

УДК 582.282.22

КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ У МИКРОМИЦЕТОВ И ДЕТЕКЦИЯ ИХ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭКВОРИНА

О.В. Козлова, С.Ю. Егоров, Ф.Г. Куприянова-Ашина

Аннотация

В обзоре впервые проведен анализ данных литературы и результатов собственных исследований авторов о Ca^{2+} -сигнальных системах растений, животных и низших эукариот, о механизмах кальциевых потоков в клетках и роли кальцийсвязывающих белков в этих процессах. Детально рассмотрены вопросы передачи внешних сигналов на Ca^{2+} -ответ и методы измерения кальциевых всплесков в цитозоле. В статье описаны данные литературы по использованию рекомбинантного экворина для определения внутриклеточного кальция у животных, растений и микромицетов, а также приведены собственные результаты измерения пула Ca^{2+} в клетках микромицетов с использованием мутантного штамма *Aspergillus awamori* с рекомбинантным Ca^{2+} -зависимым фоточувствительным белком экворин. Авторами установлена динамика Ca^{2+} -ответа микромицета на стрессовые воздействия. С использованием различных блокаторов Ca^{2+} -каналов, а также агонистов, специфически повышающих их активность, было установлено, что повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле микромицета *Aspergillus awamori* обеспечивается за счет его поступления как из среды, так и из внутриклеточных резервуаров. Основную роль в поступлении Ca^{2+} в клетки микромицетов играют потенциалзависимые транспортные системы.

Ключевые слова: Ca^{2+} -сигнальные системы, мицелиальные грибы, микромицеты *Aspergillus awamori*, рекомбинантный экворин, динамика Ca^{2+} .

Введение

В концепции о вторичных посредниках регуляции клеточного метаболизма особое место отводится универсальной роли кальция. В клетках эукариот формирование пула Ca^{2+} , вовлеченного в регуляторные процессы, осуществляется разными путями. В мембранах клетки функционируют структуры, обеспечивающие вход Ca^{2+} в цитоплазму по градиенту его концентрации (Ca^{2+} -каналы), а также системы активного транспорта Ca^{2+} против градиента концентрации, использующие для этого либо энергию АТФ (Ca^{2+} -насос), либо градиенты других ионов (например, Na^+ /Са-переносчик).

В литературе широко представлена информация о Ca^{2+} -каналах в клетках животных и растений [1–3]. Данные о роли кальция в клеточной регуляции у микромицетов не многочисленны, что обусловлено в том числе различиями в архитектонике клеток низших и высших эукариот. Между тем в этой проблеме остается много неясного, что делает ее одной из наиболее актуальных в современной физиологии мицелиальных грибов. Фактором, сдерживающим детальные исследования функций кальция у микромицетов, было отсутствие практических

и надежных методов мониторинга внутриклеточных свободных ионов Ca^{2+} в живых клетках. Выявление микроконцентраций Ca^{2+} с помощью флуоресцентных красителей оказалось технически трудно выполнимым, а результаты – не слишком надежными. Только благодаря использованию клеток мицелиального гриба *Aspergillus awamori*, трансформированных с помощью гена эквориона, стало возможным детектировать изменения содержания Ca^{2+} в ответ на разнообразные внешние стимулы, что позволяет установить регуляторную роль изменений пула Ca^{2+} у микромицетов в процессах преобразования внеклеточных стимулов в клеточный ответ.

1. Кальциевые сигнальные системы у эукариот

Кальций является убиквитарной внутриклеточной сигнальной молекулой, контролирующей целый ряд процессов, происходящих внутри клетки [4–6]. В течение своей жизнедеятельности клетка должна отвечать на самые разнообразные, часто прямо противоположные внешние стимулы, многие из которых используют Ca^{2+} в качестве вторичного мессенджера. В этой связи возникает вопрос: как такая простая сигнальная молекула может регулировать разнообразные клеточные процессы? Вероятно, что ряд факторов, таких, как история эволюции клетки, присутствие других сигнальных молекул и место расположения в клетке элементов, обрабатывающих кальциевый сигнал, вносят свой вклад в процессы контроля кальциевых сигнальных систем эукариот [7, 8].

Существует несколько гипотез, позволяющих ответить на вопрос, почему в процессе эволюции именно кальций стал универсальной молекулой внутриклеточной сигнализации. Согласно одной из гипотез клетки сначала выработали механизмы поддержания очень низкого уровня свободного внутриклеточного Ca^{2+} , намного ниже миллимолярной концентрации в морской воде [9]. Это могло быть связано с тем, что Ca^{2+} способен связываться с фосфатными группами АТФ, АДФ и АМФ, которые жизненно важны для энергетического метаболизма клеток [10], то есть поддержание очень низкого уровня концентрации Ca^{2+} было необходимым условием фосфатного метаболизма [11]. Таким образом, уже на ранней стадии эволюции клетка имела систему транспортировки Ca^{2+} из цитозоля для поддержания постоянной концентрации Ca^{2+} на микромолярном уровне.

Другой причиной, побудившей рассматривать Ca^{2+} в качестве вторичного посредника, является его способность координировать взаимодействие большого числа атомов кислорода (6–8), что позволяет осуществлять структурные изменения белков, приводящие к поступательным изменениям в сигнальных последовательностях [9]. Соответственно, даже незначительные изменения пула Ca^{2+} могут активировать самые разнообразные сигнальные процессы.

Предпосылкой к возникновению третьей гипотезы, рассматривающей Ca^{2+} в качестве сигнальной молекулы, явился факт низкой скорости проникновения Ca^{2+} в цитозоль, а также неомогенное распределение внутриклеточных запасов Ca^{2+} , формирующее органеллы с различным его содержанием. Эти факторы обеспечивают пространственное изменение концентрации Ca^{2+} в различных частях цитозоля, что позволяет разным кальциевым сигналам быть пространственно разделенными внутри одной клетки [12, 13].

Специфика кальциевых сигнальных систем в клетках растений и животных прежде всего зависела от того, насколько клетка могла ответить на определенный стимул. В тех случаях, когда клетка была способна это сделать, следующим шагом дифференцирования Ca^{2+} -активирующих стимулов являлось сравнение амплитуды, пространственных и временных характеристик кальциевого сигнала, отраженных в так называемых Ca^{2+} -профилях. Кинетика стимулиндуцированных изменений концентрации Ca^{2+} может существенно различаться как в растительных, так и в животных клетках [8, 14].

Стимулиндуцированные увеличения концентрации Ca^{2+} могут возникать в виде спайков (единичных непродолжительных ответов на определенные стимулы), вибраций (повторяющихся клеточных ответов Ca^{2+}) и волн, то есть пространственного коррелята одного спайка Ca^{2+} , при котором концентрация Ca^{2+} сначала повышается в каком-то одном месте, а затем распространяется по всей клетке как регенеративное увеличение концентрации [6, 9]. Было также установлено, что механизмы возникновения и сохранения этих видов увеличения концентрации Ca^{2+} обладают потенциалом кодирования сигнальной информации. Показано, что сигнальная информация может кодироваться в различных характеристиках «профиля» кальциевой вспышки: амплитуде, ее частоте и продолжительности [8, 14]. Различают четыре разных параметра Ca^{2+} -вспышки: время подъема, пиковая концентрация, время спада и уровень концентрации в состоянии покоя после вспышки. В период повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле поступление его превышает выход из цитозоля. В момент пика кальциевой вспышки количество Ca^{2+} , поступающего в цитозоль, равно количеству Ca^{2+} , вытекающего из него. В период спада пика, несмотря на то что увеличение концентрации Ca^{2+} все еще продолжается, его выход из цитозоля преобладает над поступлением в цитозоль. Концентрация Ca^{2+} после вспышки может оставаться на более высоком уровне, чем до нее, и может сохраняться на этом уровне в течение значительного промежутка времени.

В клетке, пребывающей в состоянии покоя, уровень Ca^{2+} находится в пределах 50–200 нМ [12]. Концентрация Ca^{2+} во внеклеточной среде в 104 раза выше, чем 200 нМ [15]. Трансдукция кальциевого сигнала обычно сопровождается временным увеличением концентрации Ca^{2+} , которое часто происходит в определенной части клетки [13, 16]. Общая схема трансдукции кальциевого сигнала в клетках эукариот приведена на рис. 1.

**[Внеклеточный стимул \Rightarrow Рецептор \Rightarrow Ca^{2+} -канал \Rightarrow
 \Rightarrow $\text{Ca}^{2+} \pm$ Кальмодулин \Rightarrow Белки \Rightarrow Ответ]**

Рис. 1. Схема сигнальной Ca^{2+} -цепи [10]

Степень увеличения концентрации Ca^{2+} часто зависит от силы сигнала [17]. Стимулы, поступающие из окружающей среды, передаются через один из рецепторов плазматической мембраны [18]. Эти рецепторы связаны главным образом с G-белком. В ответ на стимуляцию концентрация Ca^{2+} увеличивается либо вследствие его проникновения в клетки через кальциевые каналы плазматической мембраны, либо за счет высвобождения из внутриклеточных органелл [16].

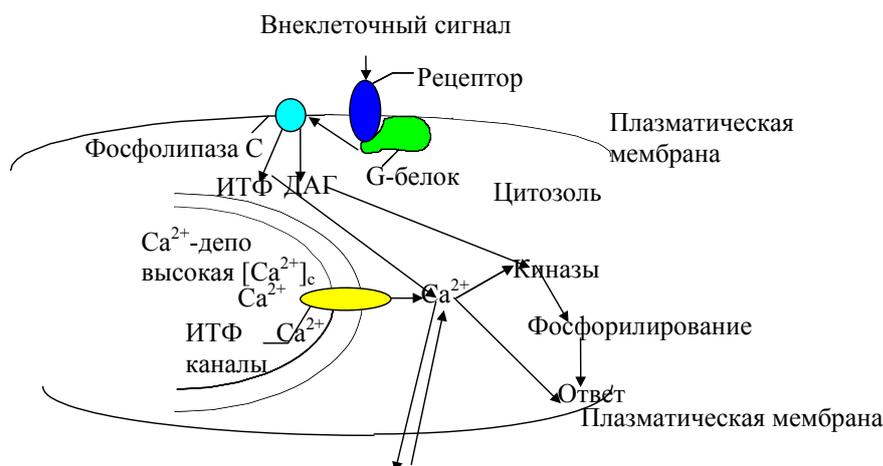


Рис. 2. Схема кальциевого обмена в клетке [21]

Согласно рис. 2, когда внеклеточный лиганд связывается с рецептором мембраны, соединенным с G-белком, он изменяет свою структуру и обычно активирует фосфолипазу C, что приводит к гидролизу 4,5-бифосфата фосфотидилинозитола (ФФ2) в диацилглицерол (ДАГ) и 1,4,5-трифосфат инозитол (ИТФ). ИТФ выступает в качестве вторичного сигнала и диффундирует с места своего образования в соответствующую органеллу, которая аккумулирует Ca^{2+} . Здесь он присоединяется к рецептору на мембране органеллы, что приводит к изменению его структуры и в результате взаимодействия с интегральным каналом способствует проникновению Ca^{2+} через него в цитоплазму [19, 20]. ИТФ был найден в клетках животных, растений и грибов. В клетках животных ИТФ вызывал высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), являющегося важным кальциевым депо. В клетках микромицетов ИТФ индуцировал отток Ca^{2+} из вакуолей, которые в гифах грибов выполняют роль Ca^{2+} -депо.

Свободные ионы Ca^{2+} взаимодействуют с различными кальцийсвязывающими белками, что имеет важное значение для регуляции концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Во многих случаях Ca^{2+} присоединяется к кальмодулину (КМ), который в свою очередь взаимодействует с различными белками, участвующими в окончательном клеточном ответе, и регулирует их деятельность. Помимо этого, Ca^{2+} может напрямую регулировать активность определенных белков, например таких, как протеинкиназы или белки ионных каналов [21, 22].

С учетом того что концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле приблизительно на 4 порядка ниже, чем во внешней среде или в органеллах, аккумулирующих Ca^{2+} [20, 21], выброс Ca^{2+} из цитозоля должен обеспечиваться энергией, образующейся в результате гидролиза АТФ [23].

2. Механизмы кальциевых потоков в клетках

Несмотря на то что механизмы потоков кальция в клетках разнообразны, основной механизм действия Ca^{2+} довольно прост. Когда уровень внутриклеточного Ca^{2+} находится в норме, клетка пребывает в состоянии покоя, но при

повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} клетка становится активной и выполняет определенные функции. Изменение степени активности клетки определяется действием двух различных механизмов. Один из них (приток Ca^{2+}) обеспечивает поступление Ca^{2+} в цитоплазму из внутренних хранилищ и внешней среды. Эти два источника могут использоваться вместе или по отдельности. Другой механизм (отток Ca^{2+}) способствует уменьшению содержания Ca^{2+} в цитозоле вследствие перекачивания его либо во внутренние хранилища, либо за пределы клетки [24].

Высокий электрохимический градиент Ca^{2+} , существующий внутри клетки, требует жесткого регулирования притока Ca^{2+} , который проникает в цитоплазму в основном через кальциевые каналы. При поступлении кальциевого сигнала тотчас включаются механизмы оттока Ca^{2+} и начинается процесс восстановления его нормального уровня за счет перекачивания во внутренние депо либо в окружающую среду. Эти процессы должны происходить очень активно, так как для проникновения Ca^{2+} сквозь мембраны необходимо преодолеть сопротивление электрохимического градиента.

В литературе достаточно полно описаны условия притока и оттока Ca^{2+} у дрожжевых организмов на генетическом и биохимическом уровнях [25], тогда как у нитчатых грибов *Magnaporthe oryzae* [26], *Penicillium notatum* [27], *Trichoderma viride* [28] и *Aspergillus nidulans* [29] установлены лишь некоторые части системы транспорта Ca^{2+} . В сложном механизме поступления Ca^{2+} в клетку одним из важнейших условий является осмотический градиент Ca^{2+} . Другой воздействующей силой служит антипортер $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ [12, 30], хотя унипорт Ca^{2+} также может играть некоторую роль. Антипорт $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обнаружен у дрожжевых клеток [31] и в вакуолярных мембранах растений [31, 32]. Описан также отток кальция из гифы *Trichoderma viride* [33], происходящий одновременно с его притоком, но с участием в этих процессах разных транспортных систем. Отток большей части Ca^{2+} у *Ustilago maydis* наблюдался в результате деятельности Ca^{2+} -АТФаз [34].

Кальциевые каналы у животных и растений классифицируются по их местонахождению в клетке. Те, которые локализованы на плазматической мембране, относятся к каналам, контролирующим приток Ca^{2+} , а находящиеся на внутриклеточной мембране – к контролирующим отток Ca^{2+} [12, 14]. Ca^{2+} -каналы, расположенные на плазматической мембране, классифицируют также в зависимости от того, как контролируется их деятельность. По этому признаку различают 3 типа каналов: потенциалоперируемые, работающие за счет разности потенциалов, лигандоперируемые и активируемые механическим растяжением мембраны. Большинство каналов на плазматической мембране животных клеток относятся к первому типу, то есть открываются в результате деполяризации мембраны. Многие из этих каналов также регулируются фосфорилированием или белками, связывающими ГТФ. Каналы лигандоперируемые активируются присоединением внеклеточных агонистов, таких, например, как глутамат и АТФ. Каналы третьего типа активируются за счет растяжения плазматической мембраны [23]. Причем плазматические мембраны клеток животных содержат Ca^{2+} -каналы, которые активируются также самим Ca^{2+} . Механизм действия последних пока еще не ясен, но существует гипотеза, что пустые хранилища Ca^{2+}

высвобождают мессенджер, который проникает в мембрану и способствует активации этих каналов [24, 35].

Высвобождение Ca^{2+} из внутренних депо может происходить через каналы, открываемые либо лигандом, либо за счет разности потенциалов. В животных клетках различают два семейства рецепторов, отвечающих за высвобождение Ca^{2+} : рецепторы 1,4,5-трифосфата инозитола (ИТФ) и рецепторы рианодина (RyRs). Информация, контролирующая открывание этих каналов, передается либо с поверхности клетки через прямое взаимодействие между белками, либо через способного к диффузии внутриклеточного мессенджера, который мобилизует Ca^{2+} , например ИТФ или циклическую рибозу дифосфата аденозина (цАДФ-рибоза) [24]. Считается, что в животных клетках каналы, открываемые ИТФ, находятся главным образом в ЭПР. У растений эти каналы отвечают за высвобождение Ca^{2+} из везикул и интактных вакуолей [23]. Для растений показано два различных типа кальциевых каналов плазматической мембраны, из которых один реагирует на дигидропиридин (ДГП), другой – на фенилалкиламин. Каналы Ca^{2+} на эндомембранах подобны тем, которые известны у животных [35].

Относительно микромицетов имеются сведения, что у них Ca^{2+} проникает в цитозоль через каналы всех трех типов [10], причем каналы третьего типа (активируемые растяжением мембраны) реагируют на различные механические воздействия и гипоосмотический шок [36]. У дрожжевых организмов были обнаружены два гена, продукты которых выполняют роль переносчиков Ca^{2+} : *CSH1* и *MIDI*. *MIDI* является трансмембранным белком, обладающим некоторой гомологией с катионными каналами, активируемыми циклическими нуклеотидами. *CSH1* обладает высокой степенью гомологии с белками гена *$\alpha 1$* субъединицы Ca^{2+} -каналов животных клеток. Вероятно, оба эти белка участвуют в одном и том же процессе поглощения Ca^{2+} [37, 38]. Присутствие *MIDI* было также показано у мицелиального гриба *Neurospora crassa* [39].

В транспорте кальция у животных и растений участвуют два крупных класса АТФаз: Ca^{2+} -АТФазы, локализованные в ЭПР, переносящие два иона кальция на каждую гидролизованную молекулу АТФ, не стимулируемые КМ, и Ca^{2+} -АТФаза, находящаяся в плазматической мембране (ПМ), переносящая один ион кальция на одну гидролизованную молекулу АТФ, стимулируемая КМ. Значение Ca^{2+} -АТФаз для клеток дрожжей было продемонстрировано на примере мутации *pms1* гена, который кодирует ПМ Ca^{2+} -АТФазу, находящуюся в дрожжевой тонопластной мембране. Ca^{2+} -АТФаза, обнаруженная в клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [40, 41], кодируется геном *cta3* и во многом напоминает ЭПР Ca^{2+} -АТФазные гены млекопитающих. В результате экспериментов, проведенных в условиях задерживания вакуолярного поглощения Ca^{2+} , а также при использовании протонофора для разобщения протонового градиента и стимуляции проницаемости плазматической мембраны (с использованием нистатина), удалось установить, что белок гена *cta3* является невакуолярным внутренним кальциевым каналом, зависящим от АТФ. Остаточное АТФ-зависимое поглощение Ca^{2+} наблюдалось у нулевого мутанта *cta3*, что предполагает существование другой невакуолярной Ca^{2+} -АТФазы [42]. У микромицетов Ca^{2+} -переносящая АТФаза была обнаружена в плазматической мембране [34].

Другой важный тип переносчиков Ca^{2+} за пределы клетки – это $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ -антипортеры, которые являются вторичными транспортировщиками, не требующими АТФ. Они активизируются за счет протонного градиента, который вырабатывается H^+ -АТФазами [12, 23]. Антипортные транспортеры $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, находящиеся в плазматической мембране, индуцируют выход Ca^{2+} из цитозоля в обмен на H^+ .

Показано, что у микромицетов, у которых главным хранилищем Ca^{2+} являются вакуоли [43], высвобождение избыточного Ca^{2+} происходит через вакуолярные мембраны за счет $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ -антипортной системы, приводимой в действие протонным градиентом, создающимся в результате действия H^+ -АТФазы вакуолярной мембраны [44, 45]. Как показано на мутантах дрожжей *S. cerevisiae*, у которых отсутствует функциональный ген для вакуолярной H^+ -АТФазы, они не способны контролировать концентрацию Ca^{2+} [46], что свидетельствует о важности поддержания протонного градиента и о значимости вакуоли как Ca^{2+} -депо. Особое внимание уделяется значению вакуоли для гомеостаза Ca^{2+} , так как функционирование вакуоли позволяет микромицетам расти в среде при концентрации CaCl_2 до 100 мМ [46].

У дрожжевых организмов также обнаружен Ca^{2+} -насос, ассоциированный с комплексом Гольджи, который кодируется *pmr1* геном, способствующим транспортировке Ca^{2+} в аппарат Гольджи для выполнения специфических секреторных функций [47]. Постоянная концентрация Ca^{2+} в ЭПР у *Saccharomyces cerevisiae* была установлена в размере 10 мкМ. У мутантов, не имеющих гена *pmr1*, который, как известно, кодирует насос Гольджи, обнаружен значительно сниженный уровень Ca^{2+} в ЭПР, что свидетельствует по крайней мере о частичном контроле насосом концентрации Ca^{2+} в ЭПР дрожжей [48]. Было также показано, что выход кальция из ЭПР клеток дрожжей осуществляется путем активизации сигнального пути с участием *Ige1p* и *Nac1p*. Когда концентрация кальция в ЭПР уменьшается, происходит увеличение притока Ca^{2+} через плазматическую мембрану через *Sch1p*–*Mid1p* Ca^{2+} -каналы [49]. Показано, что у *Penicillium notatum* в ЭПР, аппарате Гольджи, вакуолях и компонентах плазматической мембраны концентрация Ca^{2+} низкая, а основным депо свободных ионов Ca^{2+} у этих плесневых грибов являются митохондрии [50].

3. Кальцийсвязывающие белки эукариотных клеток

Клетки обладают огромным количеством разнообразных белков, связывающих Ca^{2+} , которые либо способствуют процессу кальциевой сигнализации посредством буферирования свободных ионов кальция, таким образом формируя ответ клетки, либо исполняют роль сенсоров, которые передают сигнальную функцию Ca^{2+} [24]. Большинство белков связывают Ca^{2+} с помощью шести или семи атомов кислорода, имеющих в аминокислотах глутамата или аспартата. Другой чертой, характерной для связывающих кальций белков, является наличие вторичной структуры, так называемой EF-структуры, которая включает две α -спирали, расположенные таким образом, что имеют вид указательного и большого пальцев правой руки. Между α -спиралями находится Ca^{2+} -связывающая петля, которая содержит активные остатки Ca^{2+} -связывающего глутамата и аспартата [21].

Ca^{2+} -связывающие белки условно делятся на две группы: растворимые (немембранные) белки и интегральные мембранные белки [11]. Последние связывают ионы Ca^{2+} на одной стороне плазматической мембраны или мембраны клеточной органеллы, переносят их через нее, возвращаются обратно, и цикл возобновляется. В ряду растворимых белков выделяют две категории, первая из которых может выступать только в роли буфера, связывая Ca^{2+} для поддержания его низкой концентрации в цитозоле. Вторая категория белков не только служит буфером, но также может, изменяя свою структуру, взаимодействовать с ферментами и тем самым способствовать передаче сигналов. Поэтому эти белки также называют Ca^{2+} -модулирующими. Одним из наиболее важных белков этой группы является первичный внутриклеточный Ca^{2+} -связывающий белок КМ.

КМ – это небольшой кислый белок, который у многих клеток может связывать 4 молекулы кальция, хотя в клетках дрожжей в период их почкования он может связывать только 3 молекулы [51]. Его сродство с Ca^{2+} составляет приблизительно 10^{-6} моль/л. Молекула белка по форме напоминает колокол и имеет две глобулярные области, соединенные длинной гибкой и очень подвижной α -спиралью. Как показали авторы [51], в каждой из этих шаровидных областей выделяются два EF-отдела, состоящие из двух спиралей с петлей между ними, каждая из которых может связываться с одной молекулой Ca^{2+} . Несмотря на то что эти две EF-структуры связаны внутри каждой шаровидной области коротким непараллельным β -слоем и во многом сходны, их сродство с Ca^{2+} различно. По данным [52], С-конец домена имеет такое высокое сродство с кальцием, которое приводит к важным изменениям в структуре молекулы. В результате этих структурных изменений проявляются гидрофобные бляшки, по одной в каждой молекуле. Эти бляшки затем взаимодействуют с КМ-стимулированными белками, такими, как киназы, фосфатазы, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы и Ca^{2+} -АТФазы. Сродство комплекса Ca^{2+} -КМ с данными белками на 4 порядка выше, чем самого Ca^{2+} .

КМ участвует в качестве посредника в большом количестве сигнальных систем. Иногда он составляет неотъемлемую часть ферментного комплекса. Совместно с цАМФ кальмодулин может активировать и аденилатциклазу, которая отвечает за синтез цАМФ, и Ca^{2+} -КМ-фосфодиэстеразу, что приводит к расщеплению цАМФ. В клетках дрожжей этот белок участвует в выполнении важных функций, таких, как разрастание клеток, контролирование клеточного цикла и деление ядра [44]. КМ обнаружен также у многих видов микромицетов, в том числе в клетках *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans* и *Coprinus cinereus* [10, 15, 53–56]. По Ca^{2+} -связывающим свойствам КМ *Neurospora crassa* невозможно отличить от КМ клеток позвоночных, хотя у микромицета этот белок менее кислый, чем в клетках животных, и его аминокислотный состав напоминает состав этого фермента у растений [53].

Итак, белки, связывающие и транспортирующие Ca^{2+} , выполняют важнейшие для жизнедеятельности клетки функции, изолируя и удаляя из цитозоля ионы Ca^{2+} , токсичные для клетки в высоких концентрациях.

Табл. 1

Участие Ca^{2+} в регуляции различных физиологических процессов у микромицетов

Виды	Процессы с участием Ca^{2+}	Ссылки
<i>Aspergillus nidulans</i>	Клеточный цикл	[57]
<i>A. fumigatus</i>	Гиперветвление	[58]
<i>Botrytis cinerea</i>	Разветвление и рост гиф микромицетов (фитопаразитизм)	[59]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Диморфизм	[60]
<i>Fusarium graminearum</i>	Растяжение	[61]
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Формация аппрессория	[62]
<i>Microsporium gypseum</i>	Фосфолипидный синтез	[63]
<i>Neurospora crassa</i>	Доминирование верхушки Цикадный ритм Конициальное развитие Разветвление гиф	[64–66]
<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Индукция конидиации	[27, 67]
<i>Sporothrix schenckii</i>	Прораствание спор	[68]

4. Регуляторная роль Ca^{2+} в передаче сигналов

Как уже было сказано, кальций играет важную роль в передаче ответа на сигнал внутри клетки и участвует в процессе распространения сигнала и его усиления. Имеются сведения, что кальций регулирует многие важные процессы у микромицетов (табл. 1), хотя мало что известно о конкретных этапах процесса передачи сигналов и их последовательности.

В настоящее время существует несколько методов измерения кальция в живых клетках: с помощью микроэлектродов, реагирующих на кальций, с помощью флуоресцентных красителей или люминесцентных. Каждый из этих методов имеет свои преимущества [69, 70].

При измерении Ca^{2+} микроэлектродами в цитоплазму отдельной клетки вводят два микроэлектрода: один – чувствительный к кальцию, другой – эталонный, которые могут быть объединены в один двуствольный микроэлектрод [70]. Этот метод использовался для анализа гомеостаза Ca^{2+} в гифах *Neurospora crassa* [43], но не получил широкого применения для микромицетов из-за технических трудностей. Использование флуоресцентных красителей для измерения концентрации Ca^{2+} в гифах микромицетов связано со следующими трудностями: введением в клетку красителей и изоляцией красящих веществ в органеллах [71–73]. Другими проблемами, возникающими в этой связи, являются избирательность цветообесцвечивания между другими двухвалентными катионами, такими, как Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mg^{2+} , и введение красителей, которое иногда происходит очень медленно [74].

5. Использование экворина для измерения кальция в цитозоле эукариотных клеток

Наиболее эффективный подход к измерению содержания Ca^{2+} в цитозоле связан с использованием Ca^{2+} -чувствительных фотобелков, например таких, как экворин, обелин [74]. Ранее экворин широко использовался в животных и растительных клетках [75] и лишь недавно нашел применение при исследовании Ca^{2+} в клетках микромицетов [76]. Экворин имеет несколько преимуществ по сравнению с другими белковыми молекулами, используемыми для измерения концентрации Ca^{2+} .

1. Не токсичен для клеток и не мешает выполнению Ca^{2+} -зависимых функций.

2. pH в физиологической области (6.6–7.4) не оказывает значительного влияния на чувствительность экворина к кальцию [74].

3. Белок позволяет проводить измерение свободных ионов кальция в пределах от 0.1 до 100 мкМ и от 0.3 до 300 мкМ в клетках пресноводных и морских эукариот соответственно. Такой широкий динамический диапазон экворина очень важен, так как колебания в концентрации Ca^{2+} и Ca^{2+} -градиент между цитоплазмой и внешней средой *in vivo* очень велик.

4. Экворин имеет сверхнизкий фоновый сигнал, поскольку аутолюминесценция из клеток и тканей практически отсутствует, и единственные фоновые сигналы поступают исключительно от инструментов [77]. Известно, что экворин представляет собой Ca^{2+} -чувствительный фотобелок медузы *Aequorea victoria* с молекулярной массой 21400 [78], состоящий из одной полипептидной цепи, апоэкворина, гидрофобного люминофора, селентразина и связанного кислорода [79]. Как только ионы кальция присоединяются к двум из трех кальцийсвязывающих сайтов в молекуле экворина, белок превращается в оксигеназу. Последняя катализирует окисление субстратного селентразина с помощью связанного кислорода, что приводит к излучению голубого света ($\lambda_{\text{max}} = 470$ нм), интенсивность которого зависит от концентрации свободных ионов кальция (рис. 3). Таким образом, экворин, введенный в клетку, позволяет проводить наиболее точные измерения концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Экворин состоит из 189 аминокислот и имеет три EF-структуры, характерные для Ca^{2+} -связывающих сайтов. Кроме того, он имеет гидрофобные участки, которые могут взаимодействовать с селентразином [80]. Нативный экворин состоит из девяти различных молекулярных форм (изоэкворинов), которые обозначаются как *экворин А–Н*. Константы относительного веса, светоизлучения и скорости реакции первого порядка у этих изоформ несколько различны. Наиболее чувствительным из них считается *экворин-D* [81].

Свойства экворина также могут быть изменены при помощи различных синтетических аналогов селентразина. Такой экворин называется полусинтетическим. Например, применение *ср-*, *f-* или *h-*селентразина приводит к образованию экворин-репортера в 10–20 раз более чувствительного к Ca^{2+} , чем апоэкворин, реконструированный с помощью нативного селентразина. *Нсп*-селентразин имеет такие ценные свойства, как быстрая реакция на связывание Ca^{2+} и наиболее высокий квантовый выход по сравнению со всеми имеющимися аналогами.

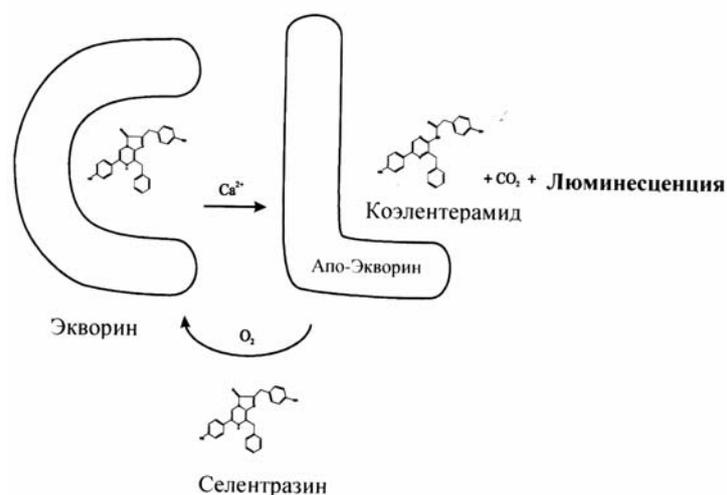


Рис. 3. Схематическая иллюстрация светоизлучения и регенерации экворина [82]

Слабая чувствительность к Ca^{2+} у *n*-селентразина позволяет использовать его для измерения высоких концентраций кальция. Реконструкция экворина с *e*-селентразином дает полусинтетический экворин с бимодальным спектром световой эмиссии (рис. 3). Это обеспечивает более простой способ измерения количества Ca^{2+} *in vivo* с использованием отношений светоизлучения 2 длин волн. При таком подходе нет необходимости в получении информации об уровнях экспрессии рекомбинантного экворина, о реконструкции или потреблении экворина, которая обычно требуется для калибровки экворином [83].

Ген экворина был получен в результате клонирования и генной инженерии, что позволило ему экспрессироваться в различных организмах [80, 84]. В зависимости от используемого промотора экворин может экспрессироваться во всех или только в определенных клетках организма. Рекомбинантный экворин может быть экспрессирован в различных органеллах и уже использовался для измерения Ca^{2+} в ядре, ЭПР, митохондриях, вакуоле и хлоропластах [85]. По мнению авторов, основным недостатком использования экворина по сравнению с флуоресцентными красителями является то, что из-за низкого квантового выхода его света микроскопическое изображение люминесценции и измерение концентрации Ca^{2+} на субклеточном уровне обычно не возможно.

Микроинъекции экворина широко использовались для измерения Ca^{2+} в животных и растительных клетках [86, 87]. Для проведения такой процедуры требуется экворин высокой степени очистки, и, что важно отметить, в ходе эксперимента могут травмироваться клетки. Клонирование и выявление характеристик двух генов апоэкворина – AQ440 [66] и AEQ1 [84] – привело к созданию новой технологии использования рекомбинантного экворина для измерения концентрации Ca^{2+} . Этот подход применяется в настоящее время для измерения количества ионов кальция в растениях [83] и различных клеточных культурах млекопитающих [88, 85]. Инкубация трансгенных организмов с селентразином позволяет создать функциональный экворин в цитозоле клеток, что приводит к появлению светящихся трансгенных организмов, свет, излучаемый которыми, свидетельствует о наличии Ca^{2+} [73].

Табл. 2

Исследование кальциевых сигнальных систем у дрожжевых культур с использованием рекомбинантного экворина

Предмет исследования	Организмы	Ссылки
Экспрессия экворина в дрожжевых культурах	<i>S. cerevisiae</i>	[78]
Внутриклеточный Ca^{2+} и Ca^{2+} -потоки	<i>S. cerevisiae</i>	[89, 90]
Гипоосмотический шок	<i>S. cerevisiae</i>	[36]
Щелочной шок	<i>S. cerevisiae</i>	[91]
Митохондриальный Ca^{2+}	<i>S. cerevisiae</i>	[92, 93]

6. Использование рекомбинантного экворина в исследованиях кальциевого ответа микромицетов на физико-химические воздействия

С начала 90-х годов XX в. был проведен ряд исследований кальциевых сигнальных систем у растений и животных, в ходе которых использовался рекомбинантный экворин. По сравнению с многочисленными исследованиями растительных и животных клеток лишь незначительное число работ посвящено исследованию Ca^{2+} -сигнальной системы у микромицетов. Работы на микромицетах проводились в основном с использованием дрожжевых культур. Некоторые данные из этих исследований приведены в табл. 2.

Было установлено, что экворин в дрожжевой культуре *S. cerevisiae* может экспрессироваться под контролем GAL1-промотора [78], причем клетки накапливают достаточно большое количество экворина, позволяющее выявить Ca^{2+} -сигнал. Применение этой системы показало, что обработка α -клеток *S. cerevisiae* феромоном (α -фактором) вызывала внеклеточную Ca^{2+} -зависимую люминесценцию только в клетках противоположного типа. Было подсчитано, что максимальное увеличение концентрации Ca^{2+} составляет 590 ± 200 нМ и происходит через 45–50 мин после добавления α -фактора. Другим использованным в работе стимулом было добавление глюкозы в клетки, испытывающие в ней дефицит. Это стимулировало Ca^{2+} -ответ с максимальной амплитудой 340 ± 4 нМ, который проявлялся через 2 мин после внесения глюкозы [89].

С помощью рекомбинантного экворина также было показано, что гипоосмотический шок в размножающейся дрожжевой культуре почти сразу вызывает вспышку концентрации Ca^{2+} от исходного значения, равного 200 нМ, до пиковой концентрации в 1100 нМ. Установлено, что при такой вспышке Ca^{2+} поступает в клетку как из внутренних резервуаров, так и из внешней среды. Сначала происходит выброс Ca^{2+} из внутренних резервуаров, который затем подкрепляется активацией каналов плазматической мембраны, реагирующих на растяжение. Изотонический шок не вызывает увеличения концентрации Ca^{2+} [36].

Первая попытка трансформировать микромицеты с помощью гена нативного апоэковорина была осуществлена на клетках *Neurospora crassa*. Уровень экспрессии был очень низким, приблизительно в 365 раз ниже, чем в трансгенных культурах *Nicotiana plumbaginifolia*. На основании этого было высказано предположение, что блокирование экспрессии апоэковорина происходит на стадии трансляции или после нее. Затем было обнаружено, что нативный ген апоэковорина

содержит 44 кодона, редко встречающиеся в *N. crassa*, и только один редкий кодон, выявленный у *N. plumbaginifolia*. Исходя из полученных результатов было сделано предположение, что кодоновая склонность является наиболее вероятной причиной низкого уровня экспрессии экворина [76]. Кодоновая склонность может встречаться у любой аминокислоты, потому что они могут кодироваться несколькими кодонами. Выбор кодонов коррелирует с большим количеством соответствующего тРНК. У высоко экспрессируемых генов преобладание кодонов более выражено, чем у генов с низкой экспрессией. Для решения этой проблемы был разработан и получен синтетический ген апоэкворина (*aeqS*) с оптимизированным кодоном, используемым для экспрессии в *Aspergillus* и *Neurospora*. Этот синтетический ген вызывал увеличение уровня экспрессии апоэкворина в *N. crassa* в $5 \cdot 10^5$ раз в сравнении с нативным геном. Позднее вектор экспрессии (pAEQ1-15), удерживающий этот ген под контролем промотора конститутивной глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, использовался для трансформации *A. niger* и *A. awamori*. Высокий уровень экспрессии апоэкворина был достигнут и с помощью преинкубации трансгенного микромицета с люминофорным селентразином, в результате чего был получен активный экворин. Применение этого метода позволило обнаружить появление внутриклеточных Ca^{2+} -вспышек в ответ на высокую концентрацию внеклеточных ионов кальция на изменения внеклеточного pH, на гипоосмотические стимулы и механическое воздействие [76]. При помощи экворина с оптимизированным кодоном было трансформировано несколько других организмов. Наиболее успешной была трансформация *A. nidulans* и фитопатогена *Phyllosticta ampellicida* [86].

Для исследования сигнальных систем животных клеток использовалось большое разнообразие фармакологических ингибиторов, некоторые из которых обладали высокой селективностью действия и способностью блокировать конкретные пути передачи сигналов, в то время как другие этого сделать не могли. Более того, селективная способность практически всех таких соединений по отношению к клеткам растений и микромицетов обычно снижена. Это указывает на необходимость соблюдения осторожности при интерпретации результатов, полученных с помощью фармакологических агентов, если они применялись в исследованиях на микромицетах. Основные работы такого рода, при проведении которых использовались Ca^{2+} -модулирующие фармакологические агенты, представлены в табл. 3 и 4.

Зачастую концентрация соединений, используемых для достижения эффекта блокирования Ca^{2+} -вспышек на микромицетах, была намного выше, чем в растительных клетках. В связи с этим возникает вопрос о фактической специфичности наблюдаемого процесса торможения. Например, показано, что La^{3+} (ингибитор кальциевых каналов) вызывает деполяризацию мембраны также за счет несвязанных с кальцием процессов [99]. Вместе с тем обработка клеток микромицетов Ca^{2+} -модулирующими агентами при прямом подсчете $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с помощью рекомбинантного экворина позволяет получать результаты с большей точностью, поскольку параметры Ca^{2+} -профилей, характерные для различных сигнальных путей (например, скорость повышения и снижения концентрации Ca^{2+} и ее амплитуда), легче анализируются.

Табл. 3

Агонисты кальциевых сигнальных систем, используемые в исследованиях на микромицетах

Препарат	Селективность агониста	Организмы	Процессы, подвергающиеся воздействию	Ссылки
A23187	Ca ²⁺ -избирательный ионофор	<i>Penicillium notatum</i>	Выброс Ca ²⁺ из митохондрий	[27]
		<i>Neurospora crassa</i>	Повышение скорости прорастания спор и разветвления гиф	[39, 94]
		<i>Fusarium oxysporium</i>	Стимуляция выработки липазы	[95]
Кофеин	Вызывает выброс Ca ²⁺ из внутренних кальциевых резервуаров	Микромицеты, вызывающие гниение древесины	Ингибирование роста	[96]
ЦПК ¹	Ингибирует Ca ²⁺ -АТФазы в обратном направлении, что приводит к заполнению внутренних резервуаров Ca ²⁺	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ингибирование разрастания колоний микромицета	[97]
		<i>Neurospora crassa</i>	Расширение гиф и их гиперветвление	[98]

Табл. 4

Некоторые антагонисты, используемые в исследованиях кальциевых сигнальных систем у микромицетов

Препарат	Избирательное действие ингибитора	Организмы	Ингибируемый процесс	Ссылки
ВАРТА	Хелирует Ca ²⁺	<i>S. cerevisiae</i>	Гипоосмотический шок	[36]
Цинаризин	Ингибирует активность кальциевых каналов	<i>Fusarium graminearum</i>	Разветвление гиф	[61]
Gd ³⁺	Ингибирует активность кальциевых каналов	<i>S. cerevisiae</i>	Гипоосмотический шок	[36]
La ³⁺	Ингибирует активность кальциевых каналов	<i>Neurospora crassa</i>	Приток Ca ²⁺	[99, 100]
Нифедипин	Ингибирует активность Ca ²⁺ -каналов L-типа	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Разветвление гиф	[59, 61]
Верапамил	Ингибирует активность Ca ²⁺ -каналов L-типа	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Разветвление и рост гиф	[59, 101]
W-5 ²	Антагонист КМ, ингибирует КМ-зависимую фосфодиэстеразу	<i>Zoophthora radicans</i>	Формирование апроссория	[102]

¹ Циклопиазоновая кислота.

² N-(6-Аминогексил)-1-нафтагенсульфонамид.

Единственным пока известным ингибитором Ca^{2+} -каналов, специфичным для микромицетов, является KP_4 . Это токсиноубийца, продуцируемый *Ustilago maydis*, который в природе эффективен прежде всего против представителей семейства *Ustilaginaceae* [103]. На примере *U. maydis* показано, что KP_4 действует аналогично кальциевым хелаторам (ЭГТА) и ингибитору Ca^{2+} -канала Cd^{2+} [104]. Поскольку KP_4 препятствовал поступлению в *Ustilago* изотопа $^{45}\text{Ca}^{2+}$, было высказано предположение, что KP_4 блокирует кальциевые каналы микромицетов. Интересно отметить, что KP_4 был эффективен при концентрации 0.33 мкМ, а для достижения такого же уровня блокировки с помощью ЭГТА требуется его миллимолярная концентрация. Такая разница в эффективности, вероятно, связана с тем, что KP_4 выбирает мишенью именно Ca^{2+} -каналы, тогда как ЭГТА приходится хелировать все ионы кальция, присутствующие в питательной среде. Установлено также, что KP_4 эффективно блокирует потенциалзависимые кальциевые каналы в нейронах млекопитающих [105].

Резюмируя изложенные данные литературы, можно заключить, что до недавнего времени не существовало удобного метода для измерения микроконцентраций Ca^{2+} в цитозоле живых клеток микромицетов, хотя имеющаяся информация доказывает, что Ca^{2+} играет важную роль в регуляции жизнедеятельности этих эукариотных микроорганизмов. Использование метода рекомбинантного экворина в качестве эффективного инструмента для фундаментального изучения пула свободных ионов кальция у микромицетов и изменения их концентрации в ответ на внешние воздействия позволит получить новую информацию о функционировании Ca^{2+} -сигнальных систем. В связи с этим в настоящей работе представлены некоторые наши экспериментальные данные, полученные в ходе исследований кальциевых ответов мицелиальных грибов на внешние воздействия, которые были определены методом рекомбинантного экворина.

7. Использование рекомбинантного экворина для измерения кальциевого ответа микромицета *Aspergillus awamori* на внешние воздействия

В наших исследованиях [106] был проведен анализ результатов воздействия различных стимулов на содержание кальция в клетках *Aspergillus awamori*, трансформированных с помощью синтетического экворина с оптимизированным кодоном. Высокая степень экспрессии экворина в клетках *A. awamori* позволила эффективно измерять незначительные изменения концентрации Ca^{2+} . Микромицет *A. awamori* подвергали механическому воздействию (перемешивание), существенному увеличению концентрации внеклеточного CaCl_2 и гипосмотическому шоку. Кальциевый ответ микромицета на каждый стимул имел свою характерную особенность, которая выражалась в уникальном сочетании четырех факторов: лаг-периода, времени подъема, амплитуды и продолжительности ответа в момент, когда амплитуда равнялась половине максимальной. Реакция клеток на каждый вид воздействия была мгновенной. Время подъема содержания кальция менялось в зависимости от воздействующего стимула. Наибольшие вариации времени подъема наблюдались в случае стимуляции клеток экзогенным CaCl_2 в концентрации 0.05 мМ. Амплитуды и продолжительность Ca^{2+} -ответов были различными при всех видах воздействия. Кальциевые вспышки

в ответ на все примененные виды стимуляции были очень короткими, и содержание Ca^{2+} в гифах восстанавливалось в течение нескольких минут.

Анализ кальциевых резервуаров, пополняющих уровень Ca^{2+} в клетках микромицета во время каждой Ca^{2+} -вспышки, был произведен с помощью ряда коммерчески доступных фармакологических ингибиторов, обладающих известным механизмом избирательного действия, а также при использовании KP_4 -ингибитора.

Важно подчеркнуть, что механизмы действия почти всех фармакологических ингибиторов были изучены на клетках животных. Многие из них использовались также в работах с растительными клетками [23], но у растений эффективные концентрации ингибиторов кальциевых каналов были, как правило, значительно выше, чем у животных клеток, а в экспериментах на клетках микромицета они были выше, чем на клетках растений. В связи с этим возникает вопрос о фактической селективности данных ингибиторов по отношению к микромицетам и растениям. Следует также помнить о том, что в клетках микромицетов и растений мишени для данных ингибиторов могут либо полностью отсутствовать, либо иметь отличную структуру, которая не позволяет Ca^{2+} -антагонисту связываться с ними.

Результаты экспериментов, приведенные в табл. 5, показывают, что из шести исследованных коммерчески доступных антагонистов (кроме KP_4) только два (La^{3+} и ВАРТА) ингибировали Ca^{2+} -ответы на воздействие физико-химическими стимулами. Особый интерес представляли данные, характеризующие влияние KP_4 на функционирование Ca^{2+} -каналов, так как именно он является единственно известным блокатором Ca^{2+} -каналов, который продуцируется микромицетом [105]. Интересно отметить в этой связи, что показатели IC_{50} для KP_4 выражаются в мкМ, а IC_{50} для LaCl_3 – в мМ. Представляется вполне вероятным, что KP_4 имеет большую специфичность для Ca^{2+} -каналов микромицетов, чем LaCl_3 . На основании полученных данных можно заключить, что важнейшим источником повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в ответ на механическое воздействие, гипоосмотический шок и стимулирование внеклеточным CaCl_2 является транспорт Ca^{2+} из внешней среды через цитоплазматическую мембрану микромицета, ввиду того что LaCl_3 эффективно ингибировал Ca^{2+} -каналы L-типа, локализованные в плазматической мембране клеток, а препарат ВАРТА изменял концентрацию внеклеточного Ca^{2+} путем его хелирования. Что касается KP_4 , точная степень специфичности его воздействия пока не известна. Вместе с тем установлено, что это вещество действует аналогично кальциевым хелаторам (ЭГТА) и Cd^{2+} – ингибитору Ca^{2+} -каналов [107], то есть препятствует проникновению в цитозоль внеклеточного Ca^{2+} .

В доступной литературе нет сведений относительно того, что внутриклеточные резервуары Ca^{2+} играют важную роль в развитии кальциевого ответа у *A. awamori* на физико-химические воздействия. Частично это подтверждается данными литературы: рианодин, вызывающий выход Ca^{2+} из внутриклеточных органелл, и ТМВ-8, ингибирующий выброс Ca^{2+} из внутренних резервуаров, не оказывали влияния на формирование Ca^{2+} -ответа [108]. Тем не менее к этим результатам следует подходить с осторожностью, поскольку рианодин, ТМВ-8, нифедипин и верапамил могут не являться эффективными модуляторами Ca^{2+}

Табл. 5

Влияние ингибиторов Ca^{2+} -транспорта на концентрацию кальция в цитозоле *A. awamori* при стрессорных воздействиях

Препарат	Избирательное действие ингибитора	IC_{50} , мМ*		
		Внеклеточный кальций	Механический стимул	Гипоосмотический шок
ВАРГА [1,2-бис-(<i>d</i> -мино-5-броифенокси) этан-N,N,N,N-тетраацетиловая кислота]	Хелирует, связывает ионы Ca^{2+} , которые становятся недоступными клетке			
Нифедипин (из группы дигидропиринов)	Ингибирует выброс Ca^{2+} из внутренних резервуаров Ca^{2+}	НКП***	0.5–5.0	0.5–5.0
Верапамил (гидрохлорид)	Вызывает выход Ca^{2+} из внутриклеточных органелл	–	–	–
Хлорид ланатана ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Блокатор Ca^{2+} -каналов L-типа	–	–	–
KR_4		10–14	–**	10–14

Примечание. Результаты – среднее из 5 измерений.

* IC_{50} – концентрация, вызывающая снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} на 50% от максимального уровня в контроле (без ингибитора).

** Не ингибирует.

*** Некорректное применение.

у *A. awamori*. Следует также учитывать, что Ca^{2+} -каналы, на которые они нацелены, могут и не участвовать в формировании Ca^{2+} -ответа на механическое воздействие, гипоосмотический шок и стимуляцию экзогенным CaCl_2 .

Избирательность действия La^{3+} , который ингибировал Ca^{2+} -ответ на гипоосмотический шок и внесение экзогенного CaCl_2 , нуждается в проверке. Согласно данным [99], La^{3+} вызывает деполяризацию плазматической мембраны в клетках *Neurospora crassa*, что может оказывать влияние на поток Ca^{2+} в цитоплазму. При стимуляции клеточного ответа экзогенным CaCl_2 в низких концентрациях (0.1 и 0.5 мМ) LaCl_3 (5 мМ) индуцировал увеличение амплитуды кальциевой вспышки. При более высокой концентрации CaCl_2 (5 мМ) LaCl_3 в тех же дозах (5 мМ) вызывал уменьшение амплитуды кальциевой вспышки. Вероятно, это объясняется тем, что при низких концентрациях CaCl_2 , побочные эффекты La^{3+} , вызываемые деполяризацией мембраны, более выражены, чем при увеличенных в 10–50 раз концентрациях CaCl_2 . Данные по кинетике изменений кальциевых вспышек у микромицета свидетельствуют о сложном характере действия La^{3+} на клетки. Это выражается в том, что La^{3+} не только уменьшает амплитуду клеточного ответа, но при концентрации 20 мМ также вызывает вторичную Ca^{2+} -вспышку, соответствующую выходу Ca^{2+} из клеточных органелл, и при любой концентрации, превышающей 5 мМ, приводит к увеличению конечного уровня содержания Ca^{2+} в отличие от нормы. Отмеченное выше воздействие La^{3+} согласуется с эффектом подавления активности Ca^{2+} -АТФазы, которая отвечает за транспорт Ca^{2+} из цитозоля. В животных клетках La^{3+} , как известно, препятствует

Табл. 6

Влияние препаратов-агонистов на динамику внутриклеточного Ca^{2+} у *A. awamori* при механическом воздействии на клетки

Ca^{2+} -агонист	Механизм действия	Увеличение концентрации Ca^{2+}	Минимальная эффективная концентрация
A23187 (кальцимицин)	Ca^{2+} -избирательный ионофор	+	1 мкМ
Кофеин	Вызывает выброс Ca^{2+} из внутренних резервуаров (плазматического ретикулума)	+	5 мМ
ЦПК (циклопиазоновая кислота, выделенная из клеток <i>Penicillium cyclopium</i>)	Ингибирует Ca^{2+} -АТФазы в обратном направлении, что приводит к наполнению внутренних резервуаров Ca^{2+}	+	20 мкМ

формированию фосфорилированного посредника Ca^{2+} -АТФазы ЭПР-типа [12]. Интересно отметить, что побочные эффекты добавления LaCl_3 , то есть увеличение уровня Ca^{2+} в отличие от нормы и вторичная Ca^{2+} -вспышка, наблюдались при механическом воздействии. Это свидетельствует о том, что данные эффекты не связаны с активностью La^{3+} как ингибитора кальциевых каналов.

Еще одним интересным моментом является тот факт, что La^{3+} и K_4 ингибировали развитие кальциевого ответа как на гипосмотический шок, так и на стимуляцию экзогенным CaCl_2 , но не оказывали влияния в случае механического воздействия. Это указывает на то, что в развитии Ca^{2+} -ответа на гипосмотический шок и внесение экзогенного CaCl_2 участвуют совсем другие системы транспорта Ca^{2+} . Высказанное предположение подтверждается результатами наших исследований, полученных при воздействии на *A. awamori* Ca^{2+} -агонистов [106] (табл. 6). Установлено, что кофеин, который стимулирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров, индуцировал снижение амплитуды кальциевой вспышки при механическом воздействии, но не в случае гипосмотического шока или стимуляции экзогенным CaCl_2 . На основании этого можно предположить, что в формировании кальциевого ответа на механические стимулы может частично участвовать выход ионов кальция из клеточных органелл, чувствительных к действию кофеина.

Добавление в среду культивирования *A. awamori* таких препаратов, как A23187, кофеин и ЦПК, вызывало увеличение концентрации Ca^{2+} в клетках микромицета. Особо следует отметить, что кальциевый ответ на воздействие этих агонистов был бифазным: первичный ответ, очень быстрый, являлся результатом механической стимуляции клеток микромицетов вследствие внесения препарата. В результате этого происходило поступление Ca^{2+} в цитозоль из внешней среды и, возможно, также из клеточных органелл. Вторичный ответ был более продолжительным. В случае добавления кофеина вторая и третья Ca^{2+} -вспышки могли быть результатом выхода Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров. Известно, что ЦПК ингибирует активность Ca^{2+} -АТФаз и, таким обра-

зом, препятствует поступлению Ca^{2+} в клеточные органеллы, которые опустошаются при повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Кофеин оказывает такое же действие, стимулируя выход Ca^{2+} из клеточных органелл *A. awamori*. Эти данные свидетельствуют о наличии специального механизма для регуляции транспорта Ca^{2+} из клеточных органелл *A. awamori* в цитозоль.

A23187 является мобильным переносчиком ионов, который образует устойчивые комплексы с двухвалентными катионами [107]. Известно, что в клетках животных при концентрации в 10 мкМ A23187 стимулирует поступление Ca^{2+} в цитозоль из внешней среды [61, 107]. При стимулировании этим препаратом клеток микромицета в них наблюдались продолжительные периоды повышения концентрации Ca^{2+} . Затем следовало восстановление до исходного уровня Ca^{2+} , возможно, в результате прекращения действия A23187 или в результате активизации деятельности Ca^{2+} -АТФаз и Ca^{2+} -/ H^+ -антипорта. Продолжительность Ca^{2+} -вспышек у микромицета в ответ на стимуляцию A23187 говорит о том, что клетки с трудом восстанавливают нормальный уровень концентрации Ca^{2+} . Поскольку A23187 имеет способность со временем образовывать нерастворимый осадок в жидкой среде [107], препарат мог локализоваться в клетках в большой концентрации и оказывать на них токсическое действие. Продолжительный Ca^{2+} -ответ мог быть результатом выхода экворина из мертвых клеток и его последующего взаимодействия с Ca^{2+} , присутствующим в питательной среде. Возвращение уровня Ca^{2+} к норме может указывать на то, что клетки микромицета адаптировались к присутствию A23187 в среде роста. Важно отметить, что в конце Ca^{2+} -вспышки, вызванной действием A23187, в клетках оставалось еще много активного экворина, поэтому восстановление исходного уровня концентрации Ca^{2+} в цитозоле нельзя объяснить недостаточным содержанием активного экворина в клетках микромицета.

Кофеин, как известно, также выпадает в осадок в жидкой среде (как правило, через 1–3 ч). В связи с этим третья Ca^{2+} -вспышка, наблюдавшаяся после добавления в среду роста кофеина, могла быть вызвана гибелью клеток, как и в случае действия A23187. Другим объяснением данного результата может быть тот факт, что в растительных клетках кофеин вызывает временную гиперполяризацию плазматической мембраны [108]. То же самое может происходить и в клетках микромицетов.

В случае применения ЦПК проблемы с восстановлением нормального уровня Ca^{2+} в гифах микромицета возникают в связи с подавлением активности Ca^{2+} -АТФазы. Приблизительно через 5 ч после начала стимуляции восстановление исходного уровня Ca^{2+} все-таки происходит, вероятно, благодаря восстановлению активности Ca^{2+} -/ H^+ -антипорта или Ca^{2+} -АТФазы. Поскольку ЦПК не выпадает в осадок в растворе, вторичный клеточный ответ на стимуляцию ЦПК, вероятно, развивается иначе, чем при воздействии A23187. Вторичная Ca^{2+} -вспышка при воздействии ЦПК достигала своего пика через 1 ч, после чего концентрация Ca^{2+} начинала сразу же снижаться. В случае с A23187 интенсивность люминесценции достигала максимального пика приблизительно через 50 мин и оставалась на том же уровне свыше 1 ч. Это вновь дает основание предположить, что продолжительность вспышки, скорее всего, обусловлена гибелью клеток в результате выпадения A23187 в осадок с течением времени.

Влияние Ca^{2+} -агонистов так же, как и антагонистов, изучали в их сочетании с физико-химическими стимулами. Через 5 мин инкубации с кофеином наблюдалось повышение исходного уровня Ca^{2+} в цитоплазме клеток. Однако после механического воздействия амплитуда клеточного ответа значительно снижалась. В противоположность этому ни гипоосмотический шок, ни высокая концентрация внеклеточного CaCl_2 не изменяли амплитуды Ca^{2+} -ответа. Этот факт указывает на то, что внутриклеточные хранилища Ca^{2+} , чувствительные к кофеину, могут играть определенную роль в Ca^{2+} -ответе клеток на механическое воздействие. Кальциевые резервуары, участвующие в Ca^{2+} -ответе на механическую стимуляцию, отличаются от резервуаров, участвующих в Ca^{2+} -ответе на два других физико-химических стимула. Восстановление уровня Ca^{2+} происходило с задержкой после всех трех видов воздействия. Вторичный ответ клеток микромицета на внешнее воздействие наблюдался в случае стимулирования кофеином и полностью отсутствовал при сочетании воздействия кофеина и физико-химических стимулов.

В случае применения ЦПК совместно с физико-химическими стимулами исходный уровень Ca^{2+} в клетках значительно повышался. Несмотря на это, Ca^{2+} -ответы были приблизительно такими же (время подъема, амплитуда и продолжительность), как при воздействии отдельно физико-химическими стимулами. Хотя присутствие ЦПК истощило запасы кальция в зависящих от него клеточных органеллах, Ca^{2+} -ответ клеток на физико-химические воздействия был нормальным. Данные результаты подтверждают предположение, что основным источником повышения внутриклеточного пула Ca^{2+} в ответ на исследованные физико-химические виды воздействия (за исключением механического стимулирования) является поступление в клетки экзогенного Ca^{2+} .

Заключение

Резюмируя описанные результаты осцилляции ионов Ca^{2+} в цитозоле микромицета с использованием рекомбинантного фоточувствительного белка экворина, можно сделать следующие заключения.

Три физико-химических стимула (механическое воздействие, гипоосмотический шок и внесение в среду высокой концентрации CaCl_2) индуцировали временное увеличение содержания Ca^{2+} в клетках микромицета, и каждый из этих кальциевых ответов имел характерные особенности, которые выражались в уникальном сочетании времени подъема, лаг-периода, амплитуды и продолжительности ответа.

Источником Ca^{2+} для клеточных ответов на гипоосмотический шок, стимуляцию внеклеточным CaCl_2 и, возможно, на механическое воздействие является в основном внешняя среда. Внутриклеточные резервуары Ca^{2+} также могут играть определенную роль в ответе клеток на механическую стимуляцию.

Из ряда исследованных Ca^{2+} -ингибиторов только два (La^{3+} и препарат ВАРТА) эффективно ингибировали кальциевый ответ. Значения их показателей IC_{50} находились в миллимолярном диапазоне, в то время как для ингибитора KR_4 , выделенного из клеток микромицета вида *Ustilago*, значения IC_{50} находились в микромолярном диапазоне.

Стимуляция Ca^{2+} -ответа с помощью таких Ca^{2+} -агонистов, как A23187, кофеин и ЦПК, вызывала бифазный ответ клеток: первичная Ca^{2+} -вспышка была результатом механического воздействия, вторичная – результатом действия агонистов.

Метод рекомбинантного экворина может рассматриваться как эффективный инструмент фундаментальных исследований функционирования Ca^{2+} -сигнальных систем у микромицетов.

Summary

O.V. Kozlova, S.Yu. Egorov, F.G. Kupriyanova-Ashina. Analysis of Calcium Signalling in Filamentous Fungi Using Recombinant Aequorin.

This article provides a review of data from literature sources and authors' research on Ca^{2+} signalling including the role of calcium in microbial, plant and animal cells, calcium fluxes and calcium modulating proteins, with the particular focus on the role of Ca^{2+} in filamentous fungi. The authors describe in detail the function of transient increases in intercellular calcium concentration in mediating the cellular response to external stimuli.

The research described in this article was carried out using a strain of *Aspergillus awamori* transformed with the recombinant aequorin gene to allow real-life measurements of cytosolic free calcium. It was demonstrated that physico-chemical stimuli caused transient increases in the intracellular Ca^{2+} concentration. Using a number of Ca^{2+} blockers and Ca^{2+} agonists, it was determined that these increases were caused by the influx of calcium ions from the external environment as well as from calcium storage organelles. The main role in the elevation of Ca^{2+} concentration was attributed to the voltage gated calcium channels.

Key words: Ca^{2+} signalling, filamentous fungi, *Aspergillus awamori*, recombinant aequorin, Ca^{2+} dynamics.

Литература

1. Ткачук В.А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} // Биохимия. – 1998. – Т. 63, Вып. 1 – С. 47–56.
2. Крутецкая З.Н., Лебедев О.Е. Механизмы внутриклеточной сигнализации. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2003. – 208 с.
3. Reddy A.S. Calcium: silver bullet in signaling // Plant Sci. – 2001. – V. 160, No 3. – P. 381–404.
4. Hepler P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – P. 2142–2155.
5. Hetherington A.M., Brownlee C. The generation of Ca^{2+} signals in plants // Ann. Rev. Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 401–427.
6. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – V. 4. – P. 517–529.
7. Berridge M.J. The AM and FM of calcium signalling // Nature. – 1997. – V. 386. – P. 759–760.
8. McAinsh M.R., Hetherington A.M. Encoding specificity in Ca^{2+} -signalling systems // Trends Plant Sci. – 1998. – V. 3. – P. 32–36.
9. Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. Calcium at the Crossroads of signaling // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – P. 401–417.
10. Gadd G.M. Signal transduction in fungi // The growing Fungus / Eds. N.A.R. Gow, G.M. Gadd. – London: Chapman and Hall. – 1995. – P. 183–210.

11. *Carafoli E.* Intracellular calcium homeostasis // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – V. 56. – P. 395–433.
12. *Bush D.S.* Calcium regulation in plant cells and its role in signalling // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1995. – V. 46. – P. 95–122.
13. *Gilroy S., Trewavas A.* Signal processing and trasduction on plant cells: the end of the beginning? // *Nat. Rev.* – 2001. – V. 2. – P. 307–314.
14. *Mazars C., Bourque S., Mithöfer A., Pugin A., Ranjeva R.* Calcium homeostasis in plant cell nuclei // *New Phytol.* – 2009. – V. 181, No 2. – P. 261–274.
15. *Saporito S.M., Sypherd P.S.* The isolation and characterization of a calmodulin-encoding gene (*cmd-1*) from the dimorphic fungus *Candida albicans* // *Gene.* – 1991. – V. 106. – P. 43–49.
16. *Berridge M.J.* Elementary and global aspects of calcium signalling // *J. Physiol.* – 1997. – V. 499. – P. 291–306.
17. *Bootman M.D., Cheek T.R., Moreton R.B., Bennett D.L., Berridge M.J.* Smoothly graded Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, No 40. – P. 24783–24791.
18. *Bootman M.D., Young K.W., Young J.M., Moreton R.B., Berridge M.J.* Extracellular calcium concentration controls the frequency of intracellular calcium spiking independently of inositol 1,4,5-triphosphate production in *HeLa* cells // *Biochem. J.* – 1996. – V. 314. – P. 347–354.
19. *Bootman M.D., Collins T.J., Peppiatt C.M., Prothero L.S., MacKenzie L., DeSmet P., Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., Lipp P.* Calcium signalling – an overview // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2001. – V. 12, No 1. – P. 3–10.
20. *Bootman M.D., Holmes A.M., Roderick H.L.* Calcium Signalling and Regulation of Cell Function // *Encyclopedia of Life Sciences.* – John Wiley & Sons, Inc., 2006. – URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003957/abstract>.
21. *Hancock J.T.* Intracellular calcium: its control and role as an intracellular signal // *Hancock J.T. Cell signaling.* – Harlow, England: Addison-Wesley Longman, 1977. – P. 144–166.
22. *Ishida A., Sueyoshi N., Shigeri Y., Kameshita I.* Negative regulation of multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – V. 154, No 4. – P. 729–740.
23. *Johannes E., Brosnan J.M., Sanders D.* Calcium channels and signal transduction in plant cells // *Bioessays.* – 1991. – V. 13. – P. 331–336.
24. *Berridge M.J., Lipp P., Martin D.* The versatility and universality of calcium signalling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 1, No 1. – P. 11–21.
25. *Cunningham K.W., Fink G.R.* Calcineurin inhibits VCXI-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* – 1996. – V. 16. – P. 2226–2237.
26. *Nguyen Q.B., Kadotani N., Kasahara S., Tosa Y., Nakayashiki H.* Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system // *Mol. Microbiol.* – 2008. – V. 68, No 6. – P. 1348–1365.
27. *Pitt D., Barnes J.C.* Calcium homeostasis, signalling and protein-phosphorylation during calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – V. 139, No 2. – P. 3053–3063.
28. *Krystofova S., Varecka L., Betina V.* Effects of agents affecting Ca^{2+} homeostasis on *Trichoderma viride* growth and conidiation // *Folia Microbiologica.* – 1996. – V. 41, No 1. – P. 249–253.

29. Hagiwara D., Kondo A., Fujioka T., Abe K. Functional analysis of C₂H₂ zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans* // *Curr. Genet.* – 2008. – V. 54, No 6. – P. 325–338.
30. Segarra V.A., Thomas L. Topology mapping of the vacuolar Vex1p Ca²⁺/H⁺ exchanger from *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* – 2008. – V. 414, No 1. – P. 133–141.
31. Dunn T., Gable K., Beeler T. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, No 10. – P. 7273–7278.
32. Hirschi K.D., Zhen R.G., Cunningham K.W., Rea P.A., Fink G.R. CAXI, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – P. 8782–8786.
33. Simkovic M., Krystofova S., Varecka L. Ca²⁺ fluxes in developing *Trichoderma viride* mycelium // *Canad. J. Microbiol.* – 2000. – V. 46. – P. 312–324.
34. Hernandez A., Cooke D.T., Clarkson D.T. Ca²⁺ ATPase – driven calcium accumulation in *Ustilago maydis* plasma membrane vesicles // *Microbiol.* – 1994. – V. 140. – P. 3047–3051.
35. Gelli A., Blumwald E. Calcium retrieval from vacuolar pools // *Plant Physiol.* – 1993. – V. 102. – P. 1139–1146.
36. Batiza A.F., Schulz T., Masson P.H. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 23357–23362.
37. Fischer M., Schnell N., Chattaway J., Davies P., Dixon G., Sanders D. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 419, No 2–3. – P. 259–262.
38. Teng J., Goto R., Iida K., Kojima I., Iida H. Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol.* – 2008. – V. 154, No 12. – P. 3775–3781.
39. Lew R.R., Abbas Z., Anderca M.I., Free S.J. Phenotype of a mechanosensitive channel mutant, mid-1, in a filamentous fungus, *Neurospora crassa* // *Eukaryot Cell.* – 2008. – V. 7, No 4. – P. 647–655.
40. Cunningham K.W., Fink G.R. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking pmc1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases // *J. Cell Biol.* – 1994 b. – V. 124, No 3. – P. 351–363.
41. Ghislain M., Goffeau A., Halachmi D., Eilam Y. Calcium homeostasis and transport are affected by disruption of *cta 3*, a novel gene encoding Ca²⁺-ATPase in *Saccharomyces pombe* // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 18400–18407.
42. Halachmi D., Eilam Y. Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺-ATPase // *FEBS Lett.* – 1996. – V. 392. – P. 194–200.
43. Miller A.J., Vogg G., Sanders D. Cytosolic calcium homeostasis in fungi: roles of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1990. – V. 87. – P. 9348–9352.
44. Anraku Y., Ohya Y., Iida H. Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – V. 1093. – P. 169–177.
45. Klionsky D.G., Herman P.K., Emr S.D. The fungal vacuole – composition, function and biogenesis // *Microbiol. Rev.* – 1990. – V. 54. – P. 266–292.
46. Ohya Y., Umemoto I., Ohta A., Iida H., Anraku Y. Calcium-sensitive *cls* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* showing a Pet phenotype are ascribable to defects of vacuolar membrane H⁺-ATPase activity // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 13971–13977.
47. Cunningham K.W., Fink G.R. Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Gen. Microbiol.* – 1994. – V. 196. – P. 157–166.

48. *Strayle J., Pozzan T., Rudolph H.* Steady-state free Ca^{2+} in the yeast endoplasmic reticulum reaches only $10 \mu\text{M}$ and is mainly controlled by the secretory pathway pump *Pmr1* // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – P. 4733–4743.
49. *Bonilla M., Nastase K.K., Cunningham K.W.* Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress // *EMBO J.* – 2002. – V. 21, No 10. – P. 2343–2353.
50. *Pitt D., Barners J.C.* Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* // *J. Gen. Microbiol.* – 1999. – V. 139. – P. 3053–3063.
51. *Luan Y., Matsuura I., Yazawa M.* Yest calmodulin: structural and functional differences compared with vertebrate calmodulin // *J. Biochem.* – 1987. – V. 102. – P. 1531–1537.
52. *Pietrobon D., Virgilio F.D., Pozzan T.* Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – V. 194. – P. 599–662.
53. *Cox J.A., Ferraz C., Demaille J.G., Perez R.O., Vantuinen D., Marme D.* Calmodulin from *Neurospora crassa* – general properties and conformation changes // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – P. 694–700.
54. *Davis T.N., Urdea M.S., Masiarz F.R., Thorner J.* Isolation of the yeast calmodulin gene – calmodulin is an essential protein // *Cell.* – 1986. – V. 47. – P. 423–431.
55. *Takeda T., Yamamoto M.* Analysis and in vivo disruption of the gene coding for calmodulin in *Saccharomyces pombe* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V. 84. – P. 3580–3584.
56. *Kaneko K., Yamada Y., Sueyoshi N., Watanabe A., Asada Y., Kameshita I.* Novel Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase expressed in actively growing mycelia of the basidiomycetous mushroom *Coprinus cinereus* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1790, No 1. – P. 71–79.
57. *Kahl C.R., Means A.R.* Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways // *Endocr. Rev.* – 2003. – V. 24, No 6. – P. 719–736.
58. *Gow N.A.R., Miller P.F.P., Gooday G.W.* Life at the apex: growth of the hiphal tip // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1992. – V. 56. – P. 217–219.
59. *Hudecova D., Varecka L., Vollek V.* Growth and morphogenesis of *Botrytis cinerea*. Effects of exogenous calcium ions, calcium channel blockers and cyclosporin A // *Folia Microbiologica.* – 1994. – V. 39. – P. 269–275.
60. *Campos C.B., Di Benedette J.P., Morais F.V., Ovalle R., Nobrega M.P.* Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis* // *Eukaryot Cell.* – 2008. – V. 7, No 10. – P. 1856–1864.
61. *Robson G.D., Wiebe M.G., Trinci A.P.* Involvement of Ca^{2+} in the regulation of hiphal extension and branching in *Fusarium graminearum* a-3/5 // *Exp. Mycol.* – 1991. – V. 15. – P. 263–272.
62. *Choi J.H., Kim Y., Lee Y.H.* Functional Analysis of MCNA, a Gene Encoding a Catalytic Subunit of Calcineurin, in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V. 19, No 1. – P. 11–16.
63. *Giri S., Mago N., Bindra A., Khuller G.K.* Possible role of calcium in phospholipid synthesis of *Microsporum gypseum* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1215. – P. 337–340.
64. *Sadakane Y., Nakashima H.* Light-induced phase shifting of the circadian conidiation rhytm is inhibited by calmodulin antagonists in *Neurospora crassa* // *J. Biol. Rhythms.* – 1998. – V. 13. – P. 452–460.
65. *Silverman-Gavrila L.B., Lew R.R.* An IP_3 -activated Ca^{2+} channel regulates fungal tip growth // *J. Cell Sci.* – 2002. – V. 115, No 24. – P. 5013–5025.

66. Rao J.P., Reena G., Subramanyam C. Calmodulin-dependent protein phosphorylation during conidial germination and growth of *Neurospora crassa* // Mycol. Res. – 1997. – V. 101, No 12. – P. 1484–1488.
67. Roncal T., Ugalde U.O., Irastorza A. Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclosporium*: calcium triggers cytosolic alkalinization at the hyphal tip // J. Bacteriol. – 1993. – V. 175. – P. 879–889.
68. Rivera-Rodriguez N., Rodriguez-Del Valle N. Effects of calcium ions on the germination of *Sporothrix schenckii* conidia // J. Med. Vet. Mycol. – 1992. – V. 30. – P. 185–195.
69. Parton R.M., Read N.D. Calcium and imaging in living cells // Light Microscopy in Biology / Ed. A.J. Lacey. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1999. – P. 211–264.
70. Read N.D., Shacklock P.S., Knight M.R., Trewavas A.J. Imaging calcium dynamics in living plant cells and tissues // Cell Biol. Int. – 1993. – V. 17. – P. 111–125.
71. Knight H., Trewavas A.J., Read N.D. Confocal microscopy of living fungal hyphae microinjected with Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes // Microbiol. Res. – 1993. – V. 97. – P. 1505–1515.
72. Read N.D., Allan W.T.G., Knight H., Knight M.R., Malho R., Russell A., Shacklock P.S., Trewavas A.J. Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal cells // J. Microbiol. – 1992. – V. 166. – P. 57–86.
73. Knight M.R., Read N.D., Campbell A.K., Trewavas A.J. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins // J. Cell Biol. – 1993. – V. 121. – P. 83–90.
74. Cobbold P.H., Rink T.J. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium // Biochem. J. – 1987. – V. 248. – P. 313–328.
75. Knight M.R., Smith S.M., Trewavas A.J. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 4967–4971.
76. Nelson G., Kozlova-Zwinderman O., Collis A.J., Knight M.R., Fincham J.R., Stanger C.P., Renwick A., Hessing J.G., Punt P.J., van den Hondel C.A., Read N.D. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin // Mol. Microbiol. – 2004. – V. 52, No 5. – P. 1437–1450.
77. Miller A.J., Karplus E., Jaffe L.F. Imaging [Ca²⁺]_i with aequorin using protein imaging detector // Methods Cell. Biol. – 1994. – V. 40 – P. 305–338.
78. Nakajima-Shimada J., Lida H., Tsuji F.I., Anraku Y. Galactose-dependent expression of the recombinant Ca²⁺-binding photoprotein aequorin in yeast // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1991. – V. 174. – P. 115–122.
79. Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. Recombinant aequorin as a probe for cytosolic free Ca²⁺ in *Escherichia coli* // FEBS Lett. – 1991. – V. 282. – P. 408–412.
80. Inouye S., Noguchi M., Sakaki Y., Takagi Y., Miyata T., Iwanaga S., Miyata T., Tsuji F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1985. – V. 82, No 10. – P. 3154–3158.
81. Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin // Biochem. J. – 1986. – V. 234, No 2. – P. 271–277.
82. Shimomura O., Musicki B., Kishi Y. Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration // Biochem. J. – 1988. – V. 251, No 2. – P. 405–410.
83. Shimomura O., Musicki B., Kishi Y., Inouye S. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium // Cell Calcium. – 1993. – V. 14, No 5. – P. 373–378.

84. *Prasher D., McCann R.O., Cormier M.J.* Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – V. 126, No 3. – P. 1259–1268.
85. *Rizzuto R., Drini M., Pizzo P., Murgia M., Pozzan T.* Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells // *Current Biol.* – 1995. – V. 5. – P. 635–642.
86. *Campbell A.K., Trewavas A.J., Knight M.R.* Calcium imaging shows differential sensitivity to cooling and communication in luminous transgenic plants // *Cell Calcium.* – 1996. – V. 19, No 3. – P. 211–218.
87. *Callaham D.A., Hepler P.K.* Measurements of free calcium in plant cells // *Cellular Calcium: A Practical Approach* / Eds. J.G. McCormack, P.H. Cobbold. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1991. – P. 383–412.
88. *Kendall J.M., Badminton M.N., Salanewby G.B., Campbell A.K., Rembold C.M.* Recombinant apoaequorin acting as a pseudoluciferase reports micromolar changes in the endoplasmic-reticulum free Ca^{2+} of intact cells // *Biochem. J.* – 1996. – V. 318. – P. 383–387.
89. *Nakajima-Shimada J., Tsuji F.I., Anraku Y.* Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin *cdna* expression system // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88. – P. 6878–6882.
90. *Cui J., Kaandorp J.A., Ositelu O.O., Beaudry V., Knight A., Nanfack Y.F., Cunningham K.W.* Simulating calcium influx and free calcium concentrations in yeast // *Cell Calcium.* – 2009. – V. 45, No 2. – P. 123–132.
91. *Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barceló A., Ariño J.* Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, No 42. – P. 43614–43624.
92. *Jung D.W., Bradshaw P.C., Litsky M., Pfeiffer D.R.* Ca^{2+} transport in mitochondria from yeast expressing recombinant aequorin // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 324, No 2. – P. 258–268.
93. *Shaw B., Read N.D., Turgeon B.G., Hoch H.C.* Expression of recombinant aequorin as an intracellular calcium reporter in the phytopathogenic fungus *Phyllosticta ampepicilida* // *Fungal. Genet. Biol.* – 2001. – V. 34, No 3. – P. 207–215.
94. *Frazier L.N., Moore D.* Antagonists and inhibitors of calcium accumulation do not impair perception though they adversely affect the gravity responses of *Coprinus cinereus* stipes // *Mycolog. Res.* – 1993. – V. 97. – P. 1113–1118.
95. *Hoshino T., Mizutani A., Shimizu S., Hidaka P.* Calcium-ion regulates the release of *Fusarium oxysporium* // *J. Biochem.* – 1991. – V. 110. – P. 457–461.
96. *Arora D.S., Ohlan D.* In vitro studies on antifungal activity of tea (*Cammelia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) against wood-rotting fungi // *J. Basic Microbiol.* – 1997. – V. 37. – P. 159–165.
97. *Okorokov L.A., Dos Santos Silva R., Kuranov A.Ju., Kuranova E.V.* Ca^{2+} -transporting ATPase(s) of the reticulum type in intracellular membranes of *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical identification // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – V. 146, No 1. – P. 39–46.
98. *Silverman-Gavrila L.B., Lew R.R.* Regulation of the tip-high Ca^{2+} -gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa* // *Eur. J. Cell Biol.* – 2001. – V. 80, No 6. – P. 379–390.
99. *Corzo A., Sanders D.* Inhibition of Ca^{2+} uptake in *Neurospora crassa* by La^{3+} : a mechanistic study // *J. Gen. Microbiol.* – 1992. – V. 138, No 9. – P. 1791–1795.
100. *Gibbon B.C., Kropf D.L.* Cytosolic pH gradients associated with tip growth // *Science.* – 1994. – V. 263. – P. 1419–1421.

101. *Dicker J.W., Turian G.* Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild-type and the “frost” and “spray” morphological mutants of *Neurospora crassa* // *J. Gen. Microbiol.* – 1990. – V. 136. – P. 1413–1420.
102. *Magalhaes D.P., Wayne R., Humber R.A., Shields E.J., Roberts D.W.* Calcium-regulated appressorium formation of the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* // *Protoplasma.* – 1991. – V. 160. – P. 77–88.
103. *Koltin K., Day R.P.* Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins // *Appl. Microbiol.* – 1975. – V. 30. – P. 694–696.
104. *Gage M.J., Bruenn J., Fischer M., Sander D., Smith T.J.* KP₄ fungal toxin inhibits growth in *Ustilago maydis* by blocking calcium uptake // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 41. – P. 775–785.
105. *Gu F., Khimani A., Rane S.G., Flurkey W.H., Bozarth R.F., Smith T.J.* Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca²⁺ channel inhibitor // *Structure.* – 1995. – V. 3, No 8. – P. 805–814.
106. *Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г., Ник Рид, Эль-Регистан Г.И.* Анализ Ca²⁺-ответа мицелиальных грибов на внешние воздействия с использованием рекомбинантного экворина // *Микробиол.* – 1994. – Т. 73, № 6. – С. 734–740.
107. *Pfeiffer R.D., Reed P.W., Lardy H.A.* Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes // *Biochem.* – 1974. – V. 13, No 19. – P. 4007–4014.
108. *Bauer C.S., Simonis W., Schoenknecht G.* Different xanthines cause membrane potential oscillations in a unicellular green alga pointing to a ryanodine/cADPR receptor Ca²⁺-channel // *Plant Cell Physiol.* – 1999. – V. 40, No 4. – P. 453–456.

Поступила в редакцию
31.01.09

Козлова Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: o.kozlova@gmail.com

Егоров Сергей Юрьевич – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Куприянова-Ашина Флера Гарифовна – доктор биологических наук, профессор НИЛ ББФ при кафедре микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Flera.Ashina@ksu.ru