad. Biol. Med.* 1990. Vol. 9. P. 23—28.
179. *Munkers K.D.* // *Free Rad. Biol. Med.* 1990. Vol. 9. P. 29—38.
180. *Munkers K.D.* // *Free Rad. Biol. Med.* 1992. Vol. 13. P. 30—33.
181. *Munkers K.D., Rana R.S.* // *Age.* 1984. Vol. 7. P. 30—35.
182. *Murayama T., Uno I., Hamamoto K., Ishikawa T.* // *Arch. Microbiol.* 1985. Vol. 142. P. 109—112.
183. *Natvig D.O., Silvester K., Dvorachek W.H., Baldwin J.L.* // *The mycota III. Biochemistry and molecular biology.* / Eds. R.Brambl, G.A.Marzluf. Berlin—Heidelberg: Springer—Verlag. 1996. P. 191—209.
184. *Navarro R.E., Aguirre J.* // *J. Bacteriol.* 1998. Vol. 180. P. 5733—5738.
185. *Nawrath C., Russo V.E.A.* // *J. Photochem. Photobiol.* 1990. Vol. 4. P. 261—271.
186. *Nelson R.E., Metzberg R.L.* // *Genetics.* 1992. Vol. 132. P. 149—162.
187. *Nelson M.A., Morelli G., Carattoli A., Romano N., Macino G.* // *Mol. Cell. Biol.* 1989. Vol. 9. P. 1271—1276.
188. *Nelson R.E., Selitrennikoff C.P., Siegel R.W.* // *Results and problems of cell differentiation* / Eds. J.Reiner, H.Holzer. Berlin: Springer—Verlag. 1975. P. 291—300.
189. *Ninnemann H.* // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1991. Vol. 9. P. 189—199.
190. *Ninnemann H.* // *Photochem. Photobiol.* 1995. Vol. 61. P. 22—31.
191. *Oda K., Hasunuma K.* // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 345. P. 162—166.
192. *Olson J.A., Krinsky N.I.* // *Faseb J.* 1995. Vol. 9. P. 1547—1550.
193. *Pahl H.L., Bawerle P.A.* // *BioEssay.* 1994. Vol. 16. P. 497—502.
194. *Paietta J., Sargent M.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. Vol. 78. P. 5573—5577.
195. *Paietta J., Sargent M.L.* // *Genetics* 1983. Vol. 104. P. 11—21.
196. *Paietta J., Sargent M.L.* // *Plant Physiol.* 1983. Vol. 72. P. 764—766.
197. *Pall M.L.* // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252. P. 7146—7150.
198. *Pall M.L.* // *Microbiol. Rev.* 1981. Vol. 45. P. 461—480.
199. *Perkins D.D.* // *Neurospora Newsl.* 1972. Vol. 19. P. 33.
200. *Perkins D.D.* // *Fungal Genet. Newsl.* 1988. Vol. 35. P. 38—39.
201. *Perkins D.D., Glassey M., Bloom B.A.* // *Can. J. Genet. Cytol.* 1962. Vol. 4. P. 187—205.
202. *Perkins D.D., Radford A., Newmeyer D., Bjorkmann M.* // *Microbiol. Rev.* 1982. Vol. 46. P. 426—570.
203. *Pittendrigh C.S.* // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1960. Vol. 25. P. 159—184.
204. *Plesofsky—Vig N., Light D., Brambl R.* // *Exp. Mycol.* 1983. Vol. 7. P. 283—286.
205. *Polizeli M.L., Jorge J.A., Terenzi H.F.* // *J. Gen. Microbiol.* 1991. Vol. 137. P. 1815—1823.
206. *Polizeli M.L., Pietro R.C., Jorge J.A., Terenzi H.F.* // *J. Gen. Microbiol.* 1990. Vol. 136. P. 1463—1468.
207. *Potapova T.V., Levina N.N., Belozerskaya T.A., Kritsky M.S., Chailakhian L.M.* // *Arch. Microbiol.* 1984. Vol. 137. P. 262—265.

208. Premakumar R., Sorger G.J., Gooden D. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 137. P. 1119—1126.
209. Presti D.E. // The biology of photoreception / Eds. D.J.Cosens, D.Vincent-Price. 1983. Soc. Exp. Biol. Great Britain. V. 83. P. 133—180.
210. Raju N.B. // Mycol. Res. 1992. Vol. 96. P. 241—262.
211. Rao T.K., DeBask A.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. Vol. 436. P. 619—626.
212. Ravagnani A., Gorfinkiel L., Langdon T., Diallinas G., Adjadj E., Demais S., Gorton D., Arst H.N., Jr., Scazzocchio C. // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 3974—3986.
213. Rau W. // Photoregulation of carotenoid biosynthesis / Eds. J.W.Porter, S.L.Spurgeon. John Willey & Son. 1983. P. 123—157.
214. Rensing L., Monnerjahn C., Meyer U. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol. 168. P. 159—166.
215. Ricci M., Krappmann D., Russo V.E.A. // Fungal Genet. Newsl. 1991. Vol. 38. P. 87—88.
216. Roberts A.N., Berlin V., Hager K.M., Yanofsky C. // Mol. Cell. Biol. 1988. Vol. 8. P. 2411—2418.
217. Roberts A.N., Yanofsky C. // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 197—214.
218. Rosenberg G., Pall M.L. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 137. P. 1140—1144.
219. Rosner J.L., Storz G. // Curr. Top. Cell. Regul. 1997. Vol. 35. P. 163—177.
220. Royer J.C., Yamashiro L.R. // Fungal Genet. Newsl. 1992. Vol. 39. P. 76—79.
221. Russo V.E.A. // Planta. 1986. Vol. 168. P. 56—60.
222. Russo V.E.A. // J. Photochem. Photobiol. 1988. Vol. 2. P. 59—65.
223. Russo V.E.A., Degli-Innocenti F. // Neurospora Newsl. 1983. Vol. 30. P. 11—12.
224. Russo V.E.A., Pandit N.N. // Development: the molecular genetic approach / Eds. V.E.A. Russo, W.E. Timberlake. Berlin: Springer-Verlag. 1992. P. 88—102.
225. Ryter S.W., Tyrrell R.M. // Free Rad. Biol. Med. 1998. Vol. 24. P. 1520—1534.
226. Sachs M.S., Yanofsky C. // Dev. Biol. 1991. Vol. 148. P. 117—128.
227. Sandman G. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 222. P. 7—24.
228. Santoro N., Thiele D.J. // Yeast stress responses / Eds. S.Hohmann, H.Mager. 1997. F.R.G.: Landers Company. P. 172—210.
229. Sargent M.L., Briggs W.R. // Plant Physiol. 1967. Vol. 42. P. 1504—1510.
230. Sargent M.L., Briggs W.R., Woodward D. // Plant Physiol. 1966. Vol. 41. P. 1343—1349.
231. Sargent M.L., Kaltenborn S.H. // Plant Physiol. 1972. Vol. 50. P. 171—175.
232. Schmidhauser T.J., Lauter F.—R., Russo V.E.A., Yanofsky C. // Mol. Cell. Biol. 1990. Vol. 10. P. 5064—5070.
233. Schmidhauser T.J., Lauter F.—R., Schuhmacher M., Zhou W., Russo V.E.A., Yanofsky C. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 12060—12066.
234. Schmit J.C., Brody S. // Bacteriol. Rev. 1976. Vol. 40. P. 1—41.
- 234a. Schroeder W.A., Johnson E.A. // J. Gen. Microbiol. 1993. Vol. 139. P. 907—909.
- 234b. Schroeder W.A., Johnson E.A. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 18374—18379.
235. Scott W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73. P. 2995—2999.
236. Scott W.A., Solomon B. // J. Bacteriol. 1975. Vol. 122. P. 454—463.
237. Selitrennikoff C.P. // Neurospora Newsl. 1976. Vol. 23. P. 23.

238. *Selitrennikoff C.P., Nelson R.E., Siegel R.W.* // Genetics. 1974. Vol. 78. P. 679—690.
239. *Sen C.K., Packer L.* // Faseb J. 1996. Vol. 10. P. 709—720.
240. *Shaw N.M., Harding R.W.* // Plant Physiol. 1987. Vol. 83. P. 377—383.
241. *Siegel R.W., Matsuyama S.S., Urey J.C.* // Experientia. 1968. Vol. 24. P. 1179—1181.
242. *Sigmund R.D., McNally M.T., Lee D.B., Free S.J.* // Biochem. Genet. 1985. Vol. 23. P. 89—103.
243. *Sokolovsky V., Kaldenhoff R., Ricci M., Russo V.E.A.* // Fungal Genet. Newsl. 1990. Vol. 37. P. 41—43.
244. *Sokolovsky V. Yu., Lauter F.—R., Muller—Rober B., Ricci M., Schmidhauser T., Russo V.E.A.* // J. Gen. Microbiol. 1992. Vol. 138. P. 2045—2049.
245. *Sommer T., Chambers J.A.A., Eberle J., Lauter F.—R., Russo V.E.A.* // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17. P. 5713—5723.
246. *Springer M.L.* // BioEssays. 1993. Vol. 15. P. 365—374.
247. *Springer M.L., Hager K.M., Garrett—Engele C., Yanofsky C.* // Dev. Biol. 1992. Vol. 152. P. 255—262.
248. *Springer M.L., Yanofsky C.* // Genes Dev. 1989. Vol. 3. P. 559—571.
249. *Springer M.L., Yanofsky C.* // Genes Dev. 1992. Vol. 6. P. 1052—1057.
250. *Stringer M.A., Dean R.A., Sewall T.C., Timberlake W.E.* // Genes Dev. 1991. Vol. 5. P. 1161—1171.
251. *Subczynski W.K., Markowska E., Siewewiesiuk J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1991. Vol. 1068. P. 68—72.
252. *Talbot N.J.* // Curr. Biol. 1997. Vol. 7. P. R78—R81.
253. *Taylor B.L., Zhulin I.B.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. Vol. 63. P. 479—506.
254. *Terenzi H.F., Flawia M.M., Tellez—Inon M.T., Torres H.N.* // J. Bacteriol. 1976. Vol. 126. P. 91—99.
255. *Terenzi H.F., Flawia M.M., Torres H.N.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. Vol. 58. P. 990—996.
256. *Thomas S.A., Sargent M.L., Tuveson R.W.* // Photochem. Photobiol. 1981. Vol. 33. P. 349—354.
257. *Toledo I., Aguirre J., Hansberg W.* // Exp. Mycol. 1986. Vol. 10. P. 114—125.
258. *Toledo I., Noronha—Dutra A., Hansberg W.* // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 3243—3249.
259. *Toledo I., Randel P., Hansberg W.* // Arch. Biochem. Biophys. 1995. Vol. 319. P. 519—524.
260. *Vedele T., Caboche M.* // Mol. Gen. Genet. 1993. Vol. 240. P. 365—373.
261. *Vollmer S.J., Yanofsky C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 4869—4873.
262. *Wang Z., Deak M., Free S.J.* // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 237. P. 65—74.
263. *Wessels J.G.H.* // Annu. Rev. Phytopathol. 1994. Vol. 32. P. 413—437.
264. *Wessels J.G.H.* // Adv. Microbiol. Physiol. 1996. Vol. 38. P. 1—45.
265. *Wessels J.G.H.* // Trends Plant Sci. 1996. Vol. 1. P. 1—45.
266. *Wessels J.G.H., de Vries O.M.H., Asgeirsdottir S.A., Schuren F.H.J.* // Plant Cell. 1991. Vol. 3. P. 793—799.
267. *Westergaard M., Mitchell H.K.* // Am. J. Bot. 1947. Vol. 34. P. 573—777.
268. *White B.T., Yanofsky C.* // Dev. Biol. 1993. Vol. 160. P. 254—264.
269. *Wolff S.P., Gamer A., Dean R.T.* // Trends in Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 27—31.
270. *Wolfenbarger L.I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1976. Vol. 436. P. 774—788.
271. *Wright B.* // Arch. Microbiol. 1967. Vol. 59. P. 335—344.
272. *Yamashiro C.T., Ebbola D.J., Lee B.—U., Brown R.E., Bourland C., Madi L., Yanofsky C.* // Mol. Cell. Biol. 1996. Vol. 16. P. 6218—6228.

273. *Yarden O., Plamann M., Ebbole D.J., Yanofsky C.* // *EMBO J.* 1992. Vol. 11. P. 2159—2166.
274. *Young J.L., Jarai G., Fu Y.M. Marzluf G.A.* // *Mol. Gen. Genet.* 1990. Vol. 222. P. 120—128.
275. *Zhang L., Villadon D., Sun G., Kazmierczak P., Van Alfen N.K.* // *Gene.* 1994. Vol. 100. P. 59—64.