

УДК 582.282.22

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО И КАЛЬЦИЕВОГО ОТВЕТОВ *ASPERGILLUS AWAMORI* НА ДЕЙСТВИЕ КАЛЬЦИЙ-МОДУЛЯТОРОВ

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

### Аннотация

На модели штамма *Aspergillus awamori* 66A с рекомбинантным  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым фоточувствительным белком-экворинном изучено изменение скорости ветвления гифов от проростковой трубочки микромицета в ответ на стрессовые воздействия (повышение уровня  $\text{CaCl}_2$  в среде, гипоосмотический и механический шок), индуцирующие «кальциевые всплески» в цитозоле. Исследовано влияние ряда фармакологических препаратов, ингибирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальные системы, на разрастание колоний и интенсивность спорообразования мицелиального грибка *A. awamori*. Обнаружено, что  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты ( $\text{La}^{3+}$  и ВАРТА) в высоких концентрациях (20 и 5 мМ соответственно) подавляют рост колоний и спорообразование у *A. awamori*, в отличие от  $\text{KР}_4$ , не влияющего на параметры роста культуры микромицета.

**Ключевые слова:** стрессовые воздействия, микромицеты *Aspergillus awamori* 66A, ветвление гифов, фармакологические препараты,  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты ( $\text{La}^{3+}$  и ВАРТА).

### Введение

В концепции о значении вторичных посредников в регуляции клеточного метаболизма особое место отводится универсальной роли кальция, функции которого в качестве мессенджера заключаются в трансдукции различных внешних стимулов в клетках про- и эукариот [1, 2]. Есть сведения, что в ряду биологически важных элементов клетки (S, P, Ca, K) удельное содержание  $\text{Ca}^{2+}$ , имеющего функции универсального клеточного эффектора и стабилизатора биомакромолекул и мембран, существенно меняется в зависимости от физиологического возраста культуры, а соотношения Ca/K и P/S служат показателем особенностей элементного состава активно метаболизирующих клеток, покоящихся и нежизнеспособных форм [3]. В литературе мало такого рода исследований на клетках микромицетов, несмотря на то, что эти организмы отличаются лабильностью реагирования на стрессовые воздействия и могут служить хорошей моделью для изучения регуляторной роли  $\text{Ca}^{2+}$  в клеточной адаптации. Имеются единичные сообщения относительно влияния  $\text{Ca}^{2+}$  на рост и развитие мицелиальных грибов. Показано участие кальция в процессах роста окончаний гифов и ветвления мицелия плесневого гриба [4, 5]. Имеются единичные сообщения о том, что некоторые ингибиторы активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (верапамил), индуцирующие изменение пула  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, угнетают процессы разветвления и роста гифов у *N. crassa* и *B. cinerea* [6]. С учетом указанных известных данных представляется интересным исследовать влияния изменений пула

внутриклеточного кальция на характер роста и развития культуры плесневых грибов. Ранее на клетках мутантного штамма *Aspergillus awamori* 66A с рекомбинантным  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым фоточувствительным белком – экворином – нами был проведен анализ  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа на различные стимулы [7]. По величине времени подъема и релаксации амплитуды люминесценции эквориона было установлено, что стрессовый ответ клеток микромицета на внешние воздействия (гипоосмотический и механический шок повышение уровня внеклеточного кальция, действие  $\text{Ca}^{2+}$ -блокаторов) характеризуется повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле.

Целью настоящей работы является определение роли «кальциевых вспышек», индуцированных внешними стимулами, в регулировании физиологических процессов, включающих ветвление гифов, рост колоний и спорообразование культуры *Aspergillus awamori*.

### 1. Условия эксперимента

Объектом исследования был штамм *Aspergillus awamori* 66A, являющийся мутантом с экспрессированным фотобелком – экворином [8], полученный из лаборатории исследования клеток микромицетов Эдинбургского университета.

Культивирование *A. awamori* 66A осуществляли при 30 °С в жидкой среде Вогеля [9], инокулированной спорами, для получения которых использовали обогащенную жидкую среду с добавлением глюкозы (ОСГ) [8]. Выращивание культуры *A. awamori* 66A на плотной среде (2%-ный агар) проводили в чашках Петри, засеянных суспензией дегидратированных спор и выдержанных в темноте (30 °С) в течение 8 дней. После этого в 0.8%-ный раствор NaCl собирали суспензию конидий с конидиеносцев микромицета, размешивали, центрифугировали (15 мин, 3000 об/мин). Выпавшие в осадок споры дважды отмывали 0.8%-ным раствором NaCl и хранили в этом растворе при 4 °С.

Физико-химические методы воздействия на рост культуры микромицета, индуцирующие  $\text{Ca}^{2+}$ -вспышки в цитозоле, описаны ранее [7].

Блокаторы  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов:  $\text{LaCl}_3$  – ингибитор притока  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки *Neurospora crassa* [10, 11]; ВАРТА – 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетраацетатная кислота) – хелирует  $\text{Ca}^{2+}$  – ингибитор гипоосмотического шока у *Saccharomyces cerevisiae* [12] и  $\text{KR}_4$  – единственный, пока известный, специфичный для микромицетов ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, продуцируемый *Ustilago maydis* [13]. При этом  $\text{LaCl}_3$  растворяли в дистиллированной воде и полученный основной раствор стерилизовали при помощи фильтра (Nalgene), чтобы избежать изменений его во время автоклавирования. Плохо растворимый в воде ВАРТА добавляли в определенных концентрациях в среду Вогеля и затем автоклавировали. При работе с  $\text{KR}_4$  необходимое количество основного раствора добавляли в среду после ее автоклавирования. Контрольные препараты включали растворитель в соответствующей концентрации.

Скорость прорастания спор и ветвления гифов мицелия *A. awamori*, подвергнутых воздействию физико-химических факторов, определяли после выращивания культуры в жидкой среде Вогеля на покровном стекле в течение 24 ч при 30 °С. В каждой капле среды (50 мкл) концентрация спор составляла от 500

до 500000 спор/мл. Количество ветвей, образующихся из одной проростковой трубочки от каждой споры, подсчитывали в 75 полях зрения микроскопа.

Влияние блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на разрастание ветвления гифов анализировали при выращивании культуры *A. awamori* в плотной среде Вогеля, на поверхности которой помещали стерильный целлофан (диаметр – 8.5 см), инокулированный суспензией спор. После инкубации 24 ч при 30 °С целлофан переносили в плотную среду, содержащую исследуемое вещество. Через каждый час инкубации (30 °С) отбирали пробы культуры путем отделения их скальпелем вместе с целлофаном на покровное стекло и анализировали с помощью темнопольного микроскопа.

Воздействие  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонистов на рост микромицета и спорообразование регистрировали в результате выращивания культуры в чашках Петри на агаризованной среде Вогеля. Для этого на поверхность агара помещали фильтровальную бумагу диаметром 8.5 см (Wahntman International Ltd, Англия), в центр которой устанавливали специальный диск диаметром 6 мм (Schleicher & Schuell, Дассел, Германия), пропитанный споровой суспензией ( $5 \cdot 10^5$  спор/мл). Через 24 ч выращивания при 30 °С фильтровальную бумагу вместе с диском снимали с поверхности среды Вогеля и помещали в плотную среду, содержащую исследуемые фармакологические препараты. Через каждые 24 ч в течение 8 дней определяли рост колонии по величине диаметра колонии микромицета. Уровень спорообразования измеряли по плотности суспензии конидий, собранных с конидиеносцев, которую определяли в гемоцитометре после 10-кратного разбавления.

Морфология гифов мицелия *A. awamori* определялась с использованием красителя FM4064 (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, США.) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. С этой целью плотную среду Вогеля засеивали спорами *A. awamori*, инкубировали 24 ч при 30 °С, после чего содержащие мицелий кусочки агара (размером  $1 \times 0.8$ ) вырезали из среды и помещали в перевернутом виде на среду, содержащую исследуемый фармакологический препарат. В контроле кусочки агара помещали на среду Вогеля с растворителем препарата. По истечении 30 мин и далее через каждый час осуществляли конфокальную микроскопию с помощью системы Bio-Rad MRC600, оснащенной ионным лазером Argon, мощностью 25 мВ, которая была установлена на темнопольном микроскопе Nikon Diaphot TMD.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием построения доверительных интервалов ( $x + 2s$ ). 95%-ные доверительные интервалы для долей строили биномиальным распределением.

## 2. Результаты и обсуждение

Для определения начала ветвления гифов, идущих от главной проростковой трубочки, культуру *A. awamori* выращивали в жидкой среде Вогеля. При этом важно было подобрать исходную плотность суспензии спор, чтобы избежать их склеивания и образования сложной сети переплетенного мицелия в процессе роста микроколоний. Из четырех протестированных концентраций спор ( $5 \cdot 10^2$  –  $5 \cdot 10^5$  в 1 мл инокулята) оптимальной явилась плотность взвеси, соответствующая  $5 \cdot 10^4$  спор/мл, когда через 24 ч культивирования наблюдались

Табл. 1

Влияние различных физико-химических стимулов на ветвление гифов мицелия *A. awamori*

Время после стимуляции	Контроль	Механическое воздействие	Гипоосмотический шок	Добавление 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
1-й ч	1.13 ± 0.05	1.16 ± 0.05	1.16 ± 0.05	1.16 ± 0.05
3-й ч	1.46 ± 0.08	1.44 ± 0.07	1.37 ± 0.08	1.47 ± 0.16
5-й ч	1.59 ± 0.10	1.59 ± 0.08	1.49 ± 0.14	1.48 ± 0.08
7-й ч	1.96 ± 0.12	1.92 ± 0.14	1.72 ± 0.9	1.6 ± 0.08

отдельные микроколонии гриба с проростковой трубочкой и идущими от нее еще 1–2 трубочками на много короче первой. При воздействии на 24-часовую культуру *A. awamori* таких физико-химических факторов, как механический и гипоосмотический шок, повышение уровня кальция в среде за счет добавления 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, ветвление гифов мицелия анализировали по числу ветвей, образующихся от проростковой трубочки в течение 7 ч после действия на культуру. Было установлено, что при всех вариантах воздействия количество разветвлений от проростковой трубочки со временем возрастало, но незначительно ( $P < 0.05$ ) в сравнении с контролем (табл. 1).

Анализ морфологии гифов микромицета методом конфокальной микроскопии после выращивания *A. awamori* на агаризованной среде Вогеля не выявил существенных изменений мицелия при всех трех видах стрессового воздействия на культуру.

Постановка вышеописанных экспериментов представляется логичной и целесообразной, особенно если учесть, что даже незначительные изменения пула Ca<sup>2+</sup> способны активировать самые разнообразные сигнальные процессы [14], в том числе сопряженные с изменениями физиологии микробных культур. Это интересно в связи с тем, что в ранее проведенной работе мы установили временное увеличение содержания Ca<sup>2+</sup> в клетках *A. awamori*, индуцированное теми же внешними факторами [7]. При этом содержание внутриклеточного кальция в ответ на механическое воздействие, гипоосмотический шок и высокие концентрации экзогенного кальция быстро (через 1–5 мин) возвращалось к норме, что не противоречит данным литературы о необходимости поддержания Ca<sup>2+</sup> в клетке на низком уровне для нормального фосфатного метаболизма [2].

Контролем служили культуры, не подвергавшиеся никакому воздействию. Результаты представляют собой среднее ± стандартное отклонение  $n = 75$ . Статистические данные показали отсутствие существенной разницы при 5%-ном уровне достоверности между исследуемыми культурами в определенный момент времени.

С учетом выявленных изменений в содержании внутриклеточного кальция при воздействии на микромицет экзогенного Ca<sup>2+</sup>, нами был проведен более детальный анализ влияния на рост колоний и спорообразование *A. awamori* CaCl<sub>2</sub> в зависимости от его содержания в среде (0.5 и 5 мМ). Как оказалось, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, как и в контроле, не оказывал влияния на рост колоний и спорообразование *A. awamori*. Вместе с тем CaCl<sub>2</sub> в концентрации 5 мМ, не вызывая изменений в интенсивности спорообразования, стимулировал рост колоний,

Табл. 2

Влияние экзогенного CaCl<sub>2</sub> на рост колоний *A. awamori*

Время после воздействия, час	Контроль	Воздействие CaCl <sub>2</sub>		Стимуляция, % 5.0 мМ CaCl <sub>2</sub>
		0.5 мМ	5.0 мМ	
24-й	0	0	0	0
48-й	2.5 ± 0.08	2.5 ± 0.07	2.6 ± 0.06	0
72-й	6.0 ± 0.07	6.0 ± 0.08	7.0 ± 0.09	0
96-й	8.0 ± 0.11	8.0 ± 0.09	10.0 ± 0.10	12.5
120-й	13.0 ± 0.10	12.5 ± 0.11	15.0 ± 0.09	15.3
144-й	17.5 ± 0.13	18.0 ± 0.12	20.0 ± 0.11	11.6
168-й	22.5 ± 0.17	22.5 ± 0.19	28.5 ± 0.13	12.1
192-й	27.4 ± 0.19	27.5 ± 0.17	32.5 ± 0.13	11.9

Результаты представляют собой среднее ± стандартная ошибка.

Контроль – клетки подвергнуты механическому воздействию.

Стимуляция роста колонии в % по отношению к контролю, принятому за 100%.

Величина колоний дана в радиусах (мм).

повышая величину радиуса колонии микромицет через 96 ч после воздействия примерно на 12% в сравнении с контролем (табл. 2).

Сопоставляя результаты этого эксперимента с ранее полученными данными об изменении уровня Ca<sup>2+</sup> в зависимости от интенсивности (концентрации CaCl<sub>2</sub>) стрессового воздействия на клетки, определяемом с помощью рекомбинантного экворина, можно считать информативным характер амплитуды люминесценции, учитывающий ее величину, время подъема и релаксация. Для вариантов воздействия на *A. awamori* CaCl<sub>2</sub> в концентрации 5 мМ характерна была наибольшая величина амплитуды люминесценции при меньшем времени релаксации. В случае использования 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub> при низкой амплитуде люминесценции наблюдалась длительная релаксация [7]. Анализируя эти данные, можно видеть, что более высокая «кальциевая вспышка», индуцированная 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, коррелировала со стимулированием роста колонии микромицета в сравнении с контролем.

Существенно, что кальциевый ответ клетки на воздействие экзогенного кальция зависел не только от концентрации CaCl<sub>2</sub>, но и от физиологического возраста микромицета. Как было показано ранее [7], реакция клеток активнорастущих культур (24-й, 48-й час) на внесение в среду CaCl<sub>2</sub> была слабее, чем при воздействии CaCl<sub>2</sub> в этих же концентрациях на клетки стационарной культуры (72-й час). В клетках *A. awamori* поздней стационарной фазы (96-й час) Ca<sup>2+</sup>-ответ вновь уменьшался. Вероятнее всего, внутриклеточный Ca<sup>2+</sup> в стационарных клетках находится в связанном состоянии, выполняя функции стабилизатора клеточных биополимеров и надмолекулярных структур, и потому не определяется применяемым методом, что не противоречит данным литературы о присутствии Ca<sup>2+</sup> в покоящихся формах микроорганизмов в связанном состоянии [15, 16].

Таким образом, физико-химические стимулы, индуцирующие кратковременные «кальциевые вспышки» в клетках без сопутствующих изменений (возникновение вторичного кальциевого ответа) и потому не вызывающие серьезных

нарушений механизма гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках микромицетов, не оказывают существенного влияния на рост и развитие мицелиального гриба, что, однако, варьирует в зависимости от интенсивности стрессового воздействия и физиологического состояния культуры.

Следующей задачей настоящей работы было определение ветвления гифов мицелия, интенсивности роста колоний и спорообразования у *A. awamori*, подвергнутых воздействию фармакологическими препаратами, известными своей способностью влиять на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальные системы и (или) гомеостаз этих ионов внутри гифов мицелия. С этой целью в экспериментах тестировались  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{KP}_4$ , ВАРТА), способные ингибировать различные кальциевые каналы, что было показано на клетках животных и растений [17, 18]. При изучении влияния этих блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$  на рост культуры *A. awamori* препараты исследовали в концентрации  $\text{IC}_{50}$ , а также использовали и самые высокие концентрации, применявшиеся нами в люцинометрических экспериментах [7]. Вследствие ограниченного количества препарата  $\text{KP}_4$  наивысшая концентрация его при изучении влияния на рост гриба составила 5.4 мкМ. Самая высокая исследованная концентрация препарата ВАРТА составила 5 мМ, что было связано с его ограниченной растворимостью.

Разрастание колонии микромицета регистрировали через каждые 24 ч по величине диаметра колонии (радиус, мм) в течение 8 дней после переноса 24-часовой культуры плесневого гриба в агаризованную среду, содержащую исследуемые  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты. Влияние  $\text{LaCl}_3$ , известного блокатора кальциевых каналов L-типа, на рост культуры мицелиального гриба исследовали в двух концентрациях (10 и 20 мМ). При выращивании *A. awamori* в агаризованной среде с  $\text{LaCl}_3$ , добавленным в дозе 10 мМ наблюдалась стимуляция разрастания колонии, особенно четко выраженная по сравнению с контролем после 72 ч инкубации (табл. 3). Рост культуры в среде с  $\text{LaCl}_3$  в более высоких концентрациях (20 мМ) угнетался. Наиболее четко ингибирующее действие 20 мМ  $\text{LaCl}_3$  проявлялось после 120 ч, когда скорость разрастания колонии замедлялась на 23–30% в сравнении с контролем (табл. 3).

Механизм выявленного эффекта можно объяснить, анализируя данные литературы [10], согласно которым  $\text{La}^{3+}$  в низких концентрациях (до 5 мМ) вызывает деполяризацию мембран у *Neurospora crassa* и, как следствие, изменения ее функциональной активности. В результате поток  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму осуществляется как через мембрану цитоплазматическую, так и мембраны внутриклеточных резервуаров  $\text{Ca}^{2+}$ , то есть неспецифически. Показанная нами ранее [7] избирательность  $\text{Ca}^{2+}$ -ингибирующего действия  $\text{La}^{3+}$  на гипоосмотический шок и воздействие экзогенным  $\text{CaCl}_2$  свидетельствуют о более сложном характере воздействия на клетки микромицета высоких концентраций  $\text{La}^{3+}$ . Эффект заключается в том, что при концентрации 20 мМ лантан не только способствует уменьшению амплитуды люминесценции экворина у гриба, но и индуцирует возникновение вторичной  $\text{Ca}^{2+}$ -вспышки, соответствующей выходу  $\text{Ca}^{2+}$  из клеточных органелл. Помимо этого,  $\text{La}^{3+}$  при любой концентрации, превышающей 5 мМ, также вызывал превышение конечного уровня содержания  $\text{Ca}^{2+}$  над нормой [7]. В связи с изложенным можно предположить, что угнетение скорости роста колоний микромицета под действием высоких доз лантана обусловлено

Табл. 3

Влияние  $\text{LaCl}_3$  на скорость разрастания колоний микромицета *A. awamori*, культивируемого на плотной среде Вогеля

Время после воздействия, час	Контроль	Воздействие $\text{CaCl}_2$		Ингибция Стимуляция	
		10 мМ	20 мМ	20 мМ $\text{LaCl}_3$	10 мМ $\text{LaCl}_3$
24-й	0	0	0	0	0
48-й	$2.6 \pm 0.08$	$2.6 \pm 0.07$	$2.4 \pm 0.06$	1.0	0
72-й	$6.0 \pm 0.10$	$6.0 \pm 0.08$	$5.0 \pm 0.07$	17.0	0
96-й	$8.0 \pm 0.11$	$9.0 \pm 0.09$	$7.0 \pm 0.09$	13.0	12.5
120-й	$13.0 \pm 0.10$	$15.0 \pm 0.11$	$10.0 \pm 0.09$	14.0	15.3
144-й	$18.0 \pm 0.13$	$21.0 \pm 0.12$	$14.0 \pm 0.11$	23.0	11.6
168-й	$23.5 \pm 0.17$	$28.5 \pm 0.19$	$17.5 \pm 0.13$	25.6	12.1
192-й	$28.4 \pm 0.19$	$33.5 \pm 0.17$	$19.5 \pm 0.13$	31.5	11.9

Результаты представляют собой среднее  $\pm$  стандартная ошибка.

Контроль – клетки подвергнуты механическому воздействию.

Ингибция, стимуляция роста колонии в % по отношению к контролю, принятому за 100%.

Скорость разрастания колоний микромицета – радиус (мм).

нарушениями гомеостаза ионов кальция внутри гифов микромицета, сопряженными с изменением физиологического состояния клеток.

Дальнейшие исследования роста и развития *A. awamori* показали замедление процесса спорообразования у микромицета, что коррелирует с уменьшением скорости разрастания колоний приблизительно на 30%. Очевидно, угнетение роста и спорообразования у *A. awamori* возрастающими концентрациями лантана (20 мМ) можно объяснить токсичностью  $\text{LaCl}_3$  для клеток [10], обусловленной возникновением вторичной « $\text{Ca}^{2+}$ -вспышки», и сохранением длительного времени кальция в клетке на более высоком уровне, чем в норме.

Следующим  $\text{Ca}^{2+}$ -блокатором, использованным в экспериментах был  $\text{KP}_4$ , который, как было показано на примере *U. maydis*, действует аналогично хелаторам (EGTA) и ингибитору  $\text{Ca}^{2+}$ -канала ( $\text{Cd}^{2+}$ ) [19]. Отметим, что показатели  $\text{IC}_{50}$  для  $\text{KP}_4$  выражены в мкМ, в отличие от  $\text{IC}_{50}$  для  $\text{LaCl}_3$ , который дан в мМ. В этой связи представляется вполне вероятным, что  $\text{KP}_4$  проявляет более высокую специфичность для  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, чем  $\text{LaCl}_3$ . Тем не менее в результате воздействия на микромицет не было обнаружено заметного влияния этого препарата на скорость разрастания колоний и на спорообразование ни в одной из исследованных (0.4 и 5.4 мкМ) концентраций, хотя наши данные люминометрических опытов выявили способность  $\text{KP}_4$  в зависимости от дозы ингибировать кальциевый ответ на осмотический шок и внесение в среду высоких концентраций  $\text{CaCl}_2$ , что сопровождалось уменьшением амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$  вспышки и увеличением продолжительности периода восстановления  $\text{Ca}^{2+}$  до нормального уровня.

Под действием препарата ВАРТА (1 мМ) скорости разрастания колоний и образования спор у *A. awamori* не отличались от контроля, но при увеличении его концентрации до 5 мМ резко замедлялось разрастание колоний микромицета: через 24 ч скорость их роста составляла 25–30%, через 192 ч – 18–20% от контроля, принятого за 100%. Угнетение роста микромицета коррелирует со способностью ВАРТА ( $\text{Ca}^{2+}$ -хелатор) в дозе 5 мМ полностью ингибировать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ микромицета на механическое воздействие и осмотический шок [1].

Суммируя результаты, описанные в данной работе, можно сделать следующие выводы.

- Физико-химические методы воздействия (механическая стимуляция, гипосмотический шок и высокая концентрация внеклеточного  $\text{CaCl}_2$ ), которые вызывали кратковременные повышения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках микромицета, не оказывали влияния на скорость разрастания колоний, спорообразование и морфологию гифов.

- Такие  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонисты, как  $\text{La}^{3+}$  и препарат ВАРТА, ингибирующие кальциевый ответ микромицета на физико-химические стимулы, в высоких концентрациях ингибировали процессы спорообразования и роста колоний микромицета.

- Эффект подавления разрастания колоний микромицета и спорообразования мог быть обусловлен токсичностью высоких концентраций  $\text{La}^{3+}$  для клеток, обусловленной возникновением вторичной  $\text{Ca}^{2+}$ -вспышки, и сохранением длительного времени кальция в клетке на более высоком уровне, чем в норме.

### Summary

*O.V. Kozlova, S.U. Egorov, F.G. Kupriyova-Ashina.* Interrelation of Cellular and Calcium Responses of *Aspergillus awamori* to Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  modulators.

Using the culture of *Aspergillus awamori* 66A with the recombinant  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent photosensitive protein-aequorin, the cellular response to stressful influences (increasing the level of  $\text{CaCl}_2$  in a medium, hyposmotic and mechanic shock) connected with the insignificant increase of hyphae's branching from the sprout tubule of micromyces was studied. The influence on the growth of colonies and sporulation of *A. awamori* by a number of pharmacological preparations that stimulate or inhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -signal systems was also investigated. It was discovered that  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonists ( $\text{La}^{3+}$  and ВАРТА) in their high concentrations (20 and 5 mM) suppress the growth of colonies and sporulation of *A. awamori* in contrast to  $\text{K}_2\text{P}_4$  that has no influence on these parameters.

**Key words:** stressful influences, micromyces *Aspergillus awamori* 66A, hyphae's branching, pharmacological preparations,  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonists ( $\text{La}^{3+}$  and ВАРТА).

### Литература

1. *Rasmussen H., Barret P.Q.* Calcium messenger system an integrated view // *Physiol. Rev.* – 1984. – V. 64, No 1. – P. 938–984.
2. *Gadd G.M.* Signal transduction in fungi // *Gow N.A.R., Gadd G.M. (eds.) The Growing Fungus.* – London: Chapman & Hall, 1995. – P. 183–210.
3. *Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Козлова Ф.Н. и др.* Синтез аутоиндукторов анабиоза у неспорообразующих бактерий как механизм регуляции их активности в почве и подпочвенных осадочных породах // *Микробиол.* – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 620–628.
4. *Schmid J., Harold F.* Dual role for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa* // *J. Gen. Microbiol.* – 1988. – V. 134. – P. 2623–2631.
5. *Jackson S.L., Heath L.B.* Effects of exogenous calcium ions on tip growth, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, and actin arrays in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax* // *Experim. Mycol.* – 1989. – V. 13, No 1. – P. 1–12.
6. *Hudecova D., Varečka L., Vollek V., Betina V.* Growth and morphogenesis of *Botrytis cinerea*. Effects of exogenous calcium ions, calcium channel blockers and cyclosporin A // *Folia Microbiol.* – 1994. – V. 39, No 4. – P. 269–275.



7. Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г., Ник Рид, Эль-Регистан Г.И. Анализ  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа мицелиальных грибов на внешние воздействия с использованием рекомбинантного экворина // Микробиол. – 2004. – Т. 73, № 6. – С. 734–740.
8. Nelson G. Development of the recombinant aequorin method and its evaluation for calcium measurements in filamentous fungi: Ph.D. thesis. – Edinburgh: University of Edinburgh, 1999.
9. Vogel H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N) // Microbial. Gen. Bull. – 1956. – V. 51. – P. 107–124.
10. Corzo A., Sanders D. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in *Neurospora crassa* by  $\text{La}^{3+}$ : a mechanistic study // J. Gen. Microbiol. – 1992. – V. 138, No 9. – P. 1791–1795.
11. Gibbon B.C., Kropf D.L. Cytosolic pH gradients associated with tip growth // Science. – 1994. – V. 263. – P. 1419–1421.
12. Batiza A.F., Schulz T., Masson P.H. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271, No 38. – P. 23357–23362.
13. Koltin K., Day R.P. Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins // Appl. Microbiol. – 1975. – V. 30, No 4. – P. 694–696.
14. Sanders D., Brownlee C., Harper J. Communicating with calcium // Plant Cell. – 1999. – V. 11, No 4. – P. 691–706.
15. Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Лойко Н.Г., Сулима Н.Е., Дуда В.И., Воробьева Е.А., Эль-Регистан Г.И. Сравнительное изучение элементного состава вегетативных и покоящихся клеток микроорганизмов // Микробиол. – 2002. – Т. 71, № 1. – С. 37–48.
16. Феофилова Е.П. Биохимическая адаптация грибов к температурному стрессу // Микробиол. – 1994. – Т. 63, № 5. – С. 757–773
17. White P.J. Calcium channels in higher plants // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1465, No 1–2. – P. 171–189.
18. Johannes E., Brosnan J.M., Sanders D. Calcium channels and signal transduction in plant cells // BioEssays. – 1991. – V. 13. – P. 331–336.
19. 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, No 4. – P. 775–785.

Поступила в редакцию  
11.09.08

---

**Козлова Ольга Владимировна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [o.kozlova@gmail.com](mailto:o.kozlova@gmail.com)

**Егоров Сергей Юрьевич** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [Sergey.Egorov@ksu.ru](mailto:Sergey.Egorov@ksu.ru)

**Куприянова-Ашина Флера Гарифовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [Flera.Ashina@ksu.ru](mailto:Flera.Ashina@ksu.ru)