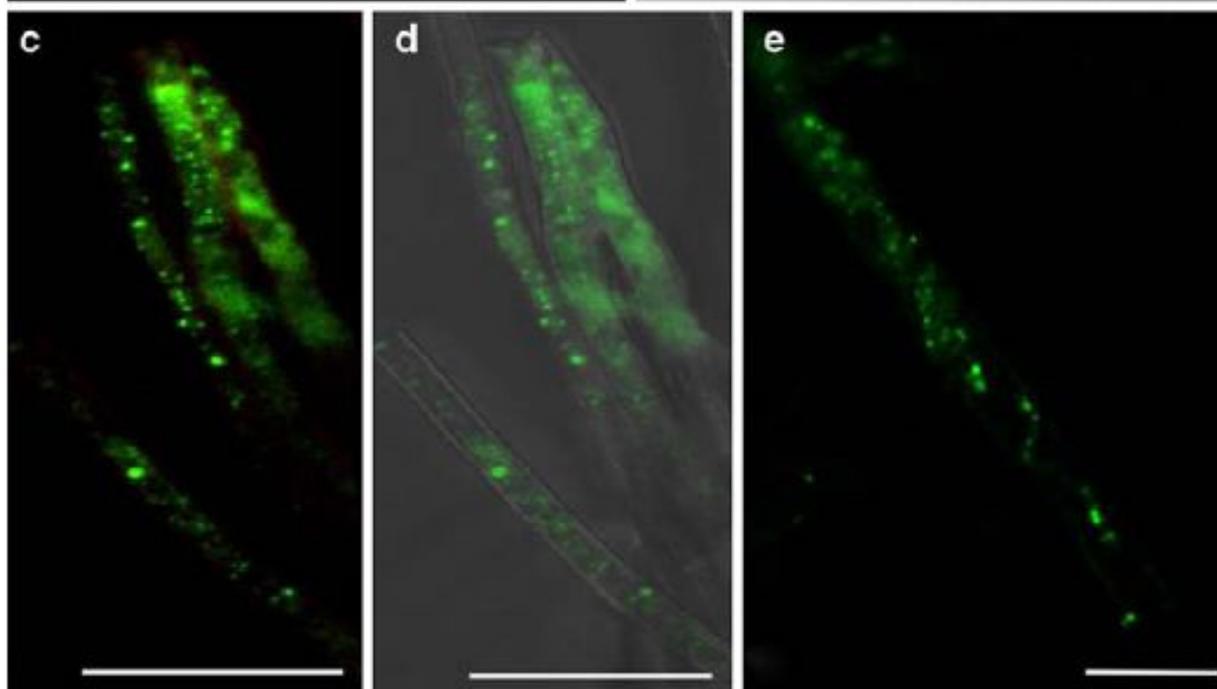


Пероксисомы/Микротельца



Пероксисомы или микротельца – органеллы, окруженные однослойной мембраной. Пероксисомы присутствуют у большинства эукариотических организмов, имеют, как правило, округлую форму и небольшой размер (≤ 1 мкм), но могут быть значительно крупнее и формировать удлиненные или ветвящиеся структуры. Пероксисомы имеют только одну мембрану и не содержат ДНК и рибосом. Так как у них нет собственного генома, все их белки поставляются извне.

Пероксисомы содержат ферменты, ответственные за множество биохимических путей, в частности, β -окисление жирных кислот и метаболизм перекиси водорода. В матриксе пероксисом локализованы ферменты оксидоредуктазы, которые образуют перекись водорода (H_2O_2) при участии молекулярного кислорода (отсюда их название), а также ферменты регуляции активных форм кислорода (АФК). Они выполняют несколько метаболических функций, которые варьируют не только между организмами, но и клетками одного организма. Пероксисомы чрезвычайно динамичные органеллы, подвергаются быстрой перестройке в клетке (размножению или автофагии) в зависимости от условий культивирования, фазы роста и т.д. и работают в тесной связи с другими органеллами (эндоплазматическим ретикулумом, митохондриями).

- Кроме окислительных ферментов, пероксисома обязательно содержит каталазу. Каталаза разлагает образовавшуюся перекись водорода, поскольку она достаточно токсична. В результате разложения перекиси водорода происходит окисление множества субстратов, например фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида, спирта. Этот тип окислительных реакций особенно важен для детоксикации ксенобиотиков (токсичных органических соединений антропогенного происхождения):
- $$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 \rightarrow \text{R}' + 2\text{H}_2\text{O}$$

- Последние данные продемонстрировали, что пероксисомы почкующихся дрожжей, мицелиального гриба *Podospora anserina* и цветкового растения *Arabidopsis thaliana* содержат примерно 200 белков. Известные пероксисомальные ферменты вовлечены в разные анаболические или катаболические пути, часть из которых повсеместны, в то время как другие более специфичны.

Функции пероксисом у эукариот

- Пероксисомы участвуют в регуляции разнообразных процессов развития, таких как узнавание женских/мужских гаметофитов при оплодотворении цветковых растений, дифференциации и миграции нейронов в процессе развития мозга у животных. Более того, у растений пероксисомы снабжают клетки разными сигнальными молекулами. У людей пероксисомы необходимы для разных процессов развития, и их дефицит приводит к множеству аномалий, которые часто летальны.
- У грибов пероксисомы необходимы для утилизации необычных источников углерода и азота, биосинтеза вторичных метаболитов, созревания и прорастания спор, важны для хищных и патогенных грибов (Kiel et al., 2005).

Общие функции

- Общие функции включают пероксисомальный путь β -окисления **жирных кислот**. Этот путь вместе с митохондриальным путем β -окисления позволяет мицелиальным грибам расти на разных жирных кислотах.
- Пероксисомальный путь превращает жирные кислоты в **ацетил коэнзим-А**, важный интермедиат в клеточном метаболизме, участвующий в нескольких путях биосинтеза.
- Анализ мутантов у разных видов грибов показал, что пероксисомальный путь β -окисления жирных кислот является источником ацетил-СoА в **синтезе меланина**.
- Пероксисомальный путь β -окисления некоторых жирных кислот приводит к **формированию пимелиновой кислоты**, предшественника биотина (витамин Н или В7).
- Помимо участия пероксисом в β -окислении жирных кислот, пероксисомы мицелиальных грибов участвуют в нескольких метаболических путях, таких как **метаболизм пурина и аминокислот**.

Специфические функции

- Последняя стадия биосинтеза пенициллина у грибов (проводимая ацилтрансферазой, IAT) происходит в пероксисомах.
- Метилотрофность дрожжей. У растущих на метаноле клеток дрожжей пероксисомы содержат три ключевых фермента метаболизма метанола: алкогольоксидазу (АО), дигидроксиацетон-синтазу (DHAS) и каталазу (CAT). У этих дрожжей алкогольоксидаза, локализованная в пероксисомах, катализирует первую ступень потребления метанола с образованием формальдегида, цитотоксичного компонента, который в дальнейшем окисляется до углекислого газа.
- Получены доказательства участия пероксисом в синтезе сидерофоров (вещества переводящие железо в растворимую форму) у *Aspergillus nidulans* и *A. fumigatus*.

Распространение

- Пероксисомы присутствуют у большинства групп грибов. Исключение составляет группа анаэробных грибов, такие как *Microsporidia*, у которых также отсутствуют настоящие митохондрии. Нет доказательств их присутствия у грибов, обитающих в рубце жвачных животных, *Neocallimasticales*, а микротельце-подобные органеллы гидрогеносомы по последним данным образуются из митохондрий. По-видимому, у анаэробных грибов пероксисомы были вторично утрачены, на что указывает существование ортологов некоторых *rex* генов в геноме у микроспоридий.

Условия формирования

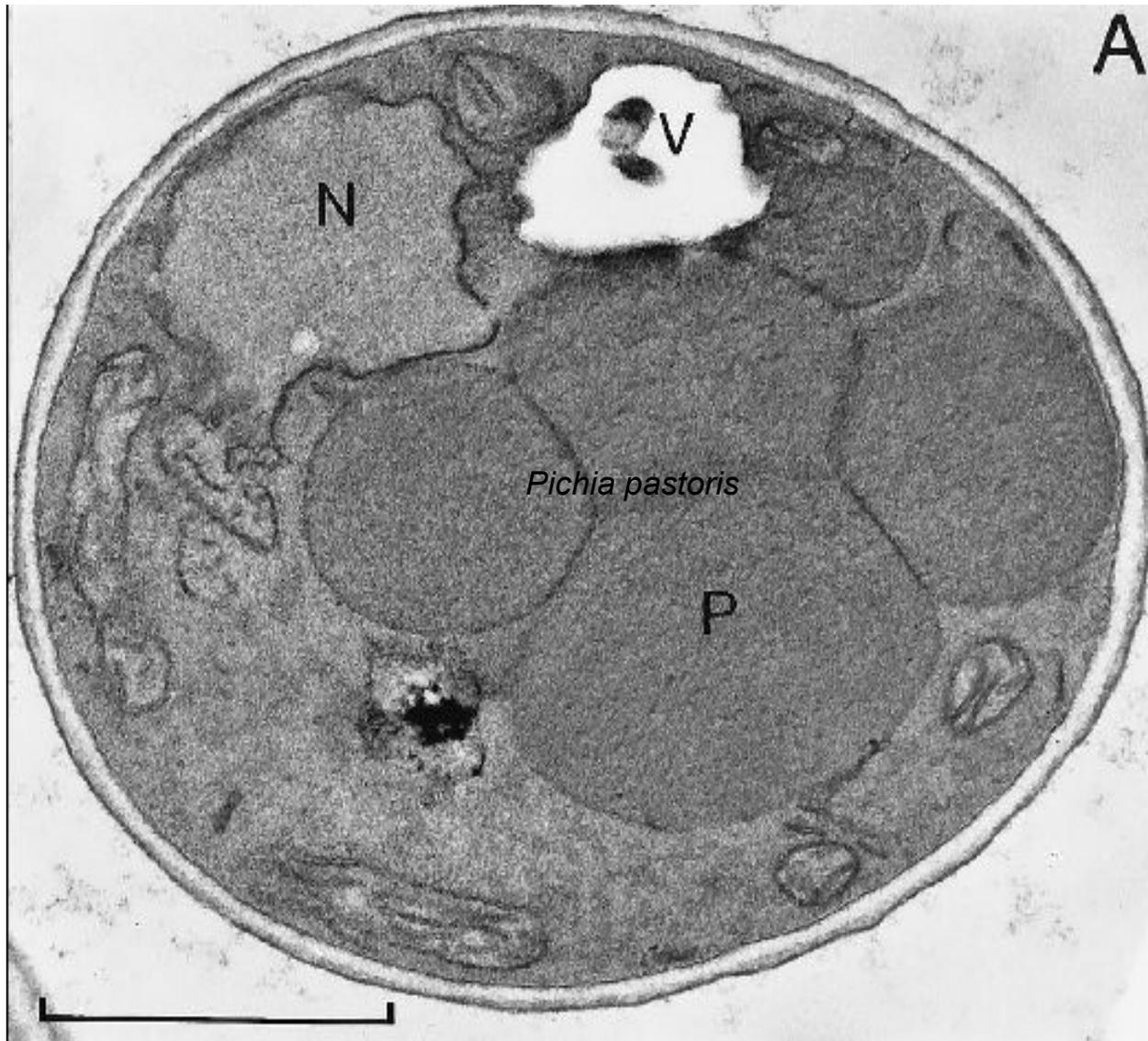
- **Пероксисомы** формируются при росте клеток дрожжей (*Candida*, *Hansenula*, *Pichia*) на метаноле (**метилотрофные** дрожжи) и содержат три ключевых фермента метанольного метаболизма, алкоголь оксидазу (АО), дигидроксиацетон синтазу (DHAS) и каталазу (CAT)

Высокая концентрация АО внутри органеллы приводит к кристаллизации этого белка, что отражается в типичной кубоидной форме органелл

Метилотрофные* и **неметилотрофные** (*Trichosporon cutaneum*) виды дрожжей способны утилизировать несколько органических источников азота. При этом активизируются следующие ферменты пероксисом: амино оксидаза (для утилизации первичных аминов подобных метиламину или этиламину), урат оксидаза и D-амино кислая оксидаза (для утилизации, например, D-alanine). Вместе с этими оксидазами также индуцируется пероксисомальная каталаза параллельно с увеличением размера и числа пероксисом.

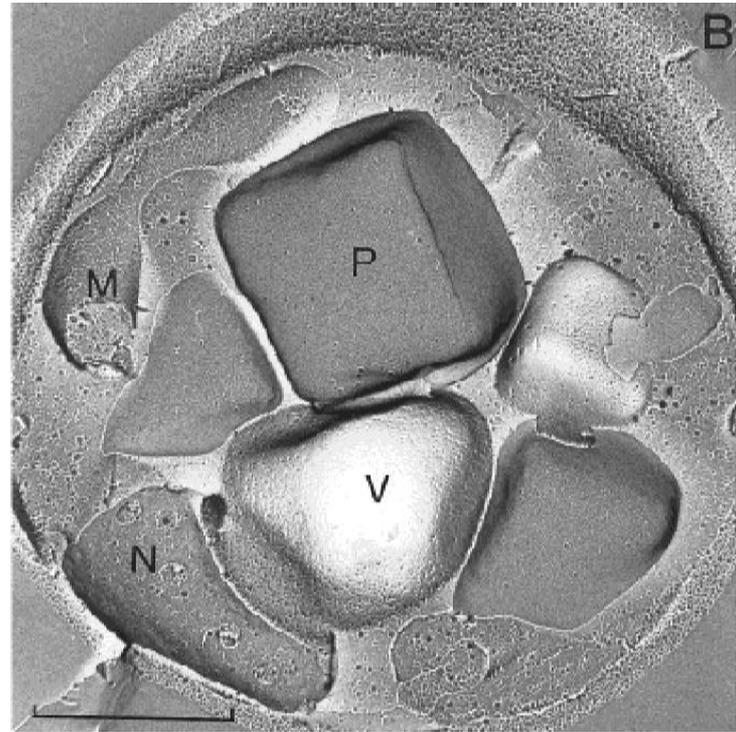
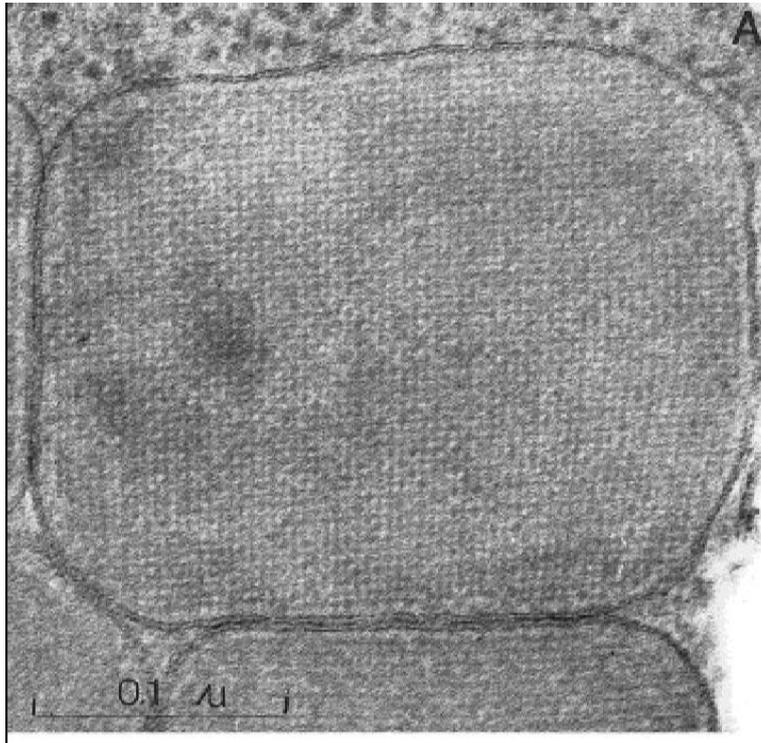
* **метилотрофные** дрожжи – дрожжи, способные использовать C1-соединения (метан, метанол, формиат и др.) в качестве источника энергии и углерода, в некоторых случаях C2- соединения.

Пероксисомы *Pichia pastoris*



Рост на
метаноле
дикий
штамм

Пероксисомы *Hansenula polymorpha*



Биогенез

- Новые пероксисомы всегда возникают из предсуществующих и формируются путем роста и деления органеллы, т. е. размножаются подобно митохондриям и хлоропластам.

- Молекулярные основы биогенеза пероксисом достаточно хорошо изучены. Формирование пероксисом у разных эукариотических организмов характеризуется общей основой биогенетических процессов, происходящих при посредничестве большого числа консервативных белков, известных как пероксины (для которых была принята аббревиатура Pex). Белки, контролирующие динамику пероксисом, классифицируются по их участию в трех основных процессах биогенеза пероксисом:
 - (1) биогенез пероксисомальных мембран,
 - (2) импорт пероксисомальных матриксных белков,
 - (3) пролиферация или деление пероксисом.

Сборка функционирующей пероксисомы требует импорта примерно 100 разных кодируемых ядром белков. Эти белки могут включаться в пероксисомальную мембрану или матрикс органеллы.

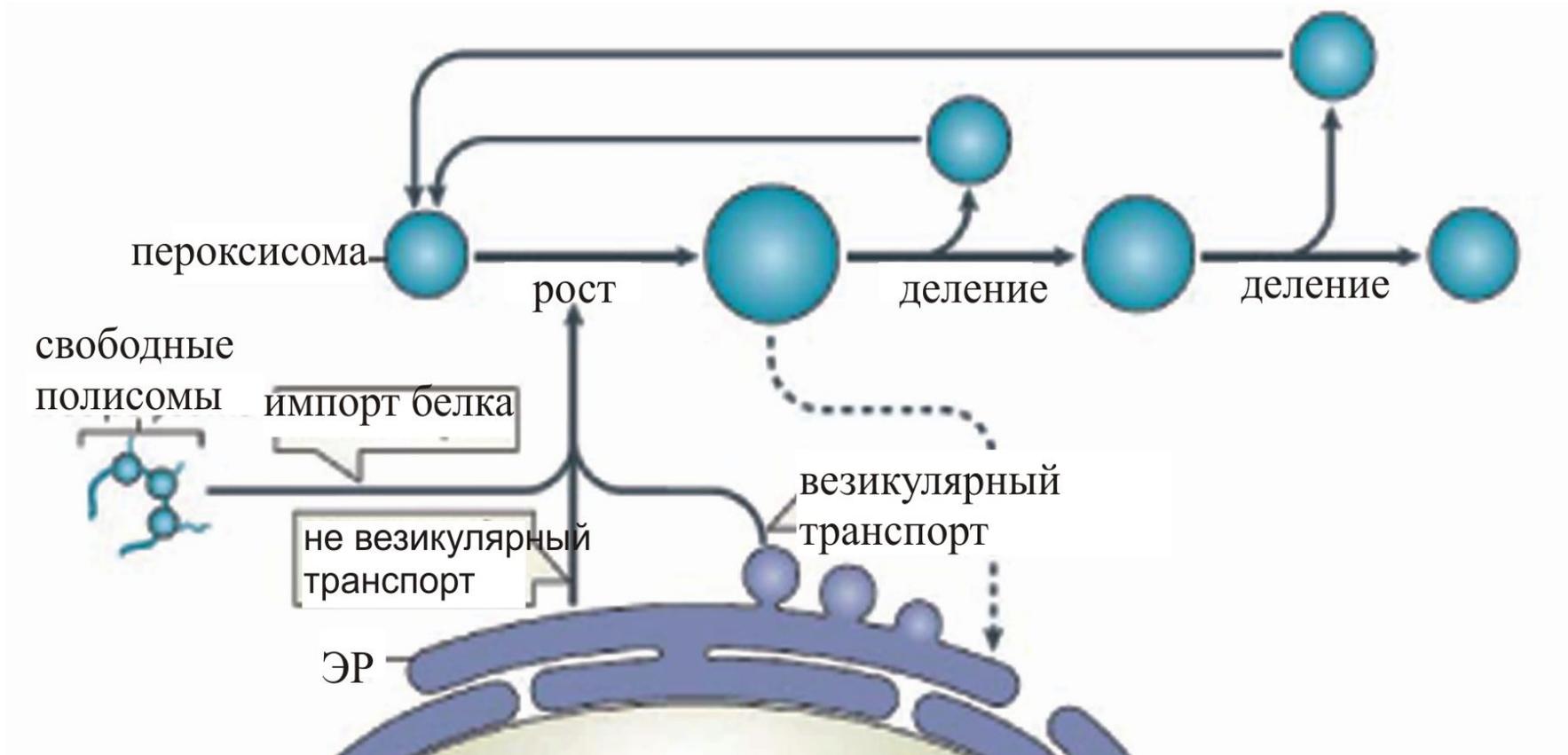
- В настоящее время общепринято, что практически все пероксисомальные матриксные белки (ПМБ) синтезируются на свободных полисомах в цитозоле и посттрансляционно импортируются в предсуществующие органеллы. Имеются доказательства того, что часть ПМБ также поступает от ЭР.

- Для мембранных белков ситуация более сложная; в зависимости от белка и изучаемого организма, биосинтез этого класса молекул происходит на свободных или связанных с ЭР рибосомах. Сборка функционирующей пероксисомальной мембраны требует координированного синтеза и поглощения не только белков, но и липидов. На протяжении многих лет были собраны доказательства участия ЭР в этом процессе сборки. Пероксисомы не способны синтезировать свою собственную фосфолипидную мембрану. В настоящее время показано, что фосфолипиды, требующиеся для растяжения пероксисомальной мембраны, могут поступать из ЭР везикулярным (например, у дрожжей *Pichia pastoris*) и невезикулярным (например, у животных) транспортным путем.

- В биогенезе и включении в мембрану пероксисомальных мембранных белков аскомицета *Podospora anserina* участвуют три пероксисомальных матриксных белка: PEH3, PEH16, PEH19.

- В импорте пероксисомальных матриксных белков используется большой набор пероксинов: PEX1, PEX2, PEX4-PEX10, PEX12-PEX15, PEX17-PEX18, PEX20-PEX22, Pex26, отсутствие которых приводит к формированию пустых оболочек пероксисом.

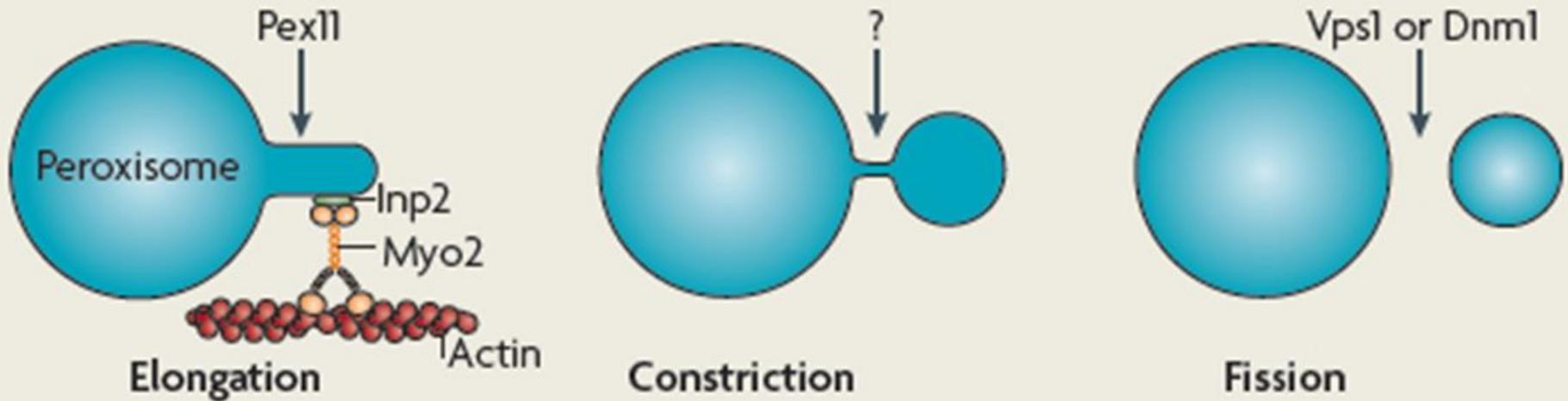
Биогенез пероксисом



- Пероксиновые гены имеют эукариотическое происхождение. Имеется множество высоко консервативных пероксинов, которые, по-видимому, представляют собой основу биогенеза пероксисом ранних эукариот. Показана высокая степень сходства предшественников пероксинов с белками пути деградации ЭР, что предполагает общее эволюционное происхождение пероксисом и ЭР.

белок наследования пероксисом 2 = Inheritance of peroxisomes protein 2 (Inp2), рецептор Myo2

Box 2 | Molecular mechanism of peroxisome division



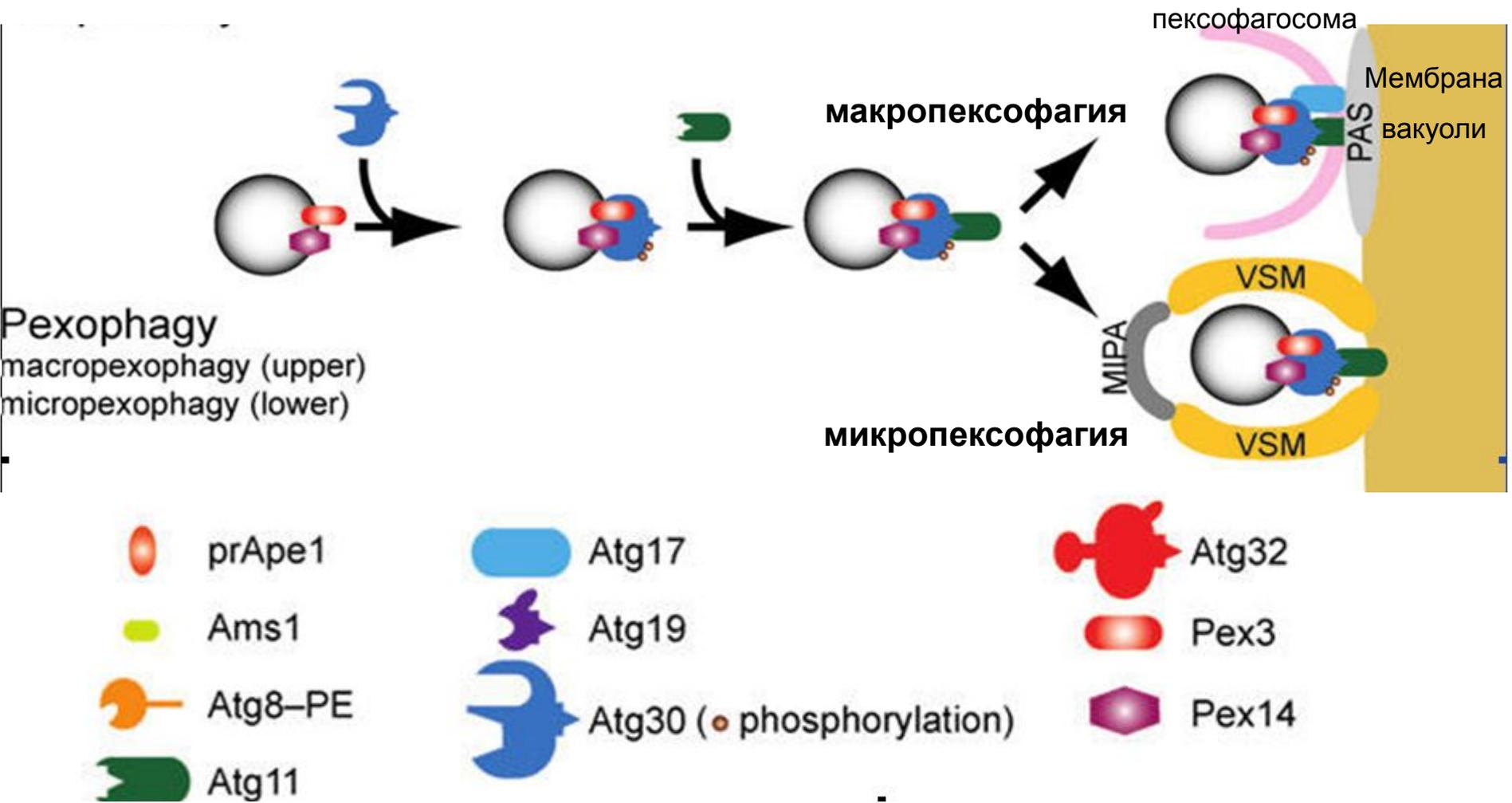
белок наследования пероксисом 2 = Inheritance of peroxisomes protein 2 (Inp2), рецептор Myo2

Пексофагия

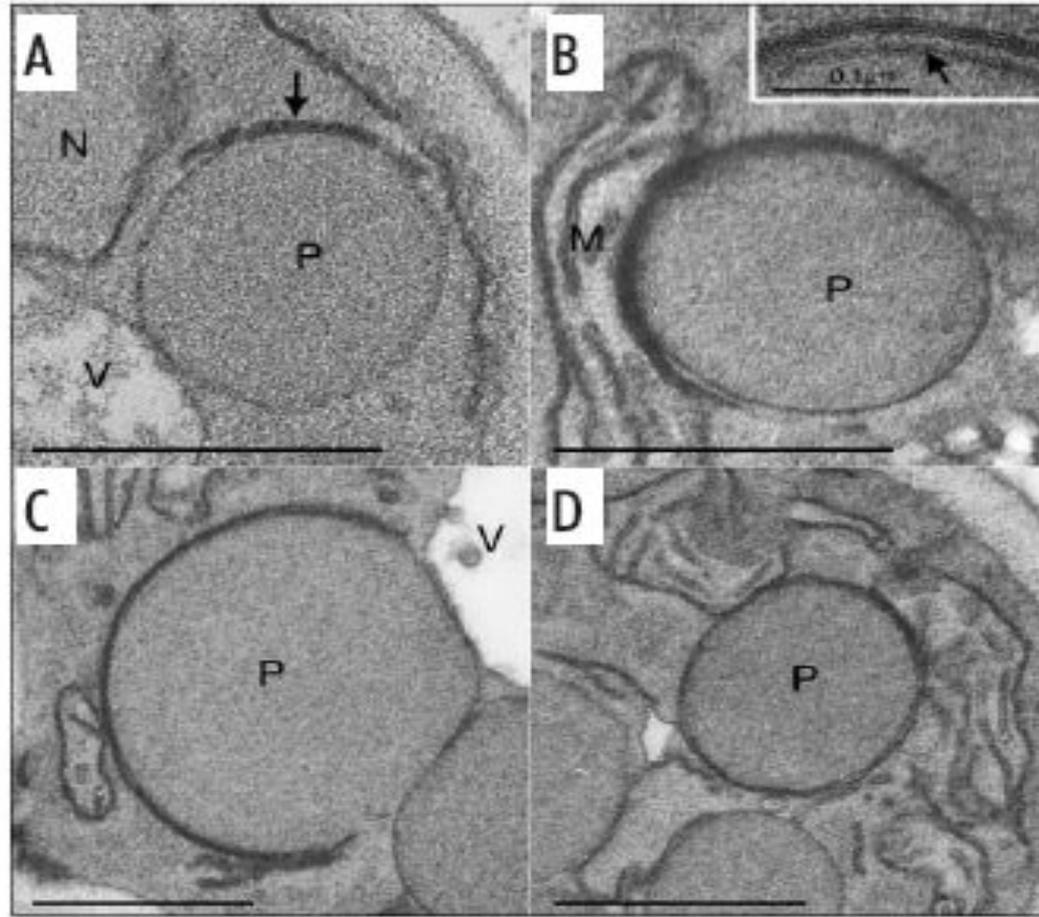
- Для регуляции функций пероксисом и ограничения процесса клеточного старения, лишние и нефункциональные пероксисомы должны быть выборочно удалены. Биохимические и генетические исследования грибов показали, что дегградация пероксисом происходит двумя разными механизмами: **макропексофагией и микропексофагией.**

- Макро- и микропексофагия (аналогичные макро- и микроавтофагии) два морфологически четких типа пероксисомспецифичных вакуолярных/лизосомальных путей деградации, которые используют основные механизмы автофагии:
- (i) в процессе **макропексофагии** индивидуальные пероксисомы селективно поглощаются вновь образованной двумембранной везикулой - эта структура, называемая пексофагосомой (аналогично автофагосомам), в дальнейшем сливается с вакуолярной/лизосомальной мембраной;
- (ii) в течение **микропексофагии** кластер пероксисом постепенно окружается вакуолярными/лизосомальными выступающими мембранами, которые затем замыкаются с формированием чашеобразной двумембранной структуры - микропексофагия-специфичный мембранный аппарат (MIRA).
- Оба типа пексофагии подвергают включенные в лизосому пероксисомы действию гидролаз.

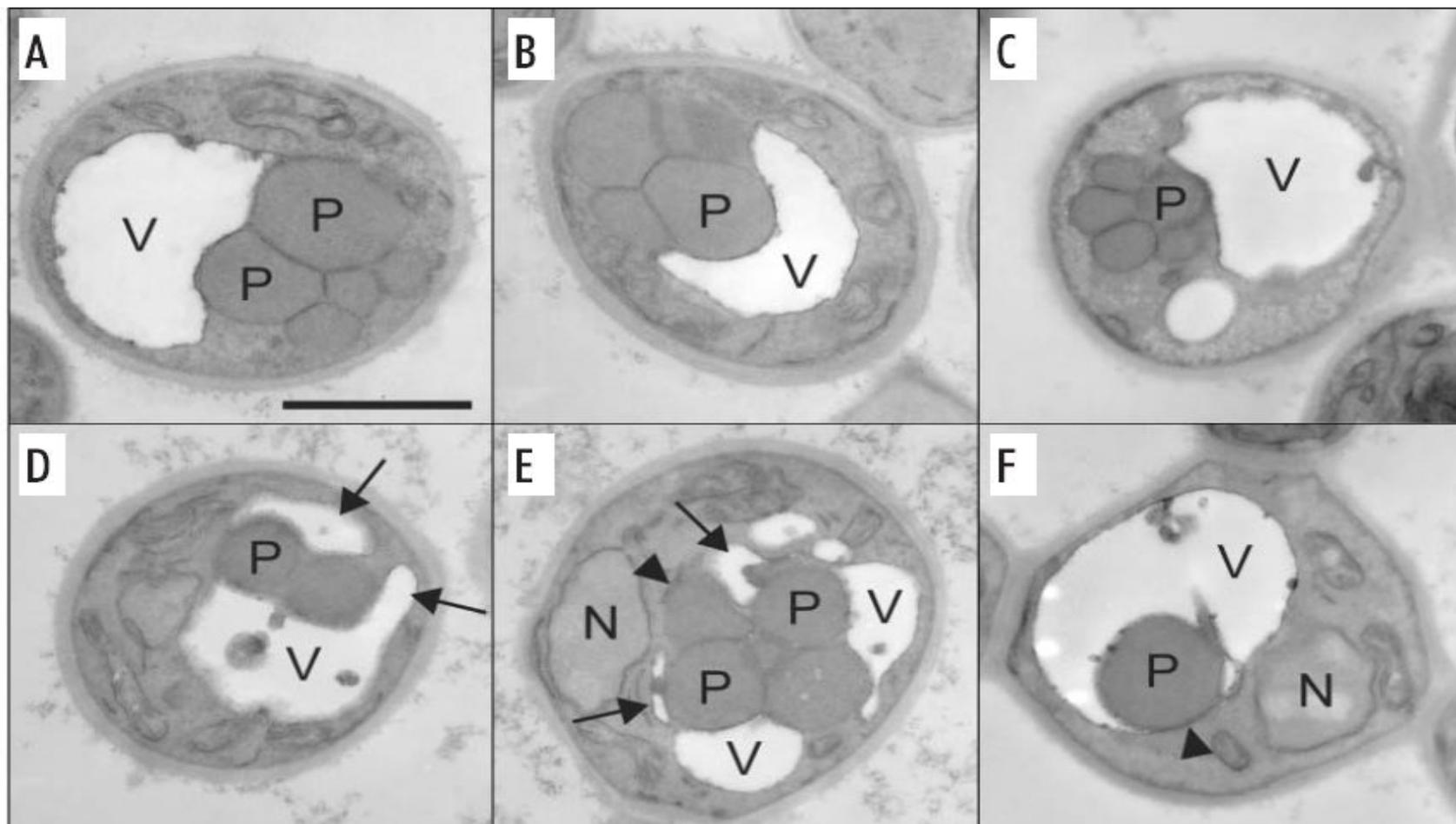
Пексофагия у *Pichia pastoris*



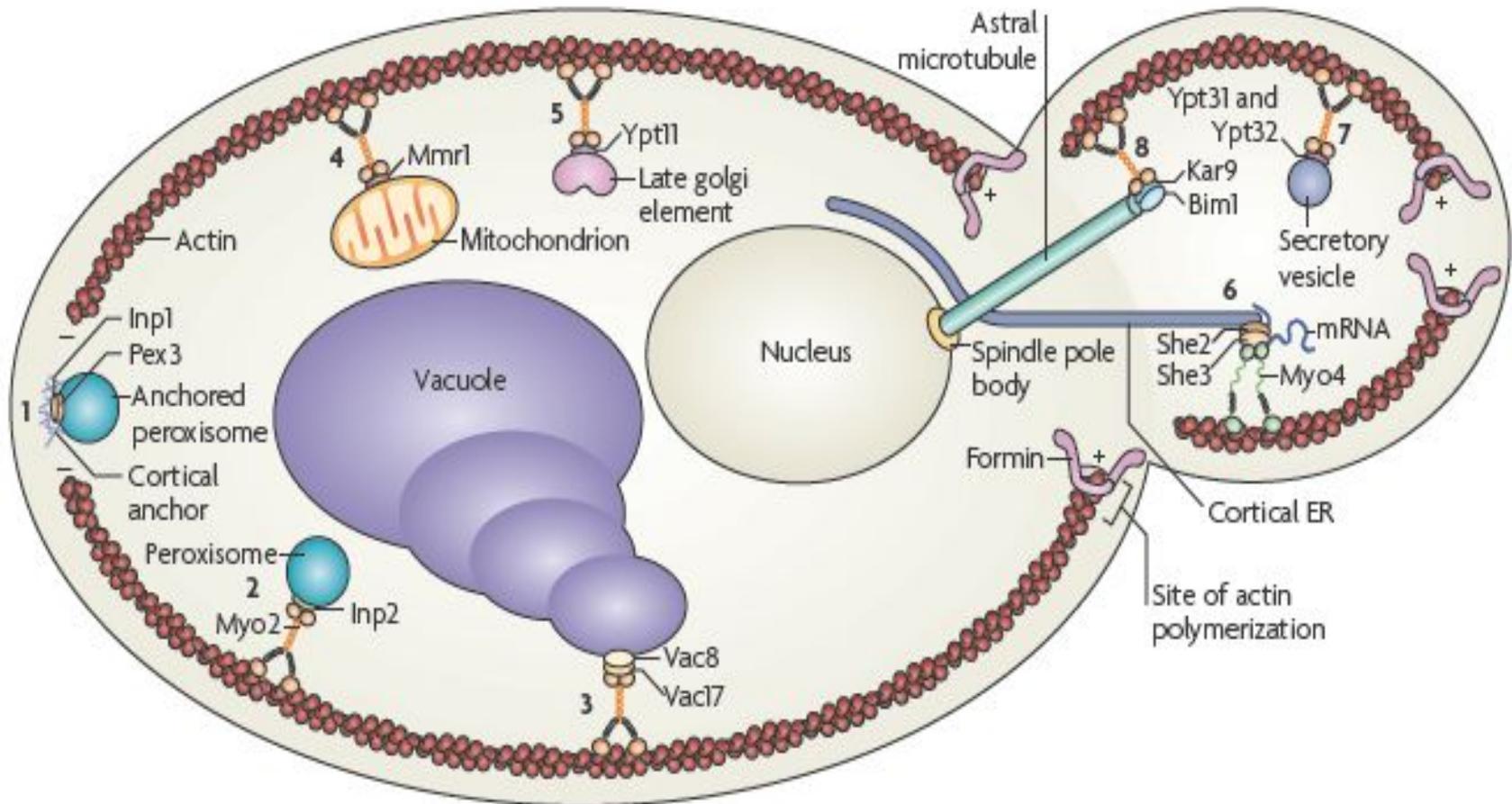
Макропексофагия у *Hansenula polymorpha*



Индуцированная глюкозой микропексофагия у *Pichia pastoris*



Транспорт и наследование пероксисом у дрожжей

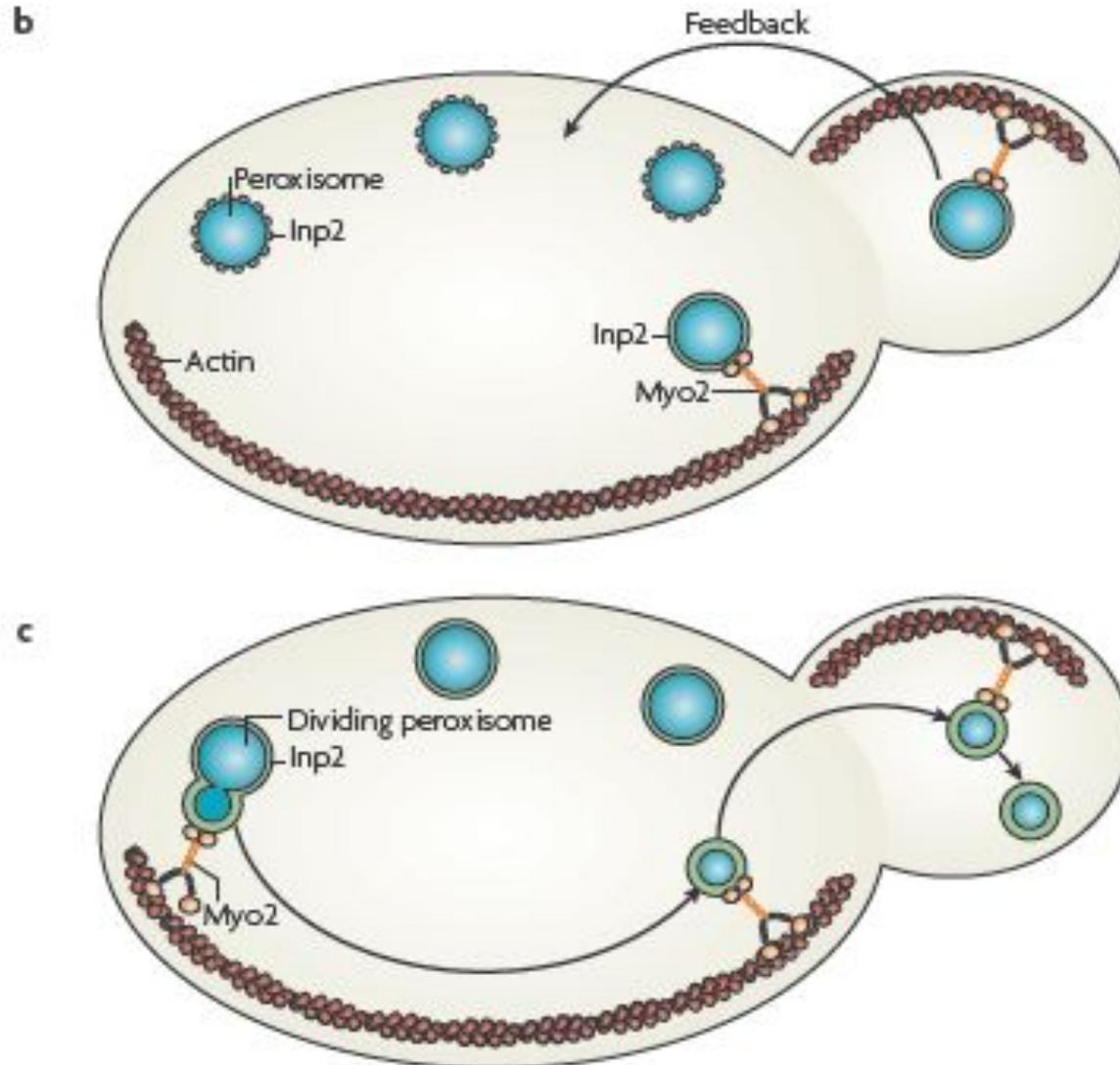


- Пероксисомы занимают строго фиксированное положение в процессе роста почки, что связано с существованием заякоривающего белка/ов. У *S. cerevisiae* обнаружен белок Inp1, который закрепляет пероксисомы у кортекса клетки. Это белок наследования пероксисом 1 = **In**heritance of **p**eroxisomes protein 1 (Inp1), периферический мембранный белок, выполняющий особую роль в иммобилизации пероксисом к клеточному кортексу. Белок Inp1 также участвует в делении пероксисом. Показана его связь с динамин-родственными белками аппарата деления пероксисом Vps1 и Pex25.

Наследование пероксисом

- Пока большинство пероксисом остаются неподвижными у кортекса материнской клетки во время роста почки, некоторые пероксисомы отрываются одна за другой от своих мест прикрепления и двигаются быстро и векторно к дочерней клетке. Наследование пероксисом может по существу рассматриваться как баланс между процессом, который обеспечивает поддержание популяции пероксисом в материнской клетке и процессом переноса оставшейся части пероксисом в дочернюю клетку. Клетки должны координировать это перетягивание каната из органелл для достижения успешного наследования. И в этом процессе участвует еще один важный белок пероксисом Inp2, который является рецептором миозина Myo2.

Деление и перенос пероксисом в дочернюю клетку





Тельца Воронина

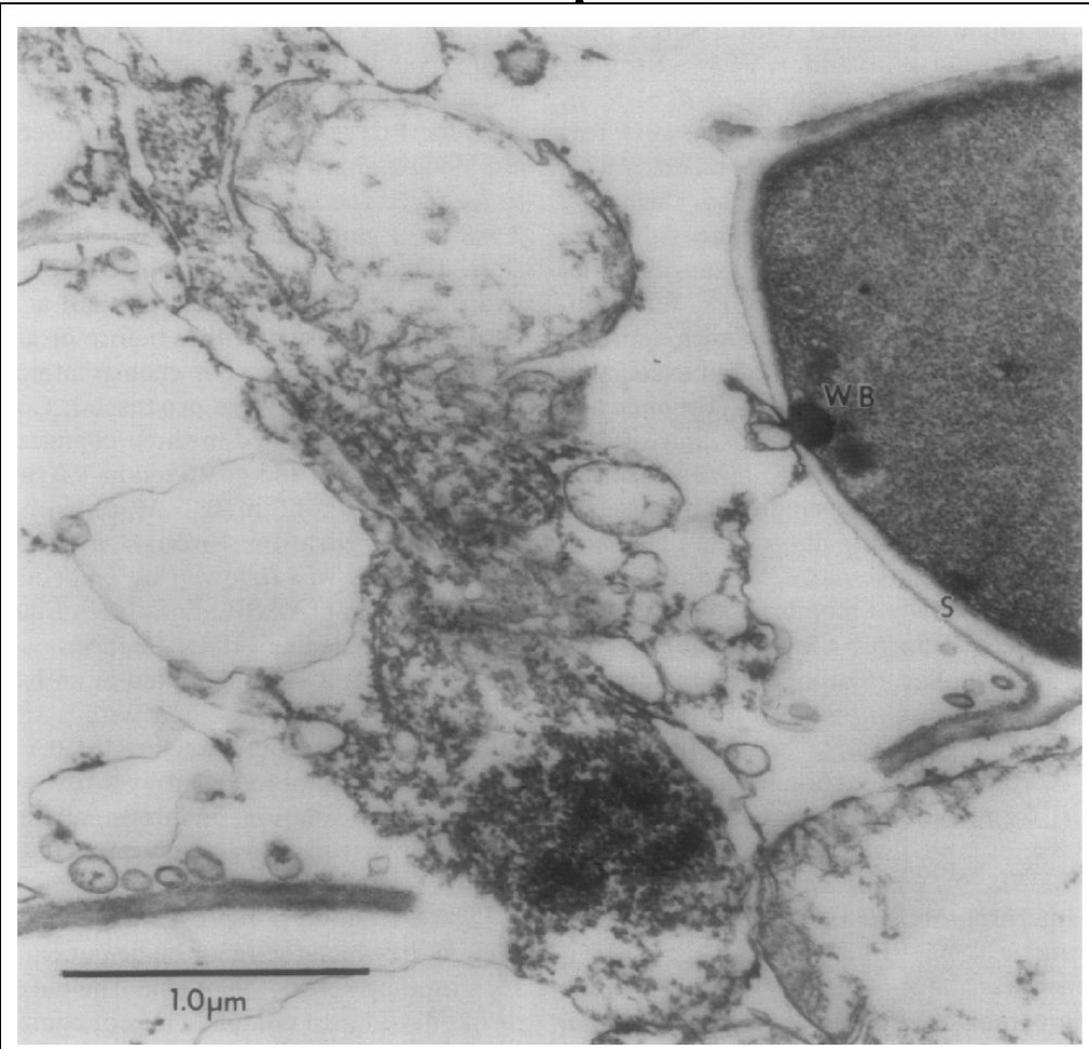


Тельца Воронина названы в честь русского миколога Михаил Степановича Воронина (Buller, 1933), который впервые описал их у *Ascobolus pulcherrimus* (Euascomycete) в 1864 году. Позднее они были обнаружены у многих мицелиальных грибов, включая патогенов растений и животных.

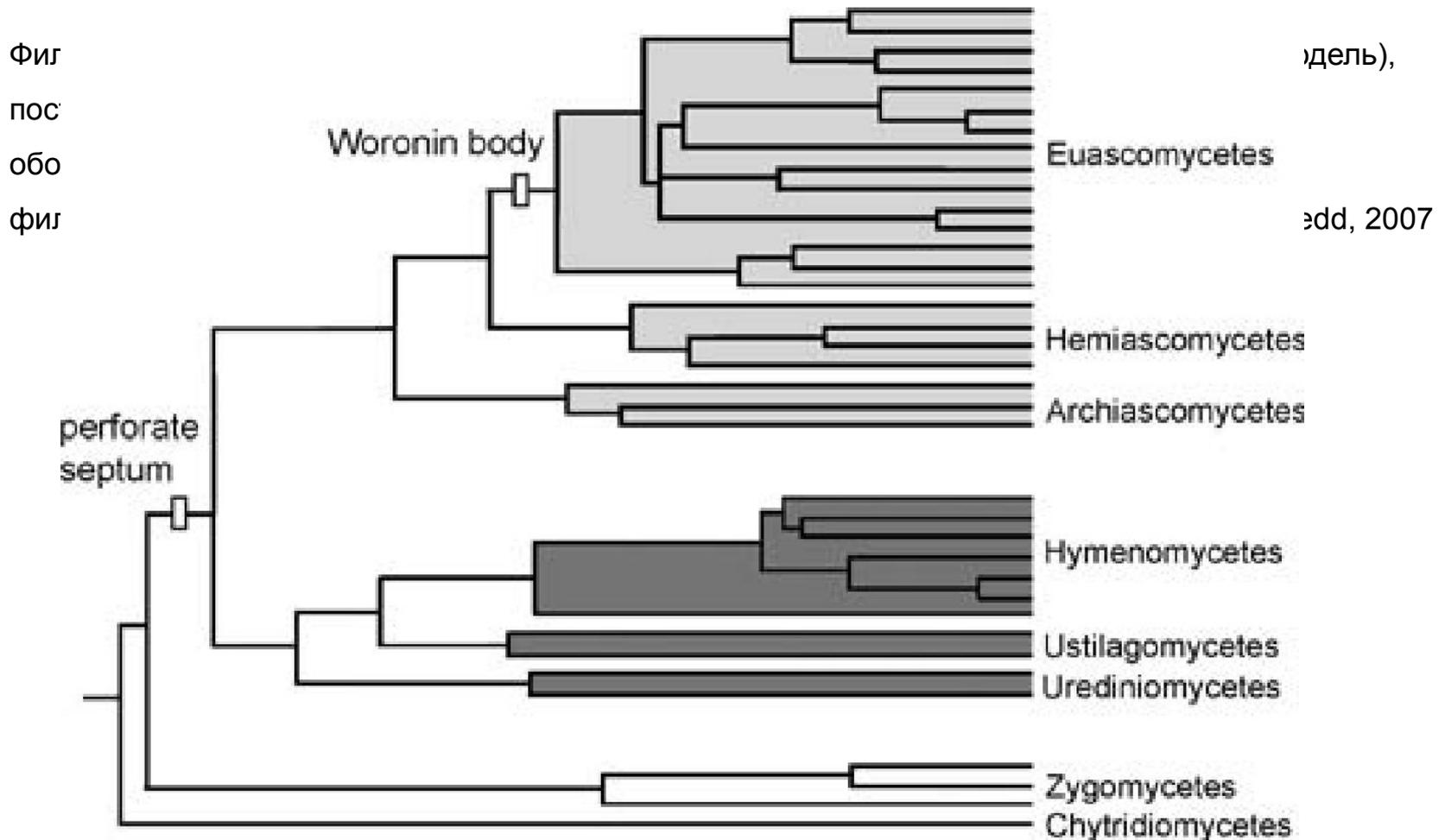
На ультратонких срезах тельца Воронина выглядят как плотные осмиофильные сердцевины, окруженные одинарной мембраной.

Размер телец Воронина варьирует от 100 нм до 1 мкм; этот разброс видоспецифичен и всегда незначительно превышает внутренний диаметр септальной поры.

Функция телец Воронина – встраивание в поровый канал септы для изоляции неповрежденной клетки мицелия

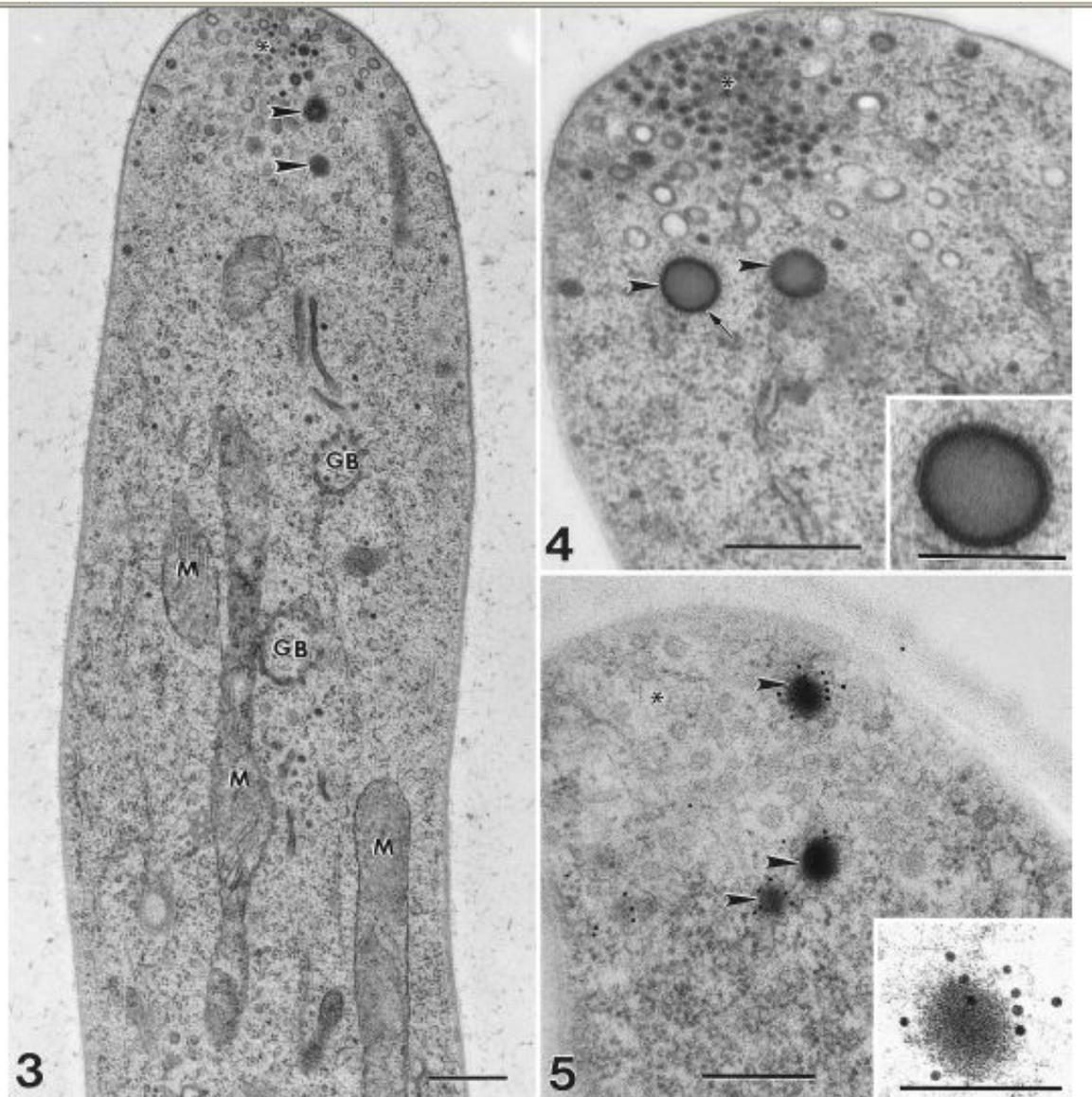


Недавно было показано на мицелии *Aspergillus oryzae*, что регулярное закупоривание септальной поры ТВ происходит и в процессе нормального роста гифы. Эта функция может представлять собой примитивный способ регуляции взаимодействия между клетками мицелия грибов.



Филогенетическое древо грибов дополненное некоторыми характеристиками (рабочая модель), построенное на 18S rRNA (мод. по Verbee and Taylor 2001). Ascomycetes и Basidiomycetes обозначены *светло-серым* и *темно-серым* соответственно. Вне шкалы обозначены филогенетическое происхождение перфорированной септы и телец Воронина Dhavale, Jedd, 2007

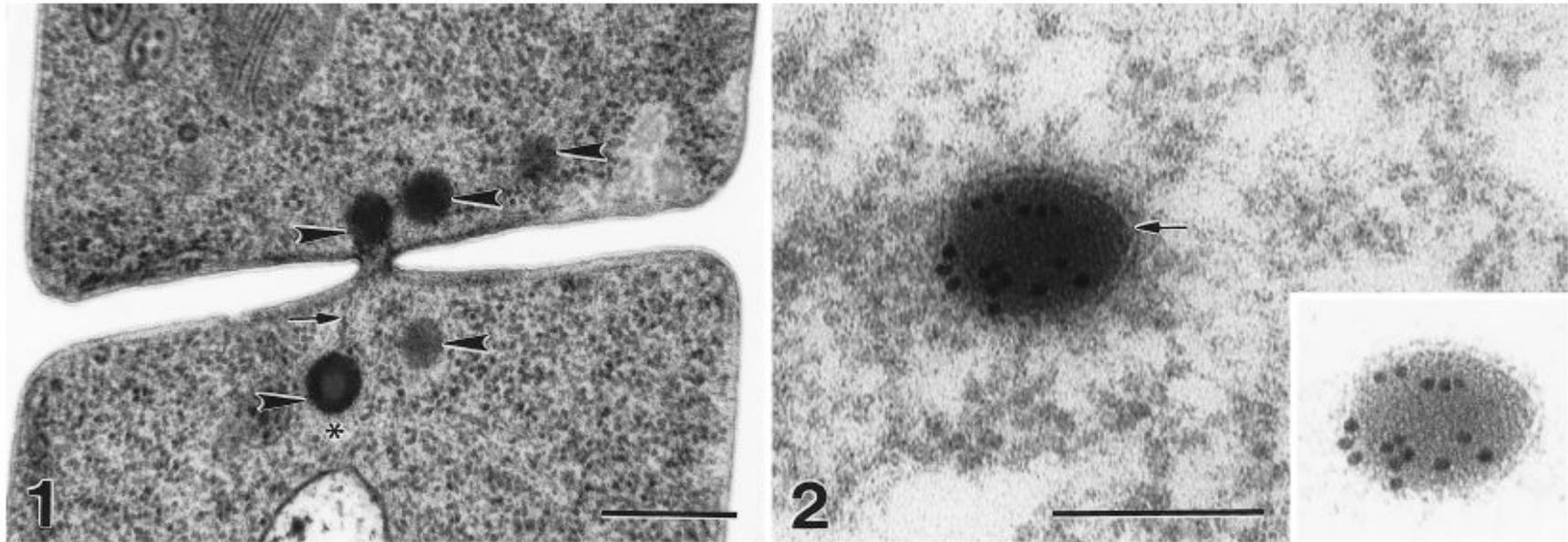
- Тельца Воронина были впервые изолированы из *N. crassa* при использовании центрифугирования в градиенте плотности и показано присутствие уникального для Euascomycetes белка **HEX-1** молекулярной массой 19 kDa, который принадлежит к семейству близко родственных белков. Известны две изоформы белка HEX-1, отличающиеся структурой N-конца. Одна изоформа HEX-1 образует шаровидную форму сердцевины телец Воронина, например, у *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus oryzae* и *Trichoderma reesei*, другая - гексагональную форму сердцевины *N. crassa*.



FIGS. 3-5. Transmission electron micrographs of near median sections through *Aspergillus nidulans* germ tube apical regions. Arrowheads indicate Woronin bodies. Asterisks indicate Spitzenkörper vesicles. 3. Mitochondria (M) and Golgi body equivalents (GB) are visible in the cytoplasm. Bar = 0.25 μm . 4. Woronin bodies are visible just behind the Spitzenkörper. Arrow denotes Woronin body enlarged in inset. Bar = 0.25 μm . Inset: Enlargement of Woronin body marked with arrow. Note surrounding membrane. Bar = 0.125 μm . 5. Apical Woronin bodies labeled with affinity-purified polyclonal antibodies against Hex1 and secondary anti-rabbit antibody coupled to 10 nm gold particles. Bar = 0.25 μm . Inset: Uppermost Woronin

Тельца Воронина в
 апексе гифы *Aspergillus
 nidulans*. Окрашивание
 с использованием
 антител к матричному
 белку микротелец
Neurospora crassa
 –Hex1 (19 kDa белок).

Микротельца Воронина в районе септы у гифы *Aspergillus nidulans* (размер от 100 нм до 1 мкм).



FIGS. 1-2. Transmission electron micrographs of longitudinal sections through *Aspergillus nidulans* septa. 1. Mature septum with five Woronin bodies (arrowheads) near central pore. Arrow indicates possible fibrous connection between Woronin body and septum. Asterisk indicates ribosome-free area surrounding Woronin body. Bar = 0.25 μm . 2. Septal Woronin body labeled with affinity-purified antibodies against Hex1 and secondary anti-rabbit antibody coupled to 10 nm gold particles. Note membrane surrounding Woronin body (small arrow). Inset: Same image overexposed to better show gold particles. Bar = 0.125 μm .

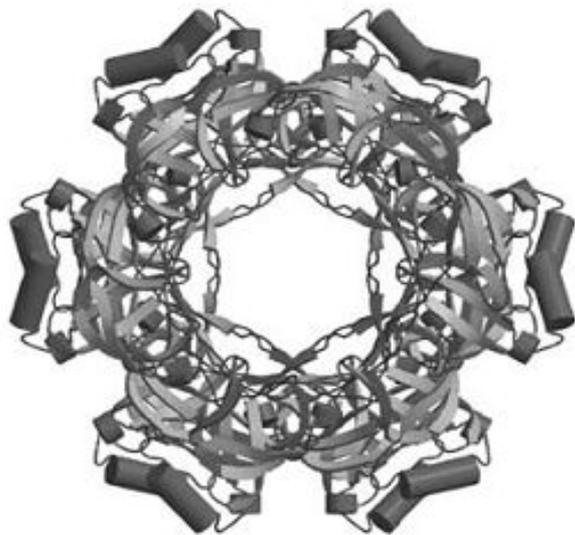
Тельца Воронина у *N. crassa*



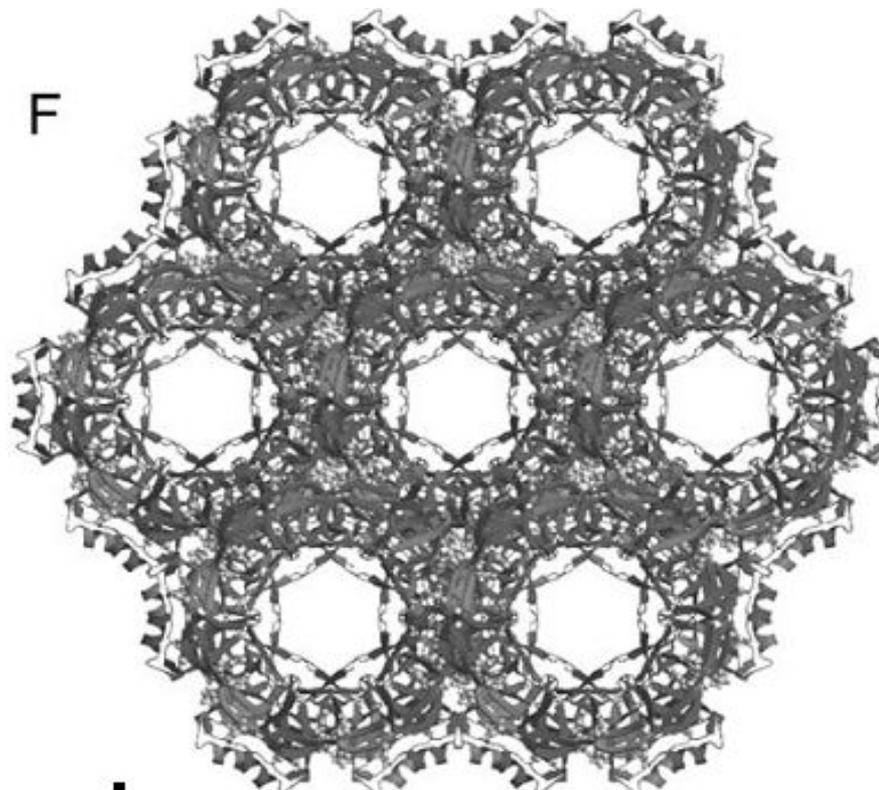
Масштабный отрезок 500 нм.

Структура кристаллической решетки HEX-1

E



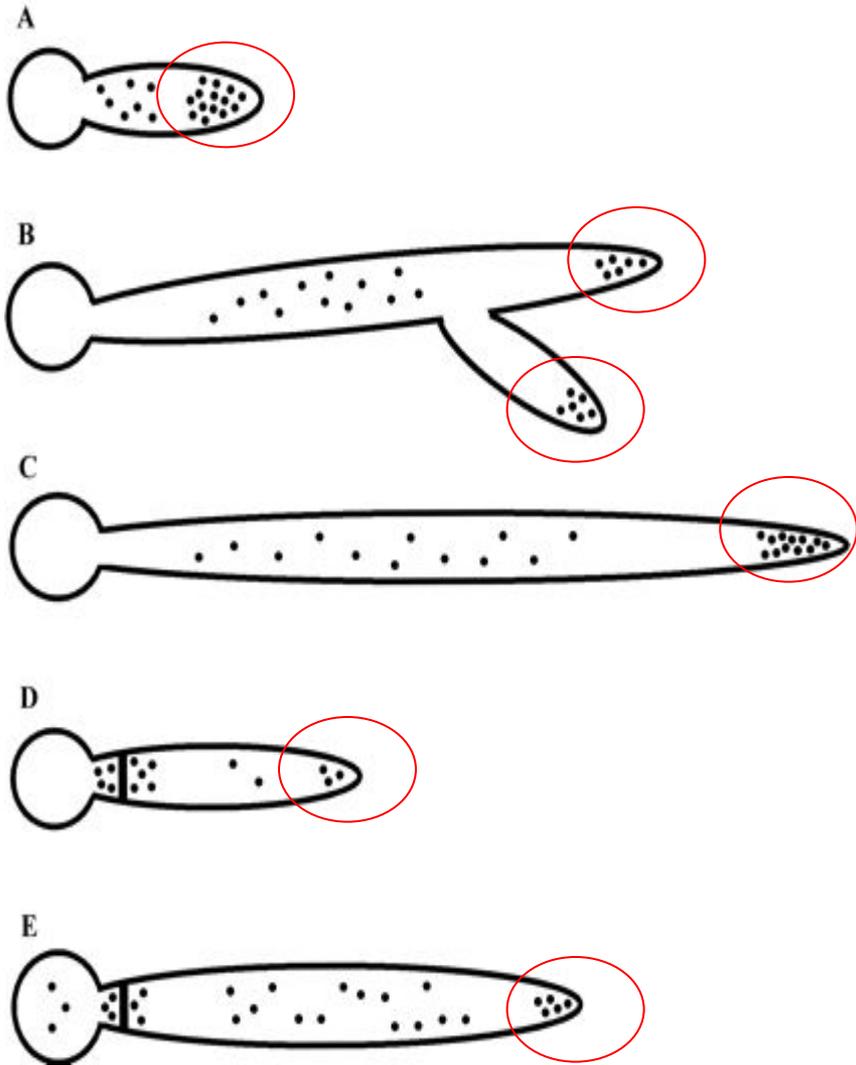
F



Очищенный рекомбинантный HEX-1 *N. crassa* спонтанно самособирается в
гексагональные кристаллы

Биогенез телец Воронина

- Тельца Воронина обнаружены во всех вегетативных гифах и формируются *de novo* без деления предсуществующих телец Воронина. Они формируются внутри пероксисом.



Распределение телец Воронина в пяти образцах мицелия при прорастании конидий *Aspergillus nidulans* до образования первой септы. Исследование с мечеными антителами к Nex1p белку показали, что на стадии прорастания конидии *Aspergillus nidulans* примерно 50% телец Воронина находится в районе будущей септы, а остальные в районе апекса проростка гифы. После формирования септы общее количество телец Воронина остается тем же, но в кончике остается только 12 % телец.

Дифференциация телец Воронина из пероксисомом

Пероксисома

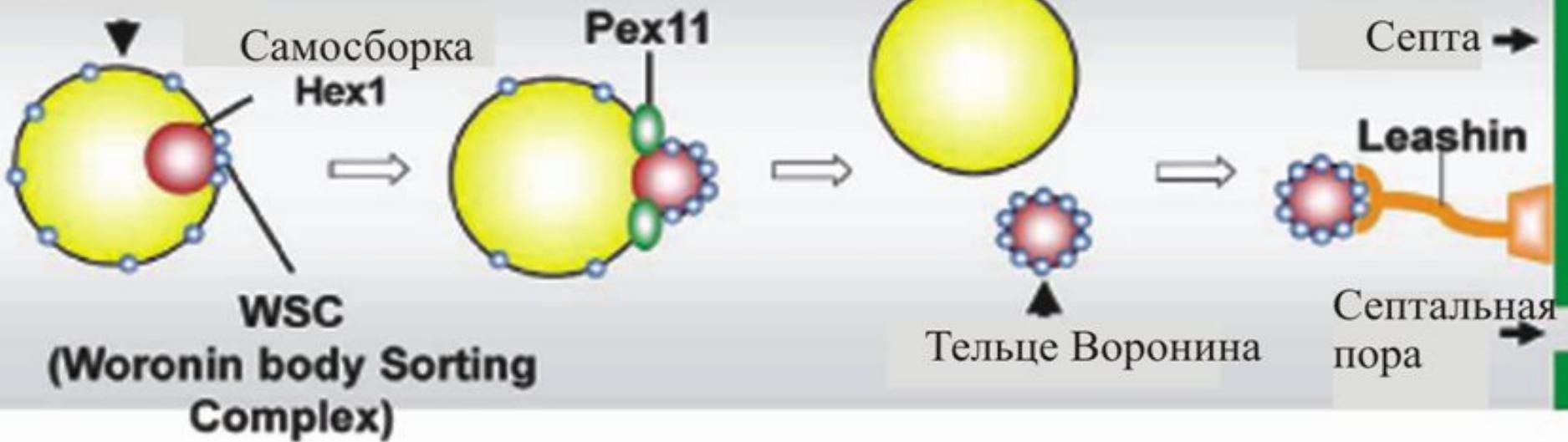


Figure 3. Depiction of a *Neurospora crassa* hyphal apex and subapex with some of the components participating...

