

УДК 576.36:579.25

ББК 28.4

Т 48

О т в е т с т в е н н ы й р е д а к т о р

Член-корреспондент РАН **В.А. Демаков**

Р е ц е н з е н т

Член-корреспондент РАН **И.Б. Ившина**

Ткаченко А.Г.

Т 48 Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов.

Екатеринбург УрО РАН, 2012. – 267 с.

ISBN 978-5-7691-2275-0

Рассмотрены общие закономерности адаптации микроорганизмов к стрессу. Представлены современные данные о физиологических и генетических перестройках, происходящих в клетках микроорганизмов в ответ на стресс, которые направлены на выживание микроорганизмов в неблагоприятных условиях среды. Исследованы механизмы регуляции стрессорных ответов, основанные на молекулярно-генетических закономерностях физиологических функций микроорганизмов. Даны представления о специфических особенностях адаптивных ответов микроорганизмов на определенные виды стресса.

Книга адресована специалистам в области микробиологии и студентам биологических и медицинских специальностей университетов.

Ил. 73. Библиогр. 651 назв.

УДК 576.36:579.25

ББК 28.4

ISBN 978-5-7691-2275-0

© ИЭГМ УрО РАН, 2012

© Ткаченко А.Г., 2012

Предисловие

Природа структурных, биохимических и генетических изменений, формируемых в результате воздействия различных стрессорных факторов, в значительной степени является сходной для клеток всех современных организмов, которые унаследовали основные стратегии адаптации к различным видам стресса от своих древних предков. Микроорганизмы в этом отношении не являются исключением, в то же время представляя собой удобную модель для изучения механизмов антистрессорной защиты.

Наибольшую роль в изучении молекулярной природы адаптивных процессов, протекающих на клеточном уровне, сыграла кишечная палочка (*Escherichia coli*), ставшая классическим объектом, парадигмой для исследований, проводимых в таких областях биологической науки как молекулярная биология, генетика, биохимия. В отношении этого организма накоплен огромный объем данных, знание которых служит путеводителем в поиске новых, неизвестных ранее механизмов жизнеобеспечения клетки, в том числе адаптивных стрессорных ответов. Поэтому не вызывает удивления то, что молекулярная природа адаптивных процессов наиболее подробно изучена именно на клетках этого микроорганизма. Распространение исследований, проводимых в области изучения молекулярных механизмов стрессорных ответов, на другие виды микроорганизмов подтвердило наличие у них сходных или даже полностью идентичных механизмов.

Оглавление

Введение.....	3
Глава I. Уровни организации адаптивных реакций у микроорганизмов.....	5
1.1. Ферментативный уровень.....	6
1.2. Уровень генной экспрессии.....	7
1.2.1. Оперон.....	7
1.2.2. Регулон, регуляторные сети.....	10
1.2.3. Модулон.....	12
1.3. Механизмы проведения сигналов стресса	13
1.3.1. Двухкомпонентная система проведения сигнала.....	14
1.3.1.1. Гистидинпротеинкиназа.....	15
1.3.1.2. Регуляторы ответа.....	19
1.3.1.3. Рибопереключатели.....	23
1.3.2. Роль двухкомпонентных систем проведения сигнала в формировании модулона	26
1.3.3. Механизм проведения сигнала по типу Quorum Sensing.....	29
Глава II. Механизмы транскрипционной регуляции адаптивных ответов.....	36
2.1. Регуляция инициации транскрипции	38
2.1.1. Специфичность взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами.....	39
2.1.2. Промоторные последовательности.....	39
2.1.3. σ -факторы.....	45
2.1.4. Транскрипционные факторы.....	49
2.1.5. Специфические транскрипционные регуляторы	55

2.1.6. Малые лиганды.....	58
2.2. Регуляция элонгации.....	59
2.3. Регуляция терминации.....	60
Глава III. Топологические свойства ДНК как фактор глобальной регуляции генной экспрессии.....	61
3.1. Свойства кольцевых ковалентно замкнутых молекул ДНК.....	63
3.2. Факторы регуляции топологического состояния ДНК.....	67
3.3. Топоизомеразы – ферменты регуляции топологических свойств ДНК.....	72
3.4. Механизм ферментативной активности ДНК-гиразы.....	77
3.5. Роль ДНК-гиразы в репликации бактериальной хромосомы.....	78
3.6. Гомеостатический контроль суперскрученности ДНК.....	81
3.7. Механизмы регуляции генной экспрессии посредством изменения топологических свойств ДНК.....	82
3.7.1. Регуляция генной экспрессии посредством спиральной закрутки.....	83
3.7.2. Регуляция генной экспрессии посредством изменения третичной структуры ДНК.....	86
3.7.3. Влияние условий среды на суперскрученность ДНК и генную экспрессию.....	88
3.8. Нуклеоидсвязывающие белки как фактор транскрипционной регуляции.....	91
3.8.1. Роль белка HU в создании архитектуры нуклеоида и регуляции транскрипции.....	92

3.8.2. Роль гистоноподробного белка H-NS как глобального репрессора транскрипции у микроорганизмов.....	93
3.8.3. Функциональная активность ДНК-связывающего белка FIS.....	96
3.8.4. Роль IHF в функциональной регуляции ДНК.....	97
3.8.5. Функции белка Dps.....	98
Глава IV. Механизмы общего стрессорного ответа.....	100
4.1. Стринджент-ответ.....	100
4.2. Роль токсин-антитоксиновых модулей в адаптации к стрессу.....	106
4.3. <i>groS</i> – регулон общего ответа на стресс.....	113
4.3.1. Регуляция транскрипции <i>groS</i>	117
4.3.2. Регуляция экспрессии <i>groS</i> на уровне трансляции.....	121
4.3.3. Регуляция протеолиза σ^S	123
Глава V. Механизмы адаптации к основным видам стресса.....	128
5.1. Стресс голодания по источникам углерода и энергии. Катаболитная репрессия.....	129
5.1.1. Механизм катаболитной репрессии.....	133
5.1.2. Механизм исключения индуктора.....	135
5.1.3. Регуляция активности генов <i>pts</i> -регулона.....	136
5.2. Стресс аммонийного голодания.....	138
5.3. Тепловой шок.....	147
5.3.1. <i>groH</i> -регулон – главный регулон теплового шока.....	149
5.3.1.1. Транскрипционная регуляция гена <i>groH</i>	150
5.3.1.2. Контроль трансляции σ^{32}	152
5.3.1.3. Регуляция активности σ^{32}	153

5.3.1.4. Контроль деградации σ^{32}	154
5.3.1.5. Функции регулона σ^{32}	155
5.3.2. <i>rpoE</i> -регулон – малый регулон теплового шока. Ответ стресса клеточной оболочки	157
5.3.3. Структура и функции белков теплового шока	167
5.3.3.1. Шапероны	168
5.3.3.2. Шаперонины	175
5.3.3.3. Протеазы	179
5.3.3.4. Контроль качества белков	181
5.4 Осмотический стресс	183
5.4.1. Влияние гипер- и гипоосмотического шока на бактерии	185
5.4.2. Совместимые вещества, их характеристика и функции	186
5.4.3. Фазы клеточного ответа на гиперосмотический шок. Фаза I	188
5.4.3.1. Природа сигналов гиперосмотического стресса	188
5.4.3.2. Роль калия в адаптации микроорганизмов к гиперосмотическому стрессу	189
5.4.3.3. Электролитический баланс цитоплазмы	193
5.4.4. Фаза II гиперосмотического шока	194
5.4.4.1. Трегалоза как основной вид совместимых веществ при стрессе	194
5.4.5. Роль осмопротекторов и особенности их транспортных систем при осмотическом стрессе	197
5.4.6. Структура и функции пориновых белков	198
5.4.7. Системы транспорта совместимых веществ	199

5.4.7.1. ProP.....	199
5.4.7.2. ProU.....	200
5.5. Окислительный стресс.....	203
5.5.1. Первичные активные формы кислорода.....	204
5.5.2. Транспорт металлов в клетки микроорганизмов и его роль в окислительном повреждении.....	208
5.5.3. Типы повреждений, вызываемых активными формами кислорода в основных биомолекулах микроорганизмов.....	210
5.5.3.1. Типы повреждений ДНК.....	210
5.5.3.2. Повреждения липидов.....	211
5.5.3.3. Повреждения белков.....	212
5.5.4. Системы защиты микроорганизмов от окислительного стресса.....	215
5.5.4.1. Детоксикация активных форм кислорода как механизм защиты микроорганизмов от окислительного стресса.....	216
5.5.4.2. Супероксиддисмутазы.....	216
5.5.4.3. Каталазы.....	218
5.5.5. Механизмы ограничения образования в клетке активных форм кислорода.....	219
5.5.6. Биосинтез биомолекул (ферментов), устойчивых к разрушительному действию АФК.....	220
5.5.7. Регуляция уровня ионов металлов переменной валентности.....	221
5.5.8. Регенерация и репарация повреждений основных биомолекул как средство защиты клеток от окислительного стресса.....	224
5.5.8.1. Регенерация белков.....	227
5.5.8.2. Репарация ДНК.....	226
5.5.9. Регуляция экспрессии генов окислительного стресса.....	228
5.5.9.1. <i>oxyR</i> -регулон.....	228
5.5.9.2. <i>soxRS</i> -регулон.....	229
Заключение.....	231

прокариотической клетки - около 1% от общего содержания белков, что позволяет оценить количество таких систем в клетках *E. coli* на уровне 62 (West et al., 2001; Klumpp et al., 2002). Эти системы вовлечены в регуляцию многочисленных процессов, включая хемотаксис, осморегуляцию, метаболизм и транспорт (рис. 5).

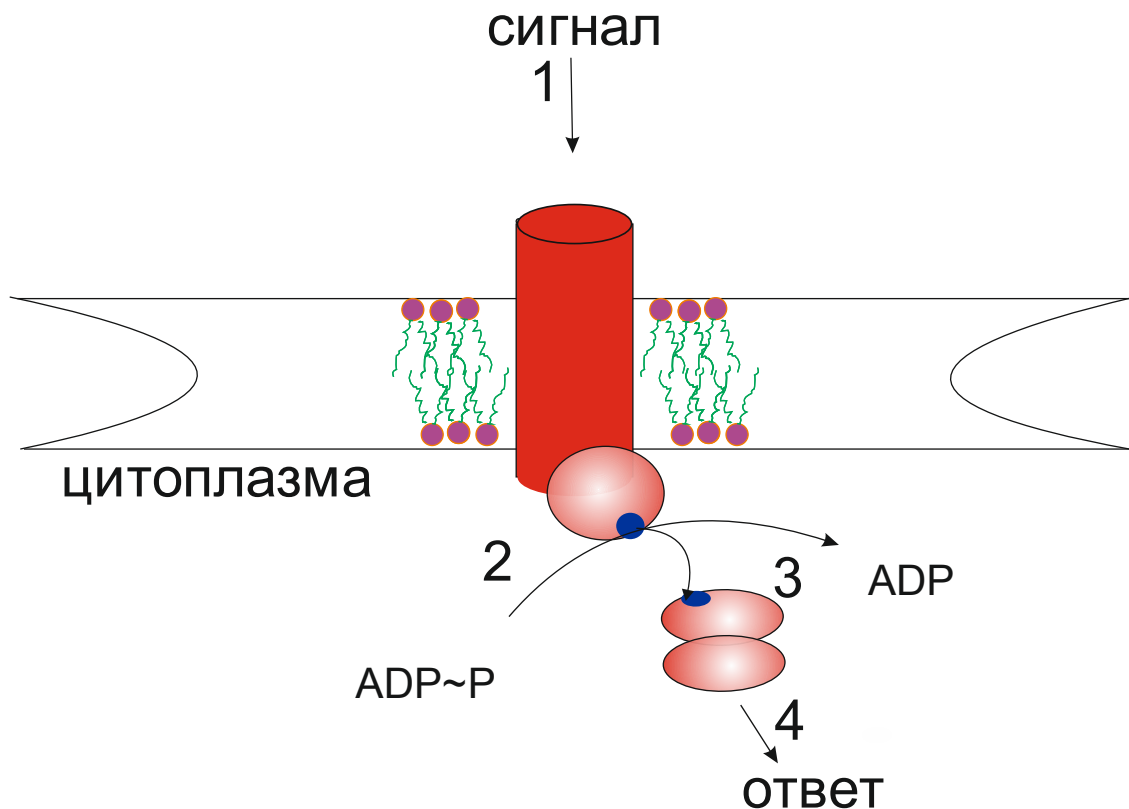


Рис. 5. Двухкомпонентная система проведения сигнала [по (Hellingwerf et al., 1998)]: Сенсорный белок, который в большинстве систем является мембранно-связанным белком, распознает и связывает периплазматическую сигнальную молекулу (1). Это приводит к возрастанию активности его цитоплазматического трансмиттерного домена (2). Фосфатные группы переносятся к рессиверному домену родственного цитоплазматического регулятора (3). Его эффекторный домен инициирует стрессорный ответ (4).

Двухкомпонентные системы, участвующие в передаче сигнала от различных факторов среды, могут различаться по своей архитектуре, но все

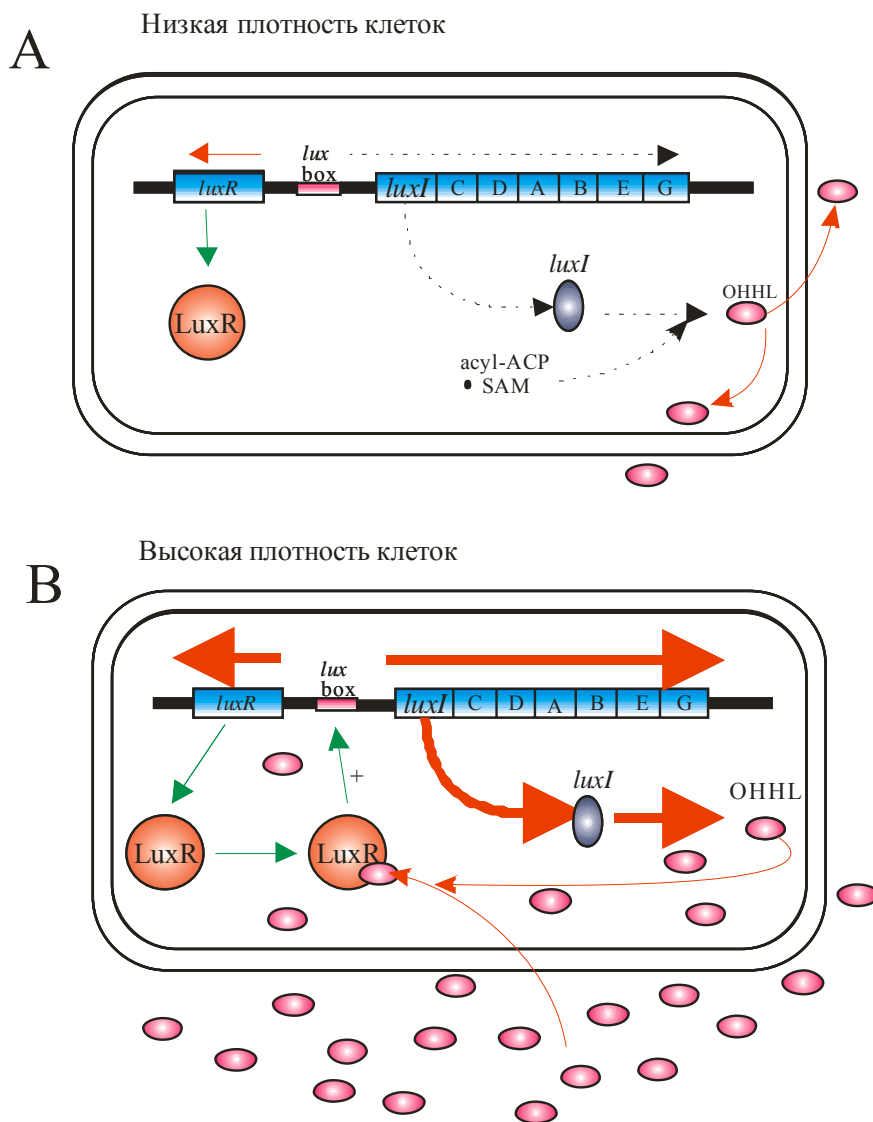


Рис. 9. Регуляция биолюминесценции *V. Fisheri*. Quorum Sensing – механизм проведения сигнала [по (Whitehead et al., 2001)]:

А. При низкой плотности клеток транскрипция генов биолюминесценции (*Lux ICDABEG*) недостаточна для излучения света вследствие низкого уровня сигнальной молекулы ОННЛ.

В. При высокой плотности клеток достигается пороговая концентрация ОННЛ, который связывается с LuxR и стимулирует транскрипцию *Lux ICDABEG*, что приводит к быстрому синтезу ОННЛ, усилению сигнала и излучению света.

Такой механизм передачи сигнала рассматривается как средство межклеточной коммуникации, что делает популяцию микроорганизмов не простой совокупностью изолированных клеток, а системой, согласованно реагирующей на изменение условий ее существования. Бактерии «общаются» друг с другом посредством множества сигнальных молекул, которые участвуют в процессах биолюминесценции, вирулентности,

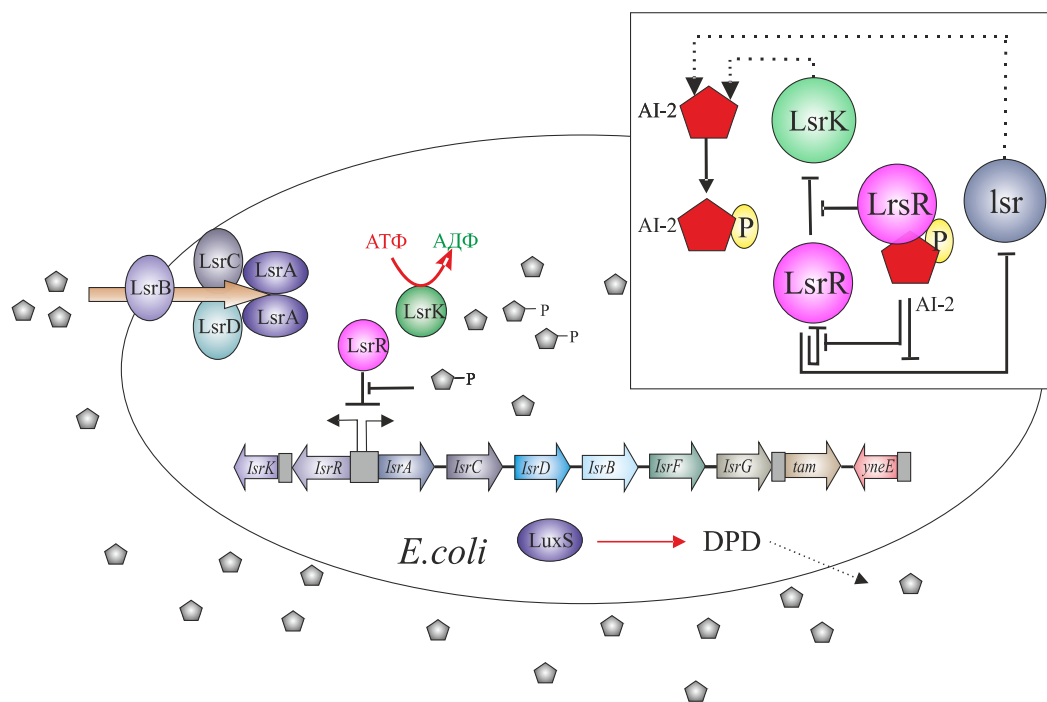
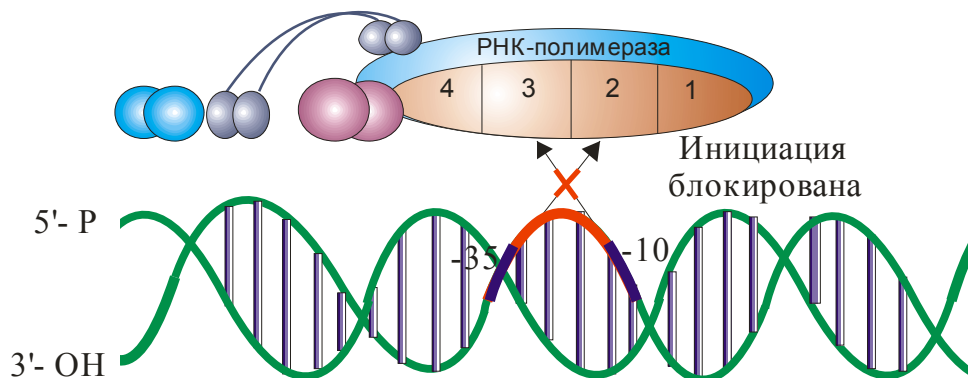


Рис. 10. Механизм регуляции *lsr*-оперона при участии аутоиндуктора AI-2 (4,5-дигидрокси-2,3-пентандион) по типу Quorum Sensing [по (Li et al., 2007)]. Репрессор потребления аутоиндуктора AI-2, белок LsrR, подавляет также экспрессию генов оперонов *lsrACDBFG* и *lsrRK*. AI-2, импортированный в клетку через транспортную систему LsrACDB, фосфорилируется киназой LsrK, в своей фосфорилированной форме связывается с LsrR и снимает репрессию генов транспортной системы lsr, запуская их экспрессию. Это, в свою очередь, стимулирует дополнительное потребление AI-2. DPD - 4,5-дигидрокси-2,3 пентандион.

При вступлении микроорганизмов в стационарную фазу концентрация AI-2 в среде снижается за счет его транспорта в клетку. АТФ-зависимый транспорт осуществляется через Lsr-белки. Поступающий в клетку AI-2 далее фосфорилируется цитоплазматической киназой LsrK и в такой активной форме блокирует ингибитор LsrR, в результате чего активируются гены, находящиеся под контролем системы QS-2. К ним относится множество генов, участвующих в регуляции разнообразных клеточных функций, в том числе в образовании биопленок, значительно повышающих инвазивный потенциал микроорганизмов (Xavier et al., 2003) (Xavier et al., 2005). Недавно показано, что две известные QS системы *E. coli* могут

уменьшению угла между ними и затрудняет выравнивание, необходимое для взаимодействия с РНК-полимеразой (рис. 30).

А. Релаксированная ДНК



В. Отрицательно суперскрученная ДНК

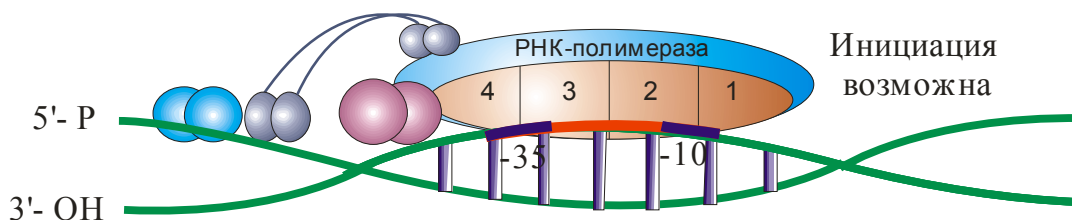


Рис. 30. Роль отрицательной суперспирализации ДНК в инициации транскрипции:

А. Сигнальные последовательности промотора (-10, -35) на релаксированной ДНК находятся под острым углом относительно друг друга за счет кривизны в промоторной области ДНК. Угол становится тем меньше, чем больше длина спейсера между сигнальными последовательностями. Это препятствует взаимодействию промотора с РНК-полимеразой и блокирует транскрипцию.

В. Отрицательная суперскрученность способствует выравниванию сигнальных последовательностей промотора и эффективному взаимодействию с ним РНК-полимеразы, стимулируя транскрипцию.

Пространственное искривление может быть скорректировано закруткой ДНК. Это становится возможным благодаря снижению числа зацеплений (Lk), обычно распределяемых между закруткой и изгибанием ДНК в соответствии с формулой $\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$.

В этом случае отрицательная сверхспирализация снижает закрученность спирали и выравнивает угол между консенсусными последовательностями, что способствует подгонке промотора к РНК-полимеразе и сопровождается возрастанием генной экспрессии.

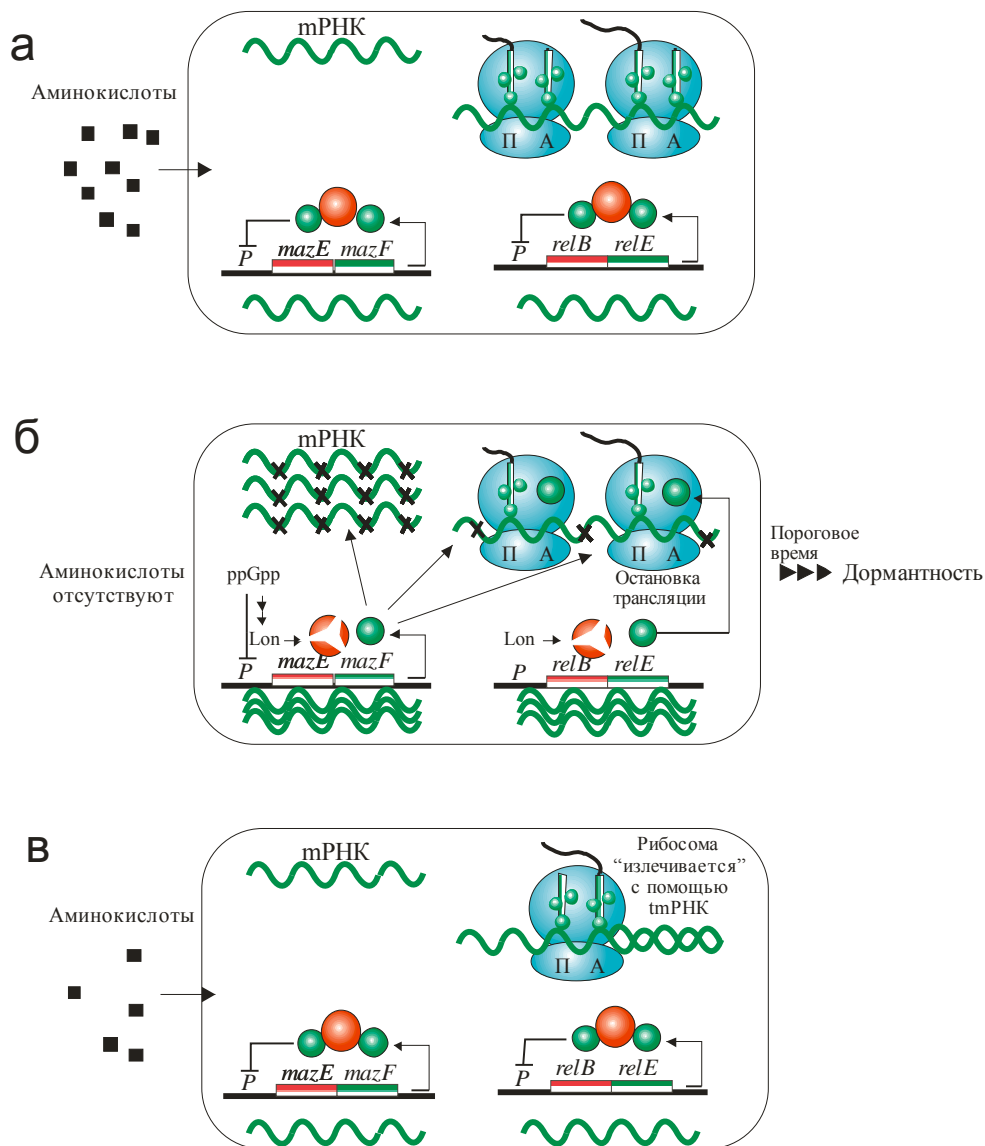


Рис. 39. Влияние аминокислотного голодания на активность и экспрессию ТА (токсин-антитоксин) модулей MazEF и RelBE [по (Condon, 2006)]:

а) В присутствии достаточного количества аминокислот вновь синтезируемые белки-антитоксины MazE и RelB связываются с белками-токсинами MazF и RelE, соответственно, блокируя их рибонуклеазную функцию. ТА-комплексы связываются также с собственными промоторными последовательностями, вызывая транскрипционную ауторепрессию.

б) В условиях аминокислотного голодания синтез MazE и RelB *de novo* блокируется, и оба эти белка подвергаются деградации Lon-протеазой, активность которой опосредованно стимулируется ppGpp через возрастание активности фосфатазы. Это приводит к дерепрессии транскрипции *mazEF* и *relBE* оперонов, а также к активации рибонуклеазных функций токсинов MazF и RelE. MazF способен расщеплять мРНК между рибосомами, а также молекулы мРНК, которые еще не участвуют в трансляции. Хотя мРНК, полностью лишенные рибосом, редко встречаются во время нормального роста, вследствие сопряженности трансляции и транскрипции у бактерий, они могут преобладать в условиях ингибирования трансляции. RelE способствует расщеплению мРНК в местах «застревания» рибосом, связываясь с А-сайтами рибосом. ppGpp может оказывать прямое отрицательное воздействие на промотор *mazEF*. Длительное аминокислотное голодание может привести клетку в состояние дормантности.

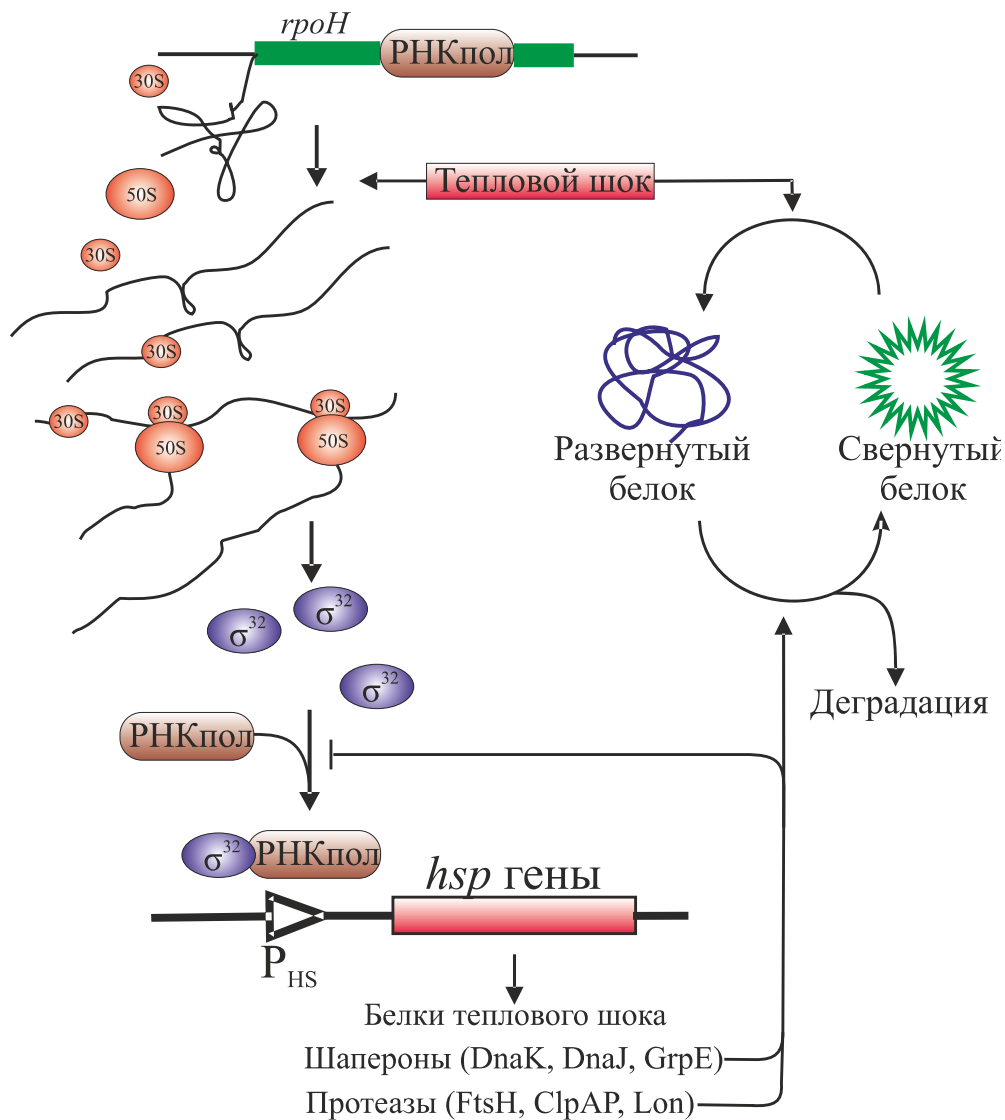


Рис. 54. Механизм регуляции количества σ^{32} в клетке (по Yura. et al., 2000)

В результате функционирования посттранскрипционного механизма количество белковых молекул σ^{32} резко возрастает, что сопровождается усиленной транскрипцией и увеличением в клетке количества белков теплового шока.

5.3.1.3. Регуляция активности σ^{32}

Контроль активности σ^{32} наблюдается в фазе адаптации, следующей за индукцией белков теплового шока, когда количество σ^{32} еще остается высоким, а экспрессия белков теплового шока начинает снижаться (Straus et al., 1987)

в два этапа. Несмотря на то, что данная пара белков не является гомологом семейства двухкомпонентных систем, SoxR функционирует как сенсор системы, а SoxS непосредственно контролирует экспрессию генов, являющихся объектами транскрипционной регуляции.

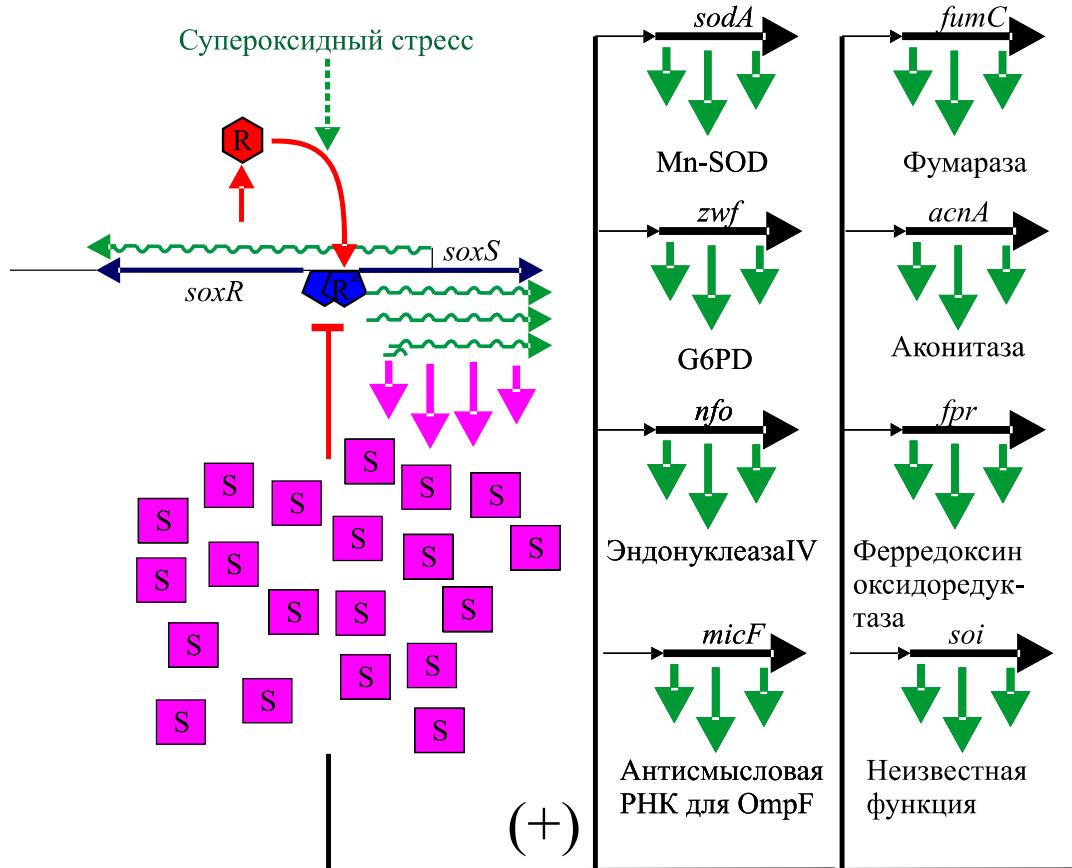


Рис. 73. Модель регулона *soxR* [по (Hidalgo et al., 1998)]

Белок SoxR функционирует в виде гомодимера (рис. 20). Его активным центром, воспринимающим в качестве сигнала супероксидные радикалы, является железосерный кластер $2\text{Fe}-2\text{S}$, который в нормальных условиях находится в восстановленном неактивном состоянии $2\text{Fe}-2\text{S}^{+1}$, но при воздействии супероксида переходит в окисленное активное состояние $2\text{Fe}-2\text{S}^{+2}$. Промоторы генов *soxR* и *soxS* расположены на противоположных полинуклеотидных цепях таким образом, что их консервативные последовательности -10 ориентированы напротив друг друга, а местом связывания SoxR является сайт, расположенный между -10-м и -35-м