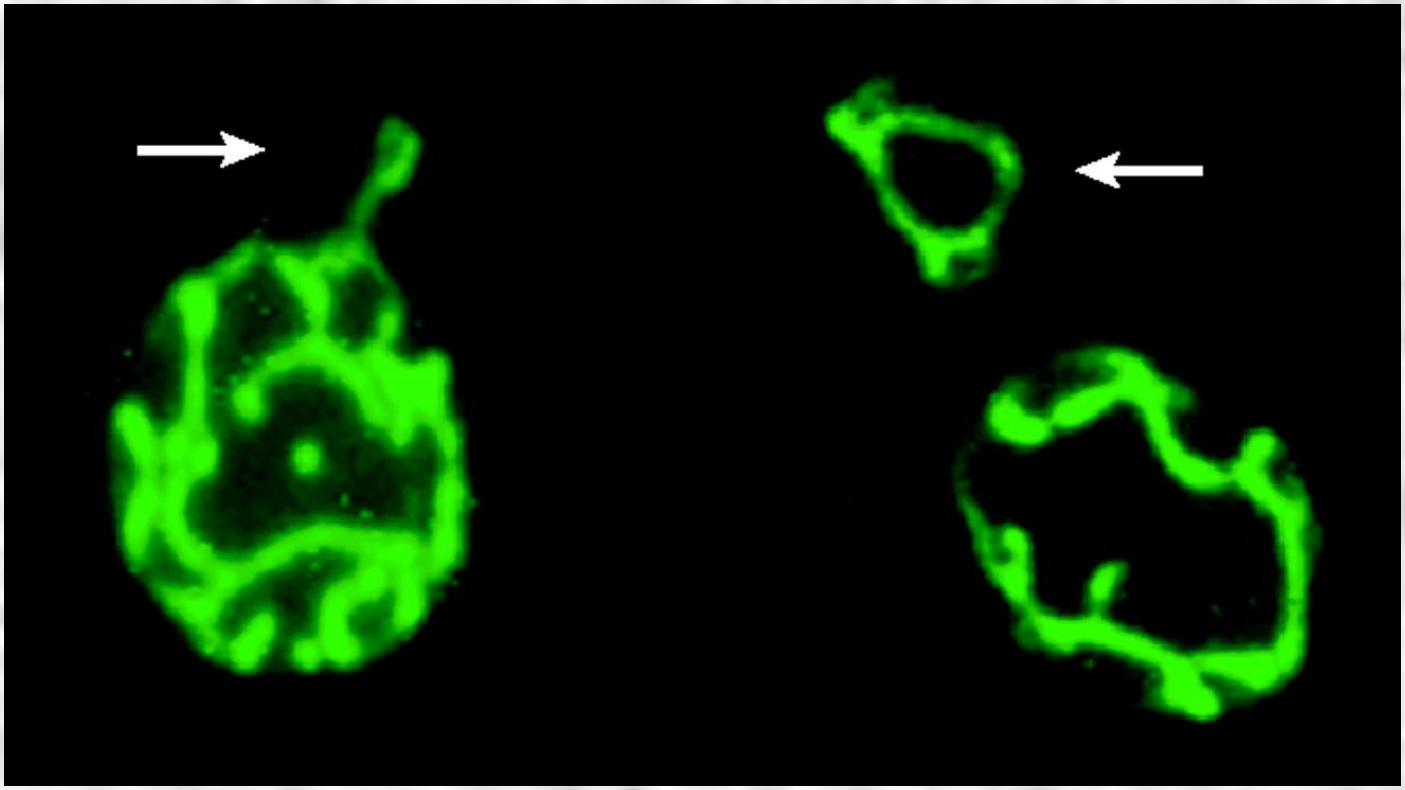
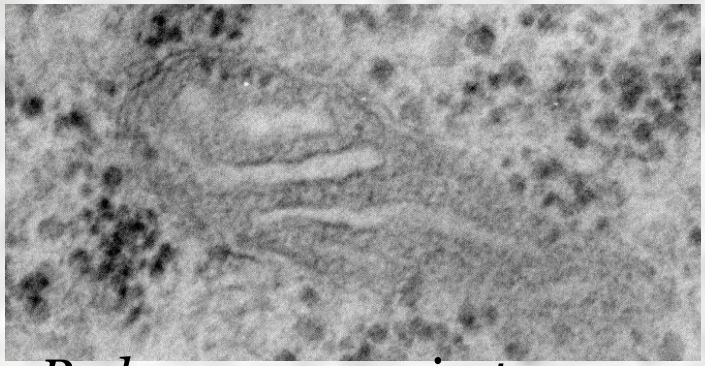
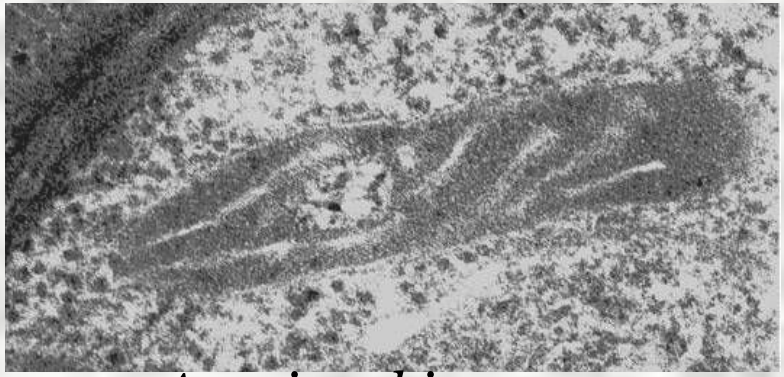
Митохондрии грибов





Podospora pauciseta



Agaricus bisporus

- Митохондрии (от греч. μίτος — нить и χόνδρος — зёрнышко, крупинка) - самовоспроизводящиеся полуавтономные двумембранные органоиды клетки, содержащие собственный геном. Митохондриальный геном в отличие от ядерного представляет собой одну или несколько кольцевых, редко линейных, молекул ДНК (мтДНК).

- Митохондрии характерны за малым исключением для всех эукариотических клеток, как аутотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных (животные, грибы) организмов. Митохондрий нет у некоторых облигатных анаэробных грибов, обитающих в желудке коров и других травоядных животных.

- Митохондрии это мультифункциональные полиморфные органеллы, выполняющие функции обеспечения жизнедеятельности клетки.
- Динамика изменения морфологии митохондрий позволяет адаптировать их активность к потребностям клеток во времени и пространстве.
- Митохондрии генерируют энергию окислительным фосфорилированием, играют ключевую роль в сборке железо-серного кластера [2Fe 2S], участвуют в промежуточном метаболизме, передаче кальциевых сигналов и апоптозе.

Функции митохондрий

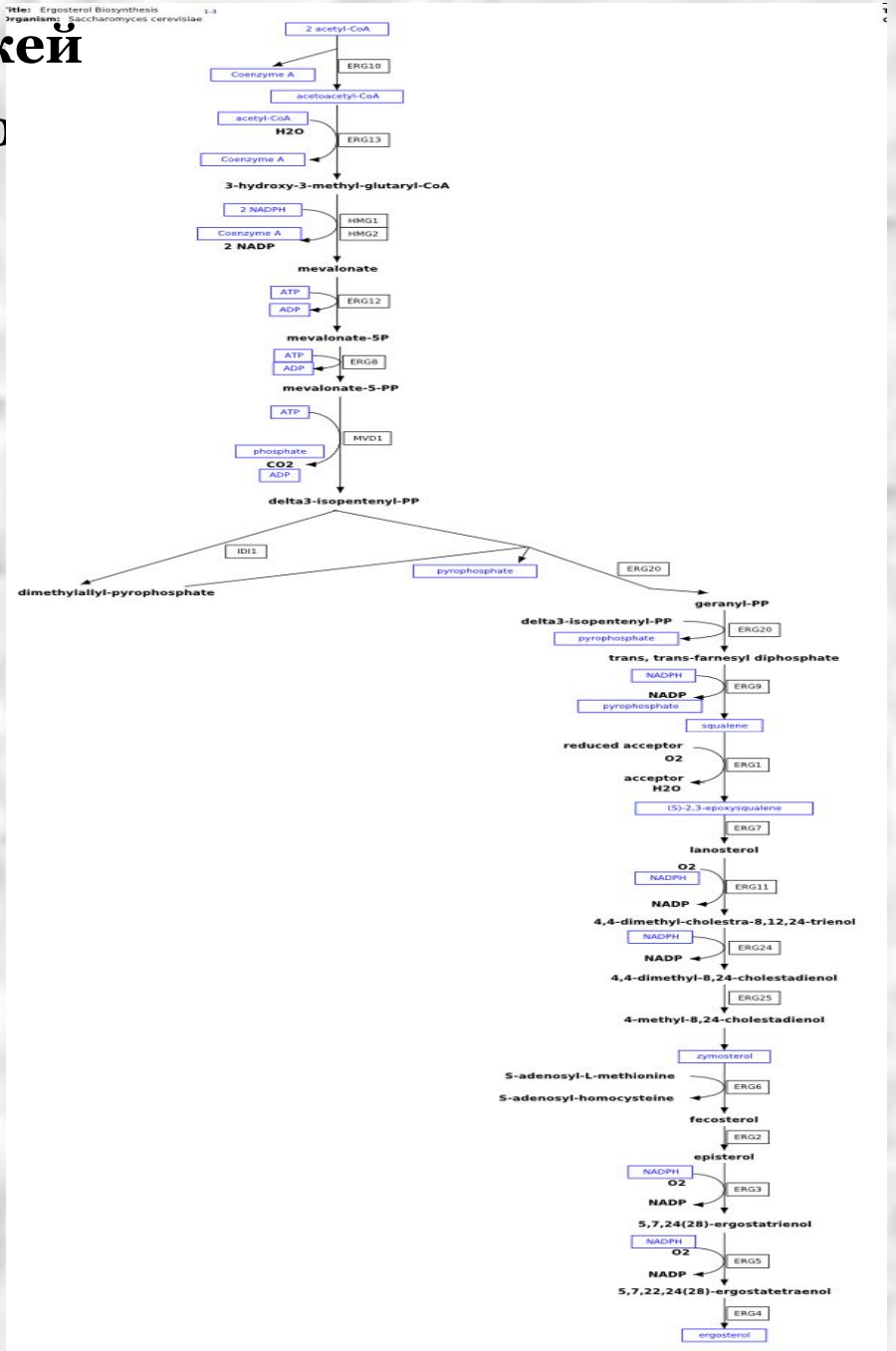
Основная функция митохондрий связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии в форме АТФ в процессе дыхания - основной энергетической единицы всего царства живого, поэтому митохондрии называют энергетическими станциями клетки.

Митохондрии дрожжей выполняют кроме основной, следующие функции (Feldmann, 2005):

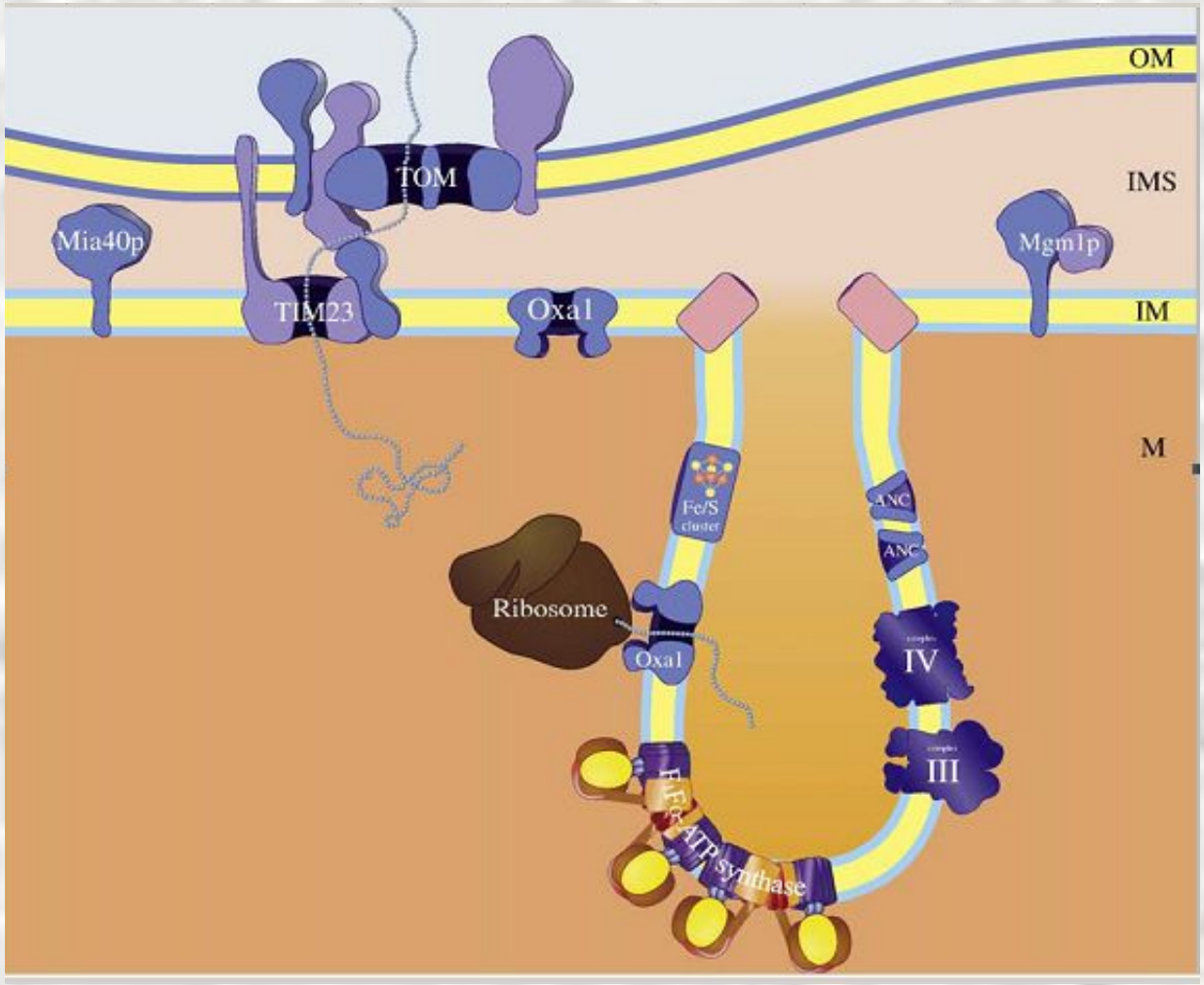
- Синтез и расщепление жирных кислот и липидов,
- биосинтез эргостеролов,
- ответ на стресс и адаптация к нему,
- локализация ферментов синтеза отдельных амино- и дикарбоновых кислот, пиримидиновых и пуриновых оснований, порфирина и птеридинов,
- мобилизация гликогена,
- продукция ароматических компонентов
- участие в апоптозе клетки.

Биосинтез эргостерола у дрожжей

Биосинтез эргостерола у дро



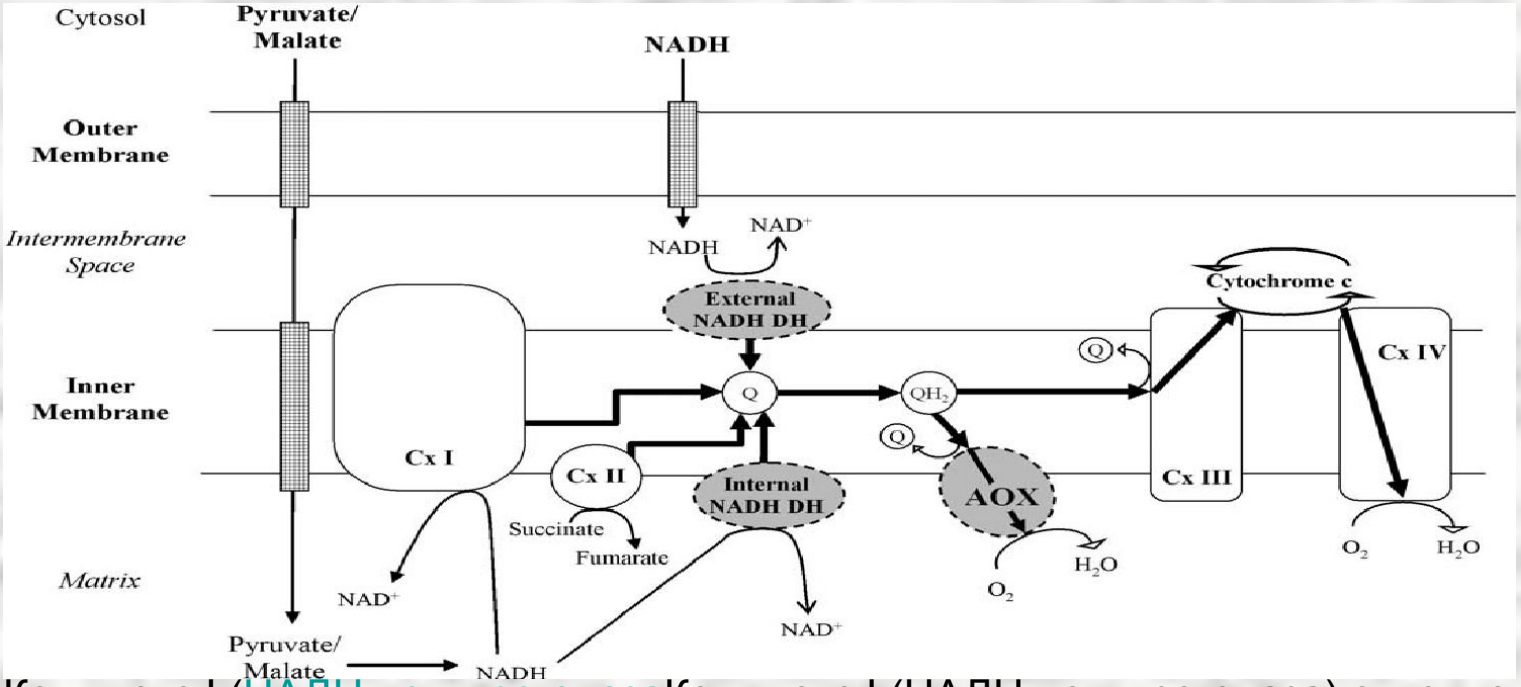
Субкомпартменты внутренней мембраны митохондрий
Митохондрии содержат около 800 белков/1500 у человека



Субкомпартментализация внутренней мембраны митохондрий. Распространение митохондриальных белков участвующих в нескольких главных процессах митохондрий определенных методами количественной иммуноцитохимии с использованием электронного микроскопа у *S. cerevisiae*.

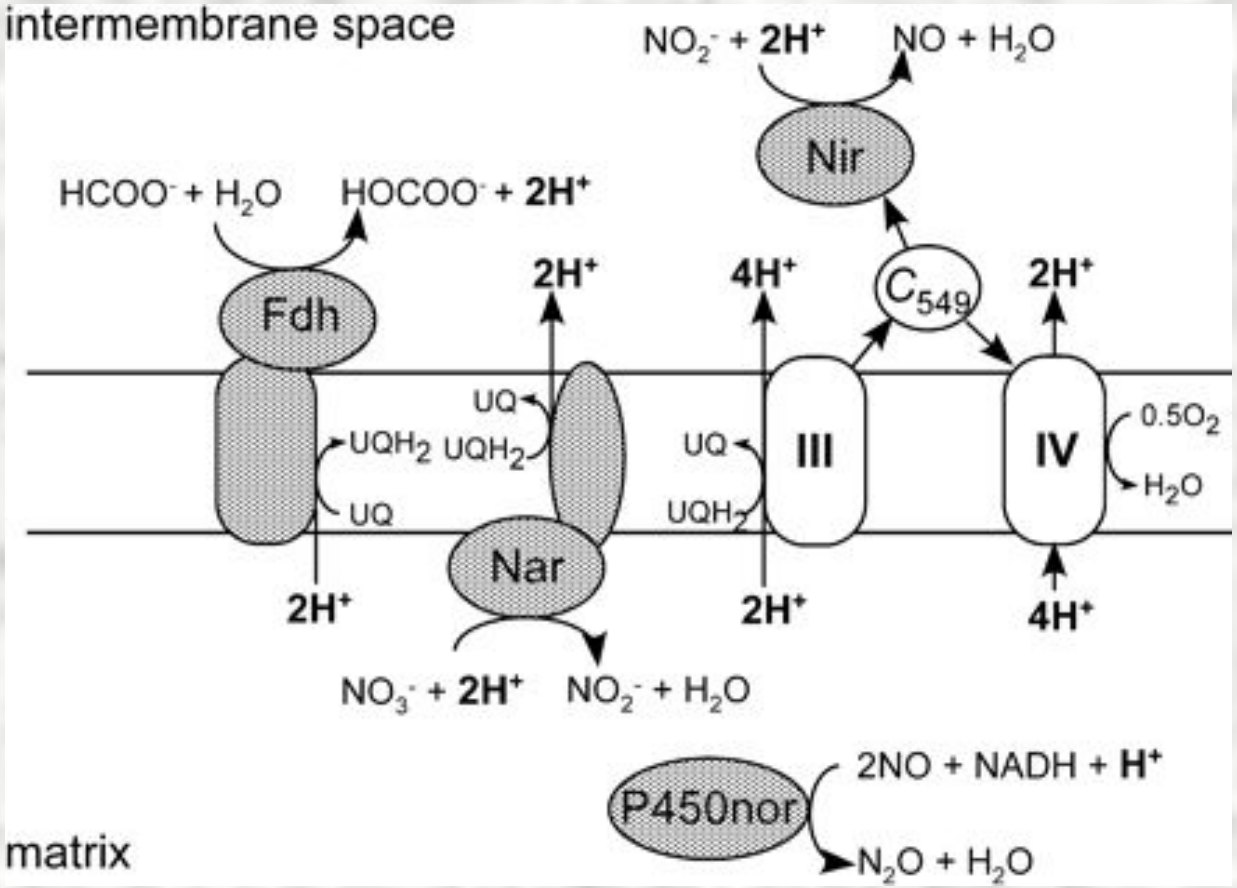
Белки внутренней мембраны вовлечены в слияние митохондрий (Mgm1p) или белок привязки (Mia40p, TIM23 комплекс) предпочтительно локализованных во внутренней мембране. Кроме белков, вовлеченных в окислительное фосфорилирование (ANC adenine nucleotide carrier protein, Complex III, Complex IV, F1FO-ATP синтаза) мембрана крист богата кластерами Fe/S.

Это распределение неравномерное и изменяющееся. Динамика перераспределения белков зависит о физиологического статуса клетки. CS-цитозоль; OM, наружная мембрана; IMS, межмембранное пространство; IM, внутренняя мембрана; M, пространство матрикса.Zicketal.,2009



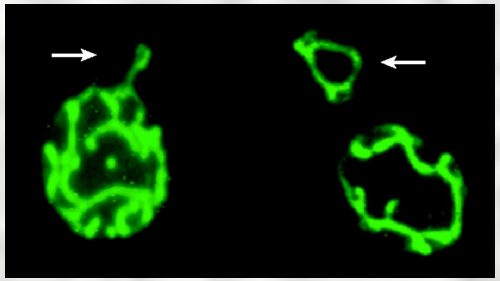
- Комплекс I (НАДН дегидрогеназаКомплекс I (НАДН дегидрогеназа) окисляет НАД·НКомплекс I (НАДН дегидрогеназа) окисляет НАД·Н, отбирая у него два электронаКомплекс I (НАДН дегидрогеназа) окисляет НАД·Н, отбирая у него два электрона и перенося их на растворимый в липидахКомплекс I (НАДН дегидрогеназа) окисляет НАД·Н, отбирая у него два электрона и перенося их на растворимый в липидах убихинон, который внутри мембраны диффундирует к комплексу III. Вместе с этим, комплекс I перекачивает 4 протона из матрикса в межмембранное пространство митохондрии. (*Podospora anserina*)
- Комплекс II (Сукцинат дегидрогеназаКомплекс II (Сукцинат дегидрогеназа) не перекачивает протоны, но обеспечивает вход в цепь дополнительных электронов за счёт окисления сукцината.
- Комплекс III (Цитохром bc1 комплексКомплекс III (Цитохром bc1 комплекс) переносит электроны с убихинола на два водорастворимых цитохрома c, расположенных на внутренней мембране митохондрии. Убихинол передаёт 2 электрона, а цитохромы за один цикл переносят по одному электрону. При этом туда также переходят 2 протона убихинола и 2 перекачиваются комплексом.
- Комплекс IV (Цитохром c оксидаза) катализирует перенос 4 электронов с 4

Гипотетическая модель гибридной дыхательной системы у *Fusarium oxysporum*.



Nar – нитратредуктаза
Nir - нитритредуктаза

- Первые наблюдения митохондрий у гриба *Pustularia versispora (Tarzetta catinus)* относятся к 1911 году, несколько позже описаны митохондрии у дрожжей. С 1938 года по 1950 год в печати вышла серия работ русского ученого М.Н. Мейселя по изучению функциональной морфологии дрожжевых организмов, в которых большое внимание было уделено структуре и функциям митохондрий.



Методы наблюдения митохондрий у грибов

- Флуоресцентные (потенциалзависимые красители или встраивание GFP плазмиды в геном митохондрий)
- Методы иммуноцитохимии с последующим наблюдением в световом или электронном микроскопе

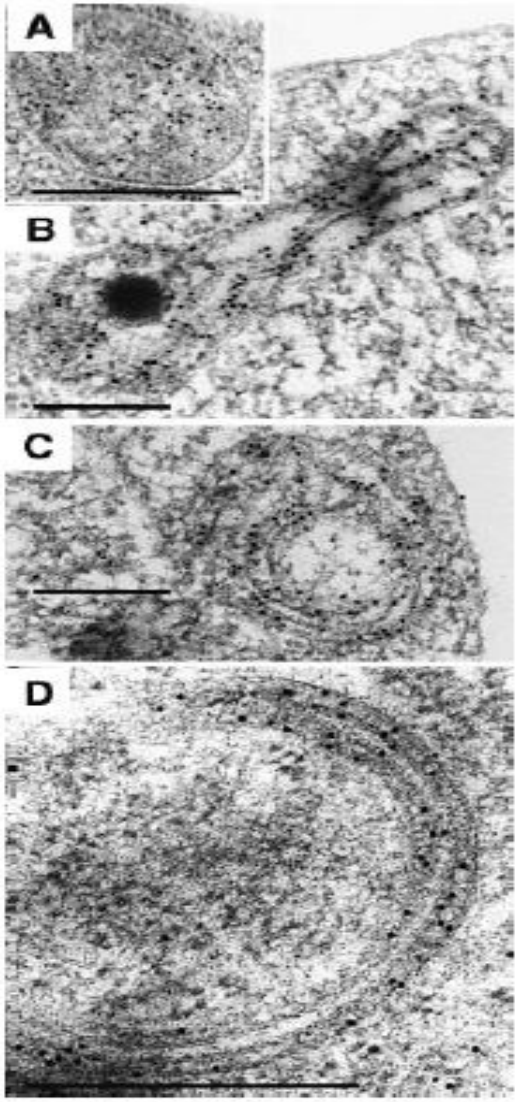


Fig. 5. Immunological detection in yeast cells of β-subunit of yeast ATP synthase Immunogold electron microscopy was carried as described in Materials and methods. The pictures are representative of experiments performed with wild-type (A) and *ΔATP20* (B–D) cells. Bars indicate 0.5 μm.

Методы иммуноцитохимии (ТЭМ)

Морфология и распределение хондриома в клетке

определяется следующими факторами:

- положением клеток в колонии
- условиями культивирования
- стадией жизненного цикла

и т.д.

Совокупность митохондрий в клетке – хондриом.

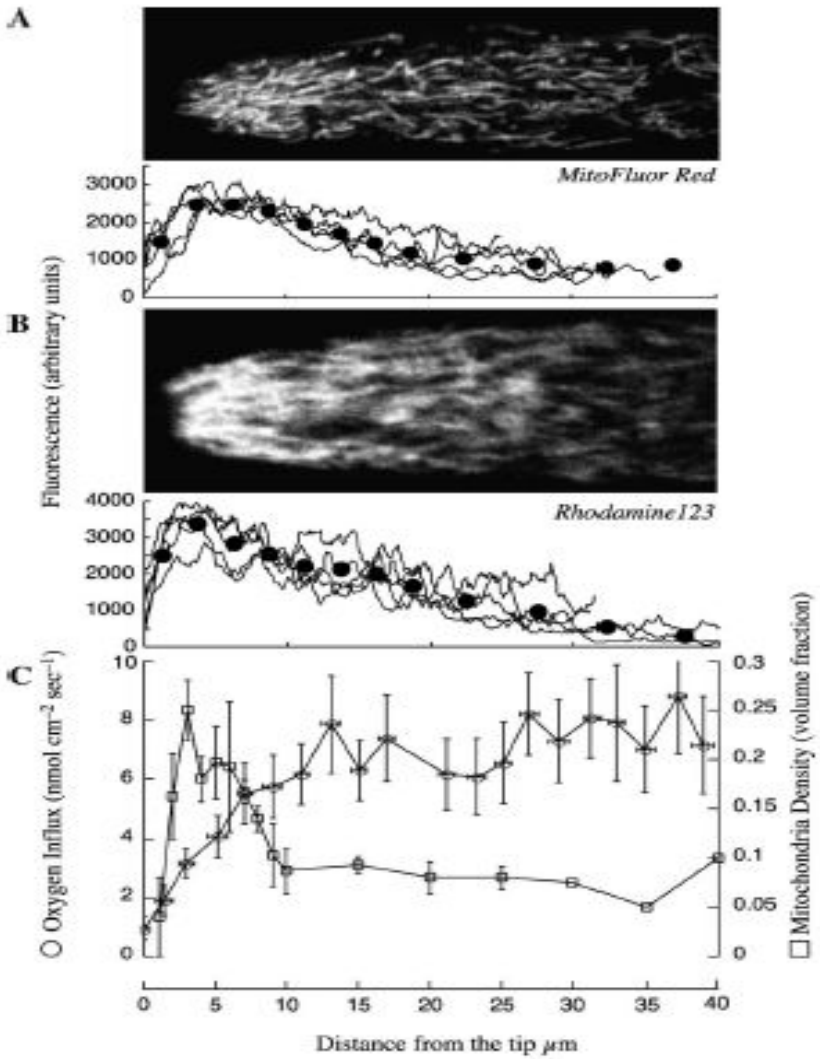


Fig. 1. Tip-localized mitochondria and respiratory activity along growing hyphae. (A) MitoFluor Red fluorescence imaging of mitochondria in a growing hyphae and quantitative fluorescence intensity transects (see Section 2.6). (B) Rhodamine 123 fluorescence imaging of mitochondria in a growing hyphae and quantitative fluorescence intensity transects. (C) Mitochondrial densities from electron micrographs (squares) and oxygen influx measurements (circles) to show that the tip-localized mitochondria do not respire (data are re-drawn from Lew, 1999 and Lew and Levina, 2004).

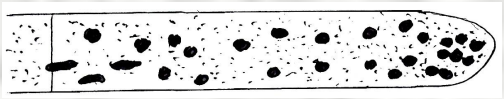
Локализованные в апикальном кончике мицелия митохондрии (до 50 мкм) у ***Neurospora crassa*** возможно участвуют в устранении излишних ионов Ca2+, они не обладают дыхательной активностью и не образуют АТФ. При этом они связываются с флуорохромами специфичными к кальцию (Levina, Lew, 2005)

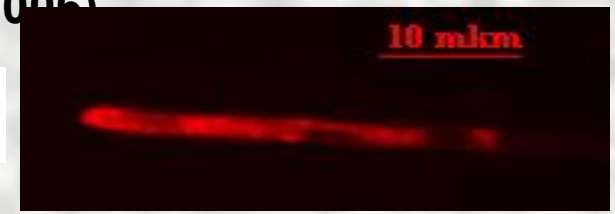
Распределение и морфология митохондрий у мицелиальных грибов

Типы распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus* (Матросова, 2006)

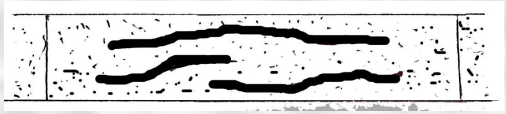
Тип 1.
Характерен для:
- Мицелия возрастом 7 суток на средах СА и КГА;
- Глубинного мицелия штаммов вида *A. bitorquis*

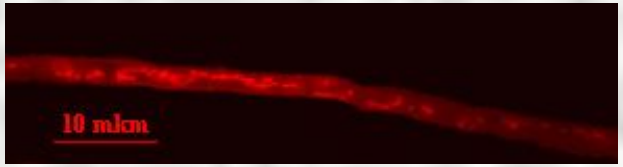
Зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика)



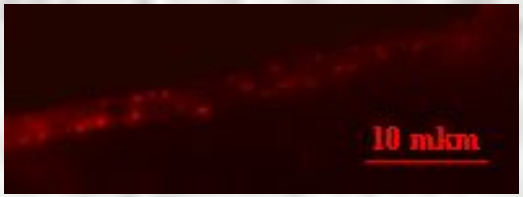


Зона 2 (30-100 мкм от апикального кончика)



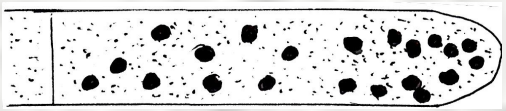


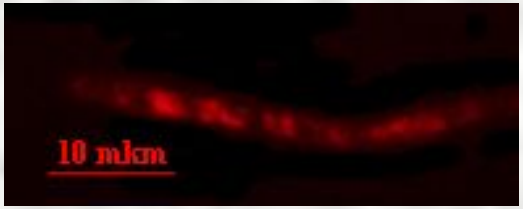
Зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика)



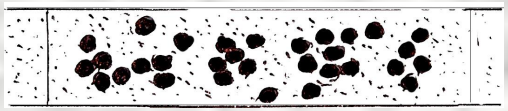
Тип 2.
Характерен для:
- Мицелия возрастом 28 суток на средах СА и КГА;
- Мицелия возрастом 7 и более суток на среде ГА;
- Мицелия возрастом 7 и более суток на СА при повышенной температуре (33±1°С);
-Глубинного мицелия возрастом 7 и более суток
- Мицелия гомокарионов

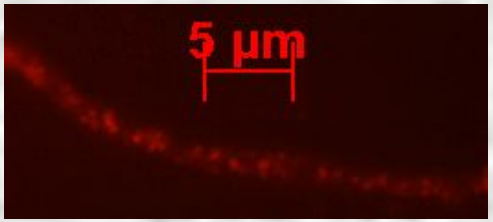
Зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика)



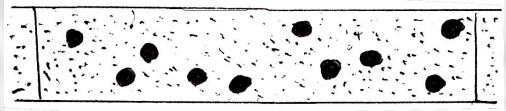


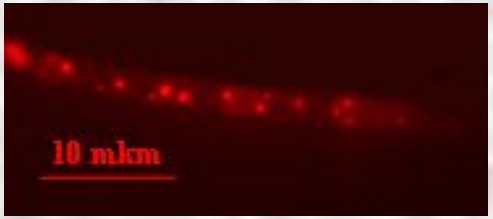
Зона 2 (30-100 мкм от апикального кончика)



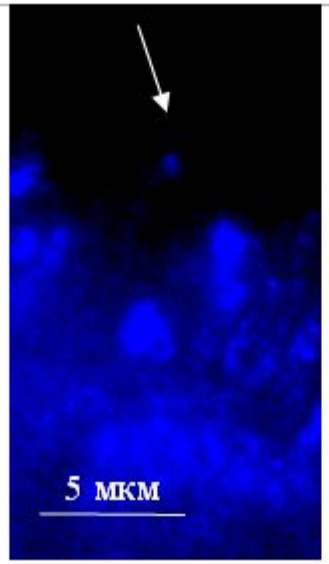
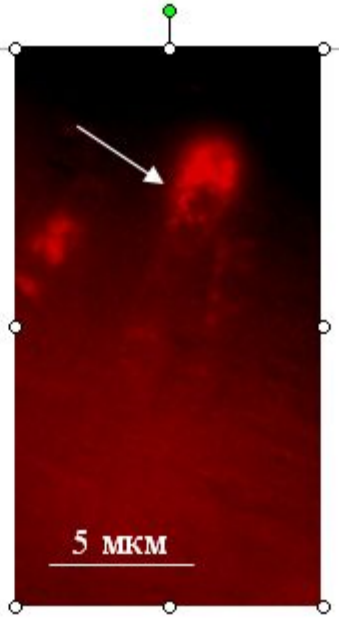


Зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика)





Базидии шампиньона двуспорового

	
Базидия с ядром (2n) (показано стрелкой) в гименциальном слое *A. bisporus* (окрашивание Hoechst 33342)	Диффузное окрашивание в апексе базидии. Округлые митохондрии (стрелка) вблизи ядра в гименциальном слое *A. bisporus* (окрашивание родамином 6Ж)

Molecular Biology of the Cell
Vol. 11, 2961–2971, September 2000

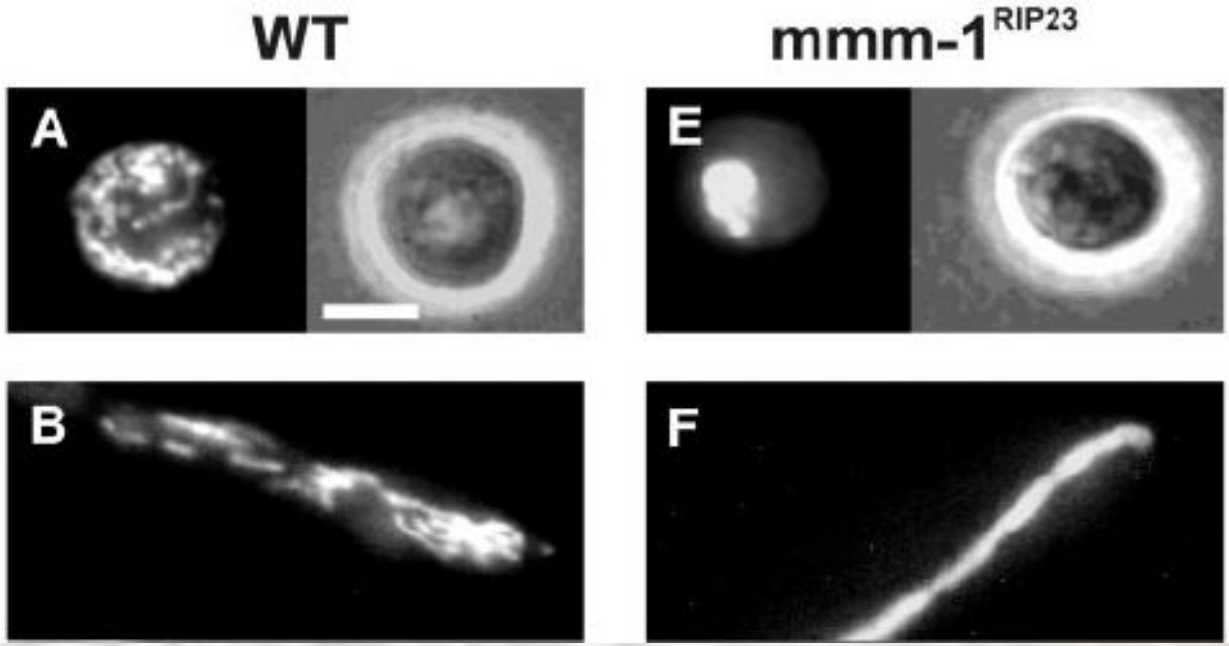
Role of MMM1 in Maintaining Mitochondrial Morphology in *Neurospora crassa*

Holger Prokisch, Walter Neupert, and Benedikt Westermann*

Institut für Physiologische Chemie der Universität München, Goethestrasse 33, 80336 München, Germany

Submitted March 3, 2000; Revised June 20, 2000; Accepted July 6, 2000
Monitoring Editor: John Pringle

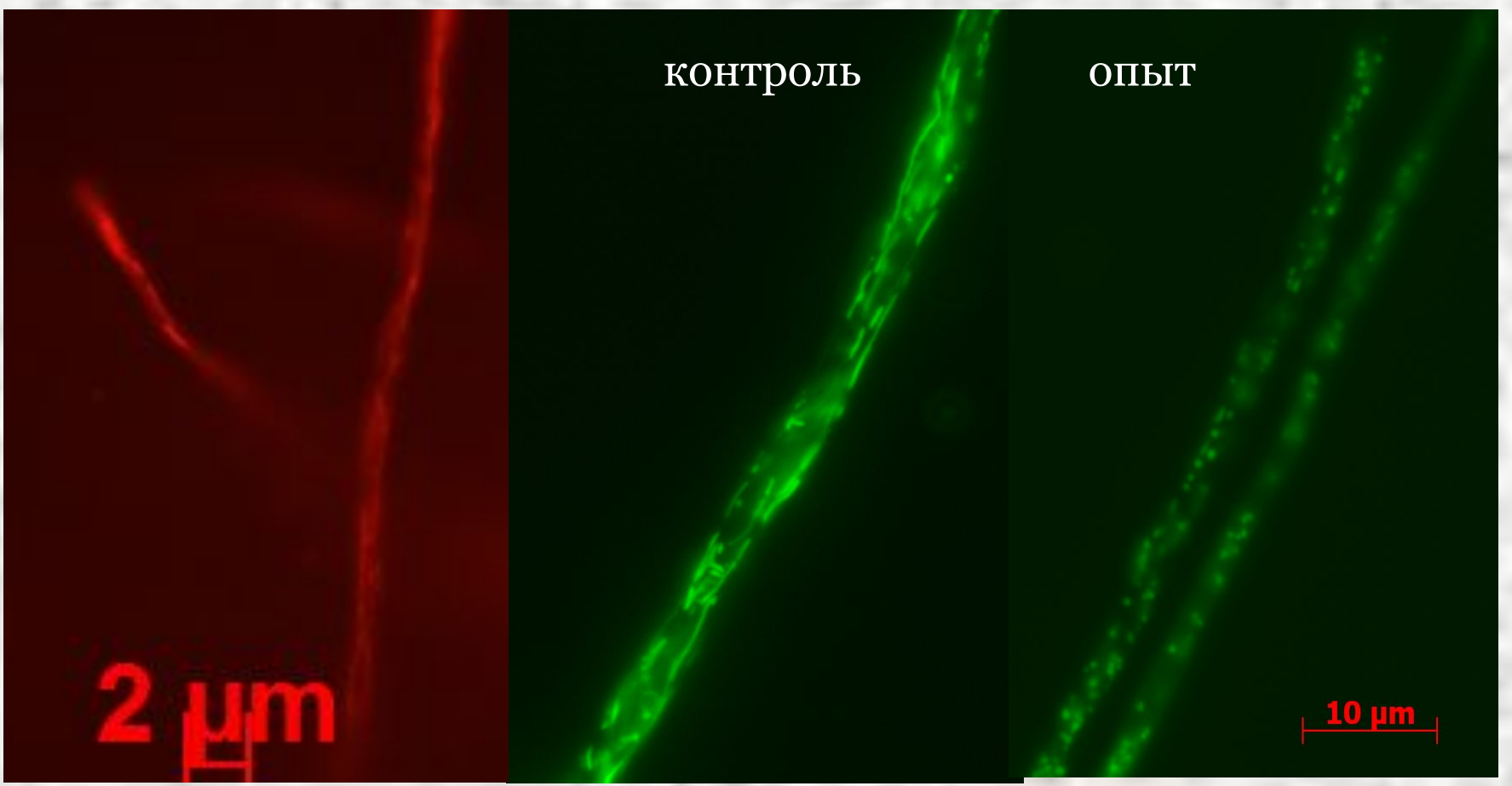
Mmm1p is a protein required for maintenance of mitochondrial morphology in budding yeast. It was proposed that it is required to mediate the interaction of the mitochondrial outer membrane with the actin cytoskeleton. We report the cloning and characterization of MMM1 of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, an organism that uses microtubules for mitochondrial transport. Mutation of the *mmm-1* gene leads to a temperature-sensitive slow growth phenotype and female sterility. Mutant cells harbor abnormal giant mitochondria at all stages of the asexual life cycle, whereas actin filament-depolymerizing drugs have no effect on mitochondrial morphology. The MMM1 protein has a single transmembrane domain near the N terminus and exposes a large C-terminal domain to the cytosol. The protein can be imported into the outer membrane in a receptor-dependent manner. Our findings suggest that MMM1 is a factor of general importance for mitochondrial morphology independent of the cytoskeletal system used for mitochondrial transport.



конидии

мицелий

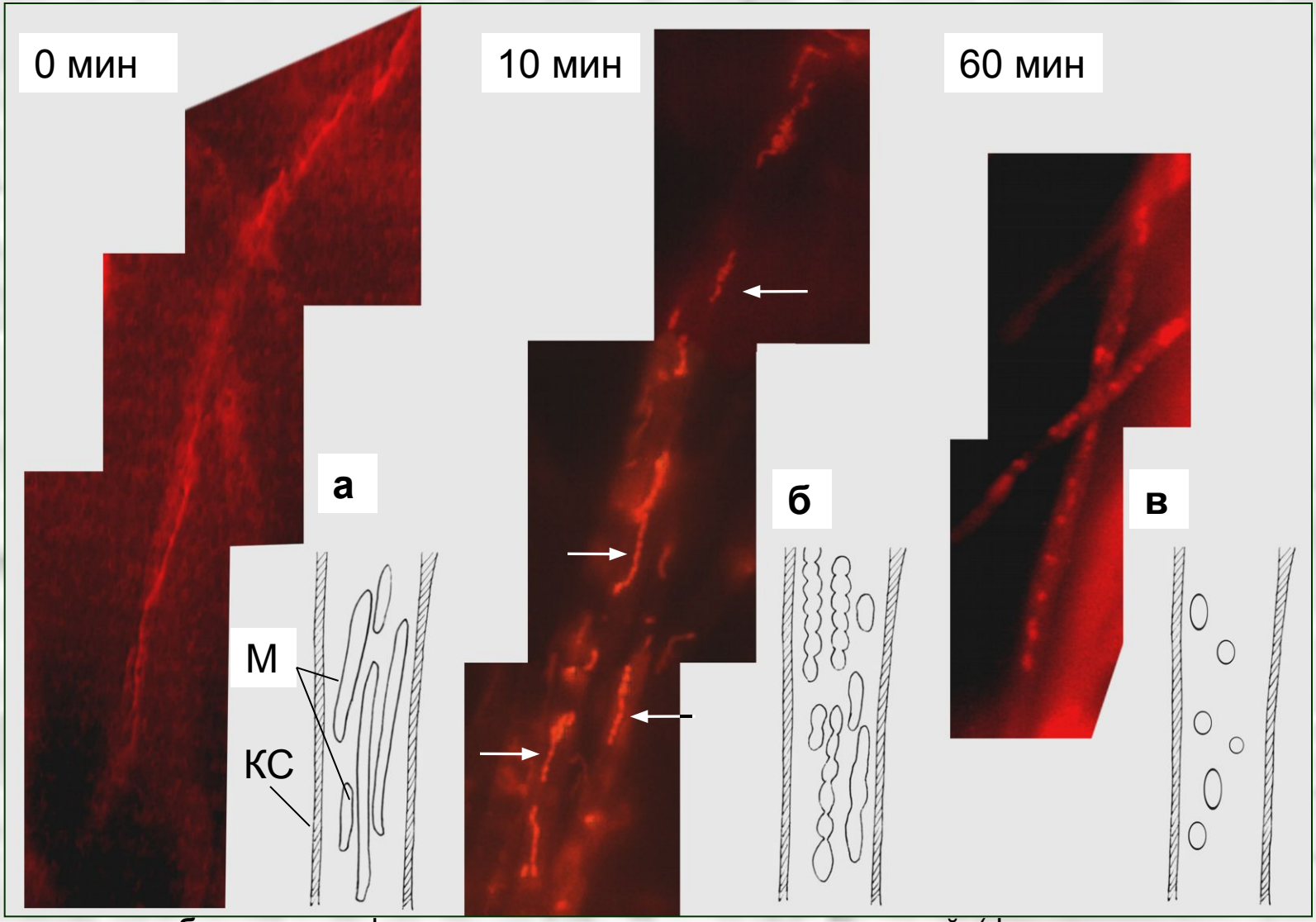
Влияние стрессового фактора на морфологию (фрагментацию) митохондрий *Podospora pauciseta*



Родамин 6Ж

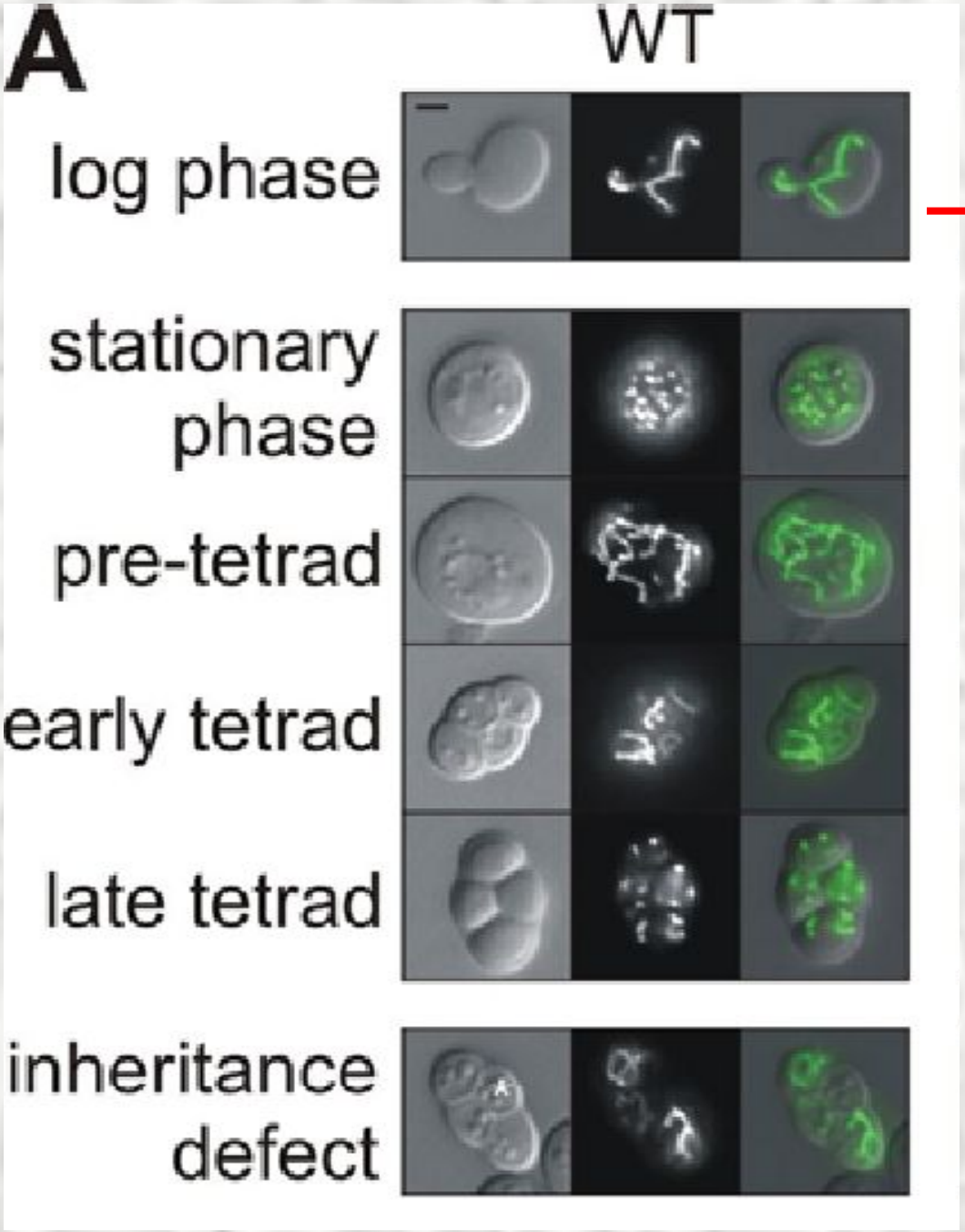
GFP плазмида

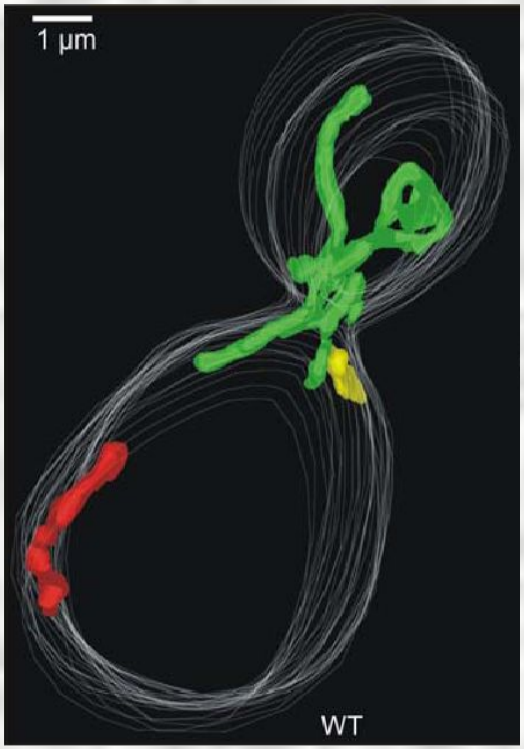
Влияние осмотического шока на морфологию митохондрий *Heleococcum alkalinum* (Козлова, 2007)



а – нулевая точка, **б** – начало фрагментации нитевидных митохондрий (формирование многочисленных перетяжек) через 10 мин инкубации в 4М NaCl, **в** – фрагментированный хондриом после 60 мин инкубации в 4М NaCl

Распределение и морфология митохондрий у одноклеточных грибов





Распределение митохондрий в клетке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

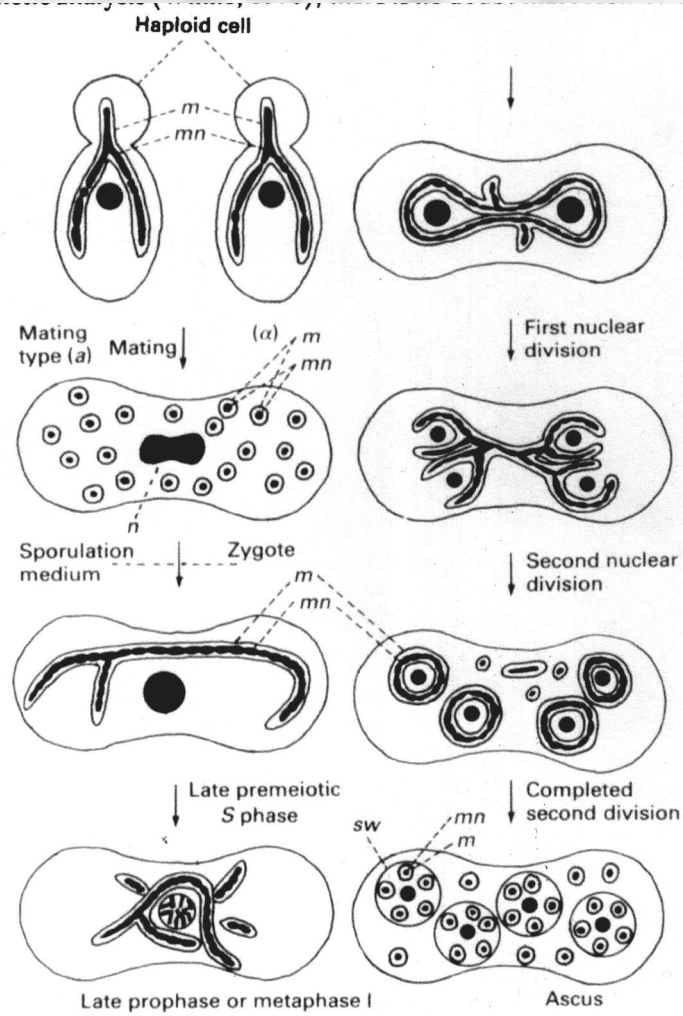


Fig. 8. A diagram of mt-nucleoid fusion and segregation during mating and meiosis–sporulation in zygote. Although fused mt-nucleoids were accumulated on a thread-like mitochondrion in exponentially growing haploid cells, dispersion of mt-nucleoids into many small spherical particles (chondriolites) and a mixing of mt-nucleoids from both parents occurred just after mating. During meiosis and sporulation in zygote, mt-nucleoids were arranged in an array on a fused mitochondrion, and recombination of DNA molecules between neighbouring mt-nucleoids took place as a result of mt-nucleoid fusion. In mature ascospores mt-nucleoids again divide into chondriolites. *m*, mitochondria; *mn*, mitochondrial nucleoids; *n*, cell nucleus; *sw*, spore wall.

Miyakawa et al., 1984

Деление и слияние митохондрий в процессе клеточного цикла у дрожжей

Molecular Biology of the Cell
Vol. 16, 5410–5417, November 2005

Role of Essential Genes in Mitochondrial Morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[D]

Katrin Altmann* and Benedikt Westermann*†

*Institut für Zellbiologie and †Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften, Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

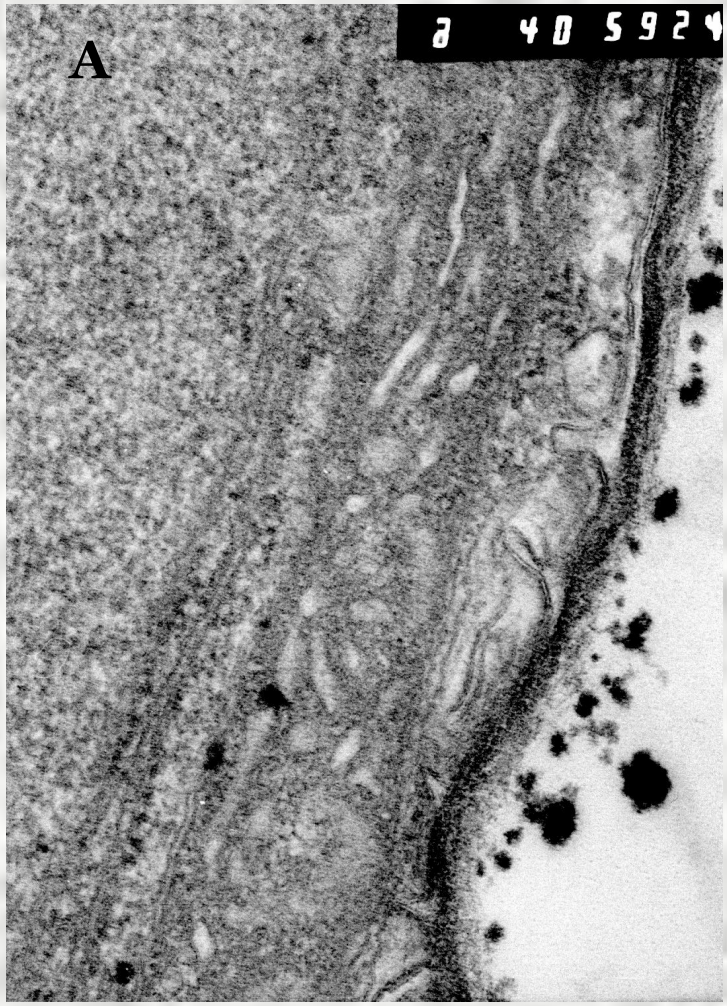
Table 1. Essential cellular pathways, protein complexes, and proteins required for mitochondrial morphogenesis in yeast

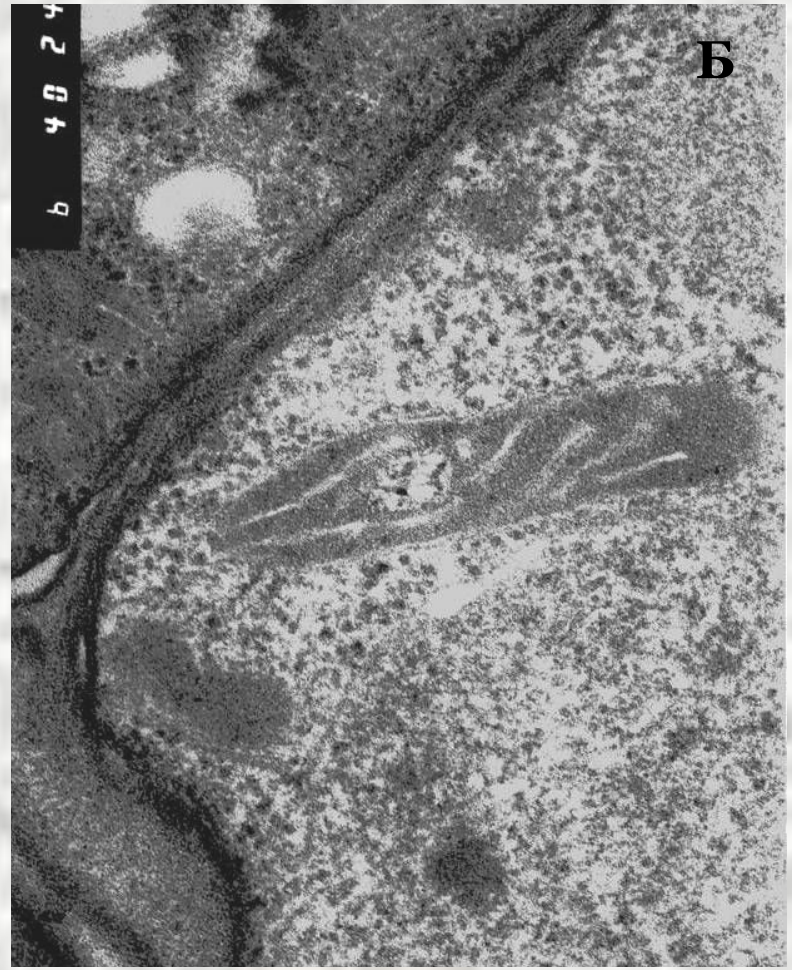
Function	Complex	Protein
Ergosterol biosynthesis		Erg1, Erg7, Erg8, Erg10, Erg12, Erg13, Erg25, Erg26, Erg27, Mvd1, Ncp1
Mitochondrial protein import and assembly	TOM complex	Mim1, Tom22
	SAM complex	Sam35, Sam50
	Tim23 complex	Mge1, Pam18, Zim17
Vesicular trafficking/protein secretion		Bfr2, Dsl1, Ret2, Sec2, Sec3, Sec4, Sec5, Sec8, Sec10, Sec13, Sec15, Sec14, Sec17, Sec18, Sec20, Sec21, Sec26, Sec27, Sec31, Sec53, Sec61, Sec63, Sec65, Sed5, Sly1, Srp14, Srp21, Srp68, Srp72, Srp101, Srp102, Trs20, Trs120, Use1, Yip1
Actin cytoskeleton-dependent transport	ARP2/3 complex	Arc35, Arc40, Arp2
	CCT complex	Cct4, Cct6
	Myosins	Mlc1, Myo2
	Other	Cof1, Iqg1, Pfy1
Ubiquitin/26S proteasome-dependent protein degradation	Proteasome	Pre1, Pre3, Pre5, Pre6, Rpn8, Rpt2, Rpt4
	SCF ubiquitin ligase	Cdc34, Cdc53
	Other	Uba1, Ufd1

Размеры митохондрий

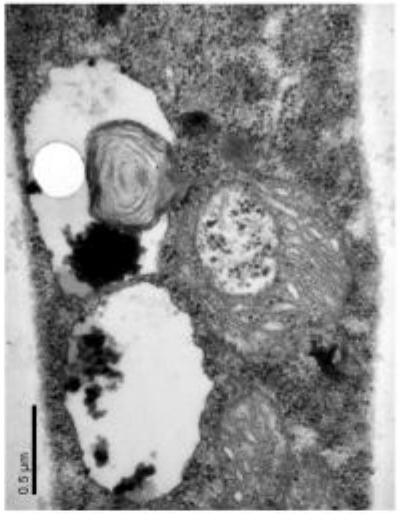
- Размеры митохондрий непостоянны у разных видов. Обычно митохондрии представляют собой мелкие (длина 0.5-3 мкм, редко до 25 мкм и толщина до 0.5 мкм) внутриклеточные гранулярные или нитевидные, иногда ветвящиеся образования, располагающиеся в тех местах клетки, где необходимо использовать энергию для любых жизненных процессов (Weber et al., 1998).

Ультраструктура митохондрий
в клетках поверхностно растущего вегетативного мицелия (А) и субгимения (Б) *Agaricus bisporus*

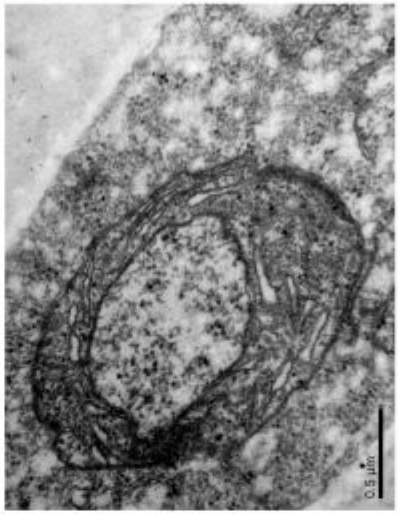




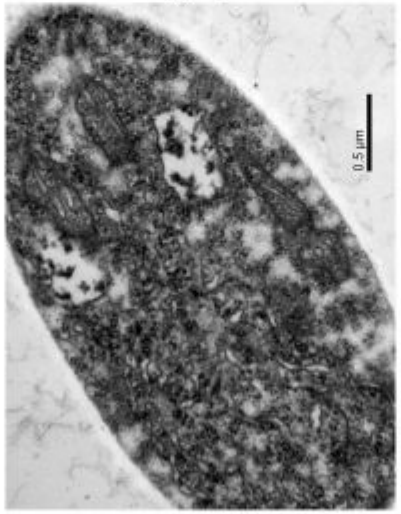
а) изолят V-GFP1-22,
8 сут роста



б) изолят V-GFP1-34,
39 сут роста



в) изолят V-GFP1-34,
39 сут роста



г) изолят V-GFP1-34,
39 сут роста

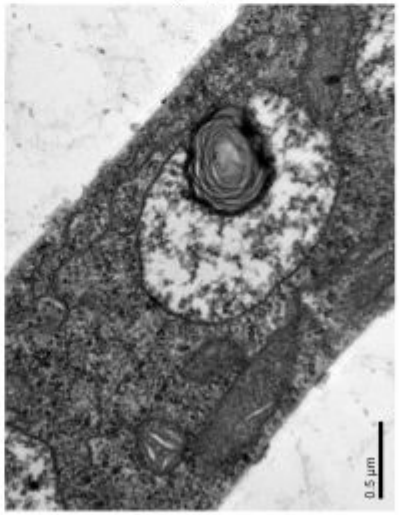


Рис. Нк. Ультраструктура поверхностно культивируемых физиологически молодых изолятов *P. anserina*, полученных из качалочной культуры, перешедшей в адаптивную фазу III.

Морфология крист у дрожжей

- Внутренняя митохондриальная мембрана способна в зависимости от напряженности энергетического обмена образовывать большее или меньшее число складок - крист, которые увеличивают ее активную поверхность. Кристы – наиболее лабильная структура дрожжевых митохондрий, точно реагирующая на условия аэрации культуры грибов. Они редуцируются при анаэробном развитии дрожжей (Мейсель, 1950).

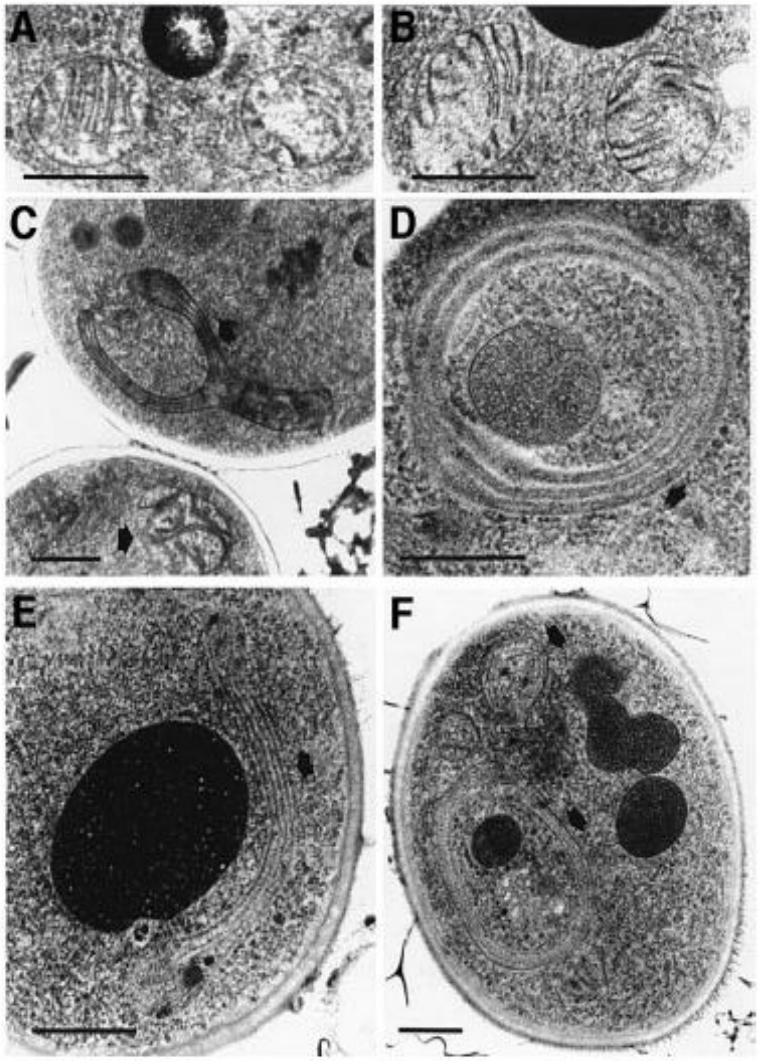


Fig. 3. Yeast cells devoid of either subunit *e* or *g* have abnormal mitochondria. Samples were prepared as described in Materials and methods. They were observed by transmission electron microscopy. The arrows indicate abnormal mitochondria. (**A**) Wild-type, (**B**) *ΔATP18*, (**C** and **D**) *ΔATP20* and (**E** and **F**) *ΔTIM11*. Bars indicate 0.5 μm.

The EMBO Journal Vol. 21 No. 3 pp. 221–230, 2002

The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology

Patrick Paumard, Jacques Vaillier, Bénédicte Coulary, Jacques Schaeffer, Vincent Soubannier, David M.Mueller[1], Daniel Brèthes, Jean-Paul di Rago and Jean Velours[2]

about how the inner mem
study provides evidence
involved in cristae forma
ATP synthase, or F_1F_0
hydrophilic catalytic un
mitochondrial matrix, a

Геном митохондрий грибов

- **ДНК в митохондриях представлена циклическими молекулами, не образующими связь с гистонными белками. Митохондриальная ДНК очень однородна, отличие заключается в величине интронов/нетранскрибируемых участков.**
- **Митохондриальная ДНК представлены множественными копиями, собранными в кластеры. В митохондриях имеется стандартный набор генов: гены ферментов дыхательной цепи, участвующие в процессах окислительного фосфорилирования, гены рРНК, тРНК и гены АТФаз.**
- **Митохондриальная ДНК собрана в отдельную зону – нуклеоид. В митохондриях грибов может быть от 1 до 10 нуклеоидов.**
- **Синтез митохондриальной ДНК не связан с синтезом ДНК в ядре. В клетках дрожжей *S. cerevisiae* в стационарной фазе содержится 22 и более митохондрий, имеющих по четыре генома.**
- **В отличие от позвоночных животных, у растений, грибов и простейших мтДНК содержат до 80% некодирующих последовательностей. Несмотря на то, что в геномах митохондрий млекопитающих и дрожжей содержится приблизительно одинаковое количество генов, размеры дрожжевого генома в 4-5 раз больше — около 80 тыс. пар нуклеотидов, у *P. anserina* – 100 тыс. пар нуклеотидов. Хотя кодирующие последовательности мтДНК дрожжей высоко гомологичны соответствующим последовательностям у человека, дрожжевые мРНК имеют дополнительно 5'-лидерную и 3'-некодирующую области, как и большинство ядерных мРНК.**

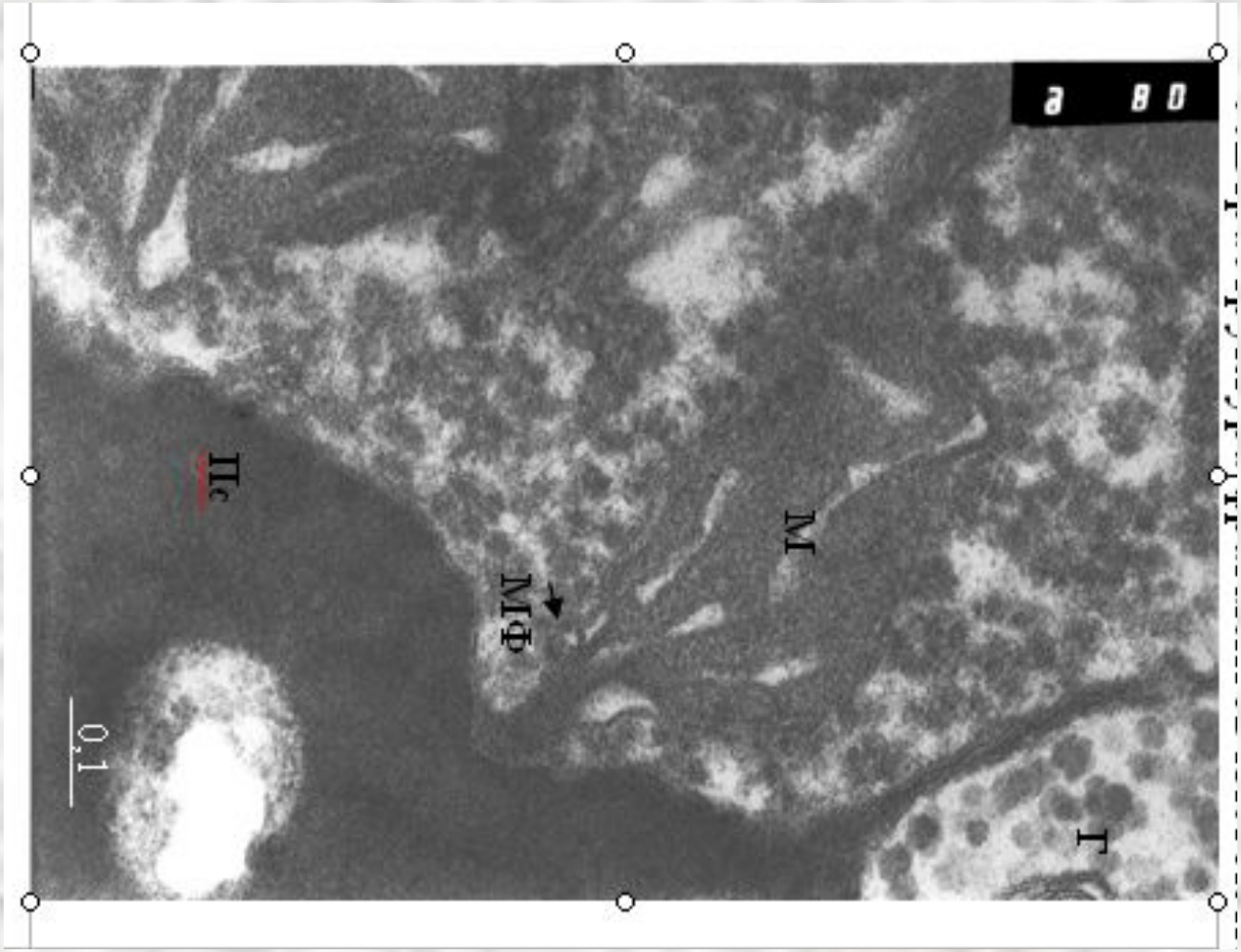
Наследование митохондрий

- Сохранение целостности митохондриального генома в процессе наследования очень важно для дыхательной функции. Факторы, контролирующие сегрегацию митохондриального генома у грибов мало изучены. У большинства высших эукариотических организмов однородительское наследование mtDNA (McAlpine et al., 2001). У мицелиальных грибов из класса Ascomycota *Neurospora tetrasperma* и *N. crassa* показано однородительское наследование митохондрий (Lee and Taylor, 1993, Mannella et al., 1979). Как в случае слияния специализированных половых клеток (трихогина и конидии), так и при слиянии гомокариотических клеток вегетативного мицелия, отличающихся по ядрам с разными mat-локусами сохраняются митохондрии клеток акцепторов ядер.
- В то время как для почкующихся дрожжей характерно двуродительское наследование (Berger and Yaffe, 2000; Okamoto et al.,1998).

Движение митохондрий

- В клетках *Saccharomyces cerevisiae,* как и в клетках *Aspergillus nidulans* в транспорте митохондрий большую роль играют актиновые микрофиламенты (Hermann and Shaw, 1998).
- У дрожжей, *Schizosaccharomyces pombe* (Yaffe et al., 1996), и в клетках *Neurospora crassa* (Steinberg, Schlia, 1993), наоборот, в распределении митохондрий задействованы, в основном, микротрубочки. Исследователи наблюдали движение органелл со скоростью 1.4 мкм/с в гифах, протопласте, клеточных фрагментах и мутантах, лишенных клеточной стенки. Разрушение микротрубочек с помощью нокодазола уменьшало подвижность митохондрий, в то время как разрушение микрофиламентов цитохалазином D не оказывало такого влияния.
- Было выяснено, что связывание митохондрий с микротрубочками осуществляют периферические белки этих органелл. К таким белкам относятся белки из семейства кинезинов или родственного динеину белка.

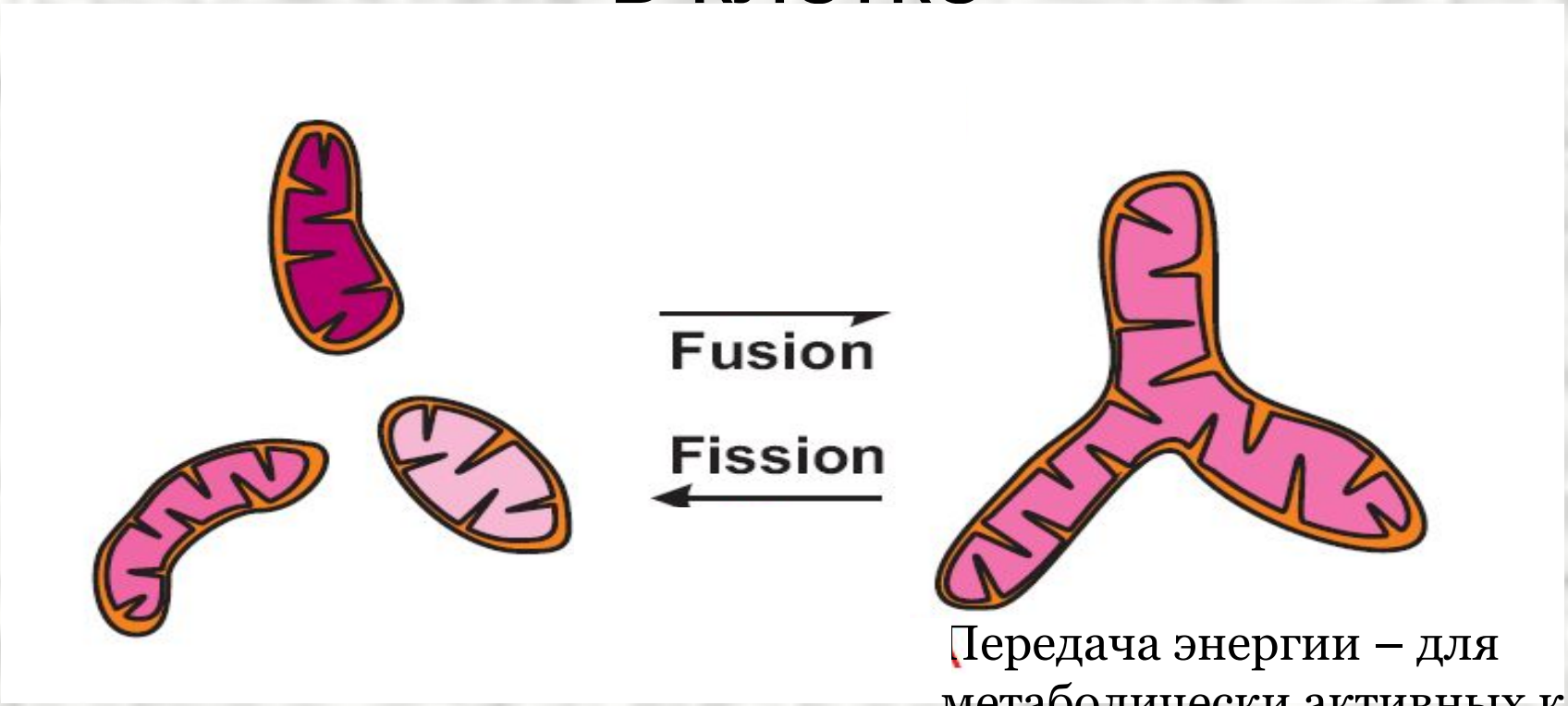
Связь митохондрий с другими органеллами: ядра и пероксисомы (клетки мицелия *Agaricus bisporus, связь митохондрий и пероксисомы)*



Слияние (англ. fusion) и деление (англ.fission или division) митохондрий

- Морфология митохондрий и количество копий зависит от баланса активности слияния и деления. Изменение в сторону слияния дает возможности клетке строить вытянутые взаимосвязанные митохондриальные сети, в тоже время сдвиг в сторону деления генерирует множество морфологически и функционально разных маленьких сферических органелл. Эта адаптация митохондиального компартмента к клеточным потребностям является ключевой для множества важных процессов

Динамика митохондрий и ее роль в клетке



Передача энергии – для метаболически активных клеток

Цитокинез

Передача кальциевых сигналов

Развитие

Развитие

Апоптоз

Защита от старения

Динамика изменения плотности митохондриальных профилей в зависимости от продолжительности культивирования *P. anserina* в поверхностных и в погруженных аэрируемых условиях.

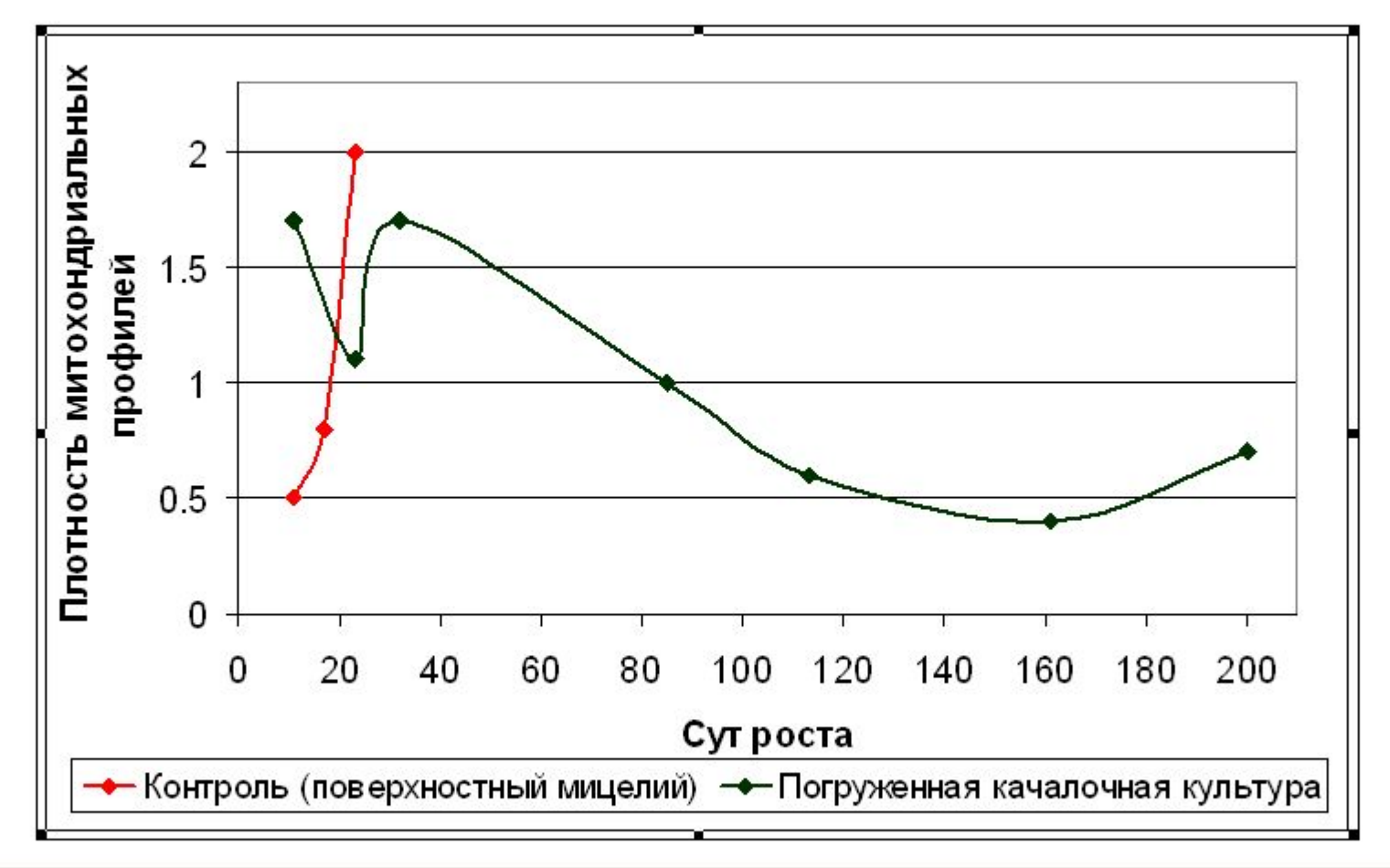


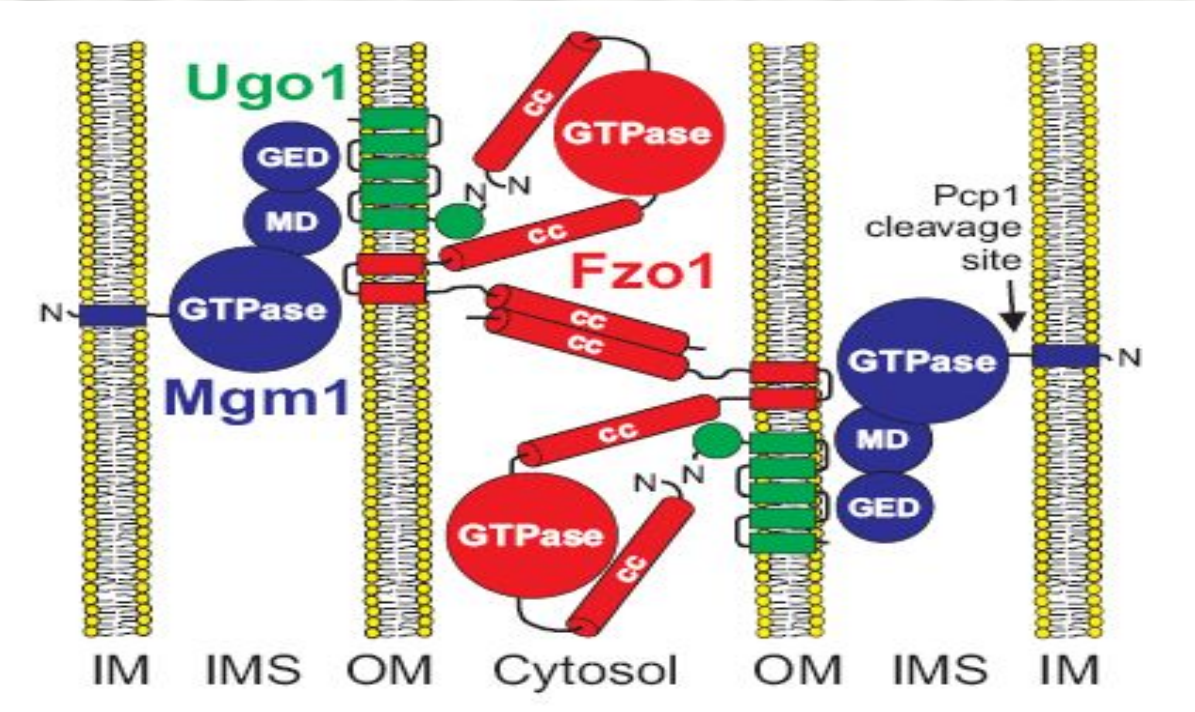
TABLE 1. **Core components of the mitochondrial fusion and fission machineries**

Process	Yeast	Orthologs in higher eukaryotes	Location	Proposed function
Fusion	Fzo1	Mfn1 and Mfn2 (mammals) Fzo and Dmfn (*D. melanogaster*)	OM	OM fusion
	Ugo1	-	OM	Coordination of OM and IM fusion
	Mgm1	OPA1 (mammals)	IM and IMS	IM fusion
Fission	Dnm1	DRP1/DLP1 (mammals) DRP-1 (*C. elegans*) ADL1 and ADL2 (*A. thaliana*)	Cytosol and OM	OM fission
	Fis1	hFis1 (human)	OM	Receptor for OM fission machinery
	Mdv1	-	Cytosol and OM	Adaptor between Fis1 and Dnm1
	Caf4	-	Cytosol and OM	Redundant with Mdv1

IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; OM, outer membrane.

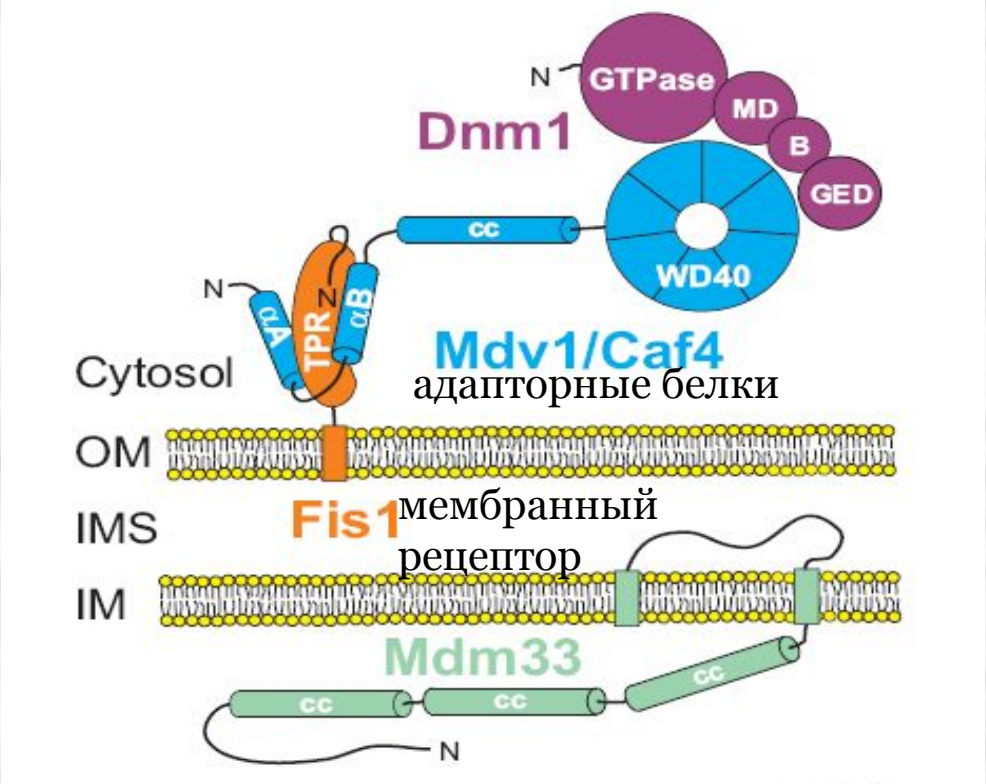
Westermann, 2008

Model of the molecular machinery of mitochondrial fusion in yeast



Two Fzo1 molecules are shown tethering adjacent mitochondria by assembling a dimeric anti-parallel coiled coil of their C-terminal heptad repeat regions (29). It should be noted that Fzo1 in mitochondria is part of a large 800 kDa complex of unknown composition (16). Ugo1 contains up to five membrane-spanning regions, as depicted here; however, alternative topologies with fewer transmembrane regions have also been proposed (25). It is unknown which parts of Ugo1 interact with Fzo1 and Mgm1. Mgm1 exists in
two forms in mitochondria, a long form containing a transmembrane region in the inner membrane, and a shorter form lacking this region due to cleavage by Pcp1 (26,27). It is unknown which domains of Mgm1 interact with the outer membrane components. See text for details. The N-terminal end of each polypeptide is indicated; cc, coiled coil; GED, GTPase effector domain; IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; MD, middle domain; OM, outer membrane.

Model of the molecular machinery of mitochondrial fission in yeast.



Mdv1 and Caf4 share the same domain organization and perform redundant functions as adaptors linking Dnm1 to Fis1 (39,41). Their coiled coil region mediates homo-oligomeric interactions (43). Dnm1 is assembled on mitochondria as dynamic oligomers that eventually form spirals surrounding the mitochondrion (44). It is not known which domains of Dnm1 interact with the WD40 repeat region of Mdv1 or Caf4. Furthermore, it is unknown whether the role of Mdm33 in inner membrane fission is direct or indirect. Mdm33 contains several predicted coiled coil regions in the matrix; however its exact domain organization has not been determined (47). See text for details. The N-terminal end of each polypeptide is indicated; αA and αB, α helices in the N-terminal extension of Mdv1 and Caf4; B, insert B; cc, coiled coil; GED, GTPase effector domain; IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; MD, middle domain; OM, outer membrane; TPR, tandem tetratricopeptide repeats.

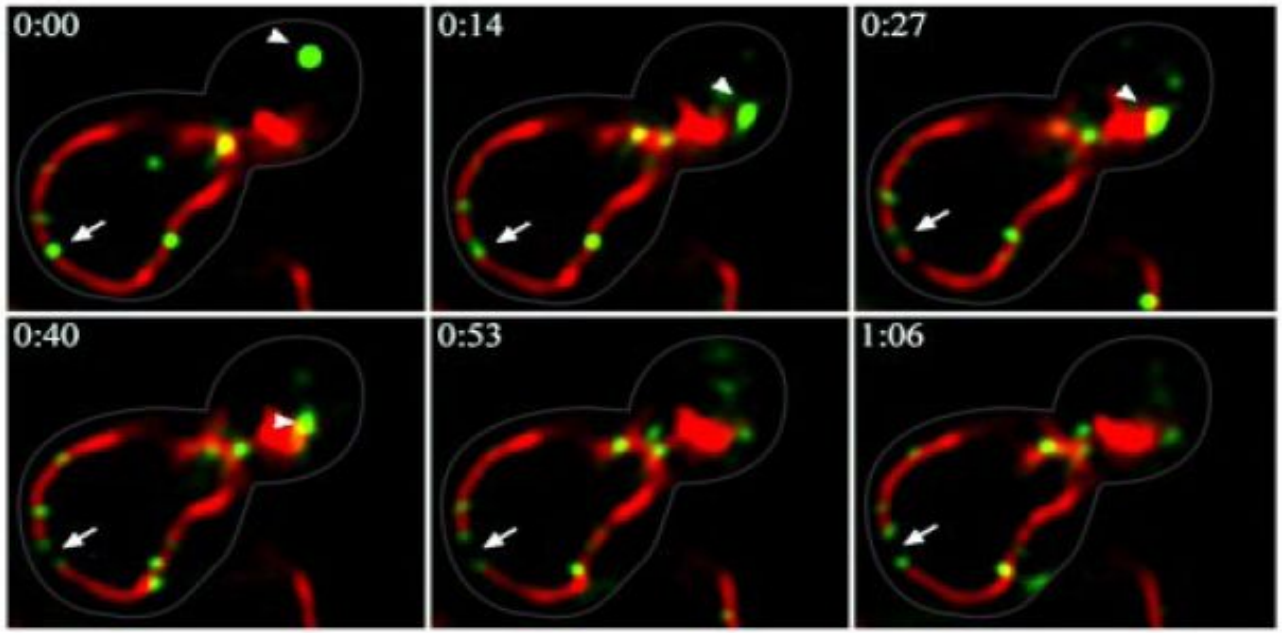


FIGURE 1. **Dnm1 punctate structures display dynamic behavior and localize to the cytoplasm and mitochondria.** Time-lapse images of Dnm1-GFP and mito-dsRed in wild type cells. A single 0.2-μm section is shown. *Arrowheads* indicate dynamic cytoplasmic Dnm1 punctate structures and *arrows* point to a stationary punctate structure stably associated with mitochondria and ultimately at a fission event. Times indicated are in seconds. Images are magnified ~500 times.

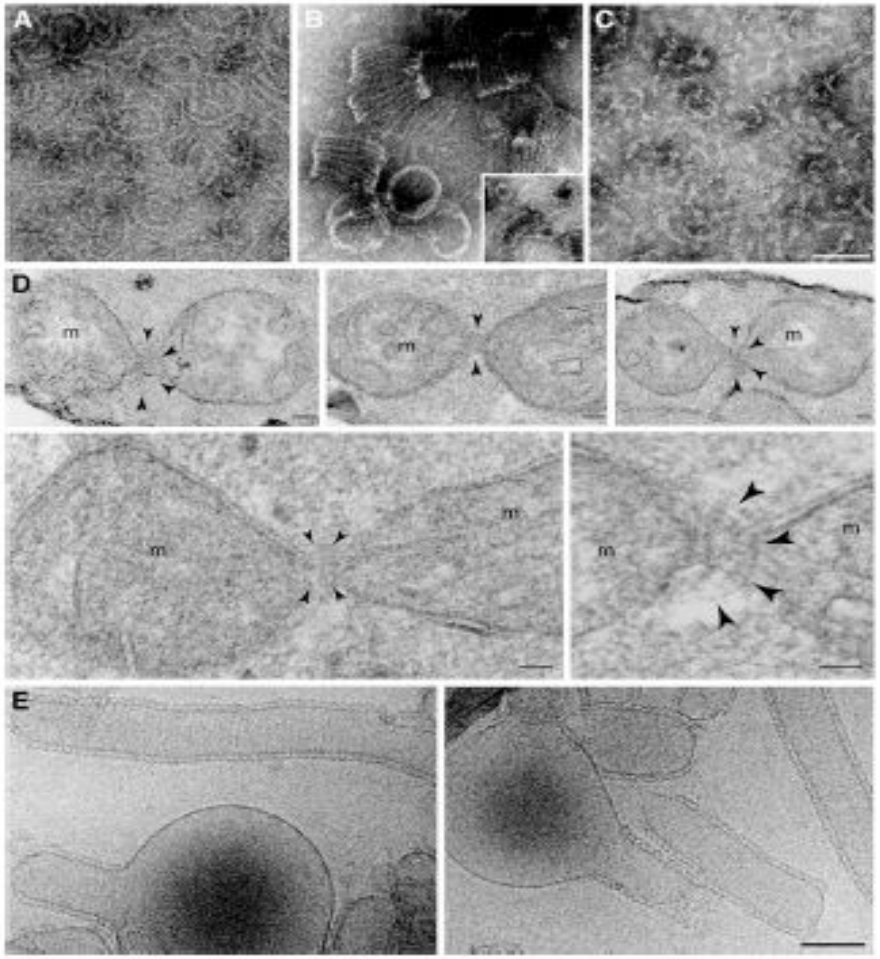
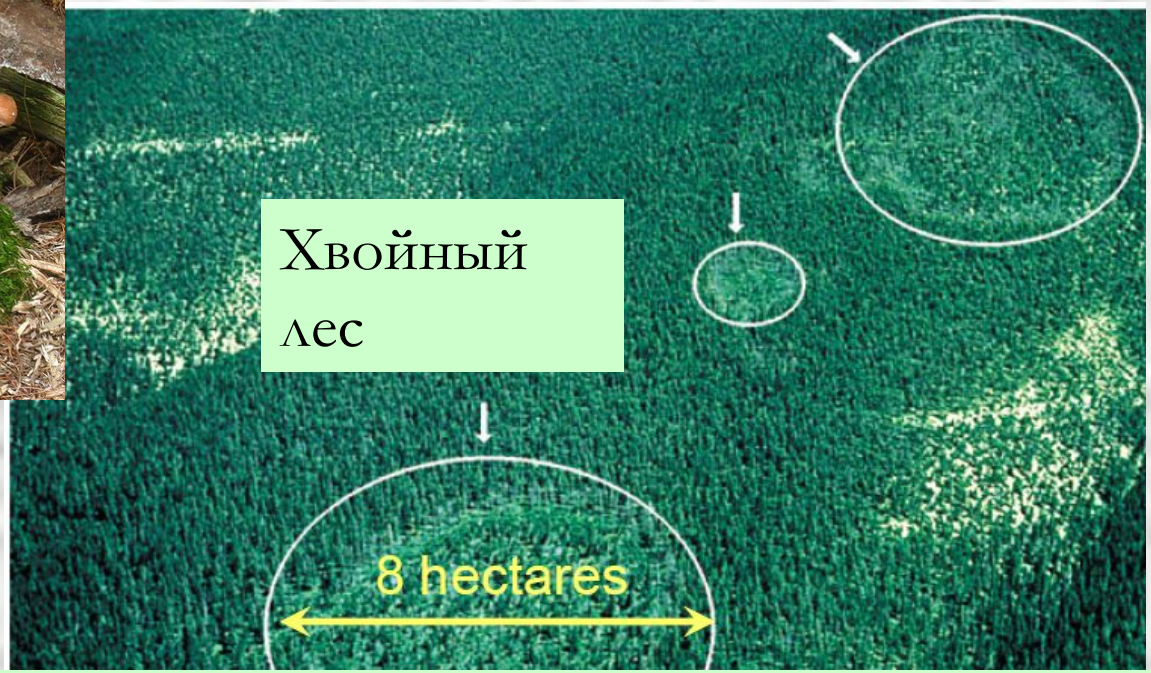


Figure 5. **Dnm1 self-assembles into spirals that are structurally tailored to fit mitochondria.** (A–C) Electron micrographs of negatively stained Dnm1 structures. (A) Dnm1 forms curved filaments in the absence of nucleotides. (B) Dnm1 self-assembles into large spirals in the presence of GMP-PCP. (Inset) Dynamin-1 spirals formed in the presence of GDP/BeF_x. (C) Dnm1/GMP-PCP spirals undergo a conformational change upon the addition of GTP. (D) Conventional EM analysis of mitochondrial constriction sites in thin sections of yeast cells. Arrowheads indicate electron-dense structures that are found in association with mitochondrial constriction sites. M, matrices of the mitochondria. (E) Dnm1 assembly in the presence of liposomes. Bars, 100 nm.

Продолжительность жизни, старение и смерть грибов

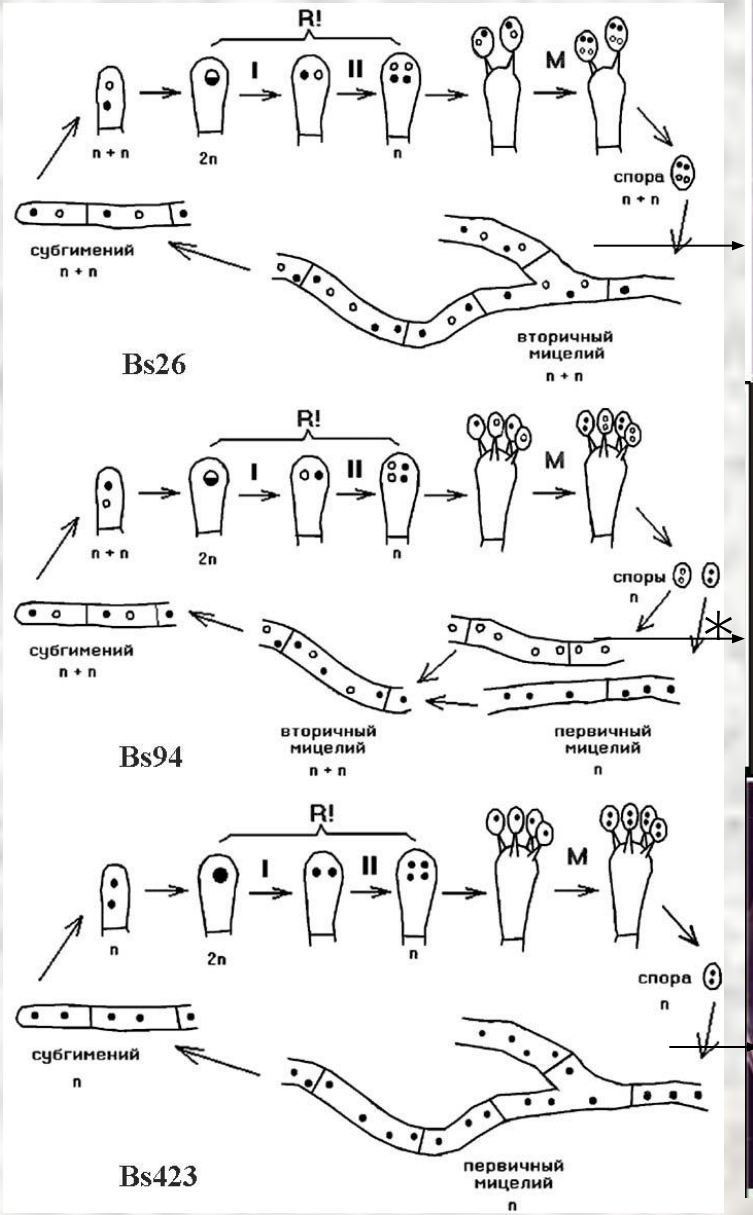
Долгоживущий мицелий базидиомицетов

Armillaria bulbosa (Smith , M., J. Bruhn and J. Anderson, 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356 : 428 - 431). Анализ mDNA, RAPD и RFLP маркеры.



Индивидуумы *Armillaria bulbosa* могут оккупировать территорию 10000 м весить 10 000 кг и оставаться генетически стабильными **более чем 1500 лет**. Штат Мичиган (США), красный дуб/белая береза/сахарный клен сменились посадками красной сосны. Скорость роста ризоморф примерно 0.3 - 0.6 м в год.

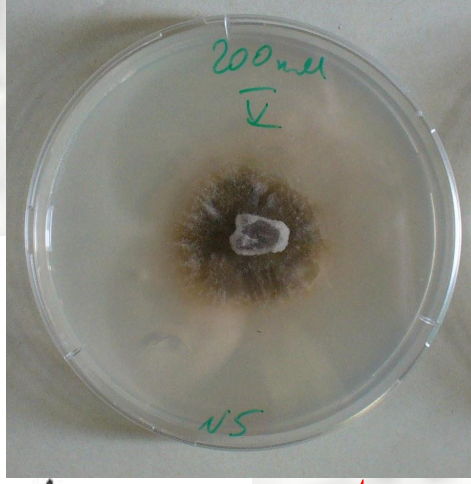
Фенотип мицелия долгоживущих и короткоживущи штаммов *Agaricus bisporus*



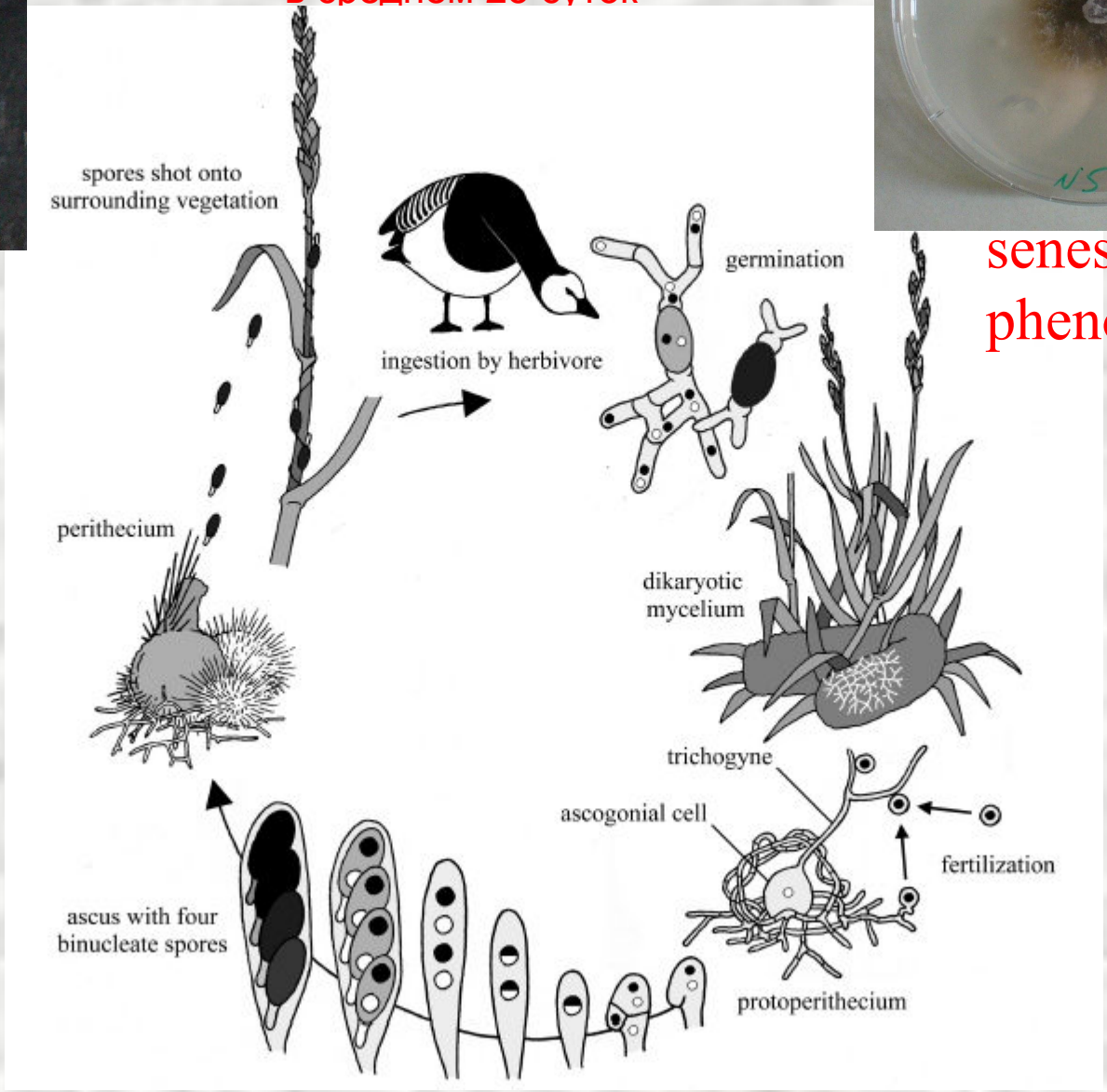
* Авторы лично наблюдали сенесценс-подобное поведение отдельных гомокариотических изолятов шампиньона двуспорового. У таких медленнорастущих гомокарионов при непрерывном пассажировании в течение нескольких месяцев падала скорость роста, менялась морфология колонии, выделялся темный пигмент, и затем штамм терял способность к пересеву.

Podospora anserina

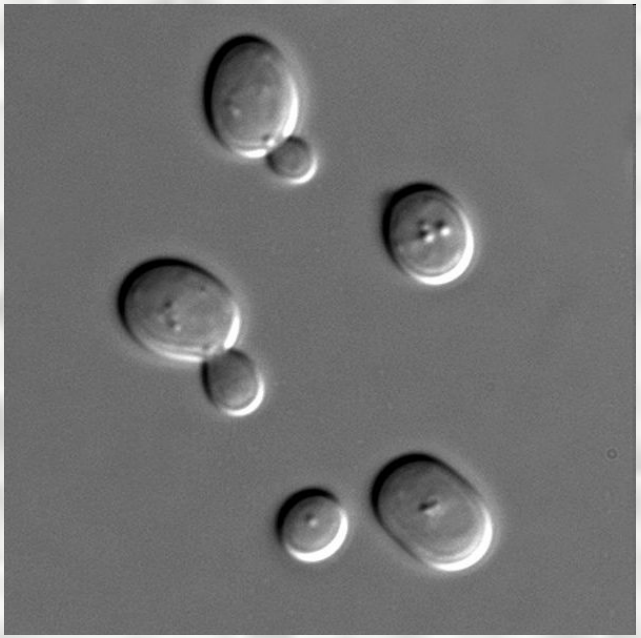
жизненный цикл природных штаммов составляет в среднем 25 суток



senescent phenotype



Продолжительность жизни *Saccharomyces cerevisiae*



Средняя продолжительность жизни клетки лабораторных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* составляет в среднем 25 делений (время митоза 10-15 минут).
Время клеточного цикла одной клетки 135 минут (около 2-ух часов). Время жизни одной клетки составляет примерно **двое суток**.

Какие факторы влияют на продолжительность жизни модельных объектов *Podospora anserina* и *Saccharomyces cerevisiae* ?

- Источник и концентрация углерода:
- Глюкоза (2%) – укорачивает жизнь, а ацетат или глицерин (2%) - продлевают
- Снижение концентрации глюкозы в среде культивирования *P. anserina* в 100 раз (0,02%) увеличивает продолжительность жизни в 50 раз
- Снижение концентрации глюкозы в среде культивирования *S.cerevisiae* в 4 раза (с 2% до 0,02 %) приводит к увеличению продолжительности жизни дрожжей в 10 раз.
- Ингибиторы синтеза белка и цитохромоксидазы в митохондриях увеличивают продолжительность жизни
- Повышенная температура и ультрафиолетовый свет (90–120 Дж/м^2), дозы, вызывающие повреждение ДНК укорачивают жизнь гриба
- Окислительный стресс (обработка перекисью водорода в концентрации 3–5 мМ 180–200 мин) укорачивает жизнь клеток, а антиоксиданты (глютатион, витамин Е) ее удлиняют. И т.д.

- На продолжительность жизни оказывают влияние не только факторы окружающей среды и доступность питательных веществ, но и онтогенетическая программа, которая обеспечивает адаптивную продолжительность жизни.

- **Старение** (англ. aging) это фундаментальный процесс обнаруженный почти у всех биологических систем и может быть определен как зависимая от времени утрата функции/й и экспоненциальное увеличение скорости наступления смерти (Osiewacz, Kimpel, 1999).
- Старение, прогрессирующий процесс дегенерации, приводящий к возрастозависимому повышению смертности, обнаружено у большинства эукариот (Dufour et al., 2000). Молекулярные механизмы, отвечающие за этот процесс, остаются в большинстве своем неизвестными.

- Признаки старения *Podospora anserina* and *Neurospora crassa* (senescent strains) (Griffiths, 1992, Osiewacz and Hamman, 2006), которые проявляются накануне смерти клеток мицелия:
- Замедление скорости роста мицелия и остановка роста
- Редукция надсубстратного мицелия
- Усиление пигментации
- Формирование нежизнеспособных конидий
- Нарушение апикального роста гиф
- Подавление цитоплазматического наследования

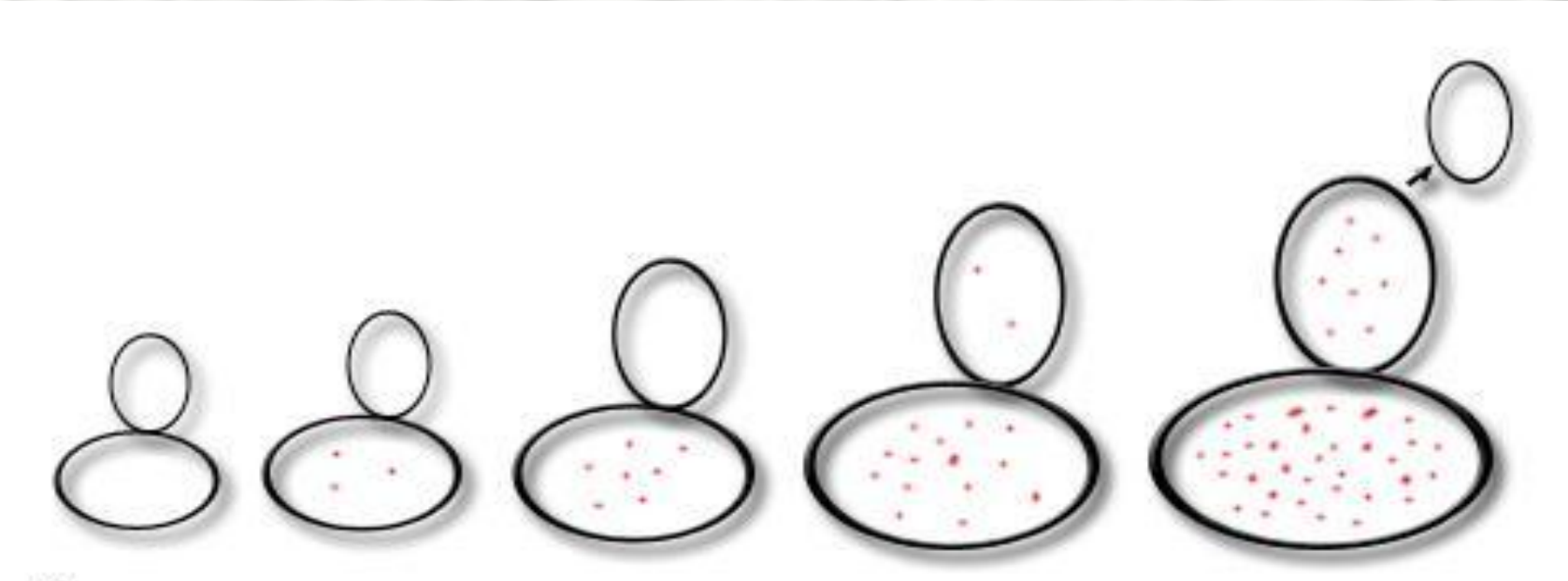
- У грибов процесс старения включает несколько возможных базисных механизмов (Мажейка и сотр., 2011):

- хронологическое старение
- репликативное старение
- апоптоз

Хронологическое и репликативное (митотическое) старение

- Хронологическое старение - потеря жизнеспособности индивидуальных клеток дрожжей при культивировании в стационарной фазе. Культивируемые на искусственной среде дрожжи, после достижения стационарной фазы, живут от недели до месяца. Описано для почкующихся дрожжей и обнаружена практически у всех клеточных организмов и характеризуется накоплением внутри клетки нарушенных биомолекул и структур, внутриклеточным дефицитом макроэргов и других жизненно важных биомолекул (Bitterman et al., 2003; Osiewacz, Scheckhuber, 2006) .
- Репликативное или митотическое старение – ограниченное количество клеточных делений при экспоненциальном росте колонии, сопровождающееся снижением скорости роста и смертью либо старых клеток у дрожжей, либо апикальных у мицелиальных грибов. В основе механизма репликативного старения/антистарения лежит ассиметричный цитокинез, обеспечивающий неравномерное распределение факторов старения между клетками, получившимися в результате деления. Описано для дрожжей и подоспоры (Pereira et al., 2001; Smeets, Segal, 2002; Leonhard, Nurse, 2005; Meadows, Millar, 2008) .
- Особенность репликативного старения - перераспределение фактора/ов старения между клетками колонии и более быстрое накопление фактора/ов в определенных клетках (материнских у дрожжей, апикальных у *P. anserina*). Неравномерное распределение детерминанта старения обусловлено либо фильтрацией при цитокинезе, либо фактом, что в области деления/нарастания активный метаболизм, большие энергетические и биосинтетические потребности, либо тем и другим.

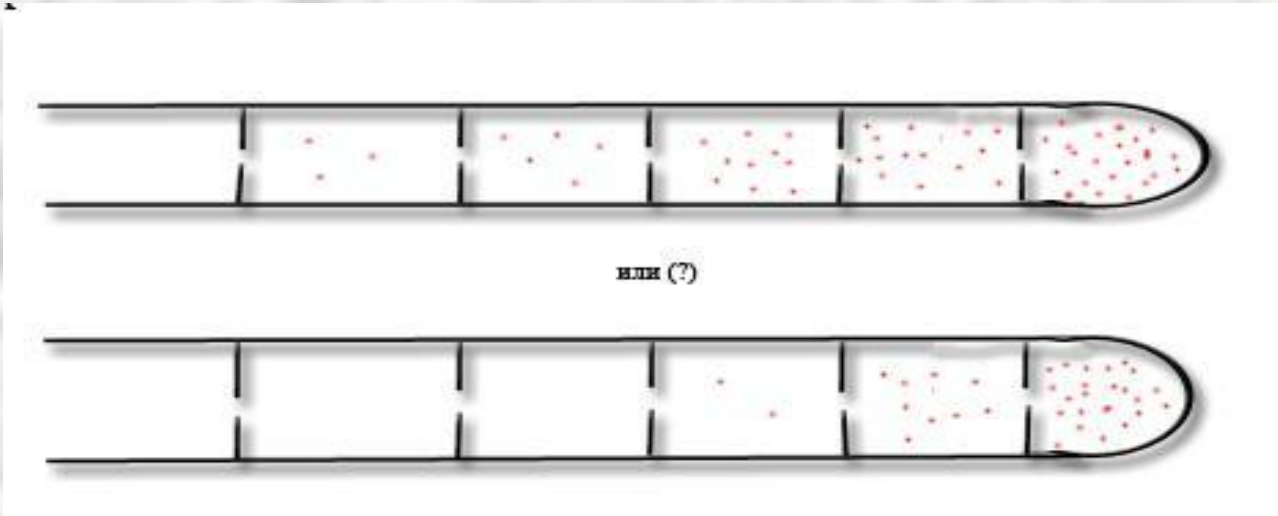
Накопление факторов старения у дрожжей



Модельная схема накопления и распределения между клетками условного фактора старения у дрожжей. У дрожжей условный фактор старения (красные точки) долгое время не передается дочерним клеткам и накапливается только в материнской (фильтрация).

Фактор старения дрожжей - рДНК-повторы (Bitterman et al., 2003 экстрахромосомные кольцевые фрагменты (до 1000 в клетке).

Накопление факторов старения у *Podospora anserina*



Модельная схема накопления и распределения между клеток условного фактора старения. у *P. anserina*. У *P. anserina* фактор накапливается в гифальном апексе. Изображено два варианта такого накопления. Гифа сверху – без фильтрации, фактор накапливается в апексе – в месте наибольшей клеточной активности, и с равномерным возрастанием распределен от старых клеток к молодым. Гифа снизу – механизм, похожий на дрожжевой, с фильтрацией – фактор остается в более старых клетках лишь тогда, когда его концентрация в апексе сильно возрастает и происходит «пробой» фильтров

Митохондриальные факторы старения *P. anserina*

α-sen ДНК представляет собой особый мобильный интрон – первый интрон (*Cox1*-i1, α-интрон, или pl-интрон) митохондриального гена *cox1*, кодирующего первую субъединицу цитохром *c*-оксидазы (cytochrome *c* oxidase, COX, Stahl et al., 1978;

Cummings et al., 1979), акселератор/модулятор старения, который приводит к реорганизации митохондриального генома и дисфункции митохондрий

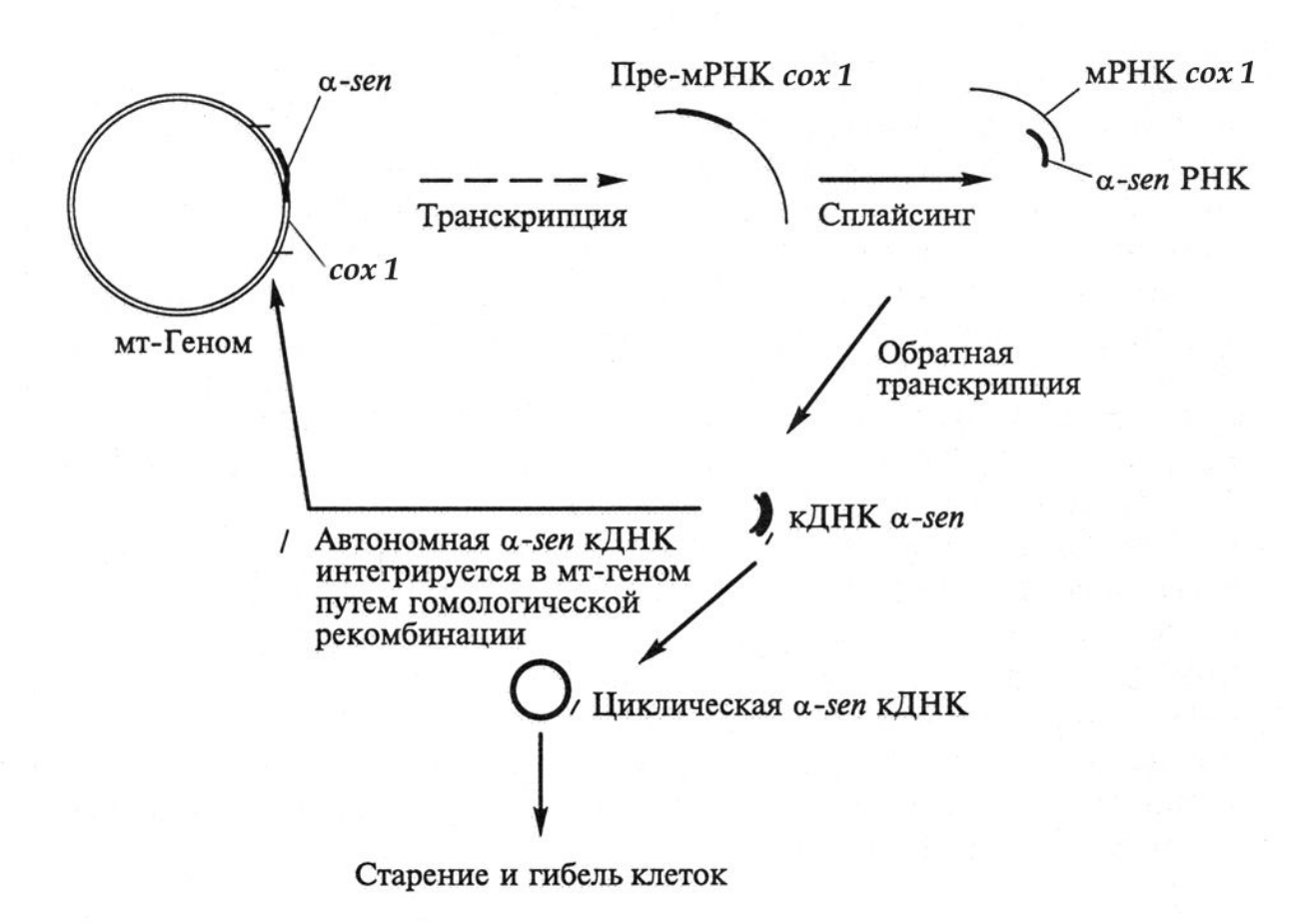
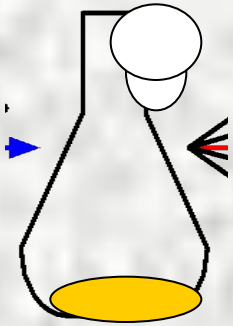


Схема вырезания и накапливания последовательности α-sen в стареющих культурах *P. anserina* (Дьяков и др., 2005)

- Какие факторы влияют на продление или сокращение продолжительности жизни у грибов?
- Рассмотрим один фактор - условия культивирования мицелия

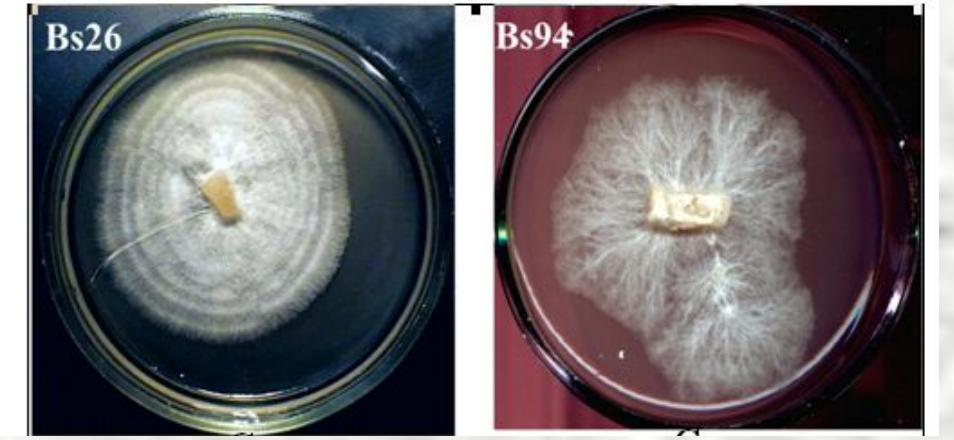


Культивирование мицелия *Podospora anserina* в глубинных условиях (Turker, Cummings, 1987; Кудрявцева с сотр., 2011)

- Культивирование в жидкой среде в стационарных условиях позволяет увеличить продолжительность жизни в 2 раза по сравнению с культивированием на агаризованной среде.
- Культивирование в жидкой среде на ротационной качалке позволяет получить бессмертные мутанты. Они теряют способность к формированию при скрещивании плодовых тел (женская стерильность).

Культивирование мицелия *Agaricus bisporus* в глубинных условиях

- Культивирование в жидкой среде вызывает гибель клеток мицелия через 14 дней роста, в то же время на агаризованной среде того же состава мицелий живет несколько месяцев/лет.



Роль митохондрий в апоптозе клетки

Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing
Hamman et al., 2008

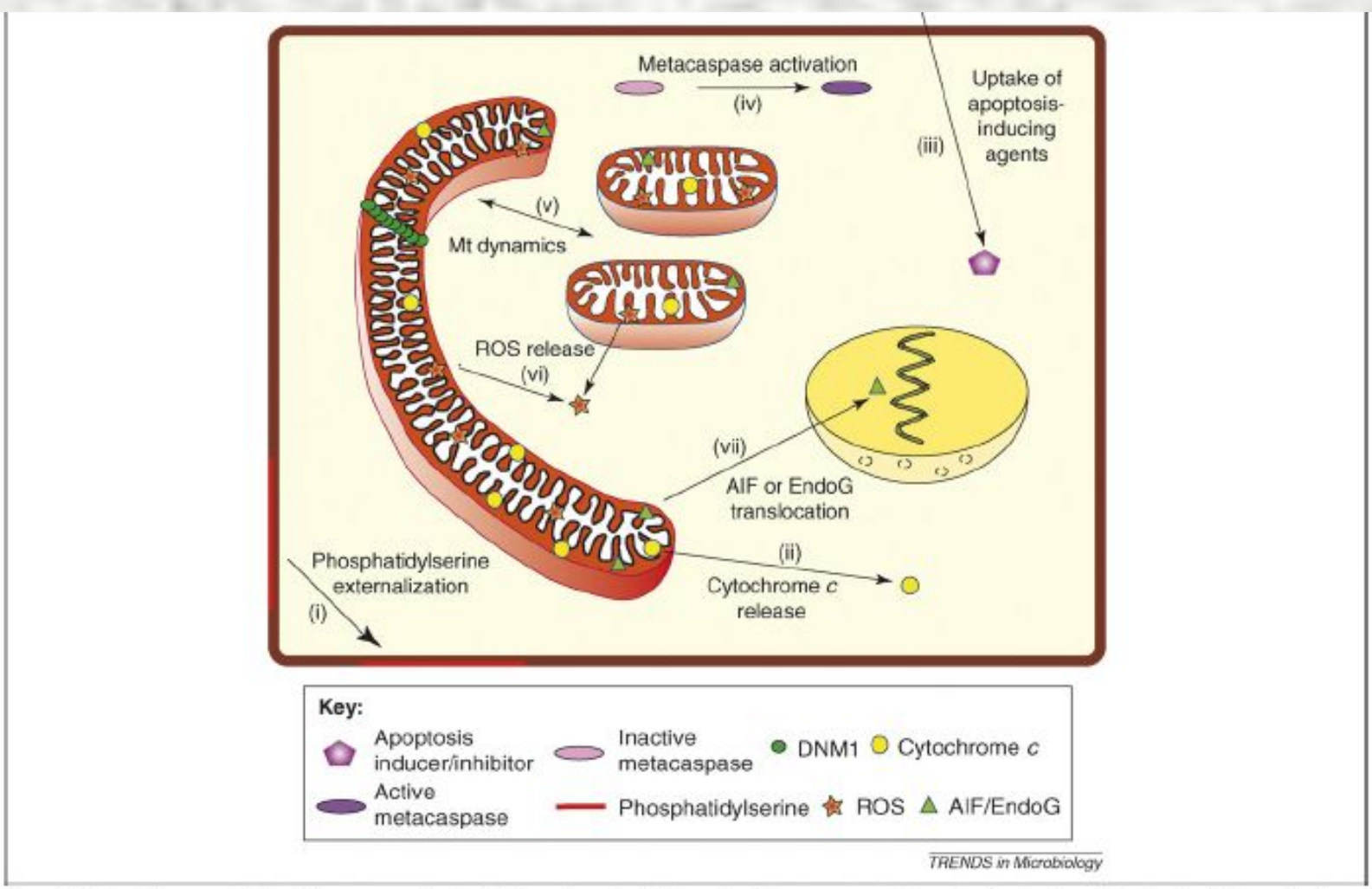
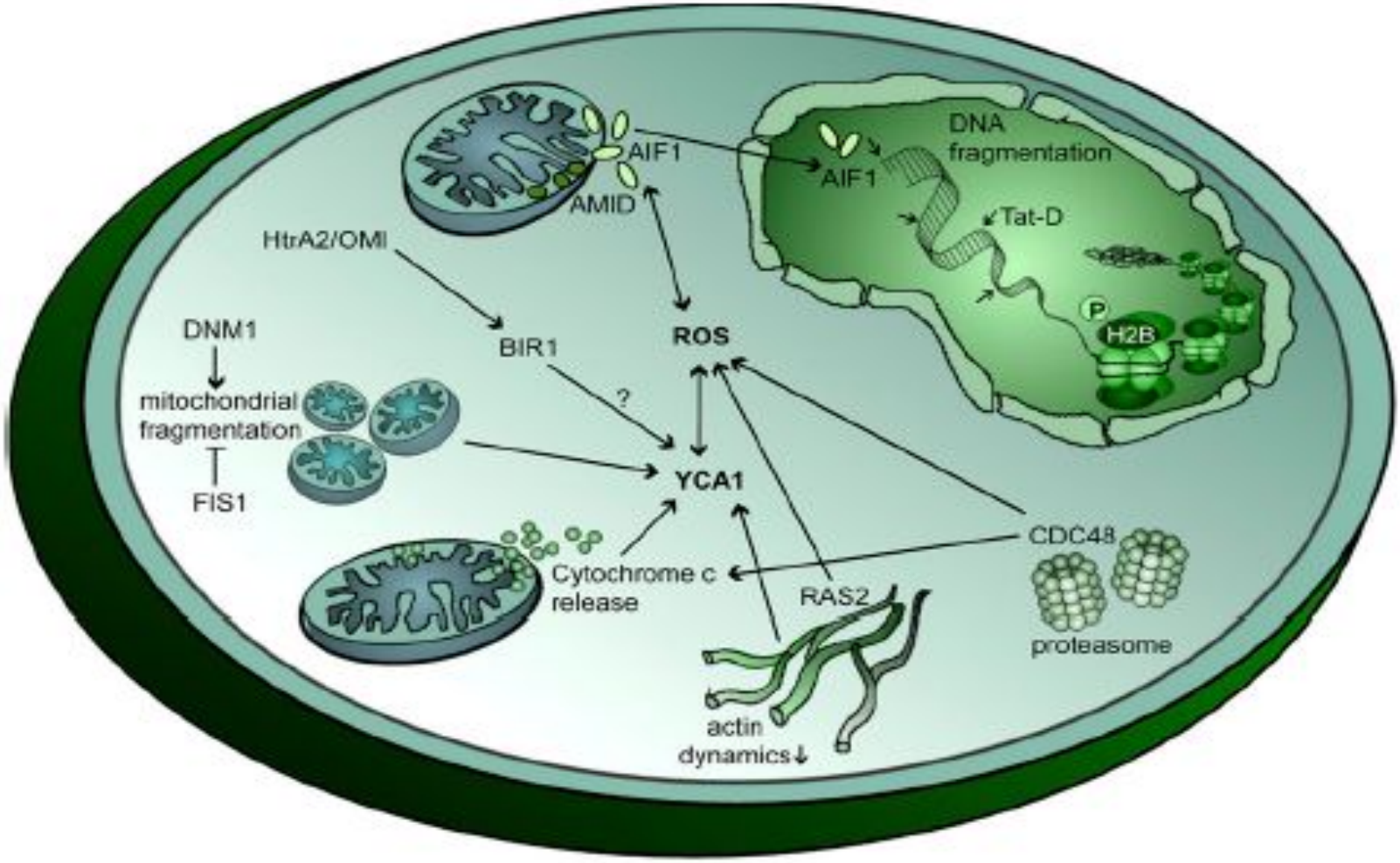


Figure 1. Schematic representation of the processes involved in fungal apoptosis. The order of these processes does not reflect a chronological order. **(i)** Externalization of phosphatidylserine, which is normally localized at the inner leaflet of the plasma membrane. **(ii)** Release of cytochrome *c* from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol [5]. **(iii)** Uptake of apoptosis-inducing agents such as farnesol, reactive oxygen species (ROS) or acetic acid. **(iv)** Activation of metacaspases [31,37]. **(v)** Mitochondrial (Mt) dynamics, a process in which fission factor DNM1 is implicated [46,74]. **(vi)** Release of ROS from mitochondria. **(vi)** Translocation of the apoptosis-inducing factor (AIF) or endonuclease G (EndoG) from mitochondria to the nucleus [38,40].

Основная молекулярная машина апоптоза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*



Компоненты, участвующие в программируемой клеточной смерти у дрожжей

Дрожжи

Метакаспаза (Yca1p)

Dnm1p Fis1

STM1 AIF?
AMID

IAP (BIR?)

Протеаза Omi

Uth1p

Феромон

↓

Увеличение концентрации цитоплазматического Ca^{2+}

↓

Увеличение ΔΨ в митохондриях

↓

Образование АФК

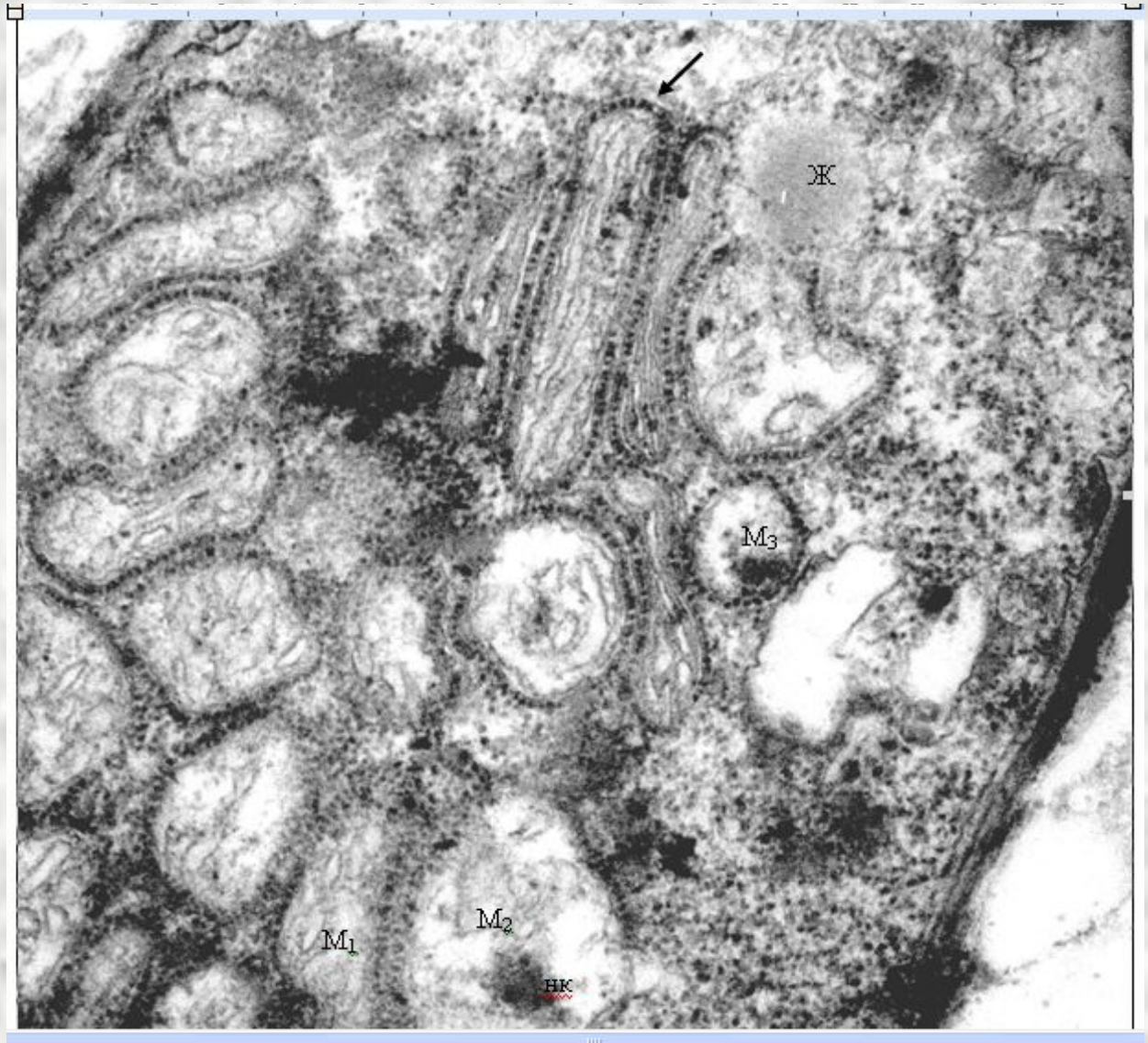
↓

Потеря целостности митохондрий

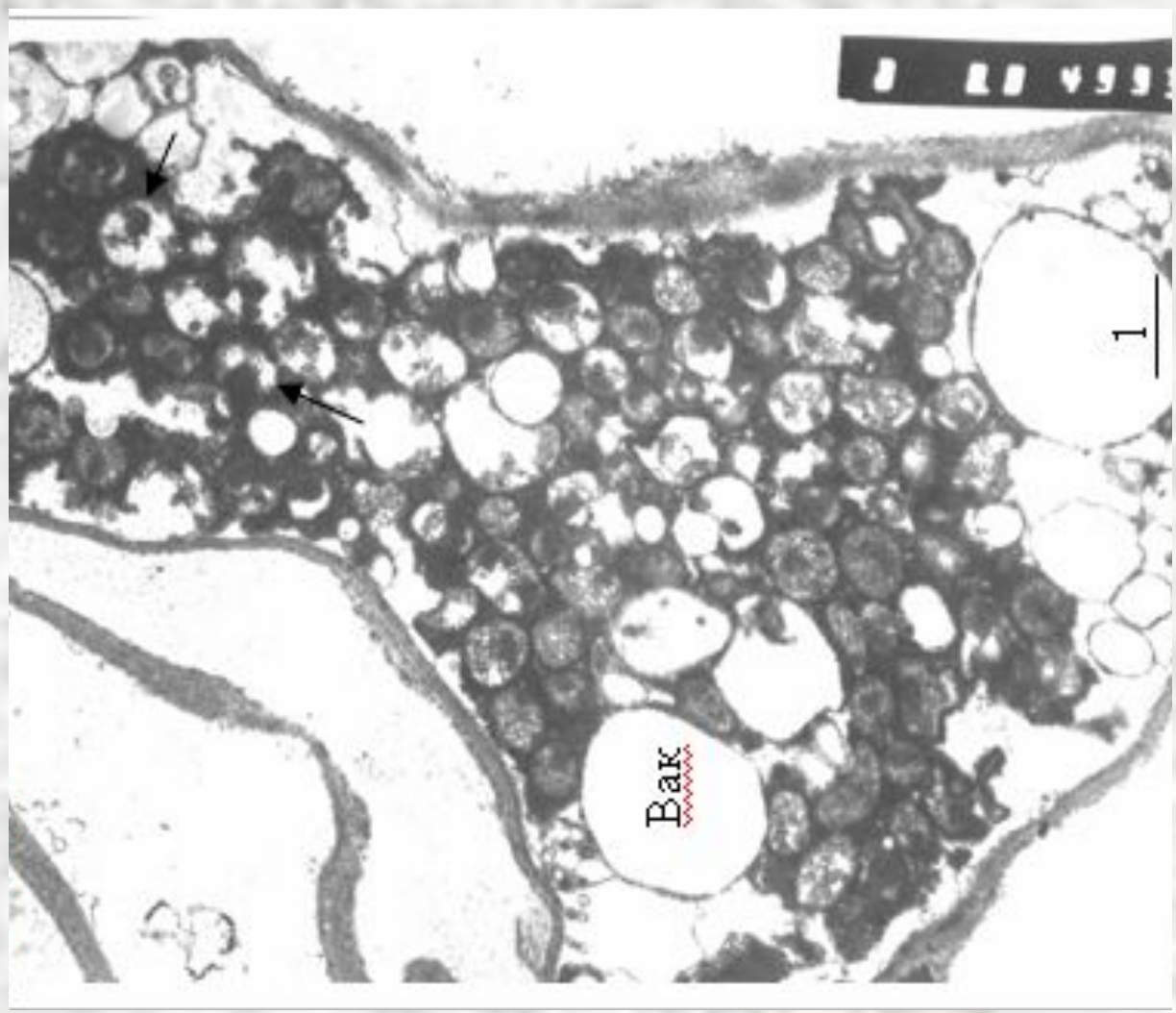
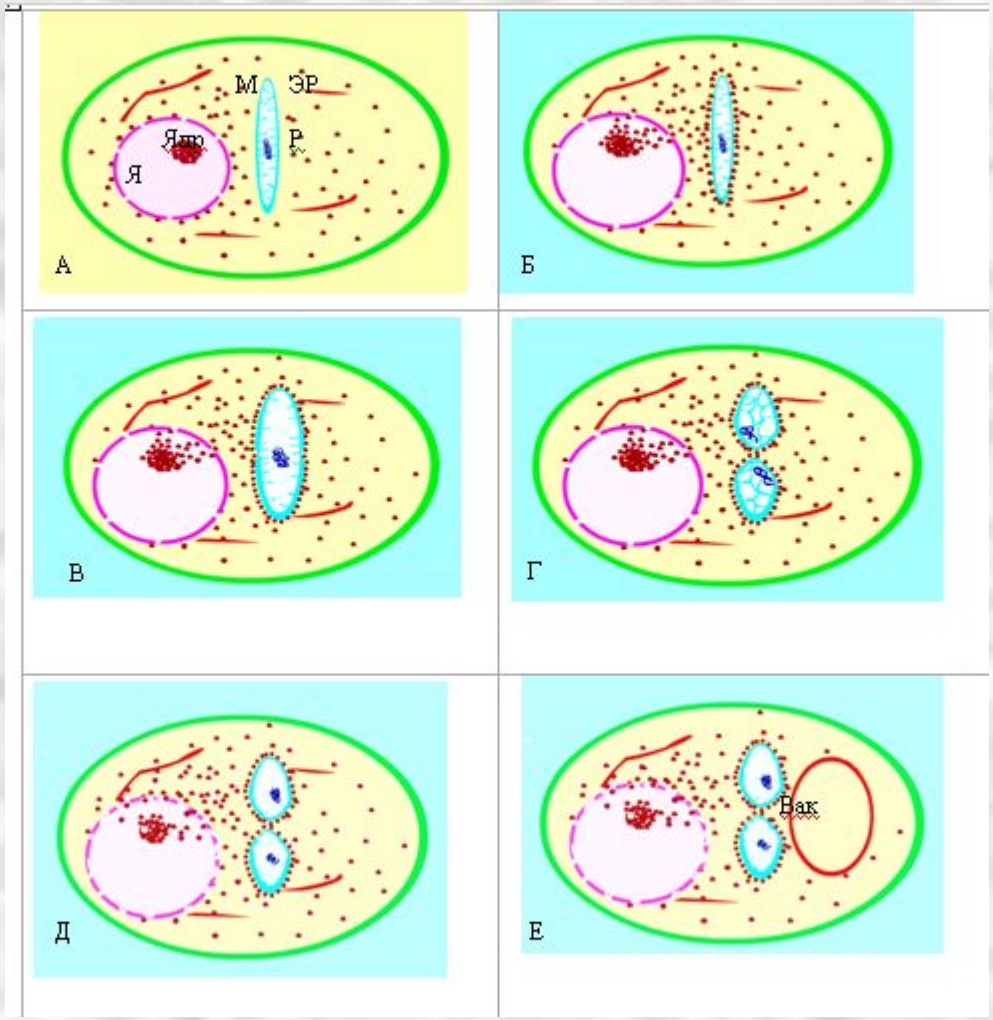
↓

Гибель клеток

Морфология митохондрий клеток глубинного мицелия *Agaricus bisporus*



Ультраструктура клетки глубинного мицелия *Agaricus bisporus* после длительного культивирования



Структурная перестройка клетки мицелия шампиньона двуспорового при изменении условий культивирования (схема):
А - модель клетки *A. bisporus* в воздушной среде обитания
Б, В, Г - модели клеток *A. bisporus* 10 с.р в глубинной культуре