

СИСТЕМА ЦИТОХРОМА P450 МОЖЕТ УЧАСТВОВАТЬ В СВЕТОИЗЛУЧЕНИИ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Могильная О.А., Пузырь А.П., Гительзон И.И.,
Бондарь В.С.

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: roniol@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0522

Аннотация. Приводятся данные, свидетельствующие в пользу участия системы цитохрома P450 в светоизлучении высших грибов. Из мицелия разных видов светящихся базидиомицетов получены экстракты, которые содержат грибные люминесцентные системы, обеспечивающие свечение *in vitro*. Условия выделения систем (обработка биомассы ультразвуком, осветление гомогенатов центрифугированием при 40000g) указывают на наличие в экстрактах мембранных структур, в частности, микросом, образующихся в результате разрушения эндоплазматического ретикула (ЭПР) ультразвуком. Дифференциальный спектральный анализ экстрактов, обработанных дитионитом натрия и СО, выявил наличие двух пиков поглощения при 410 нм и 450 нм, что указывает на наличие цитохромов P450 и b₅. Свечение экстрактов стимулируется восстановленными пиридиновыми нуклеотидами, однако установлено, что больший уровень свечения наблюдается при добавках НАДФН, по сравнению с НАДН. Значения V_{max} световой эмиссии под действием НАДФН практически в 2 раза выше, а значения кажущихся K_m в 2 раза ниже, по сравнению с НАДН. Добавки пероксида водорода значительно (от нескольких раз до 1-2 порядков) увеличивают интенсивность свечения экстрактов, активированных НАД(Ф)Н. Установлено, что добавки флуконазола (5-60 мкг в пробе) существенно ингибируют световую эмиссию экстрактов – наблюдается снижение как исходного уровня свечения, так и свечения после добавок НАД(Ф)Н. Совокупность полученных данных свидетельствует, что в механизме светоизлучения высших грибов может участвовать ассоциированная с мембранами ЭПР система цитохрома P450 с вовлечением в процесс электронно-транспортных ферментных систем: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома P450 – цитохром P450 и НАДН-зависимая редуктаза цитохрома b₅ – цитохром b₅ – цитохром P450. В этом случае цитохром P450 может осуществлять гидрокселирование гиспидина (прекурсор субстрата люминесцентной реакции) с образованием люциферина и катализировать его окисление в присутствии АФК с излучением света.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, мицелий, гиспидин, система цитохрома P450, восстановленные пиридиновые нуклеотиды, флуконазол, пероксид водорода.

Несмотря на внушительные успехи, достигнутые за последнее десятилетие в исследованиях биолюминесценции высших грибов [1-10], некоторые биохимические аспекты этого феномена пока недостаточно ясны и требуют дальнейшего изучения. Ранее была высказана гипотеза об участии активных форм кислорода (АФК) и ферментов с оксидазной функцией в механизмах свечения базидиомицетов [11-13], которая подтверждается результатами наших предыдущих исследований [14-17]. В частности, в этих работах мы высказывали предположение, что в механизм грибного светоизлучения может вовлекаться система цитохрома P450, которая катализирует окисление органических субстратов (включая грибной люциферин) с излучением квантов видимого света [14-16]. В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу участия системы цитохрома P450 в реакции светоизлучения высших грибов.

Для исследований использовали мицелий разных видов светящихся базидиомицетов (*Neonothopanus nambi*, *Armillaria borealis*, *Armillaria* sp., *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*) из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск). Эксперименты проводили с мицелием в виде шарообразных пеллет, полученных при глубинном культивировании грибов в жидких питательных средах («HiMedia Laboratory», Индия) [5,18,19]. Холодные экстракты, содержащие грибные люминесцентные системы, получали разрушением биомассы механически измельченных пеллет мицелия ультразвуком (дезинтегратор «Волна», Россия) с последующим центрифугированием гомогенатов при 40000g (центрифуга Avanti® J-E, «Beckman-Coulter», США) [1,5]. Полученные супернатанты отбирали для исследований. В качестве субстрата люминесцентной реакции использовали горячий экстракт из мицелия несветящегося высшего гриба *Pholiota squarrosa* (Коллекция ССIBSO 836) [5], содержащий гиспидин [2]. Доказано, что гиспидин является, по крайней мере, одним из предшественников субстрата реакции светоизлучения высших грибов, который преобразуется НАД(Ф)Н-зависимой гидроксилазой в 3-гидроксигиспидин (люциферин) и затем окисляется люциферазой с излучением квантов видимого света [2,3,7]. Световую эмиссию холодных экстрактов активировали добавками восстановленных пиридиновых нуклеотидов, которые являются необходимыми компонентами функционирования грибных люминесцентных систем [20,21], и горячего экстракта из *P. squarrosa*. Интенсивность и динамику световых сигналов регистрировали с помощью люминометра Glomax® 20/20 («Promega BioSystems Sunnyvale, Inc.», США). Наличие цитохрома P450 в экстрактах оценивали методом дифференциальной спектроскопии [22,23]. Метод основан на появлении в спектре поглощения характерного

спектрального сдвига при связывании монооксида углерода с восстановленным атомом железа гемма в активном центре фермента и позволяет выявлять наличие активной формы цитохрома P450 в сложных биологических системах без необходимости его выделения [24]. Дифференциальный спектральный анализ проводили на UV/VIS спектрофотометре UVIKON 943 («Kontron Instruments», Италия) в диапазоне длин волн 300-700 нм после обработки образцов экстрактов дитионитом натрия и последующей обработки опытной пробы CO. В экспериментах оценивали эффект флуконазола на интенсивность свечения экстрактов, поскольку известно, что азольные соединения являются ингибиторами цитохромов P450 [25]. Для исследований использовали: НАДФН, НАДН и дитионит натрия («Serva», Германия), флуконазол («Dr. Reddy's Laboratories Ltd.», Индия), пероксид водорода (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия).

В работе было показано, что полученные из мицелия изучаемых видов базидиомицетов холодные экстракты содержат функционально активные люминесцентные системы, обеспечивающие свечение *in vitro* при добавках восстановленных пиридиновых нуклеотидов и субстрата реакции. Анализ условий выделения систем использованным в работе способом (ультразвуковая обработка биомассы и осветление гомогенатов при ускорении 40000 g) указывают на наличие в экстрактах мембранных структур. Положительный эффект Тиндаля, наблюдающийся в экстрактах, свидетельствует об их неоднородности и присутствии нерастворимых частиц. В частности, такими структурами могут являться микросомы и их фрагменты, образующиеся при ультразвуковом разрушении эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Хорошо известно, что обработка биомассы ультразвуком применяется для получения микросом, а центрифугирование гомогенатов при ускорениях более 15000 g позволяет удалять крупные обломки клеточных мембран, ядра и митохондрии [26]. Следует сказать, что ранее мы установили необходимость ультразвуковой обработки биомассы грибного мицелия для получения экстрактов, содержащих активные люминесцентные системы [5]. Было показано, что экстракты, полученные при простом механическом разрушении мицелия с последующим осветлением гомогенатов центрифугированием, либо не обладали свечением при добавках НАД(Ф)Н и субстрата, либо уровень их световой эмиссии был крайне мал.

Дифференциальным спектральным анализом в обработанных дитионитом натрия и CO экстрактах выявлено наличие двух пиков поглощения с λ_{\max} при 410 нм и 450 нм (рис. 1). Это указывает на наличие в образцах экстрактов цитохромов P450 и b₅.

В экспериментах показано, что свечение холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов стимулируется восстановленными пиридиновыми нуклеотидами. Однако при этом было установлено, что больший уровень люминесценции наблюдается при добавках НАДФН, по сравнению с добавками НАДН. Из расчетов кинетических показателей (табл. 1) следует, что значения V_{\max} световой эмиссии при использовании НАДФН практически в 2 раза выше, а значения кажущихся K_m в 2 раза ниже, чем при использовании НАДН.

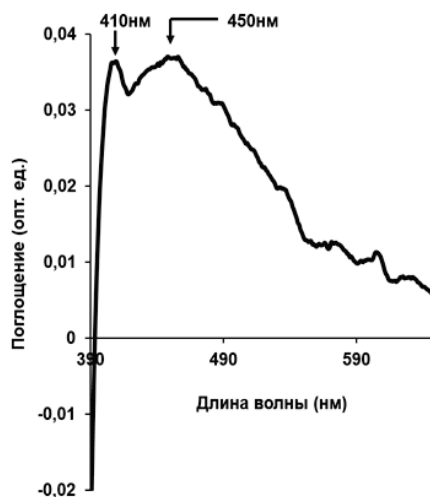


Рисунок 1. Дифференциальный спектр поглощения экстракта из гриба *N. nambi*: контроль (дитионит) – опыт (дитионит + CO)

Таблица 1. Значения кинетических показателей V_{\max} и K_m , рассчитанные из зависимостей интенсивности свечения холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов от концентрации НАД(Ф)Н (на примере экстрактов из грибов *N. nambi* и *A. borealis*)

Базидиомицет	V_{\max} НАДФН (отн. ед.)	V_{\max} НАДН (отн. ед.)	K_m НАДФН (мкМ)	K_m НАДН (мкМ)
<i>N. nambi</i>	$7,21 \cdot 10^6$	$3,96 \cdot 10^6$	43	85
<i>A. borealis</i>	$2,44 \cdot 10^7$	$1,10 \cdot 10^7$	46	92

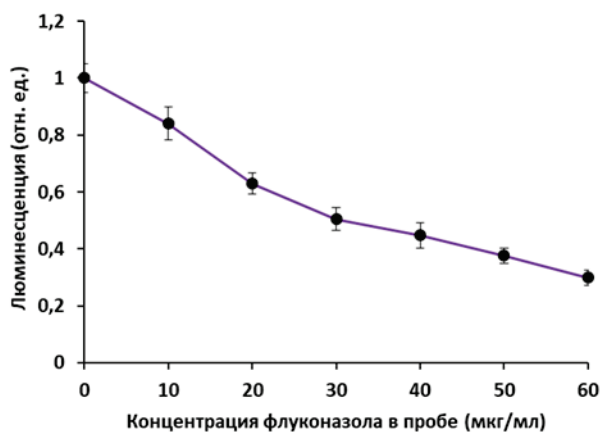


Рисунок 2. Интенсивность люминесценции холодного экстракта из мицелия базидиомицета *A. borealis* в зависимости от концентрации флуконазола. Показания нормированы на величину световой эмиссии контрольных образцов экстракта (без добавления флуконазола)

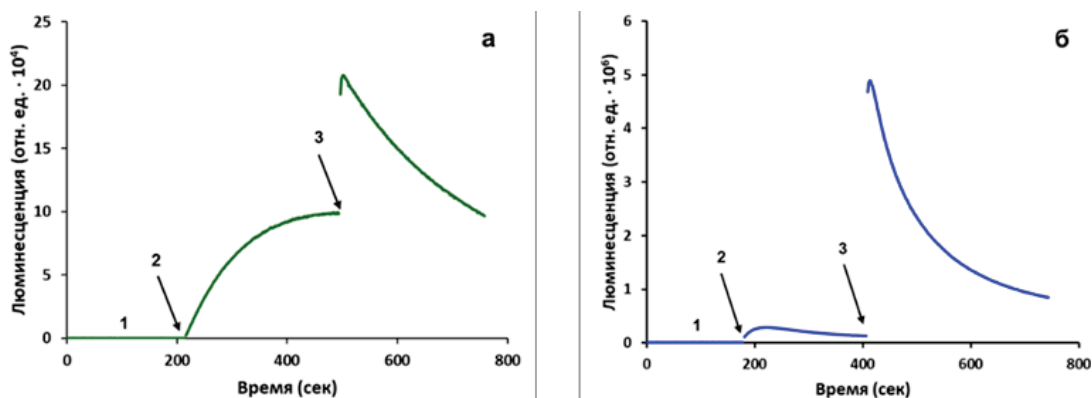


Рисунок 3. Эффект стимуляции свечения холодных экстрактов из мицелия грибов *P. stipticus* (а) и *M. citricolor* (б) пероксидом водорода: 1 – начальный уровень люминесценции, 2 – активация свечения добавками НАДФН и субстрата реакции, 3 – уровень световой эмиссии после добавления H_2O_2 . Стрелками показаны моменты добавления реагентов к экстрактам

В экспериментах установлено, что добавки флуконазола (5-60 мкг в пробе) к холодным экстрактам из разных видов базидиомицетов существенно подавляют их световую эмиссию при последующем добавлении НАДФ(Ф)Н и субстрата реакции. В качестве примера на рисунке 2 представлен ингибирующий эффект флуконазола на люминесценцию экстракта из мицелия гриба *A. borealis*.

Как показали исследования, интенсивность свечения холодных экстрактов из мицелия разных видов базидиомицетов, активированных НАДФН и субстратом реакции, значительно (от нескольких раз до 1-2 порядков) возрастает при добавках пероксида водорода (рис. 3). В качестве примера на рисунке представлена стимуляция свечения экстрактов из базидиомицетов *M. citricolor* и *P. stipticus* добавками H_2O_2 .

Таким образом, совокупность полученных в работе экспериментальных данных свидетельствует, что в механизме светоизлучения высших грибов может участвовать ассоциированная с мембранами ЭПР система цитохрома Р450 с вовлечением в процесс электронно-транспортных ферментных систем: НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома Р450 – цитохром Р450 и НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома b_5 – цитохром b_5 – цитохром Р450 (рис. 4).

Из представленной выше схемы следует, что при функционировании системы цитохром Р450 может осуществлять гидрокселирование гиспидина с образованием люциферина и катализировать его окисление в

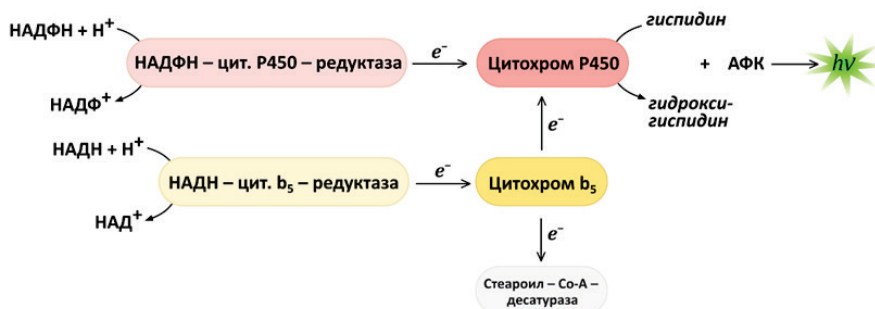


Рисунок 4. Гипотетический механизм свечения высших грибов с участием системы цитохрома Р450

присутствии АФК с излучением квантов видимого света. Такой механизм участия системы цитохрома Р450 в светоизлучении высших грибов представляется вполне возможным. Известно, что цитохромы Р450: являются гем-содержащими монооксигеназами; участвуют в окислительной трансформации широкого спектра органических соединений; катализируют реакцию гидроксирования с образованием АФК, в частности, пероксида водорода, принимающего участие в катализируемых данными ферментами окислительных реакциях [27-29].

В целом, результаты проведенных исследований дополняют и развивают представления о механизмах биолюминесценции высших грибов. Они свидетельствуют в пользу того, что в светящихся базидиомицетах генерация квантов видимого света может обеспечиваться двумя путями – за счет функционирования системы НАД(Ф)Н-зависимая гидроксилаза – люцифераза [2] и системы цитохрома Р450.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0287-2021-0016).

Список литературы / References:

1. Bondar V.S., Puzyr A.P., Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Shpak B.A., Tyaglik A.B., Shimomura O., Gitelson J.I. Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 455, doi: 10.1134/S1607672914020045.
2. Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S. et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, vol. 54, doi: 10.1002/anie.201501779.
3. Oba Y., Suzuki Y., Martins G.N.R. et al. Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2017, vol. 16, doi: 10.1039/c7pp00216e.
4. Kaskova Z.M., Dorr F.A., Petushkov V.N. et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Science Advances*, 2017, vol. 3, doi: 10.1126/sciadv.1602847.
5. Puzyr A.P., Medvedeva S.E., Artemenko K.S., Bondar V.S. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2017, vol. 7, doi: 10.5943/cream/7/3/9.
6. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A. et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, doi: 10.1073/pnas.1803615115.
7. Teranishi K. Bioluminescence and chemiluminescence abilities of *trans*-3-hydroxyhispidin on the luminous fungus *Mycena chlorophos*. *Luminescence*, 2018, vol. 33, doi: 10.1002/bio.3540.
8. Puzyr A.P., Burov A.E., Medvedeva S.E., Burova O.G., Bondar V.S. Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, 2019, vol. 10, doi: 10.1080/21501203.2019.1583688.
9. Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., Navizet I. Fungal light emitter: understanding its chemical nature and pH-dependent emission in water solution. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, vol. 85, doi: 10.1021/acs.joc.0c00246.
10. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Finding the light emission stimulator of *Neonothopanus nambi* basidiomycete and studying its properties. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2022, vol. 503, doi: 10.1134/S1607672922020120.
11. Shimomura O. Superoxide-triggered chemiluminescence of the extract of luminous mushroom *Panellus stipticus* after treatment with methylamine. *Journal of Experimental Botany*, 1991, vol. 42, no. 237, pp. 555-560.
12. Shimomura O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. *Journal of Experimental Botany*, 1992, vol. 43, no. 256, pp. 1519-1525.
13. Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006, 470 p.
14. Bondar V.S., Puzyr A.P., Purtov K.V., Medvedeva S.E., Rodicheva E.K., Gitelson J.I. The luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2011, vol. 438, doi: 10.1134/S1607672911030082.
15. Bondar V.S., Shimomura O., Gitelson J.I. Luminescence of higher mushrooms. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 331-351.
16. Bondar V.S., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Tyaglik A.B., Shpak B.A., Gitelson J.I. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2013, vol. 449, DOI: 10.1134/S1607672913020075.
17. Kobzeva T.V., Melnikov A.R., Karogodina T.Y., Zikirin S.B., Stass D.V., Molin Yu.N., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S., Gitelson J.I. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, 2014, vol. 29, doi: 10.1002/bio.2656.
18. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., Bondar V.S. Morphological properties and levels of extracellular peroxidase activity and light emission of the basidiomycete *Armillaria borealis* treated with β -glucosidase and chitinase. *Mycosphere*, 2017, vol. 8, doi: 10.5943/mycosphere/8/4/11.

19. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Bondar V.S. Estimating levels of light emission and extracellular peroxidase activity of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* treated with β -glucosidase. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2018, vol. 8, doi: 10.5943/cream/8/1/6.
20. Airth R.L., McElroy W.D. Light emission from extracts of luminous fungi. *Journal of Bacteriology*, 1959, vol. 77, doi: 10.1128/jb.77.2.249-250.1959.
21. Airth R.L. Foerster G.E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962, vol. 97, doi: 10.1016/0003-9861(62)90124-8.
22. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, vol. 239, no. 7, pp. 2370-2378.
23. Peisach J., Stern J.O., Blumberg W.E. 1973 – Optical and magnetic probes of the structure of cytochrome P-450's. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 1, no. 1, pp. 45-61.
24. Moskaleva N.E., Zgoda V.G. Modern methods of cytochrome P450 analysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry*, 2013, vol. 7, doi: 10.1134/S1990750813020078.
25. Kelly S.L. et al. An old activity in the cytochrome P450 superfamily (CYP51) and a new story of drugs and resistance. *Biochemical Society Transaction*, 2001, vol. 29, doi: 10.1042/0300-5127:0290122.
26. Maddy A.H. *Biochemical analysis of membranes*. London: Chapman & Hall Ltd., 1976, 513 p.
27. Archakov A.I., Bachmanova G.I. *Cytochrome P450 and active oxygen*. London: Taylor & Francis, 1990, 339 p.
28. Lewis D.F.V. *Guide to cytochromes P450. Structure and function*. London, New York: Taylor & Francis, 2001, 215 p.
29. Munro A.W., McLean K.J., Grant J.L., Makris T.M. Structure and function of the cytochrome P450 peroxxygenase enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 2018, vol. 46, doi: 10.1042/BST20170218.

CYTOCHROME P450 SYSTEM MAY BE INVOLVED IN THE LIGHT EMISSION OF HIGHER FUNGI

Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mogilnaya O.A., Puzyr A.P., Gitelson J.I., Bondar V.S.

Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: roniol@mail.ru

Received 22.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0522

Abstract. The paper presents data that testify in favor of the participation of the cytochrome P450 system in the light emission of higher fungi. Extracts from mycelia of different species of luminous basidiomycetes containing fungal luminescent systems that provide luminescence in vitro were obtained. Applied conditions for the isolation of luminescent systems (sonication, centrifugation at 40000g) indicate the presence of membrane structures in the extracts, in particular, microsomes formed as a result of ultrasonic disintegration of the endoplasmic reticulum (ER). Differential spectral analysis of the extracts revealed the presence of two absorption peaks at 410 nm and 450 nm, which indicates the presence of cytochromes b_5 and P450. The luminescence of the extracts is stimulated by reduced pyridine nucleotides, however, the addition of NADPH causes a higher level of luminescence compared with NADH. The addition of hydrogen peroxide significantly (from several times to 1-2 orders of magnitude) increases the luminescence intensity of extracts activated by NAD(P)H. The addition of fluconazole significantly inhibits the light emission of extracts. The data obtained indicates that the cytochrome P450 system associated with ER membranes may participate in the mechanism of light emission of higher fungi with the involvement in the process of electron transport enzyme systems: NADPH-dependent reductase of cytochrome P450 - cytochrome P450 and NADH-dependent reductase of cytochrome b_5 - cytochrome b_5 - cytochrome P450. In this case, cytochrome P450 may hydroxylate hispidin (precursor of the luminescent reaction substrate) to form luciferin and catalyze its oxidation in the presence of ROS with light emission.

Key words: *luminous higher fungi, mycelium, hispidin, cytochrome P450 system, reduced pyridine nucleotides, fluconazole, hydrogen peroxide.*