

А. В. ПИНЕВИЧ

<http://biotex.ibss.org.ua>



МИКРОБИОЛОГИЯ

БИОЛОГИЯ ПРОКАРИОТОВ

III

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

А. В. ПИНЕВИЧ

МИКРОБИОЛОГИЯ
БИОЛОГИЯ ПРОКАРИОТОВ

Учебник

Том III



ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
2009

ББК 28.4
ПЗ2

Рецензенты: д-р биол. наук, проф. *А. Д. Харазова* (С.-Петерб. гос. ун-т), чл.-кор. РАН, проф.
Ю. В. Гамалей (Ботан. ин-т РАН им. В. Л. Комарова)

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
биолого-почвенного факультета
С.-Петербургского государственного университета*

Пиневи́ч А. В.
ПЗ2 **Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т. Том 3.** —
СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009. — 457 с.
ISBN 978-5-288-04894-4

Фундаментальный учебник по микробиологии, впервые издаваемый в С.-Петербурге, основан на курсах лекций, которые автор читает студентам Биолого-почвенного факультета Университета с начала 1970-х годов. Наряду с классическими сведениями излагаются современные представления о биологии бактерий и архей. Многие вопросы рассматриваются под непривычным углом зрения, а некоторые еще не обсуждались в отечественной литературе. Учебник отражает гигантский прогресс в изучении структурно-функциональной организации, биоразнообразия и филогении прокариотов. Одним читателям это расширит кругозор, другим поможет переосмыслить представления об организации прокариотов, их роли в органической эволюции и биосфере.

Последний, III том посвящен цитогенетике, онтогенезу, регуляции, экологическим стрессам, синэкологии, микробным культурам и биотехнологии. Учебник рекомендуется студентам, аспирантам биологических факультетов университетов, может быть полезен исследователям-микробиологам, а также специалистам в других естественных науках. Табл. 19. Ил. 125.

ББК 28.4

Дизайн обложки
профессора С.-Петербургской академии художеств
И. В. Петрова

ISBN 978-5-288-04894-4

© А. В. Пиневи́ч, 2009
© С.-Петербургский
государственный
университет, 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	6
ГЛАВА 16. Цитогенетика	8
16.1. Репликоны	9
16.1.1. Хромосомы	10
16.1.2. Плазмиды	14
16.1.2.1. Классификация плазмид	15
16.1.2.2. Строение плазмид	19
16.1.2.3. Природное и практическое значение плазмид	20
16.2. Размер генома	—
16.3. Инфраструктура генома	23
16.3.1. Кодировующие участки	25
16.3.1.1. Гены	26
16.3.1.2. Опероны	30
16.3.1.3. Мобильные элементы	34
16.3.1.4. Интроны	40
16.3.2. Некодирующие участки	44
16.3.2.1. Повторяющиеся последовательности	—
16.3.2.2. Внутренние транскрибируемые спейсеры	47
16.4. Самовоспроизведение генома	48
16.4.1. Репликация	50
16.4.1.1. Репликация хромосом	—
16.4.1.2. Репликация плазмид	68
16.4.2. Взаимная изоляция сестринских репликонов	72
16.4.2.1. Расхождение сестринских хромосом	74
16.4.2.2. Расхождение сестринских плазмид	81
16.5. Консерватизм генома	83
16.5.1. Репарация	—
16.5.1.1. Фотореактивация	86
16.5.1.2. Эксцизионная репарация	87
16.5.1.3. Репарация ошибок спаривания	91
16.5.1.4. Рекомбинационная репарация	93
16.5.2. Рестрикция и модификация	98
16.6. Изменения генома	105
16.6.1. Наследственные изменения	106
16.6.1.1. Мутации	—
16.6.1.2. Рекомбинация	115
16.6.1.3. Горизонтальный перенос генов	128
16.6.2. Ненаследуемые изменения	158
16.6.3. Эволюция прокариотных геномов	159
16.7. Экспрессия генома	166
16.7.1. Транскрипция	167
16.7.1.1. Инициация транскрипции	172
16.7.1.2. Элонгация	180
16.7.1.3. Терминация	181
16.7.2. Обратная транскрипция	183
16.7.3. Транскрипция у архей	186

16.7.4. Посттранскрипционный процессинг мРНК.....	188
16.7.5. Деградация мРНК.....	190
16.8. Эпигенетическое наследование.....	191
ГЛАВА 17. Онтогенез.....	195
17.1. Клеточный цикл.....	196
17.1.1. Структура клеточного цикла.....	198
17.1.2. Регуляция клеточного цикла.....	199
17.1.3. Циркадные ритмы и их связь с клеточным циклом.....	200
17.1.4. Клеточный цикл и клеточное развитие.....	205
17.1.5. Особенности клеточного цикла у архей.....	208
17.2. Старение и смерть клетки.....	—
17.2.1. Старение клетки.....	—
17.2.2. Смерть клетки.....	210
17.3. Клеточный рост.....	215
17.3.1. Рост палочковидных и сферических клеток.....	218
17.3.2. Полярный рост и поляризация клетки.....	221
17.4. Клеточное деление.....	227
17.4.1. Выбор сайта деления.....	231
17.4.2. Кольцо деления.....	233
17.4.3. Самосборка дивисомы.....	234
17.4.4. Финал деления.....	237
17.4.5. Деление митохондрий и пластид.....	238
17.4.6. Деление архей.....	239
17.5. Клеточная дифференциация.....	240
17.5.1. Метаболически активные дифференцированные клетки.....	241
17.5.1.1. Агенты распространения — беоциты и гормогонии.....	—
17.5.1.2. Фабрики диазотрофии — диазоциты и гетероцисты цианобактерий, бактериоиды ризобиев и везикулы актинобактерий.....	243
17.5.2. Покоящиеся резистентные клетки.....	251
17.5.2.1. Цисты.....	—
17.5.2.2. Эндоспоры.....	257
ГЛАВА 18. Регуляция.....	271
18.1. Регуляция транскрипции.....	272
18.1.1. Регуляторы транскрипции.....	276
18.1.1.1. Сигма-факторы.....	277
18.1.1.2. Антисигма-факторы и анти-антисигма-факторы.....	283
18.1.1.3. Транскрипционные факторы.....	284
18.1.2. Регулоны.....	292
18.1.3. Стимулоны.....	300
18.1.4. Модулоны.....	301
18.2. Посттранскрипционная регуляция.....	303
18.2.1. Регуляторные белки.....	—
18.2.2. Регуляторные РНК.....	304
18.3. Регуляция метаболизма.....	308
18.3.1. Регуляция энергетического метаболизма.....	—
18.3.1.1. Регуляция фототрофии.....	—
18.3.1.2. Регуляция хемотрофии.....	313
18.3.2. Регуляция конструктивного метаболизма.....	316
18.3.2.1. Регуляция синтеза рРНК.....	—
18.3.2.2. Регуляция углеродного метаболизма.....	318
18.3.2.3. Регуляция азотного метаболизма.....	322
18.3.2.4. Регуляция фосфорного метаболизма.....	326
18.3.2.5. Регуляция железного метаболизма.....	327
18.3.3. Регуляция вторичного метаболизма.....	331
18.4. Регуляция поведения.....	333
18.4.1. Индивидуальное поведение и таксисы.....	334
18.4.1.1. Таксис, не зависящий от метаболизма: хемотаксис.....	335
18.4.1.2. Таксис, не зависящий от метаболизма: фототаксис.....	339
18.4.1.3. Таксис, зависящий от метаболизма: энерготаксис.....	343

18.4.1.4. Таксис, зависящий от транспорта	345
18.4.1.5. Другие формы таксисов	346
18.4.2. Коллективное поведение на основе внутривидовой коммуникации	347
ГЛАВА 19. Экологические стрессы	354
19.1. Цитоплазматические стрессы	356
19.1.1. Термические стрессы	—
19.1.2. Водный стресс	358
19.1.3. Осмотический шок	359
19.1.4. Гидростатический стресс	365
19.1.5. Радиационный стресс	366
19.1.6. Окислительный стресс	367
19.1.6.1. Механизм окислительного стресса	—
19.1.6.2. Защитный ответ при окислительном стрессе	374
19.1.7. pH-стресс	380
19.1.8. Токсический стресс	—
19.2. Периплазматический стресс	384
ГЛАВА 20. Синэкология	386
20.1. Эпibiоз	390
20.1.1. Микробные маты	391
20.1.2. Консорции	392
20.2. Квази-эндоцитобиоз	393
20.3. Эндоцитобиоз	394
20.3.1. Эндоцитобиоз на основе фотосинтеза	395
20.3.2. Эндоцитобиоз на основе хемосинтеза	—
20.3.3. Эндоцитобиоз на основе diaзотрофии	397
20.3.4. Эндоцитобиоз на основе хемогетеротрофии	401
20.3.4.1. Эндоцитобиоз у протистов	—
20.3.4.2. Эндоцитобиоз у беспозвоночных	402
20.3.5. Внутриклеточный паразитизм зоопатогенных бактерий	403
20.4. Ксеносомы	406
20.4.1. Фототрофные ксеносомы	408
20.4.1.1. Цианеллы	409
20.4.1.2. Собственно пластиды	410
20.4.2. Хемотрофные ксеносомы	418
20.5. Эктобиоз	421
20.5.1. Эктобиоз бактерий с животными	—
20.5.2. Эктобиоз бактерий с растениями	422
20.6. Эндобиоз	423
20.6.1. Эндобиоз бактерий с животными	—
20.6.2. Эндобиоз бактерий с растениями	425
ГЛАВА 21. Микробные культуры и биотехнология	427
21.1. Микробные культуры	—
21.1.1. Закономерности периодической культуры	428
21.1.2. Закономерности непрерывной культуры	434
21.2. Биотехнология	436
21.2.1. Продуценты	437
21.2.2. Сырье и ферментеры	439
21.2.3. Продукты биотехнологии	443
Заключение	449
Предметный указатель	451

ПРЕДИСЛОВИЕ

Il est très-facile à la jeunesse de se faire illusion sur son talent, de présumer en mérite, et de prétendre. Ainsi la tâche la plus difficile pour les directeurs et précepteurs de nos écoles, est peut-être de classer au juste les talens, et de leur faire sentir quel est le degré de capacité à laquelle ils sont bornés, sans les aigrir, et sans que des sympathies ou des antipathies s'y mêlent mal-à-propos.

(Молодежь с большой легкостью создает себе неправильное представление о собственной одаренности, преувеличивает свои возможности и на многое претендует. Поэтому самая, быть может, трудная обязанность руководителей и педагогов наших школ состоит в правильной оценке талантов и в том, чтобы дать понять учащимся, какова степень их способностей, которыми они ограничены, но сказать им это, не ожесточая их и без неуместных пристрастий и антипатий).

Pierre Gothard Gonzague. Information a Mon Chef, ou Éclaircissement Convenable du Décorateur-Theatral sur l'Exercice de sa Profession (a Saint-Petersbourg, 1807).

При встрече с заключительным томом учебника читатель сразу обратит внимание на то, что основной раздел посвящен генетике. Казалось бы, это дает повод вспомнить известный афоризм Козьмы Пруtkова об одностороннем специалисте, однако автор не принадлежит к цеху генетиков.

Истинная причина диспропорции глав в том, что в отечественной учебной литературе до сих пор нет книг, отражающих и классические, и новые сведения по генетике прокариотов. Парадоксально, что *в учебниках по генетике слишком мало микробиологии, а в учебниках по микробиологии практически отсутствует генетика!*

Была еще одна причина повышенного внимания автора к генетическим вопросам. Новая микробиология широко использует возможности высокопроизводительных методов дешифровки нуклеотидных последовательностей. Благодаря этому на наших глазах изменяются представления о структуре и экспрессии прокариотных геномов, их взаимодействии друг с другом, а также с ядерными и вирусными геномами. Дополнением, а порой и суррогатом актуалистической микробиологии становится метагеномика, изучающая разнообразие, эволюцию и эколого-географическое распространение геномов, генных кластеров и отдельных генов. Анализ продуктов экспрессии генов, отвечающих за архитектуру, метаболизм и клеточную регуляцию,

выявил как единство организации бактерий и архей, так и черты, порознь присущие этим двум прокариотным доменам. Открытие мобильных генетических элементов и генных островков, доказательство горизонтального переноса генов, особенно у симбиотических бактерий, позволяют переосмыслить представления об эволюции, распространении и адаптационной пластичности прокариотов.

Другим темам III тома также не везет в нашей учебной литературе, бедной сведениями об онтогенезе прокариотов, регуляторных процессах и синэкологии. В более выгодном положении оказалась автоэкология, хотя материал, который обычно дается в учебниках, и здесь нуждался в расширении и обновлении.

Иного читателя оттолкнет капитальный объем книги, нетипичный для отечественных пособий по микробиологии в отличие от зарубежных изданий. Однако наша «Микробиология» замышлялась не как портативное учебное руководство (Manual of Microbiology), а как источник разносторонней информации, равно полезный и студенту, и специалисту (Textbook on Microbiology). Автор лишен иллюзий в отношении соразмерности собственных познаний, хотя в свое оправдание должен отметить, что изложение основ современной микробиологии требует коллективного, а не индивидуального труда.

Как и в предыдущих томах, перекрестные ссылки от раздела к разделу помогают собрать воедино информацию по конкретным вопросам. Поскольку темы, как правило, взаимно пересекаются, и иные из них пришлось рассматривать в разных контекстах, в ходе изложения можно встретить мнимые повторы.

Автор приветствует тех, кто ознакомился с предыдущими томами учебника, а также читателей предлагаемого тома. В своем завершенном труде он видит вклад учителей и сотрудников по кафедре микробиологии СПбГУ, а также отечественных и зарубежных коллег, которые поделились с ним знаниями и подарили ему сотрудничество.

Автор глубоко обязан своим неизменно благосклонным рецензентам — профессорам А. Д. Харазовой и Ю. В. Гамалею. Дань признательности Т. Н. Песковой за умное и заботливое редактирование учебника.

Более всех автор благодарен своей жене Т. В. Серговской и своей дочери А. А. Пиневич. Без их самоотверженной помощи и моральной поддержки он никогда бы не осуществил задуманное.

ГЛАВА 16

ЦИТОГЕНЕТИКА

Modern biology, then, rests its case on the assumption, sometimes amounting to a conviction as the result of wide experience, that the properties of living things are the outcome of their chemical and physical configuration.

(Современная биология основана на предположении, порой доходящем до убеждения в силу широкого опыта, что свойства живых существ вытекают из их химической и физической структуры).

T. H. Morgan. The Scientific Basis of Evolution (London, 1932).

Цитогенетику часто определяют как раздел общей генетики, в котором явления наследственности и изменчивости рассматриваются на клеточном и субклеточном уровнях. Встречаются и развернутые определения данного предмета. Например, во введении к одноименному вузовскому учебнику сказано: «*Цитогенетикой можно назвать науку, изучающую особенности воспроизведения, рекомбинации, изменения и функционирования генетически значимых структур клетки, их распределение в митозе, мейозе и при оплодотворении в зависимости от их числа и генетического строения*» (В. Г. Смирнов, 1991).

Таким образом, объектом цитогенетики в ее традиционном понимании выступают цитологические и генетические свойства ядерных хромосом, а также, в меньшей степени, хромосом симбиотических органелл (митохондрий и пластид). В то же время молекулярно-информационные аспекты наследственности и изменчивости, т. е. полиморфизм генома, его размер и инфраструктура, консерватизм и непостоянство, а также эволюция отданы на рассмотрение другой дисциплине — геномике.

Иначе обстоит дело с прокариотами, у которых цитогенетику не удастся оторвать от геномики по трем причинам.

Во-первых, прокариоты — это клетки-организмы, и поэтому их генетический потенциал раскрывается на клеточном, т. е. цитогенетическом уровне.

Во-вторых, хромосомы прокариотов, в отличие от эукариотных хромосом, которые на определенной стадии клеточного цикла представляют собой дискретные микроскопические образования, выявляются только с помощью специального окрашивания или зондирования в виде ДНК-содержащей зоны, т. е. как геномная молекула.

В третьих, у прокариотов теснее связь между геном и признаком, что позволяет рассматривать в едином контексте молекулярно-информационные аспекты геномики и цитологическое поведение генетического аппарата.

Сведения о морфологии и молекулярном строении хромосом и плазмид, т. е. архитектурные основы цитогенетики прокариотов, уже приводились в I томе учебника. Приступая к углубленному изложению данной темы, остановимся вначале на репликациях.

16.1. РЕПЛИКОНЫ

В 1963 г. Франсуа Жакоб (F. Jacob, Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1965 г.) и Сидней Бреннер (S. Brenner) предложили *репликационную модель* бактериальной хромосомы. В ее основу легли результаты цитологических и генетических исследований, выполненных на *E. coli* и *B. subtilis*.

Термином «репликон» (англ. replicon; от лат. replicatio — возобновление и греч. ontos — сущее; «нечто реплицирующееся») обозначается группа сцепления, или структурная совокупность всех последовательно копируемых хромосомных генов.

Физической основой репликона служит двухспиральная кольцевая ДНК, в которой есть строго определенный локус начала репликации — *ориджин*, или *репликатор*. От него хромосома копируется в двух направлениях до диаметрально противоположного локуса конца репликации — *терминуса*. Переход ориджина из латентного состояния в репликативную форму происходит под воздействием индуцибельных *инициаторных белков*.

Репликация возможна только при условии, если ДНК в области ориджина денатурируется, а затем денатурируется, т. е. расплетается на одиночные цепи. По мере продвижения зоны денатурации за пределы ориджина в хромосоме образуются две репликационные вилки, в которых происходит матричное копирование комплементарных цепей ДНК.

За время, прошедшее с момента создания исходного варианта репликационной модели, она подверглась существенному уточнению и была дополнена:

- теперь понятие «репликон» относится не только к хромосомам, но и к нехромосомным генетическим элементам (плазмидам);
- показано, что, наряду с генами, в состав репликона входят некодирующие последовательности, в том числе с регуляторной функцией;
- установлено, что репликация кольцевой ДНК может быть не только двунаправленной, но и однонаправленной;
- выяснено, что помимо кольцевых хромосом и плазмид встречаются репликоны линейной формы.

Кардинально изменились и представления о механизме, с помощью которого сестринские хромосомы «расходятся» по дочерним клеткам.

Как известно, при эукариотном митозе сестринские хромосомы взаимодействуют своими кинетохорами (специализированными мультиполипептидными комплексами) с тубулиновыми микротрубочками митотического веретена и при помощи кинезинового мотора переносятся к противоположным полюсам клетки, на что расходуется энергия, освобождаемая при гидролизе терминальной фосфодиэфирной связи АТФ.

У бактерий не существует истинного митотического аппарата, который у эукариотов состоит из конденсированных хромосом, кинетохоров, направляющего веретена и кинезинового мотора. Поэтому задача расхождения сестринских хромосом у них решается иным способом.

Согласно одному из постулатов репликонной модели, альтернативой митотического аппарата у прокариотов служит комплекс хромосомного ориджина репликации с участком CM, расположенным на экваторе клетки. По мере того, как в эту зону встраивается новый мембранный материал, CM разрастается, сестринские хромосомы отодвигаются друг от друга и, таким образом, пассивно доставляются к противоположным клеточным полюсам.

Однако недавно было показано, что расхождение бактериальных хромосом в действительности представляет собой активный процесс (см. раздел 16.4.2). Иными словами, у прокариотов все-таки существует аналог митотического аппарата.

16.1.1. Хромосомы

Главными носителями генома прокариотной клетки служат хромосомы. Среднего размера прокариотная хромосома (~4,5 млн. п.н.) имеет контурную длину ~1,5 мм и занимает объем $\leq 0,5$ мкм³. Однако даже в таком тысячекратно компактизированном, или «сложенном» виде (англ. *folded chromosome*) прокариотная хромосома находится в динамическом состоянии. Она доступна репликазам, которые осуществляют ее воспроизведение, и ДНК-зависимым РНК-полимеразам, которые считывают с нее генетическую информацию.

Помимо хромосом в бактериях и археях нередко содержатся сателлитные генетические элементы, или плазмиды.

Два генома — хромосомный и плазмидный — формально объединяются понятием «клеточный геном». Тем не менее в информационном отношении между плазмидой и хромосомой существует принципиальное различие.

Корни различий между хромосомой и плазмидой. Хромосомный и плазмидный геномы содержат разные наборы генов. Кроме того, хромосомы отличаются от плазмид тем, как они реплицируются.

Хромосома обязательно содержит *незаменимые* гены (англ. *essential gene*). К ним относятся все *информационные* гены, т. е. гены репликации, транскрипции и трансляции, а также большинство генов *домашнего хозяйства*, в частности, гены транспортных белков и гены биосинтеза клеточной стенки. Для облигатно патогенных бактерий незаменимыми являются гены, кодирующие адгезины и токсины. Незаменимые гены нужны клетке в любой физиологической ситуации; без них она теряет способность к автономному существованию, выживанию и репродукции. Плазмида, в отличие от хромосомы, не содержит незаменимых генов, и поэтому ее присутствие для клетки-хозяина не обязательно.

Репликация хромосомной ДНК инициируется только единожды на протяжении клеточного цикла, причем в его относительно короткой, строго определенной фазе С (см. раздел 16.4.1.1). В то же время репликация плазмидной ДНК не зависит от репликации хромосомной ДНК; она инициируется в произвольный момент клеточного цикла и может происходить многократно на его протяжении. Иногда плазмида, напротив, вообще не реплицируется.

Кольцевые и линейные хромосомы. У большинства бактерий хромосома ковалентно замкнута в кольцо. Линейные бактериальные хромосомы встречаются довольно редко. В частности, они обнаружены у *Agrobacterium tumefaciens* (класс «*Alphaproteobacteria*»), *Rhodococcus fascians* (фила ВХIII *Firmicutes*), *Streptomyces coelicolor* и *S. lividans* (фила ВХIV *Actinobacteria*), а также *Borrelia burgdorferi* В31 (фила ВХVII *Spirochaetes*).

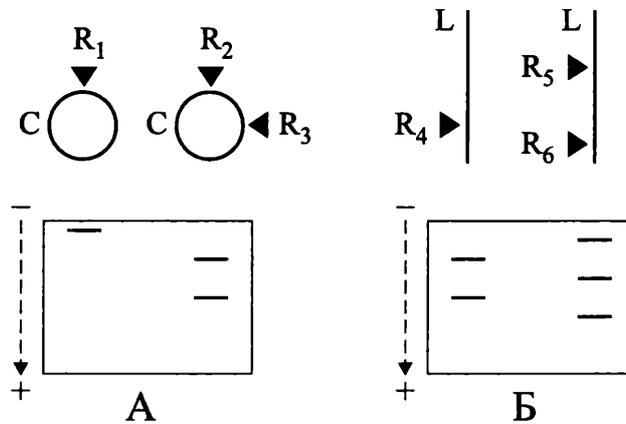


Рис. 164. Пульс-электрофореграммы кольцевой (А) и линейной (Б) хромосом.
 С — кольцевая хромосома; L — линейная хромосома.
 Черными треугольниками обозначены сайты рестрикции рестриктазами R₁–R₆.

Первая линейная хромосома размером 1 млн.п.н. была обнаружена в 1989 г. у *B. burgdorferi* B31 — возбудителя клещевого спирохетоза, или болезни Лайма (англ. Lyme disease).

Открытие линейных хромосом состоялось благодаря использованию гель-электрофореза в пульсирующем электрическом поле (англ. pulse field gel electrophoresis, PFGE). Этот метод позволяет разделить в крупнопористом агарозном геле линейные ДНК-содержащие структуры (как нативные, так и лишенные кольцевой формы или фрагментированные крупнощелящими рестриктазами). При этом используется электрическое поле постоянной полярности, которое периодически реориентируется под углом 120°. Благодаря «раскачке» в сочетании с непрерывной миграцией к аноду образуется набор полос в размерном диапазоне 0,3–3 млн.п.н., наименее подвижная из которых соответствует полноконтурной хромосомной ДНК.

Поскольку кольцевые молекулы ДНК не проникают в агарозный гель, перед электрофорезом их необходимо перевести в линейную форму. Для определения размера генома и физического картирования полноконтурные молекулы кольцевой или линейной ДНК режут рестриктазами.

Элементарное доказательство линейной структуры хромосомы основано на специфике паттерна рестрикции — при PFGE-электрофорезе кольцевой хромосомы количество полос в геле равно числу использованных эндонуклеаз с одним сайтом рестрикции (рис. 164, А), в то время как для линейной хромосомы оно на одну больше (рис. 164, Б).

У архей описаны только кольцевые хромосомы.

Партитность генома. Партитностью называется физическое существование генома в виде того или иного числа неидентичных групп сцепления.

Партитность не следует смешивать с плоидностью, или копийностью, т. е. количеством идентичных копий хромосом(ы) или плазмид(ы).

Плоидность прокариотной клетки зависит от природы объекта и фазы роста. Например, *Deinococcus radiodurans* (фила BIV «*Deinococcus-Thermus*») имеет 4–10, *Borrelia hermsii* (фила B XVII *Spirochaetes*) 8–16, *Desulfovibrio gigas* (класс «*Deltaproteobacteria*») 9–17, *Azotobacter vinelandii* (класс «*Gammaproteobacteria*») до 80, а *Buchnera aphidicola* (класс «*Gammaproteobacteria*») — в среднем 120 копий хромосомы. На сегодня абсолютным чемпионом является гигантская некультивируемая бактерия *Epulopiscium* sp. тип В (см. I том учебника и раздел 17.5.2.2 настоящего тома), которая содержит десятки тысяч копий генома размером ~3,8 млн.п.н.

При активном росте бактерии имеют больше копий хромосом(ы), чем в состоянии покоя, в частности, *E. coli* содержит 1–2 хромосомы в стационарной и 2–8 хромосом в экспоненциальной фазе.

У архей, как и у бактерий, плоидность клеток зависит от объекта и фазы роста. Старые клетки *Sulfolobus acidocaldarius* содержат 1–2, а *Methanococcus voltae* 3–10 хромосом. Аналогично, в молодых клетках архей обычно больше хромосом, чем в старых. В частности, *M. jannashii* содержит 1–5 хромосом в стационарной и 3–15 хромосом в экспоненциальной фазе.

Унипартитным (англ. unipartite; от лат. unus — один и pars — часть) называется геном, сосредоточенный в одной хромосоме, которая может быть одно- или многокопийной. В свою очередь, **мультипартитным** (англ. multipartite; от лат. multus — многочисленный и pars — часть) называется геном, который распределен между несколькими разными хромосомами, причем каждая из них может быть одно- или многокопийной. Иногда понятие мультипартитности распространяют на геномы, распределенные между одной хромосомой и одной или несколькими мегаплазмидами (см. ниже).

До недавнего времени считали, что мультипартитность генома свойственна только эукариотам. Однако сейчас известно свыше 20 примеров мультипартитных прокариотных геномов, в основном у бактерий (см. ниже). Почти все они полностью секвенированы.

Мультипартитные геномы чаще всего распределены между двумя хромосомами — большего размера, или **доминирующей** (англ. dominant) и меньшего размера, или **вторичной** (англ. secondary). Примеры мультипартитных геномов у прокариотов приведены в табл. 17.

Мультипартитность часто, но не обязательно связана с крупным размером генома. Для примера, сопоставим суммарный размер двух хромосом *Brucella melitensis* (~3 млн.п.н.) или двух хромосом *Burkholderia pseudomallei* (~7 млн.п.н.) с размером единственной хромосомы *Mycococcus xanthus* (~9 млн.п.н.).

В инфраструктурном отношении компоненты мультипартитных геномов обнаруживают как сходство, так и различия. Сходство выражается в близкой величине молярного %GC-пар, что может свидетельствовать о совместной эволюции компонентов мультипартитного генома. Различие, прежде всего, связано со спецификой строения ориджина репликации (см. раздел 16.4.1.1). Кроме того, незаменимые гены, как правило, неравноценно распределены между доминирующей и вторичной хромосомами.

В доминирующей хромосоме находится большинство незаменимых генов, тогда как вторичные хромосомы обычно содержат только несколько незаменимых генов, например гены оперона рРНК (*rrn*). Как исключение, можно назвать геном *Rhodobacter sphaeroides*, где незаменимые гены примерно поровну поделены между двумя хромосомами размером ~3 и 1 млн.п.н. (см. табл. 17). В свою очередь, вторичные хромосомы, как правило, содержат относительно больше открытых рамок считывания (см. раздел 16.3.1), функциональная роль которых неизвестна. В целом можно сказать, что вторичные хромосомы преимущественно содержат такие гены, которые имеют приспособительное значение для жизни в определенной экологической нише.

Одним из наиболее изученных мультипартитных геномов является геном *Vibrio cholerae*. Он распределен между двумя кольцевыми хромосомами. Доминирующая хромосома (x_1 -хромосома; 2,96 млн.п.н.) содержит большинство незаменимых генов. Во вторичной хромосоме (x_2 -хромосоме; 1,07 млн.п.н.) незаменимых генов только несколько. В частности, это *rpmI* (ген рибосомного белка L22), *rplT* (ген рибосомного белка L35), *infC* (ген фактора инициации трансляции) и *thrS* (ген синтазы триптофанил-тРНК).

Таблица 17. Примеры мультипартитных геномов у прокариотов

Фила или класс	Вид	Тип и геометрия репликона	Ориджин (или соседние с ним гены)	Размер репликона (млн.п.н.)	Число открытых рамок считыв.
AI <i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacterium salinarium</i>	х, к	–	2,00	–
		м, к	–	0,10	–
BIV « <i>Deinococcus-Thermus</i> »	<i>Deinococcus radiodurans</i>	х ₁ , к	<i>dnaA, dnaN</i>	2,65	2633
		х ₂ , к	<i>parA</i>	0,41	369
« <i>Alphaproteobacteria</i> »	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	х ₁ , к	<i>Cori</i> -типа	2,84	2789
		х ₂ , л	<i>repABC</i>	2,08	1882
	<i>Brucella melitensis</i>	х ₁ , к	<i>Cori</i> -типа	2,12	2059
		х ₂ , к	<i>repABC</i>	1,18	1138
	<i>B. suis</i>	х ₁ , к	<i>Cori</i> -типа	2,11	2185
		х ₂ , к	<i>repABC</i>	1,21	1203
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	х, к	<i>Cori</i> -типа	3,65	3341
		м, к	<i>repABC</i>	1,68	1570
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	х ₁ , к	–	3,05	3106
		х ₂ , к	–	0,91	874
« <i>Betaproteobacteria</i> »	<i>Ralstonia eutropha eutrophus</i>	х ₁ , к	–	–	–
		м ₁ , к	–	0,45	–
	<i>Burkholderia cepacia</i>	х ₁ , к	–	3,65	–
		х ₂ , к	–	3,17	–
		х ₃ , к	–	1,07	–
	<i>B. mallei</i>	х ₁ , к	<i>dnaA, dnaN</i>	3,51	3344
		х ₂ , к	<i>parAB</i>	2,33	2091
	<i>B. pseudomallei</i>	х ₁ , к	<i>dnaA, dnaN</i>	4,07	3460
		х ₂ , к	<i>parAB</i>	3,17	2395
	<i>R. solanacearum</i>	х, к	<i>dnaA, dnaN</i>	3,72	3448
м, к		<i>repA</i>	2,09	1681	
« <i>Gammaproteobacteria</i> »	<i>Erwinia herbicola</i>	х ₁ , к	–	–	–
		х ₂ , к	–	0,52	–
	<i>Vibrio cholerae</i>	х ₁ , к	<i>oriCI_{vc}</i>	2,96	2770
		х ₂ , к	<i>oiCII_{vc}</i>	1,07	1115
	<i>V. parahaemolyticus</i>	х ₁ , к	<i>oriCI_{vc}</i> -типа	3,29	3080
		х ₂ , к	<i>oriCII_{vc}</i> -типа	1,88	1752
<i>V. vulnificus</i>	х ₁ , к	<i>oriCI_{vc}</i> -типа	3,35	3262	
	х ₂ , к	<i>oriCII_{vc}</i> -типа	1,86	1697	
B XIII <i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	х, к	–	–	–
		м, к	–	–	–
B XVII <i>Spirochaetes</i>	<i>Leptospira interrogans</i>	х, к	<i>parAB, dnaA</i>	4,33	4360
		м, к	<i>parAB</i>	0,36	367

Примечание: х – хромосома; м – мегаплазмида; к – кольцевая; л – линейная; «–» – данные отсутствуют.

Для объяснения происхождения мультипартитных геномов предложены альтернативные гипотезы. Согласно «схизматической» гипотезе (англ. schism – раскольничество), в ходе эволюции хромосома-предшественник расщепилась на две отдельные хромосомы, каждая из которых приобрела способность к самостоятельной репликации. Согласно «плазмидной» гипотезе, бактерия с унипартитным геномом горизонтальным путем получила мегаплазмиду, в которую мигрировала часть незаменимых хромосомных генов.

То, что вторичная хромосома имеет относительно меньший размер и, как правило, бедна незаменимыми генами, а также использует оригинальную репликацию плазмидного типа (см. раздел 16.4.1.2), дает основание считать более правдоподобной плазмидную гипотезу.

16.1.2. Плазмиды

Термин «плазида» (англ. plasmid; от греч. plasma — нечто оформленное и eidos — способ действия; в данном случае — цитоплазматический фактор) был предложен в 1952 г. Джошуа Ледербергом (J. Lederberg; Нобелевская премия по химии, 1958 г.) для обозначения вспомогательных генетических элементов, которые существуют в цитоплазме либо автономно, либо в интеграции с хромосомой.

У прокариотов плазмиды распространены исключительно широко. Например, до 50% изолятов *Bacteroides* spp., самой многочисленной бактерии пищеварительного тракта человека, содержат плазмиды.

Плазмиды также найдены у ряда архей. Однако истинный масштаб их распространения в этом домене пока неизвестен.

Плазида — это нехромосомная ДНК. Другими словами, геном-сателлит, играющий роль цитоплазматического молекулярного симбионта.

Плазмиды по величине в целом уступают хромосомам (1,5 т.п.н — 1,5 млн.п.н. против 500 т.п.н. — 10 млн.п.н.). Однако в данном случае размерный критерий не имеет решающего значения — репликон считается хромосомой, даже если он мал по размеру, однако несет хотя бы один незаменимый ген. Примером служит репликон *rLeu* симбионта тлей, бактерии *Buchnera* sp. APS. Он небольшого размера (7,8 т.п.н.), однако в нем есть незаменимые гены, которые отвечают за биосинтез лейцина и отсутствуют в доминирующей хромосоме. В свою очередь, в мегаплазмиде фитопатогенной бактерии *Erwinia herbicola* (520 т.п.н.) имеется незаменимый ген прототрофности по тиамину, и поэтому ее также следует считать хромосомой.

Поскольку в плазмидах, в отличие от хромосом, отсутствуют незаменимые гены (особенно информационные), они распространены не универсально. При элиминации плазмиды клетка-хозяин не теряет жизнеспособности.

Плазида содержит гены, необходимые для ее собственного сохранения в клетке-хозяине. Прежде всего, это гены, ответственные за инициацию и контроль репликации плазмидной ДНК (в том числе, контролирующие копийность плазмиды). Кроме того, в плазмиде могут находиться гены, контролирующие ее гарантированное наследование — в частности, благодаря равномерному распределению плазмидных копий при клеточном делении или за счет переноса плазмиды между клетками-партнерами при конъюгации.

Так называемый «базовый репликон» плазмиды имеет размер 2–3 т.п.н. и состоит из локуса *ori*, который обеспечивает инициацию репликации, а также из генов *rep*, *inc* и *cop*, отвечающих за ее контроль. Иными словами, базовый репликон — это минимальная часть плазмиды, способная реплицироваться в определенном количестве копий.

Может сложиться впечатление, что все плазмиды эгоистичны. Однако это не так — многие плазмиды, помимо генов, определяющих их собственную экспансию, несут гены, которые кодируют селективно-полезные признаки и приносят пользу хозяйской клетке, в частности гены биодegradации, вирулентности, лекарственной устойчивости и т. д. Поскольку эти гены нередко входят в состав транспозонов (см. раздел 16.3.1.3), генетическая изменчивость плазмид и спектр биологических свойств их хозяев расширяется. Дополнительным фактором изменчивости служит общая, или *ResA*-зависимая и сайтспецифичная, или *ResA*-независимая рекомбинация между разными плазмидами (см. раздел 16.6.1.2).

Одни плазмиды структурно изолированы от хозяйской хромосомы и реплицируются самостоятельно. Другие способны временно интегрироваться в хромосому

с образованием общего репликона (в этом случае их называют *эписомами* (англ. episome; от греч. epi — дополнять что-либо; в данном случае — генетический элемент, дополняющий хромосому). Встраивание плазмиды в хромосому называется *интеграцией*, а обратный процесс — *исключением*, или *эксцизией* (англ. excision — вырезание).

Копии плазмид передаются дочерним клеткам, т. е. вертикально распространяются в популяции своих хозяев. Помимо этого некоторые плазмиды могут переноситься от клетки-донора гетерологичной клетке-реципиенту, т. е. распространяются не только вертикально, но и горизонтально.

При горизонтальном переносе по типу конъюгации или генетической трансформации роль вектора выполняет сама плазида. В остальных случаях ей нужна помощь самостоятельно переносящегося вектора, которым служит конъюгативная плазида или трансдуцирующий бактериофаг (см. раздел 16.6.1.3).

16.1.2.1. Классификация плазмид

Плазмиды по молекулярному размеру можно условно подразделить на три группы: мелкие (2–50 т. п. н.), средние (50–100 т. п. н.) и крупные (>100 т. п. н.). Крупные плазмиды называются *мегаплазидами*.

Однако главное значение при классификации плазмид придается не размерному, а функциональному критерию. Это, прежде всего:

- свойства, которые плазида сообщает своему хозяину;
- способ горизонтального переноса плазмиды;
- взаимная совместимость плазмид.

Классификация плазмид по свойствам, которые они сообщают своему хозяину. Данная классификация носит исторический характер. После открытия первых плазмид их по фенотипическому проявлению стали подразделять на:

- *F-плазмиды* (сокр. англ. fertility factor), или половые факторы, которые определяют способность бактерий к векторному переносу генов при конъюгации;
- *R-плазмиды* (сокр. англ. resistance factor), или факторы резистентности, которые определяют устойчивость бактерий к химиотерапевтическим препаратам;
- *Col-плазмиды* (сокр. англ. colicinogenic factor), или факторы колициногенности, которые кодируют колицин, белковый агент антагонизма между близкородственными кишечными бактериями;
- *плазмиды-фаги* (λ , *P2* и *P22*), которые, в числе прочего, кодируют капсомеры, или субъединицы белковой оболочки зрелой вирусной частицы.

В ходе изучения плазмид выяснилось, что многие из них придают своим хозяевам и другие функциональные свойства, важные в селективном плане (см. табл. 18).

Прежде всего, плазмиды могут иметь значение для автоэкологии бактерий, а также представляют интерес в плане биоремедиации. Например, имеющиеся у *Pseudomonas* spp. TOL-плазмиды размером 50–120 т. п. н. (сокр. англ. toluene) содержат гены, ответственные за ферментативное разрушение алканов, аренов и других ксенобиотиков. Помимо TOL-плазмид, можно назвать ряд других «плазмид биодegradации» (NAH, SAH, XYL и др.), которые взаимно гомологичны и способны к общей рекомбинации.

Плазмиды могут иметь существенное значение для синэкологии бактерий. Например, у патогена человека и животных *Salmonella enterica* серовар Typhimurium

Таблица 18. Примеры функциональных свойств, кодируемых плазмидами

Свойство	Бактерия	Размер плазмиды (т.п.н.)
Образование ферментов конструктивного метаболизма		
β -Галактозидаза	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	65
Синтаза целлюлозы	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	130
Уреаза	<i>Providencia stuartii</i>	95
Деградация ксенобиотиков		
Алканы	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	130
Пестициды	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	40
Хлорбензол	<i>Pseudomonas</i> sp.	40
Симбиотическая diaзотрофия		
Факторы нодуляции	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	130
Факторы симбиоза	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	130
Факторы diaзотрофии	<i>Rh. trifolii</i>	160
Образование иммуногенных и антибиотических соединений		
Антиген	<i>Shigella sonnei</i>	80
Колицин	<i>Salmonella enterica</i> серовар Typhimurium	46
δ -Эндотоксин	<i>Bacillus thuringiensis</i>	50
Инфекционность для человека и животных		
Инвазивность	<i>Shigella flexneri</i>	90
Вирулентность	<i>Corynebacterium fascians</i>	50
Патогенность	<i>E. coli</i>	40
Устойчивость к внешним (а)биотическим факторам		
Антибиотики	<i>Serratia marcescens</i>	65
Тяжелые металлы	<i>Pseudomonas</i> sp.	130
УФ-излучение	<i>S. enterica</i> серовар Typhimurium	45
Чувствительность к внешним (а)биотическим факторам		
Бактериофаг	<i>S. meliloti</i>	40
Высокая температура	<i>Yersinia ruckeri</i>	30

гены вирулентности содержатся в Vir-плазмиде (сокр. англ. virulence), размер которой составляет 90 т.п.н. В свою очередь, у клубеньковой бактерии *Sinorhizobium meliloti* до 50 генов, отвечающих за симбиоз с донником, расположены на pSym-мегаплазмиде размером 1,5 млн.п.н. У ассоциативного diaзотрофа *Azospirillum brasiliense* (см. раздел 20.3.3) гены, контролирующие дистанционные взаимоотношения с корнями злаков, локализованы в плазмиде размером 60 т.п.н. Наконец, в случае *Agrobacterium tumefaciens* Ti-плазмиды и Ri-плазмиды размером от 200 до ≥ 800 т.п.н. (сокр. англ. tumor inducing; root inducing) интегрируются в растительную хромосому, что вызывает образование коронарных галлов и индуцирует биосинтез специфических азотсодержащих субстратов-опинов, которые поддерживают эндофитный рост этой бактерии (см. I том учебника и раздел 20.6.3 настоящего тома).

Большинство генов, содержащихся в плазмидах, несущественно для выживания прокариотных хозяев. Однако при энергетическом стрессе они иногда приобретают принципиальное значение.

В качестве примера можно назвать мегаплазмиду экстремально галофильного археота *Halobacterium salinarum*, которая содержит информацию о газовых везикулах — цитоплазматических микрокомпартаментах, обеспечивающих плавучесть клетки и оптимальный световой режим для факультативной квази-фототрофии (см. I и II тома учебника).

В свою очередь, у *Ralstonia eutropha* мегаплазида HUP несет структурные гены гидрогеназы и компонентов дыхательной цепи, а также регуляторные гены, отвечающие за факультативную водородную хемолитотрофию (см. II том учебника).

Хотя по расчетам на мегаплазмиде размером >100 т. п.н. смогли бы поместиться свыше ста генов, реально их не более одного–двух десятков. Функциональное значение 90% нуклеотидных последовательностей таких плазмид неизвестно. Возможно, это так называемая *эгоистичная ДНК* (англ. selfish DNA), не имеющая фенотипического проявления.

Классификация плазмид по способу горизонтального переноса. Согласно этому критерию, плазмиды подразделяются на трансмиссивные и нетрансмиссивные.

Трансмиссивные плазмиды (англ. self-transmissible — самопередающиеся) передаются от донора к реципиенту при конъюгации. К ним относятся половые факторы и коинтегративные плазмиды (см. ниже).

Нетрансмиссивные плазмиды (англ. not self-transmissible) либо не участвуют в конъюгации, либо передаются от донора к реципиенту в составе временно образующегося комплекса, который содержит трансмиссивную плазмиду. В этом случае их называют *мобилизуемыми плазмидами* (англ. mobilizable plasmid).

Половые факторы. *Половые факторы* (англ. fertility factor), или *факторы переноса* (англ. transfer factor) — это такие плазмиды, которые содержат только гены репликации плазмидной ДНК и гены *tra* (сокр. англ. transfer — перенос; *отвечают за перенос плазмидной ДНК от донора к реципиенту при конъюгации*). Благодаря экспрессии указанных генов половые факторы непрерывно поддерживаются в цепи поколений своих хозяев, а также горизонтально переносятся между гетерологичными клетками (см. раздел 16.6.1.3). Иными словами, это «эгоистичные» генетические системы.

Классическим примером полового фактора служит F-плазида *E. coli*.

В состав полового фактора входят гены, кодирующие *половые фимбрии* (англ. sex pilus). Известны два варианта таких фимбрий — длинные гибкие F-фимбрии (сокр. англ. fertility) и короткие жесткие P-фимбрии (сокр. англ. pilus). Чаще встречающаяся F-фимбрия имеет длину 2–20 мкм, наружный диаметр 8 нм и внутренний канал шириной 2 нм. Она образована спирально уложенным белком F-пилином (7 кДа). F-фимбрия выполняет еще роль рецептора «мужских» нитчатых фагов, которые адсорбируются либо вдоль нее (f2, MS2, R17 и Q β), либо на ее дистальном конце (f1, fd и M13). Образование F-пилина контролируют три гена. Структурный ген *traA* кодирует белок-предшественник препилина молекулярной массой 13 кДа. Сигнальная пептидаза LepB (ген *traQ*) осуществляет процессинг препилина на внутренней поверхности CM, отрезая от него макропептид длиной в 51 аминокислоту. Ацетилаза (продукт гена *traX*) образует из оставшегося фрагмента зрелый пилин (7 кДа). В секрети пилина и сборке F-фимбрии участвуют до 17 генов, кодирующих структурные и регуляторные белки (см. I том учебника).

С помощью F-фимбрии «мужская» клетка-донор (F⁺) распознает рецепторы на поверхности «женской» клетки-акцептора (F⁻). Роль рецептора, в частности, играют порины в составе OM. После прикрепления к женской клетке F-фимбрия сокращается, и оболочки половых партнеров вступают во взаимный контакт. Сокращение F-фимбрии после ее адгезии к женской клетке или после адсорбции на ней мужского фага не требует затраты энергии и осуществляется путем спонтанной разборки проксимальных субъединиц пилина. В результате женская клетка или адсорбированный бактериофаг подтягиваются к мужской клетке, и между ними векторно переносится ДНК.

Половой фактор может на время встраиваться в хромосому. Позднее, в случае неточного исключения, он захватывает с собой соседние участки хозяйской хромосомной ДНК, что создает предпосылку для *сексдукции*, или горизонтального пере-

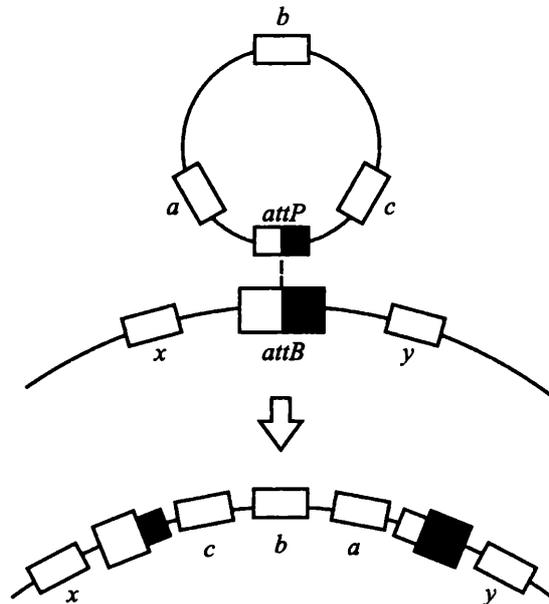


Рис. 165. Механизм интеграции плазмиды в бактериальную хромосому (схема Кэмпбела).
attB — хромосомный и *attP* — плазмидный сайты интеграции; *a*, *b* и *c* — плазмидные гены; *x* и *y* — хромосомные гены.

носа хромосомных генов. Штаммы *E. coli*, содержащие интегрированный F-фактор, обозначаются как «часто рекомбинирующие», или Hfr-штаммы (сокр. англ. high frequency of recombination). В свою очередь, F-плазмиды с присоединенными к ним хромосомными генами называются F'-факторами.

Схема интеграции полового фактора или иной плазмиды в бактериальную хромосому была предложена в начале 1960-х гг. Кэмпбелом (J. Campbell). В настоящее время она общепризнана (рис. 165).

На хромосоме имеются один или несколько сайтов *attB* для интеграции F-фактора. На плазмиде, в свою очередь, имеется сайт *attP*. По этим сайтам между хромосомой и плазмидой возникает синапс, или локальный гетеродуплекс. С помощью плазмидной интегразы в нем образуются точечные разрезы, а затем осуществляется сайтспецифичная рекомбинация (реципрокный кроссинговер).

Если в свободном состоянии плазмиды были линейной, то для интеграции в хромосому она предварительно должна приобрести кольцевую форму. В свою очередь, чтобы интегрироваться в хромосому, т. е. превратиться в профаг, линейная инъекционная форма вирусной ДНК должна перейти в кольцевую (см. разделы 16.6.1.2 и 16.6.1.3).

Коинтегративные плазмиды. Согласно названию, такие плазмиды представляют собой *коинтеграторы* (англ. cointegrate) — гибридные генетические конструкции, образующие единую группу сцепления. В состав коинтегративных плазмид входят:

- половой фактор, который обеспечивает конъюгативный перенос ДНК;
- гены, кодирующие те или иные селективно полезные признаки.

Примером коинтегративных плазмид служат R-плазмиды, состоящие из полового фактора F, и генов, которые обеспечивают устойчивость к сульфамидным пре-

парамам и антибиотикам. Таким образом, R-плазмиды принадлежат к числу F'-факторов. Распространение R-плазмид в популяциях *E. coli*, *Shigella flexneri* и других энтеробактерий вызывает феномен множественной лекарственной устойчивости.

Другим примером коинтегративных плазмид являются Col-плазмиды *S. enterica* серовар Typhimurium. Они также принадлежат к числу F'-факторов и состоят из полового фактора F, который сцеплен с генами, ответственными за биосинтез колицинов.

Мегаплазмиды размером более 100 т.п.н., как правило, относятся к группе коинтегративных.

Нетрансмиссивные плазмиды. Как уже отмечалось, такие плазмиды или вообще не передаются, или «мобилизуются» и передаются одним из двух способов — либо путем образования коинтеграта с трансмиссивной плазмидой, либо за счет использования *mob*-сайта трансмиссивной плазмиды (см. раздел 16.6.1.3).

В качестве примера можно привести коинтеграт *Pseudomonas oleovorans*, состоящий из:

- нетрансмиссивной плазмиды биodeградации OСТ;
- трансмиссивной плазмиды, несущей ген устойчивости против ртути.

Классификация плазмид по взаимной совместимости. Еще одна классификация плазмид основана на феномене *поверхностного исключения* (англ. plasmid surface exclusion) и феномене внутриклеточной *несовместимости* (англ. plasmid incompatibility).

Резидентные плазмиды не терпят конкурентов; при поверхностном исключении они мешают внедрению другой плазмиды в клетку хозяина, а при несовместимости препятствуют репликации другой плазмиды. В первом случае блокируется механизм переноса плазмиды, во втором случае — негативно регулируется ее копияность.

В соответствии с феноменом внутриклеточной несовместимости различают *группы несовместимости* плазмид. Члены одной и той же группы неспособны устойчиво наследоваться в одной и той же клеточной линии (это не относится к членам разных групп). Плазмиды несовместимы из-за своей гомологии, поскольку они содержат одинаковые системы контроля репликации и паритетного распределения плазмидной ДНК между дочерними клетками.

Классификация плазмид по группам несовместимости была предложена в начале 1970-х гг. В настоящее время она сильно детализировалась, в частности, у энтеробактерий различают около 30 групп, у стафилококков — 7 групп несовместимости.

Среди групп несовместимости плазмид *E. coli* особо выделяется группа IncP. Она интересна тем, что вместе с группами IncC, IncN, IncQ и IncW содержит плазмиды, которые характеризуются *промиксцитетом* (англ. promiscuity; от лат. promiscuus — беспорядочный), т. е. способностью к конъюгативному переносу практически между любыми грамотрицательными бактериями. Благодаря этому устойчивость к антибиотикам распространяется между очень разными в фенотипическом плане бактериями, например *Anabaena* spp., *Glucanacetobacter xylinus*, *Legionella pneumophila*, *Mycococcus xanthus* и *Xanthomonas* spp.

16.1.2.2. Строение плазмид

Напомним, что размер плазмид лежит в диапазоне 1,5–1500 т.п.н., причем чаще всего встречаются представители двух групп (5–10 и 75–100 т.п.н.).

Автономные плазмиды бактерий и архей обычно представляют собой кольцевые суперспирализованные молекулы ДНК.

Линейные бактериальные плазмиды встречаются редко. Впервые они были найдены в 1977 г. у *Streptomyces rochei*. Позднее их обнаружили у других актинобактерий (в частности, *Nocardia opaca*), у фирмикута *Rhodococcus fascians*, спирохеты *Borrelia sp.*, а также у тионовой бактерии *Thiobacillus versutus*.

У архей до сих пор обнаружены только линейные плазмиды; например, экстремальный галофил *Halofetrax mediterranea* содержит отрицательно суперспирализованные кольцевые мегаплазмиды размером >500 т. п. н.

16.1.2.3. Природное и практическое значение плазмид

Плазмиды в живой природе — это, прежде всего, векторы для переноса селективно полезных генов. Например, в популяции аллохтонных бактерий (см. I том учебника) при соответствующем давлении естественного отбора широко распространяются коинтегративные плазмиды биодegradации, которые исходно имелись только у относительно небольшой части особей.

Велико и методическое значение плазмид для создания рекомбинантных генов и/или клонирования практически любых генов.

Некоторые плазмиды содержат одиночный *палиндром* (англ. palindrome; от греч. palin — назад и dromos — бег), т. е. короткую нуклеотидную последовательность, которая одинаково прочитывается во встречных направлениях на комплементарных цепях ДНК, например GAATTC. Такие последовательности служат сайтами узнавания для рестриктаз того или иного типа (в данном случае — для рестриктазы Eco RI). Необходимо, чтобы сайт узнавания находился в области, не отвечающей за репликацию плазмиды.

Путем подбора рестриктазы и проведения рестрикции плазмиде придается форма линейного дуплекса с «липкими» концами. Если с помощью той же самой рестриктазы вырезать фрагмент (в частности, ген) из ДНК другого происхождения, то у него появятся липкие концы, комплементарные липким концам предварительно рестрицированной плазмиды (рис. 166). Используя ДНК-лигазу, можно встроить такой фрагмент ДНК в плазмидный вектор, в результате чего получится кольцевая молекула рекомбинантной ДНК.

Если гибридным вектором, без потери им способности к репликации, трансформировать бактерию, то можно осуществить экспрессию чужеродного гена *in situ* или амплифицировать изучаемый ген в количестве, достаточном для секвенирования.

Отдельно от рекомбинантных ДНК следует рассматривать искусственные плазмиды, которые изначально конструируются с помощью генноинженерных методов (примером служит плазида pBR322).

16.2. РАЗМЕР ГЕНОМА

На первый взгляд, смысл термина «размер генома» (англ. genome size) очевиден. Однако в действительности требуется пояснение.

Напомним, что *генамам* (англ. genome; от греч. genos — род и лат. omnis — совокупный; в данном случае — набор наследственных факторов) называется полный комплект генов данного живого существа.

В свою очередь, *ген* (англ. gene; от греч. genos — род; в данном случае — наследственный фактор) — это функционально определенный участок ДНК, в котором закодирована первичная структура белка, первичная структура рРНК или первичная структура тРНК (см. раздел 16.3.1).

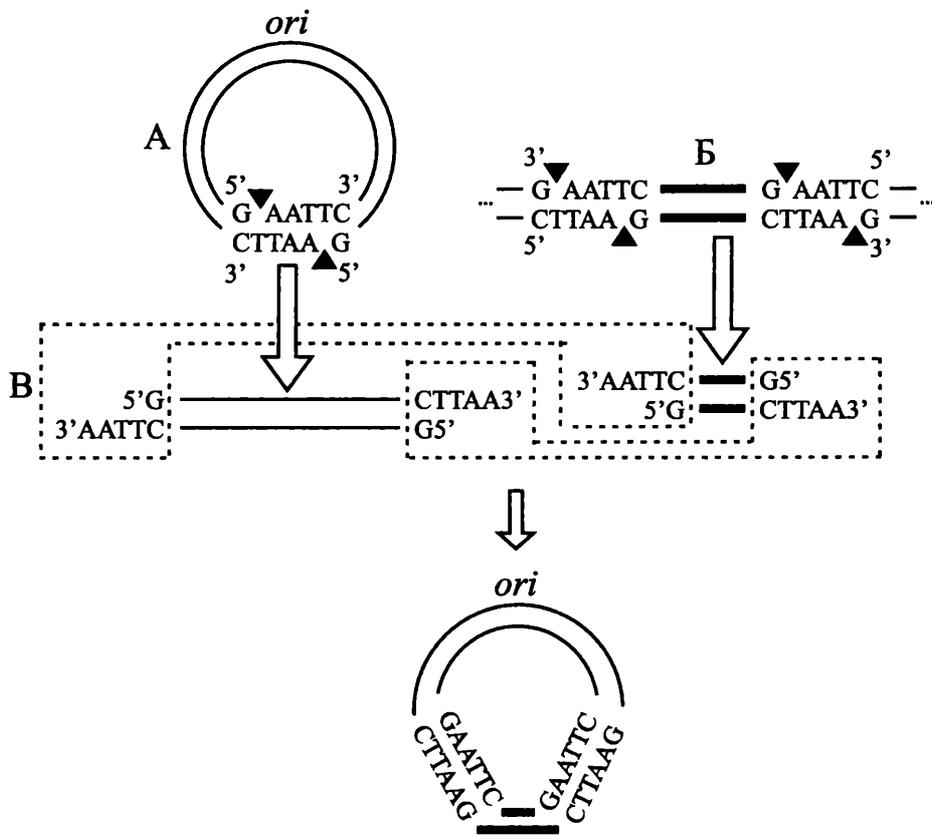


Рис. 166. Конструирование рекомбинантной плазмиды со встроенным фрагментом чужеродной ДНК.

А — разрезание кольцевой плазмиды при помощи рестриктазы *EcoRI*, образование липких концов; Б — вырезание фрагмента чужеродной ДНК при помощи той же рестриктазы, образование комплементарных липких концов; В — воссоединение липких концов при помощи ДНК-лигазы, восстановление кольцевой формы плазмиды. *ori* — плазмидный ориджин репликации.

Черными треугольниками обозначены сайты рестрикции.

Гены белков, в свою очередь, подразделяются на *структурные* и *регуляторные*. Помимо генов в геноме имеются *контролирующие генетические элементы*, с которыми связываются регуляторные белки.

Ген белка имеет кодирующую область, в которую входят иницирующий кодон, открытая рамка считывания и терминирующий кодон.

Как известно, генетический код считывается (транслируется) по неперекрывающимся триплетам. В силу этого возможны три разные рамки считывания конкретной нуклеотидной последовательности (три варианта трансляции), в которых стартовыми точками соответственно служат 1-й, 2-й и 3-й нуклеотид. *Открытая рамка считывания* (англ. open reading frame, ORF) — это последовательность триплетов, соответствующая аминокислотной последовательности полипептида; понятно, что внутри нее не должно быть терминирующих кодонов. Средний размер открытой рамки считывания у прокариотов составляет 900 нуклеотидов, что соответствует белку из 300 аминокислотных остатков общей молекулярной массой ~30 кДа.

Для выяснения информационного содержания секвенированной нуклеотидной последовательности ее с помощью компьютерных программ транслируют во всех шести возможных рамках

считывания (по три для двух комплементарных цепей). Затем для найденных открытых рамок считывания отыскиваются гомологи в компьютерной базе данных. Это позволяет ответить на вопрос: являются ли эти открытые рамки считывания актуалистическими генами, т. е. гомологичны ли продукты их трансляции ранее известным белкам. В первую очередь учитываются наиболее консервативные аминокислотные последовательности.

В результате такого анализа выяснилось, что бактериальные геномы содержат относительно много «виртуальных» генов, т. е. генов с неизвестными функциями (например, из ~4,3 тыс. открытых рамок считывания *E. coli* идентифицирована только половина). Виртуальные гены архей подразделяются на три группы: 25% гомологичны бактериальным генам, 25% эукариотным генам, а 50% уникальны.

Не все гены содержат кодирующие последовательности, которые транслируются в белок. В частности, не разбиты на триплеты гены рРНК и гены тРНК.

Количественное выражение размера генома. Строго говоря, размер генома — это только его *информационная емкость*, т. е. совокупность кодирующих участков, которая всегда будет несколько меньше размера хромосомы.

Таким образом, выражая размер генома в единицах молекулярной массы ДНК (Да) или в степени ее полимерности (п.н.), мы невольно или сознательно допускаем неточность.

Предел варьирования размера генома в домене *Bacteria* очень широк: от минимального значения 580 т. п.н. (*Mycoplasma genitalium*; 470 открытых рамок считывания) до максимально известного значения 9,5 млн. п.н. (*Mycococcus xanthus*).

В свою очередь, в домене *Archaea* установленный к настоящему моменту разброс размера генома лежит в пределах от 490 т. п.н. («*Nanoarchaeum equitans*») до 2,2 млн. п.н. (*Archaeoglobus fulgidus*; 2,43 тыс. открытых рамок считывания).

Бактериальные геномы минимального размера (600 т. п.н. — 1,2 млн. п.н.) типичны для микоплазм.

Сравнительно небольшие геномы (порядка 2 млн. п.н.) имеются у паразитических бактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам, например *Haemophilus* spp., *Helicobacter* spp., *Neisseria* spp. и *Streptococcus* spp.

Более крупными геномами (4–5 млн. п.н.) обладают свободноживущие, а также некоторые симбиотические бактерии, например *Bacillus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodobacter* spp. и *Salmonella* spp. В частности, размер генома традиционного модельного объекта — *E. coli* составляет 4,6 млн. п.н. (что соответствует молекулярной массе $3 \cdot 10^9$ Да) при контурной длине молекулы ДНК ~1,5 мм.

Наконец, самые большие геномы имеются у бактерий, способных к сложной дифференциации, например у *Anabaena* sp. PCC 7120 (6,5 млн. п.н.), *Streptomyces* spp. (8 млн. п.н.), *Bradyrhizobium* spp. (8,7 млн. п.н.) и *Mycococcus xanthus* (9,5 млн. п.н.).

Если расположить приведенные значения в порядке возрастания, то получится геометрическая прогрессия 1–2–4–8, что косвенно указывает на прогрессивную эволюцию геномов путем дупликаций и взаимного слияния.

В пределах крупной таксономической группы размер генома существенно варьирует. Например, у представителей филы ВХ *Cyanobacteria* он составляет от 2,7 млн. п.н. (*Synechococcus* sp. PCC 6301) до 6,5 млн. п.н. (*Anabaena* sp. PCC 7120). В свою очередь, у разных видов филы ВХVII *Spirochaetes* он колеблется в пределах 1–5 млн. п.н.

Близкородственные представители одной и той же таксономической группы, особенно штаммы одного и того же рода, обычно имеют геном одинакового размера — в качестве примера можно назвать цианобактерий *Synechococcus* sp. PCC 6301 и *Syne-*

chococcus sp. PCC 7002. С другой стороны, даже у разных штаммов одного и того же вида, например у *Streptomyces ambofaciens*, он может варьировать в пределах 6,5–8 млн.п.н., что связано с делециями участков размером до 2 млн.п.н.

Размер генома, если иметь в виду информационную емкость, отражает адаптационный потенциал прокариотного организма и широту его нормы реакции. Существует общая, хотя и не строгая закономерность: чем выше адаптационный потенциал бактерии, тем больше размер ее генома (*Synechocystis* sp. PCC 6803 — 3,5 млн.п.н., *B. subtilis* — 4,2 млн.п.н., *E. coli* — 4,6 млн.п.н.). В свою очередь, симбиотические бактерии и особенно облигатные эндоситобионты закономерно имеют геномы малого размера (*Mycoplasma pneumoniae* — 800 т.п.н., *Treponema pallidum* — 1,1 млн.п.н., *Chlamydia trachomatis* — 1,2 млн.п.н.).

Археи по размеру генома (порядка 1,5–2 млн.п.н.) в целом уступают бактериям, что, видимо, связано с их узкой адаптацией к экстремальным условиям существования.

Минимальный размер прокариотного генома. Ранее мы уже отмечали (см. I том учебника), что размер прокариотного генома имеет верхний ограничитель — микроскопический размер клетки, порядка 1 мкм, что позволяет вместить ДНК предельной контурной длины ~1 мм (~3 млн.п.н., или ~3 тыс. генов). В свою очередь, ультрамикробактерии, размер которых порядка 100 мкм, вынужденно обладают геномами малого размера.

Выявление и сравнительный анализ инфраструктуры малых прокариотных геномов дают возможность определить минимальный набор генов, достаточный для существования живой клетки как интегрально реплицирующейся биологической структуры. Как выяснилось, речь идет о наборе из 250–300 генов.

В конце 1990-х гг. русско-американские исследователи Е. В. Кунин (E. V. Koonin) и А. Р. Мушегян (A. R. Mushegian) высказали предположение, что в минимальный набор входят гены, общие для сильно дивергировавших бактерий, у которых стратегией эволюции генома была множественная потеря структурно-функциональных детерминант в ходе адаптации к паразитическому существованию. В качестве объектов сравнения были взяты *Mycoplasma genitalium* и *Haemophilus influenzae*, полностью секвенированные геномы которых кодируют соответственно 468 и 1073 белка. Как выяснилось, оба генома содержат 240 ортологов (см. раздел 16.3.1.1). В свою очередь, среди неортологов были выявлены 22 незаменимых гена (см. раздел 16.1.1). Шесть из них, специфичных для паразитических бактерий, в учет не принимались. Таким образом, минимальный набор генов составил 256 (240 + 16). Важно подчеркнуть, что в число этих генов входят «актуалистические» информационные гены и гены домашнего хозяйства (см. I том учебника), в том числе гены, отвечающие за репликацию, репарацию, транскрипцию, трансляцию, транспорт и генеральный метаболизм, а также гены шаперонов.

16.3. ИНФРАСТРУКТУРА ГЕНОМА

Необходимо сразу же отметить терминологическую неточность, которая прочно закрепилась в биологической литературе — понятие «геном» (совокупность генов) смешивается с понятием «репликон» (физическая единица репликации, т. е. хромосома, плазида или нуклеиновая кислота вируса).

Например, повсеместно говорят о «секвенировании генома», забывая о том, что в действительности речь идет о секвенировании ДНК репликона, состоящего из кодирующих и некодирующих участков.

Тем не менее, мы будем верны традиции и в дальнейшем станем использовать термин «инфраструктура генома» в его общепринятом, хотя и не точном значении.

Инфраструктура генома изучается с помощью разных подходов. Главной целью служит выявление специфических участков, отвечающих за те или иные фенотипические признаки. Традиционным методом служит *картирование*, которое может быть физическим или генетическим.

Физическое картирование позволяет выразить взаимное расположение и протяженность инфраструктурных элементов генома в молекулярных единицах (п.н.). Оно производится с помощью рестрицирования в сочетании с PFGE-электрофорезом, путем создания генных энциклопедий, а также секвенирования тотальной ДНК.

Генетическое картирование позволяет определить порядок расположения генов на хромосоме или плазмиде и их относительную взаимную удаленность. Оно осуществляется за счет анализа частоты рекомбинаций, в частности при конъюгации (см. раздел 16.6.1.2).

Генетическое картирование имеет ряд недостатков. Прежде всего, создание генетических карт является трудоемким делом. Кроме того, межгенное расстояние на генетической карте соответствует частоте рекомбинаций, а она, в свою очередь, неоднозначно зависит от характера распределения «горячих» рекомбинационных точек.

Нуклеотидный состав ДНК. Этот критерий инфраструктуры ДНК, выраженный в относительном содержании GC-пар, т.е. дроби $(G+C)/(A+T) \times 100\%$, косвенно характеризует белковый паттерн, или *протеом* данного объекта. Он отражает частоту использования кодонов; кроме того, высокое или низкое содержание GC-пар во всем геноме или его отдельной части определяется вариабельностью третьей позиции в кодоне, что называется вырожденностью кода. Например, аланин кодируют синонимические триплеты GCA, GCC, GCG и GCU.

В истории биологии мол. %GC сыграл роль первого индикатора ультраструктуры генома. Его оценивали прямым способом (по соотношению содержания нуклеотидов в пятнах на тонкослойной хроматограмме полного гидролизата ДНК) или косвенным путем (по температуре тепловой денатурации ДНК, которая находится в прямой зависимости от относительного количества GC-пар).

Относительное содержание GC-пар в прокариотной ДНК варьирует в пределах 20–80%. Хотя этот валовой биохимический показатель не отражает последовательность нуклеотидов (т.е. не является филогенетическим маркером и может совпадать у объектов, принадлежащих к разным ветвям глобального древа), его широко используют в систематике на уровне малых таксонов. В частности, внутривидовой разброс мол. %GC не превышает 5% (см. I том учебника).

Существует зависимость между нуклеотидным составом ДНК и способностью переносить экологический стресс. В частности, термофилы характеризуются повышенным мол. %GC по сравнению с мезофилами, что объясняется более высокой температурой плавления GC-богатой ДНК (в паре GC три водородные связи, а в паре AT — две).

Нуклеотидная асимметрия хромосом. Распределение нуклеотидов по длине ДНК-дуплекса или между комплементарными цепями ДНК неодинаково и называется *нуклеотидной асимметрией* (англ. nucleotide skew).

Цис-асимметрия выражается в том, что относительное содержание GC-пар в дуплексе ДНК возрастает по мере удаления от ориджина репликации.

Транс-асимметрия, в свою очередь, выражена в том, что две цепи ДНК — ведущая и ведомая (см. раздел 16.4.1.1) — различаются между собой по содержанию нук-

леотидов. Это связано с разными способами репликативного синтеза, разным распределением генов и разной частотой использования кодонов в двух цепях. Непрерывно синтезируемая, или ведущая цепь относительно обогащена G и относительно обеднена C. Для отстающей цепи, синтезируемой из фрагментов Оказаки, имеет место обратное соотношение между G и C. Единственным известным исключением служит аномально GC — богатая (78 мол. %) актинобактерия *Streptomyces coelicolor*, у которой ведущая цепь относительно обогащена C и относительно обеднена G.

В некоторых случаях (например, у представителей филы VXII *Proteobacteria*, а также у представителей филы VXIII *Firmicutes* с высоким содержанием GC-пар) ведущая цепь относительно обогащена T и обеднена A. Напротив, ведущая цепь фирмикотов с низким содержанием GC-пар обогащена A и обеднена T. У архей нуклеотидная асимметрия не выявлена, что может быть связано с присутствием нескольких ориджинов репликации в одной археотной хромосоме (см. раздел 16.4.1.1).

Поляризация хромосом. Большинство открытых рамок считывания (см. выше) у бактерий, как правило, расположено на ведущей цепи, и они транскрибируются в том же направлении, в котором реплицируется хромосома. Это называется *правилом коориентации* (англ. coorientation rule). Специфика бактерий, обладающих линейными хромосомами, например *Borrelia burgdorferi* B31, состоит в том, что у них примерно половина генов транскрибируется от центрально расположенного ориджина по направлению к одному концу хромосомы, а остальные гены — по направлению к другому концу.

Между ведущей и отстающей цепями неравномерно распределяются некоторые олигомерные некодирующие повторы. Например, в ведущей цепи *E. coli* содержится ~75% общего числа Chi-элементов, а также ~82% Rag-элементов (см. разделы 16.3.2.1 и 16.5.1.4).

16.3.1. Кодировующие участки

Нуклеотидный генетический *код* (англ. code — шифр) несет зашифрованную информацию о типах и последовательности расположения аминокислот — мономеров, из которых на рибосомах синтезируются полипептидные цепи.

Следуя данному определению кода, мы должны считать *кодировующими участками ДНК* (англ. coding region) только гены белка, т. е. ограниченные иницилирующим и терминирующим кодонами открытые рамки считывания, которые транскрибируются в молекулы мРНК. Необходимо также учитывать, что мРНК, а также продукты ее трансляции — белки могут подвергаться посттранскрипционному процессингу (см. раздел 16.7.4). Таким образом, ген белка не обязательно полностью коллинеарен транскрипту или полипептиду.

Выше мы уже отметили, что гены подразделяются на структурные и регуляторные. Помимо них в состав генома входят контролирующие генетические элементы, которые влияют на экспрессию генов. Хотя они и образованы специфической последовательностью нуклеотидов (часто это повторяющиеся группы нуклеотидов), в ней отсутствуют элементы генетического кода — кодоны.

16.3.1.1. Гены

В предыдущих разделах мы уже говорили о том, что средний размер прокариотного гена равен ~900 нуклеотидам, а минимальный набор генов, необходимый для существования прокариотной клетки как автореплицирующейся биологической структуры, равен 256 генам.

Напомним также, что гены подразделяются на незаменимые и не-незаменимые, а также на структурные и регуляторные. Однако классификация генов этим не исчерпывается.

Ядро генома и штаммоспецифичные гены. Ядро генома (англ. core) — это консервативный набор генов, который имеется у большинства бактериальных штаммов. Помимо него существует вариабельный пул штаммоспецифичных генов, который позволяет разным бактериям адаптироваться к специфическим экологическим условиям, в которых они оказались.

Впервые такое разграничение генов было проведено в начале 2000-х гг. на примере энтеропатогена человека *Campylobacter jejuni*. С помощью методики микрочипов (англ. microarray), которая основана на гибридизации находящейся в растворе ДНК с иммобилизованными полинуклеотидными зондами, у 11 штаммов этой бактерии были выявлены 1,1 тыс. генов ядра, которые отвечают за метаболические и регуляторные процессы. Помимо них были выявлены штаммоспецифичные детерминанты вирулентности (~20% общего числа генов), ответственные за биогенез таких поверхностных молекул и структур, как липополисахариды, капсулы и жгутики.

При аналогичном сравнении штаммов другого энтеропатогена, *Helicobacter pylori* было установлено, что из 1643 проанализированных генов 1281 консервативны, а 22% — штаммоспецифичны.

Именно за счет штаммоспецифичных генов в основном обеспечивается полиморфизм бактериальных геномов.

Функциональные группы генов в соответствии с продуктами их экспрессии. Одной из важнейших геномных характеристик служит распределение генов по функциональным группам. Такая логическая операция стала возможной только в результате секвенирования прокариотных геномов.

Структура первого полностью секвенированного бактериального генома — генома патогена человека *Haemophilus influenzae* была опубликована в 1995 г.

К началу 2000 г. был расшифрован еще 21 прокариотный геном, в том числе у четырех архей (*Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanococcus jannashii* и *Pyrococcus horikoshii*). По понятным причинам, половину проанализированных объектов составили важнейшие из патогенов человека (*Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae*, *C. trachomatis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *Rickettsia prowazekii* и *Treponema pallidum*).

Темп исследований стремительно нарастал, и к концу XX в. были секвенированы еще два археотных генома (*Halobacterium* sp. и *Pyrobaculum aerophilum*), а также 12 геномов непатогенных бактерий. Помимо анализа патогенов человека, особенно тех, которые передаются через пищевые продукты, целью многих геномных проектов стали безвредные партнеры-комменсалы, в частности бифидобактерии, а также используемые в промышленности молочнокислые бактерии.

К моменту написания III тома учебника полностью секвенировано свыше 300 прокариотных геномов. Соответствующая информация, наряду с данными об отдельных последовательностях еще не расшифрованных геномов хранится в базах молекулярно-биологических данных, или генетических «банках».

В открытом доступе имеется около 20 коллекций последовательностей геномной ДНК прокариотов. В первую очередь это взаимно дополняющие универсальные базы данных — GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) и DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Они аннотированы, т.е. содержат указания на структуру и функцию отдельных генов. Есть и более специализированные базы данных, напри-

мер для архей — UCSC Archaeal Genome Browzer (<http://archaea/ucsc/edu/>) или только для *E. coli* K-12 — EcoСус (<http://ecosus.org/>). Особо ценны те базы данных, которые аннотированы на основе сравнительного анализа нескольких геномов — в частности EntrezGenome (<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>). Некоторые из них автоматически выдают необходимый результат, другие требуют индивидуального аналитического подхода.

Помимо веб-сайтов, существует до 20 вариантов программного обеспечения, которые предназначены для рабочего анализа инфраструктуры генома, например BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

В качестве примера распределения генов по группам в соответствии с продуктами их экспрессии приведем результаты секвенирования генома цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, полученные в 1997 г. японскими исследователями Канеко (Т. Канеко) и Табатой (S. Tabata) (табл. 19).

Таблица 19. Функциональные группы генов *Synechocystis* sp. PCC 6803

Категория продукта экспрессии (белка)	Число генов
Репликация, рекомбинация и репарация	49
Транскрипция	24
Трансляция	144
Транспорт	158
Энергетический метаболизм	217
Центральные пути конструктивного метаболизма	31
Метаболизм нуклеиновых кислот	38
Метаболизм аминокислот	84
Метаболизм простетических групп и кофакторов	108
Метаболизм липидов	35
Биогенез клеточной оболочки	64
Регуляторные системы	209
Прочие категории	255
Неизвестные функции	1752
Всего	3168

Гены-ортологи и гены-паралоги. Путем частичного или полного секвенирования ДНК в прокариотных геномах выявлены дивергентные гены с консервативными участками, унаследованными от предкового гена. Такие взаимно гомологичные гены могут входить либо в один и тот же геном, либо в разные геномы. Взаимно гомологичные гены, входящие в состав разных геномов, называются *ортологами* (англ. ortholog; от греч. orthos — прямой и лат. homologia — гомология; «прямой гомолог»). В свою очередь, гены-гомологи внутри одного и того же генома называются *паралогами* (англ. paralog; от греч. para — возле и лат. homologia — гомология; «приданный гомолог»).

Ортологи возникают в результате мутирования и последующего вертикального или горизонтального переноса генов. В отличие от них паралоги являются результатом внутригеномных генных дупликаций, сопровождающихся мутированием.

Ортологи, или гены, унаследованные разными объектами от общего предка, обычно сохраняют исходную функцию. В свою очередь, паралоги в ходе эволюции могут приобрести функцию, которая отличается от исходной.

Накопление паралогов привело к тому, что содержание открытых рамок считывания в бактериальных геномах варьирует от 12% (в случае *Treponema pallidum*) до 50% (в случае *B. subtilis*).

В некоторых генных семействах представительство паралогов выражено особенно ярко. Примером служит ген АТФ-связывающей субъединицы АВС-пермеазы (см. II том учебника); число его паралогов в геноме *E. coli* превышает 70. С функциональной точки зрения такая генетическая «из-

быточность» вполне оправданна, так как она позволяет бактерии импортировать и экспортировать самые разнообразные субстраты и метаболиты.

Гены-сироты. В том случае, если выявленный ген не обнаруживает гомологии с генами других бактерий, его называют *геном-сиротой* (англ. orphan gene). Число таких генов в конкретном геноме достигает 20–30%, хотя иногда их значительно больше (например, 56% у *Helicobacter pylori* и даже 80% у *Rickettsia conorii*).

Обычно это быстро эволюционирующие гены симбиотических бактерий, обеспечивающие их функциональное разнообразие или узкую адаптацию к определенному хозяину. Однако не следует упускать из виду то, что средний размер гена-сироты составляет ~670 п.н., а это значительно меньше среднего размера обычного гена (~1 т. п.н.). Поэтому некоторые из них могут оказаться ошибочно аннотированными генами или даже псевдогенами (см. ниже).

Криптические гены. В 1983 г. американский генетик Холл (В.С. Hall) предложил называть *криптическими* (англ. cryptic), или *молчащими* (англ. silent) такие последовательности ДНК, которые обычно не проявляются фенотипически в жизненном цикле бактерии. Тем не менее, они могут экспрессироваться у относительно немногих представителей популяции в результате спонтанной мутации на основе инсерций, рекомбинаций или иных вариантов внутригеномных перестроек. Иначе говоря, молчащие аллели криптических генов не экспрессируются в клетках дикого типа при любых условиях, однако мутационным путем они превращаются в активные аллели, которые начинают экспрессироваться в лаборатории на селективной среде.

Давление отбора направлено против экспрессии молчащего гена в обычных условиях и благоприятствует ей в специфических условиях. Таким образом, активная аллель очень редко проявляется в обычных условиях, и поэтому криптический ген пребывает в молчащем состоянии. Короче говоря, активация молчащих генов — это форма генетической регуляции экспрессии генов на популяционном уровне (в отличие от физиологической регуляции на индивидуальном уровне, например в опероне; см. раздел 16.3.1.2).

Приведем два примера криптических генов *E. coli*.

Первый из них — это ген синтазы ацетогидроксикислоты (англ. aceto-hydroxy acid synthase, АНАС). Этот фермент катализирует начальную реакцию пути биосинтеза изолейцина, образуя 2-ацето-2-гидроксипутират из 2-гидроксипутирата и пирувата. У штамма *E. coli* K-12 существуют три изофермента АНАС (I, II и III). В норме экспрессируются только АНАС I и АНАС III, причем в присутствии валина рост клеток дикого типа подавляется, поскольку эта аминокислота ингибирует две изоформы фермента. Ген третьей изоформы, АНАС II (*ilvG*), не чувствительной к валину, инактивирован по причине сдвига рамки считывания. Однако, если происходит мутация с возвращением рамки считывания «в фазу», появляются клетки, способные расти в присутствии валина. Таким образом, ген *ilvG* находится в популяции *E. coli* K-12 в криптическом состоянии и активируется в зависимости от условий среды — в присутствии валина он экспрессируется, а когда нет валина, более выгоден его сайленсинг.

Второй пример — это ген *cel*, кодирующий β -глюкозидазу, благодаря которой целлобиоза может использоваться в качестве специфического источника энергии и углерода. В норме *E. coli* не утилизирует целлобиозу. Однако до 90% природных изолятов этой бактерии дают спонтанных мутантов, которые в селективных условиях роста приобретают способность утилизировать β -глюкозиды. В присутствии второго источника углерода, например глицерола, целлобиоза угнетает рост *cel*⁺-штаммов, действуя как ингибитор β -глюкозидазы. Таким образом, идет негативный отбор не по отношению к криптическому гену, а только к его *cel*⁺-аллели. В свою очередь, экспрессия *cel*⁺-аллели выгодна в редких условиях, когда целлобиоза становится единственным источником энергии и углерода.

Псевдогены. Эти участки хромосомы гомологичны функционально активным генам. Однако они не транскрибируются и не экспрессируются с образованием функционально активного белка. Псевдогены возникают в результате мутаций, нарушающих одну из стадий экспрессии «истинного» гена, прежде всего, инициацию или терминацию транскрипции. В частности, делеция пары оснований приводит к сдвигу рамки считывания и досрочно вызывает терминацию транскрипции. Инактивированный ген в дальнейшем становится местом накопления новых мутаций. В отличие от криптических генов, псевдогены «неизлечимы» и представляют собой тупик молекулярной эволюции.

Псевдогенов много в геномах эукариотов (так, в геноме человека содержится до 100 псевдогенов кератина). В случае прокариотов они более редки.

Бактериальные псевдогены встречаются преимущественно у внутриклеточных паразитов, в частности риккетсий, которые содержат около 25% некодирующей ДНК — повторов, псевдогенов и «усеченных» генов. Один из таких псевдогенов — это ген *metK*; он кодирует S-аденозилметионин-синтазу (SAM-синтазу). Поскольку SAM импортируется в готовом виде из цитоплазмы хозяина, ген *metK* этой бактерии не нужен и поэтому он находится в процессе деградации.

У архей примерами псевдогенов являются нуклеотидные последовательности в полностью секвенированных геномах термоацидофилов и метаногенов, которые сходны со структурными генами бактериальной НАДН-дегидрогеназы-1 (см. II том учебника).

Результатом дальнейшего преобразования псевдогенов, по-видимому, являются *спейсеры* (англ. spacer — прокладка). Это нефункционирующие последовательности, разбросанные между генами. В частности, в геноме *E. coli* число спейсеров составляет 4403, а их средний размер — 120 п.н. (разброс от нескольких п.н. до 1,73 т.п.н.). Хотя спейсеры могут содержать промоторы, они в основном состоят из нефункционирующей ДНК, обогащенной АТ-парами.

Гены внутри генов (англ. overlapping genes — взаимно перекрывающиеся гены). Если последовательность ДНК кодирует более одного гена, это называется *взаимным перекрыванием генов*. Иначе сказать, один ген находится внутри другого. Такая организация обычна для вирусных репликонов и обеспечивает компактизацию их генов; для прокариотов, в частности бактерий, это редкое исключение.

В качестве примера можно назвать два гена *Thermus thermophilus* — *trpA* и *trpH*. Обычно у бактерий ген *trpA*, кодирующий субъединицу РНКазы Р, расположен правее (downstream) гена *trpH*, кодирующего рибосомный белок L34. В данном же случае ген *trpH* расположен внутри гена *trpA*. Старт-кодоны этих генов разделяются четырьмя парами нуклеотидов; с левого (upstream) кодона начинается транскрипция гена *trpA*, а с правого — транскрипция гена *trpH*. Оба гена транскрибируются не в фазе (т.е. со сдвигом триплетов), но в одной и той же ориентации. Иными словами, открытая рамка считывания белка RnpA проходит через открытую рамку считывания для белка RpmH.

Еще один пример связан с двумя взаимно перекрывающимися оперонами *E. coli* — тетрациклин-резистентным опероном *frdABCD* и моноциклин-резистентным опероном *ampC*. Первый из них содержит гены фумаратредуктазы, а второй ген β-лактамазы. Четвертый ген фумаратредуктазы, *frdD* перекрывается не в фазе с нетранслируемой последовательностью длиной 30 п.н., которая входит в участок оперона *ampC*, кодирующий сигнальную последовательность белка AmpC.

В чем смысл существования перекрывающихся генов у прокариотов? Ответ на этот вопрос еще не получен. Эволюция геномов, видимо, не допускает перекрывания тех генов, продукты экспрессии которых функционально несовместимы. Иными словами, взаимное перекрывание — это один из способов увеличения сопряженной регуляции генов, хотя она достигается иным путем, чем в оперонах (см. ниже).

16.3.1.2. Опероны

Концепцию бактериального оперона, или координированно экспрессирующей группы генов (англ. «*the genetic unit of coordinated expression*») предложили в 1961 г. Франсуа Жакоб и Жак Моно (J. Monod; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1965 г.).

На основе этой концепции впервые было дано объяснение адаптационного механизма, «включающего» или «выключающего» группы функционально объединенных генов в меру доступности субстратов, за метаболизм которых данные гены отвечают.

Прокариоты — очень рационалистичные живые существа. Они ничего не делают напрасно и строго соразмеряют свою жизнедеятельность с факторами окружающей среды, в частности с ее трофическими ресурсами.

Например, чтобы быстро реагировать на изменяющиеся внешние условия, гетеротрофные бактерии должны переключаться от использования одного питательного субстрата на другой. Поскольку невыгодно постоянно содержать метаболическую систему, рассчитанную на любой питательный рацион, бактерия не синтезирует соответствующий фермент до тех пор, пока его субстрат не появился в окружающей среде. Возможна и иная ситуация: бактерия перестает вырабатывать биосинтетический фермент, если его продукт предоставляется ей в готовом виде.

Для максимальной экономичности такого способа метаболической адаптации бактериальные гены объединяются в кластеры. Иначе говоря, все ферменты и переносчики, необходимые для данного метаболического пути, кодируются тесно сцепленными генами. Они котранскрибируются в молекулу полицистронной мРНК, которая транслируется с образованием соответствующих функциональных продуктов.

У прокариотов редко наблюдается индивидуальная транскрипция генов; большинство из них образует физически интегрированные группы. Координированный контроль транскрипции этих генов основан на взаимодействии регуляторного белка с регуляторным сайтом, расположенным по соседству с общим промотором.

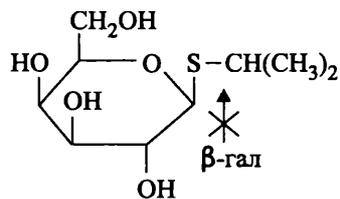
Адаптивный контроль транскрипции осуществляется путем индукции или репрессии. Суть явления *индукции* (англ. induction; от лат. *inductio* — выведение на сцену) заключается в том, что при появлении нового субстрата синтезируется воздействующий на него фермент; наоборот, при исчезновении субстрата биосинтез соответствующего фермента прекращается. В свою очередь, смысл *репрессии* (англ. repression; от лат. *reprehensio* — удерживать) состоит в том, что если в окружающей среде присутствует субстрат, то биосинтез образующего его фермента прекращается. В обоих случаях бактерия с выгодой для себя использует внешние ресурсы и не расходует напрасно свои собственные.

Индукция и репрессия ферментов осуществляются с помощью специфических низкомолекулярных *регуляторов*. Регуляторы, которые вызывают образование ферментов, осуществляющих их собственный метаболизм, называются *индукторами*. В свою очередь, регуляторы, которые специфически подавляют образование ферментов, синтезирующих их самих, называются *корепрессорами*.

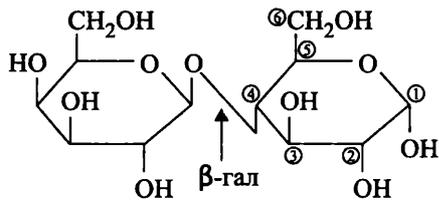
Функцию индуктора или корепрессора могут выполнять не только субстраты или продукты ферментов, но и их неметаболизируемые молекулярные аналоги. Например, индуктором β-галактозидазы и β-галактозидпермеазы является изопропилтио-β-D-галактозид (англ. isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG). Он не гидролизуется β-галактозидазой (рис. 167), однако служит субстратом тиогалактозид-трансацетилазы.

Индукция и репрессия обычно затрагивают не один фермент; совместно регулируются ферменты целого метаболического пути, а также транспортные белки. Классическим примером такой системы, регулирующей экспрессию генов, служит лактозный оперон.

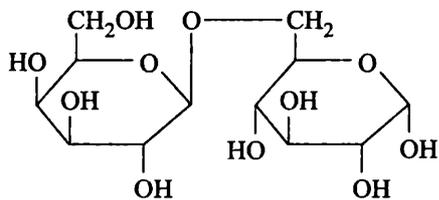
Согласно Жакобу и Моно, *оперон* (англ. operon; от лат. *operatio* — действие и греч. *ontos* — сущее; «нечто действующее») — это такой участок генома, который содержит группу последовательно расположенных и функционально родственных *структурных генов* (цистронов) и транскрибируется в виде полицистронной молекулы мРНК, транслируемой без процессинга, как единое целое.



IPTG



лактоза
(4-O-β-галактопиранозил-
-D-глюкопираноза)



аллолактоза
(6-O-β-D-галактопиранозил-
-D-глюкопираноза)

Рис. 167. Индукторы и субстрат лактозного оперона.
IPTG — изопропил-β-D-тиогаляктозид; β-гал — β-галактозидаза.

Термином «цистрон» (англ. *cistron*; от лат. *cis* — на этой стороне и *trans* — на противоположной стороне; «*нечто, локализованное в cis-trans положении*») по традиции обозначается эквивалентная гену функциональная генетическая единица, которая может быть выявлена с помощью цис/транс теста. При цис-конфигурации мутантные аллели двух разных генов находятся в одной хромосоме, а при транс-конфигурации во взаимно гомологичных хромосомах. В гетерозиготе происходит комплементация обеих мутаций, что приводит к дикому фенотипу. Иными словами, факт комплементации двух мутаций указывает на принадлежность разным цистронам.

Помимо структурных генов в оперон входит отдельно расположенный *регуляторный ген*, а также физически сцепленные со структурными генами не транскрибируемые контролирующие генетические элементы — *промотор*, *оператор* и *терминатор*.

Таким образом, классическая концепция бактериального оперона (которая также распространяется на гены архей) предусматривает:

- физическое сцепление функционально родственных генов, транскрибируемых в виде полицистронной РНК;
- адаптивную экспрессию этих генов, благодаря регуляции транскрипции (позитивной и негативной).

Позитивная регуляция транскрипции осуществляется через промотор (сигма-факторами РНК-полимеразы; см. раздел 16.7.1). Негативная регуляция осуществляется через оператор (белками-репрессорами; см. ниже).

У эукариотов также встречаются опероны, но очень редко. Примерами служат трипаносомы и нематода *Caenorhabditis elegans*, многие гены которых котранскрибируются в полицистронные

мРНК. Но, в отличие от прокариотных полицистронных мРНК, они перед трансляцией процессируются в моноцистронные мРНК.

Лактозный оперон (*lac*-оперон). Этот оперон, ответственный за импорт и гидролиз дисахарида лактозы (рис. 167), содержит три структурных гена:

- *lacZ* (кодирует β -галактозидазу, гидролизующую лактозу);
- *lacY* (кодирует β -галактозидпермеазу, импортирующую лактозу);
- *lacA* (кодирует β -галактозид-трансацетилазу, переносящую ацетильную группу от ацетил-СоА на β -галактозиды; физиологическая роль этого фермента неясна; возможно, он позволяет детоксицировать и выводить из клетки неметаболизируемые β -галактозиды).

Все три гена *lacZYA* котранскрибируются в виде одной молекулы мРНК с общего промотора *lacP* размером ~ 85 п.н. (рис. 168).

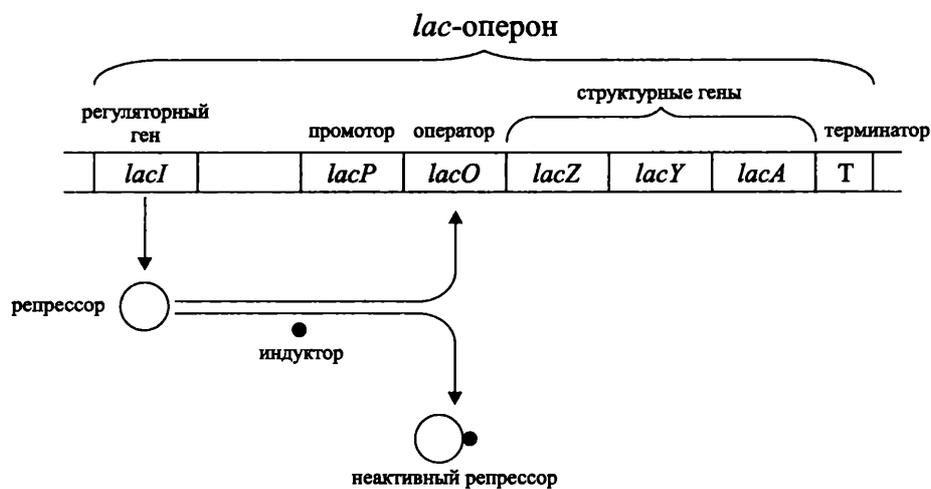


Рис. 168. Лактозный оперон и механизм его репрессии/индукции.

При появлении в окружающей среде вещества-индуктора инициируется транскрипция ДНК на участке от *промотора* до *терминатора*. Таким образом, все структурные гены лактозного оперона экспрессируются одновременно, в количественном соотношении 1:1:1. Поскольку бактериальная мРНК крайне нестабильна (время полураспада ~ 3 мин), биосинтез продуктов лактозного оперона при удалении индуктора быстро прекращается.

Благодаря независимой транскрипции *гена-регулятора lacI*, расположенного левее (*upstream*) от промотора, синтезируется моноцистронная мРНК. При ее трансляции образуется *репрессор* (тетрамер субъединиц ~ 38 кДа). Поскольку ген *lacI* детерминирует диффундирующий продукт, ему не обязательно находиться в тесном сцеплении со структурными генами.

Репрессор связывается с *оператором lacO*, который расположен рядом со структурными генами *lacZYA*, что блокирует инициацию транскрипции в промоторе *lacP* (рис. 168).

При индукции лактозного оперона индуктор присоединяется к репрессору и образует с ним комплекс, не обладающий сродством к оператору *lacO* (в репрессоре

имеются два сайта связывания: один предназначен для оператора, другой — аллостерический — для индуктора).

Таким образом, регуляция лактозного оперона носит негативный характер и происходит на фоне продолжающегося биосинтеза репрессора. Мишенью для репрессора является оператор, расположенный рядом с промотором.

Какова природа индуктора лактозного оперона? Парадоксально, что лактоза не является индуктором, т. е. она не вызывает аллостерического изменения конформации репрессора. В данном случае природным индуктором служит дисахарид *алло-лактоза* (рис. 167), который образуется при гидролизе небольшого количества поступившей в клетку лактозы с переносом галактозного остатка на остаток глюкозы (из положения-4 в положение-6).

Общие средства регуляции транскрипции будут более подробно рассмотрены в разделах 16.7.1 и 18.1.

Еще раз отметим, что классическое понятие оперона распространяется на комплекс, состоящий из структурных генов (кодирующих функционально объединенную группу ферментов), регуляторного гена и контролирующих генетических элементов.

В настоящее время термин «оперон» используется в более широком смысле — для обозначения любой группы примыкающих друг к другу генов, которые транскрибируются с общего промотора в полицистронную РНК.

Примером «неклассического» оперона служит позитивно регулируемый оперон рибосомных РНК. Его особенность состоит в том, что он не содержит регуляторного гена и оператора, и с него транскрибируется не полицистронная мРНК, а разные типы рРНК.

Оперон рибосомных РНК (*rrn*-оперон). У бактерий гены рРНК, как правило, объединяются в оперон и расположены друг за другом в следующем порядке: 5'-ген 16S рРНК (*rrs*; ~1,5 т. п.н.) — ген 23S рРНК (*rrl*; ~3 т. п.н.) — ген 5S рРНК (*rrf*; ~120 п.н.) — 3'.

Между генами 16S рРНК и 23S рРНК обычно находится *внутренний транскрибируемый спейсер* размером 50–1100 п.н., который вырезается в ходе процессинга первичного транскрипта (см. раздел 16.3.2.4).

У архей гены рибосомных РНК обычно также образуют оперон и расположены в том же порядке, как у бактерий. Как правило, между генами 16S рРНК и 23S рРНК у них также находится внутренний транскрибируемый спейсер (см. раздел 16.3.2.4).

У эукариотов гены трех рибосомных рРНК расположены в ином порядке, чем у прокариотов: 5'-ген 18S рРНК — ген 5,8S рРНК — ген 28S рРНК-3'. Внутренние транскрибируемые спейсеры повсеместно отсутствуют. Ген четвертой рибосомной РНК (5S рРНК) расположен отдельно; исключением служат некоторые протисты и грибы, у которых он физически сцеплен с геном 28S рРНК.

В бактериальных геномах присутствует либо единственный *rrn*-оперон (например, в случае *Mycobacterium* spp. и *Mycoplasma* spp.), либо их несколько (до десяти в случае *B. subtilis*). Множественные *rrn*-опероны могут быть либо идентичными, либо не идентичными. Во втором случае различия не затрагивают нуклеотидную последовательность консервативных генов 16S рРНК, 23S рРНК и 5S рРНК, а связаны с количеством копий гена 5S рРНК или с вхождением генов тРНК в состав внутреннего транскрибируемого спейсера (см. раздел 16.3.2.2). Например, в геноме

E. coli содержатся семь *rnp*-оперонов (*rnpABCDEFGHI*). В каждом из них присутствует только одна копия гена 16S рРНК и 23S рРНК. В то же время оперон *rnpB* содержит одну копию гена 5S рРНК, а оперон *rnpD* — две копии, разделенные геном тРНК. Кроме того, если в оперонах *rnpBCEG* внутренний транскрибируемый спейсер содержит ген тРНК^{Glu}, то опероны *rnpADH* одновременно несут гены тРНК^{Ala} и тРНК^{Ile}. Несмотря на указанные различия в структуре множественных *rnp*-оперонов, зрелые рРНК одного и того же микроорганизма идентичны, т. е. различия между ними устраняются в ходе процессинга пре-рРНК.

Медленно растущие бактерии обычно имеют меньшее число множественных *rnp*-оперонов, хотя это не говорит о прямой связи с регуляцией скорости роста.

Вышеизложенная модель *rnp*-оперона практически универсальна. Однако не обходится без исключений. Речь идет о так называемых *разобщенных rnp-оперонах* (англ. split rRNA operon). В данном случае гены 23S рРНК и 5S рРНК образуют дицистронный оперон, а ген 16S рРНК расположен отдельно от них, иногда в тесном физическом сцеплении с дополнительным геном-сиротой 5S рРНК (см. раздел 16.3.1.1).

Разобщенные *rnp*-опероны обнаружены у некоторых бактерий (примерами служат *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori* и *Wolbachia pipientis*) и архей (в частности, *Archaeoglobus fulgidus*). Разобщенность *rnp*-оперона также характерна для большинства митохондриальных геномов и, хотя очень редко, наблюдается в геноме пластид.

Наконец, известны примеры для бактерий (*Leptospira interrogans*) и архей (*Thermoplasma acidophilum*), когда физическое сцепление между генами 16S рРНК, 23S рРНК и 5S рРНК вообще отсутствует, и они находятся в разных участках хромосомы.

Напомним, что современная филогенетическая система живых существ, в том числе прокариотов, строится на количественной оценке взаимной гомологии рРНК определенного класса (см. I том учебника). В основе такого подхода лежит объективно существующая универсальность и безальтернативность механизма трансляции, подкрепленная высокой консервативностью рибосомных РНК.

Выбор первичной структуры рРНК в качестве универсального филогенетического маркера позволил реконструировать глобальное древо и детализировать структуру его ветвей.

Однако подход, основанный на сравнительном анализе 16S рРНК, имеет слабые стороны и ограничения. Чтобы их преодолеть, используются дополнительные детали инфраструктуры *rnp*-оперона (см. раздел 16.3.2.2).

16.3.1.3. Мобильные элементы

В геномах бактерий, архей и эукариотов широко распространены *мобильные элементы* (англ. transposable element). Они представляют собой участки ДНК, способные к *транспозиции* (англ. transpose — переставлять), т. е. к перемещению из одного сайта хромосомы или плазмиды в другой, не гомологичный ему сайт. Эти участки кодируют фермент(ы), обеспечивающие транспозицию, и сами же ей подвергаются.

Транспозиция может проходить в пределах одного генома или между геномом-донором и геномом-мишенью. В одних случаях она приводит к потере мобильного элемента донорным репликоном. В других случаях ей сопутствует копирование мобильного элемента, причем одна копия остается в донорном сайте, а другая появляется в акцепторном сайте. Мобильные элементы, за исключением бактериофага

мю, не имеют собственного ориджина репликации и этим отличаются от плазмид.

Мобильные элементы содержат 1–2 открытые рамки считывания (гены белков, необходимых для транспозиции). Самые простые мобильные элементы, инсерционные последовательности, этим ограничиваются. Более сложные мобильные элементы, транспозоны, несут дополнительные детерминанты, которые не имеют отношения к транспозиции и фенотипически проявляются в качестве селективных признаков у обладателя генома-мишени.

Число описанных мобильных элементов у прокариотов превышает 500, и они составляют значительную часть хозяйских геномов.

Инсерционные последовательности. Простейшие из мобильных элементов — это *инсерционные последовательности* (англ. insertion sequence, IS; от англ. insert — вставлять). Их длина 200 п.н. — 2,5 т.п.н., и они несут на обоих концах *инвертированные повторы* (англ. inverted repeat; IR) длиной 10–40 п.н. (рис. 169). Поскольку транспозиция сопровождается копированием сайта-мишени (см. ниже), инсерционная последовательность фланкирована короткими, длиной 2–14 п.н. *прямыми повторами* (англ. direct repeat; DR).

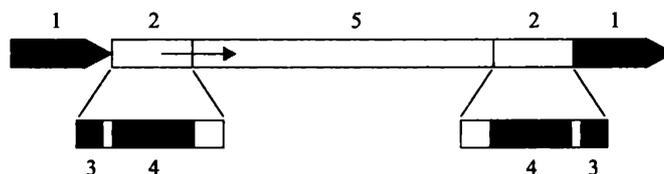


Рис. 169. Структура инсерционной последовательности и фланкирующих ее участков ДНК-мишени.

1 — прямой повтор; 2 — инвертированный повтор; 3 — сайт для разреза с помощью транспозазы; 4 — сайт для узнавания и связывания транспозазы; 5 — ген транспозазы.

Стрелкой обозначен промотор.

Кодирующая область, находящаяся внутри инсерционной последовательности, содержит ген *транспозазы* (*tnpA*), отвечающий за ферментативный процесс транспозиции. Промотор этого гена расположен внутри левого инвертированного повтора. В случае использования репликативного способа транспозиции (см. ниже) гену транспозазы сопутствует ген резольвазы *tnpR*. Внутри инвертированных повторов находится концевой сайт из 2–3 п.н. для одноцепочечного разреза ДНК с помощью транспозазы и соседний с ним сайт для узнавания и связывания этого фермента (рис. 169).

В настоящее время инсерционные последовательности (всего около 500 типов) обнаружены у представителей 70 родов, соответственно, 155 видов бактерий. У архей они описаны только для четырех родов — *Halobacterium*, *Haloferax*, *Methanobrevibacter* и *Sulfolobus*.

Некоторые геномы характеризуются необычно высоким содержанием IS-последовательностей, в частности геномы архей рода *Sulfolobus* (170 в случае *S. acidocaldarius*). Другие, напротив, почти не содержат IS-последовательностей (примером служат бактерии *Buchnera* spp. и *Rickettsia* spp., а также археоты *Pyrococcus* spp.).

Номенклатура инсерционных последовательностей отражает, в первую очередь, историю их описания (семейства IS1, IS3, IS4 и т.д.), хотя учитываются и особенности их инфраструктуры, а также их хозяйская принадлежность.

Транспозоны. Инсерционные последовательности эгоистичны, т. е. они не имеют фенотипического проявления и кодируют только ферменты, обеспечивающие транспозицию. В отличие от них *транспозоны* (англ. transposon, Tn; от англ. transposition и греч. *оп* — сущее; «нечто, переносимое с одного места на другое») дополнительно содержат те или иные селективные маркеры.

Так называемые *составные транспозоны* (англ. compound transposon) имеют размер 750 п.н. — 50 т. п.н. и содержат центральную область и два боковых плеча, каждое из которых представляет собой инсерционную последовательность. Плечи транспозона находятся в прямой или инвертированной взаимной ориентации и обеспечивают транспозицию этого сложного мобильного элемента.

Практически любой участок ДНК, фланкированный идентичными или почти идентичными инсерционными последовательностями, может стать частью составного транспозона. Иначе говоря, поскольку инсерционные последовательности универсально представлены в прокариотных геномах (исключением, видимо, является *B. subtilis*), любой хромосомный или плазмидный ген может существовать в качестве транспозона.

Классическим примером составного транспозона служит транспозон, который кодирует термостабильный токсин *E. coli* и содержит продублированную инсерционную последовательность IS1.

От составных транспозонов отличаются транспозоны, несущие по обоим концам не инсерционные, а IS-подобные последовательности, которые существуют только в составе транспозона. Примерами несоставных транспозонов являются транспозон Tn3 (обеспечивающий лекарственную устойчивость), многофункциональные транспозоны Tn7 и Tn554, *конъюгативные транспозоны* (способствующие собственному переносу из одной бактерии в другую совместно с частью хозяйской хромосомы; см. раздел 16.6.1.3), а также трансдуцирующий бактериофаг Mu.

Способы транспозиции. Процесс транспозиции включает в себя разрыв фосфодиэфирных связей на концах мобильного элемента и перенос последних на молекулу ДНК-мишени. Такая рекомбинационная реакция осуществляется с помощью тройственного нуклеопротеинового комплекса, или *транспозосомы* (англ. transpososome). Транспозосома состоит из транспозазы, концов мобильного элемента и ДНК-мишени. Транспозаза устроена таким образом, что N-конец полипептидной цепи обладает ДНК-связывающей активностью, а C-конец служит каталитическим доменом.

Существуют два основных способа транспозиции — консервативный и репликативный. В первом случае мобильный элемент в ходе транспозиции не копируется, а во втором копируется. Кроме того, в первом случае мобильный элемент физически обособляется от репликона-донора, а во втором случае остается прикрепленным к нему.

Консервативная транспозиция. Образное название этого способа — «разрежь и вклей» (англ. cut-and-paste). Иными словами, мобильный элемент вырезается из донорного сайта и без репликации вставляется в акцепторный сайт. Для этого транспозаза делает двухцепочечные разрезы в репликоне-доноре по концам мобильного элемента (рис. 170, I). Одновременно она делает одноцепочечные разрезы в сайте-мишени репликона-реципиента с образованием 5'-концевых выступов (рис. 170, II). Затем транспозаза катализирует реакцию трансэтерификации, и 5'-концы реципиента соединяются с 3'-концами донора (рис. 170, III).

После этого заполняются одноцепочечные участки ДНК в реципиенте (рис. 170, IV). Свободные 3'-концы служат праймерами для ведущих нитей двух репликационных вилок (см. раздел 16.4.1.1). Так возникают характерные прямые повторы, фланкирующие мобильный элемент.

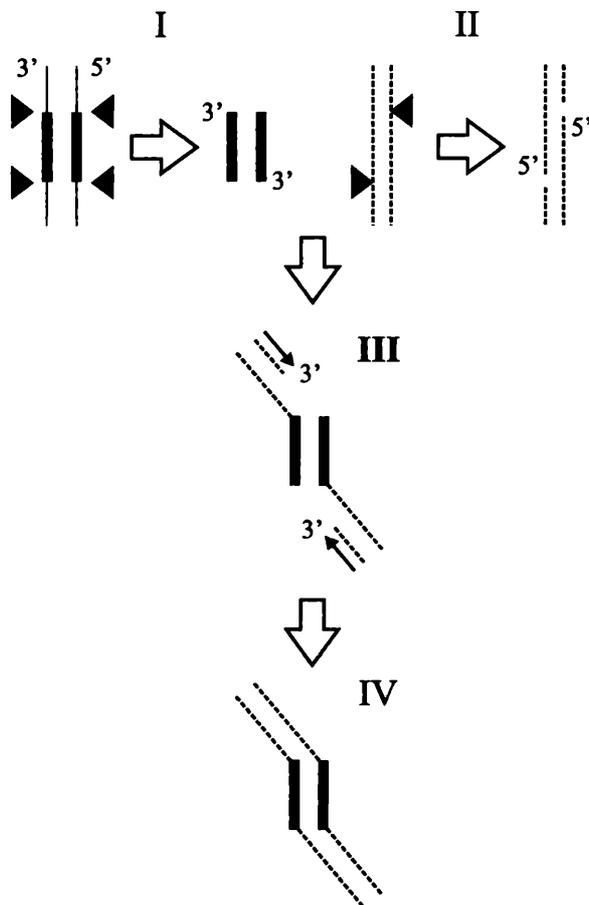


Рис. 170. Консервативная транслокация мобильного элемента.

Тонкие линии — репликон-донор; пунктирные линии — репликон-реципиент; толстые линии — мобильный элемент; черные треугольники — точки разрезов транспозазой; тонкие стрелки — заполнение одноцепочечных участков.

Примерами использования данного способа транспозиции служат инсерционные последовательности семейств IS10 и IS50, а также транспозон Tn7.

Образование потенциально летального разрыва в донорном репликоне предотвращается системами репарации двухцепочечной ДНК, которые осуществляют его рекомбинацию с сестринским донорным репликоном.

Репликативная транспозиция. Образное название этого способа — «разрежь и не зевай» (англ. cut-and-haste). Иными словами, мобильный элемент не вырезается из донорного сайта, а переносится в акцепторный сайт с образованием там репликационных вилок. В данном случае транспозаза наносит не двухцепочечные, а одноцепочечные разрезы в репликоне-доноре по 3'-концам мобильного элемента (рис. 171, I). Одновременно с этим она производит одноцепочечные разрезы в сайте-мишени репликона-реципиента с образованием 5'-концевых выступов (рис. 171, II). Затем транспозаза катализирует реакцию трансэтерификации, 5'-концы реципиента соединяются с 3'-концами донора (рис. 171, III), и образуется X-образный «интермедиат Шапиро» (назван в честь американского микробиолога J. Shapiro, который в 1979 г. предложил модель репликативной транслокации). После этого с помощью двух репликационных вилок заполняются одноцепочечные участки.

чечные участки ДНК в реципиенте, а также реплицируется сам мобильный элемент. Как и при консервативной транспозиции, свободные 3'-концы реципиента служат праймерами.

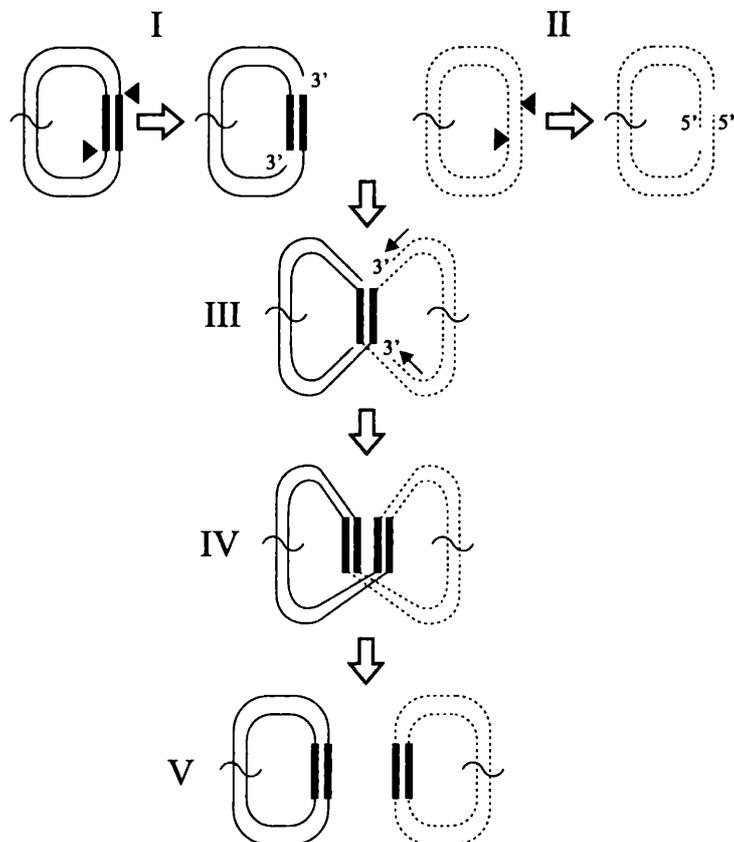


Рис. 171. Репликативная транслокация мобильного элемента. Тонкие линии — репликон-донор; пунктирные линии — репликон-реципиент; толстые линии — мобильный элемент; треугольники — точки разрезания транспозазой; тонкие стрелки — заполнение одноцепочечных участков.

Если транспозиция происходит между двумя разными репликонами, то после репликации из них образуется кольцевой коинтегра́т, в котором между репликоном-донором и репликоном-мишенью находятся две одинаково ориентированные копии мобильного элемента (рис. 171, IV). Затем коинтегра́т разделяется на репликон-донор и репликон-реципиент (рис. 171, V). Для этого используется резольваза (см. раздел 16.4.2), открытая рамка считывания которой присутствует в самом мобильном элементе. Резольваза осуществляет сайтспецифичную рекомбинацию в IRS-сайте (сокращение от англ. internal resolution site), расположенном в мобильном элементе между генами *tnpA* и *tnpR*. При отсутствии резольвазы в ход пускается клеточная RecA-зависимая система гомологической рекомбинации (см. раздел 16.6.1.2).

Примерами использования такого способа транспозиции служат инсерционные последовательности семейства IS6, а также транспозон Tn3.

Значение мобильных элементов. Мобильные элементы кодируют, помимо агентов собственной транспозиции, факторы экологической адаптации, обеспечивающие «вспомогательные» функции — устойчивость к антибиотикам и другим анти-

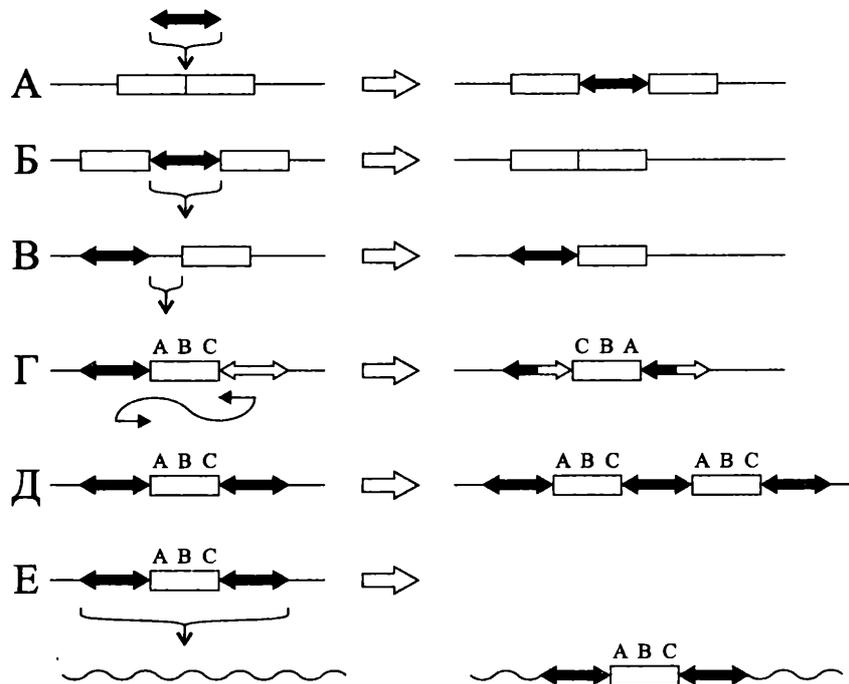


Рис. 172. Геномные перестройки, вызываемые мобильными элементами. А — вставка мобильного элемента; Б — вырезание мобильного элемента; В — делеция участка геномной ДНК; Г — инверсия участка геномной ДНК; Д — дупликация участка геномной ДНК; Е — образование составного транспозона.

бактериальным агентам, катаболизм нетривиальных субстратов (в частности, ксенобиотиков), вирулентность и токсичность, а также контроль экспрессии соседних с ними генов хозяйского генома.

Связь между мобильными элементами и вирулентностью наиболее ярко выражена у патогенов животных (*Bordetella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Haemophilus* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp. и др.), а также у симбионтов растений (*Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. и др.).

Мобильные элементы могут встраиваться в разные и многочисленные сайты хромосом или плазмид, вызывая инсерционные мутации. Имея промоторные участки, они могут влиять на транскрипцию находящихся правее (downstream) геномных генов. Цис- и транс-расположенные копии мобильных элементов участвуют в сайт-специфичной рекомбинации, обеспечивая разнообразные геномные перестройки.

Внедрение мобильного элемента в геномную ДНК изменяет структурную организацию и экспрессию прокариотных генов с частотой, близкой к частоте спонтанных мутаций (10^{-5} – 10^{-7} на генерацию), а иногда значительно большей (до 10^{-3}). В отличие от точечных мутаций, изменения затрагивают большие участки ДНК и поэтому резко ускоряют мутационный процесс, способствуя эволюции геномов.

К числу геномных перестроек, вызванных мобильными элементами, в первую очередь относятся *вставки* (рис. 172, А). Их эффект компенсируется редко происходящим *вырезанием* мобильного элемента (рис. 172, Б). Вставка обычно приводит к инактивации гена, хотя в отдельных случаях благодаря ей появляется новый промотор, вызывающий экспрессию криптического гена.

Важное эволюционное значение имеют *делеции* участка геномной ДНК, примыкающего к одному из концов мобильного элемента (рис. 172, В).

Если в геноме появляются два противоположно ориентированных мобильных элемента, они могут рекомбинировать между собой, что приводит к *инверсии* лежащего между ними участка геномной ДНК (рис. 172, Г).

В случае, когда два одинаково ориентированных мобильных элемента фланкируют участок геномной ДНК, возможна его *дупликация* (рис. 172, Д).

Наконец, *транслокация* участка геномной ДНК вместе с фланкирующими мобильными элементами приводит к образованию составного транспозона (рис. 172, Е).

Поскольку мобильные элементы передаются горизонтальным путем и часто входят в состав плазмидных векторов, они быстро распространяются в природных популяциях бактерий. Чаще всего они передаются при конъюгации, реже при трансформации и еще реже — при трансдукции (см. раздел 16.6.1.3).

Как мы уже отмечали, транспозоны кодируют многие факторы экологической адаптации. В частности, транспозоны субгруппы Tn21 обеспечивают распространение множественной лекарственной устойчивости, которая имеет огромное значение при госпитальных инфекциях.

16.3.1.4. Интроны

Согласно классическому принципу коллинеарности, порядок расположения нуклеотидных триплетов в матричной ДНК, а также в ее транскрипте — мРНК, соответствует порядку расположения аминокислотных остатков в продукте трансляции — полипептидной цепи. Однако в 1977 г. было установлено, что многие (хотя далеко не все) ядерные гены преимущественно состоят из последовательностей, которых нет в мРНК и которые удаляются при созревании первичного транскрипта. Иначе сказать, гены эукариотов мозаичны и состоят из двух типов нуклеотидных последовательностей. Во-первых, это кодирующие *экзоны* (англ. exon; от греч. exo — вне и греч. ontos — сущее; «нечто, находящееся снаружи»), которые транскрибируются в мРНК, рРНК или тРНК. Во-вторых, это не кодирующие *интроны* (англ. intron; от лат. intra — внутри и греч. ontos — сущее; «нечто, находящееся внутри»), которые разбросаны в промежутках между экзонами.

При транскрипции с молекулы ДНК считывается пре-мРНК, пре-рРНК или пре-тРНК, т. е. коллинеарная копия *мозаичного гена* (англ. split gene — разрезанный ген). Из нее после *сплайсинга* (англ. splice — сращивать концы), который заключается в удалении интронов и ковалентном соединении друг с другом экзонов, образуется зрелая РНК.

Таким образом, коллинеарность соблюдается не между геном, мРНК и полипептидной цепью, а между экзонами и белком, а также между экзонами и процессированной рРНК или тРНК.

Мозаичная структура гена была впоследствии продемонстрирована у митохондрий и пластид. Однако до 1983 г. считали, что экзонно-интронную структуру имеют только геномы ядерных клеток, тогда как у прокариотов этого не бывает.

Гены ядерных клеток варьируют по числу и размеру интронных вставок. Границы интрона отмечены динуклеотидами GT...AG (правило «GT-AG»). Исключениями являются интроны митохондрий и хлоропластов, а также интроны дрожжевой тРНК, что связано с многообразием механизмов сплайсинга.

Известны три основных типа сплайсинга; все они связаны с разрывом фосфодиэфирных связей на границе экзона с интроном и образованием новых фосфодиэфирных связей между концами интронов.

Сплайсинг первого типа, или белокнезависимый *автосплайсинг* (англ. self-splicing) осуществляется с помощью самой РНК. При процессинге она играет роль РНК-фермента, или *рибозима*.

Сплайсинг второго типа также представляет собой автосплайсинг, однако он нуждается в *матуразе* (от англ. mature — зрелый) — вспомогательном белке, который связывается с интроном и стимулирует рибозимную реакцию.

Сплайсинг третьего типа осуществляется с помощью белковых ферментов — сайтспецифичной РНК-эндонуклеазы и РНК-лигазы.

В настоящее время установлено, что мозаичная структура гена не является привилегией ядерных клеток, и что интроны нередко встречаются у бактерий и архей.

Прокариотные интроны сильно варьируют по размеру (от 15 до ≥ 3000 п.н.). Они локализуются в хромосомах, плаزمиде или фагах. В соответствии со спецификой первичной и вторичной структуры, а также по способу сплайсинга они подразделяются на три группы: бактериальные интроны группы-I, бактериальные интроны группы-II и интроны архей.

Некоторые прокариотные интроны содержат открытые рамки считывания, которые находятся в трансляционной фазе с upstream-экзоном. Одни из них кодируют ДНК-специфичные эндонуклеазы, или транспозазы. Другие открытые рамки считывания кодируют обратные транскриптазы, или ревертазы, считывающие последовательности ДНК с матрицы РНК (см. раздел 16.7.2). С помощью транспозаз и ревертаз осуществляется *гоуминг* (англ. homing — возвращение домой), или сайтспецифичное внедрение интрона в лишённые интрона аллели гена. Это обеспечивает мобильность интронов между гомологичными участками одного генома или двух разных геномов. Третьи открытые рамки считывания кодируют матуразы, которые стимулируют автосплайсинг (см. выше).

Присутствие открытых рамок считывания противоречит ранним представлениям о неинформативной природе интронов. Однако легко заметить, что интраинтронные гены, так же, как и гены инсерционных последовательностей (см. выше) отличаются от обычных белок-кодирующих генов тем, что не выражаются фенотипически и отвечают только за эгоистическую судьбу самих интронов.

Бактериальные интроны группы-I. Интроны этой группы имеются у представителей филы VX *Cyanobacteria* и филы VXII *Proteobacteria* (табл. 21). Белок-кодирующих генов они не прерывают, а находятся только внутри генов тРНК.

Интроны группы-I удаляются из пре-тРНК путем автосплайсинга в результате двух последовательных реакций трансэтерификации. Инициатором служит гуанозиновый кофактор, который в итоге оказывается на 5'-конце выщепленного интрона (рис. 173, А). В ходе первой реакции 3'-ОН группа гуанозинового кофактора осуществляет нуклеофильную атаку на 5'-конец интрона. В ходе второй реакции 3'-ОН группа 5'-экзона атакует 3'-конец интрона, в результате чего происходит лигирование экзонов и освобождается интрон.

Бактериальные интроны группы-II. Интроны этой группы довольно редки и обнаружены только у цианобактерии *Calothrix* sp., а также у протеобактерии *Xylella fastidiosa* и фирмикута *Lactobacillus lactis* (табл. 21). Они прерывают белок-кодирующие гены.

В бесклеточных препаратах интроны группы-II способны к белокнезависимому автосплайсингу. Однако в условиях *in situ* рибозимная реакция требует участия матуразы, которая закодирована в самом интроне.

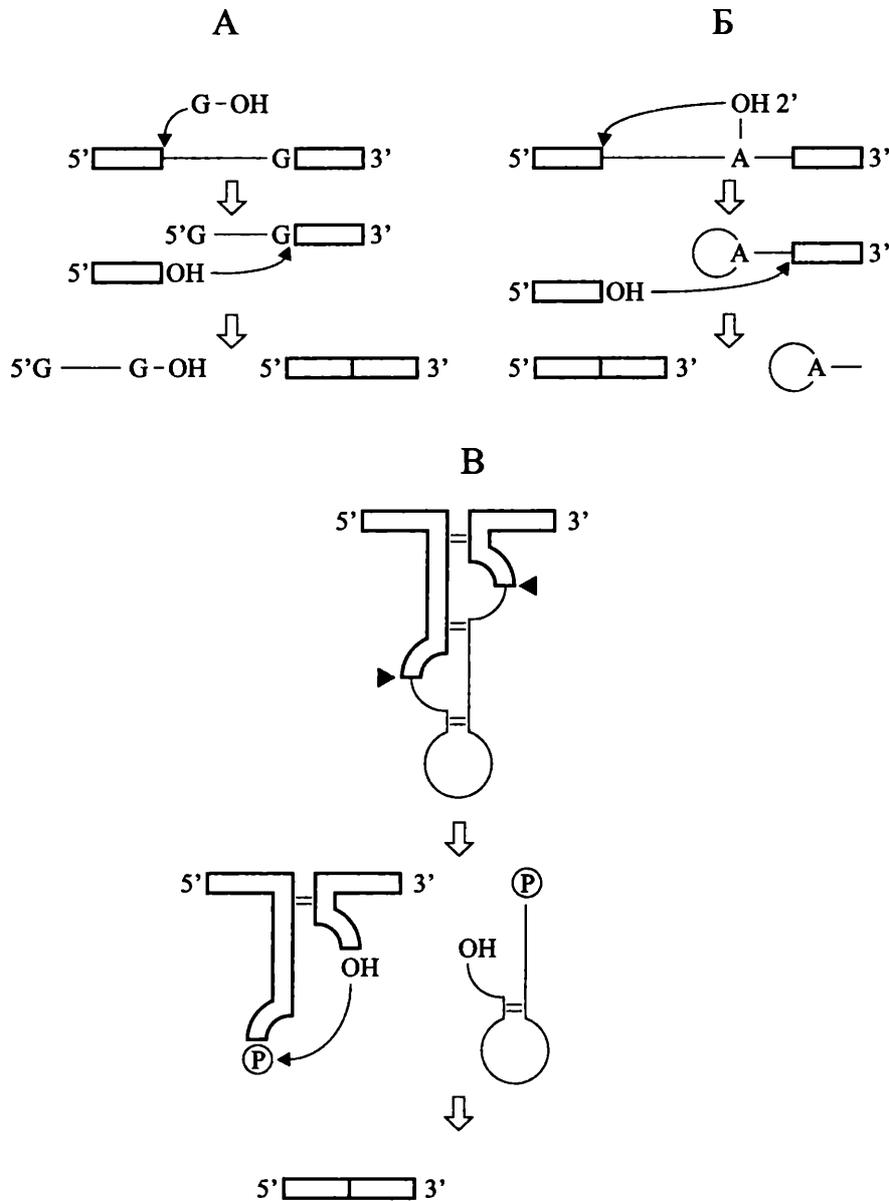


Рис. 173. Механизмы сплайсинга у прокариотов.
 А — рибозимный автосплайсинг интрона группы-I; Б — рибозимный автосплайсинг интрона группы-II; В — сплайсинг у архей, катализируемый белковыми ферментами.
 Черными треугольниками обозначены сайты разреза РНК-эндонуклеазой.

Реакции трансэтерификации здесь иные, чем при сплайсинге интронов группы-I (рис. 173, Б). В ходе первой реакции 2'-ОН группа аденозина, расположенного близко к 3'-концу интрона, атакует 5'-конец интрона, в результате чего образуется связь 2'-5'. В ходе второй реакции 3'-ОН группа 5'-экзона атакует 3'-конец интрона; происходит лигирование экзонов и освобождается интрон, имеющий форму петли лассо (англ. lariat).

Таблица 21. Примеры интронов у прокариотов

Фила	Объект	Локализация и число интронов
Интроны группы-I		
BX <i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena</i> spp., <i>Fisherella</i> spp., <i>Phormidium</i> spp., <i>Pleurocapsa</i> spp., <i>Nostoc</i> spp., <i>Scytonema</i> spp., <i>Synechococcus</i> spp.	Ген тРНК ^{Leu} (1)
	<i>Dermocarpa</i> spp., <i>Scytonema</i> spp., <i>Synechocystis</i> spp.	Ген тРНК ^{Met} (1)
BXII <i>Proteobacteria</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ген тРНК ^{Arg} (1)
	<i>Azoarcus</i> spp.	Ген тРНК ^{Ile} (1)
Интроны группы-II		
BX <i>Cyanobacteria</i>	<i>Calothrix</i> spp.	Ген SSB-белка (1)
BXII <i>Proteobacteria</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	Ген ДНК-метилтрансферазы (1)
BXIII <i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	Плазмидный ген <i>mobA</i> (1)
Интроны архей		
AI <i>Crenarchaeota</i>	<i>Desulfurococcus mobilis</i>	Ген 23S рРНК (1)
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Ген 16S рРНК (1)
	<i>Staphylothermus marinus</i>	Ген 23S рРНК (2)
	<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	Ген 16S рРНК (2-5)
AII <i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacterium volcanii</i>	Ген тРНК ^{Trp} (1)

Интересно, что такие же две реакции трансэтерификации используются при ядерном сплайсинге. Такой рибозимный процесс осуществляется с помощью рибонуклеопротеинового комплекса — *сплайсосомы* (англ. spliceosome), состоящего из небольших ядерных snРНК (сокр. англ. small nuclear) пяти типов — U1, U2, U4, U5 и U6, а также из ~50 белковых компонентов. Предполагается, что в данном случае каталитический центр сплайсинга формирует РНК, входящая в состав сплайсосомы.

Интроны архей. Интроны этой группы обнаружены у нескольких представителей филы AI *Crenarchaeota* и филы AII *Euryarchaeota*. Белоккодирующих генов они не прерывают, а находятся внутри генов рРНК и тРНК.

В данном случае вместо рибозимного автосплайсинга осуществляется сплайсинг, который катализируют белковые ферменты. Фосфодиэфирные связи на границе экзона с интроном разрываются с помощью сайтспецифичной РНК-эндонуклеазы, и новые связи между концами интронов образуются с помощью РНК-лигазы.

На первом этапе эндонуклеаза разрезает первичный транскрипт в двух петлевых участках с образованием 2',3'-циклических фосфатов и 5'-ОН (рис. 173, В). На втором этапе происходит лигирование экзонов.

РНК-лигаза обладает одновременно четырьмя активностями: киназной (для фосфорилирования 5'-конца правого экзона за счет ГТФ), цикло-фосфодиэстеразной (для раскрытия 2',3'-циклического фосфата на 3'-конце левого экзона с образованием 2'-фосфата), аденилатсинтетазной (для аденилирования 3'-конца левого экзона и активации лигазной активности за счет АТФ) и собственно РНК-лигазной (для ковалентного соединения левого и правого экзонов). Образовавшийся в месте соединения экзонов 2'-фосфат удаляется с помощью 2'-фосфотрансферазы, которая передает фосфорильную группу НАД.

Причины существования интронов у бактерий и архей неясны, особенно если учесть, что генетической стратегией прокариотов является уменьшение размера генома с целью быстроты репликации.

С одной стороны, интроны могут отражать крайний случай паразитизма, когда вертикальная и горизонтальная экспансия «эгоистической» ДНК не требует самостоятельного фенотипического выражения.

С другой стороны, интроны, особенно способные к автосплайсингу, могут представлять собой молекулярные ископаемые, сохранившиеся от первобытного «мира РНК» (см. I том учебника).

16.3.2. Некодирующие участки

Наряду с генами в прокариотный геном входят ~10% некодирующих участков. Такие нуклеотидные последовательности находятся либо внутри генов, либо в промежутках между ними.

Хотя некодирующие участки генома не транскрибируются в рРНК и не транслируются в белок, т. е. фенотипически не экспрессируются, они выполняют ряд жизненно важных функций. Это участие в репликации, индукция и проведение внутригеномных перестроек ДНК, а также регуляция экспрессии генов.

В предыдущем разделе мы уже упоминали нетранскрибируемые контролирующие генетические элементы — промотор, оператор и терминатор.

На нетранскрибируемых участках генома, которые принимают непосредственное участие в механизмах репликации хромосом и плазмид, мы еще подробно остановимся в разделах 16.4.1.1 и 16.4.1.2.

В настоящем разделе мы рассмотрим два типа некодирующих участков генома:
— повторяющиеся последовательности;
— внутренние транскрибируемые спейсеры.

16.3.2.1. Повторяющиеся последовательности

Повторяющиеся последовательности являются наиболее разнообразным типом некодирующих повторяющихся элементов.

В прокариотных репликациях широко представлены повторяющиеся элементы. В соответствии со способностью или неспособностью определять первичную структуру белка/РНК они подразделяются на две большие группы — транскрибируемые и нетранскрибируемые.

Транскрибируемые элементы (англ. transcribed element), в зависимости от их неспособности или способности изменять свою локализацию в пределах реплика, можно подразделить на иммобильные и мобильные. Иммобильные транскрибируемые элементы представлены низкокопийными генами, в частности генами множественных *trp*-оперонов (см. раздел 16.3.1.2), множественными генами тРНК, а также *rhs*-генами, ответственными за дубликации в хромосоме *E. coli* K-12. Мобильные элементы представлены инсерционными последовательностями и транспозонами (см. раздел 16.3.2.1).

Нетранскрибируемые элементы (англ. noncoding element) представлены локально сконцентрированными *повторами* (англ. repeat) и *повторяющимися последовательностями* (англ. repeated sequence). Повторы по своей ориентации подразделяются на прямые и инвертированные. Примерами повторов служат АТ-богатые последовательности и DnaA-боксы, сосредоточенные в хромосомном локусе *oriC* (см. раздел 16.4.1.1), инвертированные повторы в хромосомном локусе *terC* (см. там же), а также итероны в плазмидном локусе *oriV* (см. раздел 16.4.1.2). Повторяющиеся последовательности имеют относительно небольшую длину (преимущественно <200 п.н.) и равномерно рассредоточены между более длинными однокопийными генными последовательностями.

Повторяющиеся последовательности имеются в геномах всех живых существ и составляют их заметную часть. Например, в гаплоидном геноме человека ($3 \cdot 10^9$ п.н.) около 3–6% приходится на $3 \cdot 10^5$ копий повторяющейся последовательности *Alu*, длина которой 300 п.н.

Вначале считали, что повторяющиеся последовательности существуют только в хромосомах эукариотов. Позднее они были найдены у бактерий и архей.

Функции повторяющихся последовательностей у прокариотов точно не известны. Неясно, каким образом они произошли, каким путем распределились внутри репликонов, а также как поддерживается их взаимная гомология. Тем не менее, большое разнообразие и широкое распространение повторяющихся последовательностей косвенно указывают на то, что они важны для структуры и эволюции геномов.

Таким образом, повторяющиеся последовательности принадлежат к классу некодирующих генетических элементов, имеют относительно небольшой размер и расположены в промежутках между структурными генами. У разных прокариотов они различаются по размеру (короткие или длинные), по структуре (в частности, бывают палиндромными), а также по взаимной группировке (одиночные, тандемные или объединенные в кластеры) и взаимной ориентации (прямые или инвертированные). В некоторых случаях повторяющиеся последовательности одинакового или неодинакового типа занимают аналогичное положение на хромосомах разных объектов.

Короткие повторяющиеся последовательности. «Короткими» условно называются последовательности длиной ≤ 100 п.н., хотя в этот размерный интервал попадают генетические элементы, значительно различающиеся своими свойствами (табл. 20).

REP (сокр. англ. repetitive extragenic palindrome; синоним — palindromic unit, PU). Это наиболее распространенные и лучше всего изученные короткие повторяющиеся последовательности. REP-элементы, впервые обнаруженные в 1982 г. у *E. coli* и *S. enterica* серовар Turhimurium, представляют собой палиндромы длиной 38 п.н., которые расположены между цистронами или на концах 25% оперонов. Они присутствуют в количестве 500-1000 копий на хромосому, что эквивалентно $\sim 1\%$ генома, имеют разную взаимную ориентацию, образуют тандемы и собраны в кластеры размером до 10 копий каждый. В настоящее время REP- и REP-подобные элементы выявлены у представителей большинства бактериальных фил, а также у ряда архей (табл. 20). Предполагается, что REP-элементы полифункциональны. Они могут выступать в роли терминатора транскрипции и модифицировать ее паттерн, участвовать в репликации путем связывания с ДНК-гиразой и ДНК-полимеразой Pol I, способствовать компактизации хромосомы за счет образования сверхскрученных петлевых «домоенов» (см. I том учебника), а также обеспечивать хромосомные перестройки, в частности путем гомологической рекомбинации.

Ng-rep (сокр. англ. Neisseria gonorrhoeae repeat). Эти, а также подобные им элементы длиной 26 п.н., характерны для *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* и ряда других бактерий.

DUS (сокр. англ. DNA uptake sequence). Эти элементы обеспечивают высокую эффективность внутривидовой трансформации *Haemophilus influenzae* и *N. gonorrhoeae* (см. раздел 16.6.1.3).

Chi (сокр. англ. crossover hot spot initiation). Данный некодирующий октамерный элемент, имеющий структуру 5'-GCTGGTGG-3', широко, если не универсально, распространен у прокариотов. Он создает в репликоне «горячие точки» и провоцирует *recBCD*-опосредованную рекомбинацию (см. раздел 16.6.1.2). Кроме того, предполагается, что содержащийся в этом сайте триплет CTG связывает праймазу DnaG, которая синтезирует РНК-праймеры для фрагментов Оказаки (см. раздел 16.4.1.1).

Rag (сокр. англ. resolution at G — устранение димеров в G-богатом участке). Этот некодирующий октамер имеет переменную структуру 5'-RGNAAGGS-3' (R обозначает А или Т, N — одно из канонических оснований, S — С или G). Rag-элементы расположены рядом с локусом *ter* и фланкируют сайт *dif*, по которому проходит сайтспецифичная рекомбинация с целью устранения хромосомных димеров (см. раздел 16.4.2).

STRR (сокр. англ. short tandemly repeated repetitive) и Hip1 (сокр. англ. highly iterated palindromic; от лат. iteratio — повторение). Образующие гетероцисты цианобактерии содержат три варианта STRR-последовательностей размером 7 п.н. В частности, в геноме *Calothrix* spp. число их копий достигает 100. В свою очередь, Hip1-последовательности широко, хотя и не универсально, представлены у цианобактерий.

LTRR (сокр. англ. «long» tandemly repeated repetitive). Вопреки своему названию, это относительно низкокопийная последовательность, длиной 37 п.н. Помимо *Anabaena* sp. PCC 7120, она обнаружена еще у нескольких нитчатых цианобактерий, с гетероцистами или без них.

DR (сокр. англ. direct repeat). В хромосоме *Mycobacterium bovis* штамм BCG содержится высококонсервативный локус, состоящий из 49 прямых повторов размером 36 п.н., разделенных

уникальными последовательностями, каждая длиной 35–41 п.н. Этот кластер служит «горячей точкой» для интеграции инсерционной последовательности IS6110 (см. раздел 16.3.2.1).

MPTR (сокр. англ. *major polymorphic tandem repeats*). Этот кластер обнаружен у микробактерий *M. kansasii* и *M. goodii*. По структуре он напоминает DR-кластер *M. bovis* штамм BCG и состоит из декамерных прямых повторов 5'-GCCGGTGTG-3', которые разделены уникальными спейсерами длиной 5 п.н. Число копий MPTR-последовательности на один геном достигает 80.

Длинные повторяющиеся последовательности. «Длинными» условно считаются последовательности размером >100 п.н. Подобно коротким последовательностям, они сильно различаются своими свойствами (табл. 20).

Таблица 20. Примеры повторяющихся последовательностей у прокариотов

Последовательность	Размер, п.н.	Число	Объект
Короткие			
REP	30–38	150–1000	Многие бактерии; археи <i>Archaeoglobus fulgidus</i> , <i>Haloferax mediterranei</i> , <i>H. volcanii</i> , <i>Methanococcus jannaschii</i> , <i>Pyrococcus</i> spp., <i>P. furiosus</i>
LTRR	37	8–10	Ряд нитчатых цианобактерий
DR	36	49	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG
Ng-rep	26	–	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
MPTR	10	80	<i>M. kansasii</i> , <i>M. goodii</i>
DUS	9–10	2000	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>
Chi	8	–	Большинство прокариотов
Rag	8	–	Большинство бактерий
Hip1	8	> 20	Многие цианобактерии
STRR	7	100	Ряд цианобактерий, образующих гетероцисты
Длинные			
BIME	> 100	500	<i>E. coli</i>
Mx-rep	> 100	–	<i>Mycobacterium xanthus</i>
ERIC	126	–	Многие бактерии
DR-rep	150–192	–	<i>Deinococcus radiodurans</i> SARK
Rep MP1	300	8–10	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SDC1	400	8–10	<i>M. pneumoniae</i>
RLEP	545	28	<i>M. leprae</i>
PGRS	700–1300	26–30	Микобактерии туберкулезного комплекса

— — данные отсутствуют.

BIME (сокр. англ. *bacterial interspersed mosaic elements*). BIME-элементы представляют собой REP-элементы, мозаично сгруппированные вместе с другими типами повторяющихся последовательностей. В хромосоме *E. coli* их насчитывается до 500, примерно по одному на каждые шесть генов.

ERIC (сокр. англ. *enterobacterial repetitive intergenic consensus; синоним — intergenic repeat unit, IRU*). Первоначально они были описаны в 1990 г. на примере *E. coli*, *S. enterica* серовар Typhimurium и других *Enterobacteriaceae*. Затем оказалось, что они широко распространены у представителей домена *Bacteria*. Это инвертированные повторы длиной 126 п.н.

Dr-rep (сокр. англ. *Deinococcus radiodurans repeat*). Данная высококонсервативная повторяющаяся последовательность длиной 150–192 п.н. характерна для радиоустойчивого микробактерии *D. radiodurans* штамм SARK (см. I том учебника). На обоих своих концах она содержит два инвертированно повторенных участка.

Mx-rep (сокр. англ. *Mycobacterium xanthus repeat*). Этот элемент, ядро которого имеет длину 87 п.н., характерен для миксобактерии *M. xanthus*. Интересно, что один из его повторов занимает такое же положение, как и REP-элемент *E. coli* — правее (downstream) гена *groD*, кодирующего σ^{70} -субъединицу РНК-полимеразы.

RepMP1 (сокр. англ. *repeat of Mycoplasma pneumoniae*) и **SDC1** (сокр. англ. *small direct consensus*). Эти повторяющиеся последовательности описаны на примере *Mycoplasma*

pneumoniae. Они имеют длину, соответственно, 300 и 400 п.н. и присутствуют в количестве 8–10 копий на хромосому, что составляет до 6% генома. Сходные с ними, но более крупные элементы имеют размер 1,1–2,2 т.п.н.

PGRS (сокр. *англ. polymorphic GC-rich repetitive sequence*). Повторяющиеся последовательности этого типа, построенные на основе прямого тандемного повтора 5'-CGGCGGCAA-3' и поэтому содержащие до 80% GC-пар, широко распространены у микобактерий «туберкулезного» комплекса (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* и *M. tuberculosis*), хотя встречаются и у других микобактерий. PGRS имеют размер 700–1300 п.н. и представлены 26–30 копиями. Высокий полиморфизм PGRS позволяет широко использовать результаты их сравнительного анализа в молекулярной эпидемиологии. По характеру консенсусной последовательности, копийности и спектру хозяев PGRS обнаруживают сходство с MPTR.

RLEP (сокр. *англ. repeat of Mycobacterium leprae*). До 28 копий этого повтора, состоящего из центрального консервативного домена размером около 545 п.н. и переменных концов, находятся в разных участках генома возбудителя проказы *M. leprae*. На выявлении RLEP в биоптатах основан быстрый и чувствительный метод идентификации бацилл проказы.

В настоящее время специфические повторяющиеся последовательности небольшой длины используются в качестве праймеров при проведении полимеразной цепной реакции (гер-PCR). Спектры полученных амплификонов служат одним из критериев таксономии, а также позволяют оценить разнообразие «природных» ДНК (см. I том учебника).

16.3.2.2. Внутренние транскрибируемые спейсеры

Как уже отмечалось, в прокариотном *rrn*-опероне между генами 16S рРНК и 23S рРНК во многих случаях находится *внутренний транскрибируемый спейсер* (англ. internal transcribed spacer, ITS).

Продуктом транскрипции *rrn*-оперона (см. раздел 16.3.1.2) является пре-рРНК, которая содержит последовательности рРНК всех трех типов, а также последовательность 16S–23S ITS.

При первичном процессинге РНКаза III разрезает пре-рРНК на три части — пре-16S рРНК, пре-23S рРНК и пре-5S рРНК в блоке с транскрибируемой последовательностью 16S–23S ITS. При вторичном процессинге из них образуются зрелые молекулы 16S рРНК, 23S рРНК, 5S рРНК и тРНК (рис. 174). Важную роль в процессинге пре-рРНК играют спейсерные участки, расположенные между последовательностями рРНК.

Путем анализа вторичной структуры пре-рРНК было установлено, что в первичном транскрипте комплементарные сайты спариваются друг с другом, образуя два двухцепочечных стебля, которые несут на концах непротранскрибируемые 16S рРНК и 23S рРНК (рис. 174).

Преждевременная терминация транскрипции в области 16S–23S ITS предотвращается сайтами-антитерминаторами, которые называются «боксами» А и В. Бокс А имеет более консервативную нуклеотидную последовательность, чем бокс В.

Часто, хотя и не обязательно внутри 16S–23S ITS содержатся гены тРНК. Это либо ген тРНК^{Ala} (или тРНК^{Glu}), либо ген тРНК^{Ala} совместно с геном тРНК^{Ile}. Присутствие встроенных генов тРНК увеличивает молекулярный полиморфизм 16S–23S ITS.

В последнее десятилетие данные об инфраструктуре *rrn*-оперона все чаще используются при классификации прокариотов (к середине 2003 г. в банках данных депонировано свыше $2,5 \cdot 10^3$ по-

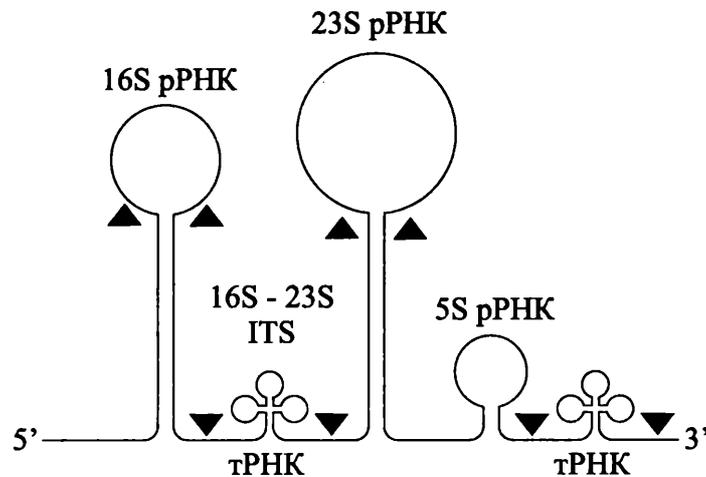


Рис. 174. Первичный транскрипт оперона рибосомных РНК.

Черными треугольниками обозначены сайты разреза РНКазой III.

следовательностей 16S–23S ITS). Дело в том, что «разрешающая сила» такого универсального критерия, как степень гомологии 16S рРНК, ослабевает применительно к филогенетическим таксонам низкого ранга. Эволюция высоко консервативных генов рРНК не обязательно отражает истинную межвидовую дивергенцию; напомним, что границей вида условно считается не менее 97% сходства последовательностей 16S рДНК (см. I том учебника).

16S–23S ITS более вариабельны, чем гены рРНК. Но в то же время они достаточно консервативны, чтобы стать надежным критерием филогении. Поэтому размер и нуклеотидная последовательность 16S–23S ITS все шире учитываются в систематике бактерий и архей при разграничении видов и более мелких внутривидовых единиц, в частности, при типировании штаммов.

16.4. САМОВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ГЕНОМА

Чтобы устойчиво наследоваться, т. е. сохраняться от поколения к поколению, наследственная информация должна самовоспроизводиться, или копироваться. Частичное копирование генома служит предпосылкой генетической рекомбинации путем горизонтального переноса генов (не от родительской клетки к гомологичным дочерним клеткам, а от клетки-донора к гетерологичной клетке-реципиенту).

Самовоспроизведение генома включает в себя два взаимосвязанных аспекта — матричный («информационный») и конструктивный («операционный»).

Матричный аспект самовоспроизведения генома общеизвестен, и мы не станем на нем задерживаться. Конструктивный аспект заключается в том, что для копирования ДНК используются мономеры-нуклеозидтрифосфаты — дезокси-АТФ, дезокси-ГТФ, дезокси-ЦТФ и дезокси-ТТФ. Они должны поступать в репликационную вилку (см. ниже) в сбалансированном и концентрированном количестве, а не просто находиться в диффузионном равновесии со своими цитоплазматическими пулами. Как это происходит, неизвестно. В частности, можно предположить, что в доставке мономеров-предшественников в репликационную вилку участвует мультиэнзимный комплекс энзоскелета (см. I том учебника).

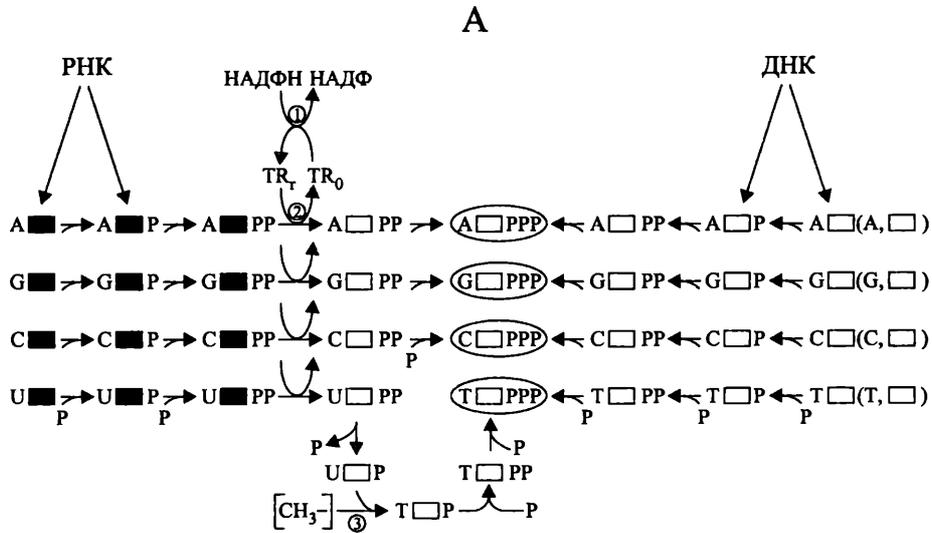


Рис. 175. Биосинтез мономеров ДНК из «вторсырья» (А) и de novo (Б).

Черные прямоугольники — рибоза; белые прямоугольники — дезоксирибоза.

1 — тиоредоксинредуктаза; 2 — рибонуклеотидредуктаза NrdAB; 3 — тимидилатсинтаза; P — фосфорильная группа; PRPP — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат; TR_r — восстановленный тиоредоксин; TR_o — окисленный тиоредоксин; [CH₃-] — метильная группа (в форме метил-N₄-фолата).

Биосинтез мономеров ДНК осуществляется двумя способами — из «вторсырья» (англ. salvage synthesis) и de novo.

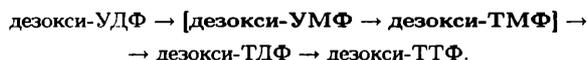
Биосинтез мономеров ДНК из «вторсырья» (рис. 175, А). В данном случае используются продукты деградации эндогенных или экзогенных ДНК и РНК — азотистые основания, (дезоксир)рибонуклеозиды и (дезоксир)рибонуклеозидмонофосфаты.

Из «подержанных» азотистых оснований и дезоксирибозы предварительно синтезируются дезоксирибонуклеозиды. Затем из них, а также из «подержанных» (дезоксир)рибонуклеозидмонофосфатов с помощью АТФ-зависимых киназ образуются соответствующие дезоксирибонуклеозидтрифосфаты.

«Подержанные» рибонуклеозиды и рибонуклеозидмонофосфаты с помощью субстратспецифичных АТФ-зависимых киназ предварительно превращаются в рибонуклеозиддифосфаты — АДФ, ГДФ, ЦДФ и УДФ. После этого они восстанавливаются в соответствующие соединения дезоксирибозного ряда. Донором электронов для АДФ-, ГДФ- и ЦДФ-редуктазы NrdAB служит вос-

становленный тиоредоксин (белок молекулярной массой ~10 кДа; его окисленная форма содержит дисульфидный мостик). В свою очередь, донором электронов для тиоредоксинредуктазы служит НАДФН. Дезокси-АДФ, дезокси-ГДФ и дезокси-ЦДФ превращаются в дезокси-АТФ, дезокси-ГТФ и дезокси-ЦТФ при помощи неспецифической АТФ-зависимой нуклеозиддифосфаткиназы.

Четвертый дезоксирибонуклеотид, дезокси-ТТФ синтезируется отдельно, в следующей цепи превращений:



Дезокси-УМФ метилируется в дезокси-ТМФ с помощью тимидилатсинтетазы, причем донором метильной группы служит N-метил-Н₄фолат (см. II том учебника).

В конечном счете, из четырех типов мономеров-дезоксинуклеозидтрифосфатов синтезируется молекула ДНК.

Биосинтез мономеров ДНК de novo (рис. 175, Б). Этот метаболический путь начинается с образования пиримидиновых и пуриновых оснований из аминокислот (аспартата, глицина и глутамата), формиата, СО₂ и NH₃. Затем из азотистых оснований и АТФ-активированной рибозы (5-фосфорибозил-1-пирофосфата, PRPP) образуются четыре рибонуклеозидмонофосфата — АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Под воздействием субстратспецифичных АТФ-зависимых киназ из этих рибонуклеозидмонофосфатов образуются рибонуклеозиддифосфаты. Затем рибонуклеотидредуктаза NrdAB восстанавливает рибонуклеозиддифосфаты в соединения дезоксирибозного ряда (см. выше). Единственное исключение составляет дезокси-ТДФ, предшественником которого служит дезокси-УДФ (см. выше).

Наконец, как и при биосинтезе из «вторсырья», неспецифическая киназа превращает все четыре дезоксинуклеозиддифосфата в соответствующие дезоксинуклеозидтрифосфаты, и из них синтезируется молекула ДНК.

16.4.1. Репликация

В основе самовоспроизведения генома лежит матричный процесс — репликация двухспиральной ДНК.

Репликацией в широком смысле слова (англ. replication; от лат. replicatio — возобновление) называется воспроизведение любых субклеточных структур, без чего невозможны клеточный рост и деление.

В первую очередь нас интересует репликация хромосомы. Ясно, что репликация ДНК как полинуклеотидной молекулы и репликация хромосомы как органеллы (см. I том учебника), в структурно-функциональной организации которой участвуют ДНК-связывающие белки, и которая взаимодействует с клеточной оболочкой, не одно и то же, хотя в литературе эти понятия обычно строго не разграничиваются.

16.4.1.1. Репликация хромосом

Репликация хромосомной ДНК происходит с помощью мультиферментного комплекса, организованного в форме временно существующей органеллы — реплисомы (см. ниже).

Репликация включает в себя три основных этапа: *инициацию* (начало), *элонгацию* (продолжение) и *терминацию* (завершение).

Ферментативный процесс репликации осуществляется полуконсервативным способом — двойная спираль ДНК расплетается на одиночные цепи, а затем на каждой из них из четырех типов дезоксирибонуклеотидов с помощью ДНК-полимеразы, или *репликазы* собирается новая цепь. Залогом правильного копирования хромо-

сомы служит комплементарность азотистых оснований, т. е. определенный тип их взаимного спаривания: $G \equiv C$; $A = T$.

При образовании РНК-праймеров (инициирующих синтез фрагментов Оказаки для образования отстающей цепи; см. ниже) временно используются четыре типа рибонуклеотидов. Их полимеризация осуществляется с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы, или праймазы. В данном случае соблюдается расширенное правило комплементарности: $G \equiv C$; $T(\text{старая цепь}) = A(\text{новая цепь})$ и $A(\text{старая цепь}) = U(\text{новая цепь})$.

Таким образом, субстратами при репликации служат восемь типов дезокси(рибо)нуклеозидтрифосфатов — дезокси(рибо)-АТФ, дезокси(рибо)-ГТФ, дезокси(рибо)-ТТФ, рибо-УТФ и дезокси(рибо)-ЦТФ. Кроме того, расходуется энергия, освобождающаяся при гидролизе их субтерминальной фосфодиэфирной связи (рис. 176).

У отдельных представителей мира прокариотов скорость полимеризации нуклеотидов существенно различается. В частности, для бактерии *Mycoplasma capricolum* она составляет $100 \text{ н.}\cdot\text{с}^{-1}$, для археота *Pyrobaculum abyssi* — $300 \text{ н.}\cdot\text{с}^{-1}$, а для бактерии *E. coli* — $1 \text{ тыс. н.}\cdot\text{с}^{-1}$.

Расплетенный участок, в котором на конкретный момент происходит репликативный синтез ДНК, называется *репликационной вилкой* (англ. replication fork).

По мере того, как вилка продвигается вперед, идет сопряженное копирование комплементарных цепей ДНК. А так как они антипараллельны, можно было бы ожидать, что одна цепь непрерывно наращивается в направлении $5' \rightarrow 3'$, а другая — в направлении $3' \rightarrow 5'$. Однако на самом деле механизм репликации сложнее.

Природные ДНК-полимеразы могут синтезировать цепь ДНК только в направлении $5' \rightarrow 3'$, причем либо уже имеющуюся цепь, либо от затравки-праймера, роль которой выполняет короткая цепочка РНК. В обоих случаях к свободной $3'$ -ОН группе (дезокси)рибонуклеотида присоединяется $5'$ -фосфатная группа следующего нуклеотида. В качестве побочного продукта этой реакции образуется неорганический пирофосфат (рис. 176).

В природе нет таких ДНК-полимераз, которые действовали бы в направлении $3' \rightarrow 5'$, поскольку на $5'$ -конце несвязанного нуклеотида находится не свободная ОН-группа, а трифосфат РРР.

Не бывает и таких ДНК-полимераз (в отличие от РНК-полимераз), которые синтезировали бы полинуклеотидную цепь *de novo*, начиная с одного нуклеотида.

В реальности одна цепь ДНК, которая называется *ведущей* (англ. leading strand), копируется непрерывно в направлении $5' \rightarrow 3'$. Другая цепь, которая называется *отстающей* (англ. lagging strand), копируется дискретно — путем сборки из отдельных полинуклеотидных блоков. Они называются *фрагментами Оказаки* (англ. Okazaki fragment) в честь японского генетика Рейдзи Оказаки (R. Okazaki), который открыл их в начале 1980-х годов.

Благодаря использованию такого возвратно-поступательного механизма ведомая цепь ДНК синтезируется в запрещенном направлении ($3' \rightarrow 5'$) — в конечном итоге, в ту же сторону, что и ведущая цепь.

Итак, репликационная вилка асимметрична. Для инициации репликации ведущей цепи праймаза однократно синтезирует РНК-праймер, а затем наращивание идет уже без праймеров, непрерывно. Отстающая цепь собирается из отдельных фрагментов Оказаки. Для инициации их синтеза каждый раз требуется праймер, представляющий собой короткую молекулу РНК, или «мини-транскрипт» (см. ниже).

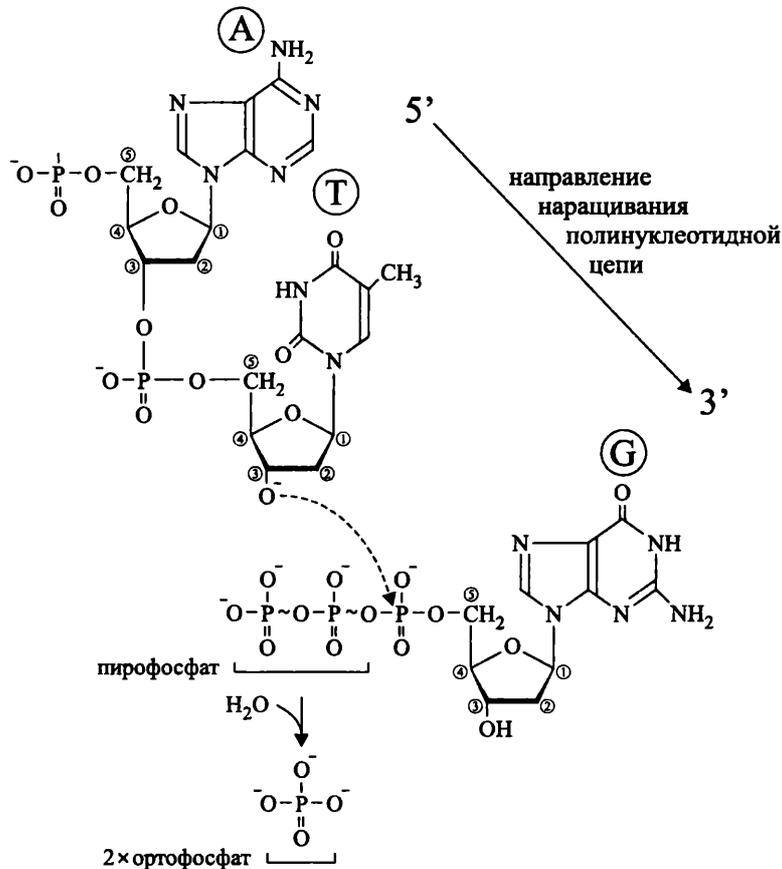


Рис. 176. Удлинение полинуклеотидной цепи с помощью ДНК-полимеразы.

A — аденин; T — тимин; G — гуанин.

Основные этапы репликации хромосомы. Репликация кольцевой бактериальной хромосомы состоит из пяти последовательных этапов:

- инициации репликации в уникальном хромосомном локусе — *ориджине репликации oriC* (сокр. англ. origin — начало и C — chromosome), или *репликаторе* (англ. replicator);
- образования двух противоположно направленных репликационных вилок;
- синтеза сестринских копий хромосомы путем наращивания новых цепей ДНК от *ориджина репликации oriC* до другого уникального хромосомного локуса — *терминации terC* (сокр. англ. termination — завершение и C — chromosome);
- размыкания сплетенных колец сестринских хромосом, или *декатенации* (англ. decatenation; от лат. catena — цепь);
- сегрегации сестринских хромосом по обе стороны от клеточного экватора с помощью бактериального «митотического» аппарата.

Ориджин репликации хромосомы *oriC*. Репликация бактериальной хромосомы стартует от *ориджина репликации oriC*. Репликационные вилки перемещаются в двух взаимно противоположных направлениях (рис. 177). При этом образуются

две симметричные *реплихоры* (англ. *replichore*; от лат. *replicatio* — возобновление и греч. *choris* — отдельно), которые соответствуют двум воссоздаваемым сестринским молекулам ДНК. В условно-графическом отображении реплицирующаяся хромосома похожа на греческую букву тета (θ). Поэтому данный механизм репликации называется «тета-механизмом». Его другое название — «механизм Кэрнса», в честь английского микробиолога Джона Кэрнса (J. Cairns), который с помощью метода радиоавтографии с включением H^3 -тимидина получил в 1963 г. первое изображение хромосомы *E. coli* в состоянии репликации.

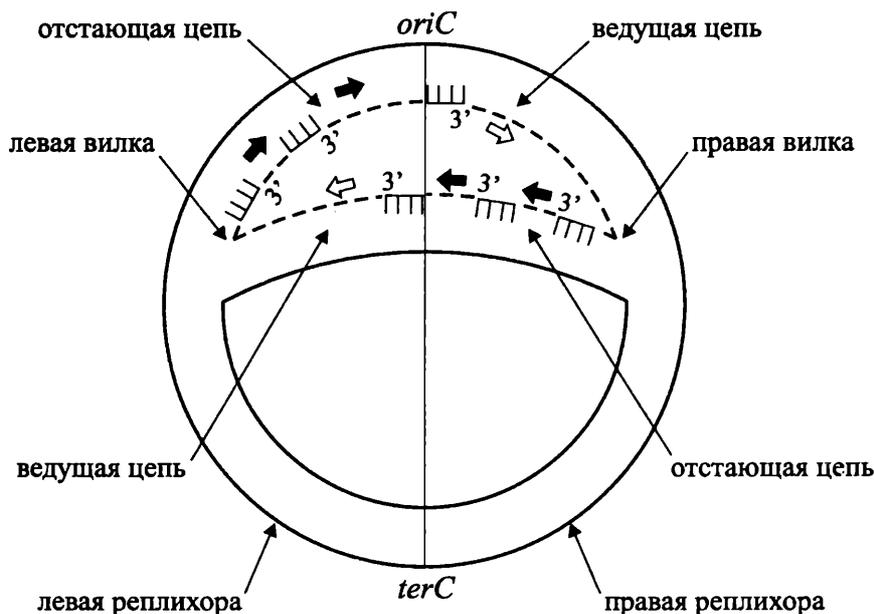


Рис. 177. Тета-механизм репликации бактериальной хромосомы.

Сплошные линии — старые нити ДНК; пунктиры — новые нити ДНК; гребенки — РНК-праймеры; белые стрелки — направление наращивания полинуклеотидной цепи на ведущей нити ДНК; черные стрелки — направление наращивания полинуклеотидной цепи на ведомой нити ДНК.

oriC — локус инициации репликации (ориджин); *terC* — локус терминации репликации (терминус).

В другом уникальном локусе *terC*, расположенном строго напротив ориджина *oriC*, репликация заканчивается (рис. 177).

Ориджин является незаменимым компонентом хромосомы, и в случае его делеции бактерия теряет способность к размножению.

Клетка может содержать один или несколько ориджинов репликации, что определяется особенностью клеточного цикла у прокариотов (см. раздел 17.1).

Для медленно размножающихся бактерий интервал между двумя последовательными делениями, или *время генерации* (англ. *generation time*) составляет ≥ 120 мин. В данном случае пререпликативная фаза, фаза репликации хромосом(ы) и фаза расхождения дочерних хромосом вместе с фазой клеточного деления разделены во времени.

У тех бактерий, которые размножаются со средней или даже высокой скоростью, время генерации сокращается до 15–40 мин. Это ровно столько или в несколько раз меньше, чем требуется для репликации хромосомы. Например, минимальное время генерации *E. coli* равно 15 мин, в то время

как при скорости полимеризации $1 \text{ тыс н.}\cdot\text{с}^{-1}$ на копирование генома этой бактерии (4,7 млн.п.н.: $10^3 \text{ н.}\cdot\text{с}^{-1} = 78 \text{ мин}$) с помощью двух репликационных вилок уходит $\sim 39 \text{ мин}$ ($78 \text{ мин} : 2$).

Поскольку в ходе размножения бактерия должна передать дочерним клеткам не менее одного геномного эквивалента, процесс копирования забегает вперед: перекрываются два или больше раундов репликации одного и того же генома, т.е. эти раунды иницируются раньше, чем сестринские хромосомы распределятся между дочерними клетками. В данном случае на хромосоме образуются множественные репликационные вилки (рис. 178). Такая репликация называется *многовилковой* (англ. multifork replication). Некоторые бактерии, например *Caulobacter crescentus*, к такому типу репликации не способны.

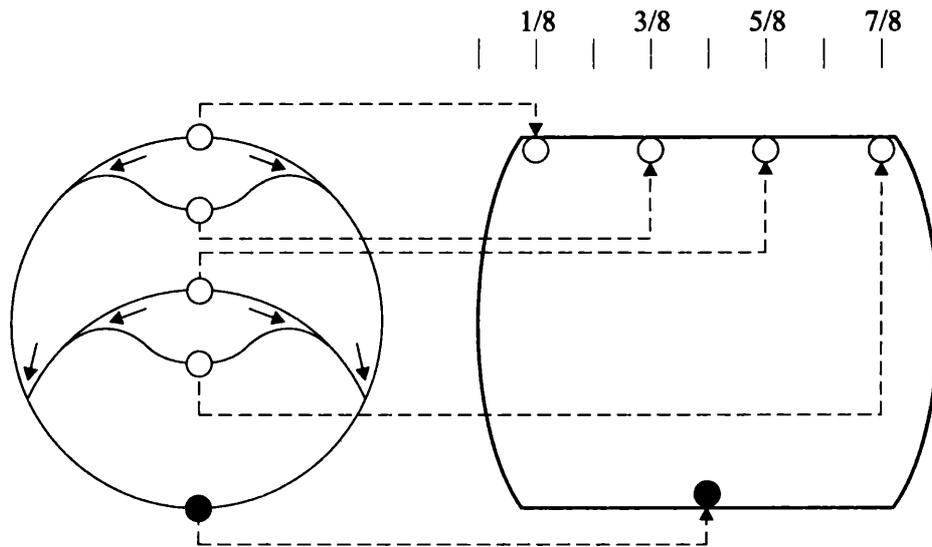


Рис. 178. Многовилковая репликация у быстро делящихся бактериальных клеток.

Белые кружки — ориджины; черный кружок — терминус; сплошные стрелки — направление перемещения репликационных вилок; пунктиры — размещение ориджинов соответственно на $1/8$, $3/8$, $5/8$ и $7/8$ продольной оси, а терминуса на экваторе клетки.

Расхождение хромосом и клеточное деление происходят на фоне репликации, благодаря чему хромосомы ювенильных дочерних клеток уже реплицированы примерно на 50%. Перед делением материнская клетка содержит один экваториальный терминус и либо два ориджина, расположенные на $1/4$ и $3/4$ длины продольной оси клетки, либо четыре ориджина — на $1/8$, $3/8$, $5/8$ и $7/8$ длины продольной оси (рис. 178).

Существование многовилковой репликации не противоречит положению о том, что репликация хромосомы иницируется только раз на протяжении клеточного цикла (см. раздел 16.4.1.1). Понятна разница между ситуацией, когда репликация иницируется «от нуля», и ситуацией, когда после очередного деления дочерняя клетка получает готовые вилки.

Локус *oriC* имеет минимальный размер 245 п.н. и содержит 56 мол. % GC, причем GC- и AT-пары нуклеотидов распределены неравномерно по его длине (см. ниже).

Согласно результатам секвенирования ДНК, полученным для нескольких десятков видов бактерий, локус *oriC* имеет консервативную структуру (рис. 179).

В этой некодирующей области хромосомы находятся:

— от девяти до четырнадцати прямых повторов GATC (в случае *B. subtilis* они отсутствуют);

– три 13-мерных (*E. coli*) или три 16-мерных (*B. subtilis*) прямых повтора, обогащенных АТ-парами;

– четыре или пять 9-мерных инвертированных повторов, или «DnaA-боксов» со структурой 5'-ТТАТССАСА-3' и, соответственно, 5'-ТГТГГАТАА-3'.

Набор генов, фланкирующих ориджин *oriC* (в частности, это гены *rnpA*, *rpmH*, *dnaA*, *dnaN*, *recF* и *gyrB*), и их взаимное расположение также консервативны.

Иногда встречаются ориджины с уникальной структурой. Например, у почкующейся стеблевой бактерии *Caulobacter crescentus* в состав локуса *oriC* входят сайты для связывания белка CtrA, негативно контролирующего репликацию в ходе диморфного клеточного цикла (см. раздел 17.1). Кроме того, нуклеотидная последовательность локуса *oriC* этой бактерии перекрывается с последовательностью гена *hemE*, который кодирует уропорфириноген-декарбоксилазу и фланкирован двумя неконсервативными генными кластерами.

Локус *oriC* является не только стартовой точкой репликации бактериальной хромосомы. Он также служит мишенью регуляции репликации. Особые механизмы следят за тем, чтобы репликация не инициировалась на протяжении значительной части клеточного цикла, которая называется *эклипс-периодом* (от греч. *eclipsis* — исчезновение; в данном случае — отсутствие репликации).

В случае *E. coli* регуляция репликации связана с действием метилазы (точнее — метилтрансферазы) Dam (сокр. англ. DNA adenine methylase; 32 кДа; ген *dam*). Этот фермент специфически метилирует остатки аденина в сайтах 5'-GATC-3' (см. также раздел 16.5.2). Таких сайтов в ДНК *E. coli* имеется ~19 тыс. Содержание Dam зависит от скорости роста и определяется эффективностью транскрипции с промотора P2 гена *dam*.

Поскольку ДНК реплицируется полуконсервативным способом, за репликационной вилкой образуются два «полуметилированных» дуплекса ДНК. Большинство неметилированных сайтов GATC быстро реметилируется с помощью метилазы Dam. Исключением является ориджин репликации *oriC*, с которым связывается белок SeqA (21 кДа; сокр. англ. sequester — изолировать).

Белок SeqA конкурирует с метилазой Dam. Он взаимодействует с кластерами из двух и более сайтов GATC, что препятствует их метилированию. Кроме того, он блокирует синтез белка DnaA, связываясь с полуметилированными сайтами в промоторе гена *dnaA*.

Поскольку локус *oriC* содержит кластер из 13 сайтов GATC, он сильнее других участков хромосомы изолируется и от метилазы Dam и от инициаторного белка DnaA.

Белок SeqA не только связывается с полуметилированным локусом *oriC*, но и играет роль якоря, прикрепляющего этот локус к участку клеточной оболочки. В результате контакт между *oriC* и реплисомой блокируется, что препятствует преждевременной реинициации репликации.

Итак, в полуметилированном мембраносвязанном виде локус *oriC* не способен участвовать в репликации. В свою очередь, для реинициации репликации он должен перейти в полностью метилированную форму и потерять связь с клеточной оболочкой. Таким образом, оболочка *E. coli* осуществляет негативный, а не позитивный контроль над репликацией.

Иная картина наблюдается в случае *B. subtilis*. Во-первых, у этой бактерии локус *oriC* не содержит GATC-сайтов для метилирования. Во-вторых, у нее нет «якорного» белка SeqA. Вместо него для прикрепления локуса *oriC* к клеточной оболочке используется белок DnaB (не путать с одноименной геликазой DnaB, имеющейся у *E. coli*; см. ниже).

Инициаторный белок DnaA. Этот ДНК-связывающий белок (52 кДа) выполняет ключевую роль в инициации репликации. Его содержание в клетке довольно велико (10^3 копий у быстро растущей *E. coli*). Гомологи гена *dnaA* кишечной палочки имеются во всех секвенированных бактериальных геномах, что свидетельствует об эволюционной консервативности и универсальности механизма репликации.

Инициаторы репликации, или *ориджин-связывающие белки* (англ. origin binding protein, OBP) — это мономеры или мультисубъединичные комплексы. Они принадлежат к суперсемейству AAA-АТФаз (сокр. англ. ATPases associated with various cell activities; см. раздел 16.6.1.3).

ОВР обладают сродством к специфическим нуклеотидным последовательностям, расположенным в локусе *ori*, и кооперативно соединяются с ними, образуя олигомеры.

Инициаторные белки выполняют две функции. Вначале они расплетают небольшой участок двухспиральной ДНК на одиночные цепи с образованием «глазка» (англ. eyelet), или «пузыря» (англ. bubble). Затем они направляют туда другие ферменты репликации, а именно:

- *геликазы*, обеспечивающие продвижение репликационной вилки;
- *праймазы*, которые синтезируют РНК-праймеры, играющие роль затравки при синтезе дочерних цепей ДНК;
- *ДНК-полимеразы*.

Чтобы ОВР выполняли все эти функции, их необходимо активировать за счет энергии АТФ.

Помимо сайтов для связывания ОВР, локус *ori* содержит легко расплетающиеся прямые повторы, богатые АТ-парами.

Белок DnaA активируется в результате связывания с АТФ, а также при взаимодействии с кислыми фосфолипидами, входящими в состав СМ. При гидролизе связанного АТФ (что стимулируется регуляторным белком Hda) белок DnaA изменяет свою конформацию и теряет способность вызывать новый раунд репликации.

Белок DnaA прикрепляется к локусу *oriC* сайтспецифично, в нескольких DnaA-боксах (рис. 179). Это служит триггером для каскада структурных превращений молекулы ДНК, которые позволяют приступить к репликации.

В большинстве случаев ген *dnaA* непосредственно фланкирует локус *oriC* (за исключением энтеробактерий, в частности *E. coli*, где они разделены последовательностью длиной 42 т. п. н.).

Как уже указывалось, локус *oriC* имеет консервативную структуру и включает в себя четыре (в случае *E. coli* — пять) девятимерных DnaA-боксов. Они обозначаются как R1-R4. К ним в очередности $R_1 \rightarrow R_1 \rightarrow R_2 \rightarrow R_3$ присоединяются молекулы белка DnaA.

Белок DnaA в процессе репликации выполняет три функции:

- распознает DnaA-боксы в локусе *oriC* и кооперативно вступает с ними в прочную связь;
- расплетает двойную спираль ДНК на одиночные нити в АТ-богатом конце локуса *oriC*, примыкающем к DnaA-боксам;
- направляет в расплетенный участок ДНК (глазок) геликазу DnaB.

При репликации в локусе *oriC* поочередно образуются три комплекса (рис. 179).

Во-первых, это *инициаторный комплекс* (англ. initial complex) (рис. 179, I). Так называется часть локуса *oriC*, содержащая DnaA-боксы. В этом месте негативно суперспирализованная ДНК делает локальный изгиб с образованием глобулы, ядро которой состоит из 20–40 молекул белка DnaA в АТФ-связанной форме. В образовании инициаторного комплекса, помимо белка DnaA, участвуют гистоноподобный белок HU (см. I том учебника), а также катионные белки IHF (сокращенно англ. integration host factor) и Fis (сокращенно англ. factor for inversion stimulation), изгибающие молекулу ДНК.

Во-вторых, это *открытый комплекс* (англ. open complex) (рис. 179, II). Он образуется в участке *oriC* размером 45 п. н., который «плавится», или расплетается на одиночные цепи путем разрыва водородных связей. Данное структурное изменение ДНК происходит потому, что белок DnaA поочередно вступает во взаимодействие с тремя «легкоплавкими» АТ-богатыми 13-мерными повторами (как известно, GC-пара стабилизирована тремя водородными связями, а АТ-пара только двумя), расположенными на левом конце локуса *oriC*. Переход от инициаторного комплекса к открытому комплексу осуществляется за счет использования энергии АТФ.

В-третьих, это *препраймерный комплекс* (англ. prepriming complex) (рис. 179, III). Он образуется после того, как в открытый комплекс внедряется *геликаза* DnaB (англ. helicase; от греч. elix — витой), расплетающая двойную спираль ДНК. Сборку гексамеров белка DnaB вокруг одноцепочечных участков ДНК осуществляет вспомогательный белок — АТФаза DnaC. Выполнив свою задачу, он покидает комплекс. В дальнейшем две молекулы геликазы DnaB расплетают ДНК во взаимно противоположных направлениях со скоростью $700\text{--}1000 \text{ п. н.} \cdot \text{с}^{-1}$. С одноцепочечными

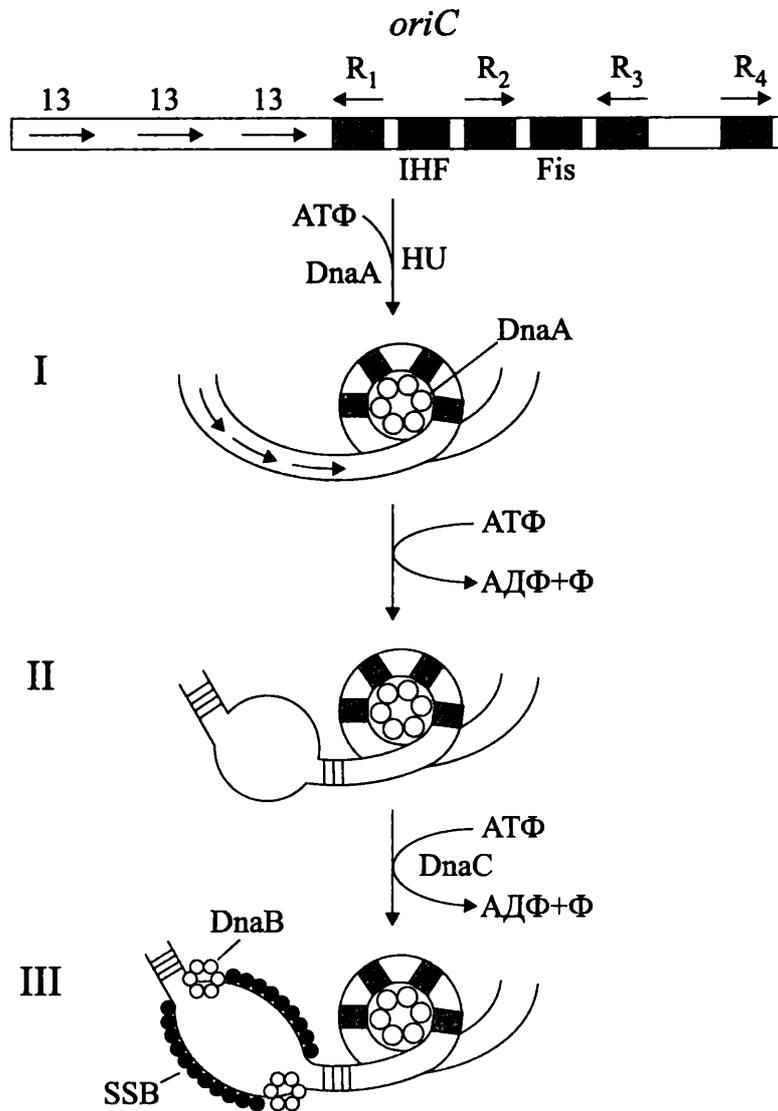


Рис. 179. Хромосомный локус *oriC* и комплексы, образующиеся в нем на стадии инициации репликации.

I — инициальный комплекс; II — открытый комплекс; III — препраймерный комплекс.

oriC — локус инициации репликации (ориджин); 13 — AT-богатые прямые повторы; R_1-R_4 — DnaA-боксы; IHF, Fis — сайты для связывания изгибающих белков; HU — ДНК-связывающий белок; DnaA — инициаторный белок; DnaB — геликаза; DnaC — вспомогательная АТФаза; SSB — белок, стабилизирующий одноцепочечную ДНК.

участками ДНК кооперативно связываются молекулы *SSB*-белка (сокр. англ. single strand binding protein). Они стабилизируют жесткую форму эти участков, защищают их от нуклеаз и правильно ориентируют по отношению к ним ДНК-полимеразу. Следом за геликазой в состав препраймерного комплекса включается праймаза (см. ниже).

Белок DnaA многофункционален. Наряду с инициацией репликации он проявляет себя как репрессор транскрипции. Это происходит благодаря его взаимодействию с DnaA-боксами, имеющимися в промоторных участках некоторых незаменимых генов (гена *mioC*, продукт которого участвует в репликации; гена *groH*, кодирующего субъединицу РНК-полимеразы; гена *uvrB* эксцизионной нуклеазы, осуществляющей репарацию ДНК, и др.). Кроме того, он регулирует свою собственную экспрессию, блокируя ген *dnaA*.

Уровень транскрипции гена *dnaA* тем больше, чем выше скорость роста. В свою очередь, негативным регулятором гена *dnaA* является «алармон» гуанозинтетрафосфат ppGpp (см. раздел 18.1.4). Концентрация ppGpp увеличивается, когда рост по той или иной причине затормаживается. При этом используется альтернативный ориджин *oriM*, расположенный по соседству с локусом *oriC*. Детали репликации в этих условиях неизвестны, хотя установлено, что она протекает в отсутствие белка DnaA.

Праймосома. Праймосома является частью органеллы репликации — реплисома (см. ниже).

Как уже указывалось, отстающая цепь ДНК образуется прерывистым способом из фрагментов Оказаки. Для инициации биосинтеза фрагментов Оказаки используются мини-транскрипты, или РНК-праймеры, длина которых составляет 10–15 н. Синтез РНК-праймеров происходит с помощью особой РНК-полимеразы, или *праймазы* (англ. primase).

У разных прокариотов фрагменты Оказаки различаются по длине (в частности, для *E. coli* это 1–2 т.п.н., а для археота *Pyrococcus abyssi* — 100 п.н.).

Сборка фрагмента Оказаки начинается с 3'-конца РНК-праймера и продолжается в направлении 5' → 3' (рис. 180).

В состав праймосомы входят ДНК-геликаза DnaB со вспомогательным белком DnaC (см. выше) и праймаза DnaG, а также вспомогательные белки DnaT и PriABC. Как уже отмечалось, функция праймазы заключается в биосинтезе РНК-праймеров — однократно для ведущей цепи и многократно для отстающей цепи.

С праймазой тесно взаимодействует топоизомераза II (см. раздел 16.4.2), или *ДНК-гираза*. Ее роль состоит в том, чтобы по ходу продвижения репликационной вилки распрямлять двойную спираль ДНК, делающую один виток на десять пар нуклеотидов. В противном случае реплисоме пришлось бы вращаться вокруг молекулы ДНК, а это привело бы к взаимному спутыванию сестринских хромосом. Кроме того, ДНК-гираза устраняет положительные супервитки, накапливающиеся перед репликационной вилкой. Для этого она сначала делает двухцепочечные разрезы ДНК, а затем восстанавливает непрерывность обеих цепей перед геликазой DnaB.

Реплисома. Комплексная задача по обеспечению репликации решается помощью мультиферментной органеллы — *реплисома* (англ. replisome). На примере *B. subtilis* показано, что реплисома формируется на экваторе клетки. Скорее всего, это характерно и для большинства других бактерий, делящихся бинарно-эквивалентно (в частности, *E. coli*).

В отличие от стабильно существующих органелл, например рибосом, отдельные компоненты реплисома удерживаются вместе слабыми электростатическими силами. Поэтому нативную реплисому невозможно получить препаративно, но ее можно визуальным методом наблюдать методом молекулярного зондирования *in situ*.

При репликации ДНК двойная спираль плавится, т. е. расходится на две старые

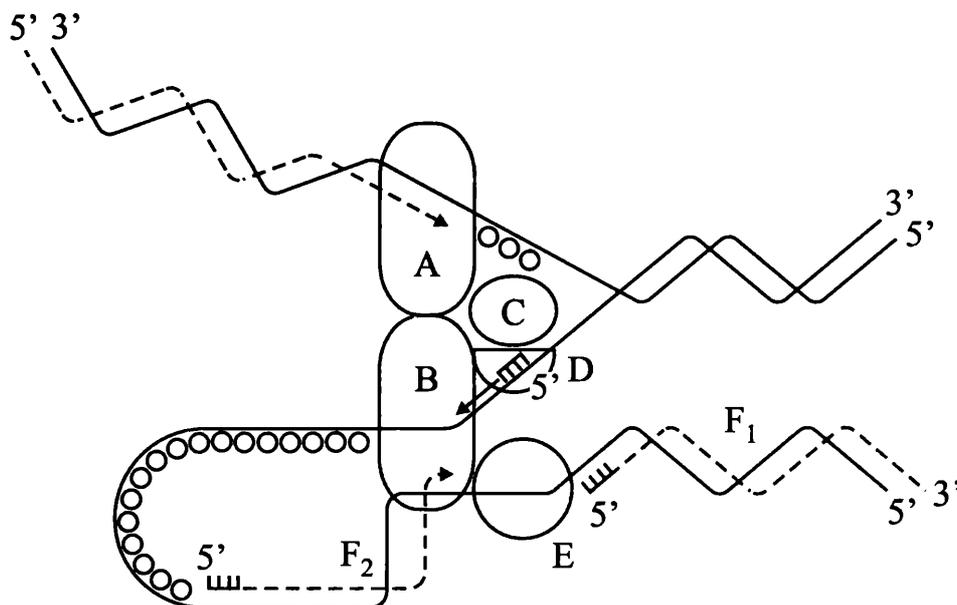


Рис. 180. Копирование хромосомной ДНК в репликационной вилке.

Сплошные линии — старые нити ДНК; пунктир — новые нити ДНК; гребенки — РНК-праймеры; черные кружки — белки, стабилизирующие одноцепочечную ДНК (SSB-белки).

А — ДНК-полимеразный комплекс (голофермент Pol III*) на ведущей цепи; В — ДНК-полимеразный комплекс (голофермент Pol III*) на ведомой цепи; С — ДНК-геликаза DnaB; D — праймаза DnaG; E — ДНК-лигаза; F₁ и F₂ — фрагменты Оказаки.

цепи. На одноцепочечных участках, стабилизированных SSB-белками, синтезируются новые цепи.

Как мы уже отмечали, ДНК-полимераза не может стартовать от одного нуклеотида, и поэтому на обеих старых цепях ДНК — ведущей и ведомой — предварительно синтезируются РНК-праймеры (рис. 180). Поскольку при репликации бактериальной хромосомы образуются две противоположно направленные и расходящиеся в разные стороны репликационные вилки, в каждой из них действует отдельная ДНК-полимераза Pol III (см. рис. 180).

Таким образом, реписома представляет собой тандем ДНК-полимераз Pol III в совокупности с двумя праймосомами, а также вспомогательными ферментами и неферментативными белками.

Еще раз напомним, что ведущая цепь ДНК наращивается непрерывно, а отстающая цепь образуется прерывистым способом из фрагментов Оказаки. После того, как заканчивается синтез очередного фрагмента Оказаки, ДНК-полимераза Pol I (см. ниже), обладающая уникальной 5' → 3' экзонуклеазной активностью, разрушает РНК-праймер, который был ковалентно связан с предыдущим фрагментом, и заполняет образовавшуюся брешь (рис. 180). Однонитевой разрыв устраняется ДНК-лигазой, или просто *лигазой* (англ. ligase; от лат. ligatio — перевязывание). ДНК-лигаза *E. coli* образует фосфодиэфирную связь в НАД-зависимой реакции; она состоит из одной субъединицы молекулярной массой 75 кДа и присутствует в количестве 200–400 копий на клетку.

ДНК-полимеразы *E. coli* (общие сведения). *E. coli* обладает пятью ДНК-полимеразами — Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV и Pol V (сокр. англ. polymerase; *римские*

цифры отражают хронологическую последовательность описания этих ферментов) (табл. 22).

В соответствии с условиями экспрессии и функционирования, различают два основных типа ДНК-полимераз:

— «нормальные», или репликативные полимеразы (Pol I и Pol III), которые синтезируются конститутивно; они участвуют в репликации и коррекции ошибок спаривания, а также в эксцизионной репарации;

— «SOS»-полимеразы (Pol II, Pol IV и Pol V), уровень экспрессии которых повышается при повреждении ДНК; они обходят участки, непреодолимые для репликативных полимераз.

Репликативные ДНК-полимеразы *E. coli* Pol I и Pol III. Эти полимеразы осуществляют нормальный полуконсервативный синтез ДНК. Кроме того, ДНК-полимераза III и, в меньшей степени, ДНК-полимераза I способны самостоятельно исправлять ошибки спаривания.

Репликация является высокоточным процессом, что не удивительно, поскольку в противном случае частота спонтанных мутаций, многие из которых летальны, оказалась бы непомерно большой. Эндогенные ошибки репликации происходят с низкой частотой (10^{-9}), что возможно только благодаря работе корректирующего аппарата, в отсутствии которого их количество оказалось бы намного выше.

Каноническое правило копирования ДНК ($G \equiv C$, $A = T$) соблюдается не абсолютно строго, поскольку все четыре типа дезоксирибонуклеотидов с частотой $\sim 10^{-5}$ спонтанно переходят в короткоживущие таутомерные формы (*), которые участвуют в неканоническом спаривании. Например, в случае цитозина вместо пары $G \equiv C$ образуется пара $A = C^*$.

Полимераза Pol III включает такой короткоживущий нуклеотид в состав новой цепи ДНК. Однако при возвращении цитозина в обычную таутомерную форму неканоническое спаривание нарушается, и у новой цепи появляется неспаренный 3'-конец.

Характерным свойством ДНК-полимеразы Pol III служит то, что она не умеет наращивать затравочную цепь на неспаренном 3'ОН-конце. Но зато ее θ -субъединица обладает вспомогательной 3' \rightarrow 5' экзонуклеазной активностью, что позволяет этому ферменту исправлять собственную ошибку — он отступает на шаг назад и удаляет неспаренный нуклеотид на затравочном 3'-конце. В результате этого на матрице появляется спаренный конец, и она вновь активизируется.

Наряду с системой исправления ошибок спаривания, по ходу репликации действует пострепликационная система репарации ошибок спаривания (подробнее см. раздел 16.5.1.3). С ее помощью удаляется участок новой цепи вместе с неспаренным нуклеотидом, что дает возможность избежать точечной мутации, т. е. сохранить без изменения локальную структуру генома. Перед тем, как репарировать ошибку спаривания, специальная система коррекции распознает еще не метилированную новую цепь (напомним, что старая цепь уже метилирована по остаткам аденина в повторяющейся последовательности GATC; см. выше). Мультиферментный комплекс сканирует ДНК на предмет присутствия в ней неметилированных последовательностей, после чего вырезается участок новой цепи, содержащий неспаренный нуклеотид. Образовавшаяся брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы, а одноцепочечный разрез устраняется с помощью ДНК-лигазы.

Репликативная ДНК-полимераза Pol I, состоящая из одной субъединицы, была открыта в 1958 г. Артуром Корнбергом (A. Kornberg; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1959 г.). Ее участие в нормальной репликации связано с заполнением односторонних брешей в ДНК, возникающих после удаления РНК-праймеров, ковалентно связанных с фрагментами Оказаки. Наряду с этим она обладает уникальным свойством — реплицировать ДНК в участках одноцепочечных разрывов, образующихся при эксцизионной репарации (см. раздел 16.5.1.2), причем это совершается без помощи других белков. О ведущей роли ДНК-полимеразы Pol I в репарационном синтезе ДНК свидетельствует ее более высокая копияность по сравнению с большинством других ДНК-полимераз.

Таблица 22. ДНК-полимеразы *E. coli*

Фермент	Ген(ы)	Мол. масса, кДа	Число молекул на клетку	Активность			Основная функция
				5' → 3' полимеразная («реплицирующая»)	3' → 5' экзонуклеазная («корректирующая»)	5' → 3' экзонуклеазная («репарирующая»)	
Pol I	<i>polA</i>	103	400	+	+	+	Заполнение брешей при репликации и репарации
Pol II	<i>polB</i>	90	40	+	+	+	?
Pol III (кор-комплекс)	<i>polC, dnaQ, holoE</i>	175 (субъединицы αεθ 140, 25 и 10 кДа)	10-20	+	+	+	Репликация; автокоррекция
Pol IV	<i>dinB</i>	75	2500 (после SOS-индукции)	+	-	-	?
Pol V	<i>umuDC</i>	240 (комплекс UmuD) ₂ UmuC 2×85+70 кДа)	15 (после SOS-индукции)	+	-	-	SOS-репликация, адаптивный мутагенез

Репликативная ДНК-полимераза Pol III, один из наиболее сложно устроенных ферментов, была открыта Корнбергом в 1969 г. В ее состав входят субъединицы десяти типов ($\alpha\beta\gamma\delta\delta'\epsilon\theta\chi\psi$) молекулярной массой 8–130 кДа. Субъединицы $\alpha\epsilon\theta$ образуют *кор-комплекс* (Pol III'). ДНК-полимеразную активность обеспечивает α -субъединица, тогда как ϵ - и θ -субъединицы контролируют точность репликации. Пара «димеризующих» τ -субъединиц играет роль мостика между двумя *кор-комплексами*. Пара β -субъединиц, или *зажим* (англ. clamp) используется для прикрепления димера *кор-комплексов* к матрице ДНК. Пять вспомогательных субъединиц $\gamma\delta\delta'\chi\psi$ (γ -комплекс) загружают димер *кор-комплексов* вместе с зажимом на матрицу ДНК. В итоге голофермент ДНК-полимеразы имеет субъединичный состав $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\delta'\epsilon_2\theta_2\tau_2\chi\psi$, и его молекулярная масса составляет около 900 кДа. ДНК-полимераза Pol III, работающая в репликационной вилке, представлена двумя идентичными голоферментами. Один из них наращивает ведущую цепь ДНК, а другой — отстающую цепь. Голофермент ДНК-полимеразы, который реплицирует ведущую цепь, постоянно загружен на ДНК и непрерывно удлиняет ее в направлении 5' → 3'. Напротив, голофермент ДНК-полимеразы, который реплицирует отстающую цепь, при синтезе каждого нового фрагмента Оказаки перезагружается на ДНК.

SOS-полимеразы *E. coli* Pol II, Pol IV и Pol V. Эти полимеразы обладают двумя основными особенностями.

Во-первых, уровень их экспрессии возрастает при адапционном SOS-ответе на повреждение ДНК (см. раздел 16.5.1.4).

Повреждение ДНК у *E. coli* вызывает дерепрессию SOS-регулона, гены которого участвуют в репликации, репарации и мутагенезе (см. раздел 18.1.2). Все они негативно контролируются белковым репрессором LexA. В свою очередь, репрессор LexA инактивируется под воздействием протеазы RecA, которая предварительно самоактивируется (RecA → RecA*).

Во-вторых, SOS-полимеразы Pol IV и Pol V (но не полимеразы Pol II, которая обладает корректирующей способностью) проходят мимо нерепарированных повреждений — сайтов с удаленными основаниями, пиримидиновых димеров, фотопродуктов типа пиримидин: 6–14 пиримидон и крупных молекулярных аддуктов, а также мимо ошибок спаривания.

Поэтому все три SOS-полимеразы называют «специализированными» (англ. specialized) репликазами, а SOS-полимеразы Pol IV и Pol V — «склонными к ошибкам» (англ. error-prone) или «синтезирующими поверх повреждения» (англ. translesion-synthesizing) репликазами. Последствием использования этих полимераз является накопление мутаций, некоторые из которых могут способствовать выживаемости, т. е. имеют адаптивный характер.

Поскольку повреждения ДНК, постоянно возникающие под воздействием эндогенных и экзогенных химических агентов, препятствуют работе «репликативных» полимераз Pol I и Pol III, использование «склонных к ошибкам» индуцибельных SOS-полимераз, в частности Pol V, позволяет реплицировать поврежденную ДНК. Однако ценой этого становится повышенная SOS-мутаторная активность.

Выбор той или иной SOS-полимеразы зависит от типа повреждения ДНК и характера конкретной нуклеотидной последовательности, в которой оно произошло, т. е. от локализации повреждения.

ДНК-полимераза Pol II, состоящая из одной субъединицы, была открыта Кэрнсом в 1969 г. Ее адаптивная экспрессия возрастает почти на порядок при активации системы SOS-ответа на облучение ультрафиолетовым светом (см. разделы 16.5.1.1,

16.5.1.4 и 18.1.2). Поскольку полимеразы Pol II обладает 3' → 5' экзонуклеазной активностью, она реплицирует ДНК с высокой надежностью (<10⁻⁶ ошибок). В отытах *in vitro* было показано, что после устранения повреждения ДНК-полимераза Pol II возобновляет репликацию, причем ее активность стимулируется белковыми субъединицами ДНК-полимеразы Pol III и SSB-белками. Однако роль ДНК-полимеразы Pol II *in vivo* до конца не выяснена, поскольку мутанты *polB*⁻ не обнаруживают фенотипических дефектов на уровне репликации и репарации. Есть данные, что она вмешивается в процесс исправления ошибок спаривания (см. раздел 16.5.1.3), что повышает частоту адаптивных мутаций.

ДНК-полимераза Pol IV, способность которой выступать в качестве истинной репликазы была доказана Вагнером (J. Wagner) в 1999 г., состоит из одной субъединицы — DinB. Для ее таргетинга в поврежденную область ДНК требуется участие βγ-субъединиц ДНК-полимеразы Pol III (зажима и его загрузчика; см. выше). ДНК-полимераза Pol IV не обладает 3' → 5' экзонуклеазной активностью, и поэтому совершает ошибки с высокой частотой (10⁻⁴–10⁻⁵). Роль ДНК-полимеразы Pol IV *in vivo* не ясна, поскольку мутанты *dinB*⁻ не обнаруживают фенотипических дефектов. Тем не менее, выяснилось, что при ее прохождении мимо поврежденного участка происходит сдвиг рамки считывания влево на один нуклеотид (-1), что является одной из причин адаптивного мутагенеза.

ДНК-полимераза Pol V, роль которой в качестве истинной репликазы была доказана Гудменом (M. F. Goodman) в 1999 г., играет ведущую роль в индуцированном мутагенезе при SOS-репарации *E. coli* (англ. SOS-induced error-prone repair; см. ниже). Этот фермент представляет собой комплекс (UmuD)₂UmuC, состоящий из продукта гена *umuD* (сокр. англ. ultraviolet mutagenesis), частично расщепленного в результате автопротеолиза, который индуцируется белком RecA* (см. разделы 16.5.1.4 и 16.6.1.2), и продукта гена *umuC*. Для таргетинга комплекса (UmuD)₂UmuC, как и в случае ДНК-полимеразы Pol IV, а также для прохождения им нерепарированных повреждений ДНК требуется участие βγ-субъединиц ДНК-полимеразы Pol III. Пройдя повреждение и осуществив репликацию ближайшего к нему участка, полимеразы Pol V уступает место полимеразе Pol III. Поскольку репликаза Pol V не обладает 3' → 5' экзонуклеазной активностью, частота ее ошибок *in vitro* составляет 10⁻³–10⁻⁴.

Репликация «поверх повреждения» по точности намного уступает нормальной репликации. Но такая стратегия все же лучше, чем оставлять одноцепочечный участок ДНК вообще не реплицированным. В этом есть даже определенный селективный смысл, поскольку при угрозе потери жизнеспособности бактерии начинают активнее мутировать, что повышает их генетическое разнообразие и, как следствие — их адаптационный потенциал.

Репликативные ДНК-полимеразы других бактерий. У некоторых грамположительных бактерий, например *B. subtilis*, репликативная ДНК-полимераза (функциональный эквивалент ДНК-полимеразы Pol III), обозначается как PolC. В отличие от ДНК-полимеразы Pol III *E. coli*, представленной двумя идентичными голоферментами, она состоит из двух разных голоферментов. Их α-субъединицы соответственно кодируются генами *dnaE* и *polC*.

Внутриклеточная локализация и расположение реплисомы относительно сестринских хромосом. Благодаря взаимодействию между праймосомой и ДНК-полимеразой, образующей новые цепи ДНК, репликационные вилки перемещаются в разные стороны от локуса *oriC*. Иными словами, реплисома и две копии

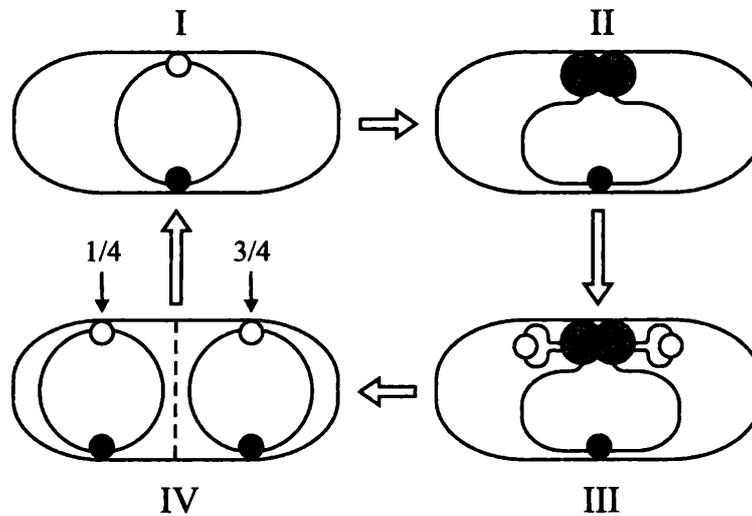


Рис. 181. Внутриклеточная ориентация хромосом *B. subtilis* в ходе репликации и взаимного расхождения.

I — пререпликативное состояние; II — сборка реплисомы; III — вытеснение ориджинов к противоположным полюсам; IV — завершение расхождения сестринских хромосом после копирования терминауса и цитокinesis.

Серые кружки — реплисомы; белые кружки — ориджины; черные кружки — терминаусы.

хромосомы изменяют свое взаимное расположение. Как же при этом они ориентируются по отношению к другим клеточным структурам?

Предложены альтернативные гипотезы. Согласно одной из них, локус *oriC* зафиксирован на СМ, а реплисома перемещается по хромосоме, как поезд по рельсам (модель «локомотив»). Согласно другой гипотезе, фиксированное положение занимает реплисома, и сестринские хромосомы выходят из нее, подобно ткани в швейной машинке (модель «фабрика»).

Как оказалось, верна вторая гипотеза. В конце 1990-х годов на *B. subtilis* были проведены опыты с использованием молекулярного гибрида между субъединицами ДНК-полимеразы и зеленым флуоресцирующим белком (GFP). Они наглядно показали, что ДНК-полимераза занимает стационарное положение на клеточном экваторе. Сестринские хромосомы вытесняются из реплисомы и расходятся к противоположным клеточным полюсам, локусами *oriC* вперед (рис. 181). При этом только что дуплицированные ориджины перемещаются к противоположным сторонам клетки, а терминаус вплоть до окончательного завершения репликации остается на экваторе.

В случае *E. coli* показано, что копии ориджинов переносятся к противоположным полюсам материнской клетки. После образования дочерних клеток они реориентируются и занимают экваториальное положение. В отличие от этого сестринские ориджины *B. subtilis* занимают положение на 1/4 и 3/4 длины продольной оси материнской клетки. Таким образом, после деления они оказываются на экваторах дочерних клеток, и реориентироваться им уже нет необходимости.

Сестринские терминаусы перед делением всегда находятся по бокам септы, т. е. они сразу после деления оказываются на новых полюсах дочерних клеток. Позже они реориентируются и занимают экваториальное положение.

Терминация репликации. Хромосомный локус *terC* (в случае *E. coli*) или IR (сокр. англ. inhibition of replication; в случае *B. subtilis*) имеет размер около 1,3 т. п. н. и расположен напротив ориджина. При двунаправленной репликации вилка, движущаяся по часовой стрелке, первой достигает локуса терминации. Спустя 5 мин с противоположной стороны туда приходит вторая репликационная вилка.

Блокирование репликационных вилок в локусе терминации осуществляется с помощью небольшого катионного белка, который называется «терминаторным». В случае *E. coli* данную роль выполняет белок Tus (сокр. англ. terminus utilization substance). Его аналогом у *B. subtilis* служит белок RTP (сокр. англ. replication terminator protein). Они специфически связываются с соответствующими терминаторными сайтами *terA-F* (в случае *E. coli*) и IR I-II (сокр. англ. inhibition of replication; в случае *B. subtilis*), которые находятся внутри локуса терминации и представляют собой инвертированные повторы длиной 20–30 п. н. Непосредственной мишенью для блока репликационной вилки служит геликаза.

Если присутствие ориджина в хромосоме строго обязательно, то терминаторный локус может делетироваться без угрозы потери жизнеспособности. Тем не менее, в норме он сохраняется, что предотвращает инициирование новых раундов репликации, иначе образовывались бы мультимерные хромосомы.

Репликация линейных хромосом. До сих пор мы говорили только о репликации кольцевых хромосом, которые типичны для бактерий, а также для архей из филы AII *Euryarchaeota*.

Репликация редко встречающихся у бактерий линейных хромосом имеет ряд особенностей.

Линейные хромосомы содержат *теломеры*, или концевые участки, отвечающие за структурную стабильность репликаона, а также за то, чтобы он копировался по всей своей длине.

Механизм репликации линейных хромосом усложняется тем, что ДНК-полимераза не может копировать ДНК со срезанного двухцепочного конца. Напомним, что для наращивания полинуклеотидной цепи в направлении 5' → 3' требуется РНК-праймер (см. выше). После удаления этого праймера на 3'-конце остался бы нереплицированный участок!

Теоретически, проблема репликации 3'-концов линейной хромосомы может быть решена следующими способами:

- концы образуют одноцепочечные шпильки;
- концы ковалентно связываются с теломерными белками;
- концы на время исчезают за счет перехода линейной хромосомы в кольцевую форму.

В первом случае локус *oriC* занимает центральное положение, разделяя хромосому на две репликоны примерно равной длины. Репликация осуществляется в обоих направлениях в соответствии с тета-механизмом (см. выше). Роль локусов *ter* выполняют шпильки-теломеры. После копирования хромосомы сцепленные кольца теломеров декатенируются с помощью резольвазы (см. ниже), и концы сестринских хромосом заделываются одноцепочечными шпильками.

Если реализуется второй механизм, то в нем участвуют уже не РНК-овые, а белковые праймеры (по аналогии с репликацией аденовируса или фага φ29). Теперь роль ориджинов выполняют правый и левый теломеры, а локус *ter* занимает центральное положение. Инициаторный белок Tap (сокр. англ. telomere-associated protein) распознает локусы *ori*, связывается с ними и начинает расплетать двойную спираль ДНК. После этого к свободным 3'-концам ковалентно присоединяется «терминальный» белок Trg (сокр. англ. terminal protein). Он выполняет роль праймера и вступает в комплекс с ДНК-полимеразой, образуя ковалентную связь между ним и первым дезоксирибонуклеозидтрифосфатом, который становится 5'-концевым нуклеотидом. От него дочерние цепи ДНК наращиваются в направлении 5' → 3'. По завершении репликации белок Trg удаляется.

Репликация хромосом симбиотических органелл. Хотя хромосомы симбиотических органелл ядерной клетки эволюционно происходят от бактериальных хромосом, для их репликации часто используются не бактериальные механизмы.

Например, митохондриальная ДНК (mtDNA) дрожжей реплицируется как хромосома, бактериальным тета-способом, а митохондриальная ДНК растений — как плаزمид, способом катящегося кольца (см. раздел 16.4.1.2).

Пластидная ДНК (pDNA) реплицируется с помощью двух механизмов. Первый раунд репликации осуществляется тета-способом, а последующие раунды — способом катящегося кольца.

Репликация археотных хромосом. Археотные хромосомы сочетают в себе признаки бактериальных и эукариотных хромосом (см. I том учебника). С одной стороны, они кольцевые; с другой стороны, они имеют нуклеосомную структуру и содержат истинные гистоны. Что касается аппарата репликации, то у архей он радикально отличается от бактериального и проявляет разительное сходство с эукариотным.

Ориджины репликации эукариотных репликонов называются *автономными репликационными последовательностями* (англ. autonomous replication sequence, ARS), или репликаторами. Лучшее всего они изучены на примере *Saccharomyces cerevisiae*. В гаплоидных клетках этих дрожжей 300–400 локусов ARS распределяются между 16 хромосомами.

В состав каждого локуса ARS входят консервативные последовательности двух типов — элементы А, или ACS (сокр. англ. ARS consensus sequence) и элементы В1–В3.

Роль инициатора выполняет *ориджин-распознающий комплекс* (англ. origin recognition complex, ORC). Он состоит из шести белковых субъединиц Orc1–6 (120–50 кДа), которые связываются с репликатором в локусах А и В1, расходуя на это энергию гидролиза АТФ. В состав пререпликативного комплекса дополнительно входят белки Cdc6 и Mcm2–7.

Эукариотный белковый комплекс ORC, так же, как и бактериальный инициаторный белок DnaA, активируется кислыми фосфолипидами.

Репликатор(ы) и инициаторы. Напомним, что у бактерий «транс-действующий» белок (инициатор) связывается с «цис-действующей» последовательностью ДНК, или ориджином репликации *oriC* (репликатором). Единственный на всю хромосому АТ-богатый локус *oriC* содержит мультিকопийные сайты для связывания инициатора DnaA (DnaA-боксы). Как правило, ген *dnaA* соседствует с ориджином, что обеспечивает их совместное регулирование.

У архей количество ориджинов на одну хромосому может варьировать. В частности, единственная кольцевая хромосома *Pyrococcus abyssi* содержит *oriC*-подобный ориджин репликации, инициатором которого служит белок Orc1/Cdc6.

Некоторые археоты, например метаноген *Methanococcus jannashii*, а также сера-зависимые термоацидофилы *Sulfolobus acidocaldarius* и *S. solfataricus* используют не один, а сразу три ориджина репликации *oriC1–3*. Имеющиеся в них сайты для связывания инициаторов Orc1/Cdc6–1, Orc1/Cdc6–2 и Orc1/Cdc6–3, или *боксы узнавания ориджина* (англ. origin recognition box, ORB) представляют собой консервативные инвертированные АТ-богатые последовательности. Хотя репликация в них инициируется синхронно, они неравномерно распределяются по длине хромосомы, что приводит к асинхронной терминации репликации.

Все секвенированные геномы архей, за исключением геномов метаногенов, содержат 1–17 генов, которые гомологичны одновременно гену *orc1* и гену *cdc6*. Продукты их экспрессии, белки Orc1/Cdc6, подобно ориджин-распознающему комплексу эукариотов ORC, принадлежат к суперсемейству AAA-АТФаз (см. раздел 16.6.1.3).

ДНК-геликаза. Напомним, что у бактерий репликативная ДНК-геликаза относится к суперсемейству AAA-АТФаз и функционирует в гомогексамерной форме. Соответствующую роль у эукариотов выполняет гетерогексамерная геликаза MCM2–7 (сокр. англ. minichromosome maintenance complex; *мутации по тст-генам*

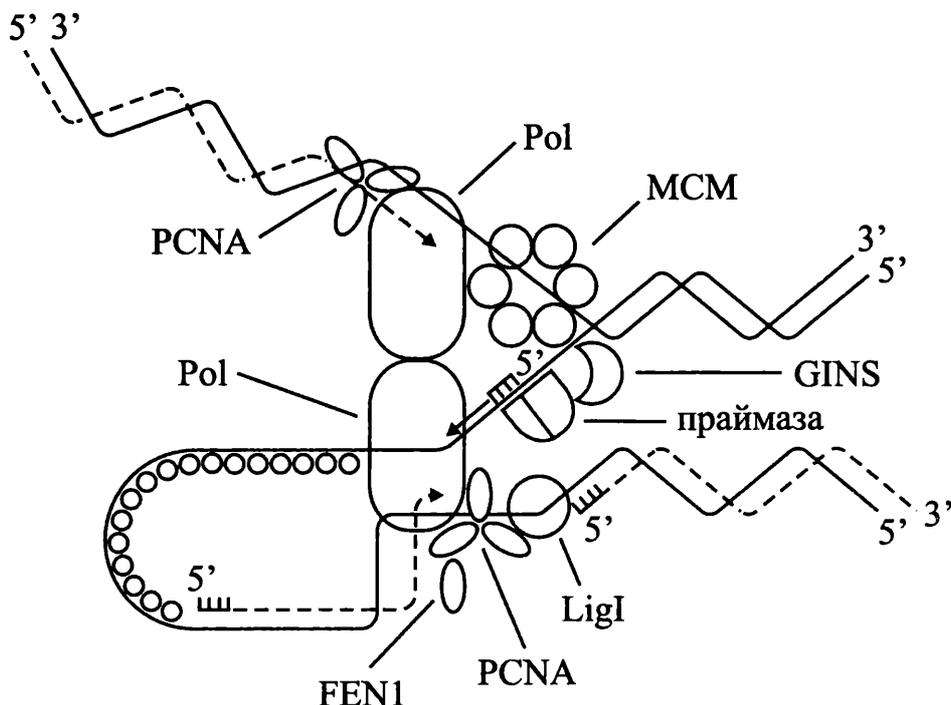


Рис. 182. Репликация у архей.
Объяснение в тексте.

лишают дрожжей способности сохранять плазмиды с ориджином репликации и центромером). Что касается архей, то у них во всех секвенированных геномах имеется минимум один гомолог гена *mcm*. Продукт его экспрессии в гомогексамерной форме играет роль ДНК-гиразы (рис. 182). Каким образом происходит ее загрузка на ДНК, точно неизвестно (у бактерий этому способствуют AAA-АТФазы DnaA и DnaC). Предполагается, что, по аналогии с эукариотами, эту роль выполняет гетеротетрамер GINS (сокр. японск. go — пять, ichi — один, ni — два и san — три; впервые выявлен у дрожжей как комплекс белков *SLD5*, *PSF1*, *PSF2* и *PSF3*). Помимо того, что GINS взаимодействует с ДНК-гиразой MCM, находящейся на ведущей цепи, он образует мост между ней и праймазой, находящейся на отстающей цепи (рис. 182).

SSB-белки. Белки, связывающиеся с одиночной цепью ДНК, у архей обладают более высокой степенью гомологии с эукариотными RPA-белками, чем с бактериальными. Они существуют в виде множественных форм (RPA14, RPA32 и RPA41 в случае *Pyrococcus furiosus*; RPA12, RPA2 и RPA в случае *Methanosacrina acetivorans* и т. д.) и образуют гомо- или гетероолигомеры. Они имеют молекулярную массу ~16 кДа и составляют 2-5% суммарного растворимого белка.

Праймаза. В отличие от мономерной бактериальной праймазы DnaG, у эукариотов праймаза состоит из малой каталитической (PriS) и большой некаталитической (PriL) субъединиц. Они образуют комплекс с субъединицами Pol α и β , входящими в состав ДНК-полимеразы. Археотная праймаза, как и у эукариотов, состоит из большой и малой субъединиц (рис. 182).

ДНК-полимеразы. Подобно бактериям и эукариотам, археи обладают несколькими ДНК-полимеразами, причем их набор варьирует в зависимости от филы. У

представителей филы АII *Euryarchaeota*, наряду с универсально распространенной В-полимеразой, которая синтезирует ведущую цепь, имеется уникальная D-полимераза, которая синтезирует отстающую цепь и состоит из субъединиц DP1 и DP2. В отличие от этого, представители филы AI *Crenarchaeota* лишены D-полимеразы, но обладают разными В-полимеразами, которые синтезируют отдельные цепи ДНК.

Как уже указывалось, у разных представителей архей скорость продвижения репликационной вилки значительно варьирует. Например, в случае *Sulfolobus* spp. она такая же, как у эукариотов (~ 100 н.·с⁻¹) — на порядок медленнее, чем у *E. coli* (см. выше). В то же время у *Pyrobaculum abyssi* она составляет (~ 300 н.·с⁻¹), что соответствует промежуточному значению между темпом репликации ДНК эукариотов и бактерий.

Зажим. В случае бактериальной ДНК-полимеразы скользящий зажим из двух β -субъединиц способствует процессивности ДНК-полимеразы, не позволяя ей диссоциировать от матрицы. У эукариотов и архей эту роль выполняет гомотример PCNA (сокр. англ. proliferating cell nuclear antigen) (рис. 182). Для его загрузки на ДНК используется пентамерный белковый фактор RFC (сокр. англ. replication factor C). После своей загрузки PCNA связывается с ДНК-полимеразой и вовлекает в состав реплисомы другие белки, в частности эндонуклеазу FEN1, которая разрушает РНК-праймеры фрагментов Оказаки (сокр. англ. flap endonuclease; «избивающая» эндонуклеаза), а также ДНК-лигазу I.

К сказанному следует добавить, что гистоны архей, как и гистоны эукариотов, подвергаются посттрансляционной модификации путем ацетилирования, что влияет на тесноту их ассоциации с ДНК и, в свою очередь, на характер экспрессии генов.

Таким образом, аппарат репликации у архей гомологичен эукариотному, хотя он устроен проще последнего. В эволюционном плане он может представлять собой более архаичный, предковый по отношению к эукариотному, вариант.

16.4.1.2. Репликация плазмид

Чтобы сохраниться в популяции хозяина, плазмиды должны согласовывать скорость своей репликации со скоростью его размножения. Хотя некоторые плазмиды могут спонтанно пропадать из дочерних клеток, большинство из них стабильно наследуется.

Если скорость репликации плазмид окажется слишком медленной, появятся дочерние клетки, в которых их уже не будет. А поскольку воспроизводство плазмид обременительно для хозяйского метаболизма, в популяции начнут преобладать бесплазмидные особи. По этой же причине метаболической экономии для клетки обременительно избыточное накопление плазмид с опережающим темпом репликации. В итоге используется специальный механизм, который поддерживает содержание плазмид на низком и постоянном уровне. Благодаря контролю собственной репликации (в данном хозяине и при данных условиях роста) плазмиды синтезируются в определенном количестве копий.

Плазмиды бывают одно- и мультикопийными (по числу копий, приходящихся на клетку или хромосому). Факторы переноса и крупные коинтегративные плазмиды представлены 1–4 копиями; мелкие неконъюгативные плазмиды 10–30 копиями. При ослабленном контроле репликации плазмид после прекращения роста клетки они могут накапливаться в числе до 10^3 копий.

В плазмидном репликоне имеется локус *inc* размером 100-300 т.п.н. Он регулирует копийность таким образом, что скорость инициации репликации плазмид (в расчете на одну копию) обратно пропорциональна их количеству. Это типичный пример авторегуляции, или негативного ингибирования по типу обратной связи. Остальная часть репликона фактически обеспечивает только воспроизводство локуса *inc*.

Таким образом, за счет контроля собственной репликации плазмиды сохраняются в популяции их хозяина.

При работе с бактериями иногда нужны клоны, свободные от плазмид. Поэтому для искусственного «излечения» от плазмид (англ. plasmid curing) применяют разные приемы, хотя встречаются «неизлечимые» плазмиды (англ. refractory plasmid). К числу «лечащих» агентов относятся красители, которые встраиваются в борозды ДНК (акридиновый оранжевый, акрифлавин, бромистый этидий, хинакрин), ингибиторы ДНК-гиразы (кумермицин, новоблоцин), ингибиторы РНК-полимеразы (рифампицин), мутагены (митомицин С) и детергенты (например, додецилсульфат). Кроме того, излечиванию способствуют повышенная температура или голодание по тимиону.

Плазмиды для собственной репликации используют полимеразы хозяина и другие компоненты его репликационного комплекса. Иными словами, плазмидная реплисома имеет хозяйское происхождение.

Инициация репликации и собственно репликация кольцевых плазмид могут осуществляться с помощью одного из двух механизмов. В соответствии с условно-графической формой образующихся интермедиатов их обычно обозначают как *тета-механизм* (θ) и *сигма-механизм* (σ).

Тета-механизм. Он более распространен у плазмид грамтрицательных бактерий и сходен с одноименным механизмом репликации кольцевых хромосом, поскольку двойная спираль ДНК расплетается в локусе *ori*, в результате чего образуется репликационный «глазок».

Однако, в отличие от двунаправленной репликации кольцевой хромосомы, репликация кольцевой плазмиды идет только в одном направлении, т. е. образуется только одна репликационная вилка. Кроме того, в тета-механизме участвует особый инициаторный белок, ген которого расположен в плазмиде по соседству с ориджином репликации. Наконец, плазмидные репликаторы структурно отличаются от локуса *oriC* (см. ниже).

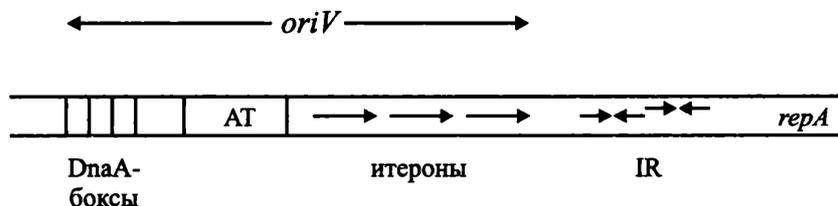
Но, как уже отмечалось, при репликации плазмид используются хозяйские факторы репликации (ДНК-связывающие белки DnaA, HU и IHF, а также ДНК-геликаза DnaB, ДНК-праймаза DnaG, ДНК-гираза и ДНК-полимераза Pol III). В репликационной вилке они образуют плазмидную реплисому — мультиферментную оргanelлу, расположенную на экваторе клетки.

Плазмидный ориджин репликации *oriV*. Плазмиды, которые реплицируются с помощью тета-механизма, содержат итероны (см. ниже), или специфические некодирующие последовательности, которые взаимодействуют с инициаторным Rep-белком. Благодаря этому репликация плазмиды контролируется независимо от репликации хозяйской хромосомы.

При вегетативной репликации, когда плазмиды передаются дочерним клеткам, используется ориджин *oriV* (сокр. англ. vegetative). В конъюгативной репликации участвует альтернативный ориджин *oriT* (сокр. англ. transfer).

Роль инициатора репликации, изменяющего конформацию ДНК, что сопровождается расплывлением двойной спирали, выполняют Rep-белки. Ген *rep* расположен рядом с локусом *oriV*. Мишенью для белка Rep служат несколько *итеронов* (англ. iteron; от лат. iteratio — повторение и греч. ontos — существительное; «нечто повторяющееся»), или прямых повторов размером около 20 п.н. Итероны по суммарной протяженности занимают примерно половину локуса *oriV*. Нуклеотидные последо-

вательности итеронов в конкретной плазмиде высококонсервативны, но не идентичны. Подобно хромосомному ориджину *oriC*, в плазмидный ориджин *oriV* входят обогащенные АТ-парами прямые повторы, а также один или несколько DnaA-боксов размером 9 т. п. н. (рис. 183).



у Рис. 183. Плазмидный локус *oriV* и прилегающий к нему участок репликона.

АТ — АТ-богатые прямые повторы; IR — инвертированные повторы; *repA* — ген инициаторного белка RepA.

В ряде случаев локус *oriV* фланкирован короткими инвертированными повторами IR, которые служат операторами для генов инициаторных белков, прежде всего для гена *repA*.

Инициаторные Rep-белки. Из всех представителей данного семейства наиболее охарактеризован белок RepA (26,5 кДа), служащий инициатором репликации плазмиды pPS10 фитопатогенной бактерии *Pseudomonas savastanoi*, а также белок RepE, инициатор репликации F-плазмиды *E. coli*.

Белок RepA существует в двух формах: мономерной и димерной. Взаимный переход между ними осуществляется при помощи молекулярных шаперонов DnaJ/DnaK/GrpE, ClpA и ClpX. Мономеры белка RepA специфически связываются с итеронами и участвуют в инициации репликации совместно с хозяйскими факторами DnaA, HU и IHF (см. выше). Димеры, в свою очередь, связываются с инвертированными повторами IR.

Белок RepA связывается с итеронами, а также с IR-последовательностями в пределах одной плазмиды (*cis*-взаимодействие). Помимо этого он участвует в образовании перекрестных комплексов между итеронами и IR-последовательностями, входящими в состав разных плазмид (*trans*-взаимодействие). Такую перекрестную связь образно называют «надеванием наручников» (англ. handcuffing). За счет нее предотвращается избыточная репликация плазмид.

Напомним, что хромосомный инициатор репликации, белок DnaA, специфически связывается с DnaA-боксами и за счет энергии АТФ изменяет конформацию ДНК, что приводит к ее расплавлению в локусе *oriC*.

В случае плазмид, содержащих итероны, белок DnaA играет роль коинициатора. Однако, вместо него плавление ДНК в области ориджина вызывает не-АТФазный белок RepA, который связывается с итеронами. Тем не менее, как и при репликации хромосомы, белок DnaA привлекает к участию в репликации геликазу DnaB (для дальнейшего расплетения ДНК), а также праймазу DnaG (для синтеза новой цепи ДНК на одноцепочечной матрице). Наряду с ним в этом процессе участвует белок RepA.

Сигма-механизм. Этот механизм репликации плазмид, известный еще под названием «катящееся кольцо» (англ. rolling-circle, RC), был впервые описан в середине 1980-х гг. на примере плазмиды pT181 *Staphylococcus aureus*. Первоначально плазмиды с данным механизмом репликации считались крайне редкими, хотя уже тогда было известно, что подобным же образом реплицируются фаги с одноцепочечной ss-ДНК (сокр. англ. single strand), например колифаг ϕ 174. В настоящее время показано, что сигма-механизм широко распространен у плазмид грамположительных бактерий (примером служат *B. subtilis* и *S. aureus*).

Напомним, что главная особенность тета-механизма состоит в том, что хромосомный или плазмидный локус *ori* распознается и расплетается специфическими белками. На обеих нитях синтезируются РНК-праймеры, и ДНК продолжает расплетаться перед репликационной вилкой.

В отличие от тета-механизма, главная особенность сигма-механизма состоит в том, что синтез ведущей цепи начинается в точке разрыва одной из комплементарных цепей ДНК. Репликационная вилка имеет специфическую структуру, а отстающая цепь не образуется до тех пор, пока не закончена сборка ведущей цепи. Наконец, инициаторный Rep-белок и репликаторный локус здесь иные, чем при тета-механизме. В то же время, подобно тета-механизму, сигма-механизм использует хозяйские факторы репликации — геликазу, РНК-полимеразу, ДНК-полимеразу и гиразу. Как и в других случаях прокариотной репликации, эти ферменты образуют плазмидную реплисому.

Основные шаги сигма-механизма изображены на рис. 184.

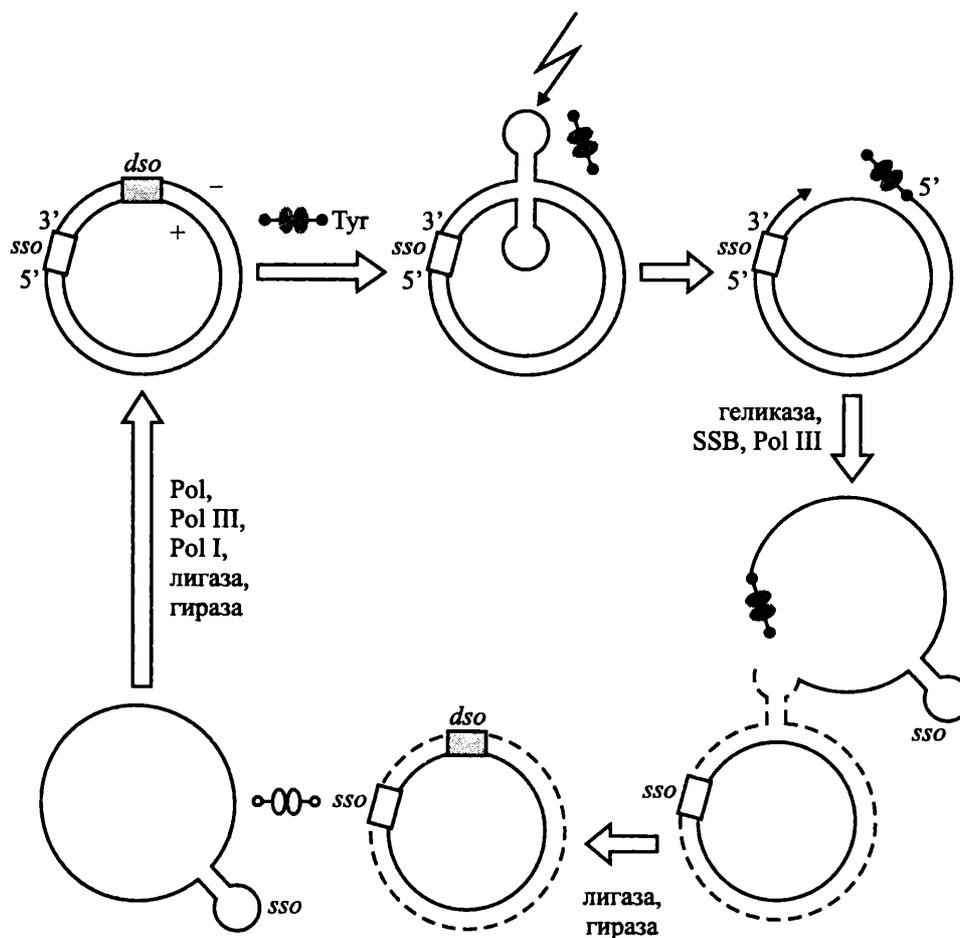


Рис. 184. Сигма-механизм репликации плазмидной хромосомы («катящееся кольцо»).

Сплошные линии — старые нити ДНК; пунктиры — новые нити ДНК; черные двоянные овалы — активный димер белка Rep; белые двоянные овалы — неактивный димер белка Rep.

Tyr — остаток тирозина, при помощи которого белок Rep ковалентно присоединяется к свободному 5'-концу антисмысловой (минус) нити ДНК; sso — «однопочечный» ориджин; dso — «двухпочечный» ориджин; зигзагообразная стрелка — место нанесения однопочечного разреза в ДНК; SSB — белки, стабилизирующие однопочечную ДНК; Pol I и Pol III — ДНК-полимеразы; Pol — РНК-полимераза (праймаза).

Инициаторный Rep-белок связывается с «двухцепочечным» ориджином *dso* (сокр. англ. double-strand origin). Помимо сайта длиной 30 нуклеотидов для связывания Rep-белка, локус *dso* содержит сайт для одноцепочечного разреза ДНК. Иногда (например, в плаزمидах pT181 и pC194) эти сайты примыкают друг к другу. В других случаях (например, в плазмидах pE194 и pLS1) их разделяет последовательность длиной 85 нуклеотидов.

В результате связывания с Rep-белком ДНК в локусе *dso* изгибается и образует двойную шпильку, что обнажает сайт для одноцепочечного разреза. Rep-белок наносит разрез в антисмысловую («минус») цепи ДНК и ковалентно прикрепляется к образовавшемуся 5'-концу при помощи остатка Тут, расположенного в его активном центре. Одновременно с разрезанием ДНК он привлекает в локус *dso* геликазу, SSB-белки (см. выше) и ДНК-полимеразу Pol III.

ДНК в точке разрыва начинает наращиваться на 3'-конце с помощью ДНК-полимеразы до тех пор, пока старая ведущая цепь полностью не вытеснится новой. Тогда Rep-белок отрезает вытесненную одноцепочечную ДНК в месте соединения старой и новой ведущих цепей (что соответствует скопированному участку разрыва). Кольцевая структура одно- и двухцепочечной ДНК восстанавливается с помощью лигазы. Одноцепочечная ДНК временно остается в релаксированной форме, а двухцепочечная ДНК суперспирализуется при помощи гиразы. Белок Rep освобождается и переходит в неактивную форму.

Одноцепочечная ДНК превращается в двухцепочечную ДНК за счет использования консервативного «одноцепочечного» ориджина *sso* (сокр. англ. single-strand origin). Число *sso* в плазмиде составляет от одного до трех.

РНК-полимераза Pol узнает в локусе *sso* свой промоторный участок и синтезирует РНК-овый праймер длиной в 17–18 нуклеотидов, а ДНК-полимераза Pol III его удлиняет. Завершает репликацию ДНК-полимераза Pol I, зарацивающая одноцепочечный участок на месте, освободившемся после удаления праймера. После этого ДНК-лигаза замыкает концы новой цепи, и двухспиральная ДНК суперспирализуется с помощью гиразы.

Если белок Rep не отрезает вытесненную одноцепочечную ДНК в месте соединения старой и новой ведущей цепи, число последовательно соединенных копий материнской плазмиды может быть сколь угодно большим.

Тем не менее, в отличие от репликации фагов, при репликации плазмид продвижение репликационной вилки обычно блокируется. Такой регуляторный эффект можно объяснить взаимодействием между белком Rep и новым локусом *dso*, а также транскрипционным контролем за содержанием этого инициатора.

16.4.2. Взаимная изоляция сестринских репликонов

Репликоны ведут себя, как пространственно динамичные структуры.

Прежде всего, в ходе репликации бактериальные хромосомы подвергаются сложным топологическим превращениям. По мере того, как отрицательно суперспирализованный материнский дуплекс ДНК расплетается в «глазке», перед репликационной вилкой в качестве компенсации вводятся положительные супервитки. Подобные временно возникающие структурные аномалии устраняются при помощи топоизомераз, в частности топоизомеразы IIВ (ДНК-гиразы; см. ниже).

Другим проявлением пространственной динамичности бактериальных хромосом служит их взаимная изоляция. Она начинается с взаимной изоляции сцепленных колец сестринских хромосом, или декатенации. Следующий этап — это расхождение свободных сестринских хромосом к противоположным клеточным полюсам, что обычно предшествует клеточному делению.

Плазмидные репликоны тоже пространственно динамичны. Подобно хромосомам, они расходятся при делении. Кроме того, при конъюгативном переносе они векторно перемещаются между гетерологичными клетками-партнерами.

Сегрегация сестринских хромосом строго контролируется и выполняется с вы-

сокой надежностью, поскольку после окончательного смыкания септы вносить исправления будет уже поздно. Если при сегрегации хромосом совершена ошибка (а это случается со средней частотой $1 \cdot 10^{-5}$), одна из дочерних клеток получает укороченную хромосому или оказывается вообще «безъядерной», т. е. без хромосомы.

Сегрегация низкокопийных плазмид находится под менее строгим контролем, а сегрегация многокопийных плазмид вообще происходит случайным образом.

Декатенация кольцевых сестринских хромосом. Поскольку хромосомная ДНК имеет кольцевую структуру, после завершения репликации сестринские ДНК-дуплексы представляют собой два взаимно переплетенных кольца, или *катенана* (лат. *catena* — цепь). Перед тем, как они разойдутся по дочерним клеткам, их необходимо расцепить, или декатенировать.

Декатенация осуществляется путем нанесения двухцепочечного разреза в одном из двух сцепленных колец ДНК, разведения образовавшейся линейной молекулы с неразрезанным кольцом и восстановления ее кольцевой формы.

В случае *E. coli* все эти действия выполняет резольваза. Этот фермент относится к классу *топоизомераз* (англ. *topoisomerase*; от греч. *topos* — место; «фермент, меняющий места»).

Топоизомеразы вызывают такие молекулярные перестройки ДНК, которые изменяют взаимное расположение ее цепей или взаимное расположение отдельных участков двойной спирали.

По механизму действия топоизомеразы подразделяются на две группы.

В первую группу входят взаимнородственные топоизомеразы типа-IA и типа-II. Они делают в молекуле ДНК временные одноцепочечные или двухцепочечные разрезы. Топоизомеразы типа-IA производят одноцепочечный разрез, через который пропускается либо одноцепочечный участок ДНК, либо ДНК-дуплекс. Топоизомеразы типа-II делают двухцепочечный разрез, через который пропускается ДНК-дуплекс. Топоизомеразы обоих типов влияют на суперспирализацию ДНК, а топоизомеразы типа-II также могут обеспечить декатенацию.

Во вторую, структурно обособленную группу, входят топоизомеразы типа-III, или *ДНК-гиразы* (англ. *gyrase*; от лат. *gyro* — крутить). Они производят в молекуле ДНК временные одноцепочечные разрезы, а затем вращают одну цепь ДНК-дуплекса относительно другой. Они влияют на суперспирализацию ДНК, но в декатенации не участвуют.

Топоизомеразы, осуществляющие взаимный обмен цепями между двумя молекулами ДНК, называются *рекомбиназами* (англ. *recombinase*). Они, в свою очередь, подразделяются на обратимо действующие *интегразы* (англ. *integrase*) и *резольвазы* (от англ. *resolve* — распадаться на части), которые необратимо разъединяют две молекулы ДНК.

Резольваза (топоизомераза Торо IV) относится к топоизомеразам типа-II. Она представляет собой гетеродимер субъединиц *ParE* и *ParC*. Субъединица *ParE* содержит АТФазный домен, а субъединица *ParC* — домен для связывания ДНК, а также домен для разрыва и последующего лигирования ДНК.

Поскольку субъединица *ParC* взаимодействует с С-концевым участком белка деления *FtsK* (в случае *E. coli*) или его гомолога *SpoIIIE* (в случае *B. subtilis*), топоизомераза Торо IV локализуется в области кольца деления (см. раздел 17.4.2).

Устранение димеризации хромосом. В некоторых случаях в ходе репликации между сестринскими хромосомами происходит гомологическая рекомбинация. При нечетном числе рекомбинативных актов образуется кольцевой хромосомный димер, содержащий два локуса *ori* и два локуса *ter*. Образование димеров, по сути, является повреждением и несовместимо с расхождением хромосом. Их обязательно нужно разделить на мономеры, т. е. репарировать.

Для этого в локусе *ter* имеется сайт *dif* размером 28 п.н., фланкированный повторяющимися G-богатыми *Tag*-элементами (см. раздел 16.3.2.1). Перед разделе-

нием на мономеры *dif*-сайты спариваются, и в этом месте при помощи *рекомбиназы* XerCD (в случае *E. coli*) происходит сайтспецифичная рекомбинация по типу кроссинговера. Хромосома *B. subtilis* содержит гомолог сайта *dif* кишечной палочки, а также гены *codV* и *ripX*, гомологичные генам рекомбиназы XerCD.

При устранении димеризации хромосомы могут образовывать нежелательные катенаны. В этом случае для декатенации используется топоизомераза Торо IV (см. выше).

16.4.2.1. Расхождение сестринских хромосом

Сегрегация хромосом у бактерий осуществляется иначе, чем у эукариотов. Напомним, что у эукариотов конденсированные гомологичные хромосомы выстраиваются напротив друг друга в метафазной пластинке, а затем растаскиваются за центромеры по митотическому веретену к полярно расположенным центриолям (см. раздел 16.1).

Существует ли у бактерий функциональный аналог митотического аппарата? Иными словами, используют ли они для сегрегации сестринских хромосом:

- центромеры и теломеры;
- молекулярный мотор типа кинезинового;
- направляющие структуры, сходные с митотическим веретенном;
- индикаторы окончательного расположения хромосом, на манер центриолей.

При ответах на поставленные вопросы следует учитывать два крайне важных обстоятельства. Во-первых, бактериальные хромосомы сегрегируются одновременно с их репликацией и конденсацией, т. е. прокариотный митотический аппарат (если таковой существует) должен принципиально отличаться от эукариотного. Во-вторых, бактерии могут обходиться и без митотического аппарата, поскольку при расхождении сестринских хромосом им нужно преодолеть очень короткое расстояние.

В настоящее время у ряда бактерий выявлен аналог эукариотного центромера. В частности, в хромосомах *B. subtilis* и *C. crescentus* он расположен по соседству с локусом *ori*. В то же время на хромосоме *E. coli* аналог центромера отсутствует или имеет другое строение и иную локализацию.

Установлено, что в случае *E. coli* ориджин репликации не является тем сайтом, который первым перемещается к полюсу. В данном случае направление движения задает последовательность *migS* (25 п.н.), расположенная по соседству с локусом *oriC*.

Независимо от присутствия или отсутствия центромера пререпликативный ориджин, как правило, находится на экваторе, и дублированные ориджины направляются к клеточным полюсам (рис. 181). Отсюда следует вывод, что у бактерий имеется некий механизм для закрепления и ориентированного перемещения сестринских хромосом.

По современным данным, разные бактерии по-своему решают эту проблему. Одни виды обладают аналогами кинезинового мотора и митотического веретена, тогда как у других они отсутствуют.

На роль бактериальных аналогов эукариотного митотического аппарата предлагаются несколько систем — ParAB, MinCDE/SeqA, MreB/Mbl, FtsK/SpoIIIE и RacA/DivIVA/Spo0J.

Система ParAB. Гены, кодирующие компоненты этой системы взаимной изоляции репликонов, были первоначально обнаружены в низкокопийных плаزمидях, в частности F и P1 (см. ниже). Позднее оказалось, что гомологи плазмидных *par*-генов имеются в хромосомном геноме многих бактерий, например гены *parABC* (в случае *C. crescentus*) и гены *soj/spo0J/parS* (в случае *B. subtilis*). В то же время у энтеробактерий, в том числе *E. coli*, гомологи *par*-генов отсутствуют.

Показано, что белок ParA, кодируемый плазмидой, образует спиральные филаменты по продольной оси клетки. В свою очередь, его хромосомный гомолог, белок Soj *B. subtilis*, участвует в транспортировке сестринских хромосом к противоположным клеточным полюсам при вегетативном размножении, а также при образовании эндоспоры (см. ниже).

Показано также, что белок ParB, кодируемый плазмидой, связывается с плазмидным аналогом центромера — нуклеотидной последовательностью, которая содержит итероны (см. раздел 16.4.1.2). В свою очередь, его хромосомный гомолог, белок Spo0J *B. subtilis* связывается с хромосомными сайтами *parS*.

Считается, что система ParAB не играет решающей роли при расхождении хромосом. Она не является полной альтернативой митотического аппарата, а лишь assisteрует в этом процессе. И, действительно, отсутствие системы ParAB не препятствует нормальному размножению бактерий, за исключением *C. crescentus*, где она совершенно необходима.

Система MinCDE/SeqA. Участие этих белков в расхождении хромосом допускается для *E. coli*, у которой, как уже отмечалось, отсутствует система ParAB. Показано, что белок MinD, компонент регуляторной системы клеточного деления MinCDE (см. раздел 17.4.1), образует спиральные микрофиламенты, которые служат треками-направляющими для сестринских ориджинов. Другим прегендентом на роль треков являются агрегаты белка SeqA, который связывается с полуметилированной ДНК в сайтах GATC, не допуская преждевременной реинициации репликации под воздействием белка DnaA (см. раздел 16.4.1.1).

Система MreB/Mbl. Актиноподобный белок MreB обладает моторной АТФазной активностью и образует спиральные филаменты, от присутствия которых зависит «несферическая» форма клетки (см. I том учебника и раздел 17.3.1 настоящего тома). Показано, что филаменты белка MreB (в случае *E. coli*) или его функциональных эквивалентов MreB/Mbl (в случае *B. subtilis*) колокализуются с интегральным мембранным белком SetB, а он тоже способен объединяться в протяженные спиральные агрегаты. Мембранная спираль белка SetB заякоривает цитоплазматическую спираль белка MreB, по которой сестринские хромосомы перемещаются к клеточным полюсам.

Система FtsK/SpoIIIE. Моторная АТФаза FtsK жизненно необходима для вегетативных клеток *E. coli*, поскольку этот белок эвакуирует терминальные участки сестринских хромосом из области, где замыкается септа. Это предотвращает их «гильтотинирование».

Аналогичную задачу для *B. subtilis*, но уже при дифференциации эндоспоры, решает белок SpoIIIE (см. ниже).

Система RacA/DivIVA/Spo0J. Она используется в спорообразовании (см. раздел 17.5.2.2). В данном случае поведение сестринских хромосом в корне отличается от их поведения при вегетативном росте.

На раннем этапе спорообразования *B. subtilis* (рис. 185) сестринские хроматиновые структуры, вместо того чтобы компактно занять позиции на 1/4 и 3/4 длины продольной оси клетки, изменя-

ют свою конформацию и протягиваются от одного полюса до другого, образуя общую *аксиальную нить* (англ. axial filament). При этом каждая хромосома занимает свою половину клетки. Участок хромосомы (~30%), ближайший к локусу *oriC*, образует полярный домен, закоренный на клеточном полюсе.

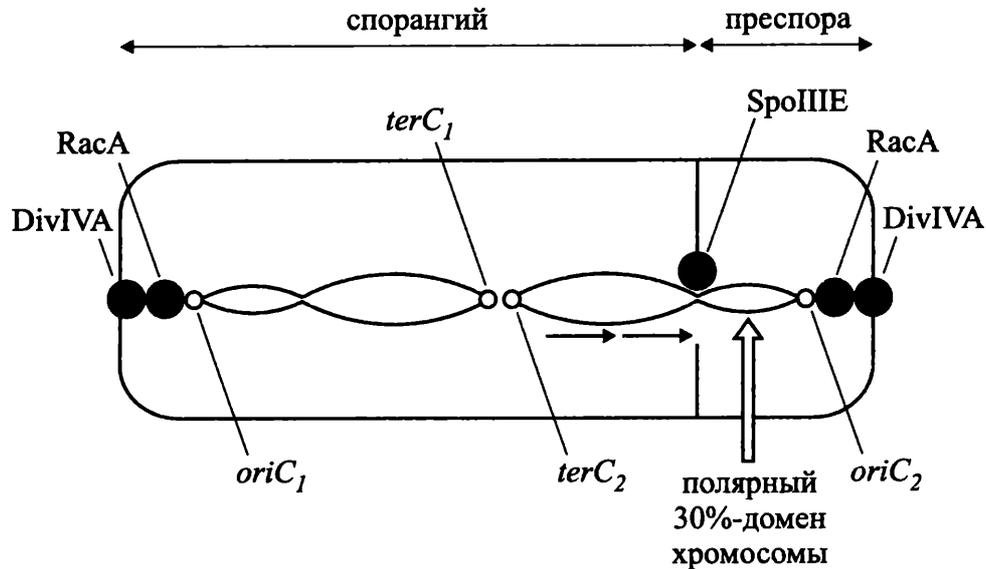


Рис. 185. Поведение сестринских хромосом *B. subtilis* при спорообразовании.

Главная роль в образовании полярного домена принадлежит ДНК-связывающему белку Spo0J (сокр. англ. sporulation; нулевая стадия; продукт гена *j*), который является гомологом белка ParB. Он присоединяется к 8 из 10 хромосомных сайтов *parS* на отрезке хромосомы протяженностью 800 т.п.н. и собирает их в компактную группу. В образовании полярного домена дополнительно участвует ДНК-связывающий белок Soj (сокр. англ. sporulation; нулевая стадия; продукт α -аллели гена *j*), гомолог белка ParA. Эта роль для него не главная; прежде всего, он является репрессором транскрипции и негативно регулирует процесс спорообразования.

Продолговатую форму нуклеида, который состоит из двух сестринских хромосом, придает белок RacA (сокр. англ. remodelling and anchoring of the chromosome). Кроме того, на основе белка RacA формируется бактериальный аналог эукариотного кинетохора, который взаимодействует с аналогом центромера, расположенным по соседству с локусом *oriC*. Одновременно с этим белок RacA связывается с белком DivIVA (сокр. англ. division — деление), который выступает в роли аналога центриолей, скапливается на клеточных полюсах и закореняет там ориджины.

При спорообразовании симметрично закладываются два Z-кольца: одно — на 1/4, другое — на 3/4 длины продольной оси клетки. Этот процесс контролируется системой MinCDE, которая определяет выбор сайта деления при вегетативном росте (см. раздел 17.4.1). Затем из двух первоначально заложенных Z-колец (произвольно, но под контролем белка SpoIIAA) выбирается одно. Это кольцо продолжает формироваться, а другое разбирается. В итоге септа образуется в субполярной области, изолируя два неравноценных по объему компартмента — клетку более крупного размера и меньшую клетку, преспору (рис. 185).

Одна из хромосомных копий транспортируется в преспору «ориджином вперед» через отверстие в септе. Но поскольку септа расположена асимметрично, преспора захватывает только полярный домен, ближайший к локусу *oriC*. Остальные 70% хромосомы позже переносятся из материнской клетки при помощи *транслоказы* SpoIIIIE, расположенной на переднем краю еще не замкнутой септы.

Таким образом, до полного переноса в преспору хромосома асимметрично компартиментализована. Гены, удаленные от ориджина (в том числе, ингибитор развития преспоры SpoIIAB), находятся вне преспоры, но зато в материнской клетке они присутствуют сразу в двух копиях.

Расхождение бактериальных хромосом в отсутствии аналогов митотического аппарата. Данная модель, получившая образное название «выталкивание-захват» (англ. extrusion-capture), была предложена в 2001 г. Лимоном (K. P. Lemon) и Гроссменом (A. D. Grossman). В соответствии с ней, противоположно направленная миграция сестринских хромосом и фиксация ориджинов в полярных областях происходят без участия кинематического устройства, будучи прямым следствием репликации ДНК.

Двигательным импульсом для расхождения хромосом служит удлинение двойной спирали ДНК и торсионная энергия ее негативной суперспирализации. Репликационные вилки ориентируются таким образом, что продукты репликации выталкиваются к противоположным клеточным полюсам. В данном случае ориджин или близлежащие сайты играют роль центромера и содержат информацию о местах, которые займут расходящиеся сестринские хромосомы.

Важная роль в этой модели отводится компактизации ДНК с помощью ДНК-связывающих белков из суперсемейства SMC. В случае *E. coli* роль компактизирующего белка, или *конденсина* выполняет SMC-белок MukB (сокр. японск. mukaku — плод без косточки; в данном случае — безъядерная клетка; при мутации по гену *mukB* нормальный процесс расхождения хромосом нарушается, и одна из дочерних клеток остается без хромосомы).

SMC-конденсины образуют V-образные димеры, которые, как щипцами, захватывают ДНК. Они связываются с взаимно удаленными участками двойной спирали, стягивая их вместе (см. 1 том учебника).

При репликации конденсация сестринских хромосом происходит по обе стороны реплисома, и они изолируются друг от друга.

Особая роль в таргетинге локусов *ori* приписывается трансляции мембранных белков на фоне еще не завершенной репликации хромосомы. Сестринские хромосомы заякориваются на мембране благодаря образованию четвертичного комплекса ДНК:РНК-полимераза:мРНК:белок. Заметим, что РНК-полимераза является самым мощным из всех известных молекулярных моторов. Она тянет на себя матрицу ДНК с силой $\sim 3 \cdot 10^{-11}$ Н. Для сравнения, тянущая сила молекулы миозина на порядок меньше ($\sim 6 \cdot 10^{-12}$ Н).

Таким образом, случайная диффузия ДНК ограничивается *трансерцией* (англ. transertion), т. е. котранскрипционной трансляцией и транслокацией мембранных белков.

Особенности репликационного аппарата и расхождения сестринских хромосом у бактерий с диморфным клеточным циклом (на примере *Caulobacter crescentus*). Согласно модели «фабрика», которая подтверждена для *B. subtilis* (см. выше), перед началом репликации ориджин занимает экваториальное положение. Сразу же после инициации репликации копии ориджинов мигрируют к противоположным полюсам материнской клетки. Когда в дочерних клетках, в свою очередь, иницируется репликация хромосом, их ориджины вновь занимают экваториальное положение и т. д.

Существует исключение из этого правила — у стебельковой простекобактерии *Caulobacter crescentus* ориджин всегда находится на клеточном полюсе.

C. crescentus обладает диморфным клеточным циклом (к этому вопросу мы еще вернемся в разделе 17.1). Сидячая, или прикрепленная к субстрату стебельковая особь выполняет роль ство-

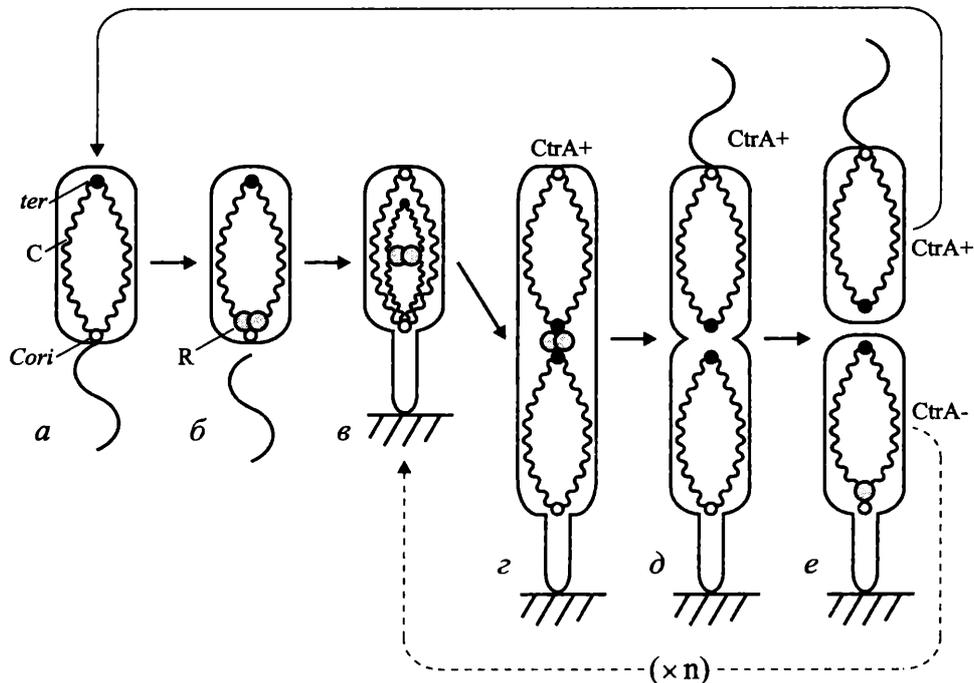


Рис. 186. Репликация хромосомы в ходе диморфного клеточного цикла *Caulobacter crescentus*.

а — нерепликативная клетка-швермер; б — инициация репликации с помощью полярно расположенной реплисомы; в — репликативная стебельковая клетка с реплисомой, смещенной на экватор; г — расхождение сестринских хромосом к противоположным полюсам стебельковой клетки; д — образование нового терминауса и разборка реплисомы; е — неэквивалентное деление.

Белый кружок — ориджин репликации (*Cori*); черный кружок — терминус репликации (*ter*); серые кружки — реплисомы; CtrA — белок-репрессор репликации.

ловой клетки. При ее делении образуются две не эквивалентные дочерние клетки — *способная к репликации* («репликативная») новая стебельковая клетка и *неспособная к репликации* («нерепликативная») подвижная клетка-швермер с полярным жгутиком (рис. 186, е). Когда швермер дифференцируется, он сбрасывает жгутик, на месте которого образуется стебелек. Одновременно с этим разрушаются хеморецепторы, бесполезные при сидячем образе жизни.

В швермере ориджин репликации *Cori* находится на том же полюсе, что и жгутик, а терминус *ter* расположен у противоположного полюса (рис. 186, а). При инициации репликации ориджин сохраняет свое положение, и реплисома формируется не на экваторе, как в случае *B. subtilis*, а на том полюсе, где прежде находился жгутик (рис. 186, б). Новый ориджин направляется к противоположному полюсу. ДНК по мере репликации скапливается сперва на том полюсе, где образовался стебелек. В результате этого реплисома оттесняется на середину клетки в будущую плоскость деления (рис. 186, в). Теперь ДНК, выходящая из реплисомы, направляется к разным полюсам (рис. 186, г). После образования нового терминауса реплисома разбирается (рис. 186, д), и клетка неэквивалентно делится (рис. 186, е).

Когда швермер превращается в стебельковую клетку, в нем избирательно деградирует регуляторный белок CtrA. В случае *C. crescentus* он выполняет две функции — глобального транскрипционного фактора и избирательного репрессора репликации.

Белок CtrA влияет на уровень транскрипции ~25% генов. В частности, он позитивно регулирует жгутиковые опероны, оперон хемотаксиса и гены биосинтеза фимбрий, а также контролирует биогенез клеточной стенки и цитокинез.

В случае *C. crescentus* белок CtrA является промежуточным звеном между комплексом событий клеточного цикла и репликацией хромосомы. Точнее сказать, он служит конечным адресатом

сигнала, поступающего из окружающей среды через двухкомпонентную сигнальную систему (см. раздел 18.1.1.3).

Преобразование неактивного белка CtrA в активную фосфорилированную форму CtrA~P происходит при помощи гистидинкиназы CckA, которая фосфорилирует его по консервативному остатку Asp51.

Другая особенность репликации хромосомы *C. crescentus* состоит в уникальном строении ориджина *CoriC*. Как и у типового ориджина (см. выше), в нем имеется сайт для связывания инициаторного белка DnaA, сайт для связывания «изгибающего» белка IHF, а также «легкоплавкий» АТ-богатый сайт. Однако, в отличие от типового ориджина, в локусе *CoriC* отсутствует кластер DnaA-боксов, а имеется только один DnaA-бокс. Кроме того, АТ-богатый сайт размером 40 п.н. не содержит повторов, хотя в нем есть участок, гомологичный АТ-богатому 13-меру *E. coli*. Наконец, в локусе *CoriC* присутствует сайт для связывания белка CtrA.

Особенности репликационного аппарата и расхождения сестринских хромосом у бактерий с мультипартирным геномом (на примере *Vibrio cholerae*). До этого мы рассматривали сегрегацию сестринских хромосом только у бактерий с унипартирным геномом, который содержится в единственной (иногда многокопийной) хромосоме.

Помимо бактерий с унипартирным геномом существуют бактерии с мультипартирным геномом, распределенным между разными хромосомами. Характерным примером является энтеропатоген *V. cholerae*, имеющий две кольцевые хромосомы — x_1 -хромосому (2,96 млн.п.н.) и x_2 -хромосому (1,07 млн.п.н.). Насколько специфичны процессы их репликации и сегрегации?

Согласно данным секвенирования мультипартирных геномов, доминирующая и вторичная хромосомы содержат разные ориджины репликации. В первом случае ориджин принадлежит к *Cori*-типу, типичному для *C. crescentus* (см. выше), и инициатором репликации является белок DnaA. Во втором случае ориджин относится к *RepABC*-типу, который характерен для некоторых плазмид (см. раздел 16.4.1.2), и инициатором репликации служит белок RepC. Благодаря этому две разные хромосомы при инициации репликации не конкурируют друг с другом, что делает их взаимно совместимыми.

Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (англ. fluorescence *in situ* hybridization, FISH) установлено, что в молодых клетках ориджин репликации доминирующей хромосомы (*oriCI_{VC}*) находится на одном из полюсов, а ориджин репликации вторичной хромосомы (*oriCII_{VC}*) расположен на экваторе. В ходе репликации две копии ориджина *oriCI_{VC}* распределяются асимметрично — одна остается на полюсе, а другая перемещается через всю клетку к противоположному полюсу. В свою очередь, две копии ориджина *oriCII_{VC}* симметрично расходятся от экватора и занимают положения на 1/4 и 3/4 длины продольной оси клетки (рис. 187).

Асимметричная сегрегация ориджина *oriCI_{VC}* напоминает только что рассмотренную нами картину расхождения сестринских хромосом *C. crescentus*. В свою очередь, симметричная сегрегация ориджина *oriCII_{VC}* характерна для низкокопийных плазмид, например R1, F и P1 (см. ниже).

Репликация хромосом x_1 и x_2 иницируется синхронно и только один раз в ходе клеточного цикла, т.е. она контролируется общим глобальным регулятором. Поскольку хромосома x_2 меньше хромосомы x_1 , ее репликация заканчивается несколько раньше.

Механизм независимой сегрегации сестринских копий хромосом x_1 и x_2 еще не установлен (возможно, для этого используется не один, а разные механизмы). Тем не менее, ясно, что при репликации хромосом x_1 и x_2 образуются две реплисомы: одна экваториальная, другая субполярная.

Недавно выяснилось, что сегрегация ориджина *oriCI_{VC}* зависит от продукта гена *parA1*, тогда как в сегрегации ориджина *oriCII_{VC}* принимают участие продукты генов *parAB2*. При этом *par*-гены хромосомы x_1 гомологичны хромосомным *par*-генам других бактерий, а *par*-гены хромосомы x_2 гомологичны плазмидным *par*-генам.

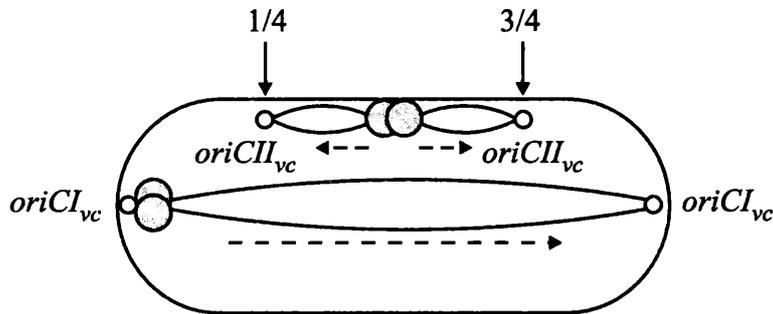


Рис. 187. Расхождение копий двух разных хромосом *Vibrio cholerae*.

Все это укладывается в гипотезу о мегаплазмидном происхождении вторичных бактериальных хромосом (см. раздел 16.1.1).

Необратимость процесса расхождения сестринских хромосом у бактерий. Почему ДНК, распределенная по полюсам, не возвращается на экватор? Каким образом локусы *oriC* фиксируются в позициях, соответствующих 1/4 и 3/4 длины продольной оси материнской клетки, так что после деления они попадают в дочерние клетки?

Ответы на данные вопросы еще не получены. Возможно, что в качестве факторов, обеспечивающих закоривание ориджинов на мембране, выступают белок ParB (в случае *C. crescentus*) или белковый комплекс ParB/Spo0J/Rac (в случае *B. subtilis*).

Расхождение сестринских хромосом у архей. Согласно немногочисленным данным, расхождение сестринских хромосом у представителей филой АI *Crenarchaeota* и у представителей филой АII *Euryarchaeota* происходит по-разному.

У кренархеотов, в частности *Sulfolobus* sp., вслед за репликацией хромосомы наблюдается период задержки, который напоминает фазу G₂ митотического цикла эукариотной клетки (см. табл. 29). В течение этого периода сестринские хромосомы конденсируются и располагаются друг против друга в центре клетки, что напоминает метафазу. Роль аналога эукариотного центромера, наличие которого окончательно не доказано, могут выполнять короткие повторы, аналогичные центромерным повторам. В случае *S. acidocaldarius* такие повторы специфически связывают белок молекулярной массой 17,5 кДа, который, возможно, играет роль аналога нитей митотического веретена. Для устранения хромосомной ДНК с пути замыкающейся септы, по-видимому, используется «моторная» АТФаза HerA, гомолог бактериального белка FtsK (напомним, что у бактерий эту роль выполняют белки FtsK/SpoIIIЕ). Таким образом, система расхождения сестринских хромосом у кренархеотов в одном сходна с митотическим аппаратом эукариотной клетки, а в другом — с типично бактериальным механизмом.

Что касается эвриархеотов, в частности *Methanothermobacter* sp., то здесь сегрегация сестринских хромосом происходит, как у бактерий — одновременно с репликацией ДНК.

16.4.2.2. Расхождение сестринских плазмид

Существуют два способа сегрегации плазмидных копий между дочерними клетками — контролируемое расхождение с помощью Par-системы и случайное распределение.

Контролируемое расхождение плазмид с помощью Par-системы. Ранее мы уже упоминали базовый репликон плазмиды, состоящий из ориджина репликации, а также из генов *ter*, *inc* и *cop*, которые контролируют несовместимость и копияемость (см. раздел 16.1.2).

Ахиллесова пята низкокопийных плазмид состоит в том, что при делении хозяйской клетки их устойчивое наследование не гарантировано. Поэтому помимо базового репликона они содержат так называемую *сегрегационную кассету* (англ. partition cassette). Она отвечает за то, чтобы каждая дочерняя клетка получила не менее одной плазмидной копии. В состав сегрегационной кассеты входят два структурных гена и аналог центромера, или *cis*-действующий сайт (см. ниже).

Хронология расхождения плазмид отличается от хронологии расхождения хромосом. В то время как хромосомы начинают расходиться сразу после копирования локуса *ori*, расхождение плазмид задерживается до момента завершения репликации центромерного сайта (см. ниже).

Контролируемое расхождение плазмид не зависит от хозяйских факторов и протекает независимо от клеточного цикла.

В основе механизма контролируемого расхождения плазмид лежит Par-система (сокр. англ. partitioning — разделение). Она аналогична митотическому аппарату эукариотов и переносит плазмидные копии на концы подготовленной к делению материнской клетки.

С помощью Par-системы сегрегируются низкокопийные плазмиды, например R1, F и P1.

Компонентами Par-системы являются:

- сайт, аналогичный центромеру;
- аналог теломерного белка, который связывается с сайтом-аналогом центромера;
- моторная АТФаза.

Во всех известных сегрегационных кассетах ген моторной АТФазы транскрибируется раньше гена теломерного белка.

Роль аналога центромера выполняет сайт *parC* (сокр. англ. centromere-like; в плазмиде R1), сайт *sopC* (в плазмиде F) или сайт *parS* (в плазмиде P1).

Функцию аналога теломерного белка в случае плазмиды R1 выполняет белок ParR (сокр. англ. repressor; *связывается с промотором внутри сайта parC и регулирует свою собственную транскрипцию*). В случае плазмиды F эту функцию выполняет белок SopB, в случае плазмиды P1 — белок ParB.

В качестве моторной АТФазы используется белок ParM (сокр. англ. motor; в случае плазмиды R1), белок SopA (в случае плазмиды F) или белок ParA (в случае плазмиды P1). Показано, что белок ParM образует филаменты, которые ориентируются вдоль продольной оси клетки и растаскивают сестринские плазмиды к противоположным полюсам. Белок ParM гомологичен актину, а его предполагаемым эволюционным предшественником является морфоскелетный белок MreB (см. I том учебника).

Интересно, что в то время как митотическое веретено эукариотов образуется из тубулиновых микротрубочек, кольцо деления состоит из актиновых микрофиламентов. У прокариотов наблюдается обратная картина разделения труда: материалом для аналога митотического веретена служит актиноподобный белок, а кольцо деления состоит из гомолога тубулина (см. раздел 17.4).

Реплицированные сайты *parC* спариваются друг с другом при помощи белка ParR. Образовавшийся *сегрегационный комплекс* (англ. partitioning complex) служит затравкой для самосборки белка ParM в протофиламенты. В сайте *parC* находятся десять прямых повторов для связывания белка ParM (который синтезируется в количестве $\sim 1,5 \cdot 10^4$ молекул на клетку), что позволяет полимеризовать сразу несколько протофиламентов.

Пучки протофиламентов образуют два столбобразных тяжа, по одному на каждую сестринскую плазмиду.

Сестринские плазмиды оттесняются к клеточным полюсам за счет полимеризации АТФ-связанной формы белка ParM на затравочных концах протофиламентов. На противоположных, не затравочных концах протофиламентов АТФ гидролизуется, и полимеры белка ParM разбираются на субъединицы (рис. 188). Отметим, что такой способ пространственного перемещения плазмид напоминает актинзависимую подвижность внутриклеточных паразитов *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* и *Rickettsia* spp. (см. 1 том учебника).

Расходящиеся сестринские плазмиды занимают позиции, соответственно, на 1/4 и 3/4 длины продольной оси материнской клетки. Поэтому по завершении цитокинеза они оказываются в экваториальных областях. В других случаях они размещаются вблизи старых клеточных полюсов. Многокопийные плазмиды образуют мультимерные, неслучайным образом расположенные группы-кластеры, из которых с целью репликации извлекаются отдельные копии.

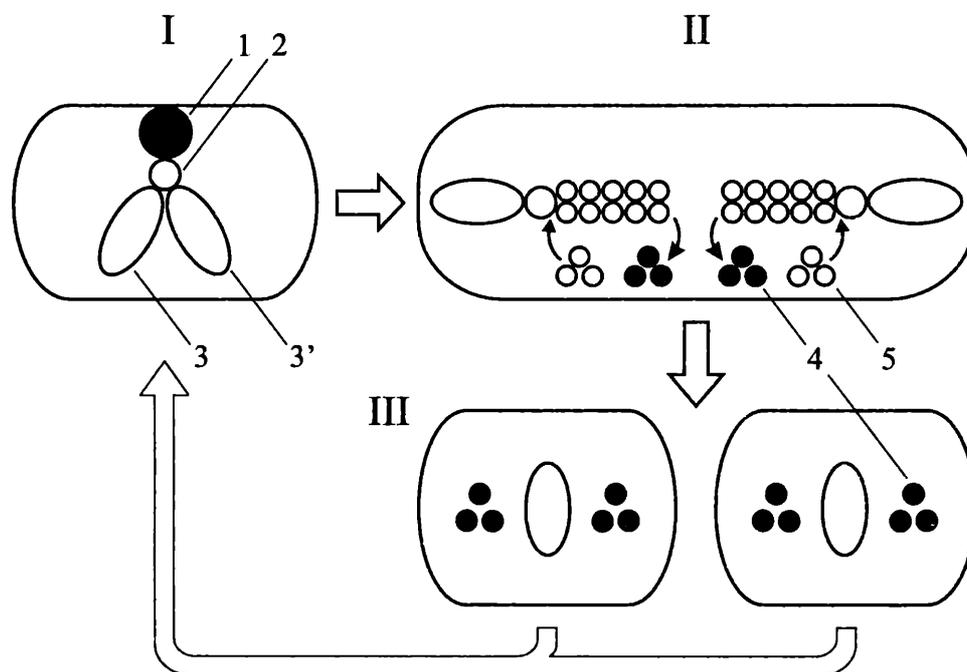


Рис. 188. Расхождение сестринских плазмид при помощи Par-системы.

1 — реплисома; 2 — сегрегационный комплекс; 3 и 3' — сестринские плазмиды; 4 — ParM-АТФ; 5 — ParM-АТФ.

Случайное распределение плазмид. Pac^+ -плазмиды, которые содержат сегрегационную кассету, перед контролируемым расхождением образуют пары на экваторе. Поскольку Pac^- -плазмиды лишены сегрегационной кассеты, они случайным образом диффундируют в разные стороны или в одном и том же направлении. По этой причине базовый репликон Pac^- -плазмид не способен стабильно поддерживаться в хозяйской популяции. В результате, часть бактериальных клеток «излечивается» от присутствия таких плазмид.

16.5. КОНСЕРВАТИЗМ ГЕНОМА

Прокариотный геном, как геном любого живого существа клеточного или неклеточного строения, служит плацдармом для реализации процессов наследственности и изменчивости. Чтобы он оставался консервативным, т. е. воспроизводил свою структуру в цепи поколений, требуется не только исправлять возникающие изменения, но и устранять их причины.

Ярким примером эволюционной консервативности, приводящей к сохранению общей геномной организации, являются энтеробактерии. В частности, генетические карты *E. coli* K-12 и *Salmonella enterica* серовар Typhimurium обнаруживают очень высокое сходство друг с другом, несмотря на то, что эти бактерии дивергировали >100 млн. лет назад. Высокое взаимное сходство проявляют и физические карты геномов *E. coli*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, *S. enteritidis* и *S. paratyphi* штамм В.

Наследуемые изменения прокариотного генома являются результатом мутаций и рекомбинационных процессов. В частности, частота некомпенсированных мутаций отражает соотношение между общим числом повреждений ДНК и числом репарированных или неверно репарированных повреждений. Иными словами, мутации реализуются в силу ограниченных возможностей репарационных систем и их ошибок.

Таким образом, за консерватизм генома прежде всего отвечают репарационные системы, которые распознают повреждения ДНК и их исправляют.

Наряду с этим за консерватизм генома отвечают превентивные системы, которые защищают его от генов чужого происхождения. Такие системы, или системы рестрикции-модификации, избирательно повреждают чужеродную ДНК, не причиняя вреда собственному геному. Рестрицированная ДНК теряет способность копироваться и экспрессироваться в ущерб клетке-хозяину. При помощи систем рестрикции-модификации бактерии, в первую очередь, борются с вирусной инфекцией. Кроме того, благодаря этим системам бактерии избегают геномных изменений, источником которых может стать рекомбинация между резидентной и чужеродной ДНК. Поэтому допустима аналогия между системами рестрикции-модификации, которые различают свою и чужую ДНК, и иммунной системой высших ядерных организмов, которая отличает собственные белки от чужеродных белков.

16.5.1. Репарация

Молекула двухцепочечной ДНК обладает жестким сахарофосфатным скелетом и стабилизирована множеством водородных связей, которые образуются между комплементарными парами азотистых оснований. Как таковая, ДНК относительно устойчива к структурным изменениям и повреждениям. Однако они постоянно

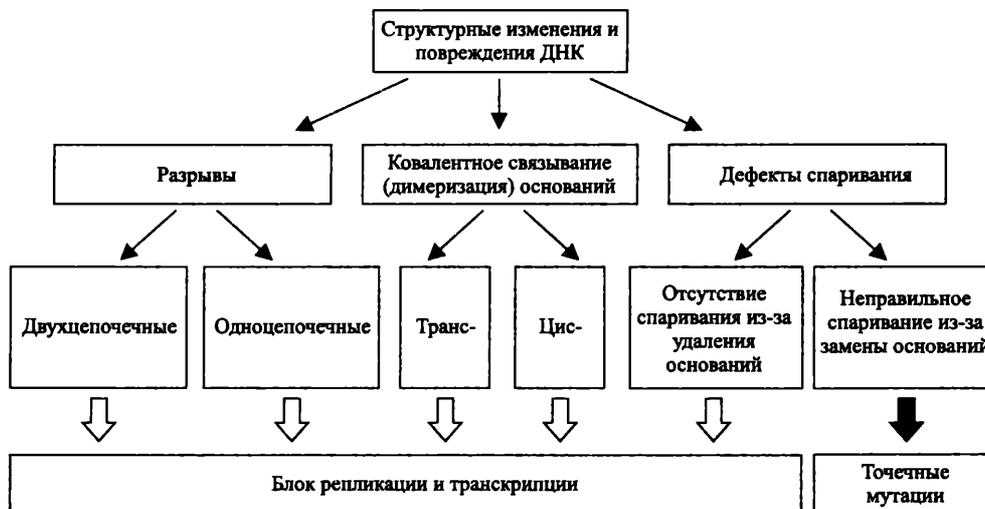


Рис. 189. Основные типы структурных изменений и повреждений в двухцепочечной ДНК.

возникают под воздействием внешних факторов или происходят вследствие эндогенных метаболических процессов.

Среди главных повреждающих ДНК экзогенных химических и физических агентов можно назвать бенз(а)пирен, диоксины, полихлорированные бифенилы и ультрафиолетовый свет. В свою очередь, важнейшими эндогенными повреждающими агентами являются активные формы кислорода, например синглетный кислород, и активные формы азота, в частности пероксинитрит (см. раздел 19.1.6.1).

Другим источником структурных повреждений ДНК служат эндогенные ошибки, которые неизбежно, хотя и с разной частотой, происходят при нормальном метаболизме ДНК, а также ее процессинге, состоящем из репликации, рекомбинации и репарации.

В частности, разные ДНК-полимеразы допускают ошибки с разной частотой. Относительно мало ошибаются репликативные ДНК-полимеразы Pol I и Pol III, а также репарационная SOS-репликаза Pol II, которые обладают способностью к автокоррекции. Напротив, репарационные SOS-репликазы Pol IV и Pol V характеризуются тем, что проходят участок повреждения, оставляя его неисправленным (см. раздел 16.4.1.1).

К числу структурных изменений ДНК относятся (рис. 189):

- *разрывы фосфодиэфирных связей* (одноцепочечные или двухцепочечные);
- *димеризация оснований*, т. е. образование ковалентных связей между двумя соседними пиримидиновыми основаниями в одной и той же цепи или в комплементарных цепях;
- *нарушение спаривания*, т. е. отсутствие канонического спаривания нуклеотидов либо из-за удаления основания, либо по причине использования «неправильного» основания;
- *образование аддуктов*, или продуктов присоединения простых органических молекул, например алкилирующих агентов.

Самыми опасными повреждениями ДНК являются разрывы цепей, димеризация оснований или локальное отсутствие спаривания; если они вовремя не устраняются, происходит полная блокада репликации и транскрипции.

С другой стороны, результатом неустраненной ошибки спаривания становятся точечные мутации, которые вносят изменения в нуклеотидную последовательность ДНК. Точечные мутации не влияют на репликацию и транскрипцию в той клетке, где они появились. Однако они наследуются и могут фенотипически проявиться у потомства.

Таким образом, повреждения ДНК снижают точность репликации и транскрипции, а в отдельных случаях могут вообще заблокировать эти процессы, что приводит к летальным последствиям.

Чтобы свести опасность к минимуму, в клетках имеются множественные *репарационные системы* (англ. *repair* — ремонтировать). Они распознают и устраняют структурные повреждения ДНК.

Репарация ДНК может осуществляться разными способами.

Некоторые повреждения структурно обратимы, и поэтому непосредственно исправляются путем возвращения ДНК в исходное состояние. Примером служит *фотореактивация* с помощью фототиазы, которая мономеризует пиримидиновые димеры, образовавшиеся под воздействием ультрафиолетового света (см. раздел 16.5.1.1).

При так называемой *эксцизионной репарации* точечный поврежденный участок в одной нити ДНК удаляется вместе с фланкирующими интактными областями, длина которых может сильно варьировать. «Правильному» заполнению образовавшейся одноцепочечной бреши способствует двухспиральная структура ДНК, так как неповрежденная комплементарная цепь играет роль матрицы.

При эксцизионной репарации с удалением основания (см. раздел 16.5.1.2) ДНК-гликозилаза удаляет модифицированное основание. Затем разрывается фосфодиэфирная связь по 5'-положению апиримидинового или апуринового сайта. После этого происходит *ник-трансляция* (от англ. *nick* — разрез; в данном случае — перенос разреза) — отрезается нуклеотид, фланкирующий повреждение по 3'-положению. Образовавшаяся минимальная брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы, а ДНК-лигаза ликвидирует разрез.

При эксцизионной репарации с удалением нуклеотидов (см. раздел 16.5.1.2) небольшой сегмент ДНК (~11 н.; поврежденный сайт с фланкирующими последовательностями) вырезается эксцизионной эндонуклеазой; брешь и разрез устраняются, как в предыдущем случае.

При репарации нарушенного спаривания, которая избирательно затрагивает неметилированную цепь ДНК (см. раздел 16.5.1.3), вместе с точечным повреждением удаляется участок ДНК протяженностью до 1 тыс нуклеотидов.

Рекомбинационная репарация (см. раздел 16.5.1.4) служит для ликвидации двухцепочечных повреждений, которые возникли либо при репликации ДНК, уже имеющей одноцепочечное повреждение, либо в результате внешнего воздействия на нереплицирующуюся молекулу. Смысл рекомбинационной репарации заключается в том, чтобы путем обмена гомологичными участками распределить двухцепочечное повреждение между двумя дуплексами ДНК. В результате два одноцепочечных повреждения устраняются в ходе репликации или с помощью пострепликационной эксцизионной репарации.

16.5.1.1. Фотореактивация

В природных условиях главным физическим фактором, который вызывает повреждение ДНК, является солнечная радиация, в частности ее коротковолновый компонент, или ультрафиолетовый свет. Он активно поглощается сопряженной системой двойных связей, что дестабилизирует молекулярные структуры и может приводить к их химической перестройке.

Одним из важнейших эволюционных приспособлений к существованию в нишах, облучаемых ультрафиолетом, служит фотореактивация (для защиты от повреждающих видимым светом используются другие механизмы; см. раздел 19.1.6.1).

Сообщения об открытии феномена *фотореактивации* (англ. photoreactivation) почти одновременно опубликовали в начале 1949 г. два американских генетика — Кельнер (A. Kelner) и Дальбекко (R. Dulbecco). Первый продемонстрировал его на актинобактерии *Streptomyces griseus*, второй на примере Т-бактериофага *E. coli*.

Феномен фотореактивации заключается в том, что выживаемость клеточных организмов и вирусов, подвергнутых воздействию природного или искусственного «дальнего» ультрафиолетового света (200–300 нм), можно повысить сразу на несколько порядков, облучая их «близким» ультрафиолетовым светом (300–350 нм) или видимым светом длиной волны 350–500 нм. Способностью к фотореактивации обладает большинство живых существ; исключения редки и не закономерны (бактерии *Haemophilus influenzae* и *B. subtilis*, археот *Methanococcus vannielii*, дрожжевой гриб *Schizosaccharomyces pombe*, плацентарное млекопитающее *H. sapiens*).

У разных бактерий спектр действия фотореактивации может различаться. Например, для *S. griseus* он имеет оптимум при 436 нм, а для *E. coli* — 365 нм, что указывает на разную природу фоторецепторных молекул, в частности флавинов.

Последствием облучения ультрафиолетовым светом является образование внутримолекулярных фотопродуктов (пиримидин:6–4 пиримидон) и особенно — спонтанное насыщение двойных связей в положении 5–6 у соседствующих остатков тимина или цитозина. Во втором случае образуется циклобутановое кольцо, или пиримидиновый димер $\text{Pyr} \langle \rangle \text{Pyr}$ (рис. 190). Димеризующиеся пиримидиновые остатки могут находиться либо в одной и той же цепи ДНК («цис-син» кольцо), либо в двух комплементарных цепях («транс-син» кольцо).

В отсутствие репарации образование димеров блокирует репликацию, что вызывает летальный эффект. В редких случаях, когда ДНК реплицируется в обход поврежденного сайта, возникает мутация.

Устранить пиримидиновые димеры можно двумя способами — путем фотореактивации или путем эксцизионной репарации (см. ниже).

Механизм фотореактивации заключается в ферментативной регенерации мономерных пиримидиновых оснований из димеров.

Фотореактивация осуществляется при помощи *фотореактивирующего фермента* (англ. photoreactivating enzyme, PRE), или светозависимой *ДНК-фотолитазы* (англ. DNA photolyase; deoxyribocyclobutadipyrimidine pyrimidine-lyase). Фермент состоит из одной субъединицы (55–60 кДа; ген *phr2*) и содержит два нековалентно связанных хромофора. Первым из них универсально служит ФАДН₂ (см. II том учебника). Вторым хромофором у ферментов «фолатного» класса является фолат (N-метинил-N₄фолат), а у ферментов «деазафлавинового» класса деазафлавин (8-гидрокси-5-деазафлавин, F_{42c}; там же).

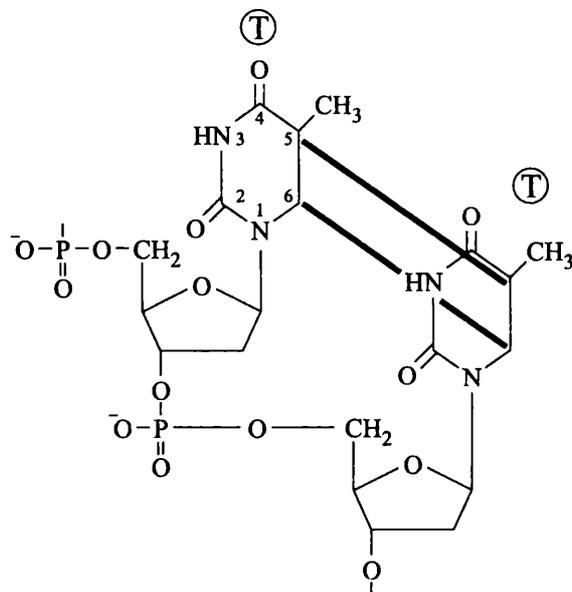
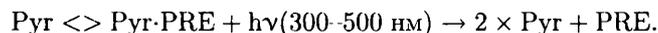
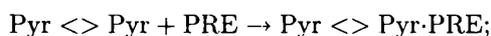


Рис. 190. Образование циклобутанового кольца при «димеризации» соседних остатков тимина в одной и той же цепи ДНК.

Циклобутановое кольцо разрывается за счет поглощенной энергии света, причем хромофоры поочередно играют роль антенны (см. II том учебника). Реакцию, катализируемую ДНК-фотолиазой, можно записать следующим образом:



Фермент независимо от света связывается со своей мишенью ($\text{Pyr} \langle \rangle \text{Pyr}$). Затем второй хромофор поглощает световой квант; энергия возбуждения передается первому хромофору, который переносит электрон на циклобутановое кольцо. В результате этого связи 5-5 и 6-6 разрываются, и пиримидиновый димер распадается на мономеры. От одного из них (Pyr^-) электрон переносится обратно на флаavin, который возвращается в исходное состояние, а фермент диссоциирует от ДНК. Таким образом, реакция фотолиза $\text{Pyr} \langle \rangle \text{Pyr} \rightarrow 2 \times \text{Pyr}$ не относится к числу окислительно-восстановительных превращений.

Второй тип фотопродуктов, 6-4 пиримидин-пиримидон, репарируется при помощи особой фотолиазы (ген *phr1*). Данные относительно ее молекулярного строения и механизма действия еще не получены.

16.5.1.2. Эксцизионная репарация

Эксцизионной репарацией называется удаление поврежденного участка ДНК с его последующей заменой новым. Репарация такого типа представляет собой высоко точный процесс, поскольку благодаря комплементарности цепей ДНК информация,

необходимая для исправления повреждения в одной цепи, считывается с другой, неповрежденной цепи.

В соответствии с молекулярным механизмом, который используется для исправления повреждений, различают две системы эксцизионной репарации.

При *репарации с удалением основания* поврежденный нуклеотид поэтапно вырезается, причем сначала с помощью гликозилазы удаляется поврежденное основание. Кроме того, компоненты этой системы могут репарировать сайты с отсутствующим основанием, а также димеры оснований, одноцепочечные разрывы или короткие одноцепочечные бреши в молекуле ДНК.

При *репарации с удалением нуклеотидов* поврежденный участок цепи (реже — один нуклеотид) вырезается за один этап.

Репарация с удалением основания. Исправление разнообразных, чаще всего точечных повреждений ДНК достигается в процессе *репарации с удалением основания* (англ. base excision repair, BER). Она включает в себя следующие этапы:

- удаление «неправильного» основания;
- расщепление сахарофосфатного скелета в сайте с удаленным основанием;
- удаление сахарофосфатного остатка;
- репарационный синтез ДНК;
- лигирование одноцепочечного разрыва.

Первым шагом при репарации с удалением основания является либо спонтанная потеря основания, либо удаление «неправильного» основания при помощи ДНК-гликозилазы (рис. 191).

В зависимости от субстратной специфичности ДНК-гликозилаз существуют разные варианты системы репарации с удалением поврежденного или «неправильного» основания. Например, в случае *E. coli* ДНК-гликозилаза MutM удаляет 4,6-диамино-5-формамидопиримидин, ДНК-гликозилаза MutY — 8-оксогуанин, ДНК-гликозилаза Ung — урацил, ДНК-гликозилазы Tag и AlkA — алкилпурины, ДНК-гликозилаза TG — тимингликоль (см. рис. 191).

Атипичные ДНК-гликозилазы *Micrococcus luteus* (PD) и колифага T4 (DenV⁺) одновременно обладают двумя активностями — гликозилазной, специфичной в отношении пиримидиновых димеров, и AP-эндонуклеазной. Это позволяет им инициировать процесс репарации, который завершается фотореактивацией (рис. 192).

В результате гидролиза N-гликозильной связи «неправильное» основание освобождается, а в молекуле ДНК появляется апириимидиновый или апуриновый сайт (англ. apurinic/apyrimidinic, AP). Затем эндонуклеаза AP II расщепляет фосфодиэфирную связь в 5'-положении AP-сайта. В результате этого у разорванной цепи появляется свободный 3'-конец, который служит затравкой для синтеза ДНК. В свою очередь, апуриновый или апириимидиновый дезоксирибозо-5-фосфатный остаток удаляется с помощью экзонуклеазы III (дезоксирибофосфодиэстеразы). При этом образуются брешь размером в один нуклеотид и свободный 5'-фосфатный конец, необходимый для воссоединения одноцепочечного разрыва ДНК.

Брешь размером даже в один нуклеотид потенциально летальна. Однако обычно она заполняется с помощью ДНК-полимеразы Pol I (см. раздел 16.4.1.1).

После заполнения бреши, иными словами, по завершении репарационного синтеза в ДНК остается потенциально опасный одноцепочечный разрез (англ. nick) с двумя противостоящими группами — 3'-гидроксильной и 5'-фосфорильной. Он устраняется непосредственно, путем образования фосфодиэфирной связи с помощью НАД-зависимой ДНК-лигазы, которая кратко охарактеризована в разделе 16.4.1.1.

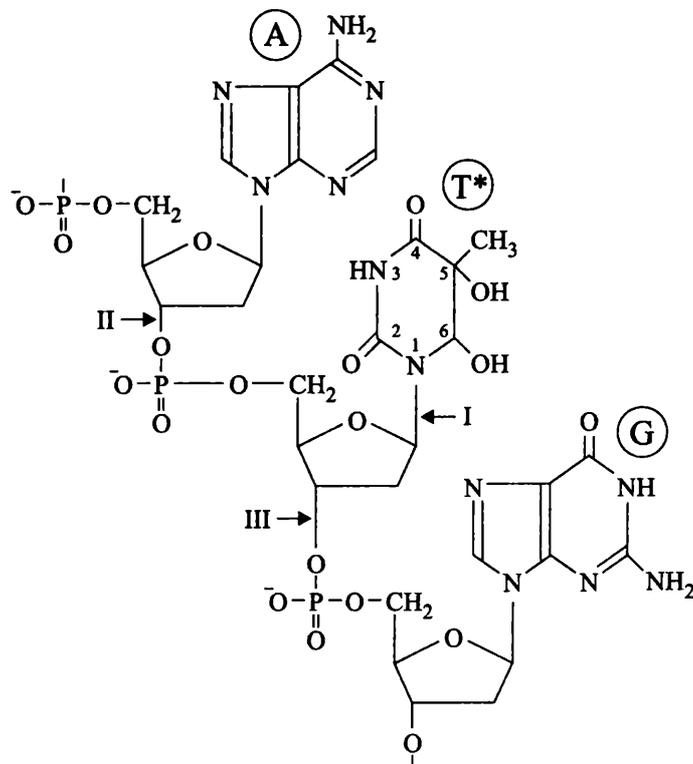


Рис. 191. Образование бреши размером в один нуклеотид при эксцизионной репарации с удалением основания.
 I — ДНК-гликозилаза; II — эндонуклеаза AP II; III — экзонуклеаза.

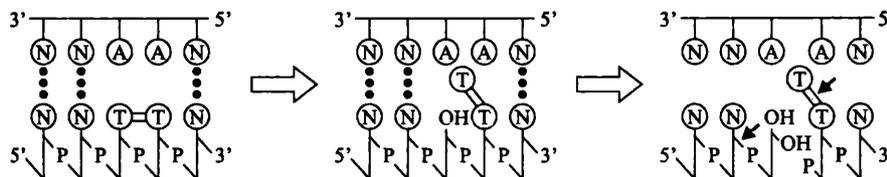


Рис. 192. Удаление основания и образование одноцепочечного разреза при эксцизионной репарации тиминового димера с помощью гликозилазы/эндонуклеазы PD (DenV⁺).

N — один из четырех дезоксирибонуклеотидов; T = T — тиминный димер.

Черные стрелки — места действия экзонуклеазы (дезоксирибофосфодиэстеразы) и ДНК-фотолиазы.

Репарация с удалением нуклеотидов. Как отмечалось ранее, ультрафиолетовое облучение приводит к образованию внутримолекулярных 6-4 фотопродуктов и циклобутановых пиримидиновых димеров. Для устранения этих повреждений наряду с механизмом фотореактивации используется универсально распространенный механизм — *репарация с удалением нуклеотидов* (англ. nucleotide excision repair, NER). В данном случае специальный белковый комплекс распознает повреждение в ДНК и непосредственно (т. е. без образования AP-сайта, в отличие от репарации с

удалением нуклеотида) наносит фланкирующие одноцепочечные разрезы. Действуя в качестве *инцизионной эндонуклеазы* (от англ. incision — разрез), он проявляет широкую специфичность в отношении разнообразных одноцепочечных повреждений ДНК, что, в частности, показано на примере *E. coli*. К числу продуктов локальной модификации ДНК относятся пиримидин:б-4 пиримидон, аддукты псоралена, производные бенз(а)пирена и т. д.

Хотя принцип действия систем репарации с удалением нуклеотидов в целом одинаков и, в частности, заключается в нанесении разрезов по обеим сторонам от повреждения, белковые компоненты этих систем и кодирующие их гены различаются между собой у разных организмов.

Репарация с удалением нуклеотидов происходит следующим образом. Вначале наносятся два разреза, фланкирующие поврежденный сайт. Затем поврежденный фрагмент ДНК удаляется. После этого осуществляется репарационный синтез ДНК, причем комплементарная цепь служит матрицей для воссоздания удаленного фрагмента. В заключение происходит лигирование одноцепочечного разреза.

В случае бактерий в систему репарации с удалением нуклеотидов входят следующие компоненты, или NER-белки:

- UvrA (сокр. англ. ultraviolet repair; 114 кДа; распознает повреждения);
- UvrB/UvrC (84 и 70 кДа; наносят разрез по обеим сторонам повреждения);
- UvrD (75 кДа; ДНК-геликаза II; расплетает ДНК по обе стороны от повреждения, образуя репарационный «глазок»).

Несмотря на то, что существует определенный базовый уровень конститутивной экспрессии NER-белков, они находятся под контролем регуляторной системы RecA/LexA и индуцируются при SOS-ответе (см. раздел 18.1.2). В частности, белок LexA непосредственно служит репрессором гена *uvrA* за счет способности связываться с его промотором.

Для проявления активности эндонуклеазы UvrABC необходимы АТФ и катионы Mg^{2+} . Разрезы наносятся по обе стороны от повреждения, например пиримидинового димера, в результате чего образуется свободный фрагмент ДНК (рис. 193).

После того, как эндонуклеаза UvrABC нанесла разрезы, она вместе с олигонуклеотидным фрагментом некоторое время остается в комплексе с ДНК. Затем они вытесняются с помощью четвертого NER-белка, или геликазы UvrD при участии ДНК-полимеразы I и SSB-белков (см. раздел 16.4.1.1).

По сравнению с двухцепочечной ДНК одноцепочечная ДНК более чувствительна к повреждениям; кроме того, отсутствует матрица для ее репарации. Поэтому особая функция SSB-белков состоит в том, чтобы контролировать плавление и отжиг одноцепочечной ДНК, помогать выявить ее повреждение и привлекать к ней белки, участвующие в репарации.

Неудивительно, что SSB-белки имеются у всех клеточных организмов, а также у многих вирусов. Стандартным доменом SSB-белка, служащим для связывания ДНК, является *ОВ-складка* (сокр. англ. outer binding). Бактерии образуют гомотетрамерные SSB-белки, содержащие одну ОВ-складку в каждой субъединице. В свою очередь, эукариоты образуют гетеротримерные SSB, или репликационные белки А (англ. replication protein A, RPA) с шестью ОВ-складками. Что касается архей, то SSB-белки *Euryarchaeota* обнаруживают более высокий уровень гомологии с RPA-белками, в то время как SSB-белки *Crenarchaeota* имеют химерную бактериально-эукариотную природу.

Брешь, размер которой в 99% случаев составляет ~12–13 нуклеотидов, заполняется с помощью ДНК-полимеразы I, а одноцепочечный разрыв зашивает ДНК-лигаза.

Каковы особенности системы репарации с удалением нуклеотидов, имеющейся у

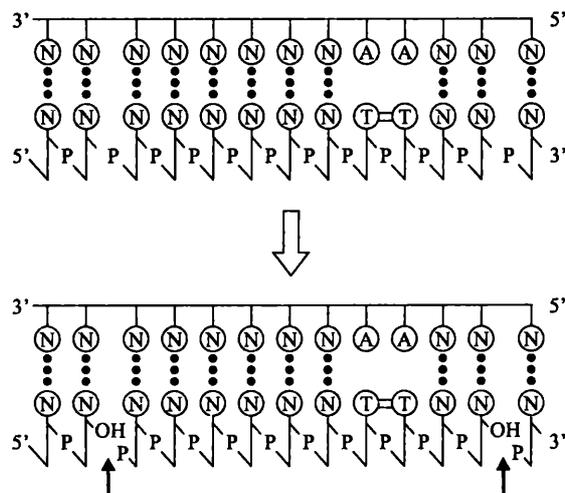


Рис. 193. Образование одноцепочечных разрывов, фланкирующих тиминный димер, при эксцизионной репарации с удалением нуклеотидов.

архей? В некоторых случаях она сходна с бактериальной, в частности геномы ряда метаногенов и экстремальных галофилов содержат ортологи генов *uvrABC* (что может объясняться горизонтальным переносом генов); в других случаях археотная NER-система ближе к эукариотной.

16.5.1.3. Репарация ошибок спаривания

Одним из важнейших репарационных механизмов служит *репарация ошибок спаривания* (англ. mismatch repair, MMR). По характеру производимых действий существует определенное сходство между этой системой и системой репарации с удалением нуклеотидов; кроме того, они используют ряд общих белковых компонентов.

С помощью MMR-системы исправляется локальное отсутствие канонического спаривания по причине включения «неправильного» нуклеотида в растущую цепь ДНК (см. раздел 16.4.1.1). MMR-система обладает широкой субстратной специфичностью в отношении mismatch-сайтов или небольших делеций. При ее низкой эффективности, а также вследствие ее дефектности происходят наследственные мутации.

Наиболее изучена MMR-система *E. coli*. В ее состав входят следующие функциональные белковые компоненты:

- MutS, MutL и MutH;
- ДНК-геликаза II UvrD (MutU);
- экзонуклеазы Exo I, Exo VII, Exo X и RecJ;
- SSB-белки;
- голофермент ДНК-полимеразы Pol III;
- ДНК-лигаза.

Белки MutSLH инициируют процесс MMR и действуют в качестве его координаторов.

Белок MutS обладает АТФазной активностью и образует гомодимеры. Он специфически распознает «неправильный» нуклеотид и взаимодействует с ним. За образование связи отвечают два консервативных аминокислотных остатка — Glu38 и Phe36.

Белок MutL также обладает АТФазной активностью и образует гомодимеры. Он физически взаимодействует с гомодимером (MutS)₂. Его роль особенно важна — он не только способствует распознаванию mismatch-сайта, но и отвечает за сборку функциональной MMR-системы. В частности, он активирует белок MutH, а также вовлекает в процесс репарации ДНК-геликазу II UvrD (MutU) и корректирует ее действие. Наконец, он участвует в репарационной репликации, обеспечивая физическое взаимодействие MMR с субъединицами «загрузочного» γ -комплекса ДНК-полимеразы Pol III (см. раздел 16.4.1.1).

Белок MutH, принадлежащий к семейству рестриктаз типа II (см. раздел 16.5.2), функционирует в мономерной форме. Он распознает неметилированные последовательности GATC в новой цепи ДНК и наносит в ней специфический разрез.

Напомним, что при репликации новая цепь ДНК временно не метилируется (см. раздел 16.4.1.1), т. е. отличительным признаком новой цепи служит присутствие в ней неметилированных последовательностей GATC. Для MMR-системы этот критерий используется при выборе цепи, подлежащей репарации. Целесообразность такой стратегии очевидна — ошибка спаривания, которая могла бы вызвать точечную мутацию, исправляется только за счет новой цепи, а старая цепь не затрагивается, что гарантирует сохранение первоначальной структуры генома.

Первым этапом MMR-репарации является связывание комплекса (MutS)₂/(MutL)₂/MutH с mismatch-сайтом. На 5'- или 3'-стороне этого сайта выявляется неметилированная последовательность GATC, и в ней делается разрез. Он служит сайтом, который инициирует вырезание новой цепи участка, содержащего неспаренный нуклеотид.

Механизм, с помощью которого MMR-система распознает два взаимно дистанцированных сайта (mismatch-сайт и GATC-сайт), точно неизвестен.

Согласно «стационарной» модели, под воздействием MMR-белков, прежде всего MutS, ДНК изгибается или образует петлю, благодаря чему эти сайты сближаются, в то время как гетеродимер MSH сохраняет связь с mismatch-сайтом. Согласно альтернативной «мобильной» модели, комплекс MutSL связывается с mismatch-сайтом, а затем перемещается от него по направлению к сайту разреза, куда поступают экзонуклеазы. В обоих случаях в качестве источника энергии используется АТФ.

ДНК-геликаза II MutU связывается с разрезом и, начиная от него, расплетает гетеродуплекс ДНК по направлению к mismatch-сайту. Одноцепочечные участки ДНК в «глазке» покрываются SSB-белками, которые защищают их от нуклеаз.

Затем 3' → 5' экзонуклеаза (ExoI или ExoX) или 5' → 3' экзонуклеаза (ExoVII или RecJ), в зависимости от ориентации разреза в GATC-сайте, наносит второй разрез за пределами mismatch-сайта.

Образовавшаяся брешь, размер которой может достигать 1 т.н., заполняется в результате репарационного синтеза ДНК с помощью ДНК-полимеразы Pol III, а одноцепочечный разрез ликвидируется благодаря ДНК-лигазе.

16.5.1.4. Рекомбинационная репарация

Репарация одноцепочечных повреждений использует матричные свойства интактной комплементарной цепи и является «личным делом» поврежденной молекулы ДНК. В отличие от этого, для репарации двухцепочечных повреждений требуется посторонняя матрица, и в качестве нее используется другая, гомологичная молекула ДНК.

Репарация двухцепочечных повреждений. Хотя повреждения чаще всего затрагивают только одну цепь ДНК, они иногда могут появляться напротив друг друга.

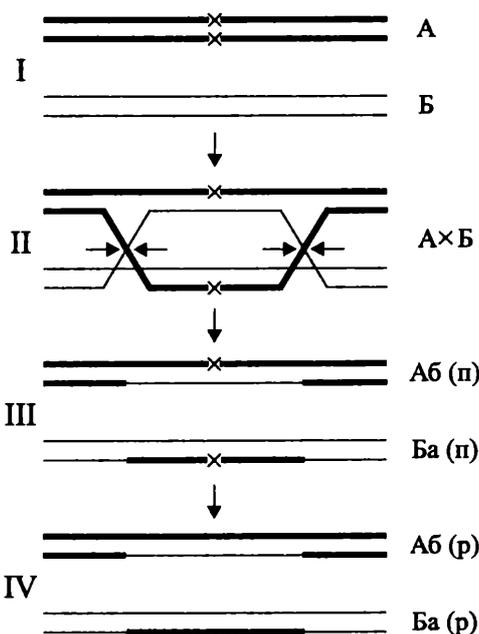


Рис. 194. Репарация двухцепочечных повреждений ДНК.

I — пресинапс, молекула ДНК с двухцепочечным повреждением (А) и ее интактный гомолог (В); II — синапс, гомологичное спаривание с образованием двух хиазм Холлидея; III — постсинапс, нанесение симметричных одноцепочечных разрезов и обмен гомологичными участками ДНК; IV — ликвидация одноцепочечных повреждений с помощью эксцизионной репарации.

Аб(п), Ба(п) — гетеродуплексы с повреждением в одной из цепей; Аб(р), Ба(р) — репарированные гетеродуплексы.

Толстые линии — старые цепи ДНК; тонкие линии — новые (дочерние) цепи ДНК.

Схема репарации таких двухцепочечных повреждений приведена на рис. 194. Поврежденный дуплекс «выравнивается» со своим интактным гомологом, образуя с ним *пресинапс* (англ. presynapsis). На решающей стадии репарации дуплексы обмениваются друг с другом гомологичными участками цепей с помощью крестообразных *хиазм Холлидея* (см. раздел 16.6.1.2). Образовавшийся таким образом *синапс* (англ. synapsis; от греч. syn-apos — вместе) расщепляется за счет нанесения симметричных одноцепочечных разрезов и воссоединения их концов. На стадии *постсинапса* (англ. postsynapsis) формируются два гетеродуплекса, каждый из которых несет одноцепочечное повреждение. И, наконец, повреждения устраняются с помощью соответствующих репарационных систем.

Повторим, что данная стратегия репарации состоит в «размене» двухцепочечного повреждения на пару одноцепочечных повреждений.

Механизмы двухцепочечных повреждений. Существуют два основных механизма двухцепочечных повреждений ДНК.

В первом случае (рис. 195 А, 1–3) двухцепочечные повреждения возникают в процессе репликации. Например, как только репликационная вилка доходит до некоди-

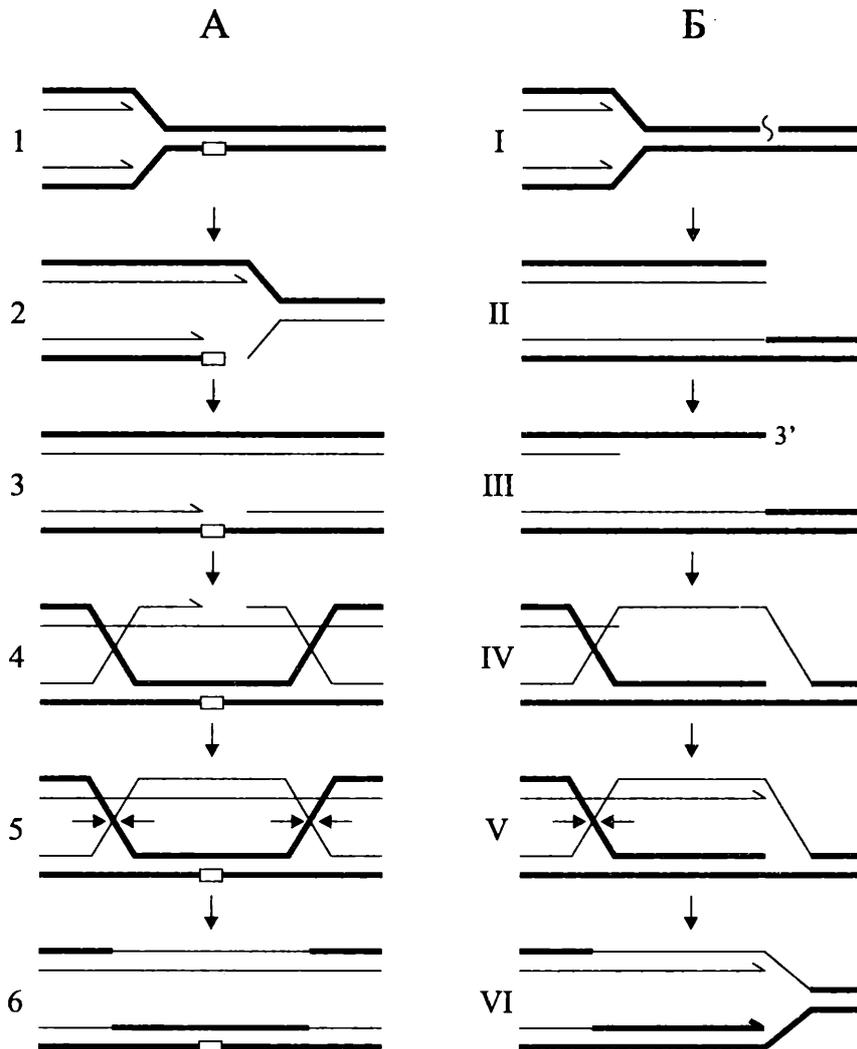


Рис. 195. Образование брешы в дочерней цепи ДНК (А) и двухцепочечного разрыва ДНК (Б) с их рекомбинационной репарацией.

1 -- приближение репликомы к тиминовому димеру; 2 -- прекращение репликации интактной цепи; 3 -- образование одноцепочечной брешы в поврежденной цепи; 4 -- образование хиазмы Холлидея; 5 -- заполнение одноцепочечной брешы; 6 -- демонтаж хиазм Холлидея.

I -- приближение репликомы к одноцепочечному разрыву; II -- распад репликационной вилки и устранение одноцепочечного разрыва в интактной молекуле ДНК; III -- создание одноцепочечного «навеса» в поврежденной молекуле ДНК; IV -- образование хиазмы Холлидея; V -- синаптический синтез ДНК; VI -- демонтаж хиазмы Холлидея.

Толстые линии -- старые цепи ДНК; тонкие линии -- новые (дочерние) цепи ДНК.

рующего повреждения в одной из цепей ДНК, в частности сайта без основания или пиримидинового димера, действие репликативной ДНК-полимеразы Pol III (см. раздел 16.4.1.1) полностью блокируется. Затем правее повреждения, на среднем рас-

стоянии от него 800 нуклеотидов репликация возобновляется с помощью «склонной к ошибкам» SOS-полимеразы Pol V, которая вскоре уступает место репликативной полимеразе Pol III. Однако при этом в новой, или дочерней цепи появляется незаполнимая брешь (англ. daughter strand gap).

Во втором случае (рис. 195 Б, I–III) образуется непреодолимый одноцепочечный разрыв в реплицируемой молекуле ДНК. Достигнув его, репликационная вилка распадается. В результате этого в одной из двух сестринских молекул ДНК появляется свободный конец. Одноцепочечная брешь во второй сестринской молекуле устраняется ДНК-полимеразой Pol I, а одноцепочечный разрыв ликвидируется с помощью ДНК-лигазы.

Двухцепочечные повреждения могут непосредственно индуцироваться и внешним воздействием. Например, свободные радикалы, образовавшиеся в водном растворе под воздействием ионизирующей радиации, создают двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК, а митомицин С образует с ней поперечные сшивки.

Заметим, что в обоих описанных случаях продуктами рекомбинации являются молекула ДНК с двухцепочечным повреждением и гомологичная ей молекула интактной ДНК.

Два пути рекомбинационной репарации. Двухцепочечные повреждения ДНК репарируются двумя путями, подробно изученными на примере *E. coli*. (рис. 195 А, Б). Хотя оба пути зависят от белка RecA, их обозначают как «RecF-путь» и «RecBC-путь» (по названию продуктов генов *recF* и *recBC*).

RecF-путь используется для репарации бреши в дочерней цепи, а RecBC-путь — для репарации двухцепочечного разрыва ДНК. Оба пути включают в себя пресинаптическую, синаптическую и постсинаптическую фазы.

RecF-путь (рис. 195 А, 4–6). В данном случае образуются две хиазмы Холлидея.

Гены *recFOR* индуцируются при SOS-ответе (см. раздел 18.1.2). В пресинаптической фазе гетеротримерный комплекс RecFOR (40, 27 и 22 кДа) перемещается по бреши в дочерней цепи, покрытой SSB-белками, и инициирует образование взаимодействующего с ней филамента белка RecA (см. ниже).

Созданию синапса способствуют две топоизомеразы. Первая из них — это ДНК-топоизомераза IV, или ДНК-гираза; она устраняет положительные супервитки, возникшие при взаимодействии интактного дуплекса с внедренным в него одноцепочечным участком. Вторая — это топоизомераза IA; она устраняет отрицательные супервитки, возникшие в гетеродуплексе.

Брешь в дочерней цепи ликвидируется с помощью ДНК-полимеразы Pol I и ДНК-лигазы.

В постсинаптической фазе резольвасома RuvABC (см. ниже) демонтирует хиазмы Холлидея и филamentosы белка RecA. В результате образуется интактный гетеродуплекс и гетеродуплекс с одноцепочечным повреждением, которое устраняется за счет эксцизионной репарации.

RecBC-путь (рис. 195 Б, IV–VI). В данном случае образуется только одна хиазма Холлидея.

На хромосоме *E. coli* гены *recBC* образуют дицистронный оперон. Ген *recD* обладает собственным промотором и терминатором (см. раздел 16.3.1.2). Ни один из этих трех генов не индуцируется при SOS-ответе.

Белки RecB (134 кДа), RecC (129 кДа) и RecD (67 кДа) образуют гетеротример. Он обладает тремя ферментативными активностями — геликазной, эндонуклеазной и АТФазной (это единственная известная АТФ-зависимая эндонуклеаза). Задача комплекса RecBCD заключается в том, чтобы сформировать в участке разрыва одноцепочечный выступ, или «навес» (англ. overhang) с 3'-концом, который будет внедрен в интактную молекулу ДНК (рис. 195, Б, IV). Эндонуклеазное расщепление неравномерно затрагивает обе цепи поврежденной молекулы ДНК. По достижении «горячей точки» рекомбинации — повторяющейся Chi-последовательности (см. раздел 16.3.2.1) — расщепление прекращается на 3'-конце бывшей ведущей цепи, однако некоторое время продолжается на 5'-конце бывшей ведомой цепи.

По аналогии с белками RecFOR, белки RecBCD стимулируют образование филamentosов белка RecA на одноцепочечных участках ДНК.

После демонтажа хиазмы Холлидея репликационная вилка восстанавливается. Для этого в бреши осуществляется ограниченный синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы Pol I; в «верхнем» разрыве для этого требуются фрагменты Оказаки.

SOS-ответ *E. coli* на повреждение ДНК. Часто возникающие одноцепочечные повреждения ДНК, а также более редкие двухцепочечные повреждения репарируются с помощью вышеописанных конститутивных систем. Но когда нарушения носят массовый характер, появляется необходимость в короткий срок резко усилить репарационные процессы.

Соответствующий клеточный механизм называется *SOS-ответом* (англ. SOS response; см. раздел 18.1.2). Заметим, что это образное название искажает истинную физиологическую ситуацию, поскольку вместо попытки любой ценой остаться в живых клетка запускает рациональную систему адаптивных реакций в ответ на прекращение репликации ДНК.

Итак, на нарушение ДНК, подавляющее ее репликацию, клетка реагирует SOS-ответом. Он выражается в повышенной экспрессии ~20 генов SOS-регулона, продукты которых способствуют возобновлению репликации (табл. 23). Стратегическая задача SOS-ответа состоит в том, чтобы позволить клетке противостоять повреждениям ДНК и, по-возможности, произвести их репарацию.

Существуют несколько тактических способов решения данной задачи:

— репликативный аппарат приобретает дополнительную способность преодолевать сайты с отсутствующим основанием благодаря увеличению числа копий ДНК-полимеразы Pol II;

— с целью прохождения участков, блокирующих репликативные полимеразы, повышается экспрессия «склонной к ошибкам» ДНК-полимеразы Pol V;

— возрастает способность к эксцизионной репарации за счет дополнительного синтеза большого количества копий эндонуклеазы UvrABC и геликазы UvrD;

— значительно усиливается рекомбинационная репарация благодаря сверхсинтезу белков RecA и RecN.

На более поздней стадии SOS-ответа усиливается синтез белка SulA, ингибирующего клеточное деление (см. раздел 17.4.1), что предоставляет клетке отсрочку для завершения рекомбинационной репарации.

В тех случаях, когда все принятые меры оказались бесполезными, и возобновить репликацию ДНК так и не удалось, активируются лизогенные профаги, а также колициногенные плазмиды, что приводит к разрушению клетки. Тем не менее, столь неблагоприятный исход выгоден для популяции в целом, поскольку «обреченная» клетка перестает расходовать лимитированные трофические ресурсы на бесполезное поддержание своей жизнедеятельности.

Описанные события происходят в результате поэтапной индукции SOS-генов (табл. 23).

В первом эшелоне индуцируются гены, ответственные за репарацию одноцепочечных повреждений ДНК (*uvrABCD*) или за их игнорирование (*polB*).

Когда это не помогает восстановить репликацию, индуцируются гены второго эшелона, в частности *recAN*, отвечающие за рекомбинационную репарацию.

Если не помогает и это, включаются гены третьего эшелона (*umuCD* и *sulA*).

Когда репликация возвращается к норме, все три группы генов репрессируются в обратном порядке. Альтернативой становится апоптоз и лизис клетки.

Повышение уровня экспрессии SOS-генов при прекращении репликации вызвано

Таблица 23. Гены и их продукты, участвующие в SOS-ответе *E. coli*

Ген	Функция продукта	Уровень экспрессии (копии на клетку)	
		Базовый	Индукцированный
Первый эшелон			
<i>lexA</i>	Репрессор SOS-регулона	1300	1
<i>uvrA//uvrB</i>	Экцизионная репарация (выявитель сайта/экзонуклеаза)	20/250	250/100
<i>uvrD</i>	Экцизионная репарация (геликаза)	5000–8000	25000–65000
<i>polB</i>	Репликация «поверх повреждения» (ДНК-полимераза Pol II)	40	300
Второй эшелон			
<i>rwvA//rwvB</i>	Рекомбинационная репарация (выявитель сайта/геликаза)	700/5600	200/1600
<i>dinI</i>	Ингибитор процессинга белка UmuD	500	2300
<i>recA//recN</i>	Рекомбинационная репарация (дерепрессор SOS-регулона, фактор пресинапса/–*	1000–10000/–	100000/–
Третий эшелон			
<i>sulA</i>	Ингибитор цитокинеза	–	–
<i>umuDC</i>	Репликация «поверх повреждения» (ДНК-полимераза Pol V)	180/0	2400/200
Апоптоз			
<i>Caa</i>	Колицин А	–	–
<i>Sea</i>	Колицин Е1	–	–

* – данные отсутствуют.

тем, что репрессор LexA инактивируется под воздействием белка RecA в активной форме (см. рис. 251).

В отсутствии экологических стрессов, приводящих к повреждению ДНК, белок-репрессор LexA подавляет экспрессию SOS-генов — его димеры связываются с квази-палиндромной последовательностью 5'-TACTG(TA)₅ CAGTA-3' в промоторных участках SOS-генов, или с *SOS-боксом* (англ. SOS box), что препятствует инициации транскрипции. Тем не менее, SOS-гены экспрессируются и на низком конститутивном уровне, поскольку белок LexA неэффективно распознает свою мишень, а также из-за того, что транскрипция происходит с альтернативных промоторов.

Роль белка RecA. Как уже отмечалось, при рекомбинационной репарации идет обмен гомологичными одноцепочечными участками между поврежденной и интактной ДНК. В случае *E. coli* две сопряженные задачи — обеспечение контакта гомологов и обмен цепями между ними — решаются с помощью многофункционального фермента RecA (см. раздел 16.6.1.2).

Ген *recA* обладает собственными промотором и терминатором и контактирует с генами, которые не имеют отношения к процессам репликации и транскрипции. В обычных условиях белок RecA синтезируется в числе 100–10000 копий на клетку, однако при блокировании репликации из-за повреждения ДНК его количество увеличивается более, чем на порядок (см. табл. 23).

Когда при SOS-ответе *E. coli* реагирует на повреждение ДНК, белок RecA переходит в активную форму (RecA*). Она играет роль копротеазы при автопротеолитическом расщеплении репрессора SOS-ответа — белка LexA.

В белке RecA присутствуют два сайта связывания — один для поврежденной одиночной цепи ДНК, другой для интактной ДНК. Его молекулы образуют гексамеры,

наподобие гексамеров геликазы DnaB (см. раздел 16.4.1.1). Гексамеры, в свою очередь, образуют филамент вокруг поврежденной одиночной цепи ДНК, чему способствуют SSB-белки.

Филамент белка RecA «выравнивает» гомологичную последовательность в двух молекулах ДНК и катализирует обмен цепями между ними с образованием хиазм Холлидея (см. рис. 195, А 3–5 и рис. 195, Б III–V). Необходимым условием этой реакции служит гидролиз АТФ, причем в роли АТФазы выступает все тот же белок RecA.

Демонтаж хиазм Холлидея. Хиазмы Холлидея представляют собой локусы, в которых пересекаются одиночные цепи ДНК. Как уже отмечалось, при репарации бреши в дочерней цепи (RecF-путь) образуются две хиазмы Холлидея, а при репарации двухцепочечного разрыва ДНК (RecBC-путь) только одна. Чтобы завершить процесс рекомбинационной репарации, необходимо демонтировать хиазмы Холлидея и филаменты белка RecA. Для этой цели в RecBC-пути используется ферментная система RuvABC (см. также раздел 16.6.1.2).

Генный локус *ruv* (сокр. англ. repair of ultraviolet damage) индуцируется в первом эшелоне SOS-ответа. Гены *ruvAB* входят в индуцибельный оперон; прилегающий к нему ген *ruvC* образует моноцистронный оперон.

Белки RuvABC функционально объединяются в *резольвасому* (см. раздел 16.6.1.2). Белок RuvA образует тетрамеры; его роль сводится к распознаванию хиазм Холлидея и связыванию с ними. Второй белок, RuvB объединяется в гексамеры, нанизанные на дуплекс ДНК, и действует в качестве геликазы. Третий белок, RuvC, активный в димерной форме, играет роль резольвазы. Он наносит разрезы в двух цепях ДНК одинаковой полярности, на одинаковом расстоянии от хиазмы Холлидея, а затем соединяет образовавшиеся концы.

Итак, мы познакомились с разными, порой довольно сложными механизмами репарации. С их помощью устраняются эндогенные и экзогенные повреждения ДНК. Благодаря репарации, а также за счет репликативных ДНК-полимераз, способных к автокоррекции, прокариоты обеспечивают консерватизм своего генома.

Существует еще один защитный механизм, при помощи которого прокариотные геномы защищаются от изменений. Речь идет о системе рестрикции-модификации.

16.5.2. Рестрикция и модификация

Смысл рестрикции заключается в обезвреживании чужеродной ДНК путем ее ферментативного расщепления; смысл модификации — сделать свою ДНК устойчивой против воздействия эндогенных ферментов рестрикции.

Феномен *рестрикции* (англ. restrict — ограничивать) открыли в 1952 г. американские генетики Луриа (S. E. Luria) и Хьюмен (M. L. Hume). В их опытах некоторые штаммы бактерий в значительной степени, хотя и не полностью, ограничивали репродукцию бактериофагов, свободно размножавшихся на других штаммах. Спустя десятилетие Эрбер (W. Arber; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1978 г.) выяснил, что в основе рестрикции лежит фрагментация вирусной ДНК под воздействием сайтспецифичных эндонуклеаз клетки-хозяина. Одновременно с этим было установлено, что рестрикция не является неизбежной; устойчивость к ней можно приобрести в результате *модификации* (англ. modification) — специфического метилирования нуклеотидов ДНК, находящихся в сайтах рестрикции.

Ферменты рестрикции подавляют репродукцию бактериофагов с немодифицированной ДНК; напротив, при отсутствии этих ферментов или при наличии собственной системы модификации фаги свободно размножаются. Модификация, приобретенная от хозяина, не наследуется и сохраняется только при репродукции фага на штаммах бактерий с полноценной системой рестрикции-модификации.

Системы *рестрикции—модификации* (англ. restriction—modification; R—M) представляют собой бифункциональные комплексы, проявляющие «противоположно направленные» ферментативные активности. Одна из этих активностей — эндо-ДНКазная, или *рестриктазная*, другая — *ДНК-метиلاзная* (точнее — ДНК-метилтрансферазная).

Субстратом *рестриктазы* (англ. restrictase) служит чужеродная ДНК, которая расщепляется на крупные фрагменты. Субстратом *метилазы* (англ. methylase) является хозяйская ДНК, которая в результате модификации становится устойчивой к воздействию собственных рестриктаз.

Ферменты в составе конкретной системы рестрикции-модификации обладают одинаковой сайт-специфичностью, т. е. распознают один и тот же участок в двухцепочечной, реже — в одноцепочечной молекуле ДНК. Процесс распознавания вызывает конформационные изменения и ферментов, и ДНК, что активизирует каталитические центры.

Сайты распознавания обычно имеют длину 4–8 п.н.; они могут быть сплошными или прерывистыми, симметричными или асимметричными, уникальными или вырожденными.

Обе активности — рестриктазную и метилазную — может проявлять один и тот же бифункциональный мультисубъединичный фермент. Однако чаще всего это два разных фермента.

Интересно, что парные, или «родственные» (англ. cognate) рестриктазы и метилазы не гомологичны друг другу. Более того, эндонуклеазы одного и того же типа и даже рестриктазы-изошизомеры (см. ниже) зачастую не являются взаимными гомологами. Метилазы, напротив, взаимно гомологичны.

Рестриктазы (общие сведения). Рестриктаза наносит двухцепочечные разрезы ДНК. Однако это не происходит, если отдельные нуклеотиды в сайте узнавания предварительно подвергаются пострепликативной модификации путем метилирования под действием метилтрансферазы.

В клетках, обладающих R—M системой, ДНК специфически модифицирована по сайтам узнавания собственных рестриктаз, что предотвращает ее «самоубийственное» эндонуклеазное расщепление. Зато чужеродная двухцепочечная немодифицированная ДНК (принадлежащая конъюгативной плазмиде или бактериофагу) легко становится субстратом рестрикции, если она не метилирована. В то же время R—M системы, как правило, не воздействуют при генетической трансформации на экзогенную ДНК, которая переходит из двухцепочечной формы в одноцепочечную и в таком виде может взаимодействовать с хозяйской хромосомой (см. раздел 16.6.1.3).

Рестрикционная эндо-ДНКаза наносит только один двухцепочечный разрез, так что в каждой цепи сайта рестрикции без затраты энергии гидролизуется по одной сахарофосфатной связи. Разрез производится с образованием концевых 5'-фосфатных и 3'-ОН групп. Сайт рестрикции находится либо внутри сайта узнавания, либо близко от него. Гораздо реже они взаимно дистанцированы; при этом положение сайта рестрикции строго не задано.

Кофактором всех известных в настоящее время рестриктаз является Mg^{2+} или

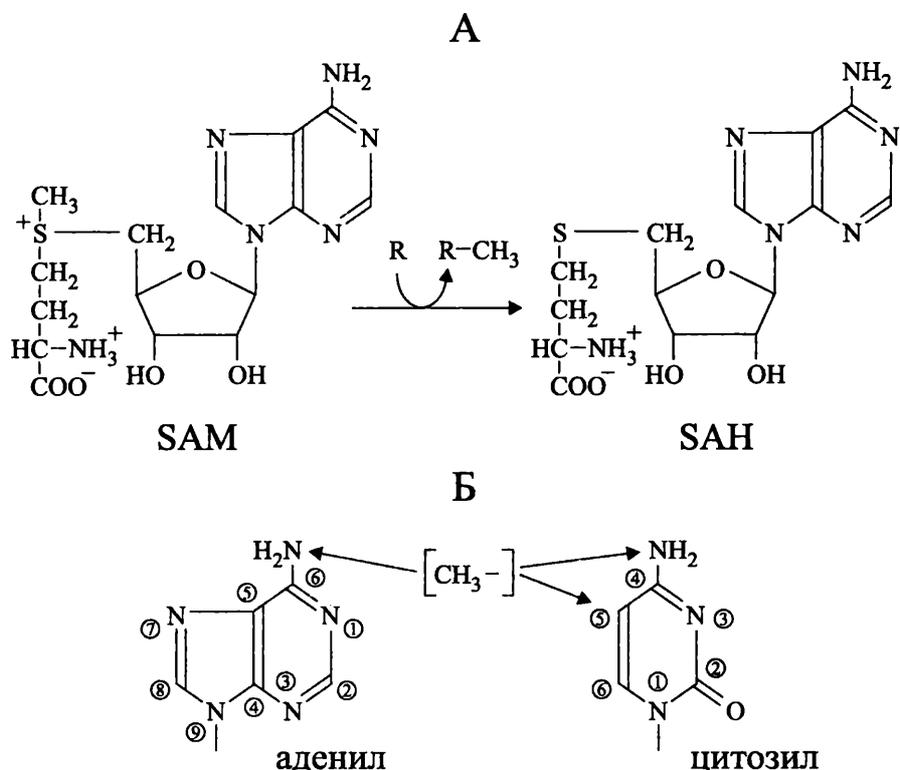


Рис. 196. Метилтрансферазная реакция (А) и позиции метилирования в азотистых основаниях ДНК (Б).

SAM — S-аденозил-L-метионин; SAH — S-аденозил-L-гомоцистеин; R — акцептор метильной группы (остаток аденина или цитозина).

другой двухвалентный катион; дополнительными кофакторами (не путать с расходуемыми субстратами) могут служить АТФ и S-аденозил-L-метионин.

Метилазы (общие сведения). «Модифицирующая» ДНК-метилтрансфераза присоединяет метильную группу к двум одинаковым нуклеотидам, расположенным в комплементарных цепях ДНК внутри сайта узнавания.

Универсальным донором метильной группы служит S-аденозил-L-метионин (англ. S-adenosyl-L-methionine; SAM), который превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин (англ. S-adenosyl-L-homocysteine; SAH) (рис. 196, А). Помимо функции субстрата он служит аллостерическим эффектором при связывании с сайтом узнавания как метилаз, так и рестриктаз типов I или III (см. ниже).

Мишенью для метилаз являются остатки аденина и цитозина, которые преобразуются, соответственно, в N⁶-метиладенин и N⁴-метилцитозин или 5-метилцитозин (рис. 196, Б). Метилазы типов I и III метилируют только аденин с образованием N⁶-метиладенина, в то время как метилазы типов II и IIS могут метилировать цитозин с образованием N⁴-метилцитозина или 5-метилцитозина, а также аденин с образованием N⁶-метиладенина.

Предпочтительное образование N⁴-метилцитозина рассматривается в качестве молекулярной адаптации к термофилии, поскольку 5-метилцитозин даже в мезофильных условиях служит «горя-

чей» точкой спонтанного мутирования. В результате реакции дезаминирования 5-метилцитозина, которая резко ускоряется с повышением температуры, образуется тимин, что при репликации приводит к замене GC-пары на AT-пару.

В случае, если дезаминируется N⁴-метилцитозин, образуется уридин. Такая ошибка исправляется системой эксцизионной репарации. Вначале урацил-гликозилаза удаляет остаток урацила. Апуриновый сайт специфически узнается AP-эндонуклеазой с образованием 5'-одноцепочечного разрыва. Довершают дело (5' → 3')-эксонуклеаза III, ДНК-полимераза Pol I и ДНК-лигаза (см. раздел 16.5.1.2).

Метилирование не мешает каноническому спариванию азотистых оснований. В то же время метильные группы размещаются в большой борозде двойной спирали, что делает их легко доступными для белков, взаимодействующих с ДНК.

Метилирование нарушает стерическое соответствие между рестриктазой и сахарофосфатным скелетом ДНК, препятствуя работе этого фермента.

Таким образом, хотя метилированные основания можно формально рассматривать в качестве дополнительной 5-й, 6-й и 7-й букв генетического алфавита, паттерн метилирования не закодирован с помощью триплетов ДНК. Иными словами, в данном случае мы сталкиваемся с одним из примеров *эпигенетического наследования* (см. раздел 16.8).

У эукариотов метилирование остатков цитозина в дуплетах GC выполняет уникальную роль -- распределение метильных групп вдоль цепи ДНК служит основным средством контроля экспрессии генов.

У прокариотов метилирование остатков аденина с помощью метилтрансферазы Dam выполняет другую уникальную функцию -- оно обеспечивает распознавание своей и чужой ДНК.

Помимо этого, с Dam-метилированием связаны разнообразные функции, не имеющие отношения к защите от рестрикции. К их числу относятся:

- контроль инициации репликации;
- пострепликативная *mismatch*-репарация;
- регуляция экспрессии генов;
- транспозиция мобильных элементов;
- контроль упаковки фаговой ДНК.

Контроль инициации репликации. Метилтрансфераза Dam выполняет исключительно важную роль в координировании репликации ДНК с клеточным циклом бактерий (см. разделы 16.4.1.1 и 17.1.2). Реакция, которую катализирует этот фермент, служит редким, хотя и не единственным примером регуляторного метилирования у прокариотов; еще один пример связан с метилтрансферазой CheR, участником регуляторной системы хемотаксиса (см. раздел 18.4.1.1).

Метилтрансфераза Dam типа II, не входящая в тандем с рестриктазой, и которую образно называют «одинокой» (англ. *solitary*) или «сиротой» (*orphan*), метилирует по 6-му положению остаток аденина в повторяющейся последовательности GATC. На протяжении клеточного цикла степень метилирования ДНК изменяется очень сильно -- от полуметилирования сразу после завершения репликации, когда метилирована только одна цепь, до полного метилирования обеих цепей (>99% сайтов GATC еще через 2–3 с). Единственным участком ДНК, который остается полуметилированным в течение ~20 мин, является локус *oriC* (см. раздел 16.4.1.1).

Регуляторный эффект метилирования выражается в том, что локусы *oriC* и *dnaA* координированно и обратимо переходят от полуметилированного (неактивного) к полностью метилированному (активному) состоянию. Когда активны оба хромосомных локуса, ген *dnaA* активно транскрибируется, что позволяет его продукту инициировать репликацию в локусе *oriC*. После завершения раунда репликации локусы *oriC* и *dnaA*, расположенные на дистанции ≤50 т.п.н. друг от друга, почти одновременно переходят в полуметилированное состояние и инактивируются. Локус *oriC* образует тройственный комплекс с белком SeqA и клеточной оболочкой. Изолированный от репликомы ориджин не может приступить к новому раунду репликации даже при высоком содержании белка DnaA.

Аналогичный контроль репликации путем Dam-метилирования осуществляется в случае плазмид и профагов, когда те и другие реплицируются с помощью тета-механизма (см. раздел 16.4.1.2).

Наконец, особая система метилирования ДНК существует у *Caulobacter crescentus* и ряда других протеобактерий. В данном случае метилтрансфераза CsrM модифицирует остатки аденина в

повторяющейся последовательности GANTC (где N — один из четырех нуклеотидов). Полагают, что такая система выступает в роли регулятора диморфного клеточного цикла (см. раздел 17.1).

Пострепликативная mismatch-репарация. Эта репарационная система предназначена для устранения ошибок репликации, по тем или иным причинам не исправленных автокорректирующей ДНК-полимеразой Pol III. К данной теме мы уже обращались в разделах 16.4.1 и 16.5.1.2.

Регуляция экспрессии генов. Напомним, что для прокариотов контроль экспрессии генов путем метилирования в целом не характерен. Два самых известных примера — это ген *dnaA* и ген транспозазы инсерционной последовательности IS10 (см. ниже).

Приведем еще два примера Dam-зависимой экспрессии; они касаются генов *tot* и *pap*. Ген *tot* (сокр. англ. modification in Mu) отвечает за специфическую модификацию путем превращения аденина в ацетамид-аденин, благодаря чему ДНК бактериофага Mu приобретает устойчивость к хозяйской рестрикции. В свою очередь, ген *pap* (сокр. англ. pyelonephritis associated pili), имеющийся у уропатогенных штаммов *E. coli*, отвечает за образование Pap-фимбрий II типа (см. I том учебника). «Фазовая» осцилляция Pap-фимбрий происходит между состоянием экспрессии (англ. phase on) и отсутствием экспрессии (англ. phase off). Оперон *papBA* содержит сайты GATC₁₀₂₈ и GATC₁₁₃₀, уровень метилирования которых коррелирует с фазовым состоянием. В состоянии phase off сайт GATC₁₀₂₈ метилирован полностью, а сайт GATC₁₁₃₀ полностью неметилирован; обратная картина наблюдается в состоянии phase on. На изменение уровня метилирования этих сайтов влияет продукт гена *papI*, являющийся позитивным регулятором транскрипции гена пилина (подробнее см. раздел 16.8).

Транспозиция мобильных элементов. Путем Dam-метилирования регулируется транспозиция некоторых мобильных элементов (см. раздел 16.3.1.3), в том числе составного транспозона Tn10, обеспечивающего устойчивость к тетрациклину. Он содержит инвертированные инсерционные последовательности IS10, причем только правая из них кодирует активную транспозазу. Внутри этой последовательности находятся два сайта GATC — один в промоторном участке транспозазы, другой во внутреннем инвертированном концевом повторе; метилирование влияет на активность обоих локусов. В чем биологический смысл этого явления?

Как выяснилось, активность гена транспозазы возрастает в полуметилированном состоянии — степень метилирования сайта GATC непосредственно определяет сродство промотора к РНК-полимеразе. Кроме того, транспозиции чаще подвергается IS10, метилированная на кодирующей (ведущей) цепи. А поскольку после прохождения репликационной вилки метилирование сохраняется именно в этой цепи, клетка получает как минимум одну копию локуса, способного к транспозиции.

Контроль упаковки фаговой ДНК. Упаковке ДНК бактериофага P1 предшествует разьединение конкатемеров (англ. concatemer; от лат. concatenatus — образующий цепочку и греч. meros — часть), или вирусных геномов, ковалентно связанных друг с другом. От сайта расщепления конкатемера в локусе *pac* (~160 п.н.) начинается односторонняя упаковка ДНК в прокапсид. Поскольку количество инкапсидированной ДНК превышает размер генома на 10–15%, ее молекулы содержат одинаковые последовательности на обоих концах. Благодаря такой концевой «избыточности» фаговая ДНК способна переходить в кольцевую форму, что способствует ее рекомбинации с ДНК хозяина. Расщепление каждого конкатемера по локусу *pac* привело бы к образованию одиночных геномных эквивалентов, лишенных концевой избыточности. Поэтому должен существовать механизм, который контролировал бы выбор локуса *pac*, маркирующего начало упаковки фаговой ДНК.

Установлено, что каждый локус *pac* содержит семь сайтов GATC, которые могут метилироваться с помощью фаговой Dam-метилазы. При репликации образуются устойчивые к расщеплению неметилированные и полуметилированные локусы *pac*, а также чувствительные к расщеплению метилированные локусы *pac*, маркирующие начало упаковки фаговой ДНК. Полному метилированию неметилированных и полуметилированных локусов *pac* препятствует связывающийся с ними хозяйский или фаговый белок «паказа» (англ. pacase; от pack — упаковывать). Таким образом, выбор локуса *pac*, маркирующего начало упаковки фаговой ДНК, определяется балансом между метилированием и связыванием паказы, в результате чего на один функциональный локус *pac* приходится 3–5 нефункциональных.

Как мы уже отмечали, метилированию подвергаются нуклеотиды в обеих комплементарных цепях ДНК. Однако для появления устойчивости к рестриктазе достаточно, чтобы оно произошло только в одной цепи. Физиологический смысл устойчивости такой полуметилированной ДНК к эндонуклеазному расщеплению очевиден, поскольку новые цепи, образующиеся в ходе репликации, вначале не метилируются (см. раздел 16.4.1.1).

R—M системы. Распространение R—M систем ограничено миром прокариотов, главным образом бактериями. Аналогичные системы открыты у архей (например, *MwoI* — система типа II *Methanobacterium wolfei*), хотя они более редки и изучены хуже, чем у бактерий. «Автометилирующие» метилтрансферазы типа II (см. ниже) закодированы в геномах ряда вирулентных и умеренных бактериофагов, а также в виде исключения имеются у вирулентных вирусов *Chlorella* sp. Но даже в случае бактерий они выявлены только у 25% изученных штаммов, что может тривиально объясняться упущениями при анализе. Зато половина из них обладает сразу несколькими R—M системами.

Селективная выгода, которую придают бактериям разные R—M системы, обуславливает их широкое распространение и исключительное разнообразие (>3 тыс вариантов).

В настоящее время описаны несколько типов R—M систем, которые выполняют одну и ту же биологическую функцию, хотя разными способами. Их особенности касаются субъединичного состава, используемых кофакторов, а также структуры сайта узнавания и местоположения сайта рестрикции (табл. 24).

Таблица 24. Свойства бактериальных R—M систем

Тип системы	Соотношение реакций рестрикции и модификации; состав ферментов	Сайт узнавания	Положение сайта рестрикции	Кофакторы реакции рестрикции
I	Альтернативные реакции; осуществляются бифункциональным ферментом, состоящим из трех субъединиц	Специфические последовательности длиной 3 и 4 п.н., разделенные неспецифическим спейсером длиной 6–8 п.н.	На большом расстоянии (≥ 1 т. п.н.) от сайта узнавания	Mg^{2+} , АТФ, SAM*
II и IIS	Параллельно протекающие реакции; осуществляются разными ферментами; рестриктаза состоит из двух субъединиц (тип II) или из одной субъединицы (тип IIS), метилтрансфераза из одной субъединицы	Специфическая последовательность длиной 4–8 п.н. (в большинстве случаев палиндром)	Совпадает с сайтом узнавания (тип II) или находится по одну сторону от него, на расстоянии 1–20 п.н. (тип IIS)	Mg^{2+}
III	Параллельные реакции; осуществляются бифункциональным ферментом из двух субъединиц	Специфическая асимметричная последовательность длиной 5–6 п.н.	На расстоянии 24–26 п.н. от 3'-конца сайта узнавания	Mg^{2+} , АТФ, SAM

* — S-аденозил-L-метионин.

Для обозначения R—M систем используются 3-х буквенные сокращения имени их обладателя; первая буква обозначает род, вторая и третья вид; иногда за ними следует индекс штамма, а римская цифра указывает на тип системы (например, *EcoRII* — это R—M система *E. coli* штамма R, тип II).

Гены, кодирующие компоненты R—M систем, обозначаются либо как *hsd* (сокр. англ. host-specificity of DNA), либо по конкретной субъединице, например *mod* (сокр. англ. modification). Они входят в состав хромосомного генома (например, в случае системы *EcoA*), плазмидного генома (например, в случае системы *EcoRI*) или вирусного генома (например, в случае системы *EcoP1*) и чаще всего тесно сцеплены друг с другом.

R—M системы типа I. Системы данного типа имеются у энтеробактерий *E. coli*, *Citrobacter* spp. и *Salmonella* spp. Они наиболее сложны и состоят из трех субъединиц: R (135 кДа; ген *hsdR*) — рестрицирующей; M (62 кДа; ген *hsdM*) — модифицирующей и S (55 кДа; ген *hsdS*) — обеспечивающей специфическое распознавание сайта метилирования. Комплекс субъединиц, представленных в разном стехиометрическом соотношении (например, 2:2:1 в случае *EcoK*), является мультифункциональным ферментом — он играет роль рестриктазы, метилазы, АТФазы и ДНК-топоизомеразы.

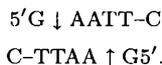
В присутствии SAM субъединица R связывается с сайтом узнавания независимо от того, метилирован он или нет. Если сайт узнавания был полностью метилирован, голофермент диссоциирует от ДНК, если полуметилирован — субъединица M метилирует вторую цепь, если вообще не метилирован — голофермент выступает в роли топоизомеразы и, благодаря принудительному изгибу ДНК, наносит разрез в переменном положении на значительном удалении от сайта узнавания. Первые две реакции стимулируются связыванием АТФ, а третья использует энергию гидролиза АТФ.

R—M системы типа II. Это самые распространенные системы — их открыто около 3 тыс, с учетом всех *изошизомеров* (англ. isoschizomer; от греч. isos — равный, schizo — раскалывать и meros — часть; в данном случае — рестриктазы разных объектов, разрезающие в одинаковом месте один и тот же вариант последовательности; например, для рестриктаз *Bam*HI и *Pae* 177I это последовательность GTGATCC). Они проще других, поскольку два фермента по отдельности катализируют рестриктазную и метилазную реакции.

Главный признак системы типа II — это то, что рестриктаза наносит разрез в пределах сайта узнавания или близко к нему; кроме того, для нуклеолитической реакции не требуется гидролиз АТФ. Рестриктаза представляет собой гомодимер субъединиц молекулярной массой ~30 кДа.

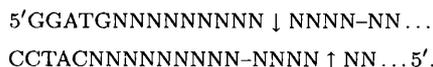
Сайт узнавания обычно палиндромный, со сплошной структурой, например GAATTC, или с прерывистой структурой, например GANTC или CCAN₉TGG (где N — один из четырех нуклеотидов). Встречаются уникальные сайты узнавания, например GTCGAC, и вырожденные сайты, например GTYRAC (где Y — цитозин или тимин и R — аденин или гуанин).

Рестриктазы типа II наносят разрез внутри комплементарных последовательностей сайта узнавания; каноническим примером служит рестриктаза *Escherichia coli* R *EcoRI*:



Поскольку сайт рестрикции представляет собой палиндром, в двухцепочечной ДНК делаются симметричные разрезы с образованием коротких одноцепочечных липких концов (в приведенном примере это AATT). Такое замечательное свойство продуктов рестрикции широко используется в молекулярной биологии при конструировании гибридных ДНК (см. раздел 16.1.2.3).

Систем подтипа IIS насчитывается на порядок меньше, чем типа II. Они распознают асимметричную сплошную последовательность длиной 4–7 п.н. и наносят разрез по одну сторону от сайта узнавания, обычно на фиксированном расстоянии в 1–20 п.н. от него. Примером служит рестриктаза *Flavobacterium okeanokoites* *Fok* I:



Иными словами, рестриктазы подтипа IIS содержат домен, отвечающий за распознавание сайта узнавания, и домен, отвечающий за распознавание сайта рестрикции (в этом отношении они сходны с рестриктазами класса III; см. ниже).

В отличие от канонических R—M систем типа II, 5'-3' последовательности в комплементарных цепях сайта узнавания различаются (в приведенном примере это GGATG и CATCC), т. е. он имеет асимметричную структуру.

Наконец, в отличие от димерных рестриктаз типа II, рестриктазы подтипа IIS представляют собой мономеры молекулярной массой 50–110 кДа.

Помимо канонической системы типа II и системы подтипа IIS, в настоящее время описаны системы подтипов IIB, IIE, IIF, IIG, IIM и IIT. Они имеют разный субъединичный состав и различаются по количеству, а также по местоположению сайтов рестрикции.

R—M системы типа III. Данные системы встречаются гораздо реже остальных. Они обнаружены только в четырех случаях — у профага P1 (*EcoP1*), у плазмиды P15 *E. coli* (*EcoP15*), у *Haemophilus influenzae* серотип f (*Hin*III) и у *Salmonella enterica* штамм LT (*Sty*LTII). Все они состоят из двух субъединиц: R (~110 кДа; ген *hsdR* или *res*) — рестрицирующей и MS (~75 кДа; ген *hsdMS* или *mod*) — с двойной функцией узнавания и модифицирования.

Уникальным свойством данных систем является то, что при модификации метилируется только одна цепь ДНК. Но поскольку при репликации метилирование сохраняется только в одной

сестринской молекуле ДНК, встает вопрос, что позволяет другой, полностью неметилированной молекуле ДНК избежать рестрикции?

Есть предположение, что в данном случае для рестрикции требуются два модифицированных сайта противоположной ориентации. В свою очередь, два сайта прямой ориентации устойчивы к рестрикции, но могут модифицироваться. А поскольку после репликации немодифицированные сайты оказываются в прямой ориентации, они не рестрицируются.

Рестрикция, требующая модификации. До сих пор мы обсуждали только такую рестрикцию, которая блокируется метилированием.

В настоящее время установлено, что рестрикционные системы подразделяются на:

— классические R–M системы типов I–III (клеточная ДНК защищается от рестрикции путем модификационного метилирования по остаткам аденина и цитозина, расположенным внутри сайта узнавания);

— неклассические R–M системы (которые расщепляют только специфически модифицированную ДНК).

Примером неклассических R–M систем служат имеющиеся у *E. coli* системы McrA и McrBC (сокр. англ. modified cytosine restriction), а также система Mrr (сокр. англ. modified adenine recognition and restriction). Они кодируются плазмидами и разрезают сайты фаговой ДНК, содержащие 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, N⁴-метилцитозин или N⁶-метиладенин.

Такие системы используют в качестве кофакторов катионы Mg²⁺, а также ГТФ (в случае McrBC) и не обладают модифицирующей активностью. Каково же их предназначение?

Скорее всего, неклассические R–M системы служат для целенаправленной борьбы с теми бактериофагами, ДНК которых содержит модифицированные основания. Иными словами, клетке гораздо выгоднее иметь упрощенную систему рестрикции, чем расходовать метаболические ресурсы на биогенез более громоздких классических R–M систем.

16.6. ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМА

Постоянство прокариотных геномов не абсолютно. Время от времени они подвергаются эндогенным перестройкам и экзогенным рекомбинациям (см. ниже). Эти изменения носят наследственный характер и составляют полезный ресурс адаптивной эволюции.

По мере накопления наследственных изменений потомки не только генетически дистанцируются от своих предков, но и взаимно дивергируют. В итоге образуются две перекрывающиеся сферы биоразнообразия прокариотов — актуалистическая и виртуальная. Первая сфера представлена (не)культивируемыми объектами; их изучают при помощи многофакторного анализа (см. I том учебника). Вторая сфера состоит из фантомных объектов, которых исследуют традиционными методами молекулярной геномики, а также с помощью аналитического аппарата новой дисциплины — *метагеномики* (см. раздел 16.6.3 настоящего тома).

Наряду с наследственными изменениями у бактерий возможны ненаследуемые внутригеномные перестройки. Однако они происходят только у некоторых типов терминально дифференцированных клеток (см. раздел 16.6.2). Хотя такие изменения также имеют адаптивный характер, в эволюции генома они не участвуют.

16.6.1. Наследственные изменения

При размножении прокариотов, которое обычно происходит путем бинарного деления, материнская клетка передает свои генетические детерминанты дочерним клеткам. Возможность, воспроизводимость и полноценность передачи эстафеты генотипа гарантируются матричным копированием ДНК, а также эффективностью «работы над ошибками», возникающими в ходе этого процесса (см. разделы 16.4 и 16.5).

Поскольку механизмы репликации и репарации действуют с высокой надежностью, прокариоты в полной мере обладают свойством, присущим любому живому существу — консерватизмом наследственности, что, впрочем, не препятствует наследственной изменчивости.

У прокариотов существуют два пути преодоления консерватизма наследственности и, соответственно, два типа наследственных изменений генома.

Те из них, которые происходят в процессе клонального размножения и сопровождаются изменениями фенотипа, относятся к *мутациям* (генным и хромосомным).

Независимо от мутагенеза существует другой механизм, также обеспечивающий наследственную изменчивость. Он связан с *генетической рекомбинацией* между клетками, происходящими из разных клональных популяций, и называется *горизонтальным*, или *латеральным* переносом генов (см. разделы 16.6.1.2 и 16.6.1.3).

Спонтанные мутации создают новые аллели, а генетическая рекомбинация — новые сочетания уже существующих аллелей. Таким образом, мутации могут распространяться в микробных популяциях двумя путями: благодаря вертикальному наследованию и за счет горизонтального переноса.

Возникновение и поддержание разнообразия жизненных форм служит одним из условий существования биосферы, и поэтому механизмы мутагенеза и генетической рекомбинации подвергались позитивной селекции на всем протяжении органической эволюции.

16.6.1.1. Мутации

Системы репликации и репарации несовершенны и постоянно ошибаются, в результате чего возникают наследственные различия между представителями одной и той же генеалогической линии. Такие различия, касающиеся структуры нуклеотидной последовательности и/или количества ДНК, называются *мутациями* (англ. *mutation*; от лат. *mutatio* — изменение вообще; в данном случае — изменение генома), а их возникновение — *мутагенезом* (англ. *mutagenesis*) или *мутированием* (англ. *mutability*).

Термины «мутация» и «мутагенез» часто используются как синонимы, хотя, строго говоря, они не равнозначны.

Применительно к прокариотной клетке мутацией называется нерекомбинативное необратимое изменение информационных свойств хромосомы, плазмиды или умеренного фага. Точнее сказать, мутация представляет собой изменение кодирующей или регуляторной последовательности в пределах одной группы сцепления, либо изменение набора/числа групп сцепления. В первом случае это *cis*-мутация, во втором случае — *trans*-мутация.

Классификация мутаций. Поскольку единой общепризнанной классификации мутаций не существует, мы приведем один из возможных вариантов.

По общему характеру вызвавших их причин мутации подразделяются на две группы:

- спонтанные;
- индуцированные.

Спонтанные мутации служат побочным эффектом эндогенных физиологических процессов. Они происходят постоянно и, как правило, с индивидуальной частотой.

Индуцированные мутации являются результатом воздействия на наследственный аппарат тех физико-химических факторов внешней среды, которые напрямую изменяют структуру ДНК или косвенно влияют на точность репликации. Они происходят периодически, и их частота, как правило, выше частоты спонтанных мутаций.

В свою очередь, по общему характеру инфраструктурных изменений генетического материала мутации можно подразделить на две группы:

- генные мутации;
- хромосомные мутации.

Генные мутации (см. раздел 16.3.1.3) представляют собой структурные изменения генов или генетических элементов, контролирующих гены. Такие мутации вызывают изменения фенотипа через изменение структуры продуктов генной экспрессии (белка, рРНК и тРНК), или посредством изменений уровня генной экспрессии.

Хромосомные мутации изменяют набор, число и взаимное расположение генов или набор и число групп сцепления. Такие мутации влияют на комплексную фенотипическую экспрессию генов.

Вредные, нейтральные и полезные мутации. Изменения нуклеотидной последовательности ДНК при точечных мутациях, а также при мутациях со сдвигом рамки считывания (см. ниже) связаны с заменой, инсерцией или делецией одного или нескольких нуклеотидов. Такие мутации возникают случайно и распределяются более или менее равномерно по всему геному, за исключением преимущественно мутирующих «горячих» точек.

Первичным фенотипическим проявлением точечных мутаций и мутаций со сдвигом рамки считывания служит изменение аминокислотной последовательности белка. В свою очередь, структурные изменения белка приводят к разным физиологическим результатам, в зависимости от того, затрагиваются или остаются интактными ключевые сайты/домены полипептидной цепи.

Большинство мутаций, изменяющих аминокислотную последовательность, приводит к образованию функционально неполноценных белков. Такие мутации называются *вредными*, и они отбраковываются естественным отбором. Относительно небольшое число мутаций (на четыре-пять порядков меньше, чем вредных) приводит к образованию более эффективного белкового продукта. Такие мутации называются *полезными*, они подхватываются естественным отбором, и при распространении мутантной аллели в микробной популяции она, в конце концов, может *закрепиться*, т.е. вытеснить аллель дикого типа. Наконец, определенная часть мутаций не оказывает заметного влияния на функцию белка. Такие мутации называются *нейтральными*, и их закрепление может быть результатом случайного *дрейфа генов*.

В большинстве случаев мутации проявляются на фенотипическом уровне, и тогда речь идет о соответствующих *мутантах*.

В зависимости от конкретного характера структурно-функциональных изменений, по сравнению с микроорганизмом дикого типа, различают следующие группы мутантов:

- цитоморфологические;
- по клеточному делению;

- по клеточной дифференциации;
- биохимические;
- транспортные;
- метаболические;
- регуляторные;
- поведенческие;
- по экологической адаптации;
- по симбиотическим свойствам.

Мутация, произошедшая в одном гене, может воздействовать сразу на несколько фенотипических признаков. Такие мутации называются *плейотропными* (греч. pleion — многочисленный и tropos — направление). Причина плейотропного эффекта геновой мутации заключается в способности последней вызывать эпигенетические изменения, поскольку продукт отдельного гена может участвовать одновременно в нескольких процессах или структурах.

В частности, мутация по гену фитоиндесатуразы приводит к блокированию глобального пути биосинтеза окрашенных каротиноидов (см. II том учебника), хотя остальные ферменты данного пути остаются незатронутыми. Благодаря такой мутации изменяется не только окраска клетки, но и нарушается биогенез фотосинтетического аппарата, повышается чувствительность к окислительному стрессу и т. д.

В некоторых случаях фенотипический эффект мутации реализуется только в специфических условиях роста. Например, потеря способности к самостоятельному биосинтезу первичного метаболита или витамина из-за мутационных дефектов соответствующих ферментов приводит к тому, что рост бактерий становится возможным только на средах с этими соединениями. Такие мутанты называются *ауксотрофными* (греч. auxo — выращиваю и trophe — питаюсь) в отличие от клеток дикого типа, или *прототрофов* (греч. protos — изначальный и trophe — питаюсь), развивающихся на минимальной среде (англ. minimal medium), т. е. без ростовых добавок.

Другим примером, когда изменение фенотипа наблюдается в специфических условиях роста, служат *термочувствительные* мутанты (англ. thermo-sensitive). В данном случае мутация проявляется только при перmissive температуре (англ. permissive — разрешающий). Хрестоматийным примером служат *fts*-мутанты *E. coli*, которые при супероптимальной температуре продолжают расти без деления, в результате чего клетки теряют палочковидную форму и превращаются в полиплоидные филаменты (см. раздел 17.4.2).

Закономерность спонтанных мутаций. Спонтанные мутации постоянно происходят в размножающихся популяциях бактерий. Для такого процесса наследственной изменчивости существует особое название — *мутагенез, зависящий от смены поколений* (англ. generation-dependent mutagenesis).

Спонтанные мутации являются движущей силой органической эволюции. Однако с какой закономерностью они происходят?

По современным представлениям, можно говорить о двух взаимно дополняющих сценариях.

С одной стороны, спонтанные мутации накапливаются в микробной популяции с относительно постоянным темпом, не зависящим от селекционного давления со стороны окружающей среды. Они случайным образом создают резерв адаптационных свойств, который становится актуальным при изменении внешних условий в (не)благоприятную сторону, т. е. при появлении соответствующего селекционного давления.

Классическое доказательство ненаправленного характера спонтанных мутаций и их неадаптивности было получено в начале 1940-х годов Сальвадором Лурия (S. E. Luria; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1969 г.) и Максом Дельбрюком (M. Delbrück; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1969 г.).

На примере *E. coli* они проанализировали частоту мутаций, вызывающих устойчивость к бактериофагу T1. Для сравнения были взяты две культуры одинаковой плотности, но разного объема (малая и большая). Клетками из таких культур в равном количестве засеивали два ряда чашек Петри с газоном бактериофага. При подсчете оказалось, что число устойчивых колоний, полученных при посеве малой культуры, было в среднем ниже, хотя и давало отдельные флуктуации.

тогда как для посева клеток из большой культуры оно было в среднем выше и характеризовалось меньшей дисперсией. Отсюда следовало, что устойчивые клетки возникли еще до встречи с бактериофагом; в противном случае в обоих вариантах опыта их число не различалось бы ни по среднему количеству, ни по характеру дисперсии. В историю генетики этот тест вошел под названием «флуктуационного».

С другой стороны, могут происходить вспышки спонтанных мутаций, когда геномная нестабильность бактерий провоцируется разнообразными экологическими стрессами. В данном случае под влиянием неблагоприятных условий среды происходит *мутагенез, индуцированный стрессом* (англ. stress-induced mutagenesis).

За счет повышения скорости спонтанного мутирования в популяции появляются *фиттинг-мутанты* (англ. fitter — ремонтник; в данном случае — лучше приспособленный), обладающие более высоким уровнем адаптации, чем клетки дикого типа.

Иными словами, повышение скорости мутирования становится частью популяционного ответа на стресс, вызванный низким исходным уровнем экологической адаптации. Хотя такой индуцированный мутагенез ускоряет адаптивную эволюцию, он происходит только в период стресса. Мутанты, адаптированные к новым условиям, уже не находятся в состоянии стресса и поэтому возвращаются к низкой скорости мутирования.

Спонтанные мутации. Существуют два эндогенных источника спонтанных мутаций — накопление эндометаболитов, непосредственно изменяющих структуру ДНК, и эндогенные ошибки репликации.

Химические индукторы мутаций называются *мутагенами*. Различают мутагены-эндометаболиты и внешние мутагены. Мутации, вызванные мутагенами-эндометаболитами, в нормальных условиях очень редки. Однако в некоторых случаях их частота увеличивается сразу на несколько порядков, например при окислительном стрессе, когда в клетке накапливаются активные формы кислорода или азота (см. раздел 19.1.6.1).

Эндогенные ошибки репликации происходят с очень низкой частотой, порядка 10^{-9} , поскольку репликативные ДНК-полимеразы Pol I и Pol III обладают способностью к автокоррекции (см. раздел 16.4.1.1). Тем не менее, частота эндогенных ошибок резко возрастает в условиях стресса, когда роль репликаз на время переходит к SOS-полимеразам Pol IV и Pol V (там же).

Индукцированные мутации. В разделе 16.5.1 мы уже перечислили основные физические и химические агенты, повреждающие структуру ДНК, и кратко охарактеризовали природу этих повреждений.

Напомним, что к числу физических факторов, служащих индукторами мутаций, в первую очередь относится ультрафиолетовое излучение.

Мутагены, поступающие в клетку из окружающей среды, могут вызывать два типа генных мутаций — точечные мутации, когда изменяется пара оснований, и мутации со сдвигом рамки считывания, когда происходит инсерция (т. е. вставка) или делеция (т. е. выпадение) одной или нескольких нуклеотидных пар.

При *точечных мутациях* (англ. point mutation) мутагены непосредственно изменяют структуру азотистых оснований или включаются в состав ДНК вместо канонических оснований. В обоих случаях это ведет к ошибке в очередном цикле репликации.

Некоторые химические соединения, которые называются *супермутагенами*, способны индуцировать мутации с особо высокой частотой. Ярким примером супермутагена служит N-метил-

N'-нитро-N-нитрозогуанидин (англ. nitrosoguanidine, NTG). Его воздействие на ДНК связано с прямым метилированием аденина и гуанина, в результате чего образуются соответственно 7-метиладенин и 7-метилгуанин (рис. 197, А). Такие химически модифицированные основания продолжают участвовать в нормальном спаривании, т.е. их образование не вызывает ошибок при репликации. Однако они не воспринимаются как канонические основания ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, что приводит к появлению множественных ошибок при считывании, в том числе к сдвигу рамки. Последствиями этого становятся патологические изменения фенотипа.

Точечная мутация может произойти в любой паре оснований двухцепочечной ДНК. Замена в паре оснований пурина другим пурином ($GC \rightarrow AT$, $AT \rightarrow GC$) или пиримидина другим пиримидином ($CG \rightarrow TA$, $TA \rightarrow CG$) называется *транзицией* (англ. transition). Она приводит к изменению типа спаривания. В свою очередь, замена пурина пиримидином ($AT \rightarrow TA$, $GC \rightarrow CG$) или пиримидина пурином ($TA \rightarrow AT$, $CG \rightarrow GC$) называется *трансверсией* (англ. transversion). Она не изменяет тип спаривания, но приводит к перераспределению оснований между двумя цепями ДНК. В обоих случаях, если произошедшее изменение осталось нерепарированным, оно закрепляется в результате репликации.

Транзиция с изменением типа спаривания часто вызывается прямым превращением одного основания в другое. Характерным примером служит мутагенное воздействие азотистой кислоты, которая окислительно дезаминирует цитозин в урацил (рис. 197, Б), в результате чего GC-пара превращается в GU-пару. В следующем цикле репликации урацил спаривается уже не с гуанином, а с аденином, т.е. происходит промежуточное образование неканонической AU-пары. В очередном цикле репликации аденин спаривается с тиминном, что приводит к окончательной замене исходной GC-пары на AT-пару.

Другой причиной транзиции может стать *ошибка спаривания* (англ. mismatch). Поскольку некоторые мутагены являются стерическими аналогами обычных оснований, они включаются вместо них в состав ДНК. Например, кетоформа 5-бромурацила является аналогом тимина и поэтому образует пару с аденином. В результате спонтанной таутомеризации она переходит в редкую енольную форму, которая при репликации спаривается уже не с аденином, а с гуанином (рис. 197, В). После очередного цикла репликации происходит окончательная замена исходной AT-пары на GC-пару. Иными словами, после однократного ошибочного включения 5-бромдезоксимурацила в состав полинуклеотидной цепи он будет индуцировать транзицию в каждом новом цикле репликации.

Мутации со сдвигом рамки считывания (англ. frameshift), как уже отмечалось, связаны со вставкой или делецией одного или нескольких нуклеотидов, что нарушает порядок взаимного расположения кодирующих триплетов.

Такое структурное изменение часто затрагивает последовательность, состоящую из одинаковых оснований (например, АААА). Предполагается, что в результате одноцепочечного разрыва ДНК локально денатурируется («плавится»), и в ней образуется одноцепочечная петля. При воссоединении («отжиге») цепей происходит случайное смещение фазы спаривания на один или несколько нуклеотидов. Образовавшаяся брешь и одноцепочечный разрыв репарируются с помощью ДНК-полимеразы Pol I и ДНК-лигазы. Фиксация положения ошибочно реассоциированного участка осуществляется в ходе репликации, что приводит к сдвигу рамки считывания.

Еще одной причиной мутаций со сдвигом рамки считывания служат некоторые мутагены, в частности из группы акридина (рис. 197, Г). Молекулы акридина и его

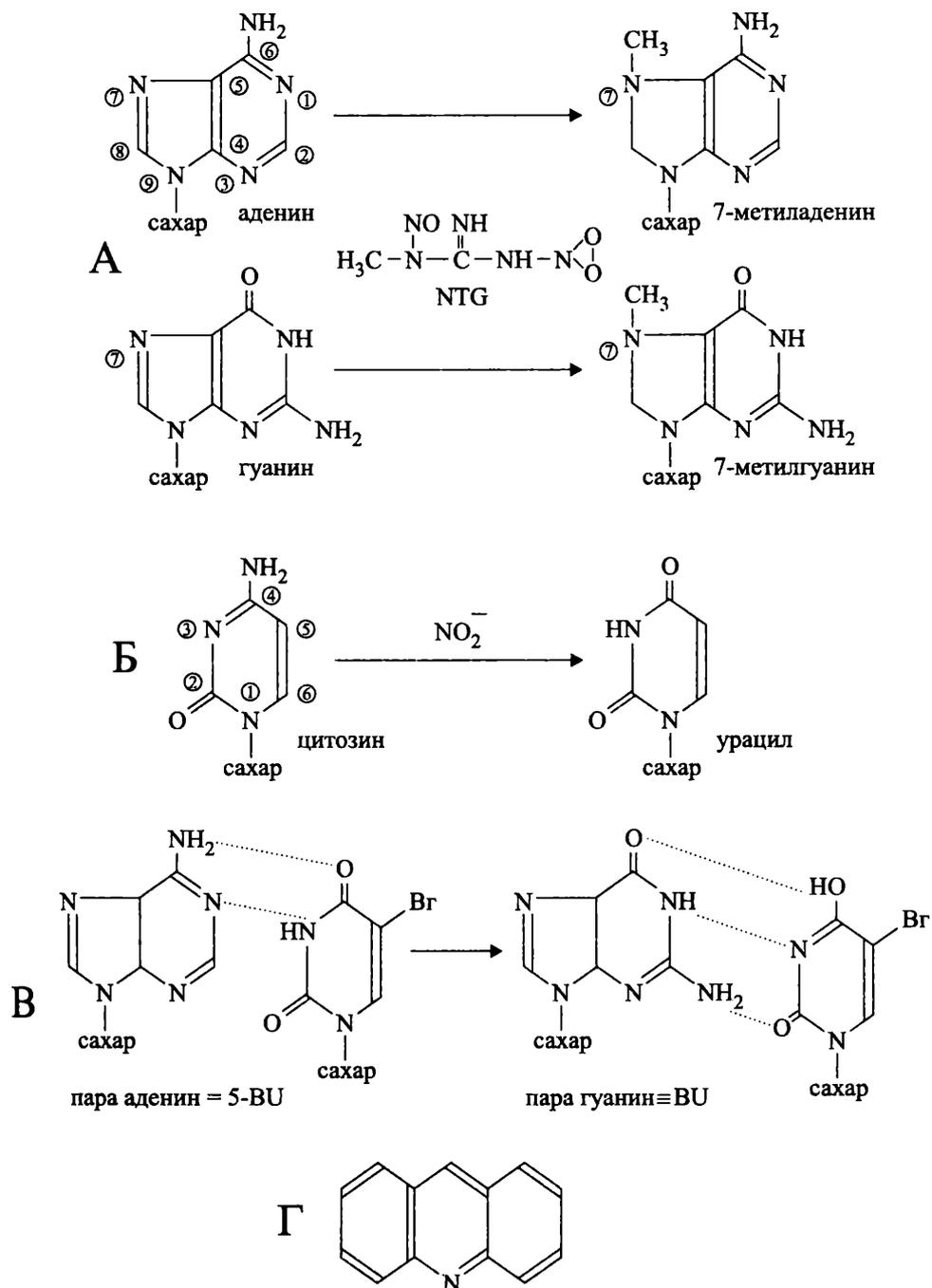


Рис. 197. Примеры мутагенов и пути их воздействия на структуру ДНК.
 А — превращение аденина и гуанина в метильные производные с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (NTG); Б — дезаминирование цитозина с помощью азотистой кислоты; В — замена пары оснований в результате таутомеризации 5-бромурацила; Г — структура акридина.

производных, например акрифлавина, являются структурными аналогами пуриновых оснований. Они интеркалируют (т. е. встраиваются) между соседними парами оснований в малой борозде ДНК, в результате чего при образовании репликационной вилки в одной из цепей имитируется дополнительное основание. При копировании такой цепи в результате ошибочного спаривания с акридином в дочернюю цепь включается дополнительное основание. Акридины могут индуцировать не только одиночные inserции, но и одиночные делеции.

Мутации со сдвигом рамки считывания происходят в несколько раз чаще, чем мутации с заменой оснований (соответственно 80% и 20%).

Исключением служат спонтанные *мутации по горячим точкам* (англ. hot spot mutation). Данным термином обозначаются сайты, содержащие один из продуктов пострепликационной модификации ДНК — 5-метилцитозин (см. раздел 16.5.2). И обычное, и модифицированное основание способны спонтанно дезаминироваться, однако с разными последствиями. В первом случае цитозин превращается в урацил, и поэтому GC-пара заменяется ошибочной GU-парой. Такой дефект распознается системой эксцизионной репарации с удалением основания (см. раздел 16.5.1.2). Во втором случае 5-метилцитозин превращается в тимин, и поэтому GC-пара заменяется ошибочной GT-парой, которая уже не распознается репарационной системой, поскольку тимин — это нормальный компонент ДНК. После очередного акта репликации GT-пара окончательно заменяется AT-парой.

Хромосомные мутации. В отличие от генных мутаций, которые происходят по одному или нескольким нуклеотидам в пределах последовательности отдельного гена, хромосомные мутации затрагивают одновременно много генов или изменяют архитектуру хромосомы в целом.

Частой причиной хромосомных мутаций служат мобильные элементы (см. раздел 16.3.1.3). Вызываемые ими *инсерционные мутации* затрагивают большие участки ДНК. Как уже отмечалось, происходящие изменения подразделяются на inserции, делеции, инверсии, дупликации и транслокации (см. рис. 172, А-Е).

Мутации, индуцированные стрессом. Мы уже говорили о том, что большинство мутаций носит вредный характер, и их накопление может привести к вымиранию популяции. Отсюда следует, что прокариотам выгодно максимально ограничить скорость мутирования — что они и делают, корректируя эндогенные ошибки, а также устраняя экзогенные повреждения. Легко заметить, что подобная консервативная стратегия становится барьером на пути эволюционного процесса.

Для выхода из кажущегося тупика прокариоты прибегают к альтернативной стратегии, которая вносит изменения в структуру генома — в нем закрепляются спонтанные мутации и «горизонтальным» путем приобретаются нуклеотидные последовательности чужеродной ДНК. В ходе селекционного процесса это позволяет предпочесть старым аллелям новые аллели, продукты экспрессии которых обеспечивают лучшую адаптацию к измененным условиям среды. Ярким примером служит появление в популяциях патогенных бактерий спонтанных мутантов, устойчивых к антибиотикам, что является серьезной клинической проблемой.

Особый вариант наследственной изменчивости связан с повышением спонтанной мутабельности в неблагоприятных условиях среды, т. е. при стрессах разного типа. Такое неординарное явление изучается с конца 1980-х годов, в основном на примере *E. coli* и родственных ей бактерий.

Соответствующие мутации получили название *мутаций, индуцированных стрессом* (англ. stress-induced mutation). Те из них, которые оказываются полезными и обеспечивают выживание микробной популяции, были названы *адаптивными мутациями* (англ. adaptive mutation).

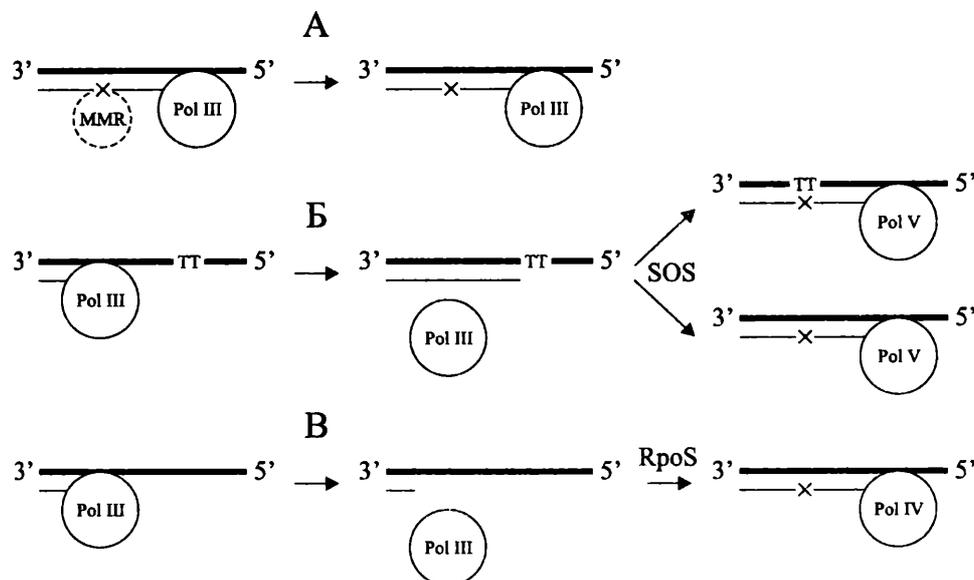


Рис. 198. Причины повышения частоты точечных мутаций на примере *E. coli*.

А — дефект системы репарации ошибок спаривания; Б — репликация «поверх поврежденного» с помощью SOS-индуцированной ДНК-полимеразы Pol V (сверху — мутация в поврежденном локусе, снизу — «неадресная» мутация из-за ошибки Pol V); В — индукция RpoS-регулона при голодании, вызывающая адаптивную экспрессию «склонной к ошибкам» ДНК-полимеразы Pol IV.

Pol III — репликативная ДНК-полимераза; MMR — система репарации ошибок спаривания; TT — тиминный димер; SOS — индукция SOS-регулона в ответ на фотоповреждение ДНК; Pol IV и Pol V — SOS-полимеразы.

x — точечная мутация.

Адаптивные мутации, подобно мутациям в отсутствие стресса, происходят спонтанно и случайно, и поэтому их появление и накопление не должны рассматриваться как проявление направленной эволюции.

Известны три механизма повышения мутабельности бактериальной популяции (рис. 198).

Первый из них (рис. 198, А) — конститутивный. Он связан с генетическим дефектом MMR-системы, которая в норме реагирует на отсутствие метилирования оснований в дочерней цепи ДНК, исправляя ошибки спаривания, совершенные репликативной ДНК-полимеразой Pol III (см. раздел 16.5.1.3).

Селекция, происходящая в условиях стресса, приводит к обогащению микробной популяции мутантами, характеризующимися повышенной частотой мутирования, или *мутаторами* (англ. mutator mutant). Мутаторами и *гипермутаторами* (англ. hypermutator) называются такие штаммы, у которых скорость мутирования увеличена на два порядка и более из-за нарушения в генах, кодирующих репарационную систему исправления ошибок спаривания MMR (*mutSLH* и *uvrD*). Такие мутанты, в первую очередь устойчивые к антибиотикам, описаны для многих патогенов человека (*E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* и др.), и их обнаруживают с частотой 2–50%.

Второй механизм (рис. 198, Б) — индуцибельный. Он связан с использованием вместо «репликативной» полимеразы Pol III SOS-полимеразы Pol V (см. раздел

16.4.1.1). При стрессовом SOS-ответе, например при образовании тиминового димера на материнской цепи ДНК, число копий этой полимеразы увеличивается на порядок. После связывания SSB-белков с одноцепочечным участком ДНК они полимеризуют и активируют белок RecA, который, в свою очередь, инактивирует белок LexA, играющий роль репрессора SOS-ответа (см. раздел 16.5.1.4). Среди множества SOS-генов особое место занимают *гены-мутаторы* (англ. mutator gene) — *umuDC* (в случае *E. coli*) или их ортологи (в случае других бактерий). Они кодируют субъединицы ДНК-полимеразы Pol V. Хотя в дальнейшем тиминный димер, образовавшийся на материнской цепи ДНК, может быть устранен системой фотореактивации (см. раздел 16.5.1.1), напротив него в дочерней цепи остается точечная мутация, проигнорированная «ненадежной» ДНК-полимеразой Pol V.

Третий механизм (рис. 198, В) — также индуцибельный. К его помощи прибегают голодающие клетки, и он связан с активацией RpoS-регулона, который играет центральную роль при трофическом стрессе (см. раздел 18.1.2). После блокировки продвижения репликационной вилки и выхода из нее ДНК-полимеразы Pol III репликация возобновляется, но теперь уже с использованием «ненадежной» ДНК-полимеразы Pol IV, которую кодирует ген-мутатор *dinB*. При стрессе число ее копий увеличивается на целый порядок (с 250 до 2500; см. раздел 16.4.1.1).

Нестабильность генома, спровоцированная стрессом, выражается в разнообразных изменениях структуры ДНК — от генных мутаций, связанных с делецией или инсерцией нуклеотидов, до хромосомных мутаций, вызванных транслокацией мобильных элементов.

Один из парадоксов мутаций, индуцированных стрессом, заключается в том, что ДНК, как правило, уже повреждена, т. е. повышенная мутабельность создает дополнительный риск для жизни клетки.

Тем не менее, можно предположить, что от увеличения скорости мутирования положение популяции, подвергнутой стрессовому воздействию, по меньшей мере, не ухудшается. Решающее значение приобретает соотношение между расплатой за ускоренное мутирование (накопление вредных и нейтральных мутаций) и полученной выгодой (появление полезных мутаций, благодаря которым можно выжить в новой среде).

Большинство мутаций, индуцированных стрессом, принадлежит к числу вредных или нейтральных, и лишь немногие из них, а именно адаптивные мутации, полезны. Для популяции в целом выгодно, чтобы в условиях стресса частота адаптивных мутаций увеличивалась. Эту задачу можно решить двумя способами — умеренно мутировать в большой популяции или мутировать с повышенной скоростью в небольшой популяции, при активном использовании систем генетической рекомбинации.

И вновь подчеркнем, что индуцибельные мутаторные системы действуют только на фоне соответствующего давления отбора. В отсутствии стресса экспрессия генов-мутаторов *umuDC* и *dinB* подавляется белком LexA. Одновременно с этим подавляется экспрессия генов *recA*, *recN*, *ruvA* и *ruvB*, отвечающих за репарационную рекомбинацию (см. раздел 16.5.1.4).

В особых случаях адаптивный мутагенез сопровождается отбором на повышенное соответствие микробной популяции условиям окружающей среды, т. е. изменчивость носит направленный характер. Формально это противоречит синтетической теории эволюции, которая в качестве механизма эволюционного процесса рассматривает нейтральные мутации в сочетании с дрейфом генов.

Широкую известность приобрели опыты Кэрнса, проведенные в конце 1980-х годов на lac^- -мутанте *E. coli* FC40, неспособном расти на лактозе в качестве единственного источника энергии и углерода. Они положили начало целому научному направлению, разрабатываемому по настоящее время. Было показано, что адаптивные lac^+ -мутанты не просто образуются в условиях стресса на минимальной среде (10^{-9}), но их количество резко возрастает на фоне специфического селекционного давления, т. е. в присутствии лактозы ($2 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-7}$). Обязательным условием мутационного процесса служит доступность энергии; аллель lac^- ослаблена (англ. leaky), благодаря чему в покоящихся клетках синтезируется небольшое количество β -галактозидазы, недостаточное для размножения, но способное поддерживать репликацию и рекомбинационную репарацию.

Механизм адаптивных lac^+ -мутаций не получил однозначного объяснения. В частности, есть идея, что они возникают в результате действия полимеразы Pol IV, которая неточно копирует поврежденную ДНК, и *рекомбинационного мутирования* (англ. recombination-dependent mutation, RDM), сопровождающего демонтаж хиазм Холлидея резольвазой RuvABC (см. разделы 16.5.1.4 и 16.6.1.2).

16.6.1.2. Рекомбинация

Напомним, что наследственные изменения генома могут происходить двумя путями — за счет мутагенеза и с помощью рекомбинации. Поскольку потенциальной мишенью для мутагенеза является вся хромосома, накопление вредных мутаций рано или поздно привело бы микроорганизм к гибели, независимо от параллельного накопления нейтральных и даже полезных мутаций.

Однако на деле эта тенденция встречает противодействие со стороны рекомбинации, благодаря которой полезные и нейтральные мутации не только отсеиваются от вредных мутаций, но и фиксируются в одной группе сцепления.

Было бы чрезмерным упрощением сводить биологическую роль рекомбинации исключительно к обеспечению генетического разнообразия. Согласно современным представлениям, три «Р» — *репликация*, *репарация* и *рекомбинация* связаны друг с другом общими ферментативными системами и общим характером молекулярных изменений. Часто они представляют собой одно и то же явление, хотя и воспринимаемое под разным углом зрения. Как мы увидим в дальнейшем, рекомбинационная репарация и гомологическая рекомбинация представляют собой фактически один и тот же процесс, который инициируется двухцепочечным концом донорной ДНК или одноцепочечной брешью в реципиентной ДНК. В свою очередь, в процессе рекомбинации происходит ограниченная репликация, а прекращение репликации из-за разрушения вилки требует рекомбинационной репарации (см. ниже).

Есть предположение, что в ходе эволюции ферментативные системы репликации и репарации вторично использовались в целях генетической рекомбинации. В свою очередь, это способствовало биологическому прогрессу прокариотов и обусловило диверсификацию основных типов рекомбинации.

Основные типы рекомбинации. Генетическая рекомбинация, или просто *рекомбинация* (англ. recombination; от лат. re-combinatio — иное сочетание) представляет собой молекулярный процесс, при котором путем внутри- или межгеномных структурных перестроек образуется новый набор генетических признаков в пределах конкретной группы сцепления. Иными словами, рекомбинация перетасовывает гены и аллели, создавая практически неисчерпаемый пул генотипического разнообразия.

Традиционно различают три типа генетической рекомбинации: гомологическую, сайтспецифичную и незаконную.

Гомологическая, или общая рекомбинация распространена наиболее широко. Она представляет собой обмен «выравненными» (англ. aligned) участками гомологии между двумя генетически различными молекулами ДНК. Хотя в ней может участвовать пара последовательностей практически с любой степенью генетического сходства, частота рекомбинационных событий в первую очередь определяется гомологией. В результате гомологической рекомбинации образуются рекомбинантные хромосомы.

Сайтспецифичная рекомбинация происходит между специфическими последовательностями, которые содержат очень короткую область гомологии. Так, например, благодаря рекомбинации данного типа ДНК бактериофага интегрируется в хозяйскую хромосому.

Незаконная рекомбинация затрагивает такие последовательности ДНК, которые полностью лишены гомологии. Рекомбинация данного типа происходит, в частности, при транспозиции мобильных генетических элементов, что приводит к перестройке инфраструктуры отдельно взятого генома.

Гомологическая рекомбинация. *Гомологическая рекомбинация, или общая рекомбинация* (англ. homologous recombination; general recombination) — это обмен фрагментами одиночных цепей, который происходит между двумя молекулами ДНК на участке выровненных гомологичных последовательностей.

Успешные участники этого процесса, или *рекомбинанты* (в случае прокариотов ими являются хромосомы, плазмиды или бактериофаги) содержат *рекомбинантную ДНК*, и на этой основе могут проявлять фенотипические признаки, которых у них раньше не было.

Гомологическая рекомбинация была впервые описана в 1946 г. американскими генетиками Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтемом (E. L. Tatum; Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1958 г.) на примере конъюгации *E. coli* K-12. Она служит неотъемлемой частью полового процесса у прокариотов. Иногда с целью уточнения такой половой процесс называют *парасексуальным* (греч. para — почти), поскольку прокариоты, в отличие от эукариотов, не обладают механизмами, необходимыми для поддержания диплоидности. Гомологичные хромосомы у прокариотов являются продуктом авторепликации и сегрегируются между дочерними вегетативными клетками. Вместо объединения признаков обоих родителей происходит векторная передача части генома (правда, иногда очень существенной) от клетки-донора клетке-реципиенту.

При парасексуальном процессе в реципиентную клетку вводится фрагмент чужеродной ДНК, который временно образует с хозяйской хромосомой *мерозиготу* (англ. merozygote; от греч. meros — часть; в данном случае — диплоид по отдельному участку хромосомы). В большинстве случаев из-за своей нестабильности мерозиготы демонтируются безо всяких последствий. Однако часть из них претерпевает гомологическую рекомбинацию. В ходе нее участок ДНК реципиента замещается участком ДНК донора, который отличается по структуре некоторых сайтов.

Фрагмент чужеродной ДНК может быть доставлен в прокариотную клетку тремя способами (см. раздел 16.6.1.3):

- посредством генетической трансформации;
- посредством фаговой трансдукции;
- посредством конъюгации.

При *генетической трансформации* в роли вектора выступает фрагмент молекулы ДНК, происходящий из клетки-донора. Такая «голая» ДНК импортируется в

клетку-реципиент, где она может рекомбинировать с гомологичным участком хромосомной ДНК.

При *фаговой трансдукции* фрагмент хромосомы клетки-донора упаковывается в вирусный капсид, выполняющий роль вектора. Доставленный к поверхности реципиента фрагмент чужеродной ДНК инъецируется внутрь клетки, а затем, как и при конъюгативной рекомбинации, встает на место гомологичного участка хромосомы.

При *конъюгации* между двумя половыми партнерами, а в случае *E. coli* это лишняя фактора фертильности «женская» клетка-реципиент (F^-) и обладающая фактором фертильности «мужская» клетка-донор (Hfr), устанавливается физический контакт, т. е. для направленного переноса ДНК не требуется помощь посредника-вектора. ДНК донора поступает в клетку реципиента по конъюгативному мостику, а затем в процессе конъюгативной рекомбинации обменивается на гомологичный участок хромосомной ДНК.

Важно подчеркнуть, что при половом процессе всех трех типов рекомбинация носит вероятностный характер и происходит с низкой частотой. Причина этого заключается в нестабильности экзогенных мерозигот, поскольку линейный фрагмент чужеродной ДНК не может самостоятельно реплицироваться и становится мишенью для экзонуклеаз, а также эндонуклеаз рестрикции (см. раздел 16.5.2).

Эндогенные мерозиготы, которым свойственна более высокая стабильность и более высокая частота рекомбинации, могут образовываться в четырех случаях:

- когда хромосома несет повторы;
- когда клетка содержит многокопийные хромосомы;
- когда клетка обладает мультипартирным геномом, причем в разных хромосомах имеются взаимно гомологичные участки;
- когда в клетке присутствуют плазмиды, в которых есть участки гомологии с хромосомной ДНК.

Частота общей рекомбинации зависит не только от степени гомологии, но и от длины гомологичных участков ДНК. Минимально необходимый размер равен 30–50 н.; более короткие последовательности рекомбинируют либо неэффективно, либо с использованием «незаконных» механизмов (см. ниже). Кроме того, частота рекомбинации определяется свойствами партнеров и локализацией гомологичных последовательностей по отношению друг к другу.

Белок RecA. Центральную роль в процессе гомологической рекомбинации *E. coli* играет *рекомбиназа* — мультифункциональный белок RecA (RecAEc).

Белок RecA (сокращение от англ. recombination) принадлежит к общему семейству с архейным белком RadA, эукариотными белками Rad51/Dmc1 и белком UvsX бактериофага T4. Все эти белки обладают трансферазной активностью, т. е. они катализируют «переключение» спаривания, приводящее к обмену цепями между двумя молекулами ДНК. За исключением белка Dmc1, который образует октамерные кольца, все остальные белки этого семейства полимеризуются в филаменты вдоль одноцепочечных участков ДНК.

Предложена конкретная модель, согласно которой нуклеопротеиновый филамент, образованный одноцепочечным участком ДНК и белком RecA, навинчивается на двухцепочечную ДНК, в результате чего выявляется область гомологии, производится спаривание, а затем его «переключение». При внедрении одноцепочечного участка ДНК-донора одна из цепей двухцепочечной ДНК-реципиента вытесняется и спаривается с другим одноцепочечным участком ДНК-донора, который существовал

ранее или синтезируется заново. В результате обмена цепями возникает гибридная молекула, которая обозначается как перекрест, или хиазма Холлидея (см. ниже). После миграции перекреста и демонтажа хиазмы Холлидея оба партнера по рекомбинации становятся гетеродуплексными.

Белки RecA, RadA, Rad51/Dmc1 и UvsX имеют консервативный центральный домен размером ~240 аминокислотных остатков. В отличие от белков RadA и Rad51/Dmc1, белки RecA и UvsX содержат С-концевой домен размером ~100 аминокислотных остатков и одновременно с этим лишены N-концевого домена размером ~80 остатков.

Свойством ДНК-зависимой АТФазы обладает только белок RecA. Следует подчеркнуть, что для гомологического спаривания и обмена цепями не требуется энергия АТФ. Роль АТФ здесь иная — белок RecA обладает высоким сродством к ДНК в АДФ-связанной форме и низким сродством к ДНК в АДФ-связанной форме. Способность гидролизовать АТФ позволяет ему либо прочно связываться с ДНК, либо легко диссоциировать от нее.

Белок RecA (37,842 кДа) содержит 352 аминокислотных остатка и состоит из девяти α -спиралей и одиннадцати β -складчатых цепей. Он полимеризуется в направлении $5' \rightarrow 3'$ в стехиометрическом количестве, один мономер на три нуклеотида. Данный процесс протекает медленнее в случае ДНК-дуплекса и быстрее — вдоль одиночной цепи ДНК, особенно в области брешы. Как правило, скорость полимеризации не зависит от характера нуклеотидной последовательности, хотя в сайтах, обогащенных остатками G и T, она несколько увеличивается.

Нуклеопротеиновый филамент, или *пресинаптический комплекс* состоит из полимеризованного белка RecA и одиночной цепи ДНК. Он имеет диаметр ~10 нм и закручен вправо (шесть мономеров белка/оборот, три нуклеотида/мономер). В результате связывания с белком RecA одноцепочечная ДНК, лежащая внутри филамента, имеет длину в полтора раза больше по сравнению с обычной В-формой ДНК.

Белок RecA примечателен своей многофункциональностью, так как он:

— участвует в механизме гомологической рекомбинации (производит гомологическое спаривание и реципрокный обмен цепями между донорной и реципиентной молекулами ДНК);

— индуцирует SOS-ответ (выступает в качестве аллостерического кофактора при автопротеолитическом процессинге белка LexA (репрессора SOS-регулона);

— индуцирует SOS-мутagenез (осуществляет протеолитический процессинг белковой субъединицы UmuD, входящей в состав «склонной к ошибкам» ДНК-полимеразы Pol V);

— способствует репликации «поверх повреждения» (взаимодействует с комплексом (UmuD')₂C, входящим в состав ДНК-полимеразы Pol V).

Пути гомологической рекомбинации (общие сведения). Рекомбинация между донором и реципиентом при помощи белка RecA связана с внедрением одноцепочечного участка ДНК в гомологичный участок ДНК-дуплекса. Вопрос в том, как образуется этот одноцепочечный участок?

С одной стороны, одноцепочечные участки закономерно появляются в ходе репликации, когда ведущая цепь копируется непрерывным способом, а отстающая цепь — на основе фрагментов Оказаки (см. раздел 16.4.1.1). В таком структурном состоянии может находиться как экзогенная ДНК (например, при конъюгации по мере того, как фактор Hfr, проникший в реципиентную клетку, переводится в двухцепочечную форму), так и эндогенная ДНК (например, при нормальной репликации бактериальной хромосомы).

С другой стороны, одноцепочечный участок может возникнуть в условиях стресса в результате блокирования ДНК-полимеразы Pol III, когда репликационная вилка достигает одноцепочечного повреждения, и SOS-синтез ДНК возобновляется с помощью ДНК-полимеразы Pol V (см. рис. 195, А).

Наконец, одноцепочечный участок может быть подготовлен путем процессинга донорной ДНК – либо путем образования «глазка» на молекуле кольцевой формы, либо в результате образования «навеса» за счет неравномерного эндонуклеазного расщепления двух цепей линейной молекулы.

Во всех перечисленных случаях одноцепочечный участок ДНК укрывается SSB-белками, прежде всего, с целью защиты от эндонуклеаз. Для проведения рекомбинации они должны быть вытеснены белком RecA, а это становится возможным только путем его АТФ-зависимой активации при участии вспомогательных белков RecFOR.

Как показали исследования американского генетика Элвина Кларка (A. J. Clark), который открыл ген *recA* в 1965 г., гомологическая рекомбинация *E. coli* может происходить двумя путями. Один из них инициируется двухцепочечным концом донорной молекулы ДНК, другой – одноцепочечной брешью в реципиентной молекуле ДНК.

Некоторые ферментные белки (табл. 25) являются специфическими участниками только одного из этих путей.

Таблица 25. Важнейшие участники системы гомологической рекомбинации *E. coli**

Белок	Мол. масса, кДа	Активность
SSB	13,8	Образование комплексов с одноцепочечной ДНК
RecA	37,8	Выравнивание ДНК; обмен цепями.
LexA	22,2	Связывание с SOS-сайтами; репрессия SOS-ответа
RecB	133,7	Геликазная; эндонуклеазная; сборка филаментов RecA.
RecC	128,6	Геликазная; эндонуклеазная; сборка филаментов RecA.
RecD	66,7	Экзонуклеазная
RecF	40,3	Связывание с одно- и двухцепочечной ДНК.
RecO	27,2	Связывание с одноцепочечной ДНК; сборка филаментов RecA.
RecR	21,8	Связывание с одно- и двухцепочечной ДНК; сборка филаментов RecA
GyrA	96,8	Устранение супервитков ДНК для создания синапса.
GyrB	89,8	Устранение супервитков ДНК для создания синапса
PolA	102,9	ДНК-полимераза Pol I (устранение одноцепочечных брешей).
LigA	73,4	ДНК-лигаза, устранение одноцепочечных разрывов
RuvA	21,9	Распознавание хиазм Холлидея.
RuvB	37,0	Геликазная.
RuvC	18,6	Резольвазная
TopA	97,1	Топоизомераза I (устранение супервитков в гетеродуплексе)

* без учета компонентов праймосомы, а также субъединиц ДНК-полимеразы Pol III

Действие белка RecA носит универсальный характер, и поэтому мутации по гену *recA* приводят к потере способности осуществлять гомологическую рекомбинацию.

Гомологическая рекомбинация, инициированная двухцепочечным концом ДНК. Основным путем рекомбинации в клетках *E. coli* K-12 дикого типа является RecBC-путь. Свое название он получил по продуктам экспрессии двух генов, мутации по которым приводят к пониженному выходу рекомбинантов. По имеющимся данным, распространение данного пути не ограничивается *E. coli*, и он широко представлен у других грамотрицательных, а также грамположительных бактерий.

RecBC-путь используется в том случае, когда донорной молекулой служит линейный фрагмент двухцепочечной ДНК, например при конъюгации и фаговой трансдукции.

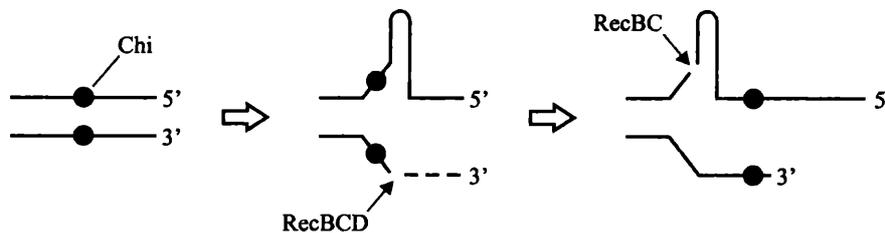


Рис. 199. Подготовка донорной молекулы с целью проведения гомологической рекомбинации, индуцированной двухцепочечным концом ДНК. Chi — Chi-сайт; RecBCD и RecBC — два состояния комплекса геликазы/нуклеазы.

Рекомбинация по RecBC-пути происходит с помощью ферментативного комплекса RecBCD. Его компоненты действуют точно так же, как при рекомбинационной репарации двухцепочечного разрыва, которую мы уже рассматривали в разделе 16.5.1.4.

На пресинаптической стадии донорная молекула ДНК подготавливается к тому, чтобы стать субстратом рекомбинации. На синаптической стадии белок RecA катализирует ключевые реакции рекомбинации (комплементарное спаривание, взаимный обмен цепями), в результате чего создается хиазма Холлидея. На постсинаптической стадии хиазма демонтируется, и образуются два рекомбинанта.

На пресинаптической фазе конец донорной ДНК процессируется белковым комплексом RecBCD, в результате чего образуется одноцепочечный «навес». Он становится затравкой при полимеризации белка RecA, филамент которого атакует реципиентную молекулу ДНК.

Комплекс RecBCD обладает четырьмя ферментативными активностями — ДНК-зависимой АТФазной, ДНК-геликазной, ДНК-эксонуклеазной (фрагментация цепи с полярностью $3' \rightarrow 5'$) и ДНК-эндонуклеазной (фрагментация цепи с полярностью $5' \rightarrow 3'$). Конец двухцепочечной ДНК расплетается за счет энергии гидролиза АТФ. Затем начинается расщепление комплементарных цепей (рис. 199). Вначале доминирует эксонуклеазная активность $3' \rightarrow 5'$. По достижении «горячей точки» рекомбинации (Chi-сайта; см. разделы 16.3.2.1 и 16.5.1.4) на смену ей приходит эндонуклеазная активность $5' \rightarrow 3'$, что приводит к образованию одноцепочечного «навеса» на $3'$ -конце.

На синаптической стадии одноцепочечный участок ДНК внедряется в ДНК-дуплекс реципиента. Положительные супервитки, образующиеся при взаимодействии реципиентного дуплекса с одноцепочечным участком ДНК, устраняются с помощью ДНК-гиразы GyrAB.

На постсинаптической стадии хиазма Холлидея демонтируется с помощью резольвасомы RuvABC.

Последовательность событий, которые происходят при гомологической рекомбинации, индуцируемой двухцепочечным концом ДНК, схематически изображена на рис. 200. Отметим, что для заполнения одноцепочечной брешы на реципиентной молекуле и сшивания $3'$ -конца внедренной нити с фланкирующим разрыв $5'$ -концом используются ДНК-полимераза Pol I и ДНК-лигаза (табл. 25).

У мутантов *recBC⁻* *E. coli* существуют два запасных пути рекомбинации — RecQJ и RecQE. На фазе пресинапса роль геликазы-нуклеазы RecBCD выполняют геликаза RecQ и одноцепочечные $5' \rightarrow 3'$ эксонуклеазы RecJ или RecE. Хиазма Холлидея по-прежнему демонтируется с помощью резольвасомы RuvABC.

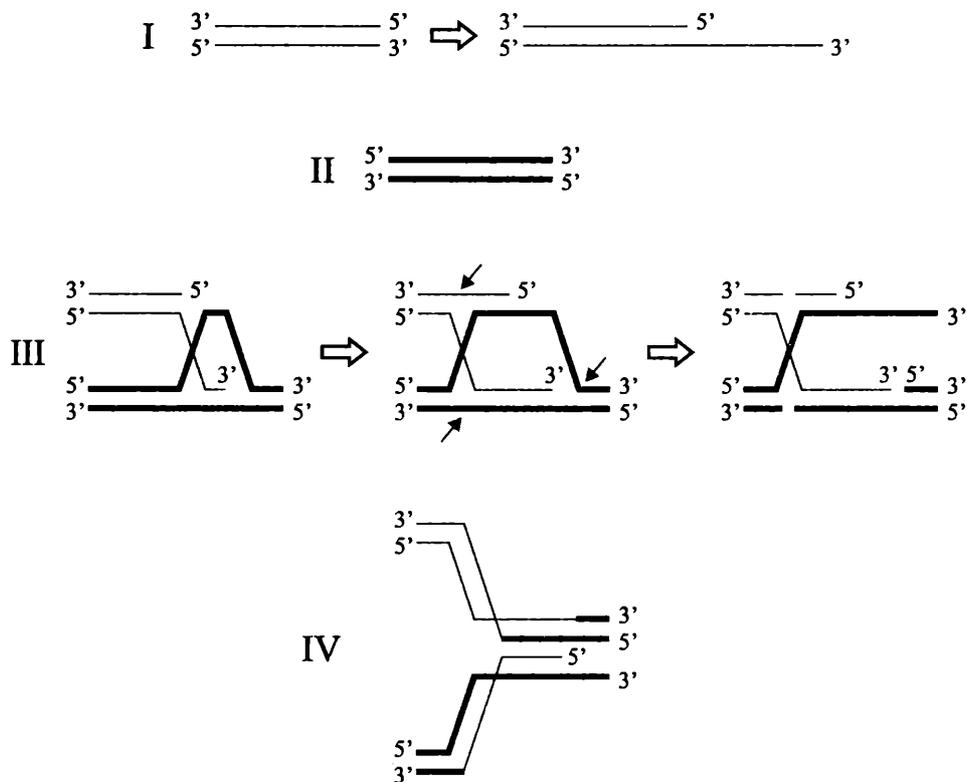


Рис. 200. Гомологическая рекомбинация, индуцированная двухцепочечным концом ДНК.

I — подготовка 3'-навеса в донорной молекуле ДНК с помощью геликазы/нуклеазы RecBCD (RecQJ или RecQE); II — реципиентная молекула ДНК; III — образование перекреста и D-петли, миграция перекреста и нанесение разрезов, заполнение бреши и устранение разрезов; IV — «кроссоверные» рекомбинанты.

Косыми стрелками указаны сайты разрезов.

Гомологическая рекомбинация, инициированная одноцепочечной брешью. При рекомбинации между двумя кольцевыми молекулами ДНК (например, между двумя хромосомами или между хромосомой и плазмидой) клетки *E. coli* дикого типа, а также другие грамотрицательные бактерии и, по крайней мере, одна грамположительная бактерия, *B. subtilis*, используют четвертый путь рекомбинации — RecFOR. Свое название он получил от вспомогательных белков, которые способствуют активации белка RecA (см. выше). Функции этих белков такие же, как при рекомбинационной репарации бреши с одноцепочечным разрывом (см. раздел 16.5.1.4).

В данном случае хиазму Холлидея демонтирует уже не резольвасома RuvABC, а геликаза RecG. Каким образом работает эта альтернативная резольваза, пока не ясно.

Хиазма Холлидея. Модель хромосомного перекреста была предложена в 1964 г. для объяснения феномена генной конверсии у возбудителя головни, базидиомицета *Ustilago maydis*. В молекулярно-генетический словарь она вошла как *хиазма Холлидея* (англ. Holliday junction) — по имени ее автора, английского генетика Робина Холлидея. В детализированном виде модель Хол-

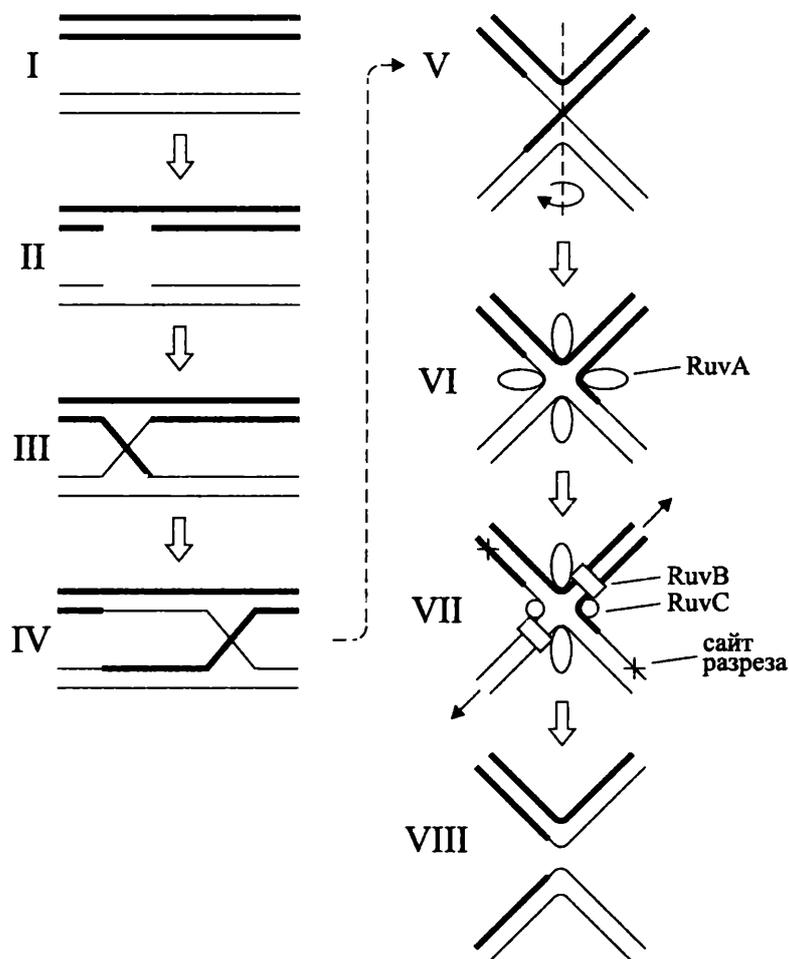


Рис. 201. Образование и демонтаж хиазмы Холлидея.

I — выровненные двухцепочечные ДНК; II — нанесение одноцепочечных разрезов; III — воссоединение цепей с образованием перекреста; IV — миграция перекреста с образованием гетеродуплексных участков; V — хиазма в «сложной» конформации; VI — хиазма в «квадратно-плоской» конформации; VII — резольвасома в действии; VIII — образование рекомбинантов. Детали в тексте.

лидея используется для описания механизма гомологической рекомбинации у разнообразных про- и эукариотных объектов.

Основной смысл модели Холлидея заключается в образовании перекреста, временно объединяющего две молекулы ДНК (рис. 201, I–III). При латеральной миграции перекреста — путем разрыва старых и образования новых водородных связей, что напоминает застежку на «молнии» — во взаимодействующих молекулах ДНК появляются гетеродуплексные участки (рис. 201, IV). Демонтаж хиазмы Холлидея посредством одноцепочечных разрывов и соединения цепей одинаковой полярности дает два свободных гетеродуплекса (рис. 201, V–VIII).

За образование хиазмы Холлидея отвечает белок ResA. Благодаря его комплексной активности (расплетение ДНК, связывание с одноцепочечными участками, комплементарное спаривание, обмен цепями) гомологичные участки двух молекул ДНК вступают в перекрестное взаимодействие.

За демонтаж хиазмы Холлидея, который приводит к образованию двух свободных гетеродуплексов, отвечает резольвасома RuvABC.

Резольвасома RuvABC. Комплексная задача по демонтажу хиазмы Холлидея решается с помощью *резольвасомы* (от англ. resolve — распадаться; в данном случае — органелла, осуществляющая демонтаж). Резольвасома связывается с хиазмой, придает ей оптимальную конформацию, защищает одноцепочечные участки от непродуктивного эндонуклеазного расщепления, перемещает зону перекреста, а также перераспределяет цепи ДНК путем нанесения симметричных одноцепочечных разрезов и соединения образующихся концов.

При образовании резольвасомы тетрамер белка RuvA распознает хиазму Холлидея, связывается с ней и поворотом вокруг вертикальной оси переводит ее из «сложенной» конформации, когда латеральное перемещение перекреста затруднено (рис. 201, V), в «квадратно-плоскую» конформацию, когда перекрест легко перемещается, что создает гетеродуплексные участки (рис. 201, VI).

Затем к тетрамеру RuvA присоединяются два гексамера *геликазы* RuvB, которые охватывают противоположные плечи перекреста. За счет энергии гидролиза АТФ они обеспечивают смещение двухцепочечной ДНК относительно зоны перекреста, что эквивалентно смещению перекреста относительно синапса; при этом внутрь резольвасомы втягиваются сайты для разреза (рис. 201, IV и VII).

На следующем этапе к тетрамеру RuvA и двум гексамерам RuvB присоединяется димер *резольвазы* RuvC, наносящий симметричные разрезы в двух цепях ДНК одинаковой полярности. Сайтом узнавания резольвазы служит вырожденная нуклеотидная последовательность 5'-(A/T)TTT(G/C)-3'. Путем соединения свободных концов образуются два гетеродуплекса ДНК (рис. 201, VIII).

Рекомбинационная индукция вилки (*oriC*-независимая репликация).

По традиционным представлениям, двунаправленная репликация ДНК инициируется в сайте *oriC*. Однако нередко складываются такие ситуации, когда репликация стартует вне зависимости от *oriC*.

С одной стороны, на пути *oriC*-индуцированной репликационной вилки могут вставать повреждения ДНК или химические блокаторы. Это приводит к остановке продвижения вилки или даже ее коллапсу. Реставрация вилки осуществляется с помощью гомологической рекомбинации (см. раздел 16.5.1.4 и рис. 195, Б).

С другой стороны, *oriC*-независимая репликация хромосомы происходит при конъюгации, для чего специально индуцируется репликационная вилка (рис. 202). После попадания донорской ДНК внутрь реципиента она переходит в двухцепочечную форму и обрабатывается пресинаптическим комплексом ферментов RecBCD таким образом, что приобретает симметричные одноцепочечные 3'-навесы (рис. 202, I). Они внедряются в кольцевую хромосому реципиента с образованием двух D-петель (рис. 202, II). Эти рекомбинационные интермедиаты превращаются в репликационные вилки, в которых инициируется новый раунд репликации, не зависящий от локуса *oriC* (рис. 202, III).

Установлено, что *oriC*-независимая репликация осуществляется прерывистым путем, т. е. через синтез фрагментов Оказаки (см. раздел 16.4.1.1). В организации праймосомы участвуют белки PriABC, DnaBC, DnaG и DnaT.

Предполагается, что данный способ репликации, протекающий без участия «канонического» белка DnaA, используют в своих целях молекулярные паразиты — фаги и плазмиды, в том числе конъюгативные.

После прохождения полного раунда репликации хиазмы Холлидея разбираются, и донорная ДНК оказывается интегрированной в одну из двух сестринских хромосом.

Заметим, что в обоих рассмотренных нами случаях реплисома образуется в области внедрения одноцепочечного участка донорной ДНК в реципиентный дуплекс.

Сайтспецифичная рекомбинация. Как мы уже отмечали, существует возможность рекомбинации между молекулами ДНК при условии низкой гомологии (сайтспецифичная рекомбинация) и даже если гомология вообще отсутствует (незаконная рекомбинация). Естественно, что соответствующие механизмы отличаются от гомологической рекомбинации; прежде всего, они не зависят от генов *recABC*.

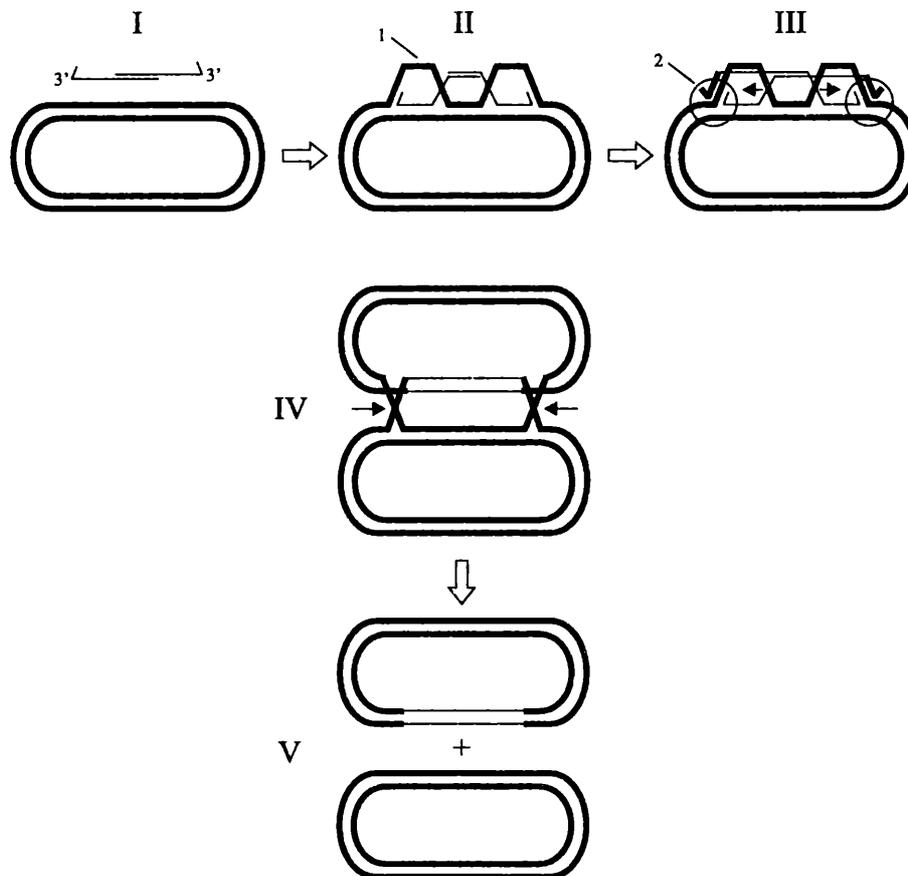


Рис. 202. Рекомбинация с помощью *oriC*-независимой репликации.

I — донорная ДНК с 3'-концами, подготовленными геликазой-нуклеазой RecBCD, и реципиентная ДНК; II — внедрение 3'-концов донорной ДНК в реципиентную ДНК, образование D-петель (1); III — превращение D-петель в репликационные вилки (2), стрелками указано смещение перекрестов; IV — демонтаж хиазм Холлидея; V — образование рекомбинантной хромосомы (сверху) и реципиентной хромосомы (снизу).

Сайтспецифичная рекомбинация может быть связана с репликацией или происходит в ее отсутствие. Так, транспозиция мобильных элементов может сопровождаться репликацией (см. раздел 16.3.1.3). Напротив, в процессе интеграции фаговой ДНК в бактериальную хромосому принимают участие ранее реплицированные геномные молекулы.

Сайтспецифичная рекомбинация первоначально была изучена на примере процессов интеграции и эксцизии, которые происходят в жизненном цикле фага лямбда (λ). Этот вирус реплицируется либо путем лизиса хозяйской клетки, либо путем клонирования его ДНК в общий репликон с хозяйской хромосомой, т. е. он может на время переходить в *лизогенное* состояние.

При лизогении кольцевая фаговая ДНК интегрируется в хозяйскую хромосому и превращается в *профаг*. Репрессорный белок, продукт фагового гена *cI*, почти полностью подавляет экспрессию вирусного генома.

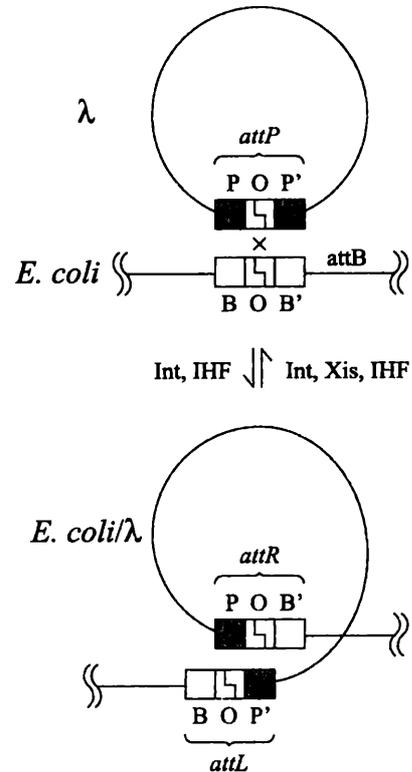


Рис. 203. Интеграция и эксцизия фага лямбда.

attB и *attP* — рекомбинационные сайты присоединения; *attL* и *attR* — гибридные рекомбинационные сайты; Int — интегразы; Xis — эксцизионаза; IHF — хозяйский ДНК-связывающий белок.

При индукции литического цикла белок-антирепрессор, продукт фагового гена *cro*, блокирует синтез репрессора. Это приводит к эксцизии вирусного генома и, как следствие, к воспроизводству популяции инфекционных частиц-вирионов.

Процессы интеграции и эксцизии основаны на сайтспецифичной рекомбинации (рис. 203). В интеграции со стороны бактерии принимают участие уникальный сайт присоединения *attB* (сокр. англ. attachment — присоединение и B — bacterium), а со стороны бактериофага — уникальный сайт присоединения *attP* (сокр. англ. attachment — присоединение и P — plasmid). В свою очередь, в эксцизии участвуют сайт *attL* (сокр. англ. left) и сайт *attR* (сокр. англ. right), фланкирующие профаг с левой и правой стороны.

Все перечисленные сайты обладают высоким сродством к соответствующим рекомбинационным белкам, что объясняет консервативную локализацию профага в хромосоме *E. coli* (между генами *gal* и *bio*). Если сайт *attB* делетирован, интеграция допускается в иных участках хромосомы, но тогда ее частота будет примерно в 1 тыс раз ниже.

Хозяйский рекомбинационный сайт *attB* состоит из центральной части, или AT-богатой *кор-последовательности O* (сокр. англ. overlap region — перекрывающийся участок). Она имеет длину 15 п.н. и фланкирована короткими «плечами» B и B' (оба ~20 п.н.). Таким образом, этот сайт имеет структуру BOB'. Фаговый рекомбинационный сайт *attP* состоит из такой же кор-последовательности O, но она фланкирована длинными плечами P и P' (~160 и ~80 п.н.), т. е. имеет структуру POP'.

При интеграции, происходящей в результате рекомбинации по кор-последовательностям в составе сайтов VOV' и POP' , образуются сайты $attL$ и $attR$, имеющие гибридную структуру VOV' и POV' . При эксцизии происходит рекомбинация по сайтам VOV' и POV' с возвращением к первоначальным сайтам VOV' и POP' (рис. 203). Важно отметить, что хотя интеграция обратима, она и эксцизия осуществляются разными путями. В этих процессах используются разные сайты узнавания интегразы, что требует участия асимметричного набора рекомбинационных белков.

Интеграза *Int*. Интеграцию осуществляет продукт фагового гена, *интеграза Int* совместно с хозяйским ДНК-связывающим белком ИФ. Для проведения эксцизии помимо них требуется другой продукт фагового гена — *эксцизионаза Xis* (сокр. англ. excision — вырезание). Сайт $attP$ содержит семь субсайтов для связывания интегразы *Int*, три субсайта для связывания ДНК-изгибающего белка ИФ ($H1$, $H2$ и H') и один субсайт для связывания белка *Xis*. Сайт $attB$ содержит только два субсайта для связывания интегразы *Int*.

При интеграции и эксцизии интегразы *Int* выступает в качестве сайтспецифичной топоизомеразы I (см. раздел 16.4.2).

Интеграза наносит одноцепочечные разрезы в кор-последовательностях обоих рекомбинационных сайтов и параллельно с этим устраняет их суперспирализацию, что позволяет образовать перекрестные фосфодиэфирные связи (например, как это изображено на рис. 201, I–III). Предполагается, что за счет миграции перекреста образуется хиазма Холлидея с гетеродуплексным участком, который укладывается в границы сайта POP' .

Интегразы *Int* (40 кДа) принадлежат к суперсемейству «тирозиновых» рекомбиназ, которые участвуют в разнообразных перестройках ДНК у прокариотов — репликации, декатенации сцепленных репликонов, сегрегации сестринских репликонов и т. д. (см. раздел 16.4.2).

Все эти ферменты, действуя в тетрамерной форме, катализируют обмен цепями ДНК путем образования и демонтажа крестообразных структур, или хиазм Холлидея. Напомним, что для этого требуется последовательно нанести две пары одноцепочечных разрезов, а затем провести лигирование (см. рис. 201).

Характерно, что данные реакции происходят без затраты энергии, посредством образования ковалентно связанных 3'-фосфотиризиновых ДНК-белковых интермедиатов.

Интегразы *Int* содержат большой С-концевой домен, который присоединяется к обеим кор-последовательностям и осуществляет ферментативные стадии рекомбинации. В свою очередь, небольшой N-концевой домен интегразы связывается с плечами за пределами участка обмена цепями.

ДНК-изгибающие белки. Чтобы единичная молекула, или протомер интегразы смогла взаимодействовать с взаимно дистанцированными областями субстрата, используются вспомогательные белки, которые образуют на молекуле ДНК сайтспецифичный изгиб. При эксцизии эту роль выполняет фаговый белок *Xis*; при его дефиците в качестве заместителя используется хозяйский белок *Fis* (сокр. англ. factor for inversion stimulation).

Третий ДНК-изгибающий белок, ИФ (сокр. англ. integration host factor; название объясняется тем, что этот белок имеет отношение к интегративной рекомбинации фага λ в хромосому хозяина) участвует и в интеграции, и в эксцизии. Он состоит из двух субъединиц — ИФ α (10,5 кДа; ген *himA*) и ИФ β (9,5 кДа; ген *hip/himD*).

Незаконная рекомбинация. Довольно расплывчатый термин *незаконная рекомбинация* (англ. illegitimate) обычно используют по отношению к таким рекомбинационным событиям, в которых участвуют негомологичные области одной и той

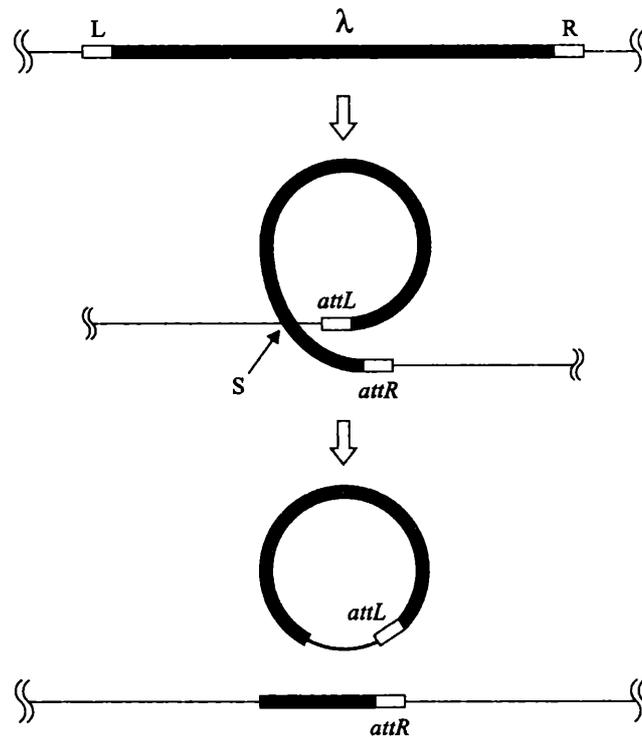


Рис. 204. Незаконная рекомбинация при эксцизии фага лямбда.
attL и *attR* — гибридные рекомбинационные сайты; S — сайт незаконной рекомбинации.

же молекулы ДНК или негомологичная пара ДНК-донор/ДНК-реципиент. Иными словами, он применяется по отношению к разным явлениям, формально объединенным по негативному признаку — отсутствию гомологии между рекомбинирующими партнерами. Поэтому такой тип рекомбинации правильнее было бы назвать *негомологической*.

Наиболее изучена незаконная рекомбинация при транспозиции мобильных элементов. Ее механизмы были рассмотрены в разделе 16.3.1.3, и во избежание повторов мы отсылаем читателя к соответствующим страницам учебника.

Иногда термин «незаконная», или «необычная» (англ. *extraordinary*) используется применительно к рекомбинации, затрагивающей гомологичные сайты, что создает путаницу.

В данном случае имеется в виду эксцизия фага лямбда путем рекомбинации между внутренней (т.е. расположенной между сайтами присоединения) последовательностью профага и последовательностью бактериальной ДНК, удаленной от одного из сайтов присоединения. Обмен осуществляется при помощи RecA-зависимого механизма и связан со случайной гомологией между короткими последовательностями фаговой и бактериальной ДНК (рис. 204).

В результате такой рекомбинации образуются дефектные вирусные частицы, поскольку фрагмент фаговой ДНК замещается фрагментом бактериальной хромосомы вместе с одним из сайтов присоединения. Благодаря тому, что часть бактериальных генов включилась в состав фагового репликона, они могут переноситься в реципиентную бактерию посредством фаговой трансдукции (см. раздел 16.6.1.3).

Рекомбинация у архей. Как известно, продукты «информационных» генов у архей обнаруживают большее сходство с эукариотными функциональными эквивалентами, чем с бактериальными. Не являются исключением и факторы гомологической рекомбинации, в частности белок RadA.

Археотная рекомбиназа RadA была впервые описана в 1998 г. на примере *Sulfolobus solfataricus*; позднее этот белок нашли у других представителей филы AI *Crenarchaeota*, таких как *Desulfurococcus amylolyticus*, *Pyrobaculum islandicum* и *Pyrococcus furiosus*. Характерно, что все они активны только при высокой температуре, т. е. это «термофильные» белки.

Белок RadA обладает сходными функциональными свойствами как с бактериальным белком RecA, так и с эукариотным белком Rad51:

— полимеризуется на одноцепочечной ДНК с предпочтением таких же последовательностей (богатых G и T), с такой же стехиометрией (три нуклеотида/мономер) и тоже с образованием правозакрученного микрофиламента;

— катализирует реципрокный обмен цепями ДНК;

— выступает в качестве ДНК-зависимой АТФазы.

В то же время по аминокислотной последовательности белок RadA обладает более высоким сходством с эукариотным белком Rad51 (53–63% гомологии, 34–42% идентичности), чем с бактериальным белком RecA (25–31% гомологии, 14–17% идентичности).

16.6.1.3. Горизонтальный перенос генов

Генетическое разнообразие возникает в результате и внутригеномных, и межгеномных преобразований. Внутригеномные преобразования бывают трех типов — точечные мутации, хромосомные мутации с помощью мобильных элементов (см. раздел 16.3.1.3) и хромосомные перестройки в результате рекомбинации.

При накоплении точечных мутаций происходит постепенная модификация резидентных генов, передающихся *вертикальным* путем от поколения к поколению. Это позволяет прокариотам медленно наращивать свое присутствие в старых нишах и таким же темпом осваивать новые ниши.

В отличие от точечных мутаций, обеспечивающих микроэволюцию, в основе макроэволюционных изменений у прокариотов лежат хромосомные мутации, а также процессы рекомбинации, которые американский бактериолог Сидней Фолккоу (S. Falkow) назвал «генетическими квантовыми скачками».

Считается, что именно рекомбинационным путем появились обладающие множественной лекарственной устойчивостью штаммы *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptococcus pneumoniae*, а также высоковирулентные серотипы *E. coli*, *Haemophilus influenzae* и *Vibrio cholerae*.

Механизмы рекомбинации позволяют перераспределять генетический материал как в пределах одного генома, так и между геномами. Во втором случае мы говорим о *горизонтальном*, или *латеральном* переносе генов от донора к реципиенту (англ. horizontal gene transfer, HGT; lateral gene transfer, LGT). Такой перенос еще называют «негенеалогическим», поскольку процесс передачи генов не означает их одновременного наследования (что происходит при делении).

Относительный вклад в наследственную изменчивость со стороны внутригеномных перестроек или горизонтального переноса зависит от конкретного организма и селекционного фона. Однако в целом горизонтальный перенос является главным механизмом адаптации прокариотов к изменяющимся условиям внешней среды.

Специфика горизонтального переноса. Геномные изменения вследствие горизонтального переноса отличаются от геномных изменений при мутировании тем, что в первом случае реципиент чаще всего приобретает «проверенные» гены, ко-

торые полезно функционировали у донора; во втором случае изменения носят преимущественно нейтральный или вредный характер. Тем не менее, возможны такие случаи, когда горизонтально переданные гены вызывают вредный эффект; в результате реципиент, как и при вредных мутациях, элиминируется.

В отличие от эукариотов, горизонтальный перенос генов у прокариотов не связан с половым размножением. Более того, за исключением конъюгации он происходит в отсутствие межклеточного контакта, основанного на взаимном узнавании партнеров.

Подобно эукариотам, горизонтальный перенос генов у прокариотов и сопутствующая ему рекомбинация позволяют обмениваться гомологичные участки генома, создавая новые комбинации аллелей. Однако в отличие от эукариотов, у прокариотов в геном могут вводиться новые последовательности (например, кассета метаболитических генов, гены устойчивости к антибиотикам или островки патогенности), что приводит к резким изменениям фенотипа.

Обмен генетическим материалом у прокариотов возможен между далеко дистанцированными объектами, вплоть до представителей разных доменов глобального древа (см. ниже).

Доказательства горизонтального переноса. В условиях эксперимента не всегда удается получить прямое доказательство передачи селективного признака от донора к реципиенту, а в эволюционной ретроспективе сделать это вообще невозможно. Поэтому кандидаты на роль горизонтально переданных генов косвенно выявляются по ряду признаков:

- преимущественному использованию GC-пар (особенность нуклеотидного состава);
- предпочтительному использованию синонимических кодонов (англ. codon bias);
- частоте встречаемости динуклеотидов;
- уникальным «маркерным» сайтам (англ. signature — личная подпись) в пределах нуклеотидной последовательности;
- аномально высокому сходству с ортологом на фоне других генов;
- порядку расположения в опероне;
- типу, числу и распределению некодирующих последовательностей, например интронов;
- характеру встречаемости в филогенетических ветвях.

Масштабы горизонтального переноса; классификация генов в соответствии со способностью передаваться горизонтальным путем. В последнее время много спорят о том, насколько распространен горизонтальный перенос генов, и какие гены он затрагивает.

По мнению одних авторов, некоторые гены свободно путешествуют между прокариотными и эукариотными геномами (часто при посредстве вирусов), так что горизонтальные генетические связи охватывают всю биосферу, уподобляя ее «глобальному организму». Как полагает один из мировых авторитетов в области метагеномики Евгений Кунин, горизонтальный перенос затрагивает значительную часть, если не большинство, прокариотных генов. Другие авторы не соглашаются с данным выводом, указывая на трудность доказательства горизонтального переноса конкретного гена, а также на проблему количественного учета этого явления. Так или иначе, горизонтальный перенос генов документирован практически для любой филогенетической дистанции и для гена практически любого типа.

По способности передаваться горизонтальным путем гены прокариотных хромосом подразделяются на три группы:

- «жесткий кор» (англ. hard core); не передаются почти никогда;
- «гибкий кор» (англ. soft core); передаются редко;
- «окружение» (англ. shell); передаются часто.

Гены жесткого кора составляют относительно небольшую, но крайне существенную часть бактериального генома (1–5%). Причина нетрансмиссивности и эволюционной стабильности этих генов связана с их особой биологической ролью. Это, прежде всего, абсолютно незаменимые информационные гены, которые универсально представлены у всех живых организмов, и поэтому их приобретение не обеспечивает реципиенту никакого селективного преимущества. Такие гены крайне редко передаются горизонтальным путем еще и потому, что они входят в состав многокомпонентных и внутренне сбалансированных систем, из-за чего их продуктам трудно функционально соответствовать «чужому» окружению.

Данные о горизонтальном переносе генов жесткого кора немногочисленны. В частности, это касается переноса генов рРНК от *Proteus vulgaris* к *E. coli* или миграции этих генов между разными видами родов *Aeromonas* и *Rhizobium*, а также между экстремально термофильными археями *Archaeoglobus fulgidus* и *Pyrococcus horikoshii* (см. также раздел 16.6.3). Горизонтальным путем передавались и гены рибосомных белков, например, ген белка S14 (Rps14) малой субъединицы. Интердоменный перенос белка L23 малой рибосомной субъединицы зарегистрирован между метаногенными археями пор. *Methanococcales* и бактериями р. *Helicobacter*.

Рассматривая это явление с позиций физиологической эволюции, можно предположить, что замещение незаменимых генов их «изофункциональными» гомологами происходило под специфическим селекционным давлением, в частности, на фоне антибиотиков или при адаптации к высокой температуре.

Гены гибкого кора — это незаменимые операционные гены; их продукты используются по «модульному» принципу, т. е. они могут входить в состав разных функциональных комплексов. Примером служат гены протонтранслоцирующих АТФаз, а также гены ключевых ферментов сульфатного дыхания (см. II том учебника), которые археи приобрели от бактерий.

Что касается генов окружения, то они не принадлежат к числу незаменимых, и их продукты наиболее часто подвергаются горизонтальному переносу.

Поскольку гены жесткого кора, как правило, передаются вертикальным путем, они служат надежными маркерами филогении. Мы уже много говорили о том, что результаты секвенирования рДНК используются для построения эволюционных дендрограмм (см. I том учебника).

В то же время характер распределения генов окружения в природных популяциях бактерий, в особенности патогенных форм, отвечает концепции «глобального» организма.

За миллионы лет «чужая» ДНК замещает значительную часть собственной ДНК, следы вертикального наследования стираются, и генеалогическое древо постепенно вырождается в сеть. Это создает большие — возможно, даже непреодолимые — трудности для филогенетической систематики прокариотов, в первую очередь, при выработке концепции вида (см. I том учебника).

Вклад горизонтального переноса в инфраструктуру генома. Анализ бактериальных геномов (особенно полностью секвенированных) показывает, что они сформировались на основе горизонтального переноса 5–30% генов между отдельными филогенетическими ветвями домена *Bacteria*, а также путем передачи генов от представителей доменов *Archaea* и *Eucarya*.

Интердоменный перенос характерен для термофильных бактерий. Например, *Aquifex aeolicus* и *Thermotoga maritima* приобрели, соответственно, 16 и 24% генов от

гипертермофильных архей. Мезофилы, в частности *B. subtilis* и *Synechocystis* spp., гораздо беднее теми генами, гомологи которых имеются в археотных геномах. В качестве конкретного примера получения бактериями гена от архей можно назвать ген прокариотного опсина *hop* (см. II том учебника).

Случаи, когда гены горизонтальным путем передаются бактериям от эукариотов, обычно связаны с эндосимбиотическими ассоциациями. В частности, таково происхождение АДФ/АТФ-транслоказы у облигатного внутриклеточного паразита *Chlamydia trachomatis*. Бактерии, в свою очередь, могут передавать гены хозяйской эукариотной клетке (примером служит ген аспаратаминотрансферазы *Wolbachia pipiens*; см. раздел 20.3.4.2).

Примеры генов, которые приобретены прокариотами горизонтальным путем и отвечают за функциональные свойства разной степени важности, приводятся в таблице 26.

Таблица 26. Гены прокариотов, приобретенные горизонтальным путем (примеры)

Объект	Ген	Продукт
Энергетический метаболизм		
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	<i>pujL</i>	Апопротеин реакционного центра
<i>Arthrospira</i> sp.	<i>cpcAB</i>	Апопротеины антенны
<i>Oligotropha carboxydovorans</i>	<i>cdhL</i>	Субъединица СО-дегидрогеназы
Конструктивный метаболизм		
<i>Methanococcus lithoautotrophicus</i>	<i>nifH</i>	Fe-белок нитрогеназы
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>celY</i>	Целлюлаза
<i>Brevibacterium</i> sp. R312	<i>amiE</i>	Амидаза
Придаточные структуры		
<i>Bacteroides nodosus</i>	<i>fimA</i>	Пилин
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>kfiA</i>	Полимераза капсулы
Устойчивость к стрессу		
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	<i>sodB</i>	Fe-супероксиддисмутаза
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>penA</i>	Модифицированный РВР-белок
Вирулентность		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>emm12</i>	Поверхностный белок серотипа M12
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctxAB</i>	Холерный токсин фага CTXφ

Явление горизонтального переноса очень часто наблюдается у патогенных бактерий. Соответствующие гены обычно входят в *островки патогенности* (англ. pathogenicity island, PI).

Напомним, что кроме *кора*, детерминирующего важнейшие структурно-функциональные свойства клетки и представленного ансамблем слабо мутирующих генов, существует меньшая часть генома (~15%), или так называемое *окружение*. Это, главным образом, *геномные островки* (англ. genome island) размером 10–200 т. п. н. Они отличаются от *кора* по содержанию ГЦ-пар и набору преимущественно используемых кодонов, что является характерным признаком «чужих» генов.

Геномные островки часто ассоциированы с генами тРНК, а также геном интегразы. Поэтому предполагается, что они эволюционно произошли от интегрированных в геном мобильных генетических элементов — плазмид, транспозонов и бактериофагов. Геномные островки организованы по общей схеме и содержат прямые повторы, мобильные элементы, а также структурные и регуляторные гены. Концы геномного островка, как правило, фланкированы прямыми повторами, приобретенными в результате интеграции в хромосому мобильного элемента.

Основу геномного островка составляют структурные гены. Как правило, речь идет о полном наборе генов, который необходим для реализации какого-либо признака, что делает возможным и целесообразным его горизонтальный перенос.

Геномные островки можно подразделить на несколько групп:

- островки сапрофитности;
- экологические островки;

- симбиотические островки;
- островки патогенности и т. д.

Геномные островки содержат гены специализированного метаболизма, гены адаптации к абиотическим факторам среды и гены устойчивости к антибиотикам, а также гены симбиоза и вирулентности. В частности, островки патогенности содержат кластеры генов, которые обеспечивают вирулентность и часто встраиваются в гены тРНК.

Способы горизонтального переноса генов у прокариотов. Напомним, что у прокариотов существуют три способа доставки ДНК от донора к реципиенту — трансформация, конъюгация и трансдукция (см. раздел 16.6.1.2). Различие между ними связано со спецификой маршрута ДНК, который включает в себя три стадии:

- презентацию ДНК донором;
- перенос ДНК между донором и реципиентом;
- восприятие ДНК реципиентом.

На вторую из этих стадий обращается наибольшее внимание, поскольку речь идет о *природе вектора*. Сильно упрощая, можно сказать, что трансформацию обеспечивает «голая» ДНК, конъюгацию — конъюгативная плаزمида, мигрирующая по конъюгационному мостику, а фаговую трансдукцию — ДНК, упакованная в оболочку вирусной частицы.

При горизонтальном переносе генов, преодолевая барьер из одной или нескольких мембран, в цитоплазму реципиента поступает либо одноцепочечная ДНК (в случае трансформации и конъюгации), либо двухцепочечная ДНК (в случае фаговой трансдукции).

Некоторые бактерии, например, *E. coli*, способны осуществлять обмен генетическим материалом несколькими способами. У других бактерий, в частности представителей рода *Neisseria*, единственным способом горизонтального переноса генов служит трансформация, поскольку они не имеют конъюгативных плазмид (в том числе, способных мобилизовать часть хромосомы), а также не являются хозяевами для трансдуцирующих фагов.

Знакомство со способами горизонтального переноса генов у бактерий мы начнем с самого распространенного из них — трансформации.

Трансформация. Генетической трансформацией, или просто *трансформацией* (англ. transformation; от лат. transformatio — преобразование) называется свойство клеток поглощать из окружающей среды «голую» чужеродную ДНК с последующим включением в хромосому или сохранением в качестве автономно реплицирующейся плазмиды. Результатом трансформации становится наследственное изменение генома, которое фенотипически выражается на селективном или неселективном фоне.

Отметим, что данных о том, что позволяет свободной ДНК уцелеть в природных экосистемах, крайне мало. Известно, что в водном растворе она легко становится мишенью для нуклеаз и иных повреждающих агентов; при адсорбции на носителях ее физико-химическая резистентность возрастает.

По-видимому, наилучшим образом ДНК защищена в биопленках, заключенных в полисахаридный матрикс (см. I том учебника). Так или иначе, в почвах или илах присутствует $\sim 1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ свободной ДНК, а в пробах пресной или морской воды она выявляется в количестве $3 \cdot 10^{-1} - 88 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$.

Приоритет открытия феномена трансформации, а также сам термин «трансформация» принадлежат английскому бактериологу Фреду Гриффиту (F. Griffith), который в 1928 г. сообщил о

том, что убитые нагреванием инкапсулированные клетки *Streptococcus pneumoniae*, если их вводить мышам совместно с живыми бескапсульными и, соответственно, непатогенными пневмококками, передают последним способность образовывать капсулу, делая их вирулентными. В настоящее время известно, что за образование капсулы отвечают до 20 генов, входящих в состав *cap*-кассеты, и что полисахаридная капсула является важнейшим фактором вирулентности пневмококков, поскольку она защищает их от поглощения и переваривания полиморфноядерными лейкоцитами.

Поскольку молекулярная природа носителя генетической информации была в ту пору неизвестна, Гриффит предположил, что при трансформации переносится затравка капсульного полисахарида или соответствующий биосинтетический фермент.

В 1930 г. Дэвсон (M. H. Dawson) и Сиа (R. H. P. Sia) провели трансформацию пневмококков *in vitro*. Год спустя Эллоуэй (J. L. Alloway) добился аналогичного результата, но уже с применением клеточных экстрактов. Решающее доказательство природы трансформирующего начала — препарата ДНК — получили в 1944 г. Эвери (O. T. Avery), Маклеод (C. M. MacLeod) и Маккарти (M. McCarty).

Если первоначально о трансформации судили по такому визуальному признаку колоний пневмококков, как шероховатые (бескапсульные) и гладкие (инкапсулированные), то во второй половине 1950-х гг. в качестве маркера стали использовать устойчивость к антибиотикам, в частности стрептомицину. В результате было показано, что частота трансформации пропорциональна количеству добавленной ДНК, т. е. на поверхности реципиентных клеток находится определенное число сайтов для поглощения ДНК. Кроме того, выяснилось, что частота трансформации зависит от фазы развития культуры бактерий.

Трансформация в каждом конкретном случае является специфическим процессом, который находится под контролем генома, хотя в целом природа трансформирующей ДНК может широко варьировать.

Это либо хромосомная ДНК генетически близкой или дистанцированной бактерии, либо ДНК бактериальной плазмиды, либо препарат ДНК бактериофага (в последнем случае трансформацию называют *трансфекцией*). Трансформация хромосомной, плазмидной и фаговой ДНК также описана у метаногенных и экстремально галофильных архей.

По современным взглядам, биологический смысл трансформации неоднозначен.

Во-первых — и это самое главное — экзогенная ДНК играет роль вектора при горизонтальной передаче селективно-полезных аллелей (например, аллели *penA*, отвечающей за устойчивость *Neisseria gonorrhoeae* к пенициллину).

Во-вторых, если нет альтернативы, экзогенная ДНК выступает в качестве матрицы при репарации двухцепочечных повреждений ДНК (см. раздел 16.5.1.4).

В третьих, ДНК может тривиально использоваться в качестве питательного субстрата. Так, на примере *Haemophilus influenzae* показано, что лишь ~15% экзогенной меченой ДНК интегрируются в хромосому реципиента, а 85% деградируют до нуклеотидов и нуклеозидов, которые утилизируются при метаболизме; в случае *B. subtilis* и *S. pneumoniae* интегрируются ~50% ДНК, а другая половина разрушается.

Различают феномен *природной трансформации* и экспериментальный метод *индуцированной трансформации*. В первом случае объект способен самостоятельно трансформироваться с помощью эндогенных механизмов — либо перманентно, либо за счет временного перехода в особое физиологическое состояние, которое называется *компетентностью* (см. ниже). Во втором случае компетентность вызывают искусственно, т. е. объект вынуждают воспринимать препарат ДНК из окружающей среды. Для этого грамотрицательные бактерии, например *E. coli*, преинкубируют на холоде в среде, содержащей 50–100 мМ Ca^{2+} ; хорошие результаты дает обратимое увеличение проницаемости СМ под воздействием пульсирующего электрического поля, или *электропорация*.

Истинные масштабы трансформации в природной среде неизвестны. В лабораторных условиях она обнаружена примерно у 50 видов бактерий и трех видов архей, в частности *Halobacterium volcanii*.

В настоящее время механизмы бактериальной трансформации охарактеризованы на ряде модельных объектов, среди которых есть грамположительные (прежде всего, *B. subtilis* и *S. pneumoniae*) и грамотрицательные (в частности, *Acinetobacter* sp. штамм BD4123, *H. influenzae*, *Helicobacter pylori*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas stutzeri* и *Thermus thermophilus*).

Напомним, что различие между этими морфотипами состоит в том, что оболочка грамотрицательных бактерий образована двумя мембранами — СМ и ОМ, которые ограничивают периплазматический компартмент, содержащий, в числе прочего, пептидогликановый саккулус толщиной 3–7 нм. В отличие от этого грамположительные бактерии не обладают ОМ, а их саккулус обычно имеет толщину > 50 нм (см. I том учебника).

Таким образом, характер преодолеваемых клеточных барьеров у грамположительных и грамотрицательных бактерий существенно различается, что отражается в деталях системы импорта ДНК (рис. 205 и 206).

В обоих случаях трансформация включает в себя пять этапов:

— освобождение ДНК донором, а также приобретение состояния компетентности реципиентом (эти процессы могут быть сопряженными или протекают независимо друг от друга);

— рецепция ДНК и связывание ДНК;

— доставка ДНК к транслокатору;

— процессинг ДНК и транслокация ДНК в цитоплазму;

— интеграция ДНК в геном.

Освобождение ДНК донором. Необходимым условием трансформации служит появление свободной ДНК донора вблизи клетки реципиента. Теоретически, существуют два пути «пожертвования» ДНК.

С одной стороны, ДНК может выходить в окружающую среду после автолиза части популяции. Это — вероятностное событие, которое происходит при достижении стационарной фазы, а также в том случае, когда клетки попадают в неоптимальные условия и оказываются в состоянии стресса. Патогенные бактерии могут лизироваться под воздействием иммунной системы хозяина или в результате антибиотикотерапии. Избирательный автолиз также может быть следствием фазовой изменчивости (см. раздел 16.6.2) или апоптоза, т. е. запрограммированной смерти клетки (см. раздел 17.2.2). Центральную роль при автолизе играет N-ацетилмурамил-L-аланин-амидаза, а также фосфолипаза, нарушающая целостность СМ.

С другой стороны, ДНК может секретироваться живыми клетками. Вероятно, в данном случае используется секреторная система IV типа (см. I том учебника). Однако неизвестно, предшествует ли экспорту ДНК репликация и подвергается ли секретируемая ДНК какому-нибудь подготовительному процессингу.

У ряда грамотрицательных бактерий, в частности *E. coli*, *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium и *Shigella flexneri*, существует альтернативный механизм трансформации — ДНК секретируется не в «голом» виде, а упаковывается в эвагинирующий участок ОМ, или блебинг-везикулу (см. I том учебника). В таком инкапсулированном виде хромосомная или плазмидная ДНК, совместно с периплазматическими автолизинами, а также факторами вирулентности, в частности гемолизинами и Шига-токсинами, доставляется к поверхности ОМ реципиента. После слияния отпочковавшегося фрагмента ОМ донора и ОМ реципиента содержимое «трансформосомы» (англ. transformosome), в том числе трансформирующая ДНК, попадает в периплазматический компартмент.

Данный механизм трансформации внешне напоминает трансдукцию (см. ниже), когда ДНК также передается от донора к реципиенту в упакованном виде.

Приобретение состояния компетентности реципиентом. Компетентностью по отношению к генетической трансформации, или просто *компетентностью* (англ. competence) называется приобретенная в ходе онтогенеза способность связывать и переносить в собственный цитоплазматический компартмент экзогенную высокомолекулярную ДНК. Иными словами, это регулируемая экспрессия генов, кодирующих систему импорта ДНК.

подавляющее большинство природно трансформируемых бактерий приобретает состояние компетентности только в определенной экологической обстановке — по достижении критической плотности популяции ($\sim 10^8$ клеток·мл⁻¹), что обычно соответствует поздней логарифмической или ранней стационарной фазе (см. раздел 21.1.1). При этом компетентность индуцируется либо у всей культуры, либо только у части клеток, иногда очень небольшой (примером служит *B. subtilis*).

В ходе развития компетентности синтезируются *de novo* около 20 специфических белков, так что ее можно рассматривать как своеобразную дифференциацию.

Приобретение компетентности связано с «чувством кворума» и является регуляторным ответом индивидуальной клетки на коллективный биосинтез аутоиндуктора, или *феромона* (см. раздел 18.4.2). Роль последнего выполняет гептадекапептид CSP (сокр. англ. competence stimulating peptide). Зрелый феромон образуется в результате протеолитического процессинга N-концевого домена *преферомона*, полипептида *ComC* и секретируется с помощью ABC-транспортера *ComAB*. При пороговом накоплении во внеклеточном пространстве феромон начинает воздействовать на двухкомпонентную сигнальную систему, состоящую из автофосфорилирующейся гистидинкиназы *ComD* (мембранного проводника сигнала) и акцептора фосфорильной группы — цитоплазматического белка *ComE* (регулятора клеточного ответа). Белок *ComE* связывается с контролирующим элементом оперона компетентности *com* и индуцирует транскрипцию структурных генов *comCDE*.

Таким образом, компетентность регулируется окружающей средой (исключением служат представители рода *Neisseria*, компетентные во всех фазах роста культуры).

Гены компетентности *comCDE* располагаются по соседству с локусом *ori*, отвечающим за инициацию репликации. Показано также, что частота актов инициации репликации у *E. coli* зависит от полноценности питательной среды. Отсюда следует, что изменение темпа репликации должно непосредственно влиять на число копий генов *comCDE*. Иными словами, можно предположить, что расположение генов *comCDE* близко к началу репликации позволяет соотносить компетентность с клеточным размножением, и что чувство кворума дает бактериям возможность предвидеть момент наступления неблагоприятных условий голодания, когда приобретение селективно-полезных признаков путем трансформации может способствовать выживанию.

Рецепция и связывание ДНК. Хотя по расчетным данным на поверхности компетентной бактериальной клетки имеется 30–80 сайтов связывания трансформирующей ДНК, эта сторона явления наименее изучена. В частности, до сих пор неизвестно, существует ли вообще специфический рецептор для ДНК.

Высокая эффективность внутривидовой трансформации *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae* определяется наличием в геномах этих бактерий повторяющихся DUS-последовательностей длиной 9–10 п.н. (сокр. англ. DNA uptake sequence). В частности, DUS-последовательность *N. gonorrhoeae* имеет структуру 5'-GCCGTCTGAA-3' и представлена 1965 копиями на хромосому.

Однако корреляция между существованием в геномах этих бактерий большого количества

DUS-повторов и присутствием на клеточной поверхности рецепторов (которые различали бы «родственную» ДНК, содержащую DUS, и «неродственную» ДНК, которая DUS не содержит) до сих пор не выявлена.

Как уже отмечалось, представители рода *Neisseria* обладают перманентной компетентностью. Благодаря высокому уровню горизонтального переноса генов популяции этих бактерий приобретают панмиктический характер, а их геномы имеют мозаичную структуру.

Центральную роль в связывании ДНК и ее доставке к транслокаторному комплексу как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий играют *псевдофимбрии компетентности* (англ. competence pseudopili, ψ -pili) — гомологи фимбрий IV (англ. type four pili, TFP).

Напомним, что обычные фимбрии IV типа представляют собой длинные (до нескольких мкм) и одновременно с этим тонкие (диаметром ~ 6 нм) поверхностные придатки, состоящие из субъединиц белка пилина. Они участвуют в образовании биопленок и плодовых тел миксобактерий, а также — благодаря способности собираться и вновь разбираться — обеспечивают поверхностное перемещение рывком, или твитчинг (см. I том учебника).

Для трансформации не требуются полноценные фимбрии IV типа, а достаточно псевдофимбрий — коротких цилиндрических структур (длиной ~ 50 нм, что соответствует радиальной протяженности периплазматического компартмента), состоящих из 40–100 субъединиц псевдопилина.

Судя по тому, что фимбрии IV типа и псевдофимбрии содержат взаимно гомологичные компоненты, они имеют одинаковую архитектуру и сходный механизм действия. К числу консервативных белков у них относятся:

- препилины и препсевдопилины;
- сигнальные пептидазы, осуществляющие процессинг препилинов и препсевдопилинов;
- экспортные АТФазы;
- вспомогательные белки в составе СМ;
- вспомогательные поверхностные белки и белки ОМ;
- секретины.

Белки первых четырех групп входят в состав псевдофимбрий как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий (например, *B. subtilis* и *N. gonorrhoeae*). Белки последних двух групп участвуют в трансформации только у грамотрицательных бактерий.

Предполагается, что за счет своего сокращения псевдофимбрия доставляет ДНК к транслокатору, расположенному в СМ, причем этот процесс не требует затраты энергии.

Таким образом, полые цилиндрические структуры, встроенные в клеточную поверхность, могут транспортировать белки (при секреции) или ДНК (при трансформации).

Следует обратить внимание на существенное различие механизмов перемещения белка и ДНК с помощью (псевдо)фимбрии. При секреции белка фимбрия служит выходным каналом, в то время как при трансформации псевдофимбрия перемещает ДНК за счет своего сокращения.

Доставка ДНК к транслокатору у грамположительных бактерий (на примере *B. subtilis*). Псевдофимбрия *B. subtilis* состоит из псевдопилинов ComGC, ComGD, ComGE и ComGG (рис. 205). Сборка этой структуры является эндергоническим процессом; источником энергии служит АТФаза ComGA, связанная с внутренней поверхностью СМ.

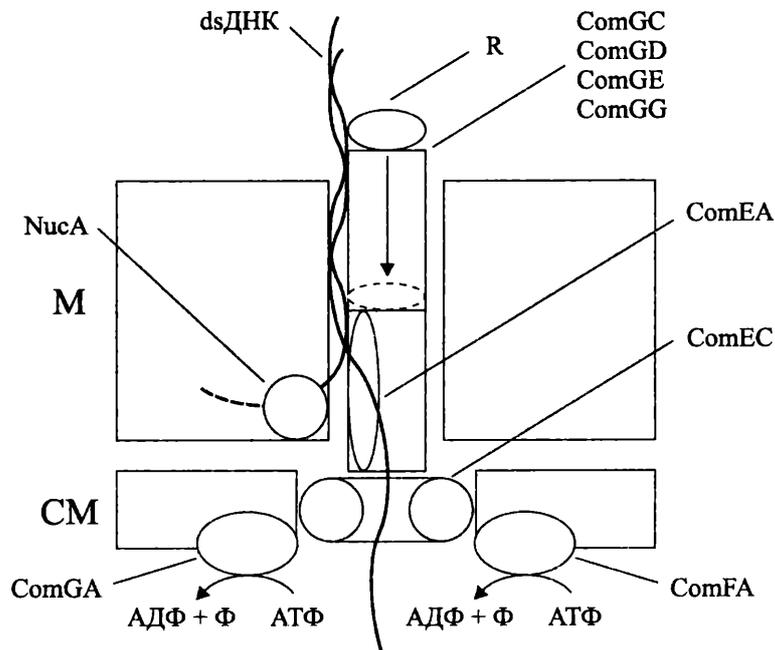


Рис. 205. Поглощение ДНК при трансформации *B. subtilis*.
 CM — цитоплазматическая мембрана; CW — клеточная стенка;
 ДНК_д — ДНК донора; ДНК_р — ДНК реципиента; ψ — псевдофимбрия;
 DB — ДНК-связывающий белок; ComEA — мембранный рецептор ДНК;
 ComEC — мембранный канал; N — нуклеаза; ComFA — АТФаза.
 Стрелкой показано сокращение псевдофимбрии.

Предполагается, что на дистальном конце псевдофимбрии находится неидентифицированный рецептор ДНК.

Сократимая псевдофимбрия играет роль динамического посредника при взаимодействии между рецептором ДНК и ДНК-связывающим белком ComEA. В свою очередь, белок ComEA презентует ДНК транслокатору ComEC, который образует сквозной канал в CM. Параллельно с этим ДНК переводится в одноцепочечную форму (см. ниже).

При доставке к транслокатору ДНК необходимо преодолеть клеточную стенку, для чего требуются локальные изменения в пептидогликановом саккулусе. По-видимому, физический доступ ДНК к белку ComEA обеспечивает цилиндр псевдофимбрии, который пронизывает клеточную стенку и состоит из ComG-белков.

Доставка ДНК к транслокатору у грамотрицательных бактерий (на примере *N. gonorrhoeae*). У грамотрицательных бактерий путь ДНК к транслокатору усложняется тем, что она должна дополнительно преодолеть OM.

Вначале экзогенная ДНК связывается с неидентифицированным рецептором, который распознает имеющиеся в ней DUS-последовательности (см. выше). Затем ДНК проникает в периплазматический компартмент при помощи специализированной транспортной системы — гомолога секреторной системы II типа. В обоих случаях используется пора, расположенная в OM и состоящая из секретина PilQ (рис. 206).

Напомним, что секреторная система II экспортирует белки свернутой конформации (см. I том учебника). Помимо этого секретины образуют портал для выхода

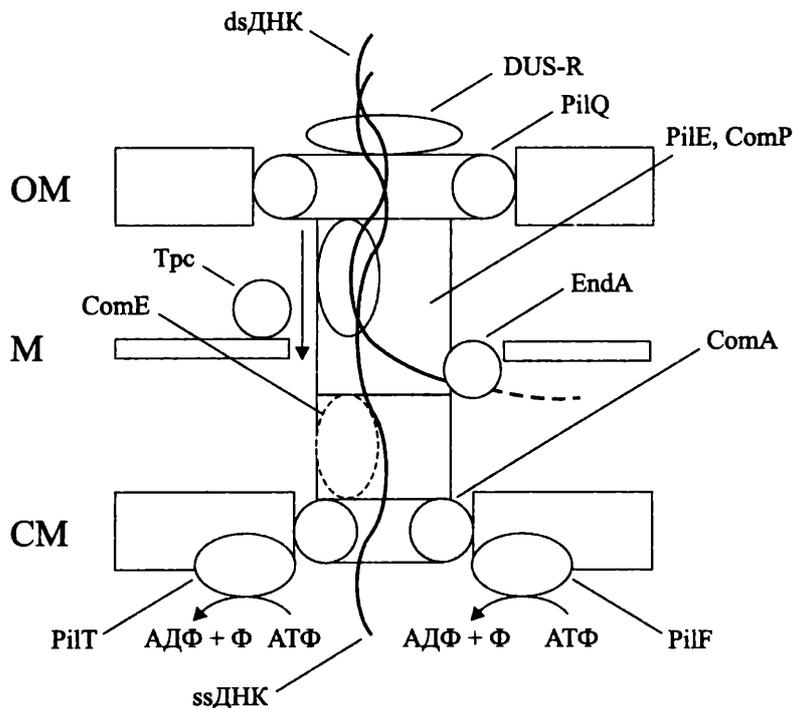


Рис. 206. Поглощение ДНК при трансформации *N. gonorrhoeae*.

СМ — цитоплазматическая мембрана; ОМ — наружная мембрана; М — муреиновый саккулус; Трс — муреингидролаза; DUS — рецептор для DUS-последовательности; dsДНК — двухцепочечная ДНК; ssДНК — одноцепочечная ДНК; PilQ — субъединица секретивной водной поры в наружной мембране; PilE и ComP — псевдопилины; EndA — эндонуклеаза; ComE — периплазматический рецептор одноцепочечной ДНК; ComA — субъединица водного канала в цитоплазматической мембране; PilF и PilT — АТФазы. Стрелкой показано сокращение псевдофимбрии.

фимбрии IV типа через ОМ на клеточную поверхность, а также используются при конъюгации (см. ниже).

Дистальным компонентом секреторной системы II служит водная пора, образованная додекамером белка секретина. Ее максимальный внутренний диаметр составляет 9,5 нм; этого достаточно, чтобы дать проход двухцепочечной ДНК, диаметр которой 2,4 нм.

После проникновения в периплазматический компартмент ДНК связывается с белком ComE, а затем доставляется к транслокатору с помощью сократимой псевдофимбрии, которая состоит из псевдопилинов PilE и ComP. Сборка этой структуры является эндергоническим процессом; источником энергии служит АТФаза PilT, находящаяся на внутренней поверхности СМ.

Прохождению ДНК сквозь муреиновый саккулус способствуют муреингидролаза Трс и пенициллинсвязывающие белки, а также вспомогательный белок ComL.

Процессинг и транслокация ДНК в цитоплазму. Процессинг трансформирующей ДНК заключается, во-первых, в ее расщеплении на фрагменты и, во-вторых, в ее переходе в одноцепочечную форму.

Размер хромосомной ДНК, которая интегрируется в реципиентный геном, в общем случае не оценивался, хотя имеются данные, что клетка может воспринимать несколько независимых фрагментов, в сумме составляющих 1–5% ее хромосомы. В свою очередь, согласно результатам, полученным в опытах по трансформации плазмидами, относительно крупные молекулы ДНК (~50 кДа) перед транслокацией расщепляются на фрагменты размером ~10 кДа.

При трансформации грамположительных и грамотрицательных бактерий через СМ всегда проходит только одна цепь ДНК. Вторая цепь подвергается нуклеолитическому расщеплению с помощью мембраносвязанной нуклеазы (в частности, *B. subtilis* использует для этого нуклеазу NucA, а *N. gonorrhoeae* нуклеазу EndA). Продукт процессинга, одноцепочечная ДНК, проникает в цитоплазму в линейной форме, причем начало импорта инициируется свободным концом молекулы. Одноцепочечная ДНК устойчива к воздействию цитоплазматических рестриктаз, а от других повреждений ее защищают цитоплазматические SSB-белки.

Как уже указывалось, ДНК транслоцируется в цитоплазму через водный канал, который образуют интегральные белки ComEC (*B. subtilis*) или ComA (*N. gonorrhoeae*).

Транслокация ДНК является энергозависимым процессом. Теоретически, источником энергии может быть гидролиз АТФ или протонный градиент, хотя этот вопрос до конца еще не решен. Имеются данные, что транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ в реакции, которую катализируют АТФазы ComFA (*B. subtilis*) или PilF (*N. gonorrhoeae*).

У компетентных палочковидных бактерий, например *B. subtilis*, система для импорта ДНК ассоциирована с клеточными полюсами. В частности, там сосредоточена «сборочная» АТФаза ComGA и «транслокационная» АТФаза ComFA, а также SSB-белки и белок RecA.

Интеграция ДНК в состав генома. Грамположительные бактерии, например *B. subtilis* и *S. pneumoniae*, а также грамотрицательные бактерии, например *Acinetobacter* sp. штамм BD413 и *Pseudomonas stutzeri*, способны воспринимать и гомологичную, и гетерологичную ДНК. Напротив, представители родов *Haemophilus* и *Neisseria* трансформируются только ДНК близкородственных объектов, содержащую видоспецифические DUS-повторы.

Вероятность интеграции высокогомологичной ДНК близка к единице, тогда как для низкогомологичной ДНК она составляет 0,1–10%. Иначе говоря, основным препятствием для трансформации является не поглощение ДНК или ее рестрикция, а процесс интеграции в хромосому реципиента, который зависит от типа рекомбинации. В частности, для гомологической рекомбинации необходимо, чтобы трансформирующая ДНК содержала участки гомологии с резидентной ДНК протяженностью порядка 25–200 п.н. В свою очередь, интеграция путем незаконной рекомбинации происходит с очень низкой вероятностью.

Главным барьером на пути интеграции дивергентной ДНК в геном бактерии является система исправления ошибок спаривания, кодируемая генами *mutSLH* (см. раздел 16.5.1.3).

Поступившая в цитоплазму процессированная хромосомная ДНК интегрируется путем рекомбинации с гомологичным участком реципиентной ДНК. Для этого используется белок RecA и система рекомбинации RecBCD (см. раздел 16.6.1.2).

В случае трансформации с помощью плазмидной ДНК последняя либо интегрируется в хромосому путем гомологической или сайтспецифичной рекомбинации

(т. е. становится эписомой), либо принимает кольцевую двухцепочечную форму с возобновлением способности к автономной репликации — при том условии, что она защищена от разрушительного воздействия хозяйских рестриктаз.

Конъюгация. Конъюгацией (англ. conjugation; от лат. conjugatio — слияние) называется механизм одностороннего переноса плазмиды или транспозона, который осуществляется путем прямого контакта между донором и реципиентом, в результате чего последний сам становится потенциальным донором.

Уникальной особенностью конъюгации является асимметричный перенос ДНК от клетки к клетке, одна из которых играет роль донора, отвечающего за все транспортные функции (закодированные в плазмиде или транспозоне), а другая является реципиентом. В отличие от трансформации и трансдукции, конъюгация всегда происходит с участием живого донора.

Конъюгацию рассматривают в качестве своеобразного *полового процесса* (англ. bacterial sex). Действительно, в ходе нее партнеры находят друг друга, вступают в физический контакт, встречно сигнализируют о готовности к передаче генетической информации и производят акт передачи.

Конъюгативная плаزمида может содержать только гены, необходимые для ее переноса, а может, как и конъюгативный транспозон, включать в свой состав отдельные хромосомные гены. Благодаря этому между бактериями разной степени родства, в том числе филогенетически взаимно удаленными, распространяются гены, обеспечивающие эффективное приспособление к изменяющимся условиям среды (устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, детергентам и ультрафиолетовому излучению; образование экзоферментов и биодegradация ксенобиотиков; способность вступать в симбиоз и т. д.).

Конъюгация играет особую роль в распространении устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам. Известны три стратегии резистентности к антибиотикам: (1) инактивация; (2) экскреция и (3) модификация мишени. Примерами соответствующих механизмов служат: (1) синтез β -лактамаз; (2) использование ABC-транспортёров и (3) метилирование рРНК.

Каково происхождение генов, отвечающих за устойчивость к антибиотикам? Маловероятно, что речь идет об ответе бактерий на введение антибиотиков в медицинскую практику, связанном с быстрым накоплением мутаций. Скорее всего, за миллионы лет до начала эры антибиотиков (1950-е годы) гены устойчивости использовались актинобактериями и плесневыми грибами для защиты от побочного воздействия этих вторичных метаболитов (изначальную ролью которых служит внутриклеточный и межклеточный сигналинг).

На фоне повсеместно используемой антибиотикотерапии горизонтальный перенос устойчивости, как способ достижения экологической адаптации патогенных бактерий, приобрел угрожающие размеры. Считается, что основное значение в этом процессе принадлежит конъюгации.

По сравнению с остальными механизмами горизонтального переноса конъюгация меньше зависит от степени родства между донором и реципиентом, т. е. она характеризуется наибольшим *промыскучетом* (см. раздел 16.1.2.1). В редких случаях она даже принимает интердоменный характер, и тогда бактерии конъюгируют с клетками дрожжевых грибов, высших растений и млекопитающих (в последнем случае примером служит клеточная культура китайского хомячка).

Конъюгацию у бактерий впервые продемонстрировали в 1946 г. американские генетики Джошуа Ледерберг и Эдвард Тейтем (E. L. Tatum). При смешивании двух ауксотрофных мутантов *E. coli* K12, *thr*⁻ и *leu*⁻ они наблюдали ревертантов к прототрофности с частотой $\sim 10^{-7}$ (среднестатистическая вероятность спонтанного появления двойных ревертантов была бы на пять порядков меньше).

Помимо *E. coli*, к настоящему времени конъюгативные системы обнаружены у представителей 30 родов грамотрицательных бактерий (в частности, у родов *Agrobacterium*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter* и *Salmonella*), а также у грамположительных бактерий (в частности, у родов *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Streptomyces*). Процесс, подобный конъюгации, описан в 1980-х гг. у экстремально галофильных архей, однако в дальнейшем это не подтвердилось.

Как отметил Ледерберг в своих воспоминаниях 1987 г., открытие конъюгации, послужившее стартовой чертой для генетики бактерий, было типичным случаем *serendipitum*.

Применительно к научным исследованиям слово серендипити (англ. serendipity) используется для обозначения открытия, совершенного проницательным исследователем при благоприятном стечении обстоятельств. Авторство этого неологизма принадлежит английскому писателю Хорейсу Уолполу (H. Walpole; 1717–1797), который в волшебной сказке «Три принца Серендипа» (1754 г.) описал путешествие владетелей о-ва Серендип (старинное название индийского о-ва Цейлон, ныне островное государство Шри-Ланка), которые не проходили мимо ценных находок.

Действительно, штамм K12, наугад выбранный Ледербергом и Тейтемом из 20 штаммов *E. coli* коллекции Стэнфордского университета (США), характеризуется редчайшим сочетанием свойств:

- содержит конъюгативную F-плазмиду, что само по себе довольно редко;
- трансферная система F-плазмиды дерепрессирована; в противном случае частота рекомбинантов оказалась бы за гранью обнаружения;
- реципиент спонтанно потерял F-плазмиду, иначе ее передача блокировалась бы из-за феномена поверхностного исключения (см. раздел 16.1.2.1);
- F-плазида содержит четыре инсерционные последовательности и может интегрироваться в разные участки хромосомы, что делает K12 часто рекомбинирующим (Hfr) штаммом;
- маркеры *thr* и *leu* тесно сцеплены, поэтому частота появления рекомбинантов выше, чем в том случае, когда бы они находились на разных концах хромосомы.

После открытия конъюгации ключевые достижения в области ее феноменологии последовали одно за другим. В 1950 г. классический опыт Дэйвиса (B. D. Davis), в котором между донором и реципиентом помещалась перегородка из пористого стекла, показал, что фактор генетической рекомбинации *E. coli* — не фильтрующийся, т. е. хромосомные маркеры переносятся только при межклеточном контакте. В 1953 г. английский генетик Вильям Хейс (W. Hayes) идентифицировал «инфекционный вектор», или отвечающий за конъюгацию и горизонтально передаваемый фактор фертильности (F). Наконец, в 1955 г. с помощью методики «прерывистого» спаривания Франсуа Жакоб и Элие Вольман (E. L. Wolman) установили, что гены *E. coli* расположены линейно и при конъюгации передаются однонаправленно. Так впервые была построена генетическая карта бактериальной хромосомы. В дальнейшем методы конструирования рекомбинантных геномов, основанные на конъюгации, стали одним из важнейших орудий генетики бактерий.

Основные этапы и системы конъюгации. На первом этапе конъюгации (не путать с последовательностью событий, которая начинается с первичного контакта между партнерами; см. ниже) происходит репликация плазмиды или транспозона, а также процессинг их ДНК в нуклеопротеиновый интермедиат, или *трансферный конъюгат*.

На втором этапе одноцепочечная, или *трансферная T-ДНК* (сокр. англ. transferred — переносимая) секретируется в цитоплазму реципиентной бактерии.

На третьем этапе синтезируется комплементарная цепь, после чего двухцепочечная ДНК может реплицироваться (автономно или после интеграции в хромосому реципиента).

Для осуществления этих этапов используются две функциональные системы, гены которых относятся к области *tra* (сокр. англ. transfer) конъюгативной плазмиды или конъюгативного транспозона:

— Mpf-система для формирования партнерской пары (сокр. англ. mating pair formation);

— Dtr-система для процессинга и секреции ДНК (сокр. англ. DNA transfer and replication).

Необходим также функциональный посредник, или интерфейс между этими системами. Его роль выполняет сопрягающий белок CP (сокр. англ. coupling protein). Он доставляет продукт Dtr-системы, или трансферный конъюгат ко входному порту Mpf-системы и в той или иной степени способствует перемещению ДНК по конъюгационному каналу.

Генетические детерминанты Mpf- и Dtr-систем, а также фактора CP содержатся в факторах фертильности — самостоятельно передающейся конъюгативной плазмиде или конъюгативном транспозоне. Эти факторы не только распространяются горизонтальным путем, но и осуществляют перенос хромосомной ДНК или мобилизуемой нетрансмиссивной плазмиды (см. раздел 16.1.2.1).

Мобилизуемые (англ. mobilized, Mob) плазмиды не обладают способностью к самостоятельному переносу, поскольку у них имеется своя собственная Dtr-система и собственный фактор CP, но нет Mpf-системы. Если в клетке той же самой донорной бактерии присутствует конъюгативная плаزمида, она играет роль хелпера, в результате чего Dtr-система Mob-плазмиды «паразитирует» на ее Mpf-системе.

Мобилизация может происходить двумя способами. При *транс-мобилизации* конъюгативная плазмиды и мобилизуемая ДНК остаются физически разделенными. При *цис-мобилизации* происходит рекомбинационное слияние конъюгативной плазмиды с мобилизуемой ДНК, и они образуют ковалентный *коинтегра́т*. После конъюгационного переноса коинтегра́т либо сохраняется, либо разделяется на составные части при помощи резольвазы.

В некоторых случаях, например у *Bacteroides fragilis*, в качестве хелпера при цис-мобилизации Mob-плазмиды выступает не конъюгативная плазмиды, а конъюгативный транспозон (см. ниже).

Конъюгативные плазмиды. Конъюгативные плазмиды, в частности фактор фертильности F и F-подобные плазмиды, широко распространены у энтеробактерий. Реже они встречаются у представителей других родов, например псевдомонад.

Они обладают способностью:

— к «вегетативной» репликации (в свободном или интегрированном состоянии);

— к переносу через тесно взаимодействующие клеточные оболочки половых партнеров (индивидуально или в комплексе с другой ДНК);

— к рекомбинации с хромосомами ДНК донора и реципиента (в разных их участках).

Фактор фертильности *E. coli* (F) является представителем большой группы плазмид с одной и той же системой горизонтального переноса, которая закодирована в области *tra*.

Как и в общем случае, эти плазмиды классифицируются по группам несовместимости Inc (см. раздел 16.1.2.1). Плазмиды одной и той же группы взаимно «интерферируют», или конкурируют друг с другом за системы, осуществляющие репликацию и за взаимную изоляцию сестринских репликационных. В том случае, когда в клетке оказываются две плазмиды, принадлежащие к одной и той же группе несов-

местимости, одна из них рано или поздно будет элиминирована в ходе клеточного размножения. Иными словами, плазмиды одной и той же группы несовместимости не могут сосуществовать в общем хозяине.

В группы несовместимости IncF, IncH, IncJ и IncT входят F-подобные плазмиды, а в группы IncI, IncN, IncP и IncW — P-подобные плазмиды (см. ниже).

Группы несовместимости, в свою очередь, делятся на подгруппы. Например, к подгруппе IncFI относятся 24 плазмиды (в частности, F); к группе IncFII — 55 плазмид (в частности, ColB2), к группам IncFIII–IncFVII — 16 плазмид (в частности, pSU316); кроме того, существуют еще шесть неклассифицированных F-подобных плазмид (в частности, R51).

Фактор фертильности F представляет собой стабильно реплицируемую кольцевую двухцепочечную ДНК (1–2 копии на хромосому; ~100 т.п.н.; 60 генов). На участке размером 34 т.п.н. группируются 24 гена, продукты которых выполняют роль регуляторов процесса конъюгации (гены *finCQUVW*; сокр. англ. fertility inhibition) или непосредственно являются субъединицами Dtr- и Mpf-систем (гены *traA–W*). Продукты этих генов позитивно регулируют конъюгацию, обеспечивают эффект поверхностного исключения, биосинтез половых фимбрий (см. ниже) и стабилизацию партнерской пары, а также осуществляют процессинг и секрецию ДНК.

Системы конъюгативного переноса у разных грамотрицательных бактерий либо содержат многочисленный набор взаимно гомологичных компонентов (примером служат плазмиды F, R388, RP4 и Ti), либо их сходство проявляется только на уровне отдельных гомологов.

Ti-плазида. *Agrobacterium tumefaciens* — это фитопатоген, вызывающий образование коронных галлов вследствие интердоменного переноса Ti-плазмиды от бактерии к растению-хозяину (сокр. англ. tumor inducing). Другим примером онкогенной бактерии служит *A. rhizogenes*, вызывающая гипертрофию корневой системы.

Гены Ti-плазмиды обозначаются как *vir*-гены (сокр. англ. virulence). Среди них есть гомологи *tra*-генов, а также уникальные гены, обеспечивающие интердоменный перенос, и гены, которые начинают экспрессироваться в реципиентном растении (см. I том учебника).

В состав оперона *virB* входят 11 генов (*virB1–virB11*), которые кодируют субъединицы Mpf-системы, состоящей из канала для транспорта ДНК, и фимбрий, служащей для прикрепления донора к реципиенту. В свою очередь, оперон *virD* содержит 5 генов (*virD1–virD5*); три из них (*virD1*, *virD2* и *virD4*) кодируют Dtr-систему, осуществляющую процессинг и секрецию ДНК.

Наряду с *vir*-онкогенами, которые вызывают сверхсинтез фитогормонов, Ti-плазида содержит *vir*-гены, отвечающие за образование опинов. Бактерии, колонизировавшие растение, используют эти вещества в качестве питательного субстрата (см. I том учебника).

Внешними индукторами процесса горизонтального переноса Ti-плазмиды служат фенольные соединения и моносахара, которые секретируются поврежденными клетками растения и активируют двухкомпонентную сигнальную систему VirA/VirG. Она, в свою очередь, активирует транскрипцию регулона *vir*. Наряду с указанными субстратами, индукторами онкогенеза служит кислая среда (pH 5,0–5,5) или дефицит неорганического фосфора, сигнал о чем воспринимается глобальной регуляторной системой PhoB (см. раздел 18.3.2.4).

В общем разделе, посвященном плазмидам, мы уже говорили, что у небольшой части клеток конъюгативная плазида может путем «законной» или «незаконной» рекомбинации встраиваться в хромосому. В свою очередь, при эксцизии часть хромосомных генов захватывается плазмидой и вместе с ее собственными генами передается реципиенту. Иными словами, хромосома мобилизуется благодаря приобретению плазмидного ориджина горизонтального переноса *oriT* (см. ниже). В случае фактора F такое событие происходит с относительно высокой частотой и называется Hfr-переносом (см. раздел 16.1.2.1).

Из-за существенной разницы в размере молекулы ДНК конъюгационный перенос хромосомы отличается от конъюгационного переноса плазмиды. Поскольку он может случайно прерваться в любой момент, частота рекомбинации прогрессивно уменьшается для генов, удаленных от локуса *oriT*, который первым поступает в клетку реципиента. Кроме того, для стабильного наследования хромосомные гены донора должны включиться в хромосому реципиента посредством гомологической, или RecBCD-зависимой рекомбинации (см. раздел 16.6.1.2).

Конъюгативные транспозоны. Термин «конъюгативный транспозон» (англ. conjugative transposon) применяется по отношению к мобильному генетическому элементу, который вырезается из генома донора и с помощью «контактного» секреторного аппарата переносится в клетку реципиента, а затем включается в геном эксконъюганта.

В начале 1980-х гг. у грамположительных бактерий были описаны конъюгативные транспозоны размером 15–70 т.п.н., кодирующие устойчивость к одному или нескольким антибиотикам и обладающие широким промискуитетом (классическим примером служит Tn916 *Enterococcus faecalis*, который имеет размер 18 т.п.н. и несет в себе ген устойчивости к тетрациклину).

Конъюгативные транспозоны у грамотрицательных бактерий, преимущественно энтеробактерий, были обнаружены только во второй половине 1990-х гг. (например, CTnscr94 *Salmonella enterica* серовар Typhimurium).

В настоящее время показано, что конъюгативные транспозоны имеются в геномах представителей родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Listeria*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* и др. (всего 25 родов, более 50 видов).

По данным секвенирования конъюгативного транспозона CTn391, он имеет мозаичную структуру и кодирует систему интеграции/эксцизии, сходную с таковой фага λ (см. раздел 16.6.1.2), а также систему горизонтального переноса, сходную с Mpf- и Dtr-системами плазмид, например R27 *Salmonella* sp. (см. выше). Помимо «эгоистических» детерминант, в том числе генов рестрикции/модификации, в число его 96 открытых рамок считывания входят гены устойчивости к ртути, а также к антибиотикам, в частности канамицину.

В отличие от плазмид, конъюгативные транспозоны не содержат ориджина репликации, и поэтому не конкурируют друг с другом за репликационные системы, т.е. не проявляют взаимной несовместимости. Поэтому в одной и той же клетке могут сосуществовать несколько таких генетических элементов.

Мобилизация конъюгативного транспозона происходит путем его вырезания из хозяйской хромосомы с помощью сайтспецифичной рекомбинации. Для этого он использует собственную систему, состоящую из интегразы/рекомбиназы и эксцизионазы (см. раздел 16.6.1.2). В результате этого транспозон покидает хромосому и превращается в кольцевой интермедиат. Он передается реципиенту с помощью механизма, аналогичного конъюгативному переносу плазмиды – путем нанесения разреза в локусе *oriT* и секреции одноцепочечной Т-ДНК (см. ниже). В некоторых случаях конъюгативный транспозон является нетрансмиссивным, и его перенос осуществляется с помощью Mpf-системы трансмиссивной плазмиды или в составе коинтеграта с конъюгативной плазмидой.

После проникновения в реципиентную клетку транспозонная ДНК рециркулируется и реплицируется. Благодаря собственной системе модификации она не подвергается хозяйской рестрикции. После этого она интегрируется в хромосому реципиента с помощью сайтспецифичной рекомбинации.

Важно иметь в виду, что гены, отвечающие за перенос конъюгативной плазмиды или конъюгативного транспозона, экспрессируются не конститутивно, а находятся под контролем со стороны глобальных регуляторных систем, а также специально предназначенных регуляторных элементов, которые входят в состав областей *tra* или *vir* (см. выше).

Расширенной вариацией на тему конъюгативных транспозонов являются *интегроны* (англ. integron; от англ. integration — объединение в одно целое и греч. *on* — сущее; «нечто, являющееся результатом объединения»). Это природные системы для клонирования и экспрессии генов, которые собирают под одной крышей открытые рамки считывания и превращают их в функциональные гены. Неизменная «функциональная платформа» интегрона состоит из гена интегразы и соседствующего с ним прикрепительного сайта *attI*, который может рекомбинировать с прикрепительным сайтом *attC* другого репликона. В свою очередь, сайт *attC* тесно ассоциирован с кассетой, несущей гены устойчивости к антибиотикам, гены вирулентности и т. д. Рекомбинационный захват разнообразных кассет создает гибридные генетические структуры — интегроны и суперинтегроны. Функциональная платформа интегрона обычно не способна к автономной транспозиции, и поэтому интегроны горизонтально переносятся при помощи конъюгативных транспозонов или конъюгативных плазмид. Хромосомные суперинтегроны, эквивалентные по размеру небольшому геному, широко распространены у протеобактерий, обеспечивая их устойчивость к антибиотикам и патогенность.

Система формирования партнерской пары. Для переноса ДНК от донора к реципиенту используется координированно действующий мультипротеиновый комплекс, или *аппарат конъюгации* (англ. conjugation apparatus). Одной из его первоочередных задач и, соответственно, предпосылкой конъюгативного переноса служит образование интимной ассоциации между поверхностными структурами половых партнеров.

Первичный контакт в конъюгационных системах грамотрицательных бактерий осуществляет *половая фимбрия* (англ. sex pilus). Обычно это длинные (2–20 мкм), гибкие и сократимые фимбрии F-типа; реже — короткие (0,2–1 мкм), жесткие и несократимые фимбрии P-типа, например T_i, pKM101, R388 и RP4.

F-фимбрии относятся к числу фимбрий IV типа (см. I том учебника). Они могут занимать как полярное, так и латеральное положение. В зависимости от штамма, их число на клетку варьирует в пределах 1–4. Цилиндрическая нить F-фимбрии имеет внешний диаметр 8 нм и содержит аксиальный канал диаметром 2 нм. Она состоит из сильно гидрофобного белка F-пилина (7,2 кДа), который не содержит аргинина, гистидина, пролина и цистеина.

За образование зрелого F-пилина отвечают три гена. Структурный ген *traA* кодирует препилин молекулярной массой ~13 кДа. Процессинг препилина осуществляет сигнальная пептидаза LepB (продукт гена *traB*), расположенная на внутренней поверхности CM (ей assisteрует продукт гена *traQ*). Она отрезает от белка-предшественника фрагмент, состоящий из 51 аминокислоты. Продукт гена *traX* путем N-ацетилирования образует из оставшегося фрагмента зрелый пилин. Всего в секрети и сборке пилина участвуют не менее 17 генов, которые кодируют структурные и регуляторные белки.

Белок TraK образует в ОМ секретивную пору, через которую фимбрия выходит на клеточную поверхность. Для фиксации секретивного кольца в ОМ используется белок TraV. Белок TraB прикрепляет секретивное кольцо к CM. Белки TraEL с помощью «секреторной» АТФазы TraC участвуют в сборке фимбрии и регулируют ее рост в длину. Белки TraHUW и TrbC принимают участие в сокращении фимбрии, а белки TraGN стабилизируют взаимодействие партнеров.

Кончик F-фимбрии связывается с поверхностными рецепторами реципиента, роль которых, по-видимому, играют липополисахариды и порин OmpA. При этом

донор может принимать разное положение относительно реципиента (бок о бок, полюсом к полюсу, боком к полюсу или полюсом к боку).

После установления конъюгационного контакта кончик F-фимбрии взаимодействует с неидентифицированным вторичным конъюгационным рецептором. Сигнал об этом поступает на основание F-фимбрии, и она спонтанно, без затраты энергии, сокращается (точнее сказать, разбирается на мономеры, начиная с проксимальной части). За счет этого F⁻-клетка подтягивается к F⁺-клетке, и они образуют *партнерскую пару* (англ. mating pair).

Итак, механизм первичного контакта с помощью сократимой фимбрии более или менее понятен. Однако, каким образом партнерская пара образуется с помощью несократимой фимбрии, не установлено. Одно из двух — либо фимбрия разбирается на мономеры, начиная с дистальной части, либо сбрасывается целиком; в обоих случаях дистанция между партнерами уменьшается и переходит в плотный контакт.

Характерным признаком партнерской пары между двумя грамотрицательными бактериями служит образование *конъюгационного мостика* (англ. conjugational junction) в результате слияния прилегающих друг к другу участков ОМ донора и ОМ реципиента. Протяженность таких мостиков составляет 150–200 нм при контакте полюсом к полюсу и до 1500 нм при контакте бок о бок.

Ранее (см. раздел 16.1.2.1) мы уже упоминали о несовместимости плазмид, основанной, в частности, на феномене поверхностного исключения. Запрет на вход (англ. entry exclusion, Eex) объясняется тем, что белок TraT, содержащийся в ОМ реципиента, препятствует связыванию F-фимбрии. Кроме того, после образования партнерской пары белок TraS, входящий в состав СМ реципиента, блокирует проникновение донорской ДНК.

Система для процессинга донорской ДНК и секреции Т-ДНК. Если у грамотрицательных бактерий для формирования партнерской пары донору необходима придаточная структура — половая фимбрия, то для процессинга и секреции ДНК ему нужны две органеллы: цитоплазматическая *релаксосома* и *транслокон*, или конъюгационная пора в клеточной оболочке.

Каким образом запускается процессинг донорской ДНК, еще неизвестно. В любом случае сигнал об установлении контакта между партнерами (англ. mating signal) поступает на *релаксосому* (англ. relaxosome) — консервативную органеллу, осуществляющую процессинг ДНК (рис. 207). Суть дела состоит в каталитическом превращении суперспирализованной, кольцевой двухцепочечной ДНК в линейную одноцепочечную форму. Каскад этих превращений инициируется в уникальном локусе *oriT* (сокр. англ. origin of transfer).

В состав релаксосомы входят:

- сегмент двухцепочечной плазмидной ДНК, содержащий ориджин переноса *oriT* и фланкирующие участки;
- плазмидная релаксаза/геликаза;
- плазмидный репрессор транскрипции;
- хозяйский ДНК-изгибающий белок IHF.

Локус *oriT* расположен по одну из сторон области *tra*. Он имеет небольшой размер (<200 п.н.) и по сравнению с остальными участками плазмидной хромосомы характеризуется более высоким содержанием АТ-пар. Он первым поступает в реципиентную клетку; следом за ним в ориентации 5' → 3' доставляется остальная часть нити Т-ДНК.

Релаксаза/геликаза TraI и TrwC (соответственно, в случае плазмид F и R388),

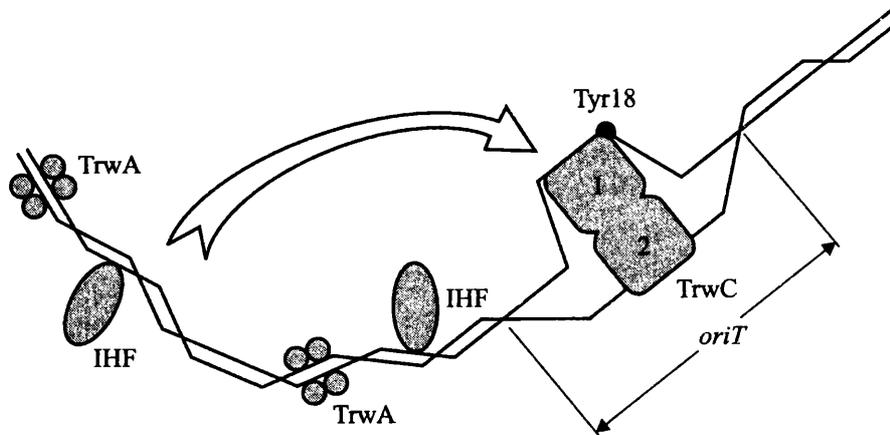


Рис. 207. Релаксосома (на примере плазмиды R388 *E. coli*).
oriT — ориджин переноса; 1 — релаксазный и 2 — геликазный домены релаксазы/геликазы TrwC; Tyr18 — каталитический остаток тирозина, образующий ковалентную связь с Т-ДНК; IHF — хозяйский ДНК-связывающий белок; TrwA — репрессор транскрипции.
 Стрелкой показано направление складывания ДНК под воздействием белка IHF.

как следует из названия этого фермента, обладает двумя активностями, локализованными в разных доменах. Релаксазный домен, обладающий эндонуклеазной (точнее сказать, трансэтерификазной) активностью, находится на N-конце. В свою очередь, геликазный домен, который расплетает двойную спираль ДНК, расположен на С-конце.

Репрессор транскрипции TraY и TrwA (соответственно, для плазмид F и R388) представляет собой небольшой тетрамерный белок, который занимает положение по обе стороны локуса *oriT* и стимулирует активность релаксазы/геликазы, а также негативно регулирует экспрессию оперонов *tra* или *traw*.

Хозяйский белок IHF локально изгибает молекулу ДНК под углом $\sim 160^\circ$, в результате чего она принимает форму буквы U. Это завершает сборку релаксосомы и помогает релаксазе/геликазе нанести разрез в Т-цепи. Сайт для связывания белка IHF представляет собой консервативную последовательность 5'-YAANNNTTGAT-3' (Y обозначает С или Т, N — одно из четырех канонических оснований).

Процессинг плазмидной ДНК начинается с того, что релаксаза/геликаза выбирает одну из комплементарных цепей и наносит разрез в *nick*-сайте локуса *oriT*. Этот сайт представляет собой динуклеотид GC или CC и находится внутри консервативной последовательности 5'-TAAATGCGCCCT-3', которая фланкирована инвертированными повторами (они образуют шпильки, позволяющие релаксазе/геликазе распознать локус *oriT*). Попутно отметим, что название «релаксаза» (англ. relaxase) связано с тем, что посредством одноцепочечного разрыва эта эндонуклеаза устраняет негативную суперспирализацию плазмидной ДНК.

После нанесения разреза релаксаза/геликаза расплетает двухцепочечную ДНК в направлении 5' → 3', постепенно удаляясь от генов оперона *tra*. Источником энергии служит АТФ. Интактная цепь служит матрицей для образования комплементарной цепи с помощью хозяйской ДНК-полимеразы Pol III. При этом действует механизм «катящегося кольца» (см. раздел 16.4.1.2). Освобожденный 5'-конец вытесняемой Т-цепи связывается фосфоэфирной связью с остатком Tyr18 релаксазы, в то время

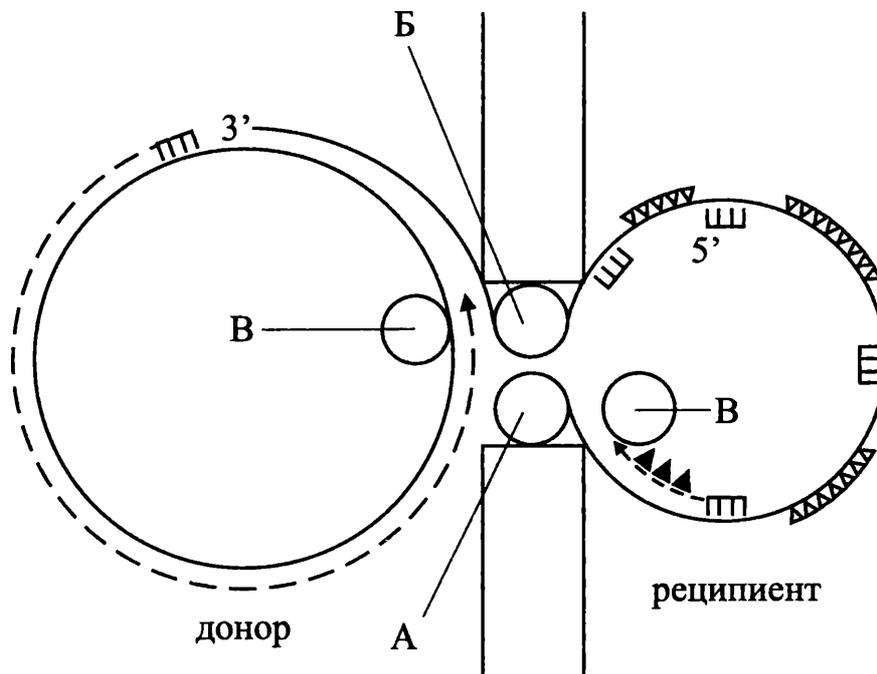


Рис. 208. Конъюгативный перенос ДНК.

A — релаксаза; Б — праймаза; В — ДНК-полимераза Pol III.

Белые треугольники — SSB-белки; черные треугольники — белок ArgA; сплошные линии — старые нити ДНК; пунктиры — новые нити ДНК; гребенки — РНК-праймеры.

Положение релаксазы и праймазы, а также пограничные структуры партнерской пары и конъюгационного канала схематизированы; репликация Т-ДНК условно изображена в процессе переноса до рециркуляризации.

как 3'-конец остается незанятым (рис. 208). В результате образуется ДНК-релаксанный аддукт, или нуклеопротеиновый интермедиат, который играет роль трансферного субстрата. Таким образом, релаксаза/геликаза преобразует свободную энергию расщепления фосфодиэфирной связи в свободную энергию фосфотирозильного интермедиата.

После этого релаксомера вступает в контакт с секреторной порой транслокона, входной портал которой расположен на внутренней поверхности СМ (рис. 207). Важно подчеркнуть, что источником сигнала для распознавания трансферного субстрата служит не сама ДНК, а релаксаза/геликаза, играющая роль «пилотного» белка. В этом заключается одно из существенных отличий конъюгации от трансформации.

Секреторная часть Mpf-системы гомологична секреторной системе III типа (см. I том учебника). Подобные ей системы транспортируют экзопротеины, например токсины, совершенно независимо от ДНК. В случае конъюгации мы сталкиваемся с парадоксальной ситуацией, когда ДНК фактически является попутчиком релаксазы/геликазы.

Рецептором для секреторного субстрата служит сопрягающий белок. После связывания с трансферным субстратом он либо самостоятельно играет роль АТФ-зависимой транслоказы (в частности, в случае плазмиды R388), либо презентует трансферный субстрат транслоказе и совместно с ней выступает в качестве АТФ-

зависимой экспортной помпы (например, в случае плазмид F и Ti). Характерно, что сопрягающие белки обнаруживают гомологию с ДНК-транслоказами SpoIIIЕ *B. subtilis* и FtsK *E. coli* (см. раздел 16.4.2.1).

Сопрягающий белок. Субъединицы сопрягающего белка TraG (в случае F-плазмиды), VirD4 (в случае Ti-плазмиды) и TrwB (в случае плазмиды R388) заякорены N-концом в CM и образуют гексамерное кольцо на внутренней поверхности CM.

Сопрягающие белки принадлежат к суперсемейству AAA-АТФаз, которое представлено во всех трех доменах глобального древа.

Мономеры этих белков содержат консервативные сегменты, или нуклеозидтрифосфат-связывающие *мотивы Уокера* (англ. Walker A and B nucleoside triphosphate binding-motif; по имени английского биохимика J. E. Walker, который впервые описал их в 1982 г.). За счет гидролиза нуклеозидтрифосфатов, в частности АТФ, AAA-белки выполняют «моторную» роль.

Гексамерные голоферменты AAA-белков содержат внутренний канал шириной 2 нм. У тех из них, которые связаны с мембранами, он на цитозольной стороне сужается до 0,8 нм.

К представителям суперсемейства AAA, в частности, относятся:

- белок DnaA (см. раздел 16.4.1.1);
- белок RecA (см. раздел 16.6.1.2);
- $\alpha\beta$ -субъединицы периферического F₁-домена АТФазы/АТФ-синтазы (см. II том учебника);
- ДНК-геликаза (участвует в составе праймосомы в репликации ДНК; см. раздел 16.4.1.1);
- δ' -субъединица «загрузочного» комплекса ДНК-полимеразы Pol III (см. раздел 16.4.1.1);
- ДНК-транслоказы FtsK (участвует в сегрегации сестринских хромосом; см. раздел 16.4.2.1) и SpoIIIЕ (участвует в асимметричной компартиментализации хромосомы при образовании эндоспоры; см. раздел 16.4.2.1);
- фактор терминации транскрипции Rho (см. раздел 16.7.1.3);
- Lon-протеазы (см. раздел 17.2.2);
- белок KaiC, входящий в состав центрального осциллятора биологических часов цианобактерий (см. раздел 17.1.3).

Роль входного портала транслоказы выполняют субъединицы TraD/TraC (в случае F-плазмиды) или VirB11/VirB4 (в случае *A. tumefaciens*). Они содержат мотивы Уокера, обладают АТФ-азной активностью и образуют гексамерные кольца, связанные с внутренней поверхностью CM.

После входного портала трансферный субстрат проходит через интегральную часть транслоказы – водный канал, соединяющий цитоплазматический и периплазматический компартменты. Он образован мультидоменной субъединицей TraB (VirB6).

Преодолев CM, трансферный субстрат не выходит прямо в периплазматический компартмент, а пересекает его по каналу, который образован проксимальной частью половой фимбрии и состоит из пилина TraA (VirB2).

Для прохождения конъюгационного мостика – продукта слияния OM донора и OM реципиента – используется секретинная пора, образованная субъединицами TraK или VirB9 (см. I том учебника).

Каким способом трансферный субстрат преодолевает последний барьер в виде CM реципиента, еще не выяснено.

Судьба T-ДНК после попадания в реципиентную клетку. В цитоплазме реципиента одноцепочечная T-ДНК превращается в дуплекс за счет синтеза на ней, как на матрице, комплементарной цепи. Предварительно она приобретает кольцевую форму путем замыкания в локусе *oriT*, что формально эквивалентно обращенной эндонуклеазной реакции. Предполагается, что рециркуляризация плазмидной ДНК не зависит от реципиента, и что в роли лигазы выступает релаксаза/геликаза, которая локализуется в области транслокона, однако где именно – неизвестно.

Синтез комплементарной цепи плазмидной ДНК в реципиентной клетке (англ. recipient conjugative DNA synthesis, RCDS) осуществляется прерывистым способом с помощью плазмидной праймазы, которая в качестве эскорта сопровождает трансферный субстрат.

Для защиты воссозданного дуплекса от нуклеолитического расщепления используется плазмидная система антирестрикции, состоящая из метилазы ArdA (сокр. англ. alleviation of restriction of DNA), ген которого экспрессируется на стадии Т-ДНК.

Конъюгация у грамположительных бактерий. Процесс конъюгации у грамположительных бактерий был описан на примере ауксотрофных штаммов *Streptomyces* spp. в начале 1950-х годов. Позднее, в начале 1970-х годов его обнаружили у ауксотрофных штаммов *Mycobacterium smegmatis*. Несмотря на исключительную важность стрептомицетов в качестве продуцентов антибиотиков, а также колоссальное значение возбудителей туберкулеза и широкое распространение лекарственной устойчивости среди клинических штаммов *M. tuberculosis*, это явление до конца 1990-х годов не привлекало внимания исследователей.

В настоящее время установлено, что системы конъюгативного переноса у грамположительных бактерий более разнообразны, чем у грамотрицательных, а иногда они даже уникальны.

Общее различие между конъюгацией грамположительных и грамотрицательных бактерий заключается в способе образования первичного межклеточного контакта. У грамположительных бактерий, в отличие от грамотрицательных бактерий, отсутствуют половые фимбрии. Способ взаимной адгезии половых партнеров, а также молекулярный механизм конъюгативного переноса ДНК у них в большинстве случаев неизвестен.

Тем не менее, у многих одноклеточных грамположительных бактерий существуют Dtg-системы и сопрягающие белки, гомологичные тем, которые грамотрицательные бактерии используют для процессинга ДНК плазмиды или транспозона, а также для секреции одноцепочечной Т-ДНК. Конъюгативные плазмиды грамположительных бактерий обладают широким промискуитетом и могут мигрировать между представителями родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* и *Staphylococcus*.

Особенностью конъюгативного переноса плазмид *Enterococcus faecalis* является то, что его стимулируют половые феромоны. Эти термостабильные гекса- или гептапептиды секретируются реципиентом, в ничтожной концентрации (<5 пМ, или 1-5 молекул на клетку) поглощаются донором и вызывают у него ответную реакцию, которая выражается в образовании поверхностных адгезинов (англ. aggregation substance). В свою очередь, на поверхности реципиента образуется рецептор (англ. binding substance). Формирование половой пары не связано с хемотаксисом (см. I том учебника, а также раздел 18.4.1.1 настоящего тома), а происходит в результате случайного соприкосновения клеток.

Конъюгативный перенос плазмид у других одноклеточных грамположительных бактерий (в частности, *B. thuringiensis* и *Lactococcus lactis*) не стимулируется феромонами. В данном случае половая пара образуется путем автоагрегации, после совместной секреции донором и реципиентом белка молекулярной массой 32 кДа, который взаимодействует с поверхностным доменом липотейхоевой кислоты.

Как уже отмечалось, у грамположительных бактерий имеются конъюгативные транспозоны (примером служит Tn916 *E. faecalis*, который несет ген устойчивости к тетрациклину и передается между 50 видами 20 родов грамположительных и грамотрицательных бактерий).

Необычна конъюгация у микобактерий, в частности у *M. smegmatis*. В данном случае конъюгативные плазмиды не содержат генов *tra* и локуса *oriT* (который распознается и процессируется продуктами плазмидных генов). Конъюгация обеспечивается аналогами *oriT* — *bot*-последовательностями (сокр. англ. basis of mobility) и связана с существованием протяженных участков гомологии между плазмидой и хромосомой реципиента, а также зависит от его системы гомологической рекомбинации, в частности от белков RecA и RecBCD (см. раздел 16.6.1.2). Есть предположение, что *bot*-последовательности служат сайтами для нанесения двухцепочечных разрезов, после чего линейная двухцепочечная ДНК плазмиды передается в реципиентную клетку, где она становится субстратом для систем рекомбинационной репарации (см. раздел 16.5.1.4), восстанавливающих ее кольцевую форму.

Конъюгация у многоклеточных грамположительных бактерий изучена на примере нескольких видов рода *Streptomyces*. Конъюгация стрептомицетов отличается от конъюгации всех других бактерий не только по молекулярному механизму, но и по уникальному фенотипическому проявлению, которое можно наблюдать невооруженным глазом.

Перенос плазмиды на агаризованной питательной среде сопровождается образованием характерных зон подавления роста и дифференциации реципиента, или «оспинок» (англ. rock) диаметром 1–3 мм. В некоторых случаях (примером служит *S. lividans*) реципиент накапливает в этих зонах красный антибиотик актинородин.

Конъюгативный перенос у стрептомицетов происходит в ранней фазе роста, когда на плотной питательной среде образуется только субстратный мицелий (см. I том учебника). Установлено, что конъюгативный перенос плазмид, в том числе совместно с мобилизованными хромосомными маркерами, обеспечивает единственный мембранный белок — Tга. Он содержит консервативный мотив Arg-Ala-Ala-Gly-Phe и проявляет высокую степень гомологии с ДНК-транслоказами семейства FtsK/SpoIIIE (которые, в свою очередь, входят в суперсемейство AAA-белков; см. выше).

Избыточную транскрипцию генов *tra* предотвращает репрессор GntR, отсутствие которого приводит к подавлению роста и дифференциации, а в некоторых случаях вызывает летальный эффект, поскольку в результате сверхсинтеза гидрофобного белка Tга нарушается целостность СМ.

Конъюгационная система стрептомицетов уникальна. Самое главное — в отличие от остальных конъюгационных систем, она не имеет плазмидной релаксазы, под воздействием которой образуется одноцепочечная Т-ДНК. В данном случае за перенос отвечают только два плазмидных локуса — *tra* (хотя он не кодирует релаксазы) и *clt* (хотя он не соответствует локусу *oriT*, в *nick*-сайте которого наносится одноцепочечный разрез). Отсюда следует, что у стрептомицетов отсутствует специальная система для формирования половой пары, и что транспортной формой ДНК при конъюгации у них становится не одноцепочечная, а двухцепочечная ДНК (напомним, что белок Tга высоко гомологичен ДНК-транслоказам FtsK/SpoEIII, субстратом которых служит именно двухцепочечная ДНК).

Отсутствие у стрептомицетов специальной системы для формирования половой пары можно объяснить тем, что формой вегетативного роста у этих неподвижных почвенных бактерий является ветвящийся субстратный мицелий, гифы которого тесно соприкасаются друг с другом. В такой ситуации для конъюгации достаточно закодированного в плазмиде транспортного белка Tга, а также сайта для его связывания, расположенного в локусе *clt*. Предполагается, что мономеры белка Tга агрегируют в мембране с образованием кольцевого агрегата диаметром 30–40 нм, внутри которого проходит канал диаметром 10 нм, способный пропустить сложенное кольцо двухцепочечной ДНК. Перемещение ДНК по внутримембранному каналу осуществляется за счет энергии АТФ.

Первичный перенос плазмиды от донора к реципиенту сопровождается ее вторичным переносом внутри мицелия реципиента. За этот процесс, помимо белка Tга, отвечают небольшие белки уникальной первичной структуры, продукты 3–5 генов оперона *spd* (сокр. англ. spreading — распределение).

Конъюгация у микоплазм. Процесс, напоминающий конъюгацию, обнаружен у некоторых микоплазм, в частности у *Acholeplasma* spp., *Mycoplasma pulmonis* и *Spiroplasma citri*. В данном случае данные о молекулярном и цитологическом

механизме конъюгационного переноса ДНК отсутствуют; в частности, неизвестно, какая форма ДНК — одноцепочечная или двухцепочечная — является трансферной. Поскольку эти бактерии лишены клеточной стенки, можно предположить, что конъюгационным мостиком служит зона прямого контакта между двумя СМ.

Трансдукция. Термином «трансдукция» (англ. transduction; от лат. transduco — переправлять) обозначен горизонтальный перенос хромосомной или плазмидной ДНК с помощью фага.

При трансдукции часть генома донора упаковывается в белковую оболочку фага, или капсид. Затем она передается реципиенту в ходе инфекционного процесса, который включает в себя адсорбцию фаговой частицы поверхностными структурами клетки-мишени и инъектирование упакованной ДНК в цитоплазму. Внутри реципиента донорская ДНК либо деградирует, либо сохраняется и получает возможность реплицироваться — автономно или после интеграции в хромосому.

Подобно трансформации, при трансдукции не соблюдается принцип совпадения места/времени, т. е. для нее не требуется образование партнерской пары. Однако, в отличие от голой трансформирующей ДНК, в данном случае ДНК упакована, что защищает ее от повреждений, в частности нуклеазами. Поэтому трансдукция служит гарантированным способом доставки ДНК реципиенту.

Поскольку в капсиде может поместиться только небольшая молекула ДНК — размером около эквивалента фагового генома (не более 100 т.п.н.), с помощью трансдукции переносится ограниченное число тесно сцепленных генов, в частности в случае фага P1 это $\leq 2\%$ генома *E. coli*.

Феномен трансдукции впервые обнаружили в 1952 г. Джошуа Ледерберг и Натан Зиндер (N. D. Zinder) на примере бактериофага P22 *Salmonella enterica* серовара *Turphimigium*. Спустя три года был открыт первый трансдуцирующий фаг P1 *E. coli*.

В настоящее время трансдукция продемонстрирована более, чем у 50 видов бактерий из 25 родов, а также у трех видов архей, относящихся к двум родам.

Если вначале считали, что передача генов путем трансдукции происходит только в узком кругу, в основном у энтеробактерий (как в случае фагов λ или T4), то в настоящее время показано, что многие трансдуцирующие фаги характеризуются довольно широким промискуитетом. Кроме того, выяснилось, что бактериальные геномы до 20% состоят из фаговых генов. Наконец, следует иметь в виду, что концентрация вирусных частиц, прежде всего бактериофагов, в водных экосистемах оценивается в 10^4 – 10^8 мл⁻¹ (что на три порядка больше, чем бактерий). Все это наводит на мысль о том, что трансдукция является одним из факторов эволюции геномов в природных популяциях бактерий, способствуя освоению новых ниш и лучшей экологической адаптации к занимаемой нише. Кроме того, трансдукция имеет важное клиническое значение, в частности при распространении генов вирулентности и устойчивости к антибиотикам.

Если трансформацию можно рассматривать как использование в генетических целях механизма трофического импорта полинуклеотидов, а конъюгацию — механизма секреции ферментов и токсинов, то трансдукция представляет собой побочный эффект репродукции облигатных внутриклеточных паразитов-фагов.

Две стратегии репродукции бактериофагов. Фаги подразделяются на литические и умеренные.

Литический фаг (англ. lytic phage), инфицирующий бактерию, запускает программу образования зрелого поколения вирионов, которые обычно покидают клетку хозяина ценой ее лизиса, т. е. гибели.

Умеренный фаг (англ. temperate phage) поступает иначе. Хотя при некоторых обстоятельствах он может вести себя как литический, выбор делается в сторону стабильного партнерства с хозяином. Фаг координирует собственную репликацию с хозяйской репликацией; при этом избирательно подавляется экспрессия тех генов, продукты которых могут причинить вред хозяину.

Как правило, фаговая ДНК физически интегрируется в состав генома хозяина. В этом случае она называется *профагом* (англ. prophage).

Инфраструктурный анализ полностью секвенированных бактериальных геномов показал, что в них широко представлены профаги. Помимо индуцибельных профагов встречаются криптические профаги. Их геном сильно преобразовался из-за инсерций, а иногда предельно редуцировался из-за делеций, что затрудняет его выявление на основе компьютерных программ.

Довольно надежным маркером профага служит ген интегразы (хотя гомологи этого гена имеются в транспозонах, а также в островках патогенности, и ему гомологичны гены рекомбиназы *xerCD*, отвечающие за устранение димеризации хромосом *E. coli*; см. раздел 16.4.2).

Лучше всего на предмет наличия профагов изучены бактерии фил ВХII *Proteobacteria* и ВХIII *Firmicutes*. В частности, 11 из 14 секвенированных геномов протеобактерий содержат по 7–20 профагов. В свою очередь, все 9 секвенированных геномов фирмикутов содержат по 2–6 профагов.

Остальные филы в этом отношении охарактеризованы гораздо слабее, хотя широко распространена точка зрения, что обладать профагом — скорее правило, чем исключение. Характерно, что паразитические бактерии с «минимизированными» геномами не содержат профагов, что можно рассматривать как следствие эволюционной стратегии массового делетирования генов, даже незаменимых. Примерами служат такие эндопаразиты, как *Buchnera* spp. и *Mycobacterium leprae*, а также эктопаразиты *Mycoplasma* spp.

На сегодняшний день чемпионом по числу профагов, одновременно присутствующих в хромосоме (18, что составляет ~16% генома), является инфицирующий пищевые продукты патоген *E. coli* штамм O157:H7 Sakai. Еще один опасный патоген, *Streptococcus pyogenes*, одновременно содержит 4–6 профагов (до 12% генома). Примером богатой профагами непатогенной бактерии служит *B. subtilis* (10 профагов).

Многие промышленно используемые, а также патогенные бактерии содержат профаги (табл. 27).

Некоторые умеренные фаги (например, LE1, N15, P1, ф20 и фВВ-1) не способны к интеграции и существуют в качестве автономно реплицирующейся плазмиды.

В соответствии с характером развития трансдуцирующего фага, различают два типа трансдукции — общую и специализированную.

Общая трансдукция. Субстратом *общей трансдукции* (англ. generalized transduction) являются случайные участки ДНК, т. е. практически любые гены могут мобилизоваться с одинаковой частотой.

Общая трансдукция (примером служит колифаг P1) происходит при репродукции литических фагов или при индукции умеренных фагов. В обоих случаях в результате экспрессии генов фаговых эндонуклеаз хозяйская хромосома разрезается на фрагменты. Некоторые из них с низкой частотой, $<10^{-6}$ на вирусную частицу, упаковываются в капсид. Причину поведения по принципу «кукушки» связывают с присутствием участков гомологии с упаковочными *pac*-сайтами фага (см. раздел 16.5.2). В результате такой функциональной мимикрии хозяйская ДНК упаковыв-

Таблица 27. Промышленно используемые и патогенные бактерии, содержащие профаги (примеры)

Продуценты	Патогены человека	Фитопатогены
Фила ВХII <i>Proteobacteria</i>		
—	<i>Escherichia coli</i> STEC (энтероколит); <i>Haemophilus influenzae</i> (бактериальный менингит); <i>Salmonella typhi</i> (брюшной тиф); <i>Shigella flexneri</i> (дизентерия); <i>Vibrio cholerae</i> (холера); <i>Yersinia pestis</i> (чума)	<i>Xanthomonas campestris</i> (черная гниль); <i>Xyella fastidiosa</i> (хлороз)
Фила ВХIII <i>Firmicutes</i>		
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (бутанол); <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (пробиотик); <i>Lactococcus lactis</i> (стартер в сыроделии); <i>Streptococcus thermophilus</i> (стартер при получении йогурта)	<i>C. botulinum</i> (пищевой ботулизм); <i>C. perfringens</i> (газовая гангрена); <i>C. tetani</i> (столбняк); <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (дифтерит); <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (туберкулез); <i>Staphylococcus aureus</i> (синдром острого кишечного отравления); <i>Streptococcus pneumoniae</i> (острая бактериальная пневмония); <i>S. pyogenes</i> (сепсис)	—

— — данные отсутствуют.

ваеется в головку капсида взамен фаговой ДНК. Естественно, что после попадания в реципиентную клетку фальшивый фаг не в состоянии пройти литический цикл, хотя сохраняет способность к адсорбции и инъектированию.

Специализированная трансдукция. При *специализированной трансдукции* (англ. *specialized transduction*) фаг интегрируется в донорскую хромосому. Есть фаги, которые интегрируются только в одном хромосомном сайте (примером служит *attB*-сайт интеграции фага λ); есть и такие, которые могут интегрироваться в нескольких сайтах (свыше десяти в случае фага P2). Наконец, некоторые фаги обладают способностью к интеграции в практически любые участки хромосомы (например, фаг Mu).

После эксцизии фаг захватывает с собой и передает реципиенту только те гены, которые были расположены по соседству с сайтом его интеграции.

Специализированную трансдукцию производит умеренный фаг, который может встраиваться в бактериальную хромосому в одном или нескольких специфических сайтах (см. раздел 16.6.1.2). Такое состояние системы фаг-хозяин называется *лизогенией* (англ. *lysogeny*), а умеренный фаг и его хозяин — *лизогенными* (англ. *lysogenic*).

При спонтанной или внешне вызванной индукции фаг переходит от лизогенного цикла к литическому циклу и вырезается из хромосомы. В редких случаях, с частотой $<10^{-6}$ на лизогенную клетку, эксцизия происходит путем незаконной рекомбинации, и тогда сегмент фаговой ДНК замещается участком бактериальной хромосомы (см. раздел 16.6.1.2).

Переходу умеренного фага в лизогенное состояние с частотой 10^{-1} – 10^{-2} способ-

ствует стресс, например при помещении бактерии-хозяина на голодную среду. Для сохранения лизогенного состояния необходим фаговый репрессор, который подавляет экспрессию большинства фаговых генов, в частности тех, которые нужны для образования вирионов и лизиса клетки.

Спонтанная инактивация рецептора индуцирует литический цикл с частотой 10^{-5} – 10^{-6} на клетку, несущую профаг. Стимулированную индукцию профага можно вызвать практически одновременно у всех лизогенных клеток, для чего требуется специфическое внешнее воздействие, например ультрафиолетовое облучение или обработка мутагенами. В обоих случаях активизируются гены литического цикла, в результате чего образуются зрелые вирионы, выход которых почти всегда связан с лизисом клетки (она потому и названа лизогенной, что способна лизироваться при индукции профага).

Лизис, наблюдаемый визуально или оцениваемый по уменьшению светорассеяния культуры при 550 нм, является следствием разрушения муреина (см. I том учебника) литическими системами фага или клеточными автолизинами. Известны две крайние ситуации — когда клетка мгновенно «растворяется» с образованием мельчайших осколков (например, в случае фага лямбда) или когда от нее остается палочковидная «тень» (например, в случае фага фХ174). Полное разрушение клеточной стенки в первом случае вызывает «эндолизин», или гетерогенный комплекс ферментов, к которым относятся лизоцим (гликозидаза), литическая трангликозилаза и эндопептидаза. Они закодированы в геноме фага, и их гены начинают экспрессироваться к моменту начала синтеза капсомеров. Лямбда-подобные фаги обладают тремя «поздними» генами (*s*, *r* и *tz*), которые транскрибируются с общего промотора. Первый из них контролирует лизис, второй кодирует трангликозилазу; функция третьего гена еще не установлена. В свою очередь, частичное разрушение клеточной стенки вызывается бактериальными автолизинами, в частности амидазой и эндопептидазой.

Как уже сказано, при лизогении экспрессируется только незначительная часть фаговых генов, причем тех, которые не имеют отношения к образованию вирионов и лизису клетки. Среди них особо интересны гены, вызывающие изменение фенотипа хозяйской клетки, или *фаговую конверсию* (англ. phage conversion).

Среди грамположительных бактерий примером служит *C. diphtheriae*, которая становится патогенной в результате лизогенизации коринефагом β, кодирующим дифтерийный токсин. В свою очередь, *S. aureus* «обязан» профагу своим энтеротоксином А. Аналогичным образом, экзотоксин *S. pyogenes* кодируется умеренным фагом Т12.

Соответствующими примерами для грамотрицательных бактерий являются STEC-штаммы *E. coli* (Шига-токсин), *Salmonella enterica* серовар Typhi (энтерогемолизин), *Shigella flexneri* (несколько факторов вирулентности) и *Vibrio cholerae* (токсин СТ).

Судьба инъецированной ДНК. При трансдукции переносится двухцепочечная молекула ДНК, причем — по крайней мере, в случае бактериофагов Р1 и Р22 — линейной конфигурации. Если трансдуцированная ДНК донора и ДНК реципиента содержат гомологичные участки, между ними происходит рекомбинация, и генетический материал донора ассимилируется реципиентом.

Трансдукция у архей. Первое сообщение о том, что у архей существует процесс, напоминающий общую трансдукцию, было опубликовано в 1989 г.; объектом исследования послужили два штамма *Methanobacterium voltae*. Через десять лет аналогичный феномен был обнаружен для фага ψМ1 *M. thermoautotrophicum*, а также для фагоподобной частицы VTA *M. voltae* (сокр. англ. voltae transfer agent), которая

переносит короткие фрагменты археотной ДНК (~4,5 т. п.н.). Детали этого процесса до сих пор не выяснены.

Половая изоляция у прокариотов. Как известно, половая изоляция служит одним из факторов видообразования (см. I том учебника). Существует ли она у прокариотов?

Пока горизонтальный перенос генов не приобрел в глазах исследователей практической актуальности (в связи с распространением лекарственной устойчивости), пока не появилась возможность теоретически изучать данный феномен (на основе анализа инфраструктуры секвенированных геномов с применением компьютерных программ), его считали редким явлением. По мере накопления фактов возникла другая крайняя точка зрения, согласно которой глобальная популяция прокариотов рассматривается как единый пул генов, пронизанный горизонтальными связями (см. выше). Истина лежит посередине -- половой процесс у прокариотов распространен широко, однако не универсально. Это позволяет говорить о ряде накладываемых на него ограничений, иными словами, о факторах половой изоляции.

Стратегическим ограничением горизонтального переноса является невыгодность неограниченного промискуитета, иначе бы все бактерии приобрели все гены, представленные в разных экологических нишах. Это привело бы к перегрузке геномов и, как следствие, к их нестабильности. В результате конкретные организмы утратили бы селективные авто- и синэкологические свойства и подверглись бы элиминации.

Другим стратегическим ограничением горизонтального переноса служит риск приобрести вредную аллель. Кроме того, привнесенный ген может функционально дисгармонизировать с резидентным комплексом генов, который обеспечивает экологическое соответствие организма занимаемой им нише. Баланс «плюсов» и «минусов», в конечном счете, определяет частоту горизонтального переноса, а также широту его распространения.

По имеющимся данным, рекомбинация у бактерий происходит с низкой частотой (в случае трансформации *B. subtilis* она составляет 10^{-7} на участок генома размером 1 т. п.н. за одну генерацию). Тем не менее, рекомбинационное преобразование генома происходит в 50 раз быстрее, чем за счет спонтанного мутирования (в пересчете на замену одного нуклеотида).

Существуют и тактические ограничения, из-за которых горизонтальный перенос генов попадает в зависимость от ряда селективирующих факторов. Рассмотрим каждое из этих ограничений по отдельности.

Избирательность экотипа. Предпочтительно, чтобы оба партнера находились в одной и той же нише; иными словами, рекомбинация «отбирает» бактерий сходного экотипа. Крайним примером служит зависимость близкородственной трансформации от феромонов, которые секретируются во внеклеточную среду и провоцируют у донора чувство кворума (см. выше). Конъюгация, требующая прямого межклеточного контакта, также происходит у экологически сходных бактерий. В отличие от этого, для трансдукции не требуется колокализация партнеров, поскольку вирионы распространяются независимо от характера ниши и служат потенциальными векторами для переноса ДНК между представителями не только одинакового, но и разных экотипов.

Избирательность рецепции. По аналогии с эукариотами, половой процесс у которых начинается с взаимного узнавания партнеров, избирательность полового процесса у прокариотов связана с рецепторами.

В случае трансформации это выражается в состоянии компетентности, в част-

ности в образовании рецепторов для специфических DUS-последовательностей донорской ДНК. В результате *Haemophilus influenzae* «не узнает» трансформирующий субстрат *Neisseria gonorrhoeae* и наоборот (см. выше). Однако столь высокая селективность не распространяется на других бактерий, например *B. subtilis*, *S. pneumoniae* и *Synechococcus* spp., способных воспринимать ДНК из разных источников.

В случае конъюгации партнерские пары образуются с помощью половых фимбрий или адгезинов. При образовании конъюгационного мостика у грамотрицательных бактерий две ОМ сливаются вместе, что подразумевает определенное сходство их состава, за которым стоит родство партнеров. Тем не менее, различие в строении оболочки не служит непреодолимым препятствием для «интерграмовой» (т.е. происходящей между грамположительной и грамотрицательной бактерией) и даже интрадоменной конъюгации.

В случае трансдукции фаг распознает рецепторные сайты клеточной поверхности, что лежит в основе его хозяйской специфичности. Хотя спектр хозяев фага может варьировать от единичного вида до представителей разных родов (например, фаг Sp-T хламидобактерии *Sphaerotilus natans* может развиваться на псевдомонадах, пурпурных бактериях и энтеробактериях), большинству фагов свойственна высокая хозяйская специфичность. Именно это ограничивает трансдукцию в сравнении с конъюгацией более узким кругом объектов, а примеры «интерграмовой» трансдукции вообще неизвестны.

Избирательность воздействия на ДНК. Главным ограничителем промискуитета при трансформации является нестабильность «голой» ДНК. Поэтому эффективность трансформации зависит от индивидуальной способности ДНК противостоять повреждениям, а также от природы воздействующих на нее физико-химических факторов среды — температуры, ионного состава, ультрафиолетового излучения и нуклеаз.

Фактором, ограничивающим промискуитет за счет селективного воздействия реципиента на структуру поглощенной ДНК, является система рестрикции-модификации (см. раздел 16.5.2), поскольку короткие фрагменты ДНК, образовавшиеся в результате рестрикции, легче разрушаются цитоплазматическими нуклеазами.

При трансформации внутрь реципиента попадает одноцепочечная ДНК, которая не расщепляется рестриктазами.

Транспортной формой ДНК при конъюгации также служит одиночная цепь, но она превращается в дуплекс, который может быть защищен системой антирестрикции (см. выше).

Трансдукция, при которой переносится двухцепочечная ДНК, особо уязвима по отношению к системам рестрикции-модификации, однако многие фаги обладают собственной системой антирестрикции.

Избирательная интеграция ДНК в хромосому. Для своего стабильного наследования чужеродная ДНК должна интегрироваться в хозяйскую хромосому. В зависимости от степени взаимной гомологии, это может произойти путем сайтспецифичной или гомологической рекомбинации (см. раздел 16.6.1.2).

Сайтспецифичная рекомбинация происходит реже гомологической рекомбинации. Однако она исключительно важна, поскольку за счет нее геном реципиента обогащается новыми последовательностями. Сайтспецифичная рекомбинация обеспечивается фаговой интегразой и не зависит от существования протяженных участков гомологии между резидентной и чужеродной ДНК. В результате горизонталь-

ный перенос возможен как между близкородственными, так и между дистанцированными объектами.

В свою очередь, при гомологической рекомбинации в геноме реципиента на протяженном участке гомологии с чужеродной ДНК происходят инсерции, делеции и другие инфраструктурные изменения. Естественно, что частота гомологической рекомбинации тем ниже, чем меньше взаимное родство донора и реципиента. Кроме того, она контролируется системой исправления ошибок спаривания (см. раздел 16.5.1.3), которая служит дополнительным фактором половой изоляции.

Особое тактическое ограничение действует у симбиотических бактерий, обладающих геномом небольшого размера. В силу специфики своей ниши они имеют мало возможностей для приобретения чужеродных генов, и у них отсутствует отбор, направленный на поддержание систем, обеспечивающих генетическую ассимиляцию экзогенной ДНК.

16.6.2. Ненаследуемые изменения

Изменения генома, которые обсуждались в предыдущем разделе, имеют наследственный характер и передаются по потенциально бесконечной цепи поколений вегетативных клеток.

В отличие от них, ненаследуемые изменения происходят в тупиковом звене, т. е. в терминально дифференцированной нерепродуктивной клетке, онтогенез которой завершается запрограммированной смертью, или апоптозом.

У прокариотов описаны, по крайней мере, два примера таких изменений. Они получили название *перестройки гена, вызванной изменением условий развития* (англ. *developmentally regulated gene rearrangement*). Первый пример имеет отношение к спорообразованию *B. subtilis* — из хромосомного гена терминально дифференцированной материнской клетки вырезается прерывающий фрагмент. Второй пример связан с дифференциацией гетероцист цианобактерий, где аналогичная эксцизия происходит в трех хромосомных генах.

В обоих случаях две части кодирующей последовательности воссоединяются и начинают считываться с общего промотора.

Перестройка гена *sigK* у *B. subtilis*. Завершающие стадии споруляции контролирует четвертый сигма-фактор — σ^K (см. раздел 18.1.1.1). В результате его образования в материнской клетке активируется группа генов, отвечающих за созревание споры, в частности за образование кортекса и защитных покровов.

Регуляция экспрессии гена *sigK* носит сложный характер, и одним из ее проявлений становится структурная перестройка хромосомы материнской клетки. При помощи сайтспецифичной рекомбиназы, которую кодирует ген *spoIVCA*, из гена *sigK* вырезается кольцевой элемент размером 42 т. п. н. Он получил название *skin-элемента* (сокр. англ. *sigK intervening element*) и содержит ген интегразы.

Предполагается, что *skin*-элемент происходит от дефектного профага или от мобильного элемента.

Перестройка генов *nifD*, *fdxN* и *hupL* у цианобактерий. Перестройка гена *nifD* (входит в состав оперона *nifHDK*, кодирует α -субъединицу MoFe-белка динитрогеназы; см. II том учебника), а также гена *fdxN* (входит в состав оперона *nifB-fdxN-nifSU*, кодирует ферредоксин) осуществляется на позднем этапе дифференциации гетероцисты у ряда штаммов *Anabaena* spp. и *Nostoc* spp. По времени она

совпадает с созданием микроаэробной внутриклеточной среды, а также с началом транскрипции генов нитрогеназы.

Гетероцистами цианобактерий называются терминально дифференцированные клетки, в которых, вопреки аэробному окружению, экспрессируются гены, ответственные за дназотрофию, и создаются условия для каталитического действия нитрогеназы (см. раздел 17.5.1.2).

В присутствии связанного азота глобальный регулятор Ntr подавляет транскрипцию гена *nifA*, продукт которого активирует промоторы генов, отвечающих за дназотрофию (см. раздел 18.3.2.3). Поскольку в большинстве случаев белок NifA инактивируется при контакте с молекулярным кислородом, дифференциация гетероцист находится под двойным контролем — со стороны связанного азота и со стороны молекулярного кислорода.

Наряду с нитрогеназой в реакции $N_2 \rightarrow 2NH_3$ участвуют два ключевых фермента, играющие роль донора электронов — ферредоксин и гидрогеназа. Все три белка исключительно лабильны по отношению к кислороду и при контакте с ним необратимо инактивируются в течение нескольких секунд. Для экспрессии их генов требуется делеция в кодирующих участках, программу которой определяет неустановленная регуляторная система.

Элемент размером 11 т. п. н., встроенный в рамку считывания гена *nifD*, вырезается путем сайт-специфичной рекомбинации по двум фланкирующим его прямым 11-мерным повторам 3'-GCCTCATTAGG-5' (рис. 209). Эксицизия совершается с помощью уникальной рекомбиназы, которую кодирует ген *xisA*, расположенный внутри делелируемого элемента.

Перестройка гена *fdxN* идет путем вырезания элемента размером 55 т. п. н. Сайт-специфичную рекомбинацию по двум фланкирующим его прямым 5-мерным повторам 3'-CTTAT-5' осуществляет *резольваза* (см. раздел 16.4.2) — продукт гена *xisF*, который расположен внутри делелируемого фрагмента.

Перестройка гена *hupL*, кодирующего мембранную uptake-гидрогеназу (см. II том учебника), происходит путем удаления элемента размером 10,5 т. п. н. с помощью рекомбиназы XisC по двум фланкирующим его прямым 16-мерным повторам 3'-CACAGCAGTTATATGG-5'. Подобно рекомбиназе XisA, этот фермент уникален и не принадлежит к числу интеграз или резольваз.

Цель всех трех перестроек очевидна: устранить элементы, которые прерывают рамку считывания генов, играющих ключевую роль в физиологии гетероцисты (в противном случае транскрипция генов, расположенных правее вставки, была бы невозможна).

Хотя налицо сходство поведения прерывающих элементов *B. subtilis* и цианобактерий с поведением лизогенного фага, вопрос об их эволюционном происхождении остается открытым. Неизвестно, на каком уровне — транскрипционном или пост-транскрипционном — регулируются соответствующие рекомбиназы. Непонятно также, почему вставка в гене *nifD* наследуется более стабильно, чем вставки в генах *fdxN* и *hupL*.

16.6.3. Эволюция прокариотных геномов

Еще задолго до появления геномики существовало представление о том, что эволюция прокариотов носит адаптивный характер и приводит к увеличению их генетического разнообразия.

На основе таких формализованных критериев, как общее изменение инфраструктуры и размера, можно выделить три основные стратегии эволюции прокариотных геномов (рис. 210):

— *перестройка*;

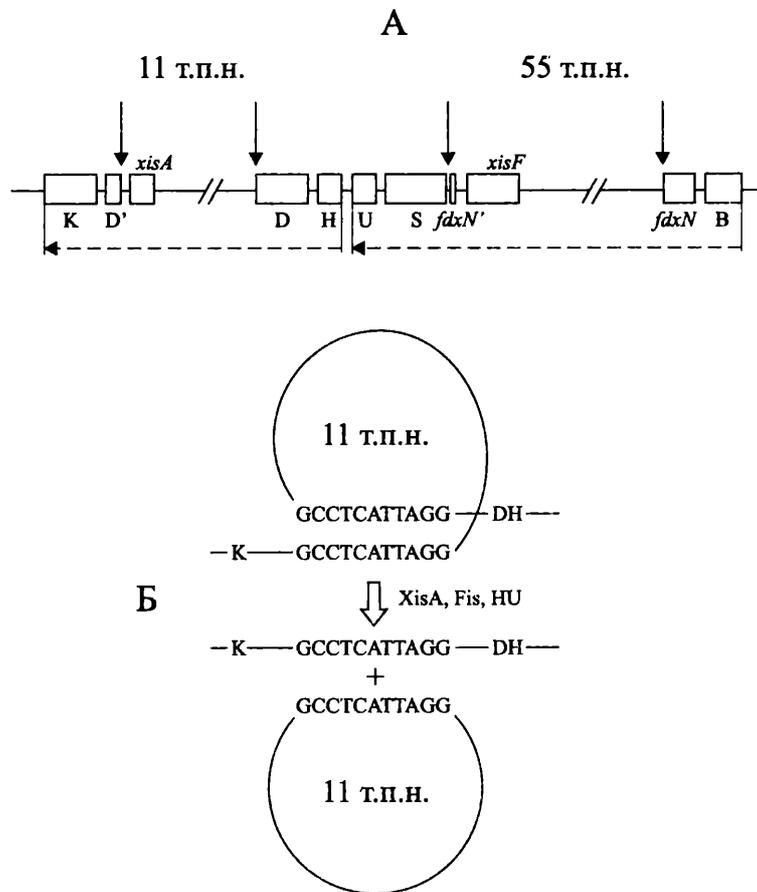


Рис. 209. Ненаследуемая перестройка генов *nifD* и *fdxN* при дифференциации гетероцист *Anabaena* sp. PCC7120.

A — схема оперонов *nifHDK* и *nifB-fdxN-nifSU*; Б — эксцизия элемента размером 11 т. п. н.

XisA — рекомбиназа; Fis — ДНК-изгибающий белок; HU — ДНК-связывающий белок.

Пунктирной стрелкой обозначено направление транскрипции. Сплошными стрелками указаны сайты рекомбинации.

— экспансия;

— редукция.

Понятно, что все эти стратегии не обособлены друг от друга, хотя их вклад в общую картину эволюции не одинаков; кроме того, они в разной степени используются представителями разных филогенетических ветвей.

Благодаря секвенированию хромосомной ДНК у нескольких сотен бактерий (особенно близкородственных; см. раздел 16.3.1), а также у нескольких десятков архей установлено, что основными механизмами эволюции прокариотных геномов являются:

— *генные дубликации*;

— *потеря генов*;

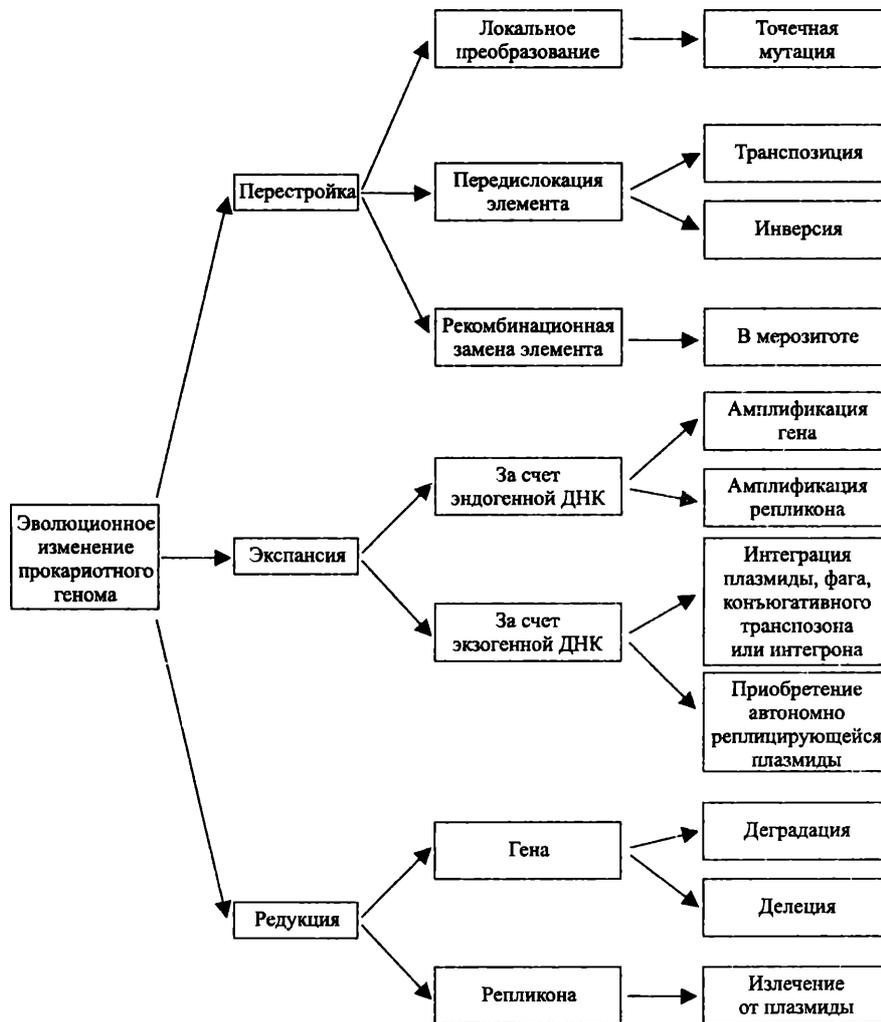


Рис. 210. Стратегии и механизмы эволюции прокариотных геномов.

- хромосомные перестройки;
- приобретение генов за счет горизонтального переноса.

Если вначале пальму первенства среди этих механизмов отдавали генным дупликациям, то теперь считается, что ведущая роль принадлежит горизонтальному переносу генов (см. раздел 16.6.1.3).

В конечном счете, эволюция прокариотных геномов протекает на основе вертикальной и горизонтальной передачи генетических детерминант. Отсюда далеко идущее следствие — родство определяется не только общим предком, но и частотой обмена генами, что создает проблему при филогенетической классификации на основе анализа семантид (см. I том учебника). Как уже отмечалось, реже всего горизонтально передаются гены жесткого коры, в частности *tts*-гены, гораздо чаще гены гибкого коры и наиболее часто — гены окружения (см. раздел 16.6.1.3).

Древо, реконструированное только с учетом гомологии *tts*-генов, не отражает истинной субординации его ветвей из-за разного темпа мутирования. Кроме того, его структура может искажаться из-за горизонтального переноса гена *tts* (примером служит *Rhizobium galegae*) и даже

всего *rnp*-оперона (в случае бактерии *Thermomonospora* sp. и археота *Halobacterium salinarium*). Поэтому более объективную картину филогении дает «супердревцо», реконструированное на основе комплексного сравнения ортологов генов *atpD*, *clpP*, *dnaK*, *groEL*, *grpE*, *hrcA*, *recA* и *tufA*.

Эволюция прокариотных геномов преимущественно связана не с эндогенными хромосомными изменениями, а с привнесенными генетическими элементами, которые являются потомками плазмид, фагов, конъюгативных транспозонов и интегров. Именно так произошли геномные островки, в частности островки патогенности (см. раздел 16.6.1.3).

Перестройка генома. Эта эволюционная стратегия практически не затрагивает размер генома. Дело ограничивается локальным преобразованием нуклеотидной последовательности за счет точечной мутации (см. раздел 16.6.1.1), передислокацией генетических элементов (см. раздел 16.3.1.3) или рекомбинационной заменой генетического элемента его гомологом (см. раздел 16.6.1.2).

Локальное преобразование нуклеотидной последовательности заключается в замене нуклеотида, а также в inserции или делеции одного или нескольких нуклеотидов. Причинами этого служат ошибки репликации, имманентная нестабильность нуклеотидов (особенно цитидилового) или воздействие химических и физических мутагенов. Но поскольку прокариоты обладают эффективными системами репарации (см. раздел 16.5.1), скорость таких локальных преобразований относительно невысока по сравнению с передислокацией генетических элементов или их рекомбинационной заменой.

Хотя частота гомологической рекомбинации у прокариотов ниже, чем у размножающихся половым путем эукариотов, этот «недостаток» с лихвой компенсируется промискуитетом. Вклад в адаптивную эволюцию бактерий и, в конечном счете, в их эволюционный успех, вносят векторы: вирусы, конъюгативные транспозоны и другие вспомогательные генетические элементы.

Экспансия генома. Экспансия, или увеличение размера генома достигается:

- путем эндогенной амплификации гена или увеличения копийности репликона;
- путем введения в состав генома чужеродных последовательностей.

Первоначально ведущую роль в экспансии генома отводили амплификации генов, поскольку именно так возникают гены-паралоги и с ними новые функции (см. раздел 16.3.1.1). Согласно концепции, которую выдвинул в начале 1970-х гг. японский эволюционист Сусуму Оно (S. Ohno), дупликация гена создает функциональную избыточность, что освобождает один из паралогов от контроля со стороны отбора, позволяя ему накопить нейтральные мутации. Большинство таких мутаций — это функционально бессмысленные «нуль-мутации», в результате чего ген вырождается в псевдоген (см. раздел 16.3.1.1). Редкой альтернативой служат спонтанные или индуцированные мутации, приводящие к появлению полезной функции. Они подхватываются и фиксируются отбором.

Согласно «канонической» модели, дупликация гена основана на рекомбинационном процессе и может происходить двумя способами.

Первый из них состоит в гомологической рекомбинации на участке дублируемого гена, которая принимает вид асимметричного кроссинговера между сестринскими репликонами (рис. 211, А).

Второй способ заключается в эксцизии, путем сайтспецифичной рекомбинации, кольцевого элемента с дублируемым геном и реинсерции этого элемента в сестринский репликон (рис. 211, Б).

В то время как механизм амплификации гена более или менее понятен, способы увеличения копийности репликонов, особенно хромосом, еще предстоит выяснить. Что касается копийности плазмид, то она определяется геном *cop* (см. раздел 16.1.2).

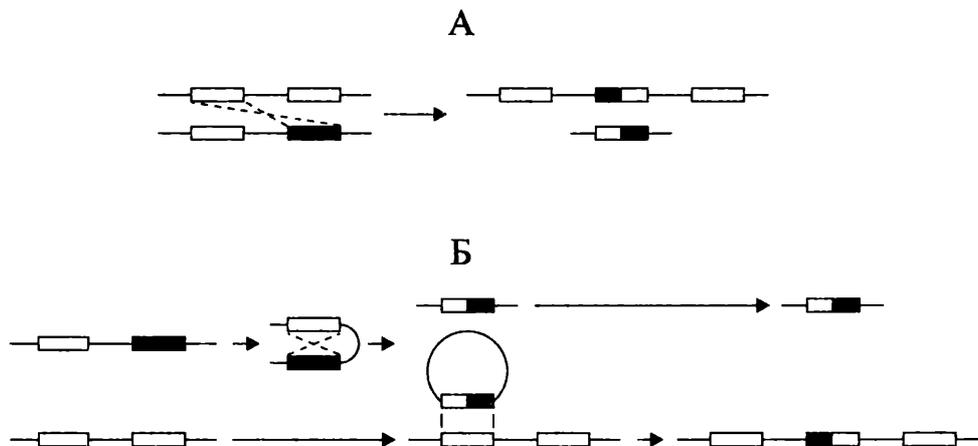


Рис. 211. Каноническая модель дупликации гена.
А — асимметричный кроссинговер; Б — эксцизия и реинсерция кольцевого элемента.

Хотя амплификация генов и репликонов важна для экспансии геномов, ведущая роль в этом процессе, как уже отмечалось, принадлежит горизонтальному переносу, при котором в состав генома включаются экзогенные последовательности.

Особое место в экспансии геномов принадлежит геномным островкам (см. раздел 16.6.1.3). Передача сцепленной группы «экологических» генов способствует быстрой адаптивной эволюции реципиентов, а сами эти гены эволюционируют за счет делеций и превращения в псевдогены.

Чужеродная ДНК может стать автономным репликоном, что происходит с плазмидой, если она совместима и обладает собственным ориджином (см. раздел 16.4.1.2). Но чаще бывает так, что горизонтально перенесенный генетический элемент — плазида, фаг, конъюгативный транспозон или интегрон — путем сайт-специфичной рекомбинации включается в состав хромосомы (см. раздел 16.6.1.3).

Редукция генома. Редукция, или уменьшение размера генома достигается за счет уменьшения количества генов или числа репликонов.

В первом случае ген поэтапно деградирует либо одновременно делетируется; во втором случае — клетка излечивается от плазмиды (см. раздел 16.4.1.2).

В отличие от эукариотов, у которых общий диапазон размеров генома составляет четыре порядка (10^7 – 10^{11} п.н.; см. I том учебника), у прокариотов он варьирует в пределах одного порядка ($5 \cdot 10^5$ – $9,5 \cdot 10^6$ п.н.; см. раздел 16.2). Кроме того, если размер эукариотного генома не прямо пропорционален числу генов (в частности, геномы *H. sapiens* и *S. cerevisiae* различаются по размеру в 300 раз, а по числу генов — всего в 6 раз), геномы прокариотов на 75–95% состоят из кодирующих последовательностей. Иными словами, различие в размере генома отражает различие в числе генов, т. е. редукция генома происходит за счет уменьшения числа генов.

Редукция генома за счет потери архаичных генов домашнего хозяйства вообще закономерна для филогении прокариотов. Делетирование даже немногих генов (прежде всего, ответственных за морфотип или способ энергетического метаболизма) нередко контрастно отражается на фенотипе. Этим, а также горизонтальным переносом соответствующих генов объясняется «парадоксальная» структура глобального древа и его отдельных ветвей, когда граммотрицательные объекты соседствуют с грамположительными, фототрофы — с хемотрофами, аэробы — с анаэробами и т. д. (см. I том учебника).

При значительной редукции генома резко сужается норма реакции генотипа, что особо характерно для бактерий, входящих в состав тесных симбиотических ассоциаций. Характерным примером служат облигатные патогены человека *Chlamydia* spp.,

Mycoplasma spp. и *Rickettsia* spp., а также эндоцитобионты насекомых *Buchnera* spp. и *Wigglesworthia* spp. (см. разделы 19.1.6.1, 20.3.4.2 и 20.3.5). Их геном имеет размер 0,5–1 млн.п.н. и редуцирован за счет генов, избыточных для занимаемой ниши или снижающих темп адаптивной эволюции. Прежде всего, это гены, отвечающие за биосинтез ключевых метаболитов; гены подвижности; гены репарационных систем и т. д. (характерно, что свободноживущие родственники *Buchnera* spp., в частности энтеробактерии, имеют геном размером 3–6 млн.п.н.). При отсутствии селекционного давления потеря гена обычно является результатом крупной делеции. Возможен и другой вариант: из-за сдвига рамки считывания ген превращается в нефункциональный псевдоген, а тот за счет новых нейтральных мутаций устраняется или вырождается в спейсер (см. раздел 16.3.1.1).

Хотя «малые» геномы в большинстве случаев являются плодом редукционной эволюции, в некоторых случаях они могут отражать прототип генетической организации прокариотной клетки.

Возможным примером служит археот *Nanoarchaeum equitans* (см. I том учебника), размер генома которого составляет 491 т.п.н., что соответствует 537 структурным генам. Геном *N. equitans* имеет необычно компактную структуру, гены расположены бок о бок. Еще одной его особенностью служит отсутствие оперонов, в том числе *trn*-оперона, одновременно с присутствием аномально большого количества интронов (11 в структурных генах и 4 в генах тРНК).

С одной стороны, все это может указывать на массовую редукцию и перетасовку генов. С другой стороны, в геноме *N. equitans* нет таких признаков эволюционной деградации, как псевдогены и спейсеры, хотя большое число псевдогенов не обязательно свойственно редуцированным геномам (например, у *Rickettsia* spp. их много, а у *Chlamydia* spp. — мало).

Таким образом, вопрос о первичности или вторичности карликового размера генома *N. equitans* остается открытым.

Соотношение экспансии генома и редукции генома. Считается, что при эволюции геномов экспансия, как правило, уравнивает редукцию. В итоге, размер генома остается относительно постоянным.

Тем не менее, во многих случаях одна из двух эволюционных стратегий преобладает над другой, и тогда изменение размера генома в ту или иную сторону определяется соотношением между потерей нуклеотидных последовательностей и их приобретением. В свою очередь, это зависит от типа занимаемой ниши. Например, размер генома эндо- и экзклеточных штаммов *E. coli* различается на 20%.

Темп эволюции прокариотных геномов. Темп эволюции прокариотного генома находится в обратной зависимости от его консерватизма. Яркой иллюстрацией этого служат различия в стабильности геномов у бактерий разных экотипов, когда мутационный процесс вместе с сопровождающим отбором принимают контрастную форму.

По современным данным, среди бактерий чемпионом по стабильности генома является эндосимбионт насекомых *Buchnera aphidicola*. За последние 50–200 млн. лет геном этой бактерии практически не подвергался перестройкам за счет передислокаций и горизонтального переноса, хотя образование псевдогенов и потеря генов в результате накопления точечных мутаций происходили с обычной скоростью.

Противоположностью *B. aphidicola* являются ее родственники — *E. coli* и *S. enterica*, в геномах которых отношение числа перестроек к нуклеотидным заменам в 2 тыс раз выше. Темп эволюции генома *E. coli* (на примере штамма K-12) был крайне высоким — свыше 17% открытых рамок считывания она приобрела от не-энтеробактерий за последние 100 млн. лет.

Пангеномика. Как уже отмечалось (см. раздел 16.3.1), полная расшифровка прокариотных геномов принимает столь широкий размах, что по прогнозам на исходе первого десятилетия XXI в. число завершенных геномных проектов превы-

сит тысячу. Благодаря развитию сверхдешевых технологий секвенирования (англ. ultra-low cost sequencing; ULCS) у исследователей появилась возможность, не прекращая секвенировать геномы все новых видов, приступить к секвенированию геномов нескольких представителей одного и того же вида.

Ясно, что полная последовательность ДНК отдельного штамма отражает только его собственный генетический репертуар, а не генетическое богатство вида, в состав которого входят объекты с разными гено- и фенотипическими признаками, в частности с разными экологическими свойствами. Ясно также, что общий пул генов бактерий определенного вида проецируется на геномы отдельных клональных популяций или коллекционных штаммов.

Целостный подход к анализу пула генов, свойственных отдельному виду, был предложен в начале 2000-х гг. и был назван *пангеномикой* (англ. pan-genomics; от греч. pantos — всецело), а набор всех генов представителей вида — *пангеномом* (англ. pan-genome).

Результаты самых первых анализов выявили существенные различия в содержании генов между близкими объектами; например, модельный штамм *E. coli* K-12 имеет только 40% общих генов с уропатогенными и энтерогеморрагическими штаммами. Различия между геномами родственных объектов касаются не только набора генов, но также набора или числа инсерционных последовательностей и транспозонов.

К середине 2005 г. пангеномный подход был применен к представителям 40 родов восьми бактериальных фил.

В частности, на основе секвенирования 20 индивидуальных геномов получена первая версия пангенома *E. coli*, который состоит из универсального кора из ~2 тыс генов и периферии из ~8 тыс генов (имеющихся не у всех, а только у некоторых штаммов).

Хотя по числу расшифрованных геномов археи значительно уступают бактериям (к середине 2006 г. — 27 против 327), в настоящее время доступна первая версия пангенома *Haloquadratum walsbyi*, а также пангенома метаногенов «кластера I», характерного для микробиоты рисовых полей.

Благодаря горизонтальному переносу пангеном представляет собой варибельную коллекцию адаптационных детерминант, дополняющих стабильный кор. Объем пангеномов у представителей разных эволюционных ветвей может различаться, что зависит от широты адаптационных возможностей вида. Иногда пангеном исчерпывается последовательностями всего нескольких штаммов, как, например, в случае термоацидофилов *Ferroplasma* spp. и *Leptospirillum* spp.

Практический аспект пангеномики заключается в разработке универсальных вакцин (применительно к стрептококкам группы В такую роль может сыграть пагеном *Streptococcus agalactiae*).

Метагеномика. Большинство обитателей природных ниш принадлежит к числу некультивируемых объектов (см. I том учебника). Факт их существования регистрируется по присутствию в «природной» ДНК уникальных последовательностей гена рРНК. Случайная амплификация последовательностей, фланкирующих этот ген, дает дополнительные сведения о структуре генома, что в ряде случаев позволяет делать выводы о функциональной роли его фантомного обладателя в микробном сообществе.

В настоящее время эту задачу решает *метагеномика* (англ. metagenomics; от греч. meta — между; в данном случае — переход к другой геномике). Первые иссле-

дования в области метагеномики морского пикопланктона провела в 1991 г. группа Нормана Пейса (N. R. Pace), а сами термины «метагеном» и «метагеномика» были предложены Рондоном (M. R. Rondon) с соавторами в 2000 г.

Метагеномика занимается анализом комплекса геномов из определенной ниши; с этой целью амплифицируют *природную ДНК* (англ. environmental DNA) и проводят компьютерную обработку полученных последовательностей. Метагеномика решает две основные задачи — идентифицирует новые гены, в том числе гены, имеющие практическое значение, а также расширяет и углубляет представления об экологии прокариотов.

В отличие от традиционной геномики, метагеномика использует для секвенирования не материал лабораторной культуры, а препарат ДНК смешанной популяции в определенной природной нише.

Метагеномный анализ начинается с получения природной ДНК. Иногда это довольно проблематично из-за загрязнения препарата полифенолами, мешающими амплификации.

На втором этапе создаются «библиотеки» небольших фрагментов ДНК (<10 т. п. н.) путем амплификации природных последовательностей и их клонирования в стандартных векторах с использованием *E. coli* в качестве хозяина. Обычно применяют вырожденные праймеры, которые дают возможность провести случайную shotgun-амплификацию (от англ. shotgun — ружье-дробовик; *буквально* — амплификация вразлет). Естественно, что шанс выявить тот или иной кластер генов зависит от размера вставки. Поэтому для вставок величиной 25–35 т. п. н. в качестве вектора используют *космиды*, т. е. плазмиды с «липкими» концами (от сокр. англ. cohesive site plasmid), а для вставок размером до 200 т. п. н. — искусственные плазмиды (см. раздел 16.1.2).

На третьем этапе секвенируют амплифицированные последовательности и собирают протяженные последовательности с перекрывающимися участками.

Четвертый этап заключается в компьютерной расшифровке метагенома. С помощью специальных программ от «сырого» прочтения переходят к протеому и идентифицируют отдельные гены. Если ген с известной или ранее неизвестной функцией сцеплен с одним из 25–35 консервативных генов-маркеров (прежде всего, с геном рРНК), это четко указывает на филогенетическое положение его хозяина.

К настоящему времени успешно завершены ряд метагеномных проектов, в частности, характеризующий акваторию Саргассова моря, что позволило идентифицировать ряд новых генов, которые после клонирования могут найти применение в биотехнологии. В число продуктов экспрессии этих генов входят амилазы, липазы, оксидоредуктазы, эстеразы и ряд других ферментов, например синтетаза 2,5-дикето-D-глюкуроновой кислоты (промежуточного продукта при производстве аскорбиновой кислоты из глюкозы) и β-кетоацилсинтетаза (участвующая в образовании антибиотиков с поликетидным «хвостом» $-S-(CO-CHR)_n-NHR$, например блеомицина, ванкомицина и эритромицина).

Приведем два примера вклада метагеномики в фундаментальные знания по экологии прокариотов — открытие бактериального регинопотеина (см. II том учебника) и характеристика микробных сообществ биопленок, колонизирующих медицинское оборудование и резиновые покрытия в системах водоснабжения.

16.7. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОМА

Самовоспроизведение генома представляет собой вертикальную и горизонтальную экспансию полинуклеотидных матриц (см. I том учебника). По сути дела, это эгоистический процесс. Однако он всегда разворачивается в конкретной экологической обстановке, где остро стоит проблема источников субстрата и энергии. Для ее

решения необходимы обслуживающие системы домашнего хозяйства, на кодирование которых нацелена основная часть информационной емкости генома.

Универсальным посредником между геномом и организмом, точнее сказать, между геномом и продуктом экспрессии информационных и операционных генов, служит аппарат транскрипции. Именно он создает информационную базу для аппарата трансляции (см. I том учебника).

16.7.1. Транскрипция

Транскрипцией (англ. transcription; от лат. transcribo — переписывать) называется полимеризация рибонуклеотидов А, G, C и U на полинуклеотидной матрице согласно правилу комплементарности Уотсона-Крика, в результате чего образуется смысловая (колинеарная гену) РНК, либо комплементарная ей антисмысловая РНК.

Под определение транскрипции попадает синтез только такой РНК, которая структурно обособляется после считывания с генного участка. Поэтому мы не называем транскрипцией посттрансляционную модификацию 3'-конца мРНК под воздействием «кэппирующей» поли-А-синтетазы, хотя данная нуклеотид-полимеразная реакция имеет стандартный химический механизм (см. раздел 16.7.4). Не считается транскрипцией и образование коротких РНК-праймеров с помощью праймазы DnaG, которые гибридизуются с отстающей цепью ДНК и инициируют синтез фрагментов Оказаки при репликации (см. раздел 16.4.1.1). Зато под определение транскрипции попадает синтез мРНК с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы, которую кодируют вирусы, содержащие матричную РНК (антисмысловую, или «минус» РНК).

Повторим, что транскрипция подчиняется правилу комплементарности нуклеотидов, которые позиционно совпадают в матрице и ее копии. Если источником информации служит двухцепочечная ДНК, то транскрибируемая цепь называется *матричной*, а комплементарная ей цепь — *нематричной*. Нематричная цепь ДНК также называется *кодирующей*, или *смысловой* («плюс») поскольку она колинеарна цепи РНК, которая содержит транскрибируемые гены, в первую очередь, открытые рамки считывания (рис. 212).

Субстратами РНК-полимеразной реакции служат 5'-рибонуклеозидтрифосфаты. Они последовательно присоединяются к 3'-концу наращиваемой цепи, т.е. синтез РНК при транскрипции происходит в направлении $5' \rightarrow 3'$, точно так же, как синтез ДНК при репликации (см. рис. 176).

В начале транскрипции двухцепочечная ДНК расплавляется на участке средней длиной 17 п.н. В образовавшемся *транскрипционном пузырьке* (англ. transcription bubble) одна из одиночных цепей выбирается в качестве матрицы.

ДНК-зависимая РНК-полимераза движется по матричной цепи в направлении $3' \rightarrow 5'$, образуя смысловую РНК. Если фермент перемещается в том же направлении, но уже по нематричной цепи, образуется не кодирующая, или *антисмысловая мРНК* (рис. 212). Хотя антисмысловая РНК не транслируется в белок, она участвует в посттранскрипционном процессинге мРНК — спаривается с ней и блокирует ее трансляцию (см. ниже).

После ответственного выбора между матричной и нематричной цепями совершается не менее ответственный выбор точки *инициации* (начала) и *терминации* (завершения) транскрипции, которые обозначают границы *транскрипционной единицы* — гена или оперона.

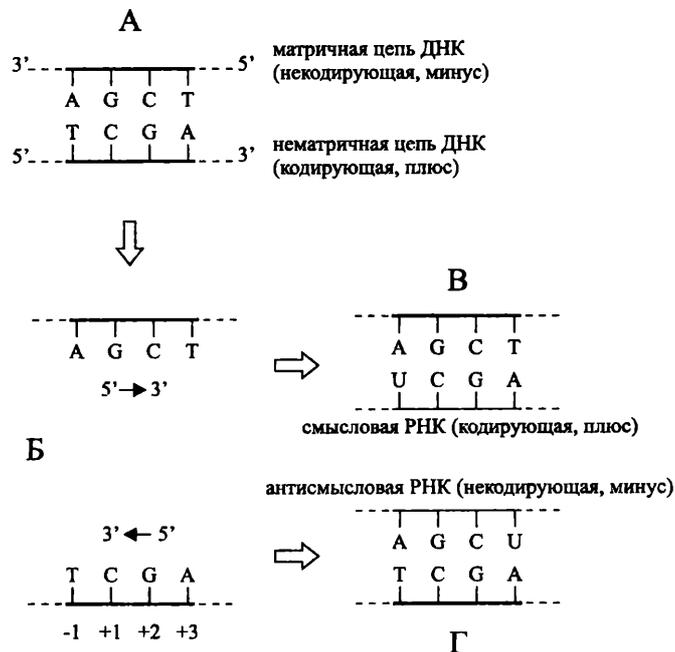


Рис. 212. Транскрипция с образованием смысловой и антисмысловой РНК.

А — матрица ДНК; Б — образование транскрипционного пузырька; В — образование смысловой РНК; Г — образование антисмысловой РНК.

Цифры со знаками + или — обозначают координаты нуклеотидов относительно стартовой точки транскрипции.

Гены «переписаны» в транскрипт, который имеет одинаковую нуклеотидную последовательность с нематричной цепью. Поэтому нуклеотид нематричной цепи ДНК, соответствующий началу транскрипции, называется *стартовой точкой* и обозначается как +1. После стартовой точки, т.е. по ходу транскрипции (англ. downstream — по течению) расположены нуклеотиды с положительными номерами, а до стартовой точки, т.е. против хода транскрипции (англ. upstream — против течения) — нуклеотиды с отрицательными номерами (рис. 212).

Слева (upstream) от 5'-старта транскрипции в матричной ДНК находится участок для исходного связывания РНК-полимеразы, или *промотор*. За *инициацией транскрипции* следует *элонгация* (удлинение полинуклеотидной цепи РНК). Синтез полинуклеотидной цепи РНК прерывается в *терминаторе*, или точке завершения транскрипции, и РНК-полимераза отделяется от матричной цепи ДНК, что соответствует *терминации транскрипции*.

В результате считывания транскрипционной единицы образуется *первичный транскрипт* с однозначно заданными 5'-началом и 3'-концом. В дальнейшем он может быть подвергнут посттранскрипционному процессингу, в частности путем сплайсинга или полиаденилирования (см. разделы 16.3.1.4 и 16.7.4).

РНК-полимеразы. Под общим названием «РНК-полимеразы» объединяются олигомерные ферменты, которые проявляют взаимную гомологию на уровне от-

дельных субъединиц. Наиболее просто устроенные РНК-полимеразы некоторых Т-нечетных фагов состоят из единственной субъединицы (~110 кДа).

Представители трех глобальных филогенетических доменов — *Eucarya*, *Archaea* и *Bacteria* — различаются между собой по типу используемых ими РНК-полимераз.

Прокариоты, а также произошедшие от бактерий симбиотические органеллы-ксеносомы (см. раздел 20.4) содержат «многоцелевую» РНК-полимеразу, которая транскрибирует все гены и, в частности, образует все три основных типа РНК (мРНК, рРНК и тРНК).

Эукариоты обладают тремя «специализированными» РНК-полимеразами — для мРНК, для рРНК и для тРНК.

Эукариотные РНК-полимеразы. К числу ядерных РНК-полимераз относятся:

— РНК-полимераза I, которая локализована в ядрышке и транскрибирует гены 5,5S рРНК, 18S рРНК и 28S рРНК;

— «главная» РНК-полимераза II, которая локализована в нуклеоплазме и транскрибирует гены мРНК;

— РНК-полимераза III, которая локализована в ядрышке и синтезирует малые стабильные РНК (5S рРНК, тРНК и sn-РНК, а также sn-РНК сплайсосомы и 7S РНК секреторной SRP-частицы; см. I том учебника).

Эукариотные РНК-полимеразы обладают сложным строением и содержат, как минимум, две большие (>100 кДа) и 8–12 малых субъединиц.

Археотная РНК-полимераза. Полимеразы этого типа преимущественно состоят из 7–11 субъединиц и сходны с 8–13 субъединичной РНК-полимеразой II. Однако они функционально отличаются от канонических РНК-полимераз эукариотов. В частности, они не чувствительны к ингибитору эукариотной элонгации α -аманитину. В свою очередь, на них не влияют специфичные для прокариотов ингибиторы — рифампицин (ингибитор инициации транскрипции) и стрептолидигин (ингибитор элонгации).

Бактериальная РНК-полимераза. РНК-полимераза бактерий, в частности *E. coli*, может находиться в двух состояниях — кор-фермента («минимального» фермента) и голофермента («максимального» фермента).

Кор-фермент образуется из субъединиц α , β , β' и ω в численном соотношении $\alpha_2\beta\beta'\omega$ и обозначается как E (сокращение от англ. enzyme). Кор-фермент способен неспецифически синтезировать полинуклеотиды, но чтобы обеспечить специфическую инициацию транскрипции в промоторном участке, т. е. превратиться в функционально полезный голофермент, он должен присоединить к себе *сигма-фактор*, или субъединицу пятого типа — σ (табл. 28). Она состоит из четырех доменов, среди которых особо важны два функциональных домена: домен для связывания с кор-ферментом и домен для связывания с ДНК.

Порознь кор-фермент и субъединица σ почти не проявляют сродства к «неспецифической» ДНК, в то время как голофермент имеет очень высокое сродство к специфическим промоторным последовательностям (константа ассоциации $1 \cdot 10^{-9} \text{M}$).

Сборка субъединиц голофермента протекает в следующем порядке: $\alpha + \alpha \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\omega \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$.

У разных бактерий компоненты РНК-полимеразы обладают высокой взаимной гомологией и в модельных экспериментах взаимозаменяемы, хотя различаются по молекулярной массе. В частности, у грамотрицательных бактерий субъединица β' обычно крупнее субъединицы β (у грамположительных бактерий — наоборот). В

Таблица 28. Состав и функции субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*

Субъединица	Число субъединиц в голоферменте	Ген	Мол. масса (кДа)	Функция
α	2	<i>groA</i>	36,5	Связывание $\beta\beta'$ -субъединиц с образованием корфермента
β	1	<i>groB</i>	150,6	Связывание субстратов (нуклеозидтрифосфатов); связывание продукта (РНК); катализ инициации транскрипции и элонгации; узнавание терминаторов; «строгий» контроль; авторегуляция оперона <i>groBC</i> ; связывание ингибиторов транскрипции (рифампицина и стрептолидигина)
β'	1	<i>groC</i>	155,2	Связывание δ -субъединицы; связывание ДНК-матрицы
ω	1 (или субстехиометрическое)	<i>groE</i>	13,6	Молекулярный шаперон, обеспечивающий правильный фолдинг β' -субъединицы
σ^{70} (главный σ -фактор)	1 (или субстехиометрическое)	<i>groD</i>	70,3	Узнавание общих промоторов с консенсусными блоками -10 (5'-ТАТААТ-3') и -35 (5'-ТТГАСА-3'); стимуляция образования транскрипционного пузырька
σ^{32} (σ -фактор теплового шока)	1 (или субстехиометрическое)	<i>groH</i>	32,4	Узнавание альтернативных промоторов с консенсусными блоками -10 (5'-СССАТНТ-3') и -35 (5'-СТТГААА-3'); стимуляция образования транскрипционного пузырька

свою очередь, субъединицы σ у грамотрицательных бактерий крупнее, чем у грамположительных бактерий (70–90 кДа против 40–60 кДа).

Главная РНК-полимераза *E. coli* образуется в количестве ~ 3 тыс молекул на клетку, и размер ее частицы составляет $8,5 \times 10,5 \times 14$ нм (примерно половина размера рибосомы).

Рабочий цикл РНК-полимеразы. Реконструкция цепи событий, происходящих с момента сборки голофермента РНК-полимеразы до высвобождения первичного транскрипта, и их точная локализация стали возможны на основе рентгеноструктурного анализа препаратов, полученных на рубеже XX–XXI вв. из бактерии *Thermus aquaticus*.

Установлено, что кор-фермент имеет вид клешни, образованной субъединицами β и β' . На их внутренних поверхностях имеются выступы в виде клапана и зажима. «Клешня» окружает главный канал диаметром 2,7 нм, достаточно просторный для размещения двухцепочечной ДНК. Активный центр с катионом Mg^{2+} находится посередине канала, на его внутренней стенке. По трем сторонам от активного центра расположены расходящиеся туннели — один для входа мономеров и выхода коротких абортных транскриптов (см. ниже), второй для выхода РНК, третий для выхода «прочитанной» ДНК (DBS-туннель; сокр. англ. downstream double-stranded DNA binding site). Помимо этих трех туннелей вблизи активного центра находятся два взаимно параллельных туннеля — соответственно, для матричной и нематричной цепей ДНК (рис. 213, А).

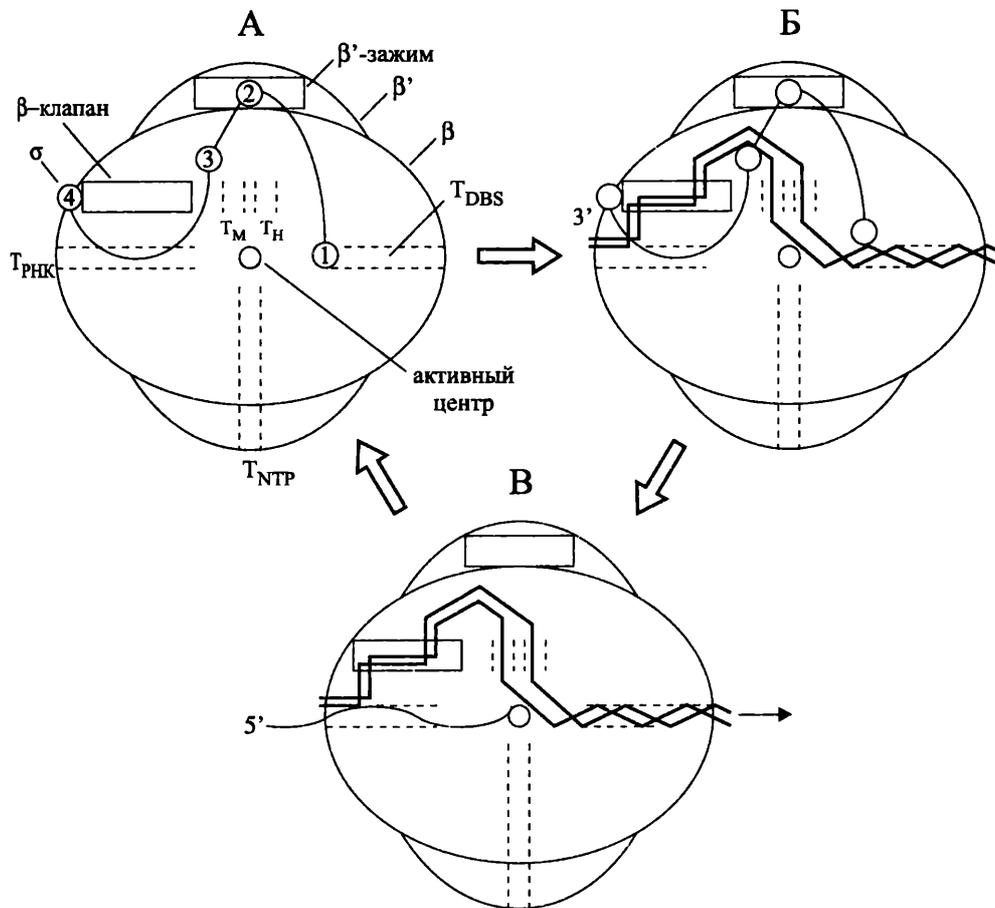


Рис. 213. Рабочий цикл РНК-полимеразы.

А — голофермент; Б — открытый комплекс; В — элонгирующий комплекс.

T_M — туннель для матричной цепи ДНК; T_H — туннель для нематричной цепи ДНК; T_{NTTP} — туннель для нуклеозидтрифосфатов; T_{RNK} — туннель для выхода РНК; T_{DBVS} — туннель (сайт) для связывания посттранскрипционной (downstream) двухцепочечной ДНК.

Цифрами 1–4 обозначены домены σ -фактора; стрелка указывает направление «продевания» ДНК сквозь фермент в ходе транскрипции.

При соединении кор-фермента с субъединицей σ образуется голофермент. Четыре домена субъединицы σ связаны между собой линкерами и ассоциированы, соответственно, с DBS-туннелем, β' -зажимом, главным каналом и β -клапаном (рис. 213, А). При узнавании промотора домен σ_2 связывается с блоком -10 (см. ниже), что способствует расплавлению ДНК с образованием транскрипционного пузырька, а домен σ_4 связывается с блоком -35 . После присоединения субъединицы σ субъединицы β и β' изменяют свою конформацию; зажим закрывается клапаном, и главный канал, ведущий к активному центру, сужается до 1,5 нм, что недостаточно для размещения двухцепочечной ДНК. В итоге образуется так называемый «закрытый» комплекс (англ. RNA polymerase-promoter closed complex, RP_C ; на рис. 204 не показан).

Для образования «открытого» комплекса (англ. polymerase-promoter open complex, RP_O) необходимо второе конформационное изменение РНК-полимеразы, в результате которого главный канал снова расширяется настолько, чтобы пропустить двухцепочечную ДНК. Разъединенные цепи ДНК занимают отдельные каналы, а домен σ_1 покидает DBS-канал, освобождая путь для downstream-ДНК (рис. 213, Б).

При переходе к стадии элонгации субъединица σ покидает кор-фермент, что образно называется «освобождением» промотора (англ. *promoter escape*). ДНК в области активного центра изгибается под углом $\sim 90^\circ$ и продевается сквозь фермент. Первоначально синтезируемые мелкие транскрипты длиной 2–8 н., образующие гетеродуплекс с матрицей, представляют собой abortивный материал и удаляются через туннель для входа мономеров. После того, как транскрипт достигает длины 10–12 н., начинается продуктивная транскрипция, и РНК поступает в туннель для выхода (рис. 213, В).

16.7.1.1. Инициация транскрипции

Дифференциальная экспрессия генов у прокариотов зависит от экофизиологической обстановки и, как правило, контролируется на уровне инициации транскрипции. Поскольку невозможно иметь набор РНК-полимераз на все случаи жизни (т.е. отдельно для каждого типа транскрипционной единицы), число типов РНК-полимераз на порядок меньше, чем число генов. При этом множественные формы голоэнзима различаются только субъединицами σ , которые узнают в матричной ДНК «свой» промотор транскрипции, или просто *промотор* (англ. *promoter* — букв. покровитель). Иначе говоря, субъединицы σ определяют специфичность РНК-полимераз в отношении промоторов, и поэтому они называются *факторами инициации транскрипции*; каждый класс промоторов распознается специфической субъединицей σ .

Разные типы субъединиц σ (сигма-факторов) взаимно конкурируют за связь с кор-ферментом. Однако, каким образом осуществляется дифференциальная транскрипция их собственных генов, точно не известно.

Промоторы. Наиболее изучены промоторные участки *E. coli* (свыше 150 типов). Как показал сравнительный анализ их последовательностей, существует главная форма РНК-полимеразы, которая отвечает за конститутивную транскрипцию информационных генов и генов домашнего хозяйства — $E\sigma^{70}$ (надстрочная цифра указывает молекулярную массу, кДа).

У другого модельного объекта, *B. subtilis*, главной формой РНК-полимеразы является голофермент $E\sigma^A$ ($E\sigma^{43}$).

Скорость синтеза субъединиц главных РНК-полимераз прямо пропорциональна скорости роста бактерий, как и скорость синтеза рибосомных белков.

Внутри промоторных участков, связывающих голофермент $E\sigma^{70}$, расположены две высоко консервативные гексануклеотидные последовательности, которые имеют консенсусную (т.е. среднестатистическую) структуру TGGACA и TATAAT. Они служат сигналами для связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Поскольку центры этих последовательностей лежат на расстоянии 35 и 10 нуклеотидов левее (*upstream*) стартовой точки транскрипции, они называются *блоком -35* и *блоком -10*. Третьим консервативным участком промотора является *спейсер* размером 17 ± 1 нуклеотид, расположенный между концом блока -35 и началом блока -10 (рис. 214). Мутации, изменяющие длину спейсера, оказывают существенное воздействие на уровень транскрипции.

Помимо главной формы РНК-полимеразы существуют минорные, или альтернативные РНК-полимеразы. Они распознают специальные консенсусные последовательности в индуцибельных промоторах. *E. coli* образует пять таких РНК-полимераз. Например, голофермент $E\sigma^{32}$ отвечает за транскрипцию генов теплового шока (см. раздел 19.1.1).

К числу других альтернативных РНК-полимераз относится голофермент $E\sigma^{54}$.

Однако на деле все выглядит иначе. Прокариоты обладают ярко выраженной способностью к дифференциальной экспрессии генов, которая контролируется *факторами транскрипции*. Они имеют белковую природу и выполняют роль регуляторных элементов по отношению к генам-мишеням, которые находятся в цис-положении по отношению к промоторам, т. е. в той же группе сцепления.

Одни из факторов транскрипции, или *активаторы транскрипции* повышают ее уровень по сравнению с базовым уровнем. Другие, или *репрессоры транскрипции* действуют противоположным образом.

Отдельным механизмом контроля инициации транскрипции является ковалентная модификация РНК-полимеразы путем фосфорилирования отдельных субъединиц.

Полиморфизм РНК-полимеразы может также обеспечиваться ее взаимодействием с сигнальным метаболитом — (p)ppGpp (см. рис. 254), который играет роль регуляторного фактора «строгого» ответа в стрессовых условиях, например при аминокислотном голодании (см. раздел 18.1.4).

Стимуляция образования закрытого комплекса. Существуют два механизма активации инициации транскрипции:

- стимуляция образования закрытого комплекса;
- стимуляция изомеризации закрытого комплекса в открытый.

Первый механизм более распространен. Его образно называют *рекрутированием РНК-полимеразы* (англ. RNA polymerase recruitment), поскольку он способствует взаимодействию голофермента с промотором.

В основе образования закрытого комплекса изначально лежит сила промотора, а она тем больше, чем выше сходство последовательностей блоков -35 и -10 с консенсусными. Неудивительно, что одними из наиболее консервативных и, соответственно, наиболее сильных промоторов являются *ттп*-промоторы оперонов рРНК. При высокой скорости роста они обеспечивают свыше половины валового объема транскрипции.

Сила *ттп*-промоторов дополнительно увеличивается за счет третьего сайта связывания РНК-полимеразы, или UP-элемента (сокр. англ. upstream palindrome). Эта АТ-богатая последовательность длиной ~ 20 п.н. имеет консенсусную структуру 5'-AAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTNNAAAA-3' и расположена слева от блока -35 .

РНК-полимераза взаимодействует с UP-элементом при помощи С-концевых доменов своих α -субъединиц (рис. 215, Б), что повышает ее сродство к «специфической» ДНК и, соответственно, способствует образованию закрытого комплекса.

В отсутствие UP-последовательностей повышенное сродство РНК-полимеразы к промоторным участкам ДНК обеспечивают *белки-активаторы*. Типичные регуляторные участки ДНК, с которыми они взаимодействуют, находятся на близком расстоянии (< 150 н.) слева от промоторов и поэтому называются 5'-активирующими, или *UAS-последовательностями* (сокр. англ. upstream activating sequence).

UAS-последовательности следует отличать от *энхансеров* (англ. enhancer — усилитель), которые расположены на дальнем расстоянии от промоторов (до нескольких т.н.), причем не только слева, но иногда и справа от них.

В обоих случаях белки-активаторы содержат два домена — *связывающий* домен (англ. binding domain; BD), который узнает специфическую последовательность регуляторного участка, и *активаторный* домен (англ. activation domain; AD), который взаимодействует с комплексом РНК-полимераза/промотор.

Характерным примером белков-активаторов, взаимодействующих с UAS-последовательностями, служат димерные CRP-белки (сокр. англ. cyclic AMP receptor protein; 23 кДа).

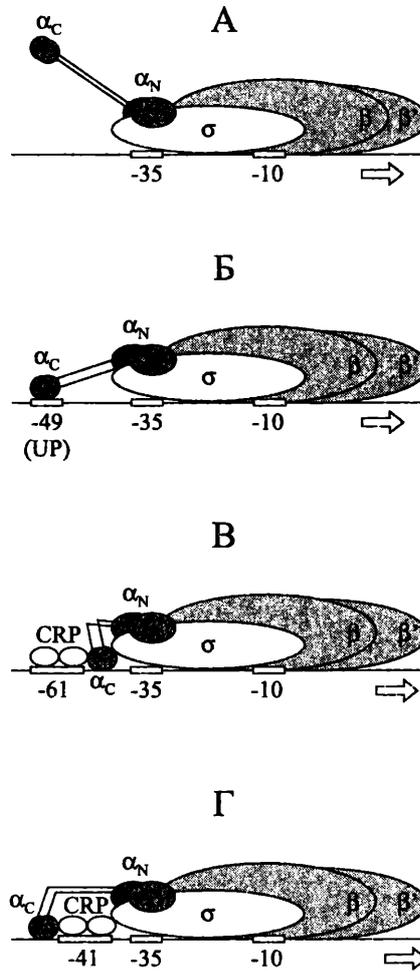


Рис. 215. Комплексы голофермента РНК-полимеразы с промотором.

А — без участия UP-последовательности; Б — с участием UP-последовательности; В — с участием CRP-белка и промоторов I класса; Г — с участием CRP-белка и промоторов II класса.

α , β , β' и σ — субъединицы РНК-полимеразы; α_C — С-концевой домен α -субъединицы РНК-полимеразы; α_N — N-концевой домен α -субъединицы РНК-полимеразы; UP — UP-последовательность; CRP — CRP-белок.

Стрелкой указано направление хода транскрипции.

После активации с помощью аллостерического эффектора — циклического аденозинмонофосфата (3',5'-цикло-АМФ) (см. рис. 260) они приобретают способность взаимодействовать с UAS-последовательностью длиной 22 п.н., которая имеет консенсусную структуру 5'-AAATGTGATCTAGATCACAТТТ-3'. Следом за этим активаторный домен CRP-белка образует тройственный комплекс с бинарным комплексом РНК-полимераза/промотор.

Белки-активаторы, взаимодействующие с UAS-последовательностями, равно как и их мишени — опероны или промоторы — подразделяются на два класса.

В комплексах I класса CRP-белок связывается с регуляторным участком в консенсусном положении -61; при этом проксимальный мономер взаимодействует с С-концевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы (рис. 215, В). Таким путем, в частности, активируется промотор лактозного оперона *lac*. Характерными примерами активаторов I класса служат белок AgaC (активатор арабинозного оперона), белок OmpR (активатор синтеза главных поринов OmpC и OmpF; см. I том учебника), а также белки OxyR и SoxR (активаторы генов защиты при окислительном стрессе; см. раздел 19.1.6.2).

В комплексах II класса CRP-белок связывается с регуляторным участком в консенсусном положении -41; при этом дистальный мономер взаимодействует с С-концевым доменом субъединицы α

РНК-полимеразы, а проксимальный — с субъединицей σ (рис. 215, Г). Так, в частности, активируется промотор галактозного оперона *galP2*. Характерным примером активатора II класса служит белок SoxS (активатор генов защиты при окислительном стрессе; см. раздел 19.1.6.2).

Наряду с комплексами типа *активирующий белок/UAS-последовательность*, образование закрытого комплекса могут стимулировать комплексы типа *активирующий белок/энхансер*. Возникает вопрос, как они это делают, занимая положение вдали от промотора?

По современным представлениям, данная проблема решается путем сближения регуляторного участка с сайтом-мишенью за счет изменения третичной структуры ДНК. Локальный изгиб с образованием *энхансомы* могут вызывать как сами активаторы транскрипции, например CRP-белки, так и многофункциональные специализированные ДНК-изгибающие белки — H-NS, Fis и IHF (см. I том учебника, а также раздел 16.6.1.2).

В частности, гетеродимерный белок IHF (2×11 кДа; гены *himA* и *himD*) связывается с консенсусной последовательностью 5'-((A/T)-ATCAANNNTT(G/A))-3', в результате чего ДНК изгибается под углом $\sim 160^\circ$.

Покажем это на примере активации оперона нитрогеназы *nifHDK* у свободноживущего диазотрофа *Klebsiella pneumoniae* (рис. 216).

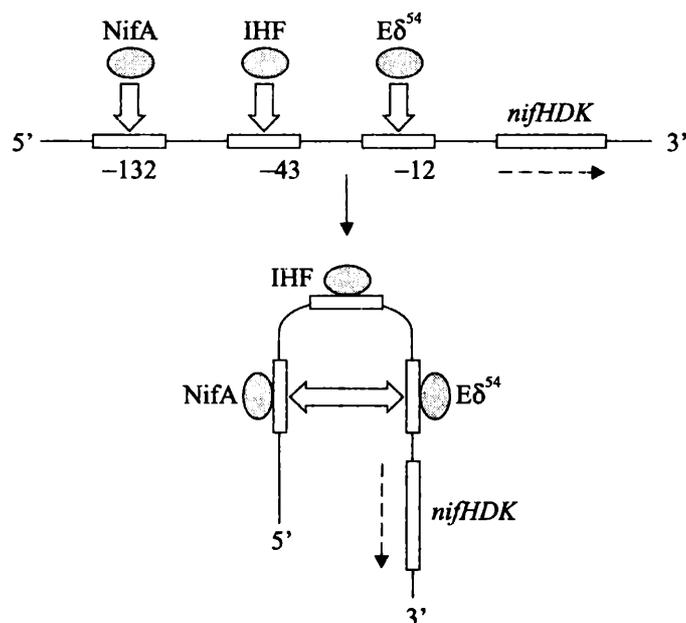


Рис. 216. Участие ДНК-изгибающего белка IHF в образовании закрытого комплекса при активации транскрипции оперона *nifHDK*.

NifA — активаторный белок; $E\sigma^{54}$ — голофермент РНК-полимеразы.

Пунктирной стрелкой указано направление хода транскрипции.

В данном случае транскрипцию осуществляет альтернативная РНК-полимераза $E\sigma^{54}$ (см. выше). Активатором служит белок NifA; он связывается с регуляторным сайтом, центр которого

находится в положении -132 (слишком далеко от промотора, чтобы образовать тройственный комплекс с РНК-полимеразой). При связывании ИНФ-белка в ДНК возникает локальный изгиб, и регуляторный участок сближается с сайтом-мишенью.

Стимуляция изомеризации закрытого комплекса в открытый комплекс. Данный механизм используется в относительно редких случаях, когда РНК-полимераза образует с промотором закрытый комплекс (R_{PC}), однако его переход в открытый комплекс (R_{PO}) происходит с низкой скоростью.

Характерным примером служат альтернативные РНК-полимеразы Eσ⁵⁴, участвующие в экспрессии генов азотного метаболизма. Хотя в данном случае голофермент обладает высоким сродством к консенсусным блокам -24 и -12, из-за короткого размера спейсерного участка промотор работает «вполсилы», и образование транскрипционного пузырька замедляется (рис. 217). Для стимуляции изомеризации в открытый комплекс требуется АТФаза, которая играет роль атипичного активатора транскрипции.

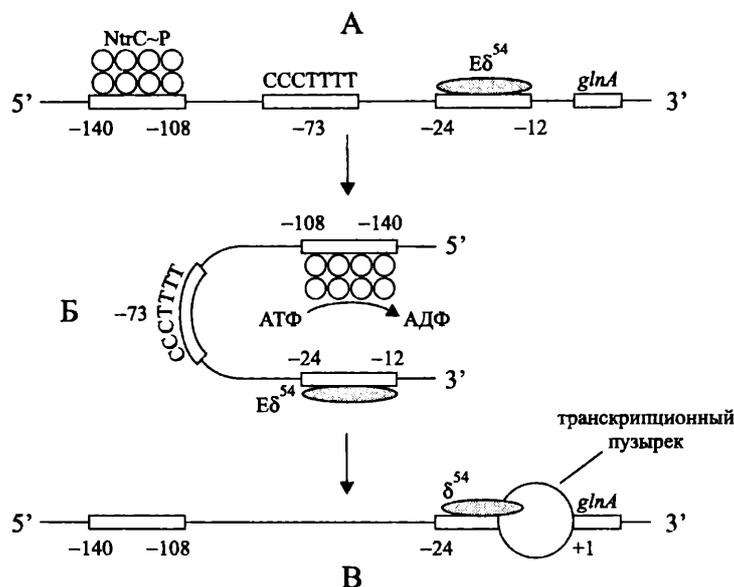


Рис. 217. Стимуляция изомеризации закрытого комплекса в открытый комплекс с помощью регуляторного белка NtrC.

А — закрытый комплекс; Б — переход к открытому комплексу; В — открытый комплекс.

NtrC~P — фосфорилированная форма регуляторного белка NtrC.

Активатором гена *glnA*, кодирующего глутаминсинтетазу, ключевой фермент ассимиляции аммония (см. II том учебника), служит белок NtrC. Он связывается с регуляторным участком, 5'- и 3'-концы которого занимают, соответственно, положения -140 и -108. Как и в случае уже рассмотренного нами активаторного белка NifA, расстояние до промотора вдоль цепи ДНК слишком велико, чтобы образовать тройственный комплекс с РНК-полимеразой. Однако необходимость в локальном изгибе ДНК в данном случае отсутствует — он и так имеется благодаря последовательности CCCTTTT, центр которой занимает положение -73.

Белок NtrC служит регулятором ответа в двухкомпонентной сигнальной системе (см. раздел 18.1.1.3). После фосфорилирования сенсорной киназой NtrB он связывается с регуляторной последовательностью гена *glnA*, образуя октамерный агрегат, обладающий АТФазной активностью. За счет энергии гидролиза АТФ изменяется конформация Eσ⁵⁴, и закрытый комплекс превращается в открытый.

Репрессия. Инициация транскрипции может не только активироваться, но и частично или полностью подавляться, т. е. репрессироваться. Специфические белки-репрессоры присоединяются к операторам — сайтам, расположенным вблизи от промоторов, не дальше положения -60 . Поэтому в большинстве случаев операторы перекрываются с консенсусными блоками -35 и -10 или даже находятся правее последнего, так что их центр имеет координату $+12$. Гораздо реже операторные сайты расположены левее блока -35 и перекрываются с UP-последовательностями или с регуляторными участками для связывания активаторов.

По современным представлениям, механизм репрессии состоит в том, что комплекс репрессор/оператор стерически блокирует образование комплекса РНК-полимераза/промотор (если они рядом). А поскольку константа ассоциации репрессора с оператором на несколько порядков выше, чем у РНК-полимеразы с промотором, спор за связь с одним и тем же участком ДНК решается в пользу репрессора.

Прочность связи репрессора с ДНК объясняется тем, что при взаимодействии с оператором он образует димеры и более крупные мультимерные агрегаты (помимо домена для связывания ДНК мономер репрессора содержит домен олигомеризации). Оператор, со своей стороны, содержит симметричные палиндромные участки, которые способствуют димеризации репрессора.

В случае перекрывания оператора с позитивной регуляторной последовательностью репрессор мешает С-концевому домену α -субъединицы взаимодействовать с UP-элементом или не позволяет белку-активатору десантироваться на ДНК.

Другой тип «архитектурной» репрессии транскрипции вызывает ДНК-связывающий белок H-NS (см. I том учебника). Его олигомеры негативно контролируют экспрессию до 5% генов *E. coli*, связываясь с изгибами ДНК в области промоторов с образованием петель, в которых запутывается РНК-полимераза. На стабильность таких репрессорных комплексов могут влиять внешние стимулы (в частности, повышение температуры и изменение осмолярности среды), которые локально изменяют суперспирализацию ДНК.

В свою очередь, «архитектурным» активатором транскрипции является ДНК-изгибающий белок Fis (см. I том учебника и раздел 16.6.1.2 настоящего тома).

Данный тип регуляции имеет особое значение для экспрессии генов инвазии и вирулентности у ряда патогенных энтеробактерий, испытывающих экологический стресс при попадании в организм хозяина (*E. coli*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, *Shigella flexneri* и др.).

Контроль над активаторами и репрессорами. Итак, мы видим, что функция регуляторных факторов транскрипции — активаторов и репрессоров — заключается в том, чтобы первично влиять на экспрессию генов. Такое влияние носит отдельный, или дифференциальный характер и служит частью сложного клеточного ответа на эндогенные команды или сигналы, поступающие из внешней среды.

Как и все, что происходит в жизни прокариотов, действие факторов транскрипции сугубо рационально, а это возможно только в том случае, если они, в свою очередь, будут регулироваться. Иными словами, существует феномен *регуляции регуляторов*.

Контроль над факторами транскрипции может осуществляться двумя способами:

— на транскрипционном и трансляционном уровнях (путем воздействия на экспрессию гена белка-активатора или белка-репрессора);

— на посттрансляционном уровне (путем изменения активности уже синтезированного активатора или репрессора).

Дополнительными формами контроля служит процессинг первичного транскрипта или процессинг первичного продукта трансляции.

Транскрипционный и трансляционный уровни. Решающее значение имеет регуляция на транскрипционном уровне, в первую очередь, на уровне инициации транскрипции. Она может осуществляться двумя способами.

В первом случае активатор и репрессор авторегулируются, т. е. контролируют экспрессию собственных генов.

Во втором случае экспрессия генов белков-регуляторов находится под контролем регулятора более высокого уровня, вплоть до глобального мастер-регулятора (см. раздел 18.1).

Типичным примером второго способа регуляции служит белок SoxS, который активирует транскрипцию структурных генов, относящихся к регулону окислительного стресса (см. раздел 19.1.6).

В свою очередь, собственная транскрипция белка SoxS активируется регуляторным белком SoxR, который взаимодействует с промотором гена *soxS*.

Наконец, «старший» регулятор SoxR тоже должен быть активирован. Это происходит в результате превращения его неактивной восстановленной формы в активную окисленную форму под прямым воздействием экзогенного или эндогенного индуктора окислительного стресса — супероксидного анион-радикала (O_2^-).

Авторегуляция по типу активации или репрессии гораздо экономичнее и поэтому она распространена шире, чем регуляция белком, расположенным выше в регуляторном каскаде. Однако еще более экономична регуляция активности уже синтезированного белка.

Посттрансляционный уровень. Белки-активаторы и белки-репрессоры могут изменять свою активность в результате связывания с низкомолекулярными лигандами, которые изменяют их молекулярную конформацию.

В качестве примера регулируемого активатора можно привести CRP-белки (см. выше), влияющие на экспрессию катаболитных генов. Они активируются в результате конформационного изменения, вызванного *лигандом-эффектором* — 3',5'-цикло-АМФ. Константа ассоциации между CRP-белком и UAS-последовательностью на пять порядков выше для его активной формы, чем для неактивной ($5 \cdot 10^{10} M^{-1}$ против $1 \cdot 10^5 M^{-1}$).

В случае регулируемого репрессора репрессия прекращается из-за уменьшения сродства к оператору в результате связывания *лиганда-индуктора*. Хрестоматийным примером служит белок-репрессор LacI лактозного оперона *E. coli*, который связывается с оператором *lacO* (см. раздел 16.3.1.2). Константа ассоциации между репрессором и оператором в отсутствии природного или искусственного лиганда-индуктора, соответственно аллолактозы и IPTG, на три порядка выше, чем без индуктора ($1 \cdot 10^{13} M^{-1}$ против $1 \cdot 10^{10} M^{-1}$). Возьмем другой пример, когда для прочной связи репрессора с оператором требуется лиганд-эффектор, который в данном случае называется *корепрессором* (см. раздел 16.3.1.2). Так, в случае *E. coli* репрессор TrpR только тогда оказывает подавляющее воздействие на транскрипцию структурных генов триптофанового оперона, когда он связывается с лигандом — триптофаном.

Наряду со связыванием лиганда, существует другой способ посттрансляционного контроля факторов транскрипции, а именно — их ковалентная модификация. Чаще всего это происходит путем обратимого фосфорилирования (см. раздел 18.2).

Примером более специфичной ковалентной модификации регулятора является уже упомянутый нами сенсор окислительного стресса SoxR. Он переходит в активную окисленную форму под

воздействием супероксидного анион-радикала. Непосредственной мишенью служит высоколабильный $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластер.

Другой пример ковалентной редокс-модификации — это окисление пероксидом водорода сульфгидрильных групп регуляторного белка OxyR, который регулирует экспрессию генов защиты при окислительном стрессе. Благодаря образованию внутримолекулярных дисульфидных сшивок изменяется конформация белковой молекулы и, соответственно, сродство к промоторному сайту. Более подробно об этих белках мы поговорим в разделе 19.1.6.2.

Наконец, существует еще один, самый радикальный способ регуляции на посттранскрипционном уровне — это протеолитическая деградация активатора или репрессора. Так происходит с некоторыми факторами транскрипции, в частности с сигма-фактором теплового шока σ^{32} или с репрессором SOS-ответа LexA (см. раздел 19.1), которые разрушаются под воздействием специализированных протеаз.

16.7.1.2. Элонгация

Открытый комплекс РНК-полимеразы способен транскрибировать разные по длине участки ДНК-матрицы, эквивалентные как отдельному гену, так и целому оперону. Первичный транскрипт имеет размер до 10 т.н. (~10 генов).

Элонгация, или наращивание полинуклеотидной цепи РНК необратимо завершается после освобождения транскрипта («нельзя дважды войти в одну и ту же реку»). Завершение транскрипции строго контролируется и происходит только в особых сайтах — *терминаторах*.

Элонгация, темп которой в среднем составляет $100 \text{ н.}\cdot\text{с}^{-1}$, не является монотонным процессом. Существуют специальные сайты торможения (англ. pause) и остановки (англ. arrest). В первом случае скорость элонгации снижается на порядки; во втором случае терминация приостанавливается с сохранением тройственного комплекса ДНК/РНК-полимераза/РНК.

С конца 1980-х гг. было предложено несколько моделей элонгирующих комплексов РНК-полимеразы, однако ни одна из них не получила решающего подтверждения.

Наиболее актуальна модель *скользящего зажима* (англ. sliding clamp). Она исходит из того, что внутри элонгирующей РНК-полимеразы имеется канал, в котором зажат участок матрицы ДНК с координатами от -15 до +15 (см. рис. 214).

Активный центр расположен на расстоянии 1–2 н. от начала транскрипционного пузырька. В этой области вновь синтезированный участок РНК образует гетеродуплекс с матричной цепью ДНК, длина которого составляет ~8 п.н. (положение от -1 до -8).

Плавление гетеродуплекса осуществляет специализированный участок на внутренней поверхности главного канала, который обладает геликазной активностью и называется «рулем» (англ. rudder). Освобожденная цепь РНК на участке от -9 до -18 попадает в свой выходной туннель.

В данной модели РНК-полимераза играет роль зажима, скользящего вдоль по матрице ДНК. Несмотря на свою жесткость, зажим способен к коротким перемещениям по гетеродуплексу в прямом ($5' \rightarrow 3'$) и обратном ($3' \rightarrow 5'$) направлениях. Во втором случае каталитический центр периодически теряет связь с наращиваемым $3'$ -концом РНК, и тогда элонгирующий комплекс временно переходит в неактивное состояние.

Осцилляции зажима усиливаются в сайтах торможения или сайтах задержки транскрипции; после их преодоления процесс приобретает монотонный характер. Хотя точная структура этих сайтов не установлена, предполагается, что они представляют собой инвертированные повторы, богатые остатками U.

Способность воспринимать сигналы и за счет этого принимать участие в регуляторных процессах долго считали прерогативой белков. Однако, как оказалось, к этому способны и РНК. Речь идет о некодирующих последовательностях двух типов: *рибовыключателях* и *малых РНК*. Первые принимают участие в регуляции элонгации транскрипции, а вторые в регуляции инициации трансляции (см. раздел 18.2.2).

Рибовыключатели. Термином «рибовыключатель» (англ. riboswitch) обозначается часть нетранслируемой 5'-области некоторых мРНК, которые имеются у представителей всех трех доменов глобального древа.

Рибовыключатели, или РНК-сенсоры связывают небольшие лиганды – аминокислоты (например, лизин), азотистые основания (например, аденин или гуанин), модифицированные сахара (например, глюкозамин-6-фосфат), флавиновые нуклеотиды (например, ФМН) или катионы Mg^{2+} . При связывании лиганда конформация рибовыключателя изменяется. В результате либо создается терминаторная структура, что не дает РНК-полимеразе продолжить элонгацию, либо возникает препятствие для трансляции полноразмерной мРНК.

Как правило, рибовыключатель состоит из 5'-концевого *аптамера* (англ. aptamer; от лат. apto – прилаживать), или области связывания лиганда и расположенной правее от него области контроля экспрессии генов.

Обычно рибовыключатель реагирует на лиганд только одного типа, однако недавно были описаны тандемные рибовыключатели, взаимодействующие с двумя разными лигандами (S-аденозилметионином и витамином B₁₂).

Согласно своему названию, рибовыключатель работает в режиме «вкл./выкл.»; иначе говоря, связывание лиганда вызывает конформационное изменение мРНК, что прекращает экспрессию генов, и наоборот.

В противовес сайтам торможения или задержки транскрипции существуют особые факторы элонгации (GreB), которые каким-то образом помогают элонгирующему комплексу вернуться в активное состояние.

16.7.1.3. Терминация

Терминация транскрипции у бактерий происходит в терминаторных сайтах и часто зависит от специализированных *факторов терминации*.

При продвижении по ДНК-матрице РНК-полимераза синтезирует РНК до тех пор, пока не доходит до терминаторного сайта. Тогда она перестает наращивать РНК, которая освобождается из элонгирующего комплекса.

По аналогии с промоторами, терминаторы могут быть конститутивными или индуцибельными.

В первом случае РНК освобождается из тройственного комплекса с матрицей и РНК-полимеразой без посторонней помощи. Такие терминаторы называются *самостоятельными* (англ. intrinsic). Во втором случае силы терминатора для этого недостаточно, и ему требуются вспомогательные белковые факторы. Такие терминаторы называются *фактор-зависимыми* (англ. factor dependent).

Самостоятельный терминатор обычно содержит GC-богатый палиндром, перед которым в матричной цепи находится последовательность поли-А. Соответственно, на 3'-конце транскрипта образуется шпилька (которая затормаживает РНК-полимеразу), а правее нее находится последовательность поли-U (которая из-за плохого спаривания с поли-А участком ДНК способствует распаду гетеродуплекса).

Фактор-зависимые терминаторы тоже обеспечивают образование шпильки на 3'-конце транскрипта, однако правее нее отсутствует последовательность поли-У. Это делает гетеродуплекс устойчивым, и РНК-полимераза не может без посторонней помощи отделиться от матрицы ДНК.

Фактор-зависимые терминаторы различаются по составу, однако для них характерно свойство активироваться с помощью белка Rho.

Белок Rho. Фактор терминации Rho (46,8 кДа; ген *rho*, от греческой буквы ρ (ро), которая созвучна первой букве английского слова release — освобождение; в данном случае — содействие освобождению РНК из тройственного комплекса с матрицей и РНК-полимеразой) важен для сохранения жизнеспособности и поэтому распространен у бактерий практически универсально. Мутации по гену *rho* по большей части летальны, поскольку из-за них образуются многоперонные транскрипты, что вызывает контрпродуктивный сверхсинтез РНК.

Белок Rho относится к суперсемейству АТФ-зависимых гексамерных геликаз, членами которого также являются ДНК-геликаза DnaВ (см. раздел 16.4.1.1) и рекомбиназа RecA (см. раздел 16.6.1.2).

Белок Rho содержит N-концевой домен для связывания РНК и С-концевой домен, который связывает и гидролизует АТФ. Соответственно, он проявляет две ферментативные активности — геликазную (для расплетания гетеродуплекса ДНК/РНК) и РНК-зависимую АТФазную. При связывании с цепью РНК белок Rho образует вокруг нее кольцевой гексамер.

Исходный терминаторный сайт для связывания белка — *rut* (сокр. англ. Rho utilization site) имеет размер 70–80 н. Это С-богатая и одновременно G-бедная вырожденная последовательность без характерной вторичной структуры. После посадки на РНК белок Rho использует энергию гидролиза АТФ для своего перемещения в направлении 5' → 3' до гетеродуплекса ДНК–РНК.

Каким образом белок Rho участвует в терминации транскрипции, точно не установлено. Скорее всего, он догоняет РНК-полимеразу, которая затормозилась на Rho-зависимом терминаторе, и расплетает гетеродуплекс. Он также может изменять конформацию РНК-полимеразы, что способствует ее отделению от матрицы ДНК.

Вспомогательный белок Rho сам нуждается в ассистенте, роль которого выполняет белок NusG (21 кДа).

Сопряжение транскрипции и трансляции. Напомним, что РНК-полимераза расплавляет участок двухспиральной ДНК размером ~17 п.н. В транскрипционном пузырьке образуется гетеродуплексный участок между кодирующей цепью ДНК и новообразованной РНК. По мере элонгации первичный транскрипт вытесняется, а одиночная цепь ДНК отжигается комплементарной цепью, т. е. регибридизуется с восстановлением исходной двухцепочечной структуры. Освобожденная мРНК быстро вступает во взаимодействие с рибосомами (см. I том учебника).

При трансляции мРНК сайты для связывания белка Rho экранируются рибосомами. Соответственно, для взаимодействия белка Rho с РНК-полимеразой РНК должна оголиться. Иначе говоря, для начала транскрипции downstream-генов необходимо завершить трансляцию мРНК upstream-гена. Такое явление называется *полярностью трансляции* (англ. translational polarity).

Нонсенс-мутации (англ. nonsense — бессмыслица) эквивалентны стоп-кодонам и вызывают разрушение трансляционного комплекса. Белок Rho получает свободу действий, и терминация наступает раньше положенного. В результате дистальный конец транскрипционной единицы оказывается нетранскрибированным.

Антитерминация. Термином «антитерминация» (англ. antitermination) обозначается ослабление или устранение терминации. Механизм антитерминации может быть разным.

В одном случае перед 3'-концом транскрипта расположена сигнальная последовательность, с которой взаимодействуют рибосомы или специальные антитерминаторные белки, препятствующие распаду гетеродуплекса с ДНК-матрицей. Иными словами, наблюдается своего рода эффект «анти-Rho».

У бактерий существуют три основных типа антитерминаторов, от которых, в частности, зависит эффективность использования простых сахаров.

Примерами антитерминатора первого типа служат обратимо фосфорилируемый BglB-белок *E. coli*, а также SacY- и LicT-белки *B. subtilis*. В ответ на появление индуктора они становятся объектами контроля со стороны фосфотрансферной системы (см. раздел 18.3.2.2).

Пример второго типа антитерминатора — GlpP-белок *B. subtilis*, который непосредственно связывается с эффектором, глицеролом.

Третий тип антитерминатора представлен AmiR-белком *P. aeruginosa*, который регулирует использование алифатических амидов опосредованно, связываясь с периплазматическим лигандо-чувствительным AmiC-белком.

В другом случае терминация предотвращается с помощью особых факторов, взаимодействующих непосредственно с РНК-полимеразой, и транскрипция продолжается «поверх терминатора» (англ. read through).

Антитерминация затрагивает только один из терминаторов (*непроцессивная антитерминация*) или охватывает все downstream-терминаторы (*процессивная антитерминация*).

Аттенуация. В отличие от антитерминации, которая направлена на ослабление или устранение терминации, аттенуация использует эффект терминации для регулирования элонгации.

Дело в том, что терминаторные сайты могут занимать положение не только на конце гена или оперона, но и недалеко от сайтов инициации. В случае их постоянной активности транскрипция приняла бы абортный характер.

Однако, действие таких терминаторов носит временный характер. Они прекращают элонгацию с определенной периодичностью, что в итоге не репрессирует ее полностью, а только замедляет. Такой эффект называется *аттенуацией* (англ. attenuation — ослабление).

По принципу аттенуации в первую очередь регулируются те опероны, которые отвечают за чувствительный к регуляторным воздействиям «белковый» сектор домашнего хозяйства (метаболизм аминокислот, биосинтез аминоксил-тРНК, биогенез рибосом и протеасом).

В аттенуации в основном участвуют Rho-независимые терминаторы. Транскрипция прерывается на уровне коротких «лидерных» РНК (англ. leader RNA). Продуктом их трансляции служат только сигнальные пептиды, а иногда они вообще не транслируются.

Механизм аттенуации выглядит следующим образом. Напомним, что при использовании самостоятельного терминатора на 3'-конце транскрипта расположена шпилька, тормозящая РНК-полимеразу. Однако под воздействием некоторых регуляторных факторов этот тип вторичной структуры может смениться альтернативным, который уже не вызывает терминацию. Сильно упрощая, можно сказать, что такими регуляторами могут быть либо транслирующие рибосомы (феномен сопряжения транскрипции с трансляцией; см. выше), либо специальные белки.

16.7.2. Обратная транскрипция

Согласно «центральной догме» молекулярной биологии, которую в начале 1960-х гг. сформулировал Френсис Крик, поток генетической информации течет только в одном направлении: ДНК → РНК (транскрипция) → белок (трансляция).

Однако довольно быстро выяснилось, что транскрипционный этап может получить обратный ход. В 1970 г. Говард Темин (Н. М. Temin; Нобелевская премия по

физиологии и медицине, 1975 г.), Дэвид Бэлтимор (D. Baltimore, Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1975 г.) и Сейко Мицутани (S. Mizutani) открыли *ретроэлементы*, т. е. генетические структуры — в данном случае это были РНК-содержащие онкогенные вирусы — в состав которых входит ген фермента, синтезирующего ДНК на матрице РНК. В соответствии с характером своего действия этот фермент был назван *обратной транскриптазой* (англ. reverse transcriptase), или *ревертазой* (англ. revertase; от лат. re-vertō — идти назад).

Позднее в круг ретроэлементов были включены некоторые ДНК-содержащие вирусы (вирус гепатита В и колимовирусы), плазмиды (в митохондриях *N. crassa*) и способные к хоумингу интроны (см. раздел 16.3.1.4), а также ретротранспозоны животных, растений и плесневых грибов.

Ретротранспозоны (англ. retrotransposon) представляют собой такие мобильные генетические элементы эукариотов, транспозиция которых происходит через образование РНК-овых интермедиатов. Иными словами, они сначала «прямо» транскрибируются в РНК, а потом «обратно» транскрибируются в ДНК и реинтегрируются в геном. Благодаря своей репликативной транспозиции (по аналогии с бактериальными транспозонами; см. раздел 16.3.1.3) ретротранспозоны способствуют увеличению размера генома, а также вызывают генные мутации. Наиболее архаичные «параретротранспозоны» потеряли способность к транспозиции и интеграции.

Различают два типа ретротранспозонов — с длинными терминальными повторами (англ. long terminal repeat, LTR) и без них (non-LTR).

В эукариотных геномах ретротранспозоны представлены универсально. Особо богаты ими растения (в случае *Zea mays* они составляют 50–75% ядерной ДНК). Животные также содержат очень много ретротранспозонов (42% геномной ДНК *H. sapiens*). Ретровирусы, в частности HIV-1 и HTLV-1, кодируют обратную транскриптазу и интегразу и также ведут себя, как ретротранспозоны.

Вопрос о существовании ретроэлементов у прокариотов оставался открытым до середины 1980-х гг., пока Масайори Инуэ (M. Inoue), проводя электрофоретический анализ ДНК миксобактерий *Mycococcus xanthus* и *Stigmatella aurantiaca*, не обнаружил сателлитную фракцию одноцепочечных молекул размером 65–163 н. Поскольку в обоих случаях число их копий составляло 500–700 на клетку, они были названы *мультикопийными одноцепочечными ms-ДНК* (англ. multicopy single-stranded DNA, msDNA). Вскоре выяснилось, что ms-ДНК имеет необычное строение: с ее 5'-концом ковалентно связана молекула РНК (76 н.), а это предполагало использование последней в качестве праймера. Необычен и характер связи — вместо того, чтобы образовать каноническую 3'-5' фосфодиэфирную связь с РНК, ДНК ответвляется от 20-го гуанилового рибонуклеотида через связь 2'-5'. Кроме того, восемь последних оснований на 3'-конце ms-ДНК образуют гетеродуплекс с 3'-концом РНК. Оба компонента содержат шпильки, т. е. участки стабильной вторичной структуры (рис. 218).

Помимо миксобактерий, у которых широко распространена ms-ДНК, ее содержат ~5% клинических штаммов *E. coli*. В данном случае молекула ДНК имеет размер 86 н. и присоединяется к молекуле РНК (82 н.) через 14-й остаток G.

Биосинтез ms-ДНК происходит следующим образом (рис. 218). Однокопийный хромосомный локус содержит частично перекрывающиеся гены *msr* (кодирующие РНК-компонент ms-ДНК) и *msd* (кодирующие ДНК-компонент ms-ДНК), а также открытую рамку считывания ревертазы. Участок первичного транскрипта, содержащий гены *msr* и *msd*, одновременно служит праймером и матрицей.

По предложению Темина, хромосомные ретроэлементы бактерий были названы *ретронами* (англ. retron, от лат. retro — назад и греч. ontos — сущее; «нечто, про-

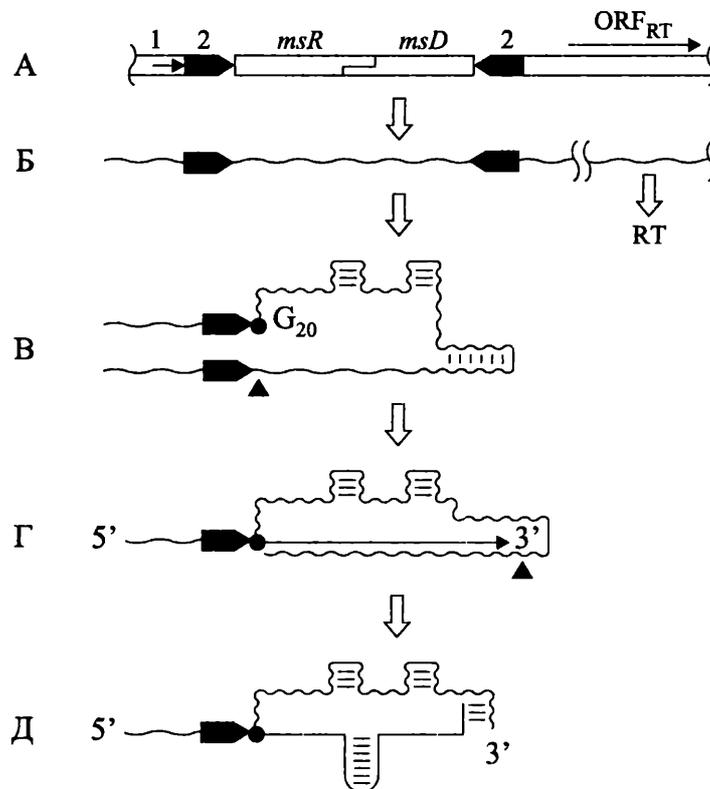


Рис. 218. Синтез ms-ДНК.

А — участок хромосомы; Б — первичный транскрипт; В — РНК, выполняющая роль праймера и матрицы; Г — синтез и процессинг РНК/ДНК-интермедиата; Д — ms-ДНК.

1 — промотор первичного транскрипта; 2 — инвертированный повтор; *msR* — кодирующая последовательность ms-РНК; *msD* — кодирующая последовательность ms-ДНК; ORF_{RT} — открытая рамка считывания обратной транскриптазы; RT — обратная транскриптаза; G₂₀ — остаток G₂₀, к которому через связь 2'-5' присоединяются дезоксирибонуклеотиды.

Черными треугольниками указаны точки разреза РНКазой Н.

изводящее обратное действие», в данном случае — агент обратной транскрипции). Это наиболее примитивная форма ретроэлементов, поскольку они кодируют только ревертазу. В отличие от мобильных интронов и ретротранспозонов они неспособны к транспозиции, а в отличие от ретровирусов — не образуют зрелые вирусные частицы.

Все известные к настоящему времени ревертазы взаимно гомологичны, что предполагает их общее эволюционное происхождение. Но если у миксобактерий ревертаза коэволюционировала с другими хромосомными генами (судя по одинаково высокому содержанию GC-пар из-за предпочтительного использования кодонов), то в случае *E. coli* этот фермент, видимо, был приобретен позднее, причем горизонтальным путем. Напрашивается вывод о том, что эволюция ретроэлементов проходила по схеме: ретроны → ретротранспозоны → РНК-содержащие ретровирусы → ДНК-содержащие ретровирусы.

Остается нерешенным вопрос, какую роль в бактериальной клетке играют ревертаза и ретроны. По современным представлениям, обратная транскрипция обеспечила переход от «мира РНК» к «миру ДНК» (см. I том учебника).

Что касается ретронов, то их, с одной стороны, можно считать генетическими паразитами, которые обеспечивают только собственную репродукцию. Но как тогда объяснить тот факт, что у миксобактерий и *E. coli* гены ревертазы присутствуют только в одной копии?

С другой стороны, процессу копирования с помощью ревертазы свойственна низкая надежность, что приводит к «супермутатгенности» ms-ДНК. И если современные ретроны сохранились как рудименты, в свое время они могли быть важным фактором эволюции геномов.

О существовании или отсутствии обратной транскрипции у архей в настоящее время ничего не известно.

16.7.3. Транскрипция у архей

Сведений о базовой и регулируемой транскрипции у архей значительно меньше, чем для бактерий и эукариотов. Однако показано, что у всех изученных представителей этого домена транскрипционный аппарат организован по общему плану. Он отличается от бактериального транскрипционного аппарата и сходен с эукариотным, хотя и не идентичен ему.

Промоторы. По контрасту с бактериями, у архей отсутствуют консенсусные гексануклеотидные блоки -35 и -10 . Вместо них имеются октануклеотидные *ТАТА-боксы* («А-боксы», или «дистальные промоторные элементы»), которые аналогичны ТАТА-боксам в промоторах эукариотной РНК-полимеразы II. Как у эукариотов, ТАТА-боксы незаменимы, и их конкретная последовательность определяет не только индивидуальную активность, но и силу промотора. Центр ТАТА-боксов лежит на расстоянии 26–27 нуклеотидов левее стартовой точки транскрипции (рис. 219). Нуклеотидная последовательность ТАТА-боксов не идентична у представителей разных групп архей, в частности для филы *Crenarchaeota* это – ТТТТТААА, для метаногенов – ТТТАТАТА, а для экстремальных галофилов – NTТТWWWN (W означает А или Т; N – один из четырех дезоксирибонуклеотидов). Для распознавания ТАТА-боксов используется белок ТВР (см. ниже). Поскольку археи, подобно бактериям, обладают многоцелевой РНК-полимеразой, ТАТА-боксы участвуют в транскрипции не только мРНК, но и стабильных РНК (тРНК и рРНК).

Левее ТАТА-боксов в промоторном участке расположен богатый пуринами элемент, узнающий транскрипционный фактор В (англ. transcription factor В recognition element, BRE). Сведений о нем мало; вероятно, он повышает силу промотора. Интересно, что сходный базовый элемент присутствует в промоторах *H. sapiens*.

Третьим компонентом промоторов у архей является *инициаторный элемент* (англ. initiator element, INR). Данных о нем крайне мало, и даже неизвестно, какой белок используется для его распознавания.

Другие базовые элементы в промоторах архей не обнаружены; в частности, отсутствует характерный для эукариотов элемент, расположенный правее промотора (англ. downstream promoter element, DPE).

Факторы инициации транскрипции. Напомним, что распознавание промотора у бактерий осуществляется комплексом кор-фермента РНК-полимеразы и субъединицы σ , которая теряется в ходе элонгации. Эукариоты используют принципиально другой механизм – сначала факторы инициации транскрипции (TFII-AB-DEFH) распознают промотор, а затем к ним присоединяется РНК-полимераза. Ана-

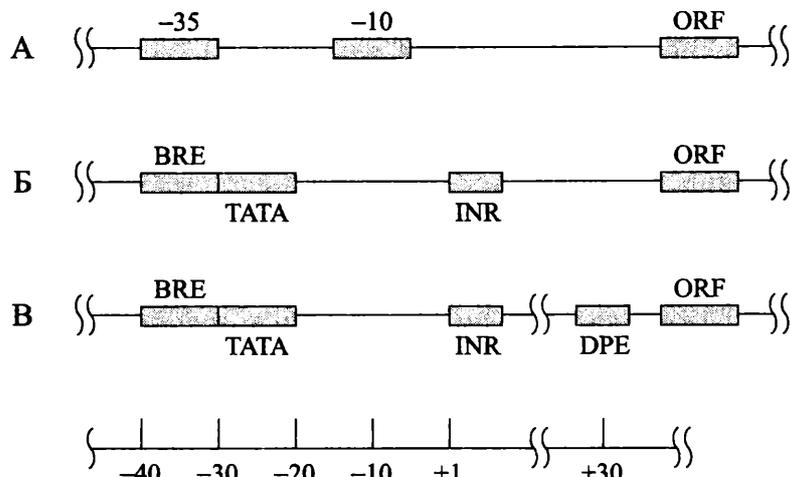


Рис. 219. Сравнительная организация промоторов у бактерий (А), архей (Б) и эукариотов (В).

BRE — элемент, узнающий транскрипционный фактор TFIIB; TATA — TATA-бокс; INR — инициаторный элемент; DPE — downstream-промоторный элемент; ORF — открытая рамка считывания.

логичный механизм имеется у архей. Главными, а может быть, единственными факторами инициации транскрипции у них служат два белка — белок, связывающийся с TATA-боксом (англ. TATA box binding protein, TBP), и транскрипционный фактор B (англ. transcription factor B, TFB).

Белок TBP (ген *tbp*) состоит из двух повторяющихся доменов по 90 а.о., что свидетельствует о его происхождении на основе дупликации предкового гена. Он содержит участки, обладающие 20–40%-ным сходством с одноименным эукариотным белком.

Фактор TFB (ген *tfb*) состоит из N-концевого домена (120 а.о.) и двух повторяющихся доменов (по 90 а.о.) на С-конце. Он обладает 20–30%-ным сходством с эукариотным фактором TFIIB, который связывается с промоторами вслед за фактором TBP. Как уже отмечалось, фактор TFB распознает BRE-элемент, расположенный левее от TATA-бокса.

Фазы транскрипции. В состав преинициаторного комплекса у архей входит участок ДНК (с BRE-элементом, TATA-боксом и INR-элементом), два транскрипционных фактора (TBP и TFB) и РНК-полимераза. В отличие от эукариотов, для перехода к открытому комплексу не требуются дополнительные транскрипционные факторы и энергия АТФ; достаточно тройственного комплекса TBP/TFB/РНК-полимераза.

Предполагается, что, как у эукариотов и бактерий (см. выше), за образованием открытого комплекса следует фаза abortивной транскрипции, т. е. синтез свободных РНК размером 2–10 н., после чего происходит освобождение промотора, и РНК-полимераза приступает к стабильной элонгации.

Фактор элонгации архей (англ. transcription factor S, TFS; 130 а.о.) гомологичен эукариотному фактору TFIIS.

Каким образом осуществляется терминация у архей, неизвестно; в частности, так и не найден общий терминаторный сигнал (возможно, что разные представители домена используют специфические терминаторы).

РНК-полимераза. Напомним, что у бактерий кор-фермент «многоцелевой» РНК-полимераза образован четырьмя субъединицами молекулярной массой от ~14 до ~190 кДа и имеет состав $\alpha_2\beta\beta'\omega$. В отличие от этого, у эукариотов три «специализированные» РНК-полимеразы представляют собой многокомпонентные ферменты, состоящие из 12–17 субъединиц (в случае *S. cerevisiae* это субъединицы Rpb1–Rpb12; 191,6–7,7 кДа).

Архей, как и бактерии, используют «многоцелевую» РНК-полимеразу, которая по числу субъединиц (в случае *M. thermoautotrophicum* это субъединицы A'A''B'V''DFHKE'E''NLP) и их молекулярной массе (от ~190 до ~8 кДа) соответствует эукариотной РНК-полимеразе II. Самые крупные субъединицы (ABD) взаимно гомологичны трем самым крупным субъединицам эукариотов (Rpb1–Rpb3) и трем самым крупным субъединицам бактерий ($\beta'\beta\alpha$).

Кор-фермент РНК-полимеразы архей, как и кор-ферменты бактерий или эукариотов, взаимодействует со специфическими транскрипционными факторами.

Предполагается, что механизм действия и рабочий цикл РНК-полимеразы архей в целом такие же, как у бактерий и эукариотов. Имеются клешни из двух самых крупных субъединиц; активный центр содержит катион Mg^{2+} ; на участке из 8 п.н. образуется транскрипционный пузырь; кодирующая и некодирующая цепи ДНК занимают отдельные туннели и т. д. (см. выше).

Проблема, отсутствующая у бактерий, но общая у архей с эукариотами — это обеспечение доступа РНК-полимеразы к матрице, экранированной гистонами и образующей вместе с ними нуклеосомы (см. I том учебника). У эукариотов разрыхление хроматина осуществляется путем ацетилирования или метилирования гистонов. Как это происходит у архей, пока не ясно.

Регуляция транскрипции. Напомним, что у архей роль регуляторных факторов транскрипции выполняют белки TBP и TFB. Хотя в большинстве археотных геномов гены *tbp* и *tfb* представлены единственной копией, экстремальные галофилы содержат до восьми аллелей этих генов, что позволяет создавать несколько десятков парных комбинаций и, соответственно, осуществлять дифференциальную экспрессию генов с разных промоторов.

Предполагается также, что регуляцию транскрипции у архей дополнительно обеспечивают специализированные белки, связывающиеся с TBP-белком, а также такой архитектурный фактор, как плотность суперспирализации хромосомной ДНК. Подробнее этот вопрос рассматривается в разделе 18.1.1.3.

16.7.4. Посттранскрипционный процессинг мРНК

Во многих случаях продукты РНК-полимеразной реакции, или первичные транскрипты представляют собой ювенильные, еще не ставшие функциональными молекулы РНК.

Созревание таких *пре-РНК* происходит за счет посттранскрипционных структурных изменений, которые называются *процессингом* (англ. processing — обработка). Соответствующие биохимические системы имеются у представителей всех трех глобальных доменов, причем и в этом отношении бактерии с археями существенно отличаются от эукариотов.

У прокариотов мРНК транслируется практически сразу же после терминации транскрипции или даже котранскрипционно, т. е. в процессе считывания с матрицы ДНК (см. I том учебника).

То, что трансляция быстро следует за транскрипцией, связано с нестабильностью мРНК и ее полицистронным характером.

В свою очередь, для эукариотов характерен пространственно-временной барьер между транскрипцией и трансляцией. Иными словами, мРНК синтезируется в ядре, а транслируется в цитоплазме (см. I том учебника). Перед тем, как транскрипт попадает в цитоплазму, он подвергается ядерному сплайсингу, что окончательно придает ему моноцистронный вид, а также подвергается процессингу, что увеличивает продолжительность жизни мРНК.

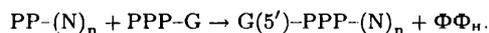
Механизмы процессинга мРНК у эукариотов сложны и разнообразны. В частности, процессинг ядерной пре-мРНК включает в себя три типа превращений:

- *экспирование* 5'-конца и *полиаденилирование* 3'-конца первичного транскрипта;
- *эксцизию* интронов и *сплайсинг* экзонов;
- *редактирование* транскрипта путем частичного изменения его нуклеотидной последовательности по сравнению с матрицей ДНК.

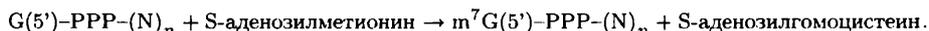
Экспирование (от англ. cap — колпачок) заключается в добавлении к 5'-концу первичного транскрипта через 5'-5' трифосфатный мостик 7-метилгуанилового нуклеотида (m^7G). Процесс экспирования состоит из трех ферментативных реакций. Вначале 5'-концевой трифосфат гидролизуется РНК-трифосфатазой с образованием концевого дифосфата:



Затем РНК-гуанилилтрансфераза переносит от ГТФ остаток ГМФ на 5'-конец полинуклеотидной цепи:



В заключение, метилтрансфераза переносит метильную группу от универсального донора, S-аденозилметионина (см. рис. 196), в 7-е положение 5'-концевого гуанилового нуклеотида:



Экспирование влияет на процессинг мРНК и на транспорт пре-мРНК, защищает 5'-конец мРНК от экзонуклеаз, а также позволяет рибосомному фактору инициации трансляции «узнать» мРНК.

Редактирование (англ. editing) выражается в окислительном дезаминировании типа C→U, A→I, происходящем в экзонах зрелой мРНК, что приводит к смене кодонов и, соответственно, к замене одного аминокислотного остатка другим.

В отличие от эукариотов, прокариоты лишены способности к экспированию и редактированию мРНК. В то же время у них существуют мозаичные гены и, соответственно, такой тип процессинга пре-мРНК, как удаление интронов/сплайсинг экзонов (см. раздел 16.3.1.4). Кроме того, у прокариотов может происходить полиаденилирование, хотя очень долго считалось, что такая биохимическая модификация мРНК свойственна исключительно эукариотам.

Полиаденилированные прокариотные мРНК были впервые найдены во второй половине 1970-х гг. — середине 1980-х гг. у *B. brevis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Hyphomicrobium* sp. и ряда штаммов нитчатых цианобактерий, а также у архей *Halobacterium salinarium* и *Methanococcus vannielii*. В конце 1970-х гг. полиаденилирование мРНК было обнаружено у митохондрий, а к середине 1990-х гг. — у пластид.

В отличие от эукариотов, у прокариотов, за исключением митохондрий и пластид, полиА-участки имеют меньшую длину (14–60 н. против 80–200 н.), и ими обладают не все, а только 1–40% мРНК. Кроме того, полиаденилированию могут подвергаться незащищенные 3'-концы любой РНК, независимо от нуклеотидной последовательности и вторичной структуры, в частности, это могут быть продукты деградации мРНК и даже рРНК (в то время как у эукариотов избирательно полиаденилируется нетранслируемый участок мРНК размером 10–30 н., расположенный правее гексануклеотида AAUAAA).

Не зависящее от матрицы полиаденилирование осуществляется с помощью полиА-полимеразы (АТФ:полирибонуклеотид-аденилилтрансферазы). Она поочередно присоединяет аденилатные остатки к 3'-концу молекулы РНК в соответствии с уравнением реакции: РНК + nАТФ → РНК(A)_n + nФФ_n.

Главная полиА-полимераза *E. coli* (PAP I) имеет молекулярную массу 52 кДа. Ее ген был обнаружен в 1992 г. международной группой, возглавляемой американским исследователем Нилимой Саркар (N. Sarkar), и обозначен как *pspB* (сокр. англ. plasmid copy number; первоначально его

идентифицировали как ген, регулирующий копиюность плазмиды *ColE1*). Важно отметить, что продукт экспрессии этого гена не гомологичен эукариотным полиА-полимеразам.

Наряду с главной полиА-полимеразой у *E. coli* имеется вторая полиА-полимераза (РАР II), которая представляет собой гидрофобный белок молекулярной массой 35 кДа (кодируется открытой рамкой считывания *f310*). Главная и вторая полиА-полимеразы функционально перекрываются и взаимно подстраховывают друг друга.

Каков смысл полиаденилирования, в частности, у прокариотов? Окончательный ответ на данный вопрос еще не получен.

Скорее всего, оно затрагивает ряд не связанных функций. Одной из них может быть регулирование репликации плазмид, в частности *ColE1*. Контроль копиюности осуществляется плазмидной антисмысловой РНК (РНК I). Она блокирует РНК-праймер (РНК II), инициирующий репликацию плазмиды. В свою очередь, концентрация РНК I контролируется РНКазой E. Продукт гена *rho* (РАР I) способствует репликации, поскольку аденилированная РНК I разрушается быстрее, чем неаденилированная. Дело в том, что 3'-экзонуклеазному расщеплению РНК под воздействием РНКазы РNP и РНКазы II препятствуют концевые структуры типа стебель-петля (англ. stem-loop), образующиеся при Rho-независимой терминации. А поскольку полиаденилированный транскрипт уже не заканчивается такой структурой, он более чувствителен к деградации. Эукариотные транскрипты не несут на себе концевые структуры типа стебель-петля, и поэтому их 3'-полиаденилирование выполняет стабилизирующую роль.

За счет полиаденилирования, по-видимому, может дестабилизироваться не только антисмысловая плазмидная РНК, но и мРНК.

Наконец, участок поли-А помогает связыванию транскрипта с белком S1, который входит в состав малой рибосомной субъединицы (см. I том учебника).

16.7.5. Дегградация мРНК

Если термин «посттранскрипционный процессинг» использовать в расширенном смысле, имея в виду любые биохимические изменения структуры, то отдельным типом процессинга мРНК можно считать ее ферментативную дегградацию до поли- и мононуклеотидов.

В отличие от стабильных типов РНК (рРНК, тРНК и др.), мРНК нестабильна — особенно у прокариотов, где время ее жизни измеряется несколькими минутами. Однако прокариоты сумели обратить этот недостаток себе во благо, поскольку они быстро реагируют на внутренние и внешние стимулы, репрограммируя трансляцию посредством количественного и качественного изменения пула мРНК.

Наряду с транскрипционным контролем на уровне промоторов, существует посттранскрипционный контроль экспрессии генов, основанный на распаде мРНК. Действие этого простого и радикального механизма неизбежно, поскольку мРНК должна постоянно выводиться из оборота. Такое обновление пула мРНК дает возможность перенастраивать трансляционный аппарат — сообразно контексту эндогенной и экологической адаптации. Кроме того, в результате частичной дегградации полицистронной мРНК образуется набор мРНК разной продолжительности жизни, что также влияет на паттерн трансляции. Наконец, обновление транскриптов позволяет синтезировать нуклеиновые кислоты из «вторсырья» (см. раздел 16.4).

Общие закономерности эндо- и экзонуклеолитической дегградации мРНК уже рассматривались в I томе учебника (см. раздел, посвященный дегградосоме). В дополнение к сказанному приведем некоторые существенные подробности.

E. coli обладает, как минимум, пятью эндо-РНКазами (III, E, G, I и M) и двумя 3' → 5' экзонуклеазами (II и РNP).

Эндо-РНКаза III специфически расщепляет двухцепочечные участки РНК, или структуры типа стебель-петля.

Эндо-РНКаза E многофункциональна; в частности, она производит процессинг тРНК и процессинг 9S рРНК → 5S рРНК; участвует в процессинге 5'-конца 16S рРНК; осуществляет деградацию антисмысловой РНК I и т. д. Она предпочитает одноцепочечные участки, богатые остатками А и U, и служит каркасом для сборки компонентов деградосомы.

Эндо-РНказы G, I и M наносят разрезы по относительно неспецифичным сайтам, расположенным в области 5'-конца полинуклеотидной цепи.

Экзо-РНКаза II и полинуклеотид-фосфорилаза PNP различаются по субстратной специфичности — первая предпочитает 3'-конец мРНК, а вторая 3'-конец рРНК.

Мы уже упоминали о том, что ферментативная деградация мРНК зависит от того, полиаденилирован субстрат или нет. В частности, РНказы II и PNP ингибируются концевыми вторичными структурами типа стебель–петля. Очень многие транскрипты *E. coli* терминируются Rho-независимым путем, с образованием структуры стебель–петля и очень короткого одноцепочечного хвоста, устойчивого к экзонуклеазам. И только добавление полиА-участка делает молекулу РНК восприимчивой к этим ферментам.

Деградация мРНК является индуцибельным процессом. Образование многих компонентов деградосомы находится под посттранскрипционным контролем. В частности, эндо-РНКаза III регулирует свой собственный синтез путем расщепления структуры стебель–петля, расположенных левее сайта для связывания рибосомы.

16.8. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ

Современный термин «эпигенетическое» наследование (англ. epigenetic inheritance; от греч. еpi- -- дополнять что-либо; в данном случае -- наследование, не имеющее прямого отношения к генам) обозначает такие наследственные изменения характера экспрессии генов, которые непосредственно не затрагивают их первичную структуру. Иными словами, помимо нуклеотидной последовательности ДНК существует дополнительная генетическая информация, которая получает фенотипическое проявление в определенных условиях окружающей среды.

Эпигенетические системы представляют собой самосохраняющиеся альтернативные состояния белка или ДНК, которые позитивно регулируются по принципу обратной связи.

Примерами эпигенетических феноменов служит наследственное самовоспроизведение структуры белка (прионы), дифференциальная экспрессия эукариотного генома посредством метилирования или ацетилирования ДНК-связывающих белков, а также контроль прокариотных промоторов путем изменения паттерна метилирования ДНК под воздействием регуляторных белков.

Механизм эпигенетического наследования у бактерий исследован, главным образом, на примере контроля экспрессии генов с помощью метилирования специфических последовательностей ДНК.

Напомним, что у бактерий метилирование ДНК обеспечивает также:

- контроль инициации репликации (см. раздел 16.4.1.1);
- расхождение сестринских хромосом (см. раздел 16.4.2.1);
- mismatch-репарацию (см. раздел 16.5.1.3);
- транспозицию мобильных генетических элементов (см. раздел 16.3.1.3);
- контроль упаковки фаговой ДНК (см. раздел 16.5.2);
- антирестрикционное метилирование в ходе конъюгативного переноса плазмид (см. раздел 16.6.1.3).

Внутренним сигналом для реализации этих разнообразных феноменов служит «полуметилированное» состояние только что реплицированной ДНК (см. раздел 16.4.1.1). В свою очередь, это состояние регулирует специфические ДНК-белковые взаимодействия. Важно подчеркнуть, что полуметилированное состояние существует временно и как таковое не наследуется.

Большинство эпигенетических систем состоит из ДНК-метиلاзы Dam и ДНК-связывающих белков, которые конкурируют с метилазой за специфические сайты-мишени в ДНК. Иначе говоря, при связывании с ДНК белки защищают сайты метилирования от метилазы Dam. Метилирование, в свою очередь, мешает связыванию этих белков. В итоге, сайт-мишень существует в альтернативных состояниях — метилированном и неметилированном.

Фазовая изменчивость. Наиболее известный пример эпигенетического наследования связан с *фазовой изменчивостью* (англ. phase variation).

В частности, фазовую изменчивость проявляют уропатогенные штаммы *E. coli*, способные образовывать фимбрии II типа. В данном случае их называют «фазовыми» Pаp-фимбриями (сокр. англ. pielonephritis-associated pili). Экспрессия генов при этом носит альтернативный характер — Pаp-фимбрии либо образуются (англ. phase on), либо не образуются (англ. phase off).

Фимбрии, или пилусы (см. I том учебника), образующиеся у возбудителей пиелонефрита, играют важную роль в прикреплении уропатогенных бактерий к эпителиальной выстилке верхнего отдела мочеточников, что, в конечном счете, способствует колонизации почек. В генетически однородной популяции бактерий одновременно присутствуют клетки с Pаp-фимбриями и без них.

Истинный смысл такой фазовой изменчивости неизвестен. Возможно, это позволяет бактериям: (1) уклониться от иммунной защиты хозяина; (2) путем попеременной адгезии-открепления подняться вверх по мочеточнику; (3) преодолеть контактное ингибирование их роста и размножения.

Фазовая изменчивость Pаp-фимбрий определяется ДНК-метилазой Dam (см. раздел 16.4.1.1), которая метилирует остатки аденина в двух сайтах GATC. Один из них, GATC_{PRX} занимает проксимальное положение, а другой, GATC_{DIS} — дистальное положение по отношению к общему промотору генов, кодирующих пилины PаpAB (рис. 220).

В промежутке между генами *papI* и *papAB* расположены сайты 1–6 для связывания глобального регуляторного белка Lgr (см. раздел 18.1.2). Внутри 5-го и 2-го сайтов, соответственно, находятся GATC_{DIS} и GATC_{PRX}. Благодаря этому метилирование контролирует эффективность связывания белка Lgr, а также связывание вспомогательного регулятора — белка PаpI (промотор его гена находится левее GATC_{DIS}).

Когда клетки находятся в состоянии «phase on», белки Lgr/PаpI взаимодействуют с GATC_{DIS}, защищая его от метилазы Dam. При этом GATC_{PRX} остается свободным и метилируется. В состоянии «phase off» GATC_{PRX} защищен только белком Lgr и не метилируется, а GATC_{DIS} метилируется (рис. 220). Прогивоположные паттерны метилирования создаются в результате конкуренции между белками Dam и Lgr за сайты связывания 1–3 и 4–6. Блокада транскрипции генов *papAB* в состоянии «phase off» объясняется тем, что белок Lgr перекрывает промотор, изолируя его от РНК-полимеразы.

Переход «phase off» → «phase on» происходит посредством полного метилирования GATC_{PRX} и полного деметилирования GATC_{DIS}. Предполагается, что для этого требуются два раунда репликации ДНК, с промежуточным образованием полуметилированных сайтов, когда белки Lgr/PаpI имеют более высокое сродство к полуметилированному GATC_{DIS}, чем к полностью метилированному.

Есть идея, что при обратном переходе «phase on» → «phase off», который также требует репликации ДНК, белки Lgr/PаpI покидают сайты 4–6, что дает возможность метилазе Dam конкурировать с белком Lgr за связь с GATC_{DIS} (рис. 220). Так или иначе, фазовая изменчивость Pаp-фимбрий имеет очень сложный, лишь отчасти расшифрованный механизм.

Существует целый ряд «Pаp-подобных» систем, выступающих в роли позитивных регуляторов фазовой изменчивости. В числе генов и оперонов, которые регу-

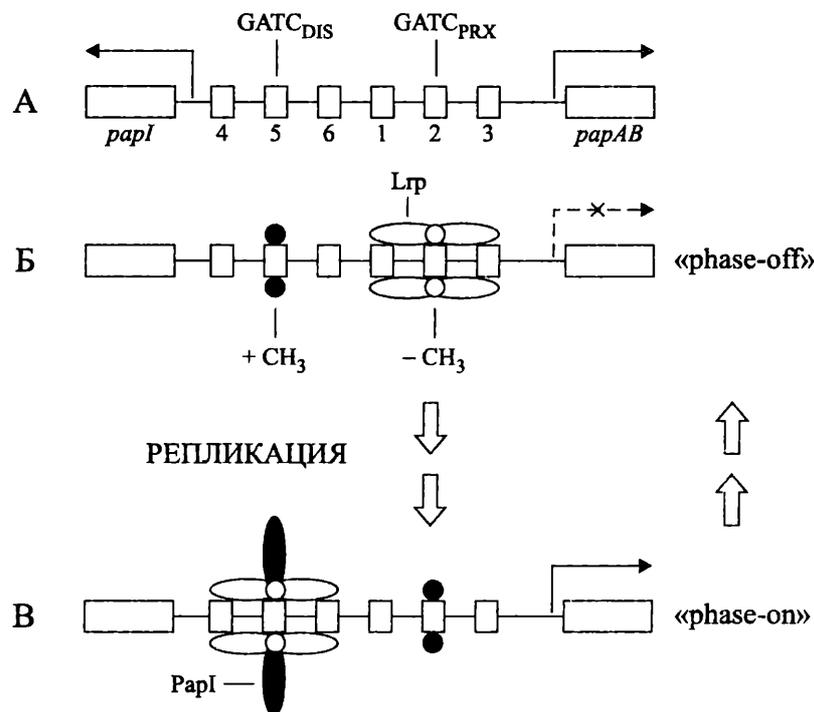


Рис. 220. Механизм перехода между состояниями «phase on» и «phase off».

А — регуляторный участок оперона *pap*; Б — состояние «phase off»; В — состояние «phase on».

Цифрами отмечены сайты для связывания белка Lrp, пунктирная стрелка указывает направление транскрипции.

лируются при помощи данного механизма, следует отметить ген белка Ag43 наружной мембраны *E. coli*; гены репарационной системы VSP энтеробактерий (сокр. англ. very short repair); гены *tra*-оперона, обеспечивающего конъюгативный перенос плазмиды *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, и т. д.

Помимо белка Lrp, к числу ДНК-связывающих белков, блокирующих Dam-метилирование, относятся другие глобальные регуляторы транскрипции, например белок OxyR (см. раздел 18.1).

Следует подчеркнуть, что в основе фазовой изменчивости могут лежать и неэпигенетические механизмы. В этом случае она обусловлена не преобразованием конфигурации ДНК или модификацией взаимодействия между матрицей и РНК-полимеразой, а изменением нуклеотидной последовательности в результате сайтспецифичной рекомбинации или мутации.

Субпопуляции симбиотических бактерий, особенно комменсалов или патогенов, вынужденных оперативно адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, обладают повышенной частотой спонтанного мутирования (см. раздел 16.6.1.1). Негативная сторона данного явления заключается в том, что штаммы-мутаторы и штаммы-гипермутаторы неизбежно накапливают вредные мутации.

Чтобы избежать этого, симбиотические бактерии выработали повышенную способность к изменениям генома только в участках, рассчитанных на непредвиденные обстоятельства (англ.

contingency loci). Такие участки отвечают, главным образом, за структуру или секрецию детерминант, обеспечивающих контакт бактерии с ее хозяином (липополисахаридов, жгутиков, фимбрий и др.).

Воздействие на экспрессию генов в этих участках осуществляется разными способами, основанными на обратимых превращениях нуклеотидной последовательности или конфигурации ДНК. В обоих случаях это приводит к фазовой изменчивости — соответственно, эпигенетической и неэпигенетической, причем эта изменчивость может быть альтернативной или мультивариантной.

Неэпигенетические изменения чаще всего связаны с увеличением или уменьшением числа *микросателлитов* (англ. *microsatellite*), или коротких повторяющихся последовательностей, а также длины этих последовательностей, что приводит к сдвигу рамки считывания. Кроме того, путем инверсии или сайтспецифичной рекомбинации локально изменяются кодирующие участки ДНК.

Фазовая изменчивость и эпигенетического, и неэпигенетического типа носит вероятностный характер. В результате нее создаются случайные комбинации фенотипов, конкурентная пригодность которых тестируется быстро меняющимися условиями окружающей среды.

* * *

На этом завершается обзор цитогенетики прокариотов.

Знание генетических структур, процессов и программ позволит в дальнейшем познакомиться с реализацией разнообразных вегетативных и дифференцированных паттернов развития у прокариотов. Гибкость адаптации дает возможность бактериям и археям существовать в разнообразных природных нишах, а также в лабораторной обстановке или на биотехнологическом производстве.

ГЛАВА 17

ОНТОГЕНЕЗ

Les organismes composés d'une seule cellule (tels que les Infusoires ainsi que beaucoup d'autres Protozoaires et de plantes inférieures) se reproduisent par division et se transforment en deux ou plusieurs êtres nouveaux; l'organisme mère s'est pour ainsi dire dissous dans celui de la progéniture, sans avoir subi la mort véritable.

(Одноклеточные организмы (как, например, инфузории и многие другие простейшие и низшие растения) размножаются делением и превращаются в две или несколько новых особей; у них материнский организм не умер, а, так сказать, растворился в своем потомстве).

É. Metchnikoff. Essais optimistes (Paris, 1907).

Термин *онтогенез* (англ. ontogeny; от греч. on — сущее и genesis — созидание; «становление живого существа»; «судьба особи»), предложенный в 1866 г. немецким натуралистом Эрнстом Геккелем (Е. Haeckel), сначала относился только к многоклеточным организмам, размножающимся половым путем. Позднее его стали использовать в очень широком смысле, и в настоящее время под онтогенезом подразумевается цикл индивидуального развития любого живого существа, в том числе одноклеточного или даже имеющего неклеточное строение.

Сущность онтогенеза у разных живых существ. Онтогенез неклеточного живого существа, или вируса, соответствует промежутку между двумя репликативными состояниями генома.

Онтогенез одноклеточного организма (протиста или прокариота) эквивалентен клеточному циклу, т. е. периоду между двумя последовательно происходящими клеточными делениями или периоду между завершающим делением и клеточной смертью.

Онтогенез многоклеточного организма (который в своей основе имеет онтогенез отдельной клетки) складывается из ряда возрастных стадий; исходным моментом служит оплодотворение яйцеклетки или начало самостоятельного существования органа вегетативного размножения, а финалом — смерть особи.

Особь у прокариотов. У бактерий особью является либо одиночная клетка, либо квази-синцитиальное образование (трихом). Археи, в отличие от бактерий, никогда не образуют трихомов, и особью у них практически всегда является клетка. В качестве исключения, например у метаногенов *Methanosaeta thermophila* и

Methanospirillum hungatei, особь представлена нитью (не путать с трихомом!), которая состоит из выстроенных в ряд цилиндрических клеток и разделяющих их спейсеров в окружении общего чехла (см. раздел 17.4.6).

Напомним, что трихом образуется как минимум из двух клеток, соединенных друг с другом микроплазмодесмами и окруженных общей ОМ (см. I том учебника).

После сегрегации сестринских хромосом цитоплазматический компартмент материнской клетки расчленяется диафрагмой, состоящей из плоской кольцевой инвагинации СМ с прослойкой «септового» муреина, который синтезируется *de novo*. У одноклеточных бактерий деление проходит до конца, и септовый муреин расслаивается на два листка, между которыми инвагинирует ОМ. В трихоме процесс деления частично заблокирован, и септовый муреин не расслаивается, а дочерние клетки остаются в окружении общей ОМ.

Цитоплазматические компартменты соседних клеток сообщаются между собой через микроплазмодесмы, которые пронизывают общую поперечную стенку.

Таким образом, у одноклеточных прокариотов онтогенез соответствует клеточному циклу, а у трихомных бактерий и нитчатых метаногенов — периоду между двумя последовательными актами фрагментации трихома или нити.

17.1. КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

Под *клеточным циклом* (англ. cell cycle) подразумевается совокупность событий, происходящих в интервале между двумя клеточными делениями.

По ходу клеточного цикла разворачиваются транспортные, метаболические и регуляторные процессы, которые решают глобальную биологическую задачу — копирование генов и их передачу по вертикали от материнской клетки дочерним клеткам или их перенос по горизонтали между двумя генетически не идентичными клетками (см. раздел 16.6.1.3).

Ключевыми фазами клеточного цикла являются:

- *репликация хромосом(ы)*;
- *сегрегация сестринских геномных эквивалентов*;
- *клеточное деление*.

Мономорфный клеточный цикл и мультиморфные клеточные циклы. В основе ключевых фаз клеточного цикла с соответствующими генетическими событиями лежат клеточный рост и морфогенез, которые сопровождаются процессами обновления и репарации (см. раздел 17.3).

Если после деления клетки не дифференцируются, то клеточный цикл называется *мономорфным* (даже если дочерние клетки отличаются друг от друга по форме и размеру). Типичным примером бактерии с мономорфным клеточным циклом служит *E. coli*.

Наблюдая морфологический результат бинарного эквивалентного деления (см. раздел 17.4 и рис. 228), мы не можем определить, какая из двух новых особей является материнской, а какая — дочерней. По образному выражению И. И. Мечникова, которое выбрано в качестве эпиграфа к настоящей главе, в момент деления старая особь «растворяется», и вместо нее появляются две новые одинаковые особи. Компоненты старой особи, в том числе несущие повреждения, распределяются между новыми особями поровну (а не консервативно, как было бы в том случае, когда их сохраняет материнская клетка).

Если клеточное деление сопровождается клеточной дифференциацией, мы имеем дело с *мультиморфными* клеточными циклами. В том случае, когда образуются дифференцированные клетки только одного типа, клеточный цикл называется *димиорфным*, а если двух типов — *тримиорфным*.

В зависимости от способа дифференциации, физиолого-биохимических свойств и выполняемой функции, дифференцированные клетки подразделяются на активные (см. раздел 17.5.1) и покоящиеся резистентные (см. раздел 17.5.2).

Примером бактерии со сложным онтогенезом, в котором представлены три типа клеточных циклов, служит *Rhodomicrobium vannielii* (рис. 221). Роль активной клетки, обеспечивающей распространение этой бактерии, играет швермер, а роль покоящейся резистентной клетки — экзоспора (см. раздел 17.5.2.1).

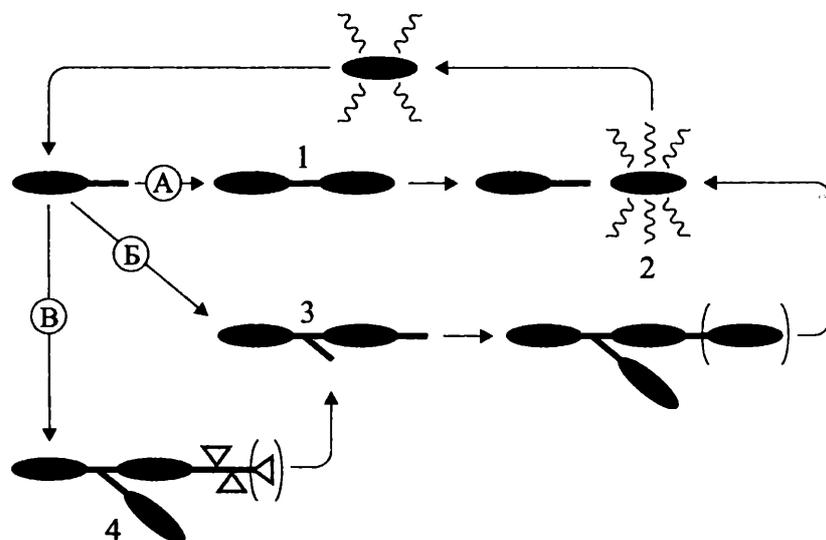


Рис. 221. Клеточные циклы *Rhodomicrobium vannielii*.

А — димиорфный цикл с вегетативной немотициальной (1) и подвижной дифференцированной (2) стадиями; Б — димиорфный цикл с вегетативной мицелиальной (3) и активной дифференцированной (2) стадиями; В — тримиорфный цикл с вегетативной мицелиальной (3), активной дифференцированной (2) и покоящейся резистентной дифференцированной (4) стадиями.

Что касается архей, то в данном случае говорить о мультиморфных клеточных циклах преждевременно, поскольку данных об их дифференцированных клетках еще мало (см. раздел 17.5.2.1).

Абортивный клеточный цикл («выход» из цикла). В отдельных случаях у прокариотов имеет место *абортивный клеточный цикл* (англ. abortive cell cycle), когда после очередного деления новый раунд репликации хромосомы по той или иной причине не инициируется или преждевременно прерывается. В данном случае по аналогии с эукариотами можно сказать, что клетка «выходит» из клеточного цикла. Такой сценарий, несмотря на способность прокариотов к потенциально неограниченному размножению, заканчивается запрограммированной смертью клетки (см. ниже).

Отсутствие фазы репликации и абортивный клеточный цикл характерны для терминально дифференцированных клеток. Классическим примером служат гете-

роцисты цианобактерий из Субсекций IV и V (см. I том учебника). Они образуются при азотном голодании и специализируются на diazotrophii. Зрелые гетероцисты неспособны к дедифференциации и рано или поздно обречены на запрограммированную смерть (см. раздел 17.5.1.2).

Наконец, abortивный клеточный цикл имеет место в результате *abortивного деления* (англ. abortive cell division), правильнее сказать, из-за ошибки в ходе взаимной изоляции сестринских хромосом (см. раздел. 16.4.2). В данном случае одна из дочерних клеток получает неполноценный фрагмент хромосомы или оказывается «безъядерной», т. е. вообще без хромосомы, что неизбежно заканчивается автолизом.

17.1.1. Структура клеточного цикла

Для понимания особенностей клеточного цикла у прокариотов его необходимо сравнить с клеточным циклом у ядерной клетки.

Клеточный цикл эукариотов состоит из четырех фаз:

- первой промежуточной фазы G_1 (сокр. англ. gap – промежуток);
- фазы репликации S (сокр. англ. synthesis; в данном случае – синтез ДНК);
- второй промежуточной фазы G_2 ;
- фазы митоза M (сокр. англ. mitosis).

Все четыре фазы взаимно обособлены и сменяют друг друга в строгой очередности: $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$. Каждая фаза начинается не раньше, чем закончится предыдущая. Иными словами, у эукариотов репликация, сегрегация хромосом и клеточное деление разобщены во времени.

Для прокариотов модель клеточного цикла, учитывающая особенности регуляции их репликации и известная как «I + C + D», была разработана в 1968 г. группой американских микробиологов во главе с Хелмстетером (С. Е. Helmstetter). Они же предложили стандартизированные обозначения для отдельных фаз клеточного цикла прокариотов – по аналогии с клеточным циклом эукариотов (табл. 29).

Таблица 29. Сравнительные обозначения фаз клеточного цикла у эукариотов и прокариотов

Фаза клеточного цикла	Эукариоты	Прокариоты
Пререпликативная	G_1	I (B)
Репликативная	S	C
Пострепликативная	$G_2 + M$	D

В случае прокариотов период от завершения взаимной изоляции дочерних клеток до начала нового раунда репликации, называется *фазой I*, или *фазой B* (сокр. англ. intermediary, или between); он соответствует фазе G_1 эукариотов. Репликативная фаза C прокариотов (сокр. англ. chromosome) соответствует фазе S эукариотов. В свою очередь, фаза D у прокариотов (сокр. англ. division) соответствует периоду $G_2 + M$, который у эукариотов проходит от терминации репликации до завершения митотического деления.

В отличие от эукариотной модели клеточного цикла $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$, прокариотная модель не обязательно реализуется в линейной последовательности I→C→D, когда за инициацией/элонгацией/терминацией репликации следует деление и т. д. При малой продолжительности клеточного цикла репликативная фаза C выходит за его пределы!

Дело в том, что общая картина репликации, связанная с числом репликационных вилок, определяется реальным соотношением между продолжительностью фазы С и временем генерации (т. е. периодом от деления до деления).

При большом времени генерации на хромосоме образуется единственная репликационная вилка, и до завершения раунда репликации реинициация не происходит, т. е. фаза С укладывается в клеточный цикл. Иными словами, после терминации репликации синтез ДНК, как у эукариотов, на некоторое время прекращается.

В свою очередь, при частом делении продолжительность фазы С больше, чем время генерации, и на хромосоме образуется несколько репликационных вилок, которые передаются в дочерние клетки (см. раздел 16.4.1.1, а также рис. 178).

17.1.2. Регуляция клеточного цикла

Для быстро размножающихся бактерий, которые делятся 1–3 раза в час, продолжительность фаз С и D постоянна и равна, соответственно, ~40 и ~20 мин. В случае медленно размножающихся бактерий фазы С и D составляют, соответственно, 2/3 и 1/3 клеточного цикла. У очень медленно размножающихся бактерий клеточный цикл растягивается за счет адаптивной фазы I(B), которая при постоянной температуре зависит от прочих физико-химических условий природной или лабораторной среды.

Каким образом осуществляется регулярная смена отдельных событий, а также целых фаз клеточного цикла?

По современным представлениям, для этого существуют особые *контрольно-пропускные пункты* (англ. checkpoint), которые в случае нарушений, допущенных на предшествующей фазе, блокируют переход к следующей фазе.

Центральным событием клеточного цикла является репликация ДНК, и неудивительно, что именно этот процесс считается главным checkpoint'ом.

Как известно, повреждения ДНК блокируют репликационную вилку, вызывая SOS-ответ (см. раздел 16.5.1.4). Для него характерна активация белка RecA, который не только сам участвует в репарации ДНК, но и стимулирует автопротеолиз репрессора SOS-ответа — белка LexA. Также элементом SOS-ответа служит активация ингибитора клеточного деления SulA (см. раздел 17.4.1), в результате чего блокируется фаза D клеточного цикла. Таким образом, в случае стресса мы имеем дело с SOS-checkpoint'ом и негативной регуляцией клеточного цикла.

Очевидно, что в отсутствии стресса речь идет о позитивной регуляции и checkpoint'e, который разрешает переход от фазы С к фазе D. Предполагается, что в данном случае главным checkpoint'ом служит терминация репликации, хотя природа соответствующего сигнала неизвестна. Роль промежуточных регуляторов клеточного цикла могут играть аналоги митотического аппарата (см. раздел 16.4.2.1). Однако, какие checkpoint'ы нужно пройти на данном этапе — не выяснено. Фаза D тоже должна иметь свой checkpoint, но мы не знаем, что дает сигнал на сборку Z-кольца.

У эукариотов прохождение отдельных фаз клеточного цикла и его общая продолжительность зависят от последовательной активации системы циклинов/циклинзависимых киназ, а checkpoint'ами служат отдельные стадии репликации и физическая организация хромосом. Существует ли аналогичный механизм у прокариотов, пока еще неизвестно.

17.1.3. Циркадные ритмы и их связь с клеточным циклом

Если условия окружающей среды на короткое время изменяются, клеточный цикл регулируется внутренними сигналами и имеет относительно постоянную продолжительность. Иными словами, он играет роль биологических часов, хотя точно не известно, каково их устройство и как они работают.

Циркадные ритмы. Наряду с клеточным циклом бактерии могут использовать второй механизм, работающий по эндогенной программе — биологические часы, которые являются *водителем циркадного ритма*.

Термином «циркадный ритм» (англ. circadian rhythm; от лат. circa diem — примерно день), применительно к одноклеточному или многоклеточному организму, обозначается суточное повторение или волнообразное изменение интенсивности биологических процессов. Осциллирующий, т. е. колебательный характер могут принимать экспрессия генов, метаболическая активность, процессы развития и поведенческие реакции.

Биологические часы, задающие циркадный ритм, характеризуются тремя каноническими свойствами:

— *они имеют независимый ход*, т. е. при постоянных внешних условиях совершают полный оборот приблизительно за 24 ч;

— *они могут переводиться*, т. е. при изменении внешних условий (сигналами служат интенсивность света, темнота или температура) циркадный ритм сдвигается по фазе, по аналогии с тем, как человек после дальнего авиаперелета привыкает к местному времени;

— *они термокомпенсированы*, т. е. идут с одной и той же скоростью в физиологическом интервале температур подобно нашим биологическим часам, для которых географический полюс субъективно не отличается от экватора (хотя при изменении температуры, как и других внешних условий, часы могут сдвигаться по фазе).

Скорость вращения Земли является наиболее стабильным физическим параметром на протяжении всей истории существования органической жизни. Поэтому неудивительно, что живые организмы регулируют свои эндогенные процессы с помощью биологических часов, ход которых совпадает с ходом космических часов. Это позволяет адаптироваться к суточным изменениям таких факторов внешней среды, как свет, температура и влажность. В частности, температура обычно минимальна перед восходом солнца и максимальна в полдень. Соответственно, устойчивость к тепловому шоку должна быть минимальна ночью, а днем максимальна, и живым организмам выгодно это предвидеть.

Феномен суточного ритма впервые описал в 1729 г. французский ботаник Дэмеран (de Mairan) на примере движения листьев, которые разворачиваются и свертываются независимо от смены периодов света и темноты. В последующие 250 лет было показано, что помимо растений биологическими часами обладают животные, грибы и протисты.

К числу осциллирующих процессов у низших организмов, в частности, относятся:

- клеточный цикл *Chlorella* spp., *E. gracilis* и *S. cerevisiae*;
- образование конидий аскомицетом *Neurospora crassa*;
- образование половых пар инфузориями *Paramecium* spp.;
- биолюминесценция у динофлагеллата *Gonyaulax polyedra*;
- хемотаксис у *Chlamydomonas reinhardtii*;
- фотосинтез сифональной водоросли *Acetabularia mediterranea* и т. д.

У высших организмов, в частности у человека, зарегистрированы циркадные ритмы температуры тела, уровня ферментов и гормонов, а также чувствительности к лекарственным препаратам.

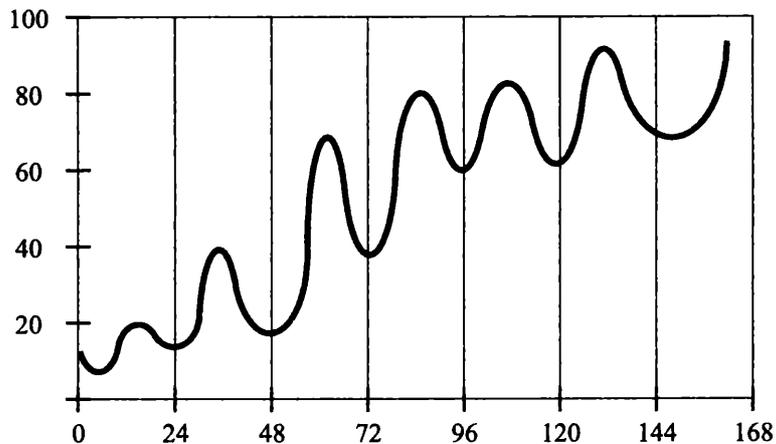


Рис. 222. Циркадная экспрессия генов люциферазы *luxAB* в клетках *Synechococcus* sp. под контролем промотора гена *psbAI*.

По оси абсцисс — время (ч) после помещения в условия непрерывного освещения; по оси ординат — интенсивность люминесценции (импульс·с⁻¹).

Существование циркадных ритмов у прокариотов, время генерации которых обычно меньше 24 ч, не допускалось a priori. Однако в 1985 г. немецкие микробиологи Шталь (L. J. Stahl) и Крумбайн (W. E. Krumbein) на примере нитчатой цианобактерии *Oscillatoria* sp. 23, а следом за ними в 1986 г. японская группа под руководством Мицуи (A. Mitsui) на примере *Synechococcus* sp. Miami BG 43511 и китайская группа под руководством Тянь-Чи Юаня (T. C. Huang) на примере *Synechococcus* sp. RF-1 обнаружили, что если культуры выращивать при сменном режиме света и темноты (по 12 ч), а затем перейти на непрерывное освещение, то в течение нескольких дней пик нитрогеназной активности будет повторяться с периодичностью ~24 ч.

Кроме того, в случае *Synechococcus* sp. Miami BG 43511 было показано, что ритм фотосинтетической активности (дневной пик) находится в противофазе с ритмом нитрогеназной активности (ночной пик). Физиологический смысл этого очевиден и связан с «темпоральной» защитой нитрогеназы (см. II том учебника).

Биологические часы у цианобактерий контролируют экспрессию генов в онтогенезе через систему глобальных регуляторов, и их ход внешне выражается в осцилляции уровня мРНК (см. ниже).

В настоящее время показано, что циркадно экспрессируются гены нитрогеназы (*nif*), ген апопротеина D1 реакционного центра ФС II (*psbAI*), ген белка теплового шока (DnaK), гены транспортеров аминокислот, гены цитокинетического аппарата (*fts*) и ряд других, не менее важных генов.

Основным инструментом для изучения биологических часов у цианобактерий служат мутанты, полученные в середине 1990-х гг. с помощью химического мутагенеза.

Для анализа циркадного ритма используется автоматизированное измерение люминесценции микроколоний цианобактерий со встроенным в хромосому репортерным геном люциферазы.

В частности, клетки трансформируют гибридной конструкцией из структурных генов люциферазы (*luxAB*), фрагмента гена *psbAI* и его промотора. В результате гомологической рекомбинации она встраивается в хромосому, и гены люциферазы начинают экспрессироваться, подчиняясь циркадному ритму (рис. 222).

Для глобального скрининга ритмического контроля промоторов гены люциферазы путем конъюгации переносят в *Synechococcus* spp. Донором служит *E. coli*, содержащая «библиотеки» гибридов *luxAB* с фрагментами цианобактериальной ДНК. После случайного встраивания в хромосому гены *luxAB* попадают под контроль резидентных промоторов.

Таким методом были выявлены циркадные ритмы с волнами разной формы, амплитуды и фазы. В ряде случаев гены люциферазы попадают под контроль промоторов известных генов (например, *glnA* и *psbAI*). Среди них различают гены класса I, которые максимально экспрессируются днем (в частности, *psbAI*), и гены класса II, которые максимально экспрессируются ночью (в частности, *glnA*). Заметим, что это не какие-то специализированные гены, а гены, отвечающие за метаболизм в целом, а также за такой фундаментальный процесс, как клеточное деление.

В результате фенотипической комплементации мутантов с нарушенным циркадным ритмом (аритмия; продолжительность 14–60 ч; изменение длины волны и фазы) у ряда цианобактерий, в частности *Synechococcus* sp. PCC 7942, идентифицированы гены, продукты которых обеспечивают ход биологических часов (см. ниже). Важно подчеркнуть, что они не гомологичны соответствующим генам у ядерных организмов.

Биологические часы *Synechococcus* sp. 7942, задающие эндогенный циркадный ритм, соединены с фоторецепторным устройством и, подчиняясь внешнему световому сигналу, ежедневно переводятся по фазе (т. е. устанавливаются по локальному времени). Кроме того, хотя природный суточный цикл равен 24 ч, реальная периодичность циркадного ритма обычно несколько меньше или больше этого времени, в зависимости от продолжительности светового дня.

Циркадная система состоит из *входа* (англ. input), *центрального осциллятора* (англ. central oscillator) и *выхода* (англ. output). Вход передает сигнал для перевода часов по фазе; осциллятор служит водителем эндогенного 24-часового ритма; выход обеспечивает внешнее проявление циркадного ритма (рис. 223, А).

Вход циркадной системы. На входе находится фоторецептор — гистидинкиназа *CikA* (сокр. англ. circadian input kinase; 754 а.о.). Она содержит характерный для бактериофитохромов мотив Gly-Ala-Phe (см. раздел 18.3.1.1), однако лишена консервативных остатков Cys и His, необходимых для ковалентного связывания билинового хромофора, т. е. билин или другой кофактор присоединяются к апопротеину нековалентно.

Центральный осциллятор циркадной системы. Сердцевину центрального осциллятора составляет трио белков, которые кодируются генами *kaiA*, *kaiB* и *kaiC* (от японск. *kai* — цикл). Гены *kaiBA* образуют оперон, в то время как ген *kaiC* транскрибируется независимо от них. Белки KaiABC незаменимы, и отсутствие хотя бы одного приводит к исчезновению циркадного ритма.

Белок KaiC (519 а.о.), принадлежащий к семейству AAA-АТФаз, содержит АТФ/ГТФ-связывающий мотив Уокера (см. разделы 16.4.1.1 и 16.6.1.3).

Белки KaiA (284 а.о.) и KaiB (102 а.о.) обладают N-концевыми доменами, которые у регуляторов ответа обычно играют роль приемника сигнала, или *ресивера* (англ. receiver domain). В двухкомпонентной сигнальной системе регулятор получает от гистидинкиназы, или сенсора фосфорильную группу, которая связывается с консервативным остатком Asp в составе приемника (см. раздел 18.2). Однако в белках KaiA и KaiB такие остатки отсутствуют, т. е. в данном случае N-концевые домены играют роль псевдоресивера.

Выход циркадной системы. На выходе циркадной системы находится белок SasA (сокр. англ. *Synechococcus* adaptive sensor). По сути дела, это умножитель ритма, задаваемого центральным осциллятором. Подобно белкам KaiA и KaiB, он играет роль регулятора ответа; его псевдоресиверный домен получает сигнал от белка KaiC. Белок SasA активирует сигма-факторы RpoD2–D4 и SigC (группа 2).

Попутно заметим, что кроме главного сигма-фактора RpoD1 (группа 1), гомолога и функционального эквивалента σ^{70} *E. coli*, у цианобактерий существует несколько

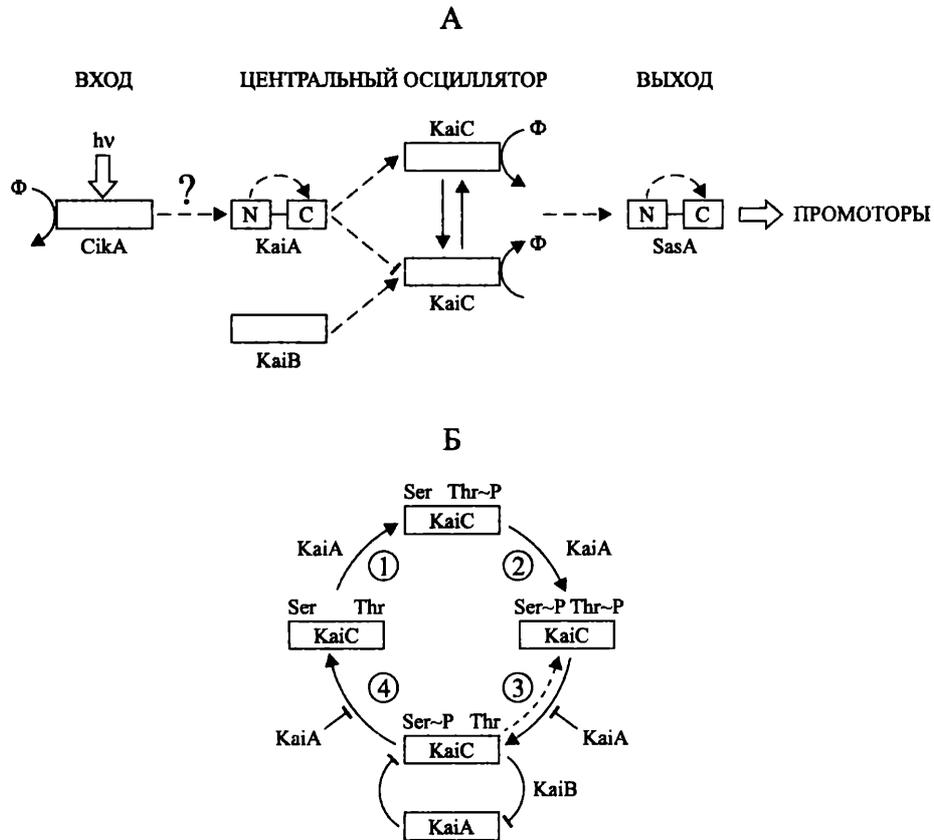


Рис. 223. Общая организация циркадной системы цианобактерий (А) и механизма работы центрального осциллятора (Б).

N и C — N- и C-концевой домены; 1 — первое фосфорилирование; 2 — второе фосфорилирование; 3 — первое дефосфорилирование; 4 — второе дефосфорилирование.

Пунктирные стрелки — передача сигнала; тупые стрелки — негативный контроль.

взаимно родственных сигма-факторов группы 2, которые также гомологичны σ^{70} , однако не участвуют в реализации процессов роста (см. раздел 18.1.1).

Биохимический механизм водителя циркадного ритма стал проясняться в 2005 г., когда было показано, что он связан с осцилляциями уровня фосфорилирования белка KaiC.

По данным, одновременно опубликованным в конце 2007 г. группами Такао Кондо (Т. Kondo) и Майкла Руста (М. J. Rust), белок KaiC последовательно автофосфорилируется и автодефосфорилируется по остаткам Thr и Ser (рис. 223, Б), причем белок KaiA позитивно регулирует автофосфорилирование и негативно регулирует автодефосфорилирование.

Почему фосфорилирование белка KaiC носит циклический характер? Как выяснилось, белок KaiC, фосфорилированный по остатку Ser (KaiC-Ser~P), образует стехиометрический комплекс с белками KaiA и KaiB. И если свободный белок KaiA активирует фосфорилирование и препятствует дефосфорилированию белка KaiC, то в составе комплекса KaiA/KaiB/KaiC-Ser~P он этого не делает (рис. 223, Б). Когда концентрация белка KaiC-Ser~P возрастает, белок KaiA «иммобилизуется» в комплексе, и начинает преобладать дефосфорилирование белка KaiC. В свою очередь, когда концентрация белка KaiC-Ser~P снижается, белок KaiA покидает комплекс, и начинает преобладать фосфорилирование белка KaiC. Иначе говоря, KaiC-Ser~P и KaiA являются взаимными антагонистами. Белок KaiA негативно регулирует белок KaiC-Ser~P, сдвигая равновесие реакции первого дефосфорилирования в сторону образования комплекса KaiC-Ser~P/KaiC-Thr~P. В свою очередь, белок KaiC-Ser~P негативно регулирует белок KaiA, «иммобилизуя» его в комплексе.

Процесс протекает по циклической схеме: нефосфорилированный KaiC → низкая концентрация KaiC-Ser~P/KaiA → преобладание фосфорилирования → накопление KaiC-Ser~P/KaiC-Thr~P → накопление KaiC-Ser~P → «иммобилизация» KaiA → накопление KaiC-Ser~P → дальнейшая «иммобилизация» KaiA → преобладание дефосфорилирования → нефосфорилированный KaiC.

Таким образом, циклический характер фосфорилирования белка KaiC обеспечивается двойной петлей обратной связи.

Возможность существования циркадных ритмов у прокариотов, не относящихся к цианобактериям. Предполагается, что циркадные ритмы характерны для всех цианобактерий. У других прокариотов они не обнаружены, хотя в геномах ряда представителей филы VII *Proteobacteria* и архей содержатся гомологи генов *kaiC* и *kaiB*, которые могли быть приобретены горизонтальным путем от цианобактерий.

Если цель использования 24-часового осциллятора медленно растущими цианобактериями очевидна, то зачем он может понадобиться быстро растущим хемотрофным прокариотам? Например, когда *E. coli* находится в пищеварительном тракте человека, она не нуждается в циркадном ритме, поскольку находит там богатую питательную среду и другие оптимальные условия для роста. Иное дело, когда эта бактерия временно оказывается в воде или почве. Не исключено, что в стрессовой обстановке она может пускать в ход биологические часы, имеющие адаптивное значение для ее выживания.

Связь циркадных ритмов с клеточным циклом. У одноклеточных ядерных организмов, в частности *E. gracilis*, *G. polyedra* и *Tetrahymena pyriformis*, циркадная система часто контролирует начало деления.

Связь между делением и проявлением циркадных ритмов у эукариотов подчиняется «циркадно-инфрадному» правилу (англ. circadian-infradian rule; от лат. infra diem — позже дня). Оно гласит, что циркадные ритмы наблюдаются только у клеток, которые делятся раз в день или реже. В свою очередь, у клеток, которые делятся чаще одного раза в день, клеточный цикл не контролируется циркадным осциллятором. Более того, при скорости деления больше одного раза в день циркадные осцилляции вообще не происходят, т. е. они имеют адаптивный смысл только в том случае, если время генерации равно одному дню или больше дня (т. е. клетки делятся не чаще раза в день).

Распространяется ли циркадно-инфрадное правило на прокариотов? Иными словами, могут ли они параллельно использовать два типа биологических часов — циркадный таймер и таймер, основанный на клеточном цикле? Если да, то какой из них является ведущим?

В опытах, проведенных с относительно быстро растущими штаммами цианобактерий, в частности с пресноводным штаммом *Synechococcus* sp. PCC 7942 и морским штаммом *Synechococcus* sp. WH 7803 (время генерации ~10 ч), культуры тренировали путем выращивания в сменном режиме света и темноты (по 12 ч). Когда их помещали в условия непрерывного освещения, первый пик делений наблюдался через 12 ч, а затем повторялся с 24-часовым интервалом (хотя культура так и не становилась синхронной). Иными словами, частота деления находится под контролем циркадного осциллятора, и оба типа биологических часов идут одновременно, причем циркадный таймер действует независимо от таймера, основанного на клеточном цикле.

В темноте фотоавтотрофные цианобактерии не делятся, хотя на свету они накапливают достаточно резервных веществ. Клеточный цикл abortируется из-за прекращения биосинтеза ключевых

макромолекул, прежде всего ДНК. В свою очередь, при попадании на свет инициируется новый клеточный цикл.

На примере *Synechococcus* sp. PCC 6301 показано, что свет регулирует транскрипцию оперонов рибосомной РНК *rnaA* и *rnaB*. В частности, транскрипция оперона *rnaA* контролируется ДНК-связывающим белком Rbp1, а тот, в свою очередь, активируется на свету и дезактивируется в темноте.

Как уже указывалось, живым организмам физиологически выгодно адаптироваться к суточной смене физико-химических параметров среды, в частности предвидеть наступление рассвета. Это особенно важно для фотосинтезирующих организмов, таких как цианобактерии, пигментные комплексы которых легко травмируются светом. Распространяется ли принцип селективного преимущества циркадных ритмов на других прокариотов, пока еще неизвестно.

17.1.4. Клеточный цикл и клеточное развитие

Клеточным развитием (англ. cell development) называется сочетание процессов роста и размножения.

Центральным модельным объектом при изучении соотношения между клеточным циклом и клеточным развитием служит стебельковая бактерия *Caulobacter crescentus* (класс «*Alphaproteobacteria*»). Она обладает диморфным клеточным циклом и образует два морфо-функционально разных типа клеток — стебельковые клетки и швермеры.

Стебельковая клетка (англ. stalked cell) играет роль вегетативной, или стволовой клетки (англ. stem cell). Она прикрепляется к субстрату или к другим клеткам при помощи стебелька. Стебелек (англ. stalk) представляет собой трубчатый вырост периплазматического компартмента, образованный ОМ. На его дистальном конце образуется адгезивное устройство — *прикрепительный диск* (англ. holdfast — захват). Таким образом, в цитологическом плане стебелек принципиально отличается от простеки гифомикробов (см. раздел 17.3.2), которая образована всеми слоями оболочки, наполнена цитоплазматическим содержимым и служит каналом, по которому сестринская хромосома транспортируется в концевую почку. Стебелек не содержит транспортных и цитоплазматических белков, но с помощью периплазматических связывающих белков обеспечивает доставку питательных субстратов, в частности фосфатов, к транспортерам, расположенным внутри СМ.

Швермер (от нем. Schwärmer — роящийся; англ. swarmer cell), снабженный жгутиком и фимбриями, представляет собой активную дифференцированную клетку. За счет свободного плавания, используя систему хемотаксиса, он играет роль агента пространственного распространения (см. раздел 17.5.1.1).

После репликации и расхождения дочерних хромосом (см. раздел 16.4.1.1 и рис. 186) на полюсе, противоположном стебельку, образуются хеморецепторы и жгутик. В экваториальной части материнской клетки собирается кольцо деления. В результате асимметричного деления возникает апикальная дочерняя клетка (т. е. швермер) и базальная дочерняя клетка (т. е. стебельковая клетка). Последняя инициирует новый раунд репликации, воспроизводит свою программу развития и т. д.

Швермер не способен к репликации; выполнив свою задачу, он завершает индивидуальную программу развития — дедифференцируется в стебельковую клетку. Жгутик сбрасывается, фимбрии стягиваются, а на их месте образуется стебелек с концевым прикрепительным диском. Размер стебелька определяется глобальным регулятором фосфорного метаболизма Pho (см. раздел 18.3.2.4).

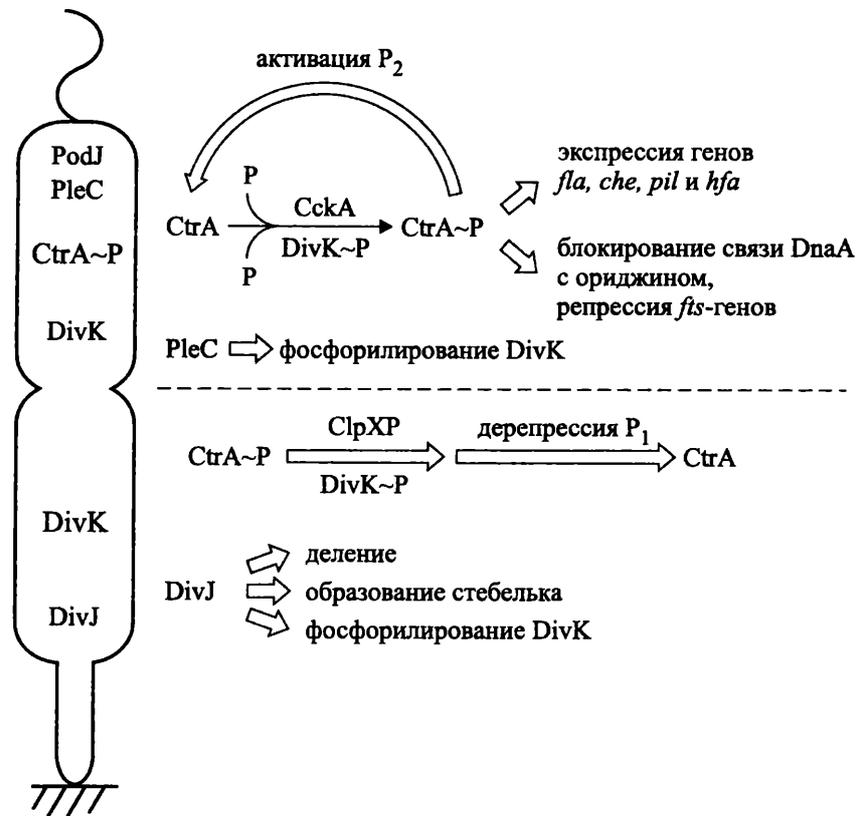


Рис. 224. Анизотропное распределение компонентов регуляторных систем в фазе G_2 диморфного клеточного цикла *Caulobacter crescentus*.
Объяснение в тексте.

В частности, стебелек имеет длину ~ 1 мкм при избытке фосфора и >30 мкм при фосфорном голодании. За счет образования стебелька увеличивается относительная площадь клеточной поверхности. Кроме того, он служит чем-то вроде телескопического устройства, которое выдвигает клетку в область с более активной диффузией питательных субстратов. Дифференциация швермеров является физиологически целесообразной реакцией на олиготрофные условия внешней среды. Таким способом снижается острота взаимной конкуренции за питательные субстраты и обеспечивается расселение популяции; неудивительно, что данной стадии отводится $\sim 25\%$ времени клеточного цикла.

Клеточный цикл *C. crescentus* состоит из последовательно сменяющихся друг друга фаз, на фоне которых разворачиваются процессы развития:

- I (образование фимбрий \rightarrow подвижность и хемотаксис \rightarrow сбрасывание жгутика и втягивание фимбрий \rightarrow начало образования стебелька);
- C (инициация репликации \rightarrow завершение образования стебелька \rightarrow рост клетки \rightarrow образование жгутика \rightarrow терминация репликации);
- D (расхождение дочерних хромосом \rightarrow деление).

Координацию клеточного цикла с развитием обеспечивает анизотропное распределение регуляторных систем в материнской клетке, подготавливающейся к делению (рис. 224). Благодаря этому после асимметричного деления каждая из дочерних клеток получает отдельную программу для развития.

В клетке накануне деления (англ. predivisional cell) гистидинкиназы PleC и DivJ неравномерно распределяются на противоположных полюсах. Первая из них преимущественно локализуется на жгутиковом полюсе с помощью вспомогательного белка PodJ, вторая — на стебельковом полюсе. Третья гистидинкиназа, CskA приурочена к жгутиковому полюсу. Вопрос о том, каким образом эти белки в нужный момент клеточного цикла находят «свои» полюсы, еще не выяснен. В частности, за привлечение гистидинкиназы PleC к жгутиковому полюсу может отвечать белок PodJ (см. раздел 17.3.2).

Четвертая гистидинкиназа, DivK, равномерно распределяется в клетке накануне деления, но отсутствует в швермере.

Гистидинкиназа PleC участвует в регуляторном каскаде, или *фосфореле* (см. раздел 18.2). Она служит сенсором и фосфорилирует гистидинкиназу DivK, которая, в свою очередь, фосфорилирует регуляторный белок CtrA (см. ниже). Кроме того, она контролирует морфогенез швермера и его подвижность.

В ходе дедифференциации гистидинкиназа DivJ замещает гистидинкиназу PleC и фосфорилирует гистидинкиназу DivK, а также позитивно регулирует рост стебелька и клеточное деление.

Таким образом, взаимная изоляция гистидинкиназ PleC, DivJ и CskA (главного донора фосфорильной группы) в разной степени влияет на активность киназы DivK.

Причина того, что в швермере заблокирована инициация репликации и что он не способен делиться, связана с активностью глобального регулятора — белка CtrA (сокр. англ. cell cycle transcription regulator), который фосфорилируется гистидинкиназами DivK и CskA.

В стебельковой клетке белок CtrA отсутствует. Его активная фосфорилированная форма начинает накапливаться только в клетке накануне деления и в высокой концентрации содержится в швермере. За счет кооперативного связывания белка CtrA~P с несколькими сайтами локуса *Cori* (см. раздел 16.4.2.1) белок DnaA вытесняется из праймосомы, что препятствует инициации репликации. Кроме того, белок CtrA~P репрессирует транскрипцию генов *ftsAIQWZ*, продукты которых образуют кольцо деления. В то же время белок CtrA~P активирует экспрессию генов жгутикового оперона *fla*, генов оперона хемотаксиса *che*, гена фимбрии *pilA* и генов прикрепительного диска *hfABD* (рис. 224).

Переход швермера к сидячему образу жизни связан с ускоренным синтезом сигнальных молекул цикло-ди-ГМФ с помощью гуанилатциклазы PleD (см. раздел 18.4.2).

Центральное событие при дедифференциации швермера — это протеолитическое разрушение белка CtrA~P под воздействием АТФ-зависимых протеаз ClpXP (сокр. англ. chymotrypsin-like protease). В качестве копротеазы выступает гистидинкиназа DivK~P. Протеолиз белка CtrA~P дерепрессирует инициацию репликации и транскрипцию *fts*-генов в образующейся стебельковой клетке (рис. 224).

Возобновление синтеза белка CtrA в стебельковой клетке накануне деления связано с тем, что его фосфорилированная форма, CtrA~P оказывает двойное воздействие на промоторы собственного гена (*ctrA*). Белок CtrA~P репрессирует сильный upstream-промотор P₁ и активирует слабый downstream-промотор P₂. Поэтому, когда белок CtrA~P разрушается при дедифференциации швермера, промотор P₁ дерепрессируется.

Таким образом, главным checkpoint'ом в клеточном цикле *C. crescentus* служит репликация ДНК, влияющая на изменение уровня фосфорилирования белка CtrA.

Установлено, что в ходе развития *C. crescentus* дифференциально экспрессируются 15% генов. После того, как все они будут аннотированы, сценарий регуляции клеточного цикла станет окончательно понятным.

17.1.5. Особенности клеточного цикла у архей

Мы уже не раз отмечали, что центральное место в клеточном цикле играет репликативная фаза. Ее специфика зависит, в частности, от того, сколько ориджинов одновременно существует в одной хромосоме, сколько репликационных вилок образуется в зависимости от времени генерации, и какова скорость элонгации, т. е. темп включения нуклеотидов в растущую цепь ДНК.

Архей из фил АI *Crenarchaeota* и АII *Euryarchaeota* сильно отличаются друг от друга по организации репликативного аппарата и, соответственно, по структуре клеточного цикла. Так, хромосомы кренархеотов содержат несколько ориджинов, а хромосомы эвриархеотов — только один (см. раздел 16.4.1.1). Если у кренархеотов, в частности *Sulfolobus* spp., наблюдается пауза между репликацией и сегрегацией сестринских хромосом (аналог эукариотной фазы G₂), то у эвриархеотов, например *Methanothermobacter thermautotrophicus*, эти процессы накладываются друг на друга.

Эвриархеоты используют такой же, как бактерии, механизм репликации хромосомы (один ориджин; быстрая элонгация; см. раздел 16.4.1.1) и такой же FtsZ-зависимый механизм клеточного деления (см. раздел 17.4.2).

Кренархеоты, напротив, проявляют удивительное сходство с эукариотами (несколько ориджинов; медленная элонгация; длинная фаза G₂). Так же, как у эукариотов, их хромосомы конденсируются и попарно объединяются на экваторе перед расхождением к полюсам делящейся клетки. Наконец, инициаторные белки Orc1/Cdc6 *Sulfolobus acidocaldarius* дифференциально экспрессируются в ходе клеточного цикла, по аналогии с эукариотными *циклинами*.

17.2. СТАРЕНИЕ И СМЕРТЬ КЛЕТКИ

Прокариотов считают потенциально бессмертными — из-за отсутствия у них комплекса феноменов старения и смерти, свойственного высшим организмам. Так ли это на самом деле, и не существуют ли у прокариотов аналоги процессов старения и смерти?

17.2.1. Старение клетки

В стационарной фазе роста (см. раздел 21.1.1) бактерии перестают размножаться — чаще всего, по причине истощения питательных субстратов. Такие «стерильные» клетки постепенно теряют жизнеспособность. Данное физиологическое состояние называется *условным старением из-за прекращения роста* (англ. conditional senescence elicited by growth arrest).

Рост и *выживание* (англ. maintenance) являются двумя взаимно конкурирующими физиологическими состояниями. Внутренним сигналом тревоги, или *алармоном*

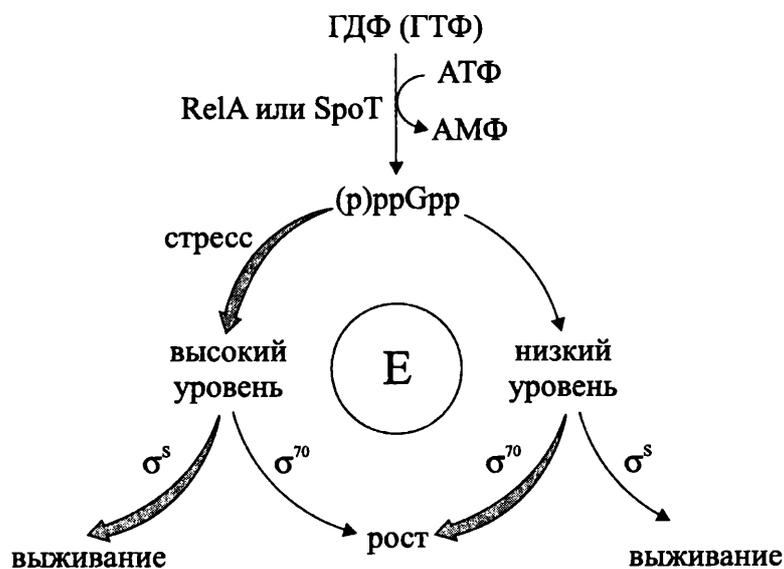


Рис. 225. Выбор между ростом и выживанием, зависящий от уровня (p)ppGpp.
 E — кор-фермент РНК-полимеразы; RelA и SpoT — соответственно, синтетазы I и II.

(англ. alarmone, от alarm — тревога), который прекращает рост и ориентирует клетку на выживание, служит (p)ppGpp (см. рис. 254).

Регуляторное влияние (p)ppGpp на транскрипцию объясняется аллостерическим связыванием этого нуклеотида с кор-ферментом РНК-полимеразы (рис. 225).

У бактерий, в том числе *E. coli*, содержание (p)ppGpp может регулироваться разными способами; в частности, оно повышается при строгом ответе на аминокислотное голодание (см. раздел 18.3).

Реакцию ГДФ (ГТФ) + АТФ → (p)ppGpp + АМФ катализирует синтетаза I (RelA). Активатором этого фермента служат «незаряженные» тРНК, которые накапливаются при аминокислотном голодании или в результате ингибирования синтеза отдельных аминокислот. Содержание (p)ppGpp возрастает и при углеродном голодании, однако в данном случае используется не синтетаза I, а синтетаза II (SpoT).

В основе выбора между ростом и выживанием лежит конкуренция главного транскрипционного фактора σ^{70} и альтернативного транскрипционного фактора σ^{38} (σ^S) за связь с кор-ферментом РНК-полимеразы (см. раздел 16.7.1). Голофермент, содержащий σ^{70} , связывается с промоторными участками «обычных» генов домашнего хозяйства, продукты транскрипции которых обслуживают ростовые процессы. В свою очередь, голофермент, содержащий σ^S , связывается с промоторными участками «стрессовых» генов. Избыточный синтез σ^{70} способствует росту, но в то же время делает клетку чувствительной к стрессорам. При низком содержании (p)ppGpp в состав голофермента преимущественно входит σ^{70} , а при высоком содержании — σ^S .

Таким образом, (p)ppGpp обеспечивает соответствие между активностью РНК-полимеразы и трофическими ресурсами окружающей среды, что и определяет выбор между ростом и выживанием (рис. 225). Когда трофический статус благоприятен (низкий уровень (p)ppGpp), с помощью σ^{70} транскрибируются гены домашнего хозяйства, и клетки растут. В свою очередь, при неблагоприятном трофическом статусе (высокий уровень (p)ppGpp) с помощью σ^S транскрибируются стрессовые гены, и клетки от роста переходят к выживанию.

Старение клеток при выживании в стационарной фазе связано с потерей жизнеспособности из-за снижения интенсивности метаболических процессов и нарушения целостности СМ. В настоящее время основной физиологической причиной старения считается окислительный стресс из-за накопления активных форм кислорода (см. раздел 19.1.6). На молекулярном уровне старение связано не только с переходом полноценных белков в окисленную форму, но и с нарушением их фолдинга (см. I том учебника).

Интересно, что патологическая смерть бактериальной клетки под воздействием бактерицидных антибиотиков (например, пенициллина, ингибирующего синтез муреина) осуществляется с помощью такого же генерального механизма, как и при старении, и связана с окислительным стрессом, при котором накапливаются активные формы кислорода. В то же время при воздействии бактериостатических антибиотиков (например, рифампицина, ингибирующего транскрипцию) активные формы кислорода не накапливаются.

17.2.2. Смерть клетки

Жизненные циклы бактерий в ряде случаев, в том числе при старении, завершаются запрограммированной смертью, которая может принимать форму апоптоза.

Запрограммированная смерть (англ. programmed cell death, PCD) и ее характерное фенотипическое выражение, *апоптоз* (греч. apoptosis — устранение) являются ни чем иным, как самоубийством. Это общебиологический феномен, при котором клетки, по той или иной причине оказавшиеся дефектными, элиминируются из популяции.

Слова «запрограммированная смерть клетки» и «апоптоз» часто используются в качестве синонимов. Однако на самом деле понятие «запрограммированная смерть» охватывает более широкий круг биологических явлений. К ним, в частности, относится и апоптоз, который представляет собой комплекс морфологических изменений, характерных для клетки, умирающей по эндогенной программе.

Термин «апоптоз», предложенный в 1972 г. английским физиологом Керром (J. F. R. Kerr), традиционно используется применительно к запрограммированной клеточной смерти у ядерных, особенно многоклеточных организмов. К числу морфо-биохимических признаков апоптоза относятся разбухание клетки, конденсация хроматина, протеолиз и деградация ДНК. Диагностическим признаком апоптоза служит процессинг ядерной ДНК с образованием «лестницы» фрагментов в размерном диапазоне 180–200 п.н.

Апоптоз соответствует физиологической смерти клетки, в отличие от *некроза* (греч. necrosis — смерть), или патологической смерти, вызванной внешним повреждающим воздействием. При апоптозе мембраны, в частности мембрана лизосомы, остаются интактными, и завершающей фазой служит распад клетки с образованием апоптозных телец, которые поглощаются фагоцитами; содержимое мертвой клетки не выходит наружу, что исключает развитие воспаления. При некрозе, напротив, лизосомы разрушаются; содержимое клетки выходит наружу, вызывая воспаление. Таким образом, в отличие от апоптоза, некроз повреждает соседние клетки.

Апоптоз — это альтруистический процесс, позволяющий устранять ненужные клетки ради эффективного функционирования или выживания многоклеточного организма. Он неразрывно связан с дифференцировкой, гистогенезом и органогенезом, а также уничтожает опасные клетки (мутантные, неопластические, инфицированные вирусами и т. д.). Индукторами апоптоза служат как внутриклеточные, так и внеклеточные сигналы, в частности цитокины (интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухоли и др.), а также гормоны. «Сигналы о смерти» поступают в митохондрии, что приводит к коллапсу протонного градиента и высвобождению белковых факторов проапоптоза, в частности растворимого цитохрома *c*. Центральную роль в механизме апоптоза играют цистеиновые киллер-протеазы, принадлежащие к семейству *каспаз* (англ. caspase; от cysteinyl aspartate-specific proteinase).

В случае одноклеточных организмов, особенно прокариотов, об апоптозе говорят редко по причине отсутствия у них соответствующего комплекса морфо-биохимических признаков клеточной смерти или несходства этих признаков с эукариотными признаками апоптоза (хотя у прокариотов также наблюдаются дисперсия нуклеоида, деградация внутриклеточных структур, плазмолиз и фрагментация СМ). В данном случае применяется только термин «запрограммированная смерть клетки», которым в настоящее время обозначают любую форму клеточной смерти по эндогенной программе, независимо от того, чем она запускается, а также независимо от того, имеет ли картина смерти признаки классического апоптоза.

Запрограммированная смерть у прокариотов регулируется генетически и связана с синтезом или активацией ферментов, участвующих в цепи превращений, ведущих к гибели клетки. Конкретный характер этих превращений зависит от специфики онтогенеза, метаболического статуса и присутствия сателлитных геномов.

Некоторые из систем, вызывающих запрограммированную смерть прокариотной клетки, широко распространены, тогда как другие уникальны. Как правило, они представляют собой белковый токсин, действующий в паре с антитоксином (белком или антисмысловой РНК). Механизм действия токсина может быть разнообразным — от рестрикции ДНК до разрушения клеточной оболочки.

Запрограммированной смерти, в частности, подвергаются:

- вегетативные клетки миксобактерий при формировании плодового тела;
- клетки субстратного мицелия актинобактерий при формировании воздушного мицелия;
- клетка-спорангий при дифференциации эндоспоры;
- сегрегант, излеченный от плазмиды;
- вегетативные клетки в стационарной фазе;
- клетка-хозяин при репродукции бактериофага.

Смерть вегетативных клеток миксобактерий при формировании плодового тела. В случае миксобактерий, а также актинобактерий (см. ниже) альтруистический автолиз отдельных клеток обеспечивает остальную популяцию питательными субстратами, давая возможность завершить клеточный цикл образованием дифференцированных особей.

Выше мы уже говорили о том, что миксобактерии обладают сложным циклом развития. У наиболее изученных видов, *Mycococcus xanthus* и *Stigmatella aurantiaca*, скопление клеток погружено в слизистый матрикс, и такая «улитка» медленно ползет по увлажненному твердому субстрату (см. I том учебника). В метаболическом отношении миксобактерии являются либо сапрофитами, переваривающими мертвые тела других бактерий с помощью комплекса внеклеточных гидролаз, либо хищниками, которые лизируют живых бактерий и питаются содержимым их клеток. При истощении питательных субстратов (сигналом об этом служит повышенный уровень (p)ppGpp; см. выше) миксобактерии начинают взаимно агрегировать с образованием спорангиев, наполненных округлыми или эллипсоидными цистами, или *микоспорами* — продуктами дифференциации палочковидных вегетативных клеток (см. раздел 17.5.2.1).

Ценой образования микоспор является смерть значительной части, иногда до 90%, вегетативных клеток из-за секреции *автоцида* (англ. *autocide*) — смеси разветвленных жирных кислот, представляющих собой побочный продукт обновления мембранных липидов. Такое альтруистическое самоубийство в сочетании с агрегацией обеспечивает остальную часть популяции концентрированными питательными субстратами, что позволяет завершить дифференциацию образованием спорангиев, плодовых тел и микоспор.

Смерть клеток субстратного мицелия у актинобактерий при формировании воздушного мицелия. Высшие актинобактерии (см. I том учебника) проявляют сходство с миксобактериями, образуя окрашенные макроколонии на поверхности твердых субстратов. В начальной фазе развития они образуют *субстратный мицелий* (англ. substrate mycelium), состоящий из (не)ветвящихся гиф с множественными нуклеоидами и редко расположенными септами.

При дефиците питательных субстратов (сигналом об этом, как обычно, служит повышенный уровень (p)ppGpp) актинобактерии прекращают расти, что сопровождается альтруистическим автолизом части гиф. Переход к образованию *воздушного мицелия* (англ. aerial mycelium) связан с чувством кворума, наступающим при накоплении феромонов (см. раздел 18.4.2). Гифы воздушного мицелия обладают повышенным тургором благодаря деполимеризации резервных полиглюкозидов, а также имеют липофильную поверхность, что связано с образованием специализированных *белков, ассоциированных со спорами* (англ. spore-associated protein, SAP). Это позволяет гифе расти вверх, преодолевая поверхностное натяжение водной пленки (см. раздел 17.3.2).

Росту воздушного мицелия в экстремальной среде предшествуют гидролиз биомассы мертвых гиф и поглощение образующихся субстратов сохранившейся частью гиф (как и в случае миксобактерий, такое поведение эквивалентно каннибализму). Поскольку гифы воздушного мицелия не могут поглощать из воздуха питательные субстраты, они прекращают рост и переходят к дифференциации. Цитологической основой этого процесса является апикальное септирование. Нуклеоиды поодиночке изолируются в коротких отрезках воздушных гиф, которые дифференцируются в пигментированные цисты, или так называемые *споры* (см. ниже). После автолиза нефрагментированных участков воздушных гиф споры освобождаются, а затем пассивно или активно, за счет плавания, распространяются в окружающей среде.

Смерть клетки-спорангия при дифференциации эндоспоры. Спорогенез *B. subtilis* обеспечивается ~60 генами, которые неупорядоченно распределены по хромосоме. Чаще всего триггером служит снижение концентрации питательных субстратов при переходе к стационарной фазе роста.

Процесс спорообразования подразделяется на обратимую фазу (стадии 0–II) и необратимую фазу (стадии III–VII), причем «точка возврата», при условии снабжения материнской клетки питательными субстратами, предшествует асимметричному делению. Ключевым моментом в спорообразовании служит переход регуляторного белка Spo0A в фосфорилированную форму, которая активирует транскрипцию генов спорообразования или подавляет транскрипцию ингибиторов спорообразования AbrB и Hrg (см. раздел 17.5.2.2).

В клетке-спорангии синтезируются специфические белки, в частности ключевой альтернативный фактор транскрипции σ^K . Последующую взаимную координацию дифференциации спорангия и преспоры обеспечивает взаимодействующая система сигма-факторов (см. раздел 17.5.2.2). Установлено, что причиной смерти спорангия становятся автолизины, в частности амидаза CwlC (сокр. англ. cell wall lysis), хотя механизм, запускающий автолиз, еще не выяснен.

Смерть сегреганта, излеченного от плазмиды: смертельные/антисмертельные факторы плазмидной природы. Генетические системы такого типа содержатся в низкокопийных плазмидах; они обнаружены только у *E. coli*. Во всех случаях они состоят из двух генов, кодирующих, соответственно, стабильный *токсин* и нестабильный *антитоксин* (антидот).

Плазмидные гены, которые кодируют токсин/антитоксин, получили образное название — *модули привыкания* (англ. addiction module), поскольку клетка, как наркоман, зависит от постоянного присутствия этого необязательного генетического элемента.

Когда модуль привыкания имеет плазмидную локализацию, сегреганты, по той или иной причине не получившие плазмид(ы), погибают (англ. postsegregational killing effect). Летальный эффект объясняется тем, что противоядие разрушается быстрее, чем токсин. Логика этого явления очевидна — механизм привыкания косвенно обеспечивает стабильное наследование плазмид, наряду с такими механизмами прямого действия, как системы контроля репликации, системы расхождения сестринских плазмид и системы декатенации (см. разделы 16.4.1.2 и 16.4.2.2). Эгоистичное поведение плазмид гарантирует их сохранение, поскольку в отсутствие программируемого самоубийства быстрее размножающиеся «излеченные» клоны вытеснили бы клоны с плазмидами.

Модули привыкания бывают двух типов. В первом случае оба продукта экспрессии, стабильный токсин и нестабильный антитоксин, являются белками. Такие модули привыкания называются «белковыми» системами киллерных генов (англ. proteic killer gene system). Во втором случае токсин также является стабильным белком, однако антитоксин представляет собой нестабильную антисмысловую РНК из семейства *hok/sok* (сокр. англ. host-killing/suppressor of killing), которая препятствует трансляции мРНК токсина в клетках, содержащих плазмиды.

«Белковые» системы киллерных генов имеют сходную генетическую структуру, взаимно гомологичны (что говорит об их дивергентном, а не конвергентном происхождении) и имеют ряд общих свойств:

- продуктом *upstream*-гена является нестабильный антитоксин, а продуктом *downstream*-гена стабильный токсин;
- токсин и антитоксин представляют собой небольшие белки, соответственно, из 100–130 и 70–85 а.о.;
- антитоксин синтезируется в избыточном количестве и разрушается специфической протеазой;
- токсин и антитоксин непосредственно взаимодействуют друг с другом;
- модуль привыкания autoreгулируется на уровне транскрипции комплексом токсин/антитоксин или только антитоксином.

Специфика отдельных систем киллерных генов связана со свойствами токсина/антитоксина, типом разрушающей антитоксин протеазы и клеточной мишенью для токсина.

Наиболее изученной белковой системой киллерных генов является модуль привыкания *ccdAB* (сокр. англ. control of cell death). Он содержится в однокопийной конъюгативной F-плазмиде размером 95 т. п.н. (см. разделы 16.1.2.1 и 16.6.1.3). Гены *ccdA* и *ccdB* кодируют, соответственно, антитоксин CcdA (8,7 кДа) и токсин CcdB (11,7 кДа). Помимо оперона-модуля *ccdAB*, F-плаزمида содержит два вспомогательных оперона — *srnB* (сокр. англ. stabile RNA degradation) и *flm* (сокр. англ. F leading maintenance). Эти опероны представляют собой модули привыкания, где роль антидота выполняет антисмысловая РНК. Эффект убийства выражается в гибели >90% бесплазмидных сегрегантов. В отсутствие антитоксина CcdA токсин CcdB вызывает образование нитевидных клеток и индуцирует SOS-ответ, что приводит к апоптозу. Непосредственной мишенью для токсина служит каталитическая субъединица ДНК-гиразы GyrA (топоизомеразы типа-II), которая обеспечива-

ет АТФ-зависимую суперспирализацию хромосомы, делая двухцепочечный разрез ДНК, пропуская сквозь него другой участок и сращивая тупые концы (см. разделы 16.4.1.1 и 16.4.2). Результатом связывания токсина с гиразой GyrA становится летальная релаксация суперспирализованной ДНК. Антитоксин, который синтезируется в «плазмидных» клетках, предотвращает эффект токсина, образуя с ним прочный комплекс. Авторегуляция транскрипции генов *ccdAB* происходит за счет взаимодействия этого комплекса с промоторным сайтом. Деградацию антитоксина CcdA осуществляет АТФ-зависимая протеаза Lon (сокр. англ. lambda omission of N; название связано с тем, что субстратом этого фермента служит один из нескольких быстро деградирующих белков, в частности антитерминатор N фага лямбда).

Попутно отметим, что протеаза Lon принадлежит к суперсемейству AAA-АТФаз (см. раздел 16.6.1.3) и представлена во всех трех доменах глобального древа. Она разрушает широкий круг нестабильных белков, обеспечивающих, в числе прочего, организацию, воспроизведение и экспрессию генетических структур.

Аналогичный механизм собственного стабильного сохранения с помощью белковой системы киллерных генов используют низкокопийные плазмиды R1 и R100, принадлежащие к группе несовместимости IncFII (см. раздел 16.1.2.1). В плазмиде R1 модуль привыкания *kis/kid* (сокр. англ. killing suppression/killing determinant) кодирует токсин Kis (12 кДа) и антитоксин Kid (9,3 кДа). Сходным образом, в плазмиде R100 модуль привыкания *remIK* (сокр. англ. plasmid emergency maintenance inhibitor/plasmid emergency maintenance killing) кодирует токсин RemK (12 кДа) и антитоксин RemI (9,3 кДа). Для лучше изученного модуля привыкания *remIK* установлено, что мишенью токсина RemK служит ДНК-геликаза DnaB, которая превращает открытый комплекс в препраймерный, расплетая двойную спираль ДНК (см. раздел 16.4.1.1). Таким образом, токсин выступает в роли ингибитора репликации, что вызывает летальный эффект, в то время как антитоксин нейтрализует его действие. Показано, что транскрипция генов *remIK* негативно авторегулируется комплексом белков RemIK за счет блокирования промоторного сайта. Установлено также, что антитоксин RemI разрушается АТФ-зависимой протеазой Lon.

Похожий пример связан со стабильно наследуемой 4–7 копийной плазмидой RK2 (RP4). Ее модуль привыкания *ragDE* кодирует токсин RagE (12 кДа) и антитоксин RagD (9 кДа). В отличие от предыдущих примеров, мишень для токсина не установлена, а антитоксин разрушается протеазой, не относящейся к семейству Lon.

Смерть вегетативных клеток в стационарной фазе. «Белковые» системы киллерных генов могут иметь не только плазмидную, но и хромосомную локализацию; в данном случае это гены самоубийства. Мы уже говорили о том, что при аминокислотном голодании содержание сигнального медиатора (p)ppGpp возрастает в результате активации синтетазы RelA. В хромосоме *E. coli* ген *relA* входит в общий оперон с генами *mazEF* (сокр. евр. ma-ze — что такое; функция этих генов вначале была неизвестна). Другое обозначение этих генов — *chrAB* (сокр. англ. chromosome homologue of *ret*; продукты их экспрессии гомологичны продуктам экспрессии генов модуля привыкания *remIK*).

Ген *mazF* кодирует стабильный токсин (12,1 кДа), а ген *mazE* — нестабильный антитоксин (9,4 кДа), который разрушается под воздействием сериновой протеазы ClpP. Мишень для действия токсина MazF еще не установлена. Транскрипция генов *mazEF* негативно авторегулируется комплексом белков MazEF за счет блокирования промоторного сайта.

При азотном или углеродном голодании повышается уровень (p)ppGpp (см. рис. 225). Этот алармон связывается с кор-ферментом РНК-полимеразы и ингибирует экспрессию генов *mazEF*. Поскольку антитоксин MazE более лабилен, чем токсин MazF, преимущественное накопление последнего приводит к клеточной смерти. Иными словами, *mazF* — это регулируемый модуль привыкания.

Смерть хозяйской клетки при репродукции бактериофага. В конце цикла репродукции бактериофага происходит лизис хозяина. Этот биохимический процесс осуществляется с помощью двух ферментов, играющих роль токсинов, причем оба они кодируются геномом фага. Это *холин* (англ. holine; от hole — отверстие; *не путать с холином-амином*), который образует бреши в СМ, и *эндолизин* (англ. endolysin), который получает доступ к муреиновому саккулусу и вызывает его локальный гидролиз. Преждевременное действие этих ферментов, которое могло бы разрушить клетку до окончательного формирования фаговых частиц, предотвращается белками-антидотами. Как и другие антидоты, они лабильны, и к моменту завершения репродукции фага их концентрация опускается ниже критического уровня.

В то время как сборка и выход зрелых фаговых частиц обычно связаны со смертью хозяина, при лизогении (см. разделы 16.6.1.2 и 16.6.1.3) клетка остается интактной. Одним из немногих генов профага лямбда, активных в лизогенном состоянии, является ген *texB* (сокр. англ. *rII exclusion*; *tex-оперон обеспечивает иммунитет к вторичному заражению фагом T4rII*). Продукт экспрессии гена *texB* ингибирует расщепление двух ключевых субстратов протеазы ClpP — нестабильного белка λ O, участвующего в репликации фаговой ДНК, и клеточного антитоксина MazE. Таким образом, эгонистичное поведение фага спасает хозяйскую клетку от смерти.

17.3. КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ

Общим термином «рост» в микробиологии обозначают два разных процесса — *рост культур* (англ. culture growth; см. главу 21), отражающий увеличение биомассы клеточной популяции, и *клеточный рост* (англ. cell growth), который происходит на уровне отдельной клетки. В обоих случаях наряду с термином «рост» используется более емкий термин «развитие», под которым имеется в виду совокупность процессов роста и размножения.

Понятие «клеточный рост», в свою очередь, имеет неоднозначное объяснение. Обычно делается упор на увеличение биомассы, вопреки тому, что данный параметр не всегда отражает клеточный рост.

Истинный смысл клеточного роста следует искать в репликативной природе этого феномена, когда новые структуры образуются в дополнение к уже имеющимся структурам или за счет увеличения размера этих структур. Причем речь идет не о любых, а только о незаменимых структурах, необходимых для поддержания жизнеспособности клетки.

Таким образом, клеточный рост можно определить как *подготовку к размножению путем увеличения числа и/или объема незаменимых клеточных структур*. Понятно, что одним из последствий роста будет увеличение биомассы.

Из понятия «клеточный рост» исключаются ситуации, когда при отсутствии поступления извне одного из биогенных элементов, например связанного азота, бак-

терии перестают размножаться, однако в избытке накапливают запасные полимеры (в данном случае полиглюкозиды).

Не относится к росту и такая ситуация, когда клетка утяжеляется путем образования наружных покровов, например чехла или капсулы, а также приобретает дополнительный вес за счет биоминерализации (см. I том учебника).

Кроме того, клеточный рост следует отличать от *обновления* (англ. turnover), под которым подразумевается замена старой структуры на новую, а также от *репарации* (англ. repair), когда в старой структуре избирательно устраняется нанесенное ей повреждение.

Как правило, клеточный рост предшествует делению, перед которым биомасса удваивается. Исключением служит размножение путем дробления, когда клетки делятся в отсутствие роста (см. раздел 17.4).

Различают два типа клеточного роста — сбалансированный и несбалансированный.

При *сбалансированном клеточном росте* (англ. balanced cell growth) клеточные структуры реплицируются в одинаковом темпе. За определенное время содержание хромосомной ДНК, мембранных липидов и белков, рибосом, молекулярных шаперонов и растворимых ферментов, а также масса ригидного слоя клеточной стенки увеличиваются в одинаковое число раз. Поэтому при сбалансированном росте состав клетки остается постоянным.

При *несбалансированном клеточном росте* (англ. unbalanced cell growth) разные субклеточные структуры реплицируются с неодинаковой скоростью, в результате чего между ними возникает количественная диспропорция. Например, в клетке может односторонне измениться содержание рибосом или интрацитоплазматических мембран. Несбалансированный рост обычно вызывается общим стрессом, наступающим при неравномерном истощении питательных субстратов (см. главу 19). Он также может быть результатом попадания микроорганизма в новые трофические условия (англ. nutritional shift), в частности при резкой смене природной ниши, а также при переносе на другую питательную среду.

Скорость клеточного роста. Для асинхронной популяции скорость клеточного роста (англ. growth rate) определяется по усредненному изменению линейных размеров или усредненному изменению содержания незаменимых компонентов — ДНК и РНК за единицу времени. Чем выше скорость роста, тем меньше время генерации, которое измеряется отрезком времени от деления до деления, или числом делений за единицу времени.

Между временем генерации R (сокр. англ. reproduction — размножение), которое измеряется числом удвоений $\cdot t^{-1}$, и средним объемом клетки V_R существует соотношение:

$$V_R = V_U \times 2^R,$$

где V_U (англ. unit volume — «единица объема») — константа, равная среднему объему клетки при $R = 0$.

Легко вычислить, что при малом времени генерации (~ 20 мин) средний объем клетки в восемь раз больше, чем при большом времени генерации (> 100 мин).

В свою очередь, между временем генерации и средней длиной клетки L_R существует соотношение:

$$L_R = L_U \times 2^{(R/3)},$$

где L_U (англ. unit length — «единица длины») — константа, равная средней длине клетки при $R = 0$.

Таким образом, длина клетки меньше зависит от скорости роста, чем ее объем.

Клеточный рост и размер клетки. Хотя общим показателем клеточного роста является удвоение массы, более удобным для анализа количественным параметром

ром служат линейные размеры. Ясно, что размер клетки не случаен и — в пределах нормы реакции генотипа — отражает гомеостаз на разных фазах онтогенеза при конкретных условиях окружающей среды.

Каким же образом прокариотная клетка контролирует свой размер, и как он связан с клеточным циклом?

Предварительный ответ на этот вопрос был получен еще в конце 1950-х гг. представителями Копенгагенской микробиологической школы Маалоюе (O. Maaløe), Кьельдгардом (N. O. Kjeldgaard) и Шехтером (M. Schaechter). Из результатов их опытов вытекало, что решающее влияние на размер клетки оказывает ее трофический статус, т. е. доступность питательных субстратов. Проще сказать, на богатой среде клетки имеют больший размер и растут быстрее, чем на бедной.

В частности, клетки *B. subtilis*, сохраняющие относительно постоянный диаметр, на богатой среде вырастают примерно в два раза длиннее, чем в условиях ограниченного питания. На богатой среде размер клеток *E. coli* и *S. enterica* серовар Турхимурium изменяется в сторону увеличения обоих линейных параметров — длины и диаметра. При менее благоприятных условиях питания размер клетки стабилизируется (в случае *B. subtilis* это происходит, когда время генерации превышает 60 мин).

Логика этого явления очевидна. Быстро растущие клетки должны разместить в своем цитоплазматическом компартменте больше рибосом. Подсчитано, что массовая доля рибосом в быстро растущих клетках (время генерации ~20 мин) в три раза больше, чем в медленно растущих клетках (время генерации >100 мин). При этом число бездействующих рибосом и незаряженных тРНК сводится к минимуму, т. е. рибосомы все время работают с полной нагрузкой, что позволяет с максимальной скоростью утилизировать имеющиеся в распоряжении аминокислоты.

Быстро растущие клетки также содержат больше ДНК, чем клетки, растущие с меньшей скоростью. При росте на богатой среде на хромосоме образуется несколько репликационных вилок (см. разделы 16.4.1.1 и 17.1.1), т. е. клетки, по существу, являются полиплоидными. Иными словами, размер растущей бактерии пропорционален содержанию в ней ДНК.

В то же время быстро растущие бактерии имеют и более короткое время генерации, т. е. чаще делятся. Но при этом они сохраняют большой размер. Такое возможно, если информация о скорости роста сообщается органелле цитокинеза, или *дивисоме* (см. раздел 17.4.3).

Основу дивисомы составляет сократимое кольцо, образованное белком FtsZ. Поэтому вполне естественно, что сборка протофиламентов FtsZ служит мишенью для белковых блокаторов цитокинеза.

В частности, при SOS-ответе синтезируется белок SulA; он связывается с белком FtsZ и блокирует образование Z-кольца, пока повреждение ДНК не будет исправлено (см. разделы 17.4.1 и 19.1). В свою очередь, белок MinC блокирует «незаконную» сборку Z-колец на полюсах клетки (см. раздел 17.4.1).

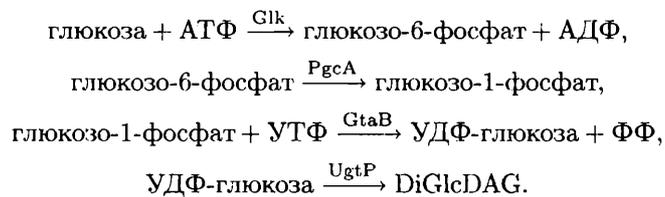
Как оказалось, блокирование сборки Z-кольца позволяет решать и такую сложную задачу, как координация размера клетки со скоростью роста.

В 2007 г. группа американских микробиологов под руководством Петры Левин (P. A. Levin) выяснила природу регуляторной связи между трофическим статусом клетки (который, как мы уже знаем, влияет на скорость клеточного роста и размер клетки) и образованием Z-кольца, т. е. частотой делений. Оказалось, что в случае *B. subtilis* роль посредника играет один из ферментов, участвующих в ассимиляции

глюкозы — при высоком уровне этого субстрата он становится блокатором сборки Z-кольца.

Значительная часть экзогенной глюкозы используется при биосинтезе липотейхоевой кислоты, одного из важнейших компонентов клеточной оболочки грамположительных бактерий (см. I том учебника). Точнее сказать, глюкоза включается в состав глюколипидного «якоря» *липотейхоевой кислоты* — диглюкозил-диацилглицерола (англ. diglucosyldiacyl glycerol, DiGlcDAG). Катализатором этой реакции служит УДФ-глюкозилтрансфераза UgtP (сокр. англ. uridine diphosphate-glucose transferase).

Вначале с помощью глюкокиназы Glk (сокр. англ. glucokinase) глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат. Затем под воздействием фосфоглюкомутазы PgcA (сокр. англ. phosphoglucomutase) глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат. Наконец, глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза GtaB (сокр. англ. glucose-1-phosphate-uridylyltransferase) превращает глюкозо-1-фосфат в активированную форму глюкозы — УДФ-глюкозу, которая включается в состав диглюкозил-диацилглицерола:



Хотя мутанты по генам *pgcA*, *gtaB* и *ugtP* образуют на богатой питательной среде более короткие клетки, чем дикий тип, оказалось, что для регуляции длины достаточно только белка UgtP совместно с его субстратом, УДФ-глюкозой. Иными словами, под контролем UgtP быстро растущие клетки делятся, имея большую длину, чем клетки, растущие медленно.

Установлено, что белок UgtP активируется при увеличении содержания УДФ-глюкозы на богатой питательной среде и ингибирует сборку Z-кольца, ослабляя взаимодействие между протофиламентами белка FtsZ. В результате этого деление откладывается до момента, когда клетка достигает массы, «критической» для данной скорости роста.

Поскольку трансфераза UgtP не универсальна (в частности, *E. coli* ею не обладает), предполагается, что дивисома может реагировать на другие индикаторы метаболического статуса, например на скорость биогенеза рибосом.

17.3.1. Рост палочковидных и сферических клеток

Клеточный цикл бактерий сопровождается морфогенезом — морфологическими превращениями, неразрывно связанными с процессами роста. Они наиболее выражены в условиях стресса; например, при переходе от экспоненциальной фазы (рост с постоянной скоростью) к стационарной фазе (отсутствие роста) палочковидные клетки часто приобретают сферическую форму. Более сложные морфогенетические процессы происходят на протяжении мультиморфного клеточного цикла (см. раздел 17.1), особенно когда образуются покоящиеся резистентные клетки (см. раздел 17.5.2).

Как известно, форма бактерий задается в первую очередь экзоскелетом, роль которого играет муреиновый саккулус (см. I том учебника).

Блоки-мономеры муреина (дисахарид-пентапептиды) синтезируются в цитоплазме с помощью продуктов генов *mit*, связываются с липофильным переносчиком (ундекапренилфосфатом), образуя липид II, который с помощью транслоказы RodA переносится на наружную поверхность СМ. Там они полимеризуются в линейные цепи, которые, в свою очередь, соединяются друг с другом олигопептидными мостиками. Обе реакции, гликозилтрансферазную и транспептидазную, одновременно катализируют пенициллинсвязывающие белки (англ. penicillin binding protein, РВР).

Саккулус грамположительных бактерий состоит из многих слоев и обновляется путем перемещения новых цепей муреина к поверхности клетки. Однослойный саккулус грамотрицательных бактерий растет в результате замещения одной цепи в акцепторном триplete тремя цепями донорного триплета, так что за каждую генерацию муреин обновляется примерно на 50% (см. I том учебника).

Если форма клетки определяется формой муреинового саккулуса, то за его собственную форму и рост отвечает семейство пенициллинсвязывающих белков.

Высокомолекулярные РВР класса А (РВР1abc) и класса В (РВР2ab, РВР3 и РВРН) обладают гликозилтрансферазной и/или транспептидазной активностью. Они катализируют образование новых пептидогликановых цепей, а также их интеграцию в саккулус.

Низкомолекулярные пенициллинсвязывающие белки РВР4–7, AmpC, AmpH и DacD обладают DD-карбоксипептидазной активностью (удаляют терминальный остаток D-аланина) или эндопептидазной активностью (разрезают пептидные мостики).

РВР, относящиеся к классу А, представляют собой бифункциональные гликозилтрансферазы/транспептидазы, участвующие в синтезе и латерального, и септального муреина. Они играют роль общего регулятора морфогенеза (у дефектных по ним мутантов нарушается координация между удлинением клетки и септированием).

РВР из класса В выполняют две взаимно дополняющие функции. Так, РВР2a и РВРН отвечают за латеральный рост и, соответственно, за удлинение клетки (дефектные по ним *rod*-мутанты имеют сферическую форму). В свою очередь, РВР2b и РВР3 образуют септовый муреин (дефектные по ним *fts*-мутанты принимают нитевидную форму).

В отличие от высокомолекулярных РВР1–3, низкомолекулярные РВР (англ. low molecular weight, LMW), прежде всего DD-карбоксипептидаза РВР5, муреина не синтезируют, а только модифицируют его структуру, что оказывает вторичное влияние на морфогенетические процессы.

Помимо саккулуса, за рост и форму клетки отвечают тейхоевые кислоты — ковалентно связанная с муреином стеночная тейхоевая кислота (англ. wall teichoic acid, WTA) и интегрированная в СМ липотейхоевая кислота (англ. lipoteichoic acid, LTA) (см. I том учебника). В случае *B. subtilis* биосинтез и экспорт WTA обеспечивают продукты генов *tagABCDEFGHI* и гена *mnaA*.

Рост палочковидных бактерий. При росте палочковидной клетки, характерным примером которой служит *B. subtilis*, она сначала удлиняется, не изменяя своего диаметра. По достижении двойной длины на клеточном экваторе формируется септа, в результате расслоения которой появляются две одинаковые дочерние клетки; длина каждой из них равна длине материнской клетки перед началом роста (см. рис. 228).

Рост и морфогенез палочковидных клеток описываются моделью, которая была разработана в 1990-е гг. и известна как «модель двух конкурирующих сайтов» (англ.

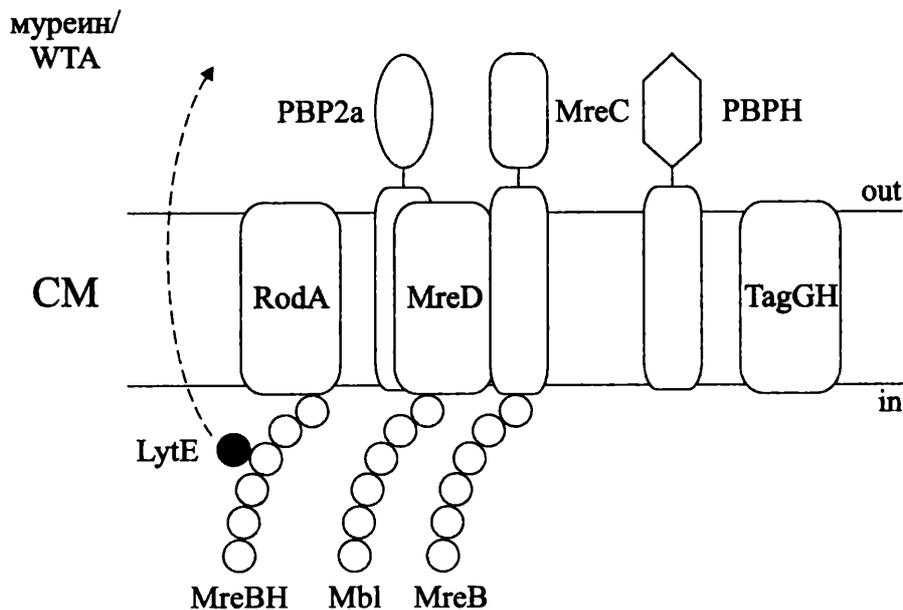


Рис. 226. Комплекс латерального роста *B. subtilis*.
Объяснение в тексте.

two-competing-sites model). Согласно ей, клетка динамически сохраняет палочковидную форму, поочередно используя два способа образования муреина — латеральный биосинтез и септа-специфичный биосинтез. Соответственно, для канонического примера *B. subtilis* известны два типа мутантов — нитчатый (*fts*; сокр. англ. filamentous thermo-sensitive) и округлый (*rod*; сокр. англ. round).

При росте палочковидной клетки в длину муреиновый саккулус надстраивается в цилиндрической части клетки за счет диффузной интеркаляции новых гликановых цепей и образования между ними новых поперечных швов. Затем продольный рост прекращается, и клетка переключается на локальный синтез септового муреина.

Наряду с белками PBP2a и PBPH за синтез латерального муреина отвечают спиралевидные филаменты цитоскелетных белков-гомологов актина — MreB, MreBH и Mbl (рис. 226). Считается, что они играют роль перманентного или временно разбираемого каркаса для сборки компонентов мультиферментного биосинтетического комплекса, в первую очередь состоящего из белка PBP2a. Латеральное встраивание муреина осуществляется по спиральной траектории, повторяющей расположение филаментов белков MreB, MreBH и Mbl.

Дополнительное участие в регуляции роста палочковидных клеток в длину и поддержании их формы принимают транслоказа липида II — белок RodA (сокр. англ. round; *соответствующие мутанты имеют сферическую форму*). Еще одними участниками «комплекса латерального роста» являются мембранные белки MreC и MreD. Они служат структурными посредниками между спиральными филаментами белков MreB/Mbl и комплексом муреин/WTA (напомним, что за биосинтез и экспорт WTA отвечают продукты генов tag, в частности белки TagGH).

Наконец, филаменты белка MreBH ориентируют секрецию автолизина LytE. Воз-

действие этой гидролазы на ковалентные связи в муреине позволяет саккулусу увеличиваться в размере (рис. 226).

В то время как экспоненциально растущие клетки *B. subtilis* имеют относительно постоянную толщину, при изменении скорости роста изменяется и диаметр клетки — он относительно больше при быстром росте.

По-видимому, механизм, обеспечивающий рост и форму муреинового саккулуса, воспринимает информацию о скорости роста. Как это происходит, точно неизвестно; по некоторым данным, в регуляции диаметра клетки участвуют низкомолекулярные РВР, в частности D,D-карбоксипептидаза РВР5.

Правило сохранения постоянного диаметра распространяется не на все варианты палочковидных клеток. В частности, рост клетки *E. coli* в длину сопровождается увеличением ее диаметра. В данном случае, помимо фазы синтеза латерального муреина и фазы синтеза септового муреина, наблюдается отдельная фаза — *не чувствительная к пенициллину* (сокр. англ. РВР3-independent/penicillin-insensitive peptidoglycan synthesis; PIPS). В ходе нее на полюсах дочерних клеток образуется метаболически инертный муреин. Возможно, что именно он служит ограничителем диаметра.

Рост сферических бактерий. В настоящее время кокки рассматриваются как результат эволюционного изменения палочек — вопреки ранним наивным представлениям о первичности сферического морфотипа. Иными словами, они не могут расти в длину из-за отсутствия РВР2, и поэтому их рост осуществляется только «септовым» способом, с помощью РВР3.

У бактерий сферической формы зоны роста распределяются равномерно. В данном случае полюса неразличимы (хотя с равным основанием можно сказать, что поверхность таких клеток представляет собой как бы сплошной полюс).

17.3.2. Полярный рост и поляризация клетки

В отличие от латерального роста палочковидных бактерий и равномерного роста бактерий округлой формы, *полярный рост* (англ. polar growth) представляет собой образование протуберанца на поверхности клетки или удлинение одного из ее концов. В обоих случаях надстраивается локальный участок клеточной оболочки.

Следует различать полярный рост стебелька, полярный рост простеки и полярный рост гифы, или апикальный рост.

Полярный рост стебелька. Напомним, что стебелек является придатком периплазматического компартмента (см. раздел 17.1.4), и поэтому его рост не сопряжен с репликацией компонентов цитоплазматического компартмента.

Образование стебелька регулируется клеточным циклом, а его длина совместно определяется внутренними и внешними сигналами. В частности, голодание по фосфору, который чаще всего лимитирует развитие природных популяций бактерий, стимулирует рост стебелька в длину.

Биогенез стебелька находится под контролем альтернативного сигма-фактора σ^{54} , который образуется при общем стрессе (см. раздел 18.1) и отвечает за экспрессию ~30 генов *стебелькового регулона*. Рецепция и процессинг внешнего сигнала осуществляется хемосенсорной системой (см. раздел 18.4.1.1), состоящей из гистидинкиназы ShkA, гистидин-фосфотрансферазы ShpA и регулятора ответа TасA.

По мере роста стебелька *C. crescentus* прикрепительный диск дистанцируется от тела клетки. Однако так бывает далеко не всегда. В частности, *Asticcacaulis biprosthescum* образует две симметрично расположенные латеральные простеки, а прикрепительный диск находится непосредственно на теле клетки.

Полярный рост простеки. Как мы уже отмечали, простека (англ. prostheca; от греч. prostecomai — приростать к чему-либо) принципиально отличается от стебелька. Это не придаток периплазматического компартмента, а цельный вырост клетки (см. раздел 17.1.4).

В полярном росте простеки принимают участие компоненты систем, обеспечивающих латеральный рост палочковидных клеток — пенициллинсвязывающий белок РВР2а и транслоказа липида II RodA (см. раздел 17.3.1), однако каким образом модифицируется их активность, еще неизвестно. Кроме того, рост простеки происходит при участии цитоскелетного белка MreB, обеспечивающего «несферическую» форму клетки (см. I том учебника).

Ригидность простеки дополнительно обеспечивается регулярно расположенными *поперечными кольцами* (англ. crossband), которые состоят из септового муреина. Их образование контролируется белком деления FtsZ (см. раздел 17.4.2).

Апикальный рост. Отдельным примером полярного роста служит *апикальный рост* (от лат. apex — кончик), или рост верхушечной части цилиндрической клетки, характерный для мицелиальных актинобактерий. В данном случае особью является *гифа* (греч. huphe — паутина; *не путать с простекой гифомикробов*) — агрегат из сильно вытянутых цилиндрических клеток, которые удерживаются вместе нераслоенными поперечными стенками.

По характеру своего роста и развития высшие актинобактерии, в частности стрептомицеты, резко отличаются от других бактерий. В то же время они внешне напоминают мицелиальные грибы, и поэтому их долго называли «актиномицетами». В обоих случаях в результате апикального роста (англ. apical growth) и ветвления гиф образуется мицелий — субстратный при благоприятных условиях и воздушный в условиях стресса.

При истощении питательных ресурсов вегетативный мицелий был бы «прикован» к локальному участку твердого субстрата. В таких условиях, чтобы обеспечить себе дальнейшее развитие, актинобактерии образуют новый тип мицелия — воздушный. Он приподнимается над субстратом и поверхностью колонии.

Образование воздушного мицелия имеет, главным образом, репродуктивный смысл — на нем образуются цисты-споры, биологические свойства и расположение которых способствуют передислокации в новые места обитания и ниши (см. также разделы 17.1 и 17.5.2.1).

Гифы актинобактерий растут в апикальной зоне протяженностью ~20 мкм. Зона ветвления с апикальным ростом ветвей расположена на протяжении следующих 100 мкм. Еще дальше расположены старые гифы, которые не ветвятся и не растут.

Суть апикального роста актинобактерий заключается в том, что муреиновый саккулус достраивается только на конусовидном конце гифы; в остальной, трубчатой части он инертен. После того, как апикальная клетка отделяется септой, субапикальная клетка может расти только путем закладки боковой ветви.

Ведущая роль в апикальном росте приписывается гипотетическому «апикальному комплексу». Наиболее вероятными кандидатами в его состав служат ферментативные РВР-белки (см. I том учебника). С их помощью синтезируется максимально эластичный муреин, в результате чего гифа под воздействием тургорного давления

растягивается в продольном направлении. Дополнительное участие в характерном морфогенезе стрептомицетов могут принимать еще не идентифицированные цитоскелетные белки (по аналогии с белками MreB и CreS, которые детерминируют, соответственно, палочковидную и спиралевидную форму бактериальной клетки; см. I том учебника).

Первым идентифицированным компонентом апикального комплекса *S. coelicolor* стал белок DivIVA_{SC}. Он гомологичен белку DivIVA, который определяет экваториальную закладку кольца деления в клетках *B. subtilis* (в качестве фиксатора белков MinCD на полюсах; см. раздел 17.4.1), а также обеспечивает образование «аксиальной нити» при спорообразовании (в качестве аналога центриолей; см. раздел 17.5.2.2). Мутанты, дефектные по этому белку, обладают слабым апикальным ростом, а суперэкспрессия гена *divIVA_{SC}* стимулирует ветвление. В отличие от своего гомолога, белок DivIVA_{SC} не участвует в делении и сегрегации хромосом — ДНК реплицируется не в апикальной зоне, а во внутренних участках гиф, причем сестринские хромосомы доставляются в апикальные участки и боковые ветви с помощью системы ParAB (см. раздел 16.4.2.1).

Гифы воздушного мицелия, апикально растущие за пределы зоны трофического стресса, преодолевают поверхностное натяжение на границе раздела вода–воздух, а затем успешно переносят водный стресс благодаря гидрофобным свойствам своей поверхности. С этой целью у стрептомицетов, в частности у *S. coelicolor*, адаптивно синтезируются гидрофобные белки, аналогичные гидрофобинам мицелиальных грибов.

Гидрофобины (англ. hydrophobin, HFB) представляют собой небольшие, сильно гидрофобные и исключительно стабильные белки. Гидрофобины (в частности, HFBII гифомицета *Trichoderma reesei*) состоят из α -спирали и «корзинки» из четырех антипараллельных β -цепей, стабилизированных четырьмя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. Они секретируются в виде мономеров, но активно агрегируют с образованием амилоидоподобных фибрилл.

Гидрофобины — это многофункциональные природные детергенты. Они снижают поверхностное натяжение на границе раздела вода–воздух, защищают воздушные гифы и споры от обезвоживания, способствуют адгезии к гидрофобным поверхностям, стабилизируют плодовое тело и определяют вирулентность некоторых патогенных грибов.

При росте воздушных гиф *Streptomyces* spp. синтезируются три типа гидрофобин — родлины, шаплины и SapB.

Родлины RdlAB (сокр. англ. rodlin; от rod — стрезень) образуют параллельные палочковидные структуры шириной 8–10 нм на поверхности воздушных гиф и спор. Спектр их функциональных свойств еще не выяснен, однако показано, что они способствуют адгезии к гидрофобным поверхностям.

Центральная роль в образовании воздушных гиф и адгезивности принадлежит *шаплинам* A–H (англ. chaplin; от *S. coelicolor* hydrophobic aerial protein), которые взаимодействуют с родлинами на поверхности воздушных гиф. При дефекте от одного до четырех из восьми генов, кодирующих шаплины, подавляется образование воздушных гиф и спор. Шаплины обладают исключительно высокой детергентной активностью и снижают поверхностное натяжение с 72 до 26 мДж·м⁻².

Третий гидрофобин, SapB (сокр. англ. spore associated protein B) усиливает действие шаплинов.

Поляризация клетки. Феномен поляризации клетки, центральная часть которой имеет цилиндрическую форму, связан с существованием двух полусферических полюсов. Такое различие в геометрической кривизне оболочки приводит к неодно-

родности физико-химических свойств ее отдельных участков и, как следствие, к анизотропному распределению генетических, метаболических и регуляторных функций. Например, кардиолипид (см. I том учебника) сосредоточен преимущественно на полюсах, кривизна которых термодинамически более выгодна для размещения кластеров этого фосфолипида. В свою очередь, с кардиолипином ассоциированы специфические белки, в частности, интегральный мембранный белок ProP (сокращение от англ. proline), который импортирует осмопротекторы, родственные пролину.

Комплекс контрастных изменений, связанных с поляризацией, затрагивает либо только старый полюс (существовавший до деления), либо оба полюса — старый и новый (образованный после деления).

Наиболее характерным морфологическим выражением поляризации клетки служит образование жгутиков на старом полюсе, число которых может быть очень большим (у рекордсмена, археота *Pyrococcus furiosus* их ~50 в одном пучке).

При дифференциации швермеров *C. crescentus* на старом полюсе удаляются фимбрии и жгутик, а на их месте образуется стебелек (см. раздел 17.1.4).

Listeria monocytogenes передвигается в цитоплазме хозяйской клетки за счет полимеризации актиновых микрофиламентов на старом полюсе (см. I том учебника, а также раздел 20.3.5 настоящего тома).

Клетки *Bradyrhizobium japonicum* прикрепляются старым полюсом к корневому волоску бобового макросимбионта с помощью микрофибрилл, в состав которых входит лектин BJ38; на новом полюсе находится капсула и сосредоточены рецепторы бобового агглютинина (см. раздел 20.3.3). В свою очередь, жгутик *Pseudomonas aeruginosa* образуется на новом полюсе, а адгезионные фимбрии — на старом полюсе; с их помощью бактерия сначала прикрепляется к эпителиальным клеткам трахеи, а затем их прободает. Наконец, хеморецепторный комплекс *E. coli* расположен на обоих клеточных полюсах.

На молекулярном уровне поляризация клетки выражается в обогащении полюсов специфическими белками. Такой эффект может быть достигнут:

- первичным включением белка в состав полюса;
- вторичным перераспределением белка в пользу полюса;
- таргетингом «полюсного» белка в сайт деления;
- осцилляцией белка между двумя полюсами.

Первичное включение белка в состав полюса. Простейшим способом, с помощью которого белок может занять место на полюсе клетки, является первичный таргетинг. Именно так, независимо от секреции, оказывается на полюсе белок IscA, отвечающий за полимеризацию актина у *Shigella flexneri*. В свою очередь, за счет локализованной секреции на полюсе *Streptococcus pyogenes* сосредоточивается один из факторов вирулентности этой бактерии, белок PrtF.

Вторичное перераспределение белка в пользу полюса. Перераспределение белка в пользу полюса может произойти двумя способами.

В первом случае белок пассивно вытесняется в полярную область по мере латерального роста оболочки. Характерным примером служит полимеризатор актина ActA (см. I том учебника), который заякорен в муреиновом саккулусе *L. monocytogenes*.

Во втором случае белок активно транспортируется по направлению к полюсу по продольно ориентированной сети микрофиламентов многофункционального белка MreB (который, наряду с этим, способствует расхождению сестринских хромосом и определяет палочковидную форму клетки; см. разделы 16.4.2.1 и 17.3.1).

В частности, белок MreB обеспечивает таргетинг гистидинкиназ PleC и DivJ, которые детерминируют, соответственно, жгутиковый и стебельковый полюсы *C. crescentus* (см. раздел 17.1.4 и рис. 224).

Каким образом регулируется анизотропное распределение этих регуляторных белков? По одному из предположений, непосредственно после деления на новом полюсе появляется специфический маркер, или *организующий центр* (англ. organizational center). Одним из его компонентов служит белок TipN, контролирующий топографию белка MreB, а через него — полярность клетки. Белок MreB, в свою очередь, обеспечивает размещение гистидинкиназ PleC и DivJ на «правильных» полюсах.

Другим фактором полярной локализации гистидинкиназ (по крайней мере, PleC) является белок PodJ, который существует в двух формах. «Длинная» мембраносвязанная форма (PodJ_L) образуется в стебельковой клетке и фиксирует гистидинкиназу PleC на апикальном, или бывшем новом полюсе. «Короткая» форма (PodJ_S) является продуктом протеолиза «длинной» формы в ходе клеточного деления и дифференциации швермера. Таким образом, поляризация клетки непосредственно связана с процессингом белка PodJ.

Таргетинг «полюсного» белка в сайт деления. Как уже отмечалось, при росте в длину палочковидных бактерий, например *B. subtilis* и *E. coli*, новый муреин встраивается по бокам клетки, а полюсы, сформированные при предшествующем делении, остаются относительно инертными в плане роста. Однако они не инертны в морфогенетическом отношении, поскольку служат организующими центрами, где скапливаются «полюсные» белки.

Полюсные белки предварительно локализируются в области формирующейся септы. Характерным примером служат хеморецепторы Tap, Tag, Trg и Tsr (см. раздел 18.4.1), которые в быстро растущих культурах *E. coli* образуют неподвижные кластеры, расположенные на 1/4 и 3/4 длины продольной оси клетки. После двух раундов деления они окончательно оказываются на полюсе, и позднее к ним подключаются другие хемотаксисные белки.

Полюсный белок TipN (сокращение от англ. tip — кончик) вначале привлекается в сайт деления и некоторое время остается на новом полюсе, но когда клетка вновь приступает к размножению, он покидает «старейший» полюс и перемещается на экватор. В качестве белка-индикатора полюса TipN продольно ориентирует микрофиламенты белка MreB, а также определяет нормальное положение жгутика.

Осцилляция белка между двумя полюсами. В данном случае мы сталкиваемся с динамичной полярностью клетки, когда белки или белковые комплексы осциллируют, т. е. попеременно скапливаются то на одном, то на другом полюсе.

Хорошо известным примером осциллирующих белков являются компоненты Min-системы *E. coli* (белки MinCDE). Их перемещение между полюсами определяет экваториальное положение Z-кольца деления (см. раздел 17.4.1).

Осцилляция белков между клеточными полюсами обеспечивает смену направления движения у миксобактерии *Myxococcus xanthus*.

Клетки *M. xanthus* представляют собой гибкие палочки, которые в поисках пищи осуществляют групповое скольжение по влажной поверхности субстрата (см. 1 том учебника). В отсутствие стресса скольжение индивидуальной клетки прекращается каждые 7–8 мин, после чего возобновляется в прежнем или противоположном направлении. Во втором случае передний полюс становится задним, а задний полюс — передним. При наступлении голодания начинает преобладать поступательное движение к центрам агрегации. В результате этого монослойные биопленки собираются в многослойные массы, которые дифференцируются с образованием плодовых тел, наполненных микроспорами (см. раздел 17.5.2.1).

Скольжение *M. xanthus* бывает двух типов — *социальное* (англ. social gliding, S) и *индивидуально-поисковое* (англ. adventurous gliding, A). При этом используются разные локомоторные системы — механизм «тяги» и механизм «толкая» (рис. 227), которые кодируются разными группами генов. Естественно, что локомоторные системы разнонаправленного действия не могут одновременно работать на одном и том же полюсе.

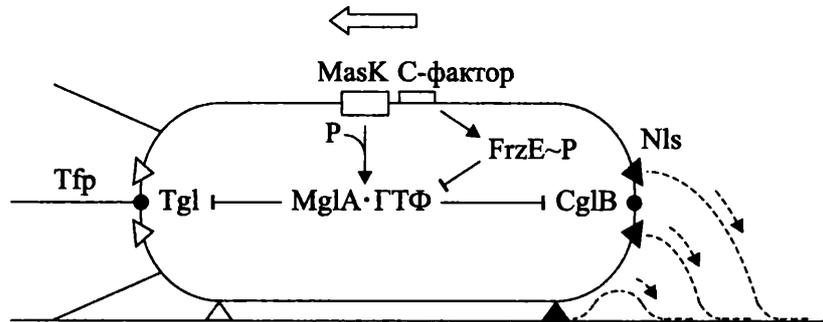


Рис. 227. Механизм смены полярности двигательных систем у *Myxococcus xanthus*.

Tfp — фимбрии IV типа; Nls — секреторные поры; Tgl и CglB — липопротейны наружной мембраны; MasK — тирозинкиназа; MglA·ГТФ — активная форма белка, блокирующего реверсию скольжения; FrzE~P — регулятор ответа хемосенсорной системы.

Пунктирные линии — слизь; пунктирные стрелки — направление секреции; черные треугольники — активная форма Nls; белые треугольники — неактивная форма Nls; контурная стрелка — направление скольжения; сплошные стрелки — активация; тупые стрелки — ингибирование.

При социальном S-скольжении (механизм «тяги») клетки движутся рывками в тесной группировке. Рывок, или твитчинг происходит в результате резкого втягивания фимбрий IV типа, которые расположены на переднем полюсе клетки (англ. type IV pili, Tfp; см. I том учебника). Взаимная координация твитчинга отдельных клеток осуществляется с помощью липополисахаридного O-антигена, а также за счет образования внеклеточного матрикса — он соединяет соседние клетки и образован фибриллами диаметром 10–30 нм, которые состоят наполовину из белка, наполовину из полисахарида. Социальное скольжение происходит только, когда в рое поддерживаются межклеточные контакты. Оно включает в себя: (1) сборку Tfp-фимбрий на одном из полюсов; (2) прикрепление Tfp-фимбрий к внеклеточному матриксу соседа и более тесный контакт клеток, обеспечиваемый на уровне O-антигена; (3) рывок за счет втягивания Tfp-фимбрий. Регулярная смена направления S-скольжения связана со сменой полюсов, на которых образуются Tfp-фимбрии.

Индивидуально-поисковое A-скольжение (механизм «толкая») наблюдается у клеток-разведчиков, которые периодически покидают рой. Оно происходит без участия Tfp-фимбрий и основано на выделении гидрофильной слизи сквозь отверстия структур, которые напоминают сопла-форсунки и сконцентрированы на обоих полюсах клетки (англ. nozzle-like structure, Nls). Каждая Nls представляет собой пору, проходящую через ригидный слой клеточной стенки и ОМ и содержащую компоненты секреторной системы I — выделительные поры TolB, TolR и TolQ (см. I том учебника). Хотя Nls постоянно присутствуют на обоих полюсах клетки, в момент движения они функционируют только на заднем полюсе, т.е. изменение направления связано со сменой полярности секреции слизи.

Изменение направления движения при использовании той или иной локомоторной системы (за счет смены полярности ее расположения) осуществляется с помощью регуляторного каскада, в котором участвуют C-фактор, хемосенсорная Frz-система и белок MglA. C-фактор служит средством внутривнутрипопуляционной коммуникации и, в качестве белкового феромона, вызывает «чувство кворума» (см. раздел 18.4.2). Он синтезируется роем при метаболическом стрессе и воздействует на клетки извне, в результате чего повышается уровень фосфорилирования белка FruA (сокр. англ. fruiting — образование плодового тела). В свою очередь, FruA~P взаимодействует с хемосенсорной Frz-системой (сокр. англ. frizzy — вертящийся; Frz-белки влияют на смену направления движения).

Хемосенсорная Frz-система регулирует частоту реверсий, происходящих при скольжении. Frz-белки гомологичны хемотаксисным белкам энтеробактерий (см. I том учебника и раздел 18.4.1.1 настоящего тома). В частности, гетеродимерный белок FrzCD является гомологом гомодимерного метилацепторного белка MCP, хотя, в отличие от последнего, он содержит только C-концевой сигнальный домен и локализуется в цитоплазме. Метилирование белка FrzCD стимулируется белком FruA~P. В свою очередь, под воздействием белка FrzCD-CH₃ автофосфорилируется белок FrzE,

который является гибридным гомологом гистидинкиназы CheA и генератора ответа CheY (отметим также, что гетеродимер FrzAB гомологичен белку CheW — «адаптору» между MCP и CheA, а белки FrzFG гомологичны, соответственно, метилтрансферазе CheR и метилэстеразе CheB, которые обеспечивают сенсорную адаптацию).

Белок MglA (сокр. англ. *Mycosoccus gliding*) выполняет роль негативного регулятора реверсий. Он превращается в активную ГТФ-связанную форму MglA·ГТФ с помощью мембранной тирозинкиназы MasK (обратная связь обеспечивается его собственной ГТФазной активностью). ГТФ-связанная форма белка MglA подавляет смену полярности А- и S-систем, вызывая демонтаж Тр-фимбрий или блокируя секрецию слизи. В первом случае мишенью MglA·ГТФ является липопротеин Tgl, а во втором случае — липопротеин SglB; оба они входят в состав ОМ. В свою очередь, негативным регулятором MglA·ГТФ служит белок FrzE~P (рис. 227).

17.4. КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ

В результате клеточного роста накапливаются конструктивные и энергетические ресурсы, а также создаются регуляторные предпосылки для клеточного деления, которое у прокариотов, в конечном счете, лежит в основе всех способов размножения.

Размножением, или *пролиферацией* (англ. proliferation; от лат. proles — потомство и fero — несу) называется самовоспроизведение особи, т. е. совокупность процессов, с помощью которых она приносит потомство. Прокариоты неспособны к половому размножению и размножаются только вегетативно: одноклеточные — делением, а нитчатые — фрагментацией трихома.

В том случае, когда особь представлена клеткой, размножение осуществляется за счет *клеточного деления* (англ. cell division), или просто *деления*. Для обозначения этого процесса также используются термины *цитокinesis* (от греч. kitos — сосуд, в данном случае — клетка, и греч. kinesis — движение; в данном случае — изменение внешнего вида) и *цитотомия* (англ. cytotomy; от греч. kitos — сосуд, в данном случае клетка, и греч. tome — разрезание).

Если особью является трихом, деление клеток выполняет «ростовую» функцию, а размножение происходит путем фрагментации. Чаще всего материнский трихом фрагментируется на дочерние трихомы, реже (особенно в неблагоприятных условиях) — на отдельные клетки, из которых посредством деления регенерируются новые трихомы. Таким образом, трихом растет за счет роста и деления интеркалярных и/или терминальных клеток, а размножается в результате случайной или запрограммированной фрагментации.

Случайная фрагментация связана с внешним (а)биотическим воздействием на интеркалярную клетку. В основном это механический эффект, например принудительный изгиб трихома. В свою очередь, запрограммированная фрагментация происходит в области *некридия*, или интеркалярной клетки, смерть которой наступила в результате апоптоза (см. ниже). При этом пустая оболочка разрывается либо в случайном месте на боковой стороне некридия, либо перфорируется по левой или правой цепочке субсептальных пор, пронизывающих муреиновый саккулус.

Общие сведения о клеточном делении у прокариотов. Завершающим этапом размножения особи-клетки служит клеточное деление — взаимное обособление сестринских цитоплазматических компартментов.

Способность к вегетативному размножению путем бинарного деления является неотъемлемым свойством прокариотов. Неслучайно в середине 1870-х гг. Фердинанд Кон отнес бактерий к группе «схизофитов», т. е. бинарно делящихся растений (см. I том учебника).

Клетки животных делятся перешнуровкой, при помощи *сократительного кольца* (англ. contractile ring). Оно состоит из актиновых микрофиламентов и физически связано с внутренней поверхностью СМ.

Клетки высших растений окружены жесткой целлюлозосодержащей стенкой и делятся с помощью *клеточной пластинки* (англ. cell lamina). Она образуется из фрагмопласта — совокупности везикул аппарата Гольджи, которые расположены на концах микротрубочек остаточного митотического веретена.

Прокариоты делятся с помощью особой органеллы — *дивисомы* (англ. divisome). Она формируется в сайте деления из *белков деления* нескольких типов (англ. division protein).

До середины 1960-х гг. допускали а priori, что бактерии, как и ядерные клетки, способны к митотическому делению. Неудивительно, что находились предубежденные исследователи, считавшие, что видят на световых микропрепаратах бактериальных клеток классические стадии митоза, в частности метафазу. И лишь с разработкой метода электронной микроскопии окончательно выяснилось, что бактериальный хроматин не подвергается обратимой конденсации, а сестринские хромосомы расходятся в отсутствие истинного митотического веретена.

По завершении цитокинеза у прокариотов обычно образуются две дочерние клетки, каждая из которых имеет один старый и один новый полюс. Для монтажа новых полюсов требуется локальная перестройка оболочки материнской клетки (СМ, муреинового саккулуса и — в случае грамотрицательных бактерий — ОМ), а также перегруппировка белковых субъединиц поверхностного S-слоя, если таковой присутствует.

Некоторые молекулярные компоненты цитокинетического аппарата у прокариотов универсальны и высоко консервативны, а некоторые (особенно те, которые используются на завершающих этапах цитокинеза) не универсальны или сильно дивергировали друг с другом.

Модельными объектами при изучении цитокинеза у прокариотов служат палочковидные бактерии *E. coli* и *B. subtilis*. Цитокинез у бактерий иной формы, а также цитокинез у архей практически не изучен. Главным методом анализа является мутационный нокаут генов, кодирующих белки деления. Эти белки можно также визуализировать *in situ* при помощи иммуноэлектронной микроскопии, либо путем конструирования гибридов с зеленым флуоресцирующим белком (англ. green fluorescent protein; GFP) или другими флуоресцирующими белками.

Достоверно известна функция только двух белков деления. Первый из них — это прикрепленный к СМ белок FtsZ; он отвечает за образование перетяжки. Второй — это пенициллинсвязывающий белок FtsI; он отвечает за биосинтез септового муреина на новых клеточных полюсах.

При цитокинезе прокариотов последовательно решаются четыре задачи:

— выбирается сайт деления, обычно на экваторе клетки, посередине между сгрегированными сестринскими хромосомами;

— в сайте деления, непосредственно под СМ, собирается кольцо деления (Z-кольцо), состоящее из белка деления FtsZ;

— к Z-кольцу присоединяются «координирующий» белок FtsA и «якорный» белок ZipA, а затем *поздние белки деления* (англ. late division protein), связанные с внешними слоями клеточной оболочки или участвующие в биосинтезе *септового муреина* (англ. septal murein);

— создается граница между дочерними клетками, и у каждой из них формируется новый полюс.

Варианты клеточного деления. Для большинства бактерий характерно *бинарное деление* (англ. binary fission), или деление материнской клетки надвое (рис. 228, А). Различают бинарно-эквивалентное деление, когда дочерние клетки

имеют равный размер и одинаковую форму, и бинарно-неэквивалентное деление, которое называется *почкованием* (англ. budding), когда дочерние клетки различаются по размеру, а иногда и по форме, причем меньшая из них называется *почкой* (англ. bud).

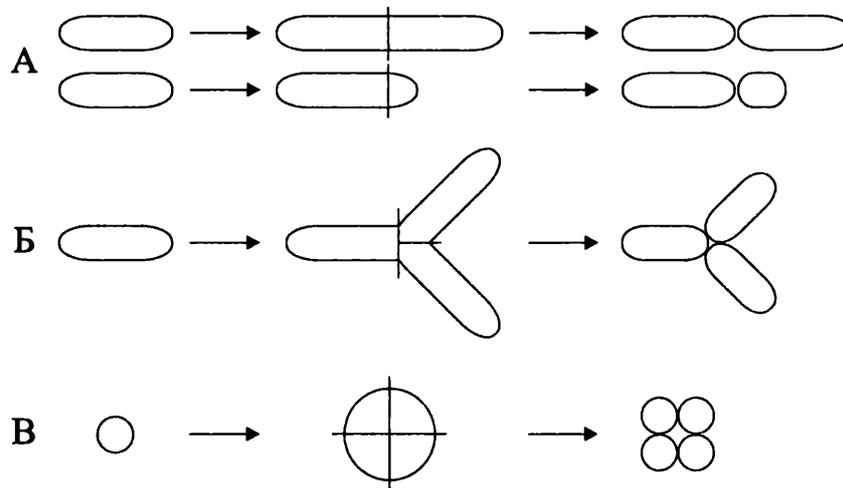


Рис. 228. Способы деления прокариотной клетки.

А — бинарное эквивалентное деление (сверху) и бинарное неэквивалентное деление, или почкование (снизу); Б — тройственное деление; В — четвертное деление.

Прочерчены оси деления.

Исключительно редко у бактерий встречается *тройственное деление* (англ. ternary fission), или одновременное деление материнской клетки на три части (рис. 228, Б). В качестве примера можно назвать квази-фототрофную бактерию *Citromicrobium bathyomarinum* (класс «Alphaproteobacteria»), а также зеленую аноксигенную фототрофную бактерию *Pelodictyon* spp. (фила ВХI Chlorobi).

Уникальное *четвертное деление* (англ. tetrary fission), или деление материнской клетки на четыре части (рис. 228, В), наблюдается у хемогетеротрофной радиоустойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* (фила ВIV «Deinococcus-Thermus»).

Разобщение клеточного деления с клеточным ростом: дробление. При бинарном, тройственном или четвертном делении бактерия, прежде чем поделиться, растет и увеличивается в размере. Только что образовавшиеся, или ювенильные дочерние клетки практически не отличаются по величине от зрелых неделящихся клеток. Иная картина наблюдается в случае дробления, которое редко встречается у бактерий, а у архей вообще не обнаружено.

При *дроблении*, или *множественном делении* (англ. multiple fission) материнская клетка образует 2^n дочерних клеток ($n = 3 - 10$), значительно уступающих в размере зрелым неделящимся клеткам. Предварительно, по аналогии с бинарным, тройственным или четвертным делением, материнская клетка растет, однако деление происходит в отсутствие роста ювенильных дочерних клеток.

Способность к дроблению служит диагностическим признаком цианобактерий пор. *Plectocapsales*. У них существуют альтернативные программы развития (рис. 229):

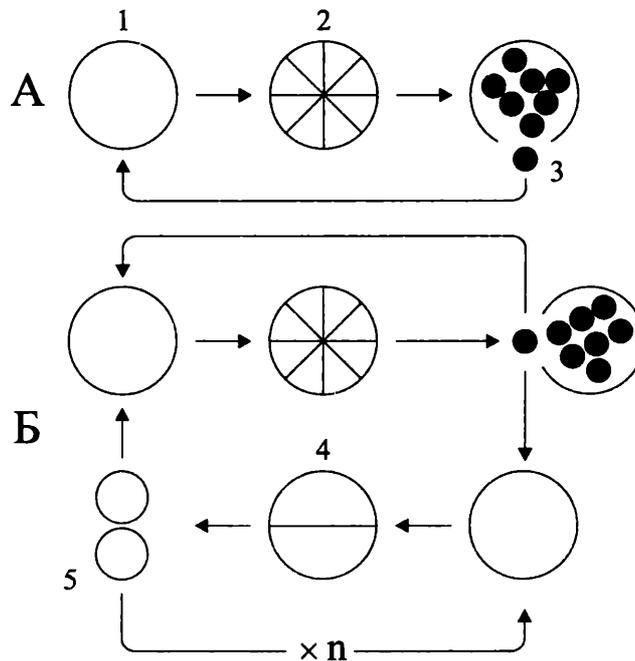


Рис. 229. Программы развития плеврокапсовых цианобактерий.

А — дробление; Б — дробление в сочетании с бинарным размножением.

1 — макроцит; 2 — дробящийся макроцит (спорангий); 3 — беоцит, покидающий спорангий; 4 — бинарно делящийся макроцит; 5 — дочерняя клетка, образовавшаяся после бинарного деления.

— зрелая клетка, или *макроцит* (англ. macrocyte; от греч. macros — большой и kitos — сосуд; в данном случае — большая клетка) проходит репликативно-ростовую фазу, превращается в материнскую клетку и делится бинарно; дочерние макроциты превращаются в материнские клетки и т. д.;

— макроцит, в отсутствие ростовой фазы, дробится на дочерние клетки, или *беоциты* (англ. baecyte; от греч. baios — маленький и kitos — сосуд; в данном случае — маленькая клетка), обладающие собственным чехлом или лишенные чехла; покинув чехол материнской клетки, или спорангий, беоциты превращаются в макроциты, размножающиеся бинарным делением либо путем дробления.

Одни плеврокапсовые цианобактерии реализуют только первую программу развития (рис. 229, А), другие используют обе программы — попеременно и в разном соотношении (рис. 229, Б).

Цитологический механизм дробления плеврокапсовых цианобактерий окончательно не выяснен. Скорее всего, происходит ряд измельчающих бинарных клеточных делений. Однако теоретически возможен и другой способ, когда образуется серия септ, одновременно разгораживающих материнскую клетку на 2^n отсеков. В обоих случаях множественная репликация хромосомы материнской клетки должна сопровождаться точной сегрегацией сестринских хромосом между дочерними клетками.

Блокирование программы роста при дроблении, очевидно, происходит на генетическом уровне, и поиски соответствующего мастер-регулятора составляют отдельную проблему.

Биологический смысл дробления окончательно не ясен. Скорее всего, образование множества мелких клеток, которые в отсутствие чехла перемещаются путем скольжения, обеспечивает эффективное расселение на локальной территории.

17.4.1. Выбор сайта деления

При бинарном эквивалентном делении Z-кольцо, создающее границу между будущими дочерними клетками, полимеризуется на экваторе материнской клетки. Возникает вопрос, каким образом прокариоты узнают, где расположен их экватор?

Установлено, что положение экватора определяется по остаточному принципу — в результате двойного негативного контроля за сборкой Z-кольца: (1) со стороны сестринских нуклеоидов и (2) со стороны регулирующей системы MinCDE. Дополнительным негативным регулятором, который органичивает сборку Z-кольца областью экватора, служит белок Zula.

Эффект расположения сестринских нуклеоидов (англ. nucleoid occlusion — «нуклеоид заслоняет»). Его смысл заключается в том, что сборка Z-кольца запрещается в тех участках под клеточной оболочкой, где концентрация ДНК достигает максимального уровня. Иначе говоря, цитокинез ингибируется там, где сестринские нуклеоиды (хромосомы) ближе всего подходят к СМ. Напротив, сборка Z-кольца разрешается в том месте, где концентрация ДНК минимальна.

В палочковидных клетках существуют три участка с минимальной концентрацией ДНК: экваториальная область между сегрегированными сестринскими хромосомами и оба клеточных полюса (рис. 230). Поэтому размещение потенциальных сайтов деления ограничивается экваториальной областью и полюсами. Реально из этих трех мест остается только экваториальная область, поскольку незаконное деление на полюсах предотвращается системой белков MinCDE (см. ниже).

Поскольку экваториальная область, где концентрация ДНК минимальна, формируется после завершения очередного раунда репликации и расхождения сестринских хромосом (см. раздел 16.4.1.1 и 16.4.2.1), за счет эффекта nucleoid occlusion детерминируется не только место, но и время запуска клеточного деления.

Система белков MinCDE. При бинарном эквивалентном делении экваториальное положение Z-кольца определяется системой белков Min (сокр. англ. minicells; Z-кольцо *min*-мутантов закладывается на полюсе, в результате чего при делении, наряду с жизнеспособной клеткой с двумя хромосомами, образуется abortивная мини-клетка, или клетка без хромосомы).

Min-система *E. coli* состоит из белков MinC, MinD и MinE. Сообща они препятствуют сборке Z-кольца на клеточных полюсах, а белок MinC служит ингибитором полимеризации белка FtsZ.

Белок MinC существует в димерной форме. Каждый из мономеров содержит по два квази-симметричных глобулярных домена, которые соединены гибким линкером; за димеризацию отвечает C-концевой участок.

N-концевой участок белка MinC содержит области гомологии со вторым белком кольца деления — FtsA, а также с белком SpoIIAA (от которого зависит субполярная закладка Z-кольца и асимметричное деление при дифференциации эндоспоры; см. раздел 17.5.2.2).

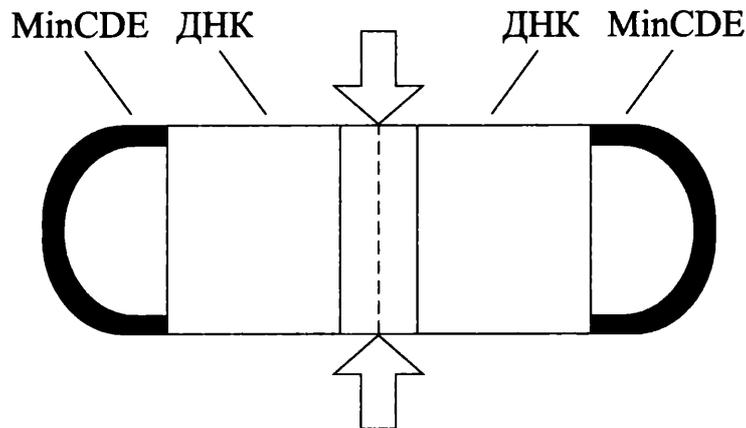


Рис. 230. Деление «на замке» — двойной негативный контроль за сборкой Z-кольца (эффект расположения сестринских нуклеотидов; действие регуляторной системы MinCDE).
Белые стрелки — экваториальная область деления.

«Якорный» белок MinD обладает АТФазной активностью и существует в двух формах — АДФ-содержащей растворимой и АТФ-содержащей мембраносвязанной. Он способствует присоединению димеров белка MinC к внутренней поверхности CM.

Белок MinE также образует димеры, за что отвечает его С-концевой участок. В свою очередь, N-концевой участок не позволяет белкам MinCD (ингибиторам сборки Z-кольца) занять экваториальное положение.

С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что белки MinCDE осциллируют, попеременно с интервалом ~ 20 с собираясь в кластеры то на одном, то на другом клеточном полюсе. Благодаря таким перемещениям концентрация ингибиторного белка MinC становится минимальной в области клеточного экватора. В итоге клетка косвенно определяет положение своей продольной оси, перпендикулярно которой и проходит плоскость деления.

Схема осцилляций белков MinCDE выглядит следующим образом (рис. 231). АДФ-содержащая форма белка MinD находится в цитоплазме. В свою очередь, АТФ-содержащая форма белка MinD фиксируется в полярном участке CM и связывает ингибиторный белок MinC. К ним присоединяется белок MinE и стимулирует АТФазную активность белка MinD. В результате этого АТФ-содержащая форма белка MinD превращается в АДФ-содержащую форму, которая теряет контакт с CM и переходит в цитоплазму. Там АДФ обменивается на АТФ. Регенерированная АТФ-содержащая форма белка MinD образует кластер на удалении от белка MinE, т. е. на противоположном клеточном полюсе, и т. д.

Показано, что кластеры АТФ-содержащей формы белка MinD полимеризуются в микрофиламенты, отходящие от полюса в той половине клетки, где на данный момент за счет осцилляций скапливается относительно меньше белка MinE.

Компоненты системы MinCDE имеются не у всех бактерий. В то время как белок MinD и его гомологи распространены очень широко, белок MinC встречается реже, а белок MinE еще более редок.

В случае *B. subtilis* и ряда других грамположительных бактерий белки MinCD не осциллируют, а постоянно заякорены на обоих полюсах с помощью белка DivIVA, что позволяет Z-кольцу собираться посередине клетки; белок MinE в данном слу-

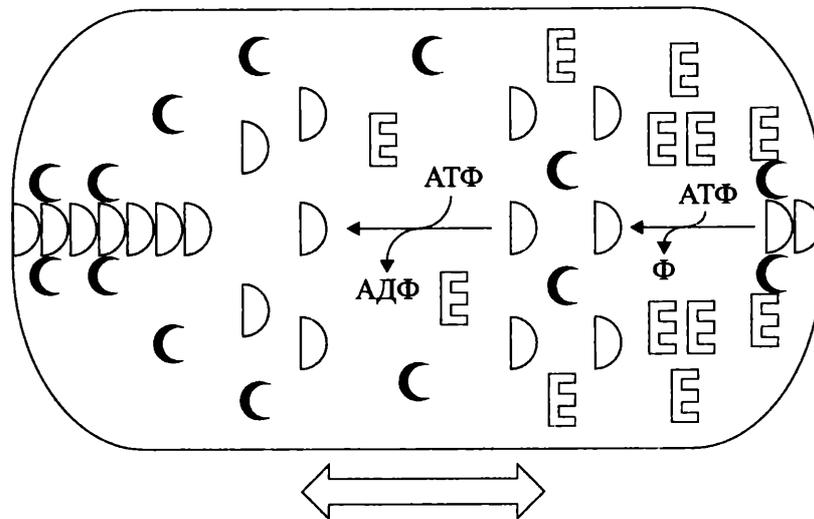


Рис. 231. Осцилляция компонентов регуляторной Min-системы *E. coli*.
Объяснение в тексте.

чае отсутствует. У ряда представителей рода *Clostridium* одновременно обнаружены белки DivIVA и MinE.

Наконец, некоторые бактерии, в частности грамположительные кокки, вообще обходятся без системы белков Min.

Белок Sula. Третьим негативным регулятором образования Z-кольца служит белок Sula (сокр. англ. supressor of lon; мутации гена *sulA* супрессируют (подавляют фенотипическое проявление) мутации гена протеазы Lon (см. раздел 17.2.2), в результате которых клетки приобретают нитевидную форму). Транскрипция гена *sulA* индуцируется в стрессовых условиях при SOS-ответе (см. раздел 19.1). Продукт экспрессии этого гена ингибирует полимеризацию Z-белка, в результате чего цитокинез откладывается до завершения репарации ДНК. Целесообразность такой стратегии очевидна.

Выбор сайта деления у клеток сферической формы. Модель цитокинеза, предложенная для *E. coli* и других палочек, не применима к сферическим бактериям, у которых число потенциальных плоскостей бинарного эквивалентного деления бесконечно велико. Разбраться в этом парадоксе предстоит в ходе будущих исследований.

17.4.2. Кольцо деления

Структурной основой цитоплазматического кольца деления, или Z-кольца служит белок FtsZ (сокр. англ. filamentous temperature-sensitive; из-за дефектов аппарата цитокинеза *fts*-мутанты не делятся при повышенной температуре, в результате чего гаплоидные палочки превращаются в нитевидные полиплоидные клетки). Под контролем этого белка находится также процесс образования органеллы деления — дивисомы.

Аминокислотная последовательность белка FtsZ на 10–18% сходна с аминокислотной последовательностью тубулина, и эти белки похожи по трехмерной струк-

туре. Подобно тубулину, белок FtsZ содержит характерный мотив GGGTGTG для связывания нуклеотидов и проявляет ГТФазную активность, а также способен к обратимой полимеризации.

Самосборка Z-кольца. Белок FtsZ *E. coli* имеет молекулярную массу ~45 кДа. Его гомологи найдены практически у всех бактерий, за исключением *Chlamydia trachomatis*, а также у большинства архей, кроме представителей филы AI *Crenarchaeota*.

Белки FtsZ-типа широко распространены у пластид, произошедших от бактерий. Напротив, у митохондрий, также имеющих бактериальное происхождение, они встречаются крайне редко (см. ниже).

В 1991 г. американский микробиолог Джо Люткенхаус (J. Lutkenhaus) установил на примере *E. coli*, что белок FtsZ образует в сайте деления микроскопическую кольцевую структуру. Позднее ее назвали *Z-кольцом* (англ. Z-ring).

Содержание белка FtsZ относительно велико, до $2 \cdot 10^4$ молекул на клетку. Если их условно выстроить цепью, она несколько раз обогнула бы клетку по экватору. Протофиламенты белка FtsZ, образующие Z-кольцо, сходны с протофиламентами тубулина по морфологии и по механизму ГТФ-зависимой самосборки. Между сетью протофиламентов, в которую входят 25% белка FtsZ, и его свободными олигомерами, состоящими из 10–15 субъединиц, происходит непрерывный обмен мономерами.

Z-кольцо образуется только по завершении репликации хромосомы, но независимо от сегрегации сестринских хромосом. Что служит сигналом к началу этого процесса, пока еще не выяснено.

Сборка Z-белка начинается в *сайте нуклеации* (англ. nucleation site) на одной из боковых сторон цитоплазматического цилиндра. Процесс полимеризации идет по кругу в двух взаимно противоположных направлениях до полного замыкания кольца, которое охватывает клетку изнутри в плоскости деления.

Механизм стягивания Z-кольца. Z-кольцо прикрепляется к СМ при помощи якорного белка ZipA (см. ниже). В ходе цитокинеза от СМ не требуется активных физических усилий, она пассивно инвагинирует в результате стягивания Z-кольца. Для описания этого процесса предложены три модели.

Согласно первой модели, микрофиламенты белка FtsZ при участии неидентифицированного «моторного» белка скользят относительно друг друга, что приводит к сужению Z-кольца. По второй модели, в «якорной» области Z-кольца происходит разборка микрофиламентов белка FtsZ, и связанная с ними СМ подтягивается к центральной оси клетки. В соответствии с третьей моделью, за счет энергии гидролиза ГТФ изменяется конформация микрофиламентов белка FtsZ — они изгибаются, и диаметр Z-кольца уменьшается. Ни одна из этих моделей еще не получила решающего подтверждения.

17.4.3. Самосборка дивисомы

Общепринятое название «дивисома» (англ. divisome) предложил голландский микробиолог Наннэ Наннинга (N. Nanninga). Наряду с этим, но гораздо реже для обозначения органеллы цитокинеза используются термины *септальсома* (англ. septalsome) или *септатор* (англ. septator).

Дивисома представляет собой мультимерную структуру, которая формируется в сайте деления на основе Z-кольца и состоит из белков деления нескольких типов.

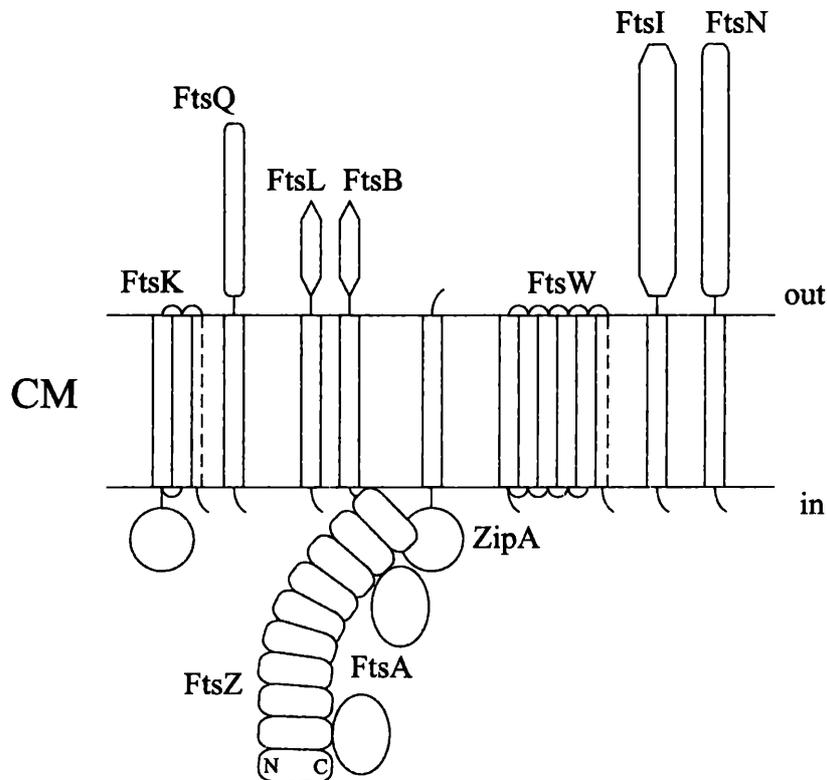


Рис. 232. Взаимодействие Z-кольца с дивисомой и доменная структура белков деления *E. coli*.

CM — цитоплазматическая мембрана; C и N — C- и N-концевые домены мономера белка FtsZ.

Большинство из них содержит гидрофобные мембранные сегменты. К субъединицам Z-кольца непосредственно присоединяются белки FtsA и ZipA. Затем для активации процесса цитокинеза к ним подключаются белки FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI и FtsN.

Белок FtsA. Наряду с белком FtsZ это второй цитоплазматический белок деления, не содержащий мембранных сегментов. Он гомологичен актину и, подобно актину, проявляет АТФазную активность, а также способен к обратимой полимеризации. Количественное соотношение белков FtsA и FtsZ в клетках *E. coli* составляет 1 : 100. Это означает, что белок FtsA не образует замкнутого кольца, а распределяется в промежутках между протофиламентами белка FtsZ. Для *B. subtilis* относительное содержание белка FtsA на порядок выше.

Белок FtsA самым первым из белков деления связывается с Z-кольцом (рис. 232). Его предполагаемая функция — поспособствовать тому, чтобы все остальные белки деления включились в состав дивисомы. На это расходуется энергия АТФ.

Якорный белок ZipA. Мы уже отмечали, что Z-кольцо прочно связано с клеточной оболочкой. Это позволяет делящейся клетке — как бы с помощью ирисовой диафрагмы — сомкнуть инвагинацию CM и взаимно обособить дочерние цитоплазматические компартменты.

В клетках *E. coli* роль якоря, фиксирующего Z-кольцо на CM, выполняет амфипатический белок ZipA (сокращение от англ. Z-ring interacting protein). Он содержит N-концевой мембранный сегмент, соединенный гибкой перемычкой с большой цитоплазматической частью, состоящей из двух доменов.

Содержание белка ZipA на один-два порядка меньше, чем белка FtsZ. В сайте деления находятся только 30% его молекул и они непрерывно обмениваются с остальными 70%, расположенными в других участках CM.

У большинства бактерий функциональные эквиваленты белка ZipA не выявлены. Хотя в клетках *B. subtilis* содержится белок EzgA с аналогичной третичной структурой и таким же характером взаимодействия с мембраной, он непосредственно не участвует в цитокинезе, а служит негативным регулятором полимеризации Z-кольца (подобно белку MinE кишечной палочки).

Поздние белки деления. Для них характерно присутствие как минимум одного мембранного сегмента в сочетании с крупным цитоплазматическим или периплазматическим сегментом (рис. 232). Функция этих белков по большей части неизвестна, за исключением белка FtsK (который участвует в сегрегации сестринских хромосом), а также белка FtsI (который участвует в биосинтезе септового муреина, образующего перегородку между дочерними клетками).

В случае *E. coli* и *B. subtilis* набор и порядок взаимодействия поздних белков деления сильно различаются. У кишечной палочки их сборка протекает в последовательности FtsK → FtsQ → FtsL/FtsB → FtsW → FtsI → FtsN. Очередной белок включается в дивисому только следом за предыдущим. В отличие от этого, у *B. subtilis* белки DivIB, FtsL, DivIC, PBP-2B и FtsW собираются одновременно.

Белок FtsK. Этот консервативный белок содержит большой цитоплазматический сегмент и N-концевой сегмент, состоящий из четырех трансмембранных спиралей. Предполагается, что при сегрегации сестринских хромосом (см. раздел 16.4.2.1) C-концевой сегмент белка FtsK движется вдоль цепи ДНК и смещает ее в сторону от смыкающейся перегородки. Отметим, что у *B. subtilis* гомологом белка FtsK является белок SpoIIIE, который обеспечивает попадание одной из двух копий хромосомной ДНК внутрь формирующейся преспоры (см. раздел 17.5.2.2).

Белки FtsQ и DivIB. Белок FtsQ (~30 кДа), имеющийся у *E. coli*, содержит единственный мембранный сегмент. Его гомологом у *B. subtilis* является белок DivIB. Возможно, оба они участвуют в биосинтезе септового муреина.

Белки FtsL/FtsB и DivIC. Небольшие белки FtsL/FtsB (~12 кДа), имеющиеся у *E. coli*, содержат по одному мембранному сегменту. Предполагается, что они регулируют клеточное деление. У *B. subtilis* найдены два функционально сходных с ними и слабо гомологичных им белка (FtsB и DivIC).

Белок FtsW. Данный компонент дивисомы содержит десять мембранных сегментов и принадлежит к белковому семейству SEDS (сокращение от англ. shape, elongation, division and sporulation). Возможно, он взаимодействует с белком FtsI и осуществляет таргетинг пенициллинсвязывающих белков, а также доставляет предшественников муреина на наружную поверхность CM (см. I том учебника).

Белки FtsI и PBP-2b. Биосинтез септового муреина, входящего в состав перегородки между дочерними клетками и участвующего в образовании новых клеточных полюсов, осуществляется с помощью пенициллинсвязывающих PBP-белков (см. I том учебника и раздел 17.3.1). У многих бактерий, в том числе *E. coli*, данную роль выполняет белок FtsI; его функциональным аналогом у *B. subtilis* служит белок PBP2b. N-концевой участок белка FtsI (50 а.о.) интегрирован в мембрану. На C-конце находится большой периплазматический сегмент из 300 а.о.; он содержит каталитический центр. Белок FtsI встраивает новые полигликановые цепи в муреиновый саккулус в соответствии с моделью «три в обмен на одну» (см. I том учебника).

Белок FtsN. Этот белок содержит N-концевой мембранный сегмент и большой периплазматический сегмент. Он не универсален и, кроме *E. coli*, обнаружен только у немногих бактерий. Поскольку белок FtsN слабо гомологичен муреин-амидазам, его функция может быть связана с локальным гидролизом септового муреина и расслоением поперечной стенки.

Белки деления у цианобактерий. Механизмы цитокинеза у прокариотов консервативны, однако встречаются исключения. Например, в геноме цианобактерий обнаружены ортологи восьми генов деления грамотрицательных и грамположительных бактерий — *ftsI*, *pbp2b*, *ftsK*, *ftsL*, *ftsQ*, *divIB*, *ftsW* и *ftsZ*, а также ортологи генов *minCDE* и *sulA*, продукты экспрессии которых регулируют сборку Z-кольца. В то же время у цианобактерий выявлены уникальные гены цитокинеза — *ftn2* (*zipN*), *ftn6* и *cikA*. Продукты их экспрессии локализуются в сайте деления, где они могут взаимодействовать с Z-кольцом и регулировать его поведение.

У некоторых штаммов цианобактерий цитокинез начинается еще до того, как сестринские хромосомы покидают сайт деления, что не согласуется с гипотезой nucleoid occlusion, предложенной для *E. coli* и других хемотрофных бактерий (см. раздел 17.4.1). Могут быть две причины такого различия.

Во-первых, цианобактерии содержат много геномных эквивалентов, и поэтому у них репликация ДНК не сопряжена с цитокинезом. Во-вторых, между периферией клетки, где собирается Z-кольцо, и центрально расположенной хромосомой находится экран из фотосинтетических ламелл (тилакоидов).

17.4.4. Финал деления

На завершающем этапе деления образуется граница между дочерними клетками. В этот процесс вовлекаются все компоненты клеточной оболочки — СМ, ригидный слой и, в случае грамотрицательных бактерий, ОМ.

Если при росте палочковидных бактерий саккулус достраивается только по латеральной поверхности, а при росте бактерий сферической формы — равномерно по всей поверхности клетки, то при цитокинезе процесс реорганизации муреина переносится в узкую экваториальную зону, соответствующую сайту деления.

Картина деления грамотрицательных бактерий отличается от картины деления грамположительных бактерий (рис. 233). В первом случае деление происходит *перетяжкой* (англ. constriction) — на цилиндрической части материнской клетки образуется кольцевая бороздка, по мере углубления которой перемычка между дочерними клетками истончается. Во втором случае деление осуществляется путем *септирования* (англ. septation) — цилиндрическая часть материнской клетки остается внешне ровной, и дочерние клетки расходятся только после того, как автолизины расслаивают септу, или поперечную перегородку.

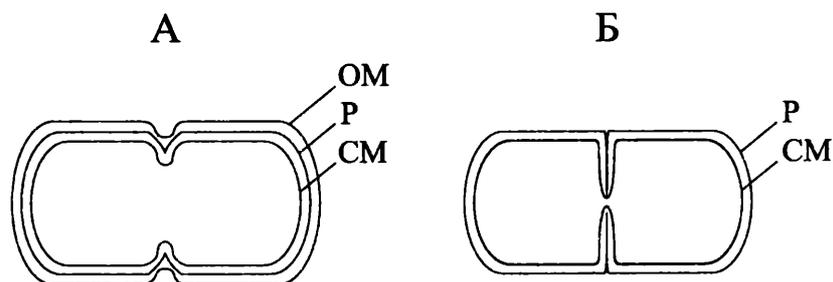


Рис. 233. Поведение клеточной оболочки при бинарном делении посредством образования перетяжки (А) и септы (Б).

ОМ — наружная мембрана; П — муреиновый саккулус; СМ — цитоплазматическая мембрана.

Как правило, клетки с относительно толстым ригидным слоем делятся перетяжкой, а если ригидный слой относительно тонкий — путем септирования. Наблюдаемое различие не обязательно носит альтернативный характер (встречаются промежуточные варианты) и связано с характером размещения муреина на новых клеточных полюсах. В обоих случаях СМ инвагинирует под воздействием белков деления, и лидирующий край кольцевой диафрагмы смыкается на длинной оси клетки.

Чтобы СМ смогла инвагинировать, ей необходимо преодолеть клеточный тургор, а также физическое сопротивление цитоплазматических структур. По-видимому, источником силы, направленной внутрь клетки, служит стягивание Z-кольца, а не вращение ригидного слоя (поскольку у микоплазм деление происходит в отсутствие клеточной стенки).

Особая ситуация наблюдается у бактерий рода *Chlamydia*, у которых альтернативой муреина служит периплазматический белковый саккулус (см. I том учебника). В данном случае Z-кольцо не образуется, т. е. механизм цитокинеза должен быть уникальным.

По завершении цитокинеза дивисома разбирается. Сценарий этого процесса еще не выяснен.

17.4.5. Деление митохондрий и пластид

Полуавтономные цитоплазматические органеллы ядерных клеток, митохондрии и «простые» пластыды, относятся к прокариотному морфотипу (см. I том учебника и раздел 20.4 настоящего тома) и эволюционно произошли от эндосимбиотических бактерий.

Предтечами митохондрий были фототрофные представители класса «*Alphaproteobacteria*», которые 1,5 млрд лет назад заняли такую специализированную нишу, как эукариотная клетка. Затем митохондриальные протисты вторично приобрели эндосимбионтов из числа представителей филы ВХ *Cyanobacteria*, которые превратились в «простые» хлоропласты (см. раздел 20.5.2.2).

Митохондрии и пластыды никогда не образуются *de novo*. Подобно своим бактериальным предкам, они размножаются бинарным делением, причем деление клетки-хозяина и деление органелл — это самостоятельные, хотя и взаимно координированные процессы.

Оболочка митохондрий и «простых» хлоропластов (произошедших непосредственно от цианобактерий) состоит из двух мембран, которые после сегрегации сестринских хромосом этих органелл участвуют в *митокинезе* (англ. *mitochondriokinesis*) и *пластокинезе* (англ. *plastidokinesis*).

Митокинез архаичных протистов, как и цитокинез бактерий, осуществляется с помощью Z-кольца. Митохондрии более прогрессивных протистов, а также митохондрии грибов, растений и животных Z-кольца не образуют, а взамен него используется кольцевая структура эукариотного типа.

Пластокинез сходен с цитокинезом прокариотной клетки, поскольку при нем используется Z-кольцо, а также белки MinDE.

Митокинез. Гомолог протеобактериального белка FtsZ сохранился только у протистов *Cyanidioschyzon merolae* и *Mallomonas splendens*. Этот белок полимеризуется в матриксе митохондрии в кольцо, расположенное под внутренней мембраной оболочки этой органеллы. Над ним, тоже в митохондриальном матриксе, собирается вспомогательное MD-кольцо (сокр. англ. *mitochondrion-dividing*). Его состав и функция неизвестны.

В остальных случаях митокинез осуществляется с помощью гомологов *динамина* (англ. dynamin-related protein, DRP). Напомним, что в ядерной клетке динамин участвует в эндоцитозе и помогает клатрин-окаймленным везикулам отшнуровываться от поверхности СМ. DRP-белки обладают ГТФазной активностью и способны полимеризоваться в спиральные микрофиламенты. В отличие от Z-кольца и MD-кольца, DRP-кольцо размещается в цитозоле клетки-хозяина. Материалом для него служат белки Dnm1 (в случае дрожжей) и Dgp1 (в случае животных). Помимо белка Dnm1, у дрожжей имеются еще два белка, которые совместно запускают митокинез (Fis1 и Mdv1). Это периферические белки, связанные с внешней мембраной оболочки митохондрии.

Пластокинез. Ключевую роль в пластокинезе выполняют гомологи белка цианобактерий FtsZ. Они являются продуктами экспрессии двух ядерных генов-паралогов — *ftsZ1* и *ftsZ2*. Эти белки синтезируются хозяйскими рибосомами, и за счет удаляемой сигнальной последовательности, или N-концевого транзитного пептида импортируются в хлоропласт. Из них в строме хлоропласта (которая является эквивалентом прокариотной цитоплазмы) при содействии белков MinDE, а также белка ARC6 (гомолога цианобактериального белка Ftn2) полимеризуется Z-кольцо. Другими участниками этого процесса являются бактериальный белок SulA и уникальный растительный белок ARTEMIS.

После образования Z-кольца в строме пластиды собирается внутреннее PD-кольцо (сокращенно англ. plastid-dividing). Данные о составе и функции PD-кольца, как и для MD-кольца, еще не получены. В последнюю очередь в цитозоле клетки-хозяина собирается внешнее PD-кольцо. Материалом для него служит DRP-белок ARC5.

Дочерние пластиды обособляются в результате совместного стягивания всех трех колец, которые затем разбираются.

17.4.6. Деление архей

У многих видов архей из филы АII *Euryarchaeota* прямыми биохимическими методами, а также косвенным путем, на основе анализа полностью расшифрованных геномов, выявлен белок FtsZ. По аминокислотной последовательности он больше сходен с FtsZ-белками, чем с тубулином.

Некоторые виды архей содержат не один ген *ftsZ*, а два гена-паралога (*ftsZ1* и *ftsZ2*). Среди бактерий такие дивергентные гены удалось обнаружить только у *Sinorhizobium meliloti*; кроме того, они имеются у пластид (см. выше). Смысл существования генов-паралогов *ftsZ* неясен; возможно, что они экспрессируются в разных условиях, или их продукты выполняют разную функцию. Из других белков, участвующих в цитокинезе архей и сходных с соответствующими бактериальными белками, выявлен только гомолог белка MinD.

Цитокинез архей из филы АII *Euryarchaeota* протекает в целом так же, как у бактерий (путем перетяжки или септированием), хотя встречаются интересные исключения.

Метаногены *Methanosaeta thermophila* и *Methanospirillum hungatei* делятся не с помощью цитоплазматического, а с помощью экзоплазматического кольца.

Внешне эти археоты выглядят как слабо спирализованные палочки, что отражено в их родовых названиях (лат. *saeta* — грива и *spira* — завиток). Однако в действительности это не одна длинная клетка, а цепочка коротких палочек, разделенных двойковогнутыми прослойками, или *спейсер*-

ными пробками (англ. spacer plug). Агрегат, состоящий из взаимно перемежающихся клеток и спейсерных пробок, одет общим чехлом, внешний диаметр которого составляет ~1 мкм, а длина ~150 мкм. Чехол, устойчивый к химическим реагентам, а также гидролитическим ферментам, образован димерами белка молекулярной массой 50 кДа, уложенными кольцами или образующими плотно сжатую спираль. Поскольку в данном случае стенка представлена эластичным S-слоем, состоящим из негликозилированных белковых протомеров молекулярной массой 100 кДа, форма клетки зависит не от нее, а от экзоскелета, т. е. от совокупности чехла и спейсерных пробок.

Материнская клетка перегораживается по экватору белковым кольцом деления (англ. division annulus), которое представляет собой спиральную ленту, образующуюся в зазоре между S-слоем и чехлом. Кольцо смыкается, как ирисовая диафрагма, в результате чего дочерние клетки принудительно обособляются друг от друга, и между ними образуется спейсер (рис. 234). Молекулярный состав кольца деления, а также способ выбора сайта его сборки еще не выяснен.

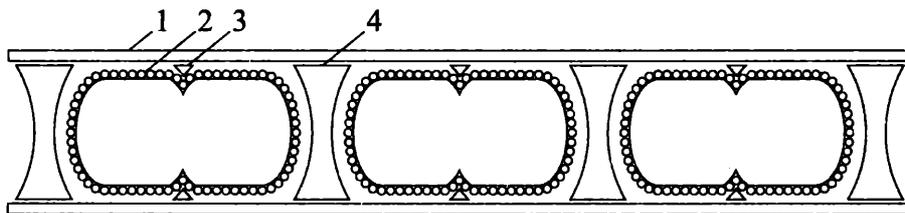


Рис. 234. Деление *Methanosaeta thermophila* и *Methanospirillum hungatei*.
1 — чехол; 2 — S-слой; 3 — формирующееся кольцо деления; 4 — спейсерная пробка.

У представителей филы AI *Crenarchaeota* гомологи белка FtsZ не обнаружены, и молекулярный механизм их цитокинеза неизвестен. Археи из рода *Sulfolobus*, обладающие эластичным ригидным слоем, делятся перетяжкой. В свою очередь, клетки *Thermoproteus* spp., имеющие более жесткий ригидный слой, делятся путем *расщепления* (англ. snapping division). Характерным признаком этого способа деления служит колебательное движение пары дочерних клеток, после чего их общая поперечная стенка резко расслаивается (отметим, что аналогичный тип деления известен у грамположительных бактерий из рода *Corynebacterium*; он приводит к образованию характерных агрегатов, в которых клетки расположены палисадами или в форме буквы V). Наконец, клетки *Pyrobaculum* spp. делятся еще не известным способом — без образования перетяжки, но и не путем септирования.

17.5. КЛЕТочная ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

В отличие от вегетативных клеток, дифференцированные клетки перестают, на время или окончательно, расти и размножаться делением. В таком непролиферативном состоянии они выполняют одну или несколько специализированных физиологических функций.

Дифференцированные клетки широко распространены у многоклеточных ядерных организмов, а также встречаются у некоторых протистов и прокариотов. Однако *дифференцировка клеток и тканей* многоклеточного организма существенно отличается от *клеточной дифференциации* (англ. cell differentiation) у одноклеточного организма.

В первом случае дифференцированные клетки входят в состав ткани или, при искусственно созданных условиях, образуют клеточную культуру. Во втором случае они, как правило, представляют собой индивидуальный организм.

Признаки дифференциации также имеются у гамет, которые формируются у размножающихся половым путем многоклеточных ядерных организмов и у некоторых протистов. Однако — в

отличие от собственно дифференцированных клеток — гаметы выполняют не физиологическую, а генетическую функцию.

У прокариотов клеточная дифференциация может принимать разнообразные, порой весьма контрастные формы. В одних случаях в дифференцированных клетках начинают экспрессироваться структуры и появляются *de novo* функции, ранее отсутствовавшие у вегетативной особи. В других случаях биогенез той или иной структуры репрессируется, что приводит к временной или окончательной потере функции.

Дифференцированные клетки прокариотов можно подразделить на две группы.

К первой группе относятся метаболически активные дифференцированные клетки. Они характеризуются высоким уровнем метаболических процессов и относительно низкой устойчивостью к экстремальным факторам внешней среды.

Во вторую группу входят покоящиеся резистентные клетки. Для них характерен пониженный уровень генеральных метаболических процессов (вплоть до анабиотического состояния), что сочетается с относительно высокой устойчивостью к экологическим стрессам (вплоть до гиперрезистентности). Отдельные представители этой группы обладают растянутым клеточным циклом, рекордная продолжительность которого может достигать сотен тысяч и даже нескольких десятков миллионов лет.

17.5.1. Метаболически активные дифференцированные клетки

Дифференцированные клетки, относящиеся к данной группе, проявляют общую или специфически ориентированную метаболическую активность (в частности, они могут обладать способностью к диазотрофии: см. II том учебника), что позволяет объекту широко распространиться в пространстве и повышает его конкурентный потенциал.

17.5.1.1. Агенты распространения — беоциты и гормогонии

У прокариотов задача по пространственному распространению, т. е. физическому (не адаптационному!) проникновению в новые ниши, а также общему расширению ареала может решаться разными способами. Это свободный перенос через воздушную или водную среду, использование (а)биотических макроносителей и собственная активная подвижность.

Эффективность распространения тем выше, чем большее количество особей принимает в нем участие, а также чем выше их инвазивные свойства и жизнеспособность. Конечный успех ожидает либо покоящиеся резистентные клетки, либо физиологически активные клетки мелкого размера, который по понятным причинам способствует пространственному распространению и инвазии.

Физиологически активные агенты пространственного распространения бывают двух типов. Это либо вегетативные клетки ультрамикробактерий (см. I том учебника), либо дифференцированные клетки бактерий «обычного» размера, например

швермеры *Rhodocyclidium vanniellii* и *Caulobacter crescentus* (их мы уже рассматривали в связи с вопросами, касающимися клеточного цикла; см. раздел 17.1.4). В настоящем разделе речь специально пойдет о двух физиологически активных агентах пространственного распространения цианобактерий — беоцитах и гормогониях.

Беоциты. О механизме образования беоцитов и их значении для пространственного распространения плеврокапсовых цианобактерий уже говорилось в разделе 17.4. Теперь остановимся на признаках их дифференциации.

Существует два типа беоцитов — подвижные и неподвижные. В первом случае они не имеют чехла, а во втором случае, как и материнские клетки, окружены чехлом. Беоциты в несколько раз меньше материнской клетки по диаметру и, соответственно, на два порядка уступают ей в объеме.

Какие стимулы способствуют переходу от обычного бинарного деления к дроблению с образованием беоцитов, неизвестно. Во всяком случае, в растущих культурах оба типа размножения наблюдаются одновременно.

По имеющимся данным, тилакоиды в беоцитах упакованы иначе, чем в вегетативных клетках; фикобилипротеины практически отсутствуют, а состав апопротеинов ФСII видоизменен.

Таким образом, признаки дифференциации беоцитов в первую очередь связаны с покровными структурами и фотосинтетическим аппаратом. Сходные изменения происходят при дифференциации акинет и гетероцист (см. ниже). Хотя адаптационные стратегии этих дифференцированных клеток различны, во всех трех случаях энергетический метаболизм разобщен с конструктивным метаболизмом.

Особенности фотосинтетического аппарата в беоцитах можно объяснить следующим образом: дробление опережает темп биосинтетических реакций, которые обеспечиваются ФСII и ее антенной — фикобилисомой. В качестве агентов пространственного распространения беоциты испытывают первоочередную потребность не в биосинтезах, а в энергии, которая в основном поступает от ФСI.

Гормогонии. В словаре альгологов *гормогонием* (греч. hormos — обрубок и gonos — рождение; в данном случае — особь, возникшая из части трихома) называется короткий и подвижный дочерний трихом, отделившийся от неподвижного и очехленного родительского трихома. Для микробиологов смысл данного термина иной: гормогоний — это короткий, (не)подвижный трихом, состоящий из клеток, которые мельче вегетативных, отличаются от них по форме и обладают признаками физиологической дифференциации. В данное определение также входит то, что в позднем гормогонии могут появляться гетероцисты, и его клетки часто содержат газовые везикулы (см. I том учебника).

Гормогоний образуется в результате серии «измельчающих» клеточных делений, что аналогично дроблению плеврокапсовых цианобактерий (см. раздел 17.4). Дифференциация сопровождается уменьшением гидрофобности клеточной поверхности и приобретением подвижности — флотационной (с помощью газовых везикул), твичинга (с помощью фимбрий) и скользящей. Клетки гормогония уступают вегетативным клеткам по числу копий генома (в среднем 3,5 против 24).

Регуляция образования гормогониев. Существует пестрый набор индукторов, вызывающих образование гормогониев у разных представителей цианобактерий из Субсекций IV и V — от специфического термолабильного агента, который синтезируется клетками в стационарной фазе, до ряда общих физико-химических факторов и трофических условий (температура, отсутствие света или облучение красным светом длиной волны ~640 нм; лимитирование азотом, железом или фосфором). Отмечается также, что эндогенным триггером образования гормогониев служит переход пластохинонного пула в окисленное состояние (см. II том учебника).

Есть данные о том, что ген *sigA* (кодирует главный сигма-фактор) начинает сильнее экспрессироваться при образовании гормогониев. Альтернативные сигма-факторы, ассоциированные с данным типом дифференциации, не обнаружены.

17.5.1.2. Фабрики diaзотрофии — diaзоциты и гетероцисты цианобактерий, бактериоды клубеньковых бактерий и везикулы актинобактерий

Способностью к diaзотрофии могут обладать как вегетативные, так и дифференцированные прокариотные клетки.

В первом случае используются собственные метаболические ресурсы diaзотрофа; ему же, главным образом, и достаются продукты ассимиляции молекулярного азота (обычно это глутамин).

Во втором случае diaзотроф вступает в мутуалистические взаимоотношения с вегетативными клетками, снабжающими его углеродными субстратами в обмен на продукты ассимиляции молекулярного азота.

Существует несколько типов таких специализированных фабрик diaзотрофии. Одни из них способны дедифференцироваться, другие дифференцируются терминально и после завершения жизненного цикла подвергаются запрограммированной смерти.

В diaзотрофной клетке содержится нитрогеназа, и создаются предпосылки для ее функционирования: (1) доступ N_2 в качестве главного субстрата для восстановления; (2) поступление низкопотенциального восстановителя, в частности ферредоксина или флаводоксина; (3) приток энергии в форме Mg-АТФ; (4) низкое парциальное давление O_2 .

Особое значение имеет поддержание режима аноксии, необходимого для обоих компонентов нитрогеназы — редуктазы динитрогеназы и динитрогеназы (см. II том учебника), поскольку этот фермент инактивируется молекулярным кислородом.

Dиазоциты. Diaзотрофные цианобактерии подразделяются на две группы — образующие гетероцисты (см. ниже) и не образующие гетероцист. Штаммы первой группы способны к diaзотрофии в аэробной среде, и при отсутствии связанного азота ~7% вегетативных клеток дифференцируются в гетероцисты. Внутри гетероцист поддерживаются условия, близкие к анаэробным. Это совершенно необходимо для функционирования нитрогеназы (в отличие от вегетативных клеток, гетероцисты не образуют эндогенный O_2 , а от накопления экзогенного кислорода они защищены особым чехлом).

Вторая группа diaзотрофных цианобактерий, в свою очередь, подразделяется на одноклеточные штаммы и нитчатые (трихомные) штаммы. Одноклеточные diaзотрофные штаммы в принципе не способны превращаться в гетероцисты, но все же обладают разнообразными механизмами защиты нитрогеназы от кислорода (см. II том учебника). Нитчатые безгетероцистные штаммы также используют ряд механизмов защиты нитрогеназы в отсутствие клеточной дифференциации. Однако в отдельных случаях — примером служат штаммы *Trichodesmium* spp. — при азотном голодании в центральной части трихома образуются 1–2 цепочки дифференцированных *диазоцитов* (англ. diazocyte). Подобно гетероцистам, диазоциты служат местом сосредоточения нитрогеназы и в аэробных условиях на свету восстанавливают молекулярный азот. Соответственно, они обладают рядом морфо-биохимических отличий от недиазотрофных вегетативных клеток — в них увеличивается количество тилако-

идов, возрастает активность цитохромоксидазы и образуется глутаминсинтетаза. В диазоцитах выявлены гены, с которыми связана дифференциация гетероцист, например гены *ntcA*, *hanA*, *hetR*, *devR* и *patB* (см. ниже). В отличие от гетероцист, диазоциты не дифференцируются терминально и могут возвращаться в вегетативное состояние. Их изучение еще только начинается; в частности, предстоит выяснить механизм, с помощью которого нитрогеназа защищается от кислорода.

Гетероцисты. При азотном голодании ($<5 \text{ mM NH}_4^+$ или NO_3^-) нитчатые цианобактерии Субсекций IV и V образуют гетероцисты (англ. heterocyst; от греч. *eteros* — другой и *kistis* — пузырь; в данном случае — особенная циста). В этих дифференцированных клетках избирательно локализуется нитрогеназа, что доказано иммуноцитохимическим методом, а также при помощи молекулярного зондирования структурных генов *nifHDK*. После достижения порогового уровня связанного азота (чаще всего, аммония или нитрата) в качестве промежуточной стадии образуются *прогетероцисты*, которые через 6–12 ч можно отличить от вегетативных клеток по желтоватому цвету и повышенной зернистости; еще через 12–20 ч они начинают превращаться в зрелые гетероцисты. До появления активности нитрогеназы зрелые гетероцисты еще способны дедифференцироваться. Затем дифференциация становится необратимой, и по завершении клеточного цикла гетероциста обречена на старение и запрограммированную смерть.

Строение и физиологические свойства гетероцисты. Источником энергии для нитрогеназной реакции служит АТФ, продукт циклического фотофосфорилирования (относительное количество РС ФС в гетероцисте выше, чем в вегетативной клетке) или окислительного фосфорилирования. Неудивительно, что по размеру ламеллярной системы гетероциста не уступает вегетативной клетке, хотя тилакоиды в ней приобретают иную конфигурацию (рис. 235). Донором электронов для нитрогеназы служит ферредоксин, восстанавливающийся в результате НАДФН:ферредоксин-оксидоредуктазной реакции. В свою очередь, НАДФН регенерируется при катаболизме импортируемых или запасных гексоз через окислительный пентозофосфатный цикл (см. ниже).

Гетероциста желтее вегетативных клеток, что связано с разрушением фикобилипротеинов, а на светооптическом уровне выглядит зернистой из-за накопления запасных включений, в первую очередь цианофициновых гранул. На электронных микропрепаратах видно, что в цитоплазме гетероцисты содержится большое количество полиглюкозидных включений (рис. 235).

Как уже отмечалось, для функционирования нитрогеназы необходимо, чтобы в цитоплазме гетероцисты поддерживалось низкое парциальное давление кислорода. Для этого в гетероцисте прекращается эндогенное образование O_2 , и она имеет дело только с тем кислородом, который проникает в нее из соседних вегетативных клеток, а также с кислородом, поступающим в нее из окружающей среды.

Чтобы прекратить эндогенное образование кислорода, под воздействием индуцибельных протеаз в той или иной степени демонтируется основной светособирающий комплекс (фикобилисома) и ФСII. В обязательном порядке деградирует кислород-выделяющий комплекс.

Чтобы уменьшить диффузию кислорода из вегетативных клеток, площадь контакта гетероцисты с соседями уменьшается за счет образования «шейки» (рис. 235). Сверх этого, чтобы ограничить поступление кислорода через микроплазмодесмы, соединяющие гетероцисту с примыкающей вегетативной клеткой, внутри шейки образуется цианофициновая пробка (англ. plug; рис. 235).

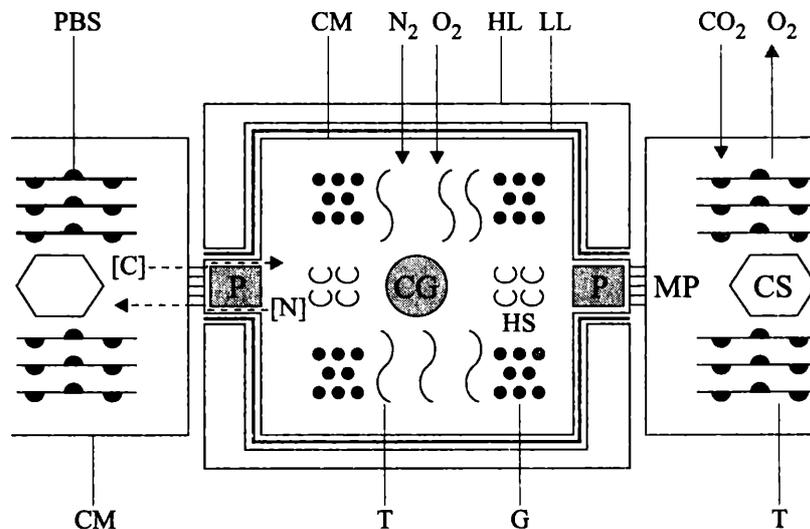


Рис. 235. Гетероциста с фланкирующими вегетативными клетками.

CM — цитоплазматическая мембрана; Т — тилакоид; PBS — фикобилисома; MP — микроплазмодесмы; HS — соевидная структура; LL — ламинарный слой; HL — гомогенный слой; P — пробка; CG — цианофициновая гранула; G — полигликозидные гранулы; CS — карбоксисома; [C] — связанный углерод (сахароза); [N] — связанный азот (глутамин).

Не изображены: нуклеонд, муреиновый саккулус, OM и фибриллярный слой оболочки гетероцисты.

В свою очередь, доступ экзогенного кислорода ограничивается за счет фильтрующих свойств ламинарного слоя чехла.

Гетероциста одета чехлом из трех слоев — внешнего (фибрилярного), промежуточного (гомогенного) и внутреннего (ламинарного). Фибриллярный и гомогенный слои состоят из гетерополисахарида, а ламинарный слой из гликолипидов; все они, особенно ламинарный слой, препятствуют поступлению наружного воздуха внутрь гетероцисты. Поскольку ван-дер-ваальсовы радиусы молекул азота и кислорода примерно одинаковы (1,5 и 1,4Å), чехол ограничивает диффузию обоих газов. При их атмосферном соотношении 4:1 концентрация азота в цитоплазме гетероцисты не лимитирует диазототрофию, а остаточный кислород удаляется за счет эндогенного дыхания.

Гликолипиды ламинарного слоя имеют уникальное строение. Это простые эфиры глюкозы с неразветвленными 26-углеродными спиртами, содержащими 1–3 гидроксигруппы и, в некоторых случаях, оксогруппу. Среди них наиболее распространен 1-(O-α-D-глюкопиранозил)-гексакозан-3,25-ди-ол (рис. 236).

Помимо вышеуказанных механизмов, которые служат для поддержания анаэробных условий в цитоплазме гетероцисты, для устранения кислорода, все-таки проникшего в гетероцисту, используется ряд дополнительных способов.

Важнейшим из них является дыхание, в ходе которого кислород при помощи цитохромоксидазы восстанавливается до воды. Особо богаты окислительными ферментами соевидные мембранные агрегаты, расположенные на полюсах гетероцисты по соседству с шейками (рис. 235). Субстратом для дыхания, видимо, служит сахароза. Она поступает в гетероцисту из вегетативных клеток (гетероциста неспособна к углеродной автотрофии, поскольку самостоятельно не образует восстановителя и не содержит ферментов цикла Кельвина—Бенсона—Бэссема; см. II том учебника). Под воздействием инвертазы сахароза превращается в глюкозу и фруктозу, которые

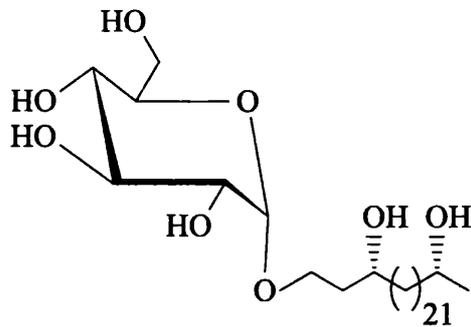


Рис. 236. Главный гликолипид, образующий ламинарный слой оболочки гетероцисты (1-(O- α -D-глюкопиранозил)-гексакозан-3,25-ди-ол).

катаболизируются в пентозофосфатном цикле, а образующийся НАДФН окисляется дыхательной цепью (см. II том учебника). Еще одним субстратом для дыхания служит молекулярный водород, побочный продукт нитрогеназной реакции. Он окисляется *uptake*-гидрогеназой (см. II том учебника), которая восстанавливает НАДФ; НАДФН, в свою очередь, передает электроны аэробной дыхательной цепи.

Чтобы предотвратить инактивацию нитрогеназы, в гетероцистах дополнительно используется кислородсвязывающий белок *цианоглобин* (англ. cyanoglobin, GlnN). По функции он аналогичен леггемоглобину в клубеньках бобовых растений, который связывает кислород и доставляет его бактероидам (см. ниже).

Наконец, нитрогеназа сама себя защищает (англ. autoprotection). Соответствующий механизм связан с инактивацией кислорода в результате его неспецифического восстановления Fe-белком (см. II том учебника). При относительном избытке кислорода происходит одноэлектронное восстановление с образованием супероксидного анион-радикала O_2^- , а при относительном избытке Fe-белка — 2-х или 4-х электронное восстановление с образованием, соответственно, H_2O_2 и H_2O .

Конечный продукт нитрогеназной реакции, аммоний, используется для синтеза глутамина из глутамата с помощью *глутаминсинтетазы* (GS), которая избирательно накапливается в гетероцисте. Глутамат, в свою очередь, поступает из вегетативных клеток, где он синтезируется с помощью *глутаматсинтазы* (GOGAT; см. II том учебника). Таким образом, трихом цианобактерий, в котором гетероцисты сосуществуют с вегетативными клетками, можно уподобить многоклеточному организму, состоящему из взаимозависимых клеток двух типов.

Дифференциация гетероцист вызвана глобальными изменениями характера экспрессии генов, что связано не только с частично расшифрованным внутриклеточным ответом на азотное голодание, но и с таинственной системой межклеточных взаимоотношений. Важнейший вопрос, на который еще не получен ответ — как иницируется дифференциация и каким образом в ходе нее регулируется транскрипция?

Регуляция образования гетероцист. Дифференциация у прокариотов обычно находится под контролем альтернативных сигма-факторов, которые определяют сродство РНК-полимеразы к промоторам стрессовых генов; самым ярким примером служит образование бактериальных эндоспор (см. раздел 17.5.2.2). Однако мутации по генам *sigB* и *sigC*, кодирующим сигма-факторы, которые экспрессируются при азотном голодании, не приводят к потере способности образовывать функционально активные гетероцисты. Из генов шести известных сигма-факторов цианобактерий (*sigA*–*sigF*) ни один специфически не связан с дифференциацией гетероцист.

Ранний ответ на азотное голодание (0–0,5 ч) заключается в том, чтобы полностью использовать экзогенный связанный азот путем активации генов, отвечающих за поглощение и ассимиляцию нитрата. В ответ на возросший уровень α -кетоглутарата активируется ген *ntcA* (сокр. англ. nitrogen consumption). Его продуктом является глобальный регулятор — ДНК-связывающий белок NtcA. Он обеспечивает экспрессию комплекса генов, отвечающих за транспорт и восстановление нитрата, ассимиляцию аммония, дифференциацию гетероцист и diaзотрофию. Белок NtcA autoreгулируется, связываясь с ДНК в upstream-положении от гена *ntcA*, а также взаимодействует с палиндромом GTA(N₈)TAC в промоторных участках генов *nrtABCD* (кодируют транспортер нитрата), *narB* (кодирует нитратредуктазу), *nirA* (кодирует нитритредуктазу), *glnA* (кодирует глутаминсинтазу), *petH* (кодирует ферредоксин:НАДФ-оксидоредуктазу) и *nifH* (кодирует Fe-белок нитрогеназы).

Помимо указанных генов, белок NtcA активирует ген *hanA*. Продукт этого гена, ДНК-связывающий белок HanA (сокр. англ. histone of *Anabaena*) является гомологом гистоноподобного HУ-белка *E. coli* (см. I том учебника). В свою очередь, белок HanA каким-то образом активирует транскрипцию центрального участника регуляторного каскада — гена *hetR*.

Через 1–2 ч после начала азотного голодания повышается транскрипция гена *hetR* (сокр. англ. heterocyst), причем это происходит в прогетероцистах, которые регулярно распределены по трихому. В контроле экспрессии этого гена участвует белок NtcA, но косвенным образом, поскольку в его промоторах нет палиндрома GTA(N₈)TAC. В отличие от предыдущих регуляторов, белок HetR не является ДНК-связывающим белком, а представляет собой «сериновую» протеазу (с остатком Ser152 в активном центре). Мишенью для протеолиза служат белки, участвующие в дифференциации гетероцист.

Через 4 ч после начала азотного голодания индуцируются гены *hetP* и *hetC*. Мутации по ним блокируют образование гетероцист. Функция продукта гена *hetP* непонятна, и он не имеет гомологов среди известных белков. Функция продукта гена *hetC* также не выяснена, хотя установлено, что он гомологичен АВС-пермеазам (см. II том учебника).

Через 6 ч после начала азотного голодания, в строгой зависимости от экспрессии генов *ntcA* и *hetR*, начинает экспрессироваться ген *devH* (сокр. англ. development). Белок DevH гомологичен белку NtcA и, как и тот, принадлежит к числу ДНК-связывающих белков.

Как видно, многие актеры при дифференциации гетероцист известны, однако сценарий этого процесса ждет реконструкции.

Замечено, что некоторые гены, участвующие в образовании гетероцист, в том числе ген *hetR*, кодируют белки, гомологичные белкам двухкомпонентных сигнальных систем (см. раздел 18.2). Для сравнения, у энтеробактерий азотный метаболизм регулируется двухкомпонентной сигнальной системой NtrB/NtrC (см. раздел 18.3.2.3). В качестве стимула, сообщающего об азотном статусе клетки, используется продукт гена *glnB* — белок P_{II}, который, в частности, контролирует экспрессию гена глутаминсинтазы *glnA*. Гомологи белка P_{II} обнаружены у цианобактерий и, возможно, каким-то образом участвуют в образовании гетероцист.

Регуляция паттерна распределения гетероцист. Помимо регуляции образования гетероцист регулируется *паттерн* их распределения (англ. pattern — рисунок), т. е. положение гетероцисты по отношению к соседним вегетативным клеткам и другим гетероцистам. Согласно имеющимся данным, за паттерн распределения гетероцист отвечают гены *patA*, *patB* и *patC* (сокр. англ. pattern). Их экспрессия начинается, соответственно, через 3–6, 3–6 и 12 ч после начала азотного голодания. Предполагается, что белки PatA и PatB по отдельности входят в двухкомпонентные сигнальные системы, которые в ответ на изменение уровня внутриклеточных хемозффекторов регулируют транскрипцию генов, специфичных для гетероцисты. В свою очередь, продуктом гена *patC* является пептид, с помощью которого прогетероцисты, по-видимому, ингибируют дифференциацию соседних клеток.

Относительное количество гетероцист многократно возрастает у симбиотических цианобактерий, в частности у *Nostoc* sp. (см. раздел 20.3.3), и может достичь 30–80%. Налицо адаптивная коррекция регуляторных механизмов образования и паттерна распределения гетероцист, но каким образом это происходит, еще неизвестно.

Бактероиды. Бактероиды представляют собой дифференцированные клетки diaзотрофных клубеноковых бактерий, в первую очередь, из рода *Rhizobium* — факультативных эндоситобионтов бобовых растений. Дифференциация носит в основном терминальный характер (судя по способности образовывать колонии, жизнеспособность зрелых бактериоидов не превышает 0,3%). Как правило, вегетативные ри-

зобии инфицируют растительную ткань при помощи специального средства доставки — *инфекционной нити* (см. раздел 20.3.3). Она представляет собой наполненную ризобиями трубчатую инвагинацию СМ и клеточной стенки хозяина. Инфекционная нить распространяется по разросшейся под влиянием бактериальной инфекции ткани корневого кортекса, пронизывая ее клетки. Выход ризобиев из инфекционной нити в кортекс осуществляется на ее боковых сторонах в участках, не покрытых клеточной стенкой. Отделившиеся от инфекционной нити ризобии внедряются в полиплоидные клетки клубенька с помощью механизма, напоминающего эндоцитоз, что весьма необычно для растительной клетки, которая в норме не допускает прямого контакта между внешними объектами и своей СМ.

В ходе эндоцитоза ризобияльная клетка окружается *перибактероидной мембраной* и оказывается внутри *перибактероидной вакуоли*. На ранней стадии симбиоза вегетативные ризобии быстро размножаются на периферии хозяйской клетки; вместе с ними увеличивается в размере и перибактероидная вакуоль. После ее фрагментации образуются мелкие вакуоли с 1–2 бактериальными клетками, равномерно распределяющиеся в цитоплазме. В результате этого на долю бактериоидов приходится 25–50% массы клубенька.

На более поздней стадии симбиоза вегетативные ризобии дифференцируются в *бактероиды* (англ. bacteroid). Диаметр бактериоидов достигает 20 мкм, соответственно, по объему они в несколько раз больше вегетативной клетки; они часто имеют специфическую Х- или Y-образную форму. Хотя при дифференциации бактериоидов скорость синтеза белка возрастает, в зрелых бактериоидах содержание ДНК увеличивается, а количество рибосом, наоборот, уменьшается. Бактероиды окружены истонченной осмочувствительной стенкой, у них изменяется конфигурация нуклеоида, а в цитоплазме накапливаются запасные включения — гликогеновые, полифосфатные и полигидроксиалканоатные гранулы (см. I том учебника). Наконец, у бактериоидов изменяется состав терминального участка дыхательной цепи, что повышает ее сродство к кислороду: взамен цитохромоксидазы aa_3 появляются альтернативные автоксидабельные цитохромы с-типа (с 552 и с 554, а также цитохромы Р-420, Р-428 и Р-450). Необходимость этого вызвана тем, что для интерьера клубенька характерно крайне низкое парциальное давление кислорода (~10 нМ). В зрелых бактериоидах синтезируется нитрогеназа, содержание которой составляет 10–12% суммарного растворимого белка.

Бактероиды и перибактероидные вакуоли образуют специализированную органеллу diaзотрофии — *симбиосому* (англ. symbiosome). Поскольку в полости, ограниченной перибактероидной мембраной, содержится ряд ферментов, в частности α -маннозидаза II и протеазы, симбиосому можно рассматривать в качестве гидролитического компартмента, интерьер которого нейтрализуется аммонием — продуктом секреции бактериоидов.

Перибактероидная мембрана служит границей, отделяющей бактериоиды от хозяйской клетки. Через нее осуществляется встречный импорт — хозяин получает аммоний и гем, служащий протетической группой леггемоглобина, а бактериоид взамен получает углеродный субстрат и молекулярный кислород, необходимые для регенерации восстановителя и АТФ.

Бактероиды обладают системой импорта дикарбоновых кислот. При diaзотрофии либо непосредственно используются эти продукты растительного фотосинтеза, либо мобилизуются запасные полигидроксиалканоаты самой бактерии.

С учетом чувствительности нитрогеназы к кислороду, его доставка к дыхатель-

ной цепи осуществляется по принципу «низкая концентрация–активный приток». В качестве переносчика кислорода используется *леггемоглобин* (от лат. *Leguminosae* — сем. бобовых), содержание которого достигает 25–30% белка инфицированной клетки. Этот гемпротеин гомологичен гемоглобину и миоглобину. Он обладает исключительно высоким сродством к кислороду (50%-ное насыщение при парциальном давлении 0,55 мМ). Аполеггемоглобин (~150 а.о.; 16 кДа) синтезируется на рибосомах шероховатой ЭПС клетки хозяина. В свою очередь, дефицит кислорода, который начинают ощущать на себе пребактериоды, стимулирует в них синтез гема. Гем экспортируется через оболочку бактерии и перибактероидную мембрану в цитоплазму растительной клетки, где присоединяется к апопротеину. Готовый леггемоглобин остается в хозяйской цитоплазме и контактным путем доставляет кислород к поверхности бактериоида, так что цитоплазма бактерии, где находится нитрогеназа, остается аноксичной.

Вышеупомянутые *ризобии* (от греч. *riza* — корень и *bios* — жизнь; живущее в корне), или классические клубеньковые бактерии вступают в эндоцитобиоз с травянистыми бобовыми растениями, вызывая у них образование diaзотрофных корневых клубеньков. Однако у некоторых древеснистых бобовых растений, в том числе *Aeschynomene* spp., diaзотрофные клубеньки образуются не на корнях, а в основании стебля, которое регулярно подтапливается в половодье. В данном случае эндоцитобионтами являются аноксигенные фототрофные бактерии *Bradyrhizobium* spp., названные *фоторизобиями* (англ. photosynthetic rhizobia). Наиболее изученным среди них является штамм ВТАi 1, эндосимбионт *Aeschynomene indica*. При аэробном гетеротрофном росте в условиях периодического освещения он образует мембранные антенны с бактериохлорофиллом *a* и реакционные центры RCII-типа (такие же, как у пурпурных бактерий; см. II том учебника).

После проникновения в клетки кортекса палочковидные фоторизобии окружаются перибактероидной мембраной и превращаются в сферические бактериоиды диаметром 2,5–3,5 нм. Каждая симбиосома содержит 1–2 бактериоида, которые имеют многочисленные хроматофоры и большое количество гранул резервных полигидроксисилканоатов. В отличие от поверхностных клеток зеленого клубенька, внутренние инфицированные клетки лишены хлоропластов, и концентрация кислорода в них не превышает 5 нМ.

Как и в случае классического ризобияльного симбиоза, хозяин снабжает бактериоиды дикарбонowymi кислотами, которые служат источником электронов для дыхательной цепи. С целью транспортировки кислорода к бактериоидам используется леггемоглобин.

Предполагается, что эффективность данного бобово-ризобияльного симбиоза связана с тем, что фотосинтетический аппарат бактериоида поставляет АТФ для нитрогеназы, а восстановитель она получает от клетки-хозяина.

Везикулы актинобактерий. Представители рода *Frankia*, названного в честь швейцарского микробиолога Франка, соавтора термина «симбиоз» (см. главу 20), относятся к числу высших актинобактерий. Они образуют только субстратный мицелий, на котором в терминальном, латеральном или интеркалярном положении появляются многорядные спорангии с неподвижными спорангиоспорами. Франкии способны к diaзотрофии в свободном состоянии или в симбиозе с древесными покрытосеменными растениями, относящимися к 194 видам 24 родов 8 семейств 7 порядков, в том числе с болотным миртом *Myrica gale* L. и серой ольхой *Alnus incana* Mch.

Симбиоз с участием актинобактерий рода *Frankia*, или *актиноризоидный эндосимбиоз* морфологически выражается в образовании корневых клубеньков на среде, не содержащей связанного азота (или на среде с аминокислотами, которые не разлагаются с образованием аммония). Клубеньки состоят из клеток кортекса, колонизированных гифами мицелия. В отличие от ризобиев, гифы *Frankia* spp. проходят сквозь клеточную стенку кортикальной клетки; затем ее мембрана инвагинирует, и вокруг ветвящейся гифы снова начинает формироваться клеточная стенка. Таким образом, гифы находятся не в перибактероидной вакуоли, а инкапсулируются внутри материала клеточной стенки.

На концах или на укороченных боковых ветвях гиф образуются *провезикулы* (англ. provesicle) — изолированные септой сферические клетки диаметром 1,5–2 мкм. Они вскоре превращаются в светопреломляющие *везикулы* (англ. vesicle) диаметром 2–4 мкм, что связано с образованием наружного чехла и внутренних перегородок.

Зрелые везикулы снабжены утолщенной септой, или «ножкой», имеют сферическую, грушевидную, булавовидную или нитевидную форму и служат местом сосредоточения нитрогеназной активности. Отдельные везикулы могут образовываться *ex plantae*, в том числе в недiazотрофных условиях. Ключевые ферменты ассимиляции аммония — глутаминсинтетаза и глутаматсинтаза — компартиментализованы, соответственно, в везикуле и вегетативных гифах по аналогии с тем, как это осуществляется у гетероцист и вегетативных клеток трихома цианобактерий.

В отличие от бактериоидов, находящихся в микроаэробных условиях, везикулы способны к diaзотрофии при атмосферном парциальном давлении кислорода. Это происходит как *in plantae* (особенности анатомии хозяина, в частности широкие межклетники, создают внутри клубенька хорошо вентилируемую среду), так и *ex plantae*. В обоих случаях защиту нитрогеназы обеспечивает ламинарный чехол везикулы, который образован несколькими липидными слоями толщиной по 4 нм, состоящими из *бактериогопантетрола* и его сложного эфира с фенилуксусной кислотой (рис. 237). Оба относятся к классу гопаноидов (см. I том учебника).

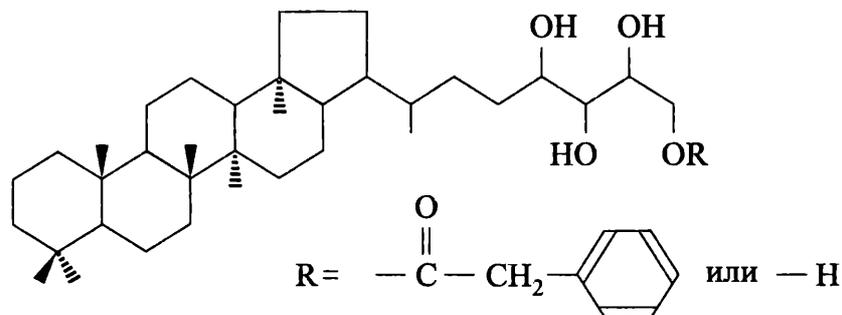


Рис. 237. Бактериогопантетрол и его сложный эфир с фенилуксусной кислотой.

Зрелые везикулы с активной нитрогеназой существуют непродолжительное время, по истечении которого часть из них стареет и подвергается запрограммированной смерти (см. раздел 17.2). Другая часть, в отличие от терминально дифференцированных гетероцист, способна прорасти с образованием вегетативных гиф.

Таким образом, везикула актинобактерий конвергирует с гетероцистой как минимум по двум признакам. В обоих случаях защита нитрогеназы достигается с помо-

щью ламинарного слоя чехла. В обоих случаях симбиоз носит внеклеточный характер (исключением служит *Nostoc* spp., эндоцитобионт покрытосеменного растения *Gunnera* spp.). Для более детального сопоставления везикулы с гетероцистой пока еще нет оснований, поскольку, в отличие от гетероцисты, везикула слабо изучена как в физиолого-биохимическом, так и в генетическом плане.

17.5.2. Покоящиеся резистентные клетки

При попадании в стрессовые условия многие прокариоты проявляют характерную адаптивную реакцию — временно переходят в состояние *покоя* (англ. dormancy), которое сочетается с повышенной *резистентностью* к повреждающим факторам внешней среды (англ. resistance). Абсолютная и относительная степень покоя и резистентности может быть разной, вплоть до полного анабиоза в сочетании с гиперрезистентностью, что характерно для бактериальных эндоспор.

Хотя комплексное состояние физиологического покоя/резистентности может наблюдаться у вегетативных клеток, в частности при полном голодании, обезвоживании или замораживании, чаще всего оно является следствием клеточной дифференциации.

Покоящиеся резистентные клетки выполняют задачу по выживанию особи при экологическом стрессе и освоению бактериальной популяцией новых ниш и территорий. В зависимости от специфики цитологических механизмов (де)дифференциации, а также в меру глубины покоя и степени резистентности такие клетки можно разбить на две группы — *цисты* и *эндоспоры*.

17.5.2.1. Цисты

Унифицированным термином «циста» (англ. cyst; от kistis — пузырь; в данном случае — округлая клетка) мы назовем сборную группу умеренно покоящихся и слаборезистентных клеток, которые образуются непосредственно путем бинарного деления или дробления. При попадании в благоприятную экологическую обстановку цисты дедифференцируются и вновь приступают к росту и размножению.

Цисты характеризуются, по меньшей мере, пятью универсальными для них признаками:

- пониженной, по сравнению с вегетативными клетками, метаболической активностью;
- повышенной, по сравнению с вегетативными клетками, устойчивостью хотя бы к одному из повреждающих факторов внешней среды;
- образованием защитных покровов, отсутствующих у вегетативных клеток;
- накоплением запасных включений;
- способностью прорасти с образованием вегетативного потомства.

Подчеркнем, что у разных прокариотов цисты имеют разные названия («акинеты», «артроспоры», «галоцисты», «зооспоры», «конидии», «микроцисты», «микроспоры», «спорангиоспоры», «споры», «экзоспоры»). Это не только дезориентирует читателя, но и приводит к искажению смысла термина. Например, спорами часто называют уникальные дифференцированные клетки бактерий — *эндоспоры* (см. ниже).

Цисты актинобактерий. У высших актинобактерий (см. I том учебника) цисты выполняют универсальную роль покоящихся резистентных клеток. Но одновременно с этим образование цист служит формой массового размножения и обеспечивает расселение, которое в силу мицелиального строения актинобактерий иначе было бы крайне затруднительным.

Процесс образования цист носит кооперативный характер и регулируется чувством кворума (см. раздел 18.4.2).

Обособление цист, содержащих по одной хромосоме, может происходить либо путем их поочередного отделения от конца стволовой гифы, что принято называть *сегментацией* (в цитологическом плане это эквивалентно почкованию), либо путем синхронного образования серии клеточных перегородок внутри стволовой гифы, что принято называть *фрагментацией* (в цитологическом плане это эквивалентно дроблению).

Цисты актинобактерий в общем случае называются *спорами* (англ. spore). Они могут образовываться на гифах субстратного мицелия или воздушного мицелия. Споры, не обладающие подвижностью, называются *конидиями* (англ. conidia; от греч. konia — пыль и eidos — подобный; «споры, похожие на пыльцу»), или *артроспорами* (англ. arthrospore; от греч. arthros — сустав; «споры как часть расчлененной структуры»). Плавающие при помощи жгутиков споры называются *зооспорами* (англ. zoospore).

Споры либо открыто располагаются на концах гиф, либо находятся внутри мешковидного чехла спорангия, и тогда их называют *спорангиоспорами* (англ. sporangiospore). Открытые споры бывают одиночными, могут образовывать продольную пару, а также могут выстраиваться в относительно короткую (<20 клеток) или более длинную (>50 клеток) цепочку, обычно закрученную в спираль.

Наиболее изучены споры *стрептомицетов* (от греч. streptos — скрученный). В частности, *Streptomyces griseus* образует спиральные цепочки спор на концах воздушных гиф, стабилизированные общим фибриллярным чехлом. Споры сильно преломляют свет, имеют утолщенную стенку и гидрофобный скульптурированный чехол, на поверхности которого часто образуются шипики или волоски, повышающие сцепление с телом вектора-переносчика (червя, насекомого, птицы, млекопитающего и т. д.). В качестве запасного субстрата они накапливают полиглюкозиды, а в качестве осмопротектора — дисахарид *трегалозу* (1-O- α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид).

Споры обладают относительно низким уровнем эндогенного метаболизма. Они лучше вегетативных клеток переносят обезвоживание и более термоустойчивы.

Регуляция образования воздушного мицелия и спор. На первом этапе морфологической дифференциации мицелия *S. griseus* образует *воздушные гифы*. Для этого реутилизируются полимерные продукты ассимиляции органических субстратов, ранее накопленные в субстратных гифах (белки, запасные полиглюкозиды, ДНК и т. д.; см. выше). Затем на концах воздушных гиф в результате синхронной закладки септ образуется цепочка *проспор* — микрокомпарментов, которые содержат по одной хромосоме. Позднее каждая проспора превращается в спору.

Споры могут образовываться не только на воздушном мицелии, но и — при истощении питательных субстратов — в условиях погруженной культуры, на концах так называемых *спорогенных гиф*. По своим свойствам такие «водные» споры отличаются от «воздушных» спор; в частности, они имеют более тонкую стенку и, соответственно, более чувствительны к лизозиму.

В настоящее время выявлено, по меньшей мере, 15 регуляторных генов, которые отвечают за морфологическую дифференциацию *S. griseus*. Рост воздушного мицелия обеспечивается генами *bld* (сокр. англ. bald — лысый; *мутанты по этим генам теряют способность к спорообразо-*

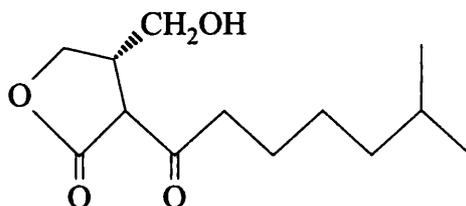


Рис. 238. Феромон *Streptomyces griseus* — 2-изокапроил-3R-гидроксиметил- γ -бутиролактон (γ -лактон 2-метил-7-оксо-8(β -оксиметил- γ -гидроксиэтил)-нонановой кислоты).

ванию), а спорообразование — генами *whi* (сокр. англ. white — белый; мутанты по этим генам образуют непигментированные колонии).

При голодании по углероду или азоту, источником которого обычно служат аминокислоты, в клетках мицелия усиливается синтез (p)ppGpp — так же, как при строгом ответе в случае *E. coli* (см. разделы 17.1 и 18.1).

При накоплении (p)ppGpp активируется экспрессия гена синтетазы AfsA, и она начинает вырабатывать *автоиндуктор* — А-фактор, или 2-изокапроил-3R-гидроксиметил- γ -бутиролактон (рис. 238). Он диффундирует по мицелию, секретируется в окружающую среду, а затем снова поступает в гифы, вызывая адаптивный ответ.

А-фактор запускает регуляторный каскад, с помощью которого, в конечном счете, образуется воздушный мицелий и начинается синтез вторичных метаболитов, в частности антибиотиков.

Цисты миксобактерий. По традиции данный тип цист называют *миксоспорами* (англ. *microspore*) или *микрощистами* (англ. *microcyst*).

Будучи в цитоморфологическом отношении ничем не примечательными одноклеточными грамотрицательными бактериями, миксобактерии обладают уникальным для прокариотов биологическим свойством — кооперативным многоклеточным поведением. Иначе сказать, они живут в больших группах, или роях, распределенных по поверхности твердого субстрата.

Рои мигрируют в поисках питательного субстрата (часто это тела других бактерий или дрожжевых грибов). Найдя его, они секретируют гидролитические экзоферменты в концентрированном виде, что служит условием для совместного питания.

В отсутствии пищи, а также при других стрессах, миксобактерии образуют макроскопические, обычно ярко окрашенные плодовые тела, которые пассивно или с помощью биологических векторов (червей, насекомых, птиц, млекопитающих и т. д.) переносятся в другие местообитания.

При неблагоприятных условиях клетки миксобактерий тесно сближаются, или агрегируют, скользя по поверхности твердого субстрата, а также наползая друг на друга (см. III том учебника). Результатом сосредоточения до 10^5 клеток вокруг отдельных центров агрегации служит образование *плодового тела* (англ. *fruiting body*), внутри которого образуются микоспоры.

Спорообразование обычно происходит после созревания плодового тела, хотя у мутантов или при добавлении некоторых химических веществ, например глицерола, его можно вызвать в обход данной морфогенетической стадии.

Модельным объектом при изучении спорогенеза у миксобактерий является *Mycosoccus xanthus*, образующая плодовые тела простой сферической формы. Вторым модельным объектом является *Stigmatella aurantiaca*, образующая сложные пло-

вые тела, которые состоят из группы спорангиев, сидящих на общей ножке. Морфология, а также биологические свойства микроспор *S. aurantiaca* аналогичны таковым *M. xanthus*.

При образовании микроспор палочковидная или веретеновидная вегетативная клетка окружается чехлом, укорачивается и округляется. Резкое изменение формы бактерии связано с увеличением числа поперечных сшивок в муреиновом сакуллусе. Чехол микроспоры состоит из *кортекса* (англ. cortex), *промежуточного покрова* (англ. intermediate coat) и *наружного покрова* (англ. surface coat). В состав кортекса входит полимер, содержащий галактозамин, а покровы образованы линейным глюканом со связями $\alpha 1 \rightarrow 3$. Дополнительный, самый наружный слой чехла микроспоры состоит из так называемого «белка S».

Микроспоры обладают низкой метаболической активностью. Они противостоят высушиванию, слабо термотолерантны и проявляют устойчивость к механическому воздействию (в том числе, к ультразвуку), ультрафиолетовому излучению и детергентам. Микроспоры сохраняются в почве в покоем состоянии свыше десяти лет до момента прорастания.

Регуляция образования плодовых тел и микроспор. Образование плодового тела, наполненного микроспорами, вызывается голоданием по углероду, азоту (в частности, по любой из аминокислот) или фосфору. Соответствующая программа развития включает в себя индивидуальную реакцию на сигнал голодания, взаимную коммуникацию, агрегацию клеток и собственно дифференциацию микроспор.

Исходным внутриклеточным сигналом голодания у миксобактерий, как и у стрептомицетов, служит накопление алармона (p)ppGpp. Для взаимной коммуникации, создающей чувство кворума (см. раздел 18.4.2), голодающие клетки *M. xanthus* секретируют в окружающую среду «ранний» А-фактор и «поздний» С-фактор, которые играют роль аутоиндукторов.

А-фактор (не путать с А-фактором *S. griseus*) представляет собой олигопептидный комплекс и образуется при повышении концентрации (p)ppGpp. После восприятия реципиентом он, совместно с (p)ppGpp, обеспечивает связь между альтернативным сигма-фактором σ^{54} и промоторными участками первой группы стрессовых генов, в частности гена *fruA*. Продукт экспрессии гена *fruA*, белок FruA, запускает трансляцию С-фактора.

С-фактор (CsgA, 17 кДа) переносится к поверхности продуцента, где он взаимодействует с рецептором на поверхности реципиента. Сигнал передается в цитоплазму и вызывает посттрансляционную активацию ДНК-связывающего белка FruA. Мишенью для активированной формы белка FruA служат два оперона второго эшелона — *frzCDE* (продукты которого контролируют направление скользящего движения; см. раздел 17.3.2), и оперона *devTRS* (сокр. англ. development — развитие), продукты которого контролируют процесс споруляции.

В качестве вспомогательного сигнала, обеспечивающего чувство кворума при образовании сложных плодовых тел *S. aurantiaca*, используется аутоиндуктор *стигмолон* (англ. stigmatolone). По химической структуре это 2,5,8-триметил-8-гидрокси-нонан-4-он (рис. 239). Дополнительным внешним стимулятором в данном случае служит свет — в темноте и на свету секретируется одинаковое количество феромона. Однако на свету миксобактерии сенсibiliзируются к восприятию низкой концентрации феромона; иными словами, свет способствует образованию плодовых тел при относительно меньшей плотности популяции.

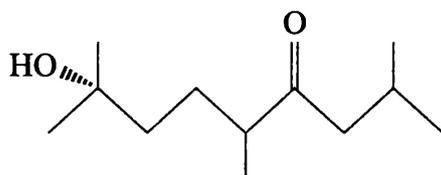


Рис. 239. Феромон *Stigmatella aurantiaca* (2,5,8-триметил-8-гидрокси-нонан-4-он).

Цисты цианобактерий. Традиционно их называют *акинетами* (греч. а — лишенный чего-либо и кинео — двигаюсь; в данном случае — неподвижная (?) клетка). Исторически акинеты были первыми дифференцированными клетками, известными у бактерий — английский ботаник Картер (H. J. Carter) описал их в 1865 г., т. е. еще до того, как Фердинанд Кон и Роберт Кох в 1877 г. открыли эндоспоры.

Акинеты имеют сферическую или эллипсоидную форму; они крупнее вегетативных клеток и гранулированы, поскольку в ходе дифференциации накапливают полиглюкозидные и цианофициновые гранулы. Они окружены толстым чехлом, состоящим из внутреннего и наружного слоев, которые по составу сходны, соответственно, с гомогенным и фибриллярным слоями гетероцисты (полисахарид с глюкозосманнозным 1 → 3 скелетом и боковыми остатками галактозы и ксилозы). Специфическим маркером акинет является полипептид молекулярной массой 43 кДа (ген *avaK*), который, возможно, входит в состав чехла или является антистрессорным агентом.

Акинеты проявляют низкую фотосинтетическую активность (в частности, из-за разрушения фикобилисом), хотя, в отличие от гетероцист, электрон-транспортная цепь ФСII и кислородвыделяющий комплекс у них сохраняются. Дыхательная активность акинет, как правило, ниже, чем у вегетативных клеток.

Акинеты не обладают терморезистентностью. Тем не менее, они устойчивы к высушиванию, низкой температуре и замораживанию-оттаиванию. Благодаря этим свойствам цианобактерии получают возможность переживать зимы в высоких широтах, а также могут до 5 лет сохранять жизнеспособность в темноте в высушенном состоянии (по сравнению с 15 днями у вегетативных клеток).

Внешним стимулом к образованию акинет служат разнообразные стрессовые условия: (1) дефицит фосфора, углерода или азота; (2) слабая освещенность; (3) низкая температура; (4) понижение водной активности; (5) повышение концентрации минеральных катионов.

Регуляция образования и паттерн распределения акинет еще не изучены. Какую-то роль в этом, несомненно, играют гетероцисты, выделяющие, по крайней мере, у *Cylindrospermum* sp., аутоиндуктор, который по химической структуре представляет собой 1-карбоксит-5-метенамин-тиофен-циклокарбамид (рис. 240). Он вызывает дифференциацию прилежащих клеток, которые превращаются в цепочки акинет, что служит отдаленным аналогом феномена эмбриональной индукции у высших организмов.

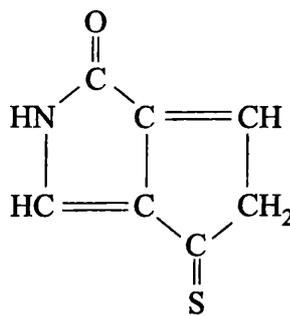


Рис. 240. Феромон *Cylindrospermum* sp. (1-карбоксит-5-метенамин-тиофен-циклокарбамид).

Цисты пурпурных бактерий. По предложению российского микробиолога В. М. Горленко, который впервые описал этот уникальный тип дифференцированных клеток, их называют *экзоспорами* (англ. exospore).

В онтогенезе почкующейся стебельковой бактерии *Rhodomicrobium vannielii*, принадлежащей к физиологической группе несерных пурпурных фототрофных бактерий, реализуются клеточные циклы трех типов: (1) диморфный с вегетативной немиецелиальной стадией; (2) диморфный с вегетативной миецелиальной стадией и (3) триморфный (см. рис. 221).

В двух первых случаях дифференцированная клетка (швермер) обладает жгутиками и играет роль расселительной стадии. В третьем случае на концах вегетативных гиф одна за другой отпочковываются до четырех треугольных светопреломляющих экзоспор. Благодаря окружающему их капсульному материалу они некоторое время остаются прикрепленными к материнской гифе. Экзоспоры *R. vannielii* одеты толстым чехлом и содержат меньше хроматофоров, чем вегетативная клетка.

Экзоспоры *R. vannielii* термоустойчивы и выдерживают прогрев при 100°C в течение нескольких минут, в то время как вегетативные клетки погибают при 50°C за 20 мин. Кроме того, они остаются живыми после высушивания в течение 3 дней при 30°C в отличие от вегетативных клеток, для которых такая обработка летальна.

Цисты описаны также у пурпурной бактерии *Rhodospirillum centenum*, способной к альтернативному хемогетеротрофному росту. На среде с бутиратом в качестве единственного источника углерода подвижные спиралевидные клетки образуют пакеты эллипсоидных цист, которые стабилизированы взаимно вложенными чехлами. Цисты *R. centenum* накапливают до 30% полигидроксиалканоатов и в два раза более устойчивы к высушиванию по сравнению с вегетативными клетками.

Цисты *Azotobacter* spp. Свободноживущие diaзотрофы из рода *Azotobacter* широко распространены в почвах и водоемах, а также заселяют ризосферу и филлосферу. В старых культурах или при росте на бутаноле они образуют цисты, по форме и размеру близкие к вегетативным клеткам. Основу цисты составляет «центральное тело», или собственно клетка с большим количеством гранул запасных полигидроксиалканоатов. Она окружена чехлом, в котором различаются внутренняя *интина* и наружная *эзина*, примерно в равных пропорциях состоящие из альгинатов (см. I том учебника), белков и липидов.

В результате инцистирования метаболическая активность *Azotobacter* spp. практически затухает.

По сравнению с вегетативными клетками цисты *Azotobacter* sp. более устойчивы к обезвоживанию, а также токсическому воздействию химических реагентов.

Цисты метанотрофных бактерий. Разные представители облигатных метанотрофов типа-I и типа-II (см. II том учебника) могут образовывать цисты одного из трех типов.

Штаммы *Methylococcus* spp. и *Methylomonas* spp. (тип-I) при понижении парциального давления кислорода или дефиците метана образуют цисты, сходные с цистами *Azotobacter* spp. Они устойчивы к высушиванию, однако не обладают термоустойчивостью.

Штаммы *Methylosinus trichosporium* (тип-II) отпочковуют дочерние клетки, которые превращаются в округлые цисты, содержащие хорошо развитую систему ИСМ и одетые толстым чехлом из внутреннего ламинарного слоя и наружного кортекса. Цисты *M. trichosporium* проявляют очень низкую дыхательную активность, термоустойчивы (выдерживают нагревание при 85°C в течение 15 мин), механически прочны (не разрушаются при 10-мин обработке ультразвуком) и сохраняют жизнеспособность после высушивания в течение 18 месяцев.

Штаммы *Methylocystis parvus* (тип-II) образуют «липидные» цисты, которые на-

капливают большое количество полигидроксиалканоатов и не содержат ИСМ. Они термоустойчивы и переносят высушивание.

Цисты архей. Если у бактерий, равно как у протистов, образование цист служит примером часто используемой цитофизиологической стратегии, то у архей они встречаются исключительно редко.

Причина этого явления специально не выяснялась, хотя в упрощенном виде она может заключаться в следующем. Большинство актуалистических форм архей — как правило, экстремофилы, живущие в условиях, которые обычно вызывают стресс у бактерий, приводящий к инцистированию. В свою очередь, в условиях, комфортных для бактерий, архей испытывают стресс, однако их адаптационный ответ не обязательно должен быть симметричным, т. е. он может не проявляться морфологически (в изменении формы клетки, а также в образовании защитных покровов и запасных включений).

Единственным типом цист у архей являются *галоцисты* (англ. halocyst). Они описаны российским микробиологом В. И. Дудой на примере *Halobacterium* spp.

Галоцисты представляют собой округлые клетки, собранные в группы и окруженные общим чехлом. Они образуются в гипогалинных условиях, т. е. при солености ниже оптимальной. Предполагается, что за счет дифференциации галоцист архей получают возможность переживать стресс. Оказавшись снова в гипергалинных условиях, они прорастают с образованием вегетативного потомства.

17.5.2.2. Эндоспоры

Бактериальная *эндоспора* (англ. endospore; от греч. endon — внутри и spora — семя; «эндогенная спора») — это уникальное цитологическое образование. Для краткости ее обычно называют просто *спорой*. Однако такая, на первый взгляд, допустимая вольность приводит к размыванию концептуального смысла термина. У бактерий не бывает «просто» спор (англ. spore), а существуют принципиально различающиеся *экзоспоры* и *эндоспоры*.

Экзоспоры, или цисты, конкретные типы которых мы рассматривали в предыдущем разделе — это продукты индивидуальной дифференциации дочерней клетки.

В отличие от экзоспор, эндоспора образуется в результате взаимно скоординированной дифференциации двух дочерних клеток, одна из которых проникает в сестринский эндоплазматический компартмент (см. рис. 245). Дальнейшие цитоморфологические и физиолого-биохимические преобразования приводят к запрограммированной смерти внешней клетки, или *спорангия* (англ. sporangium), которую необоснованно называют *материнской клеткой* (англ. mother cell). В свою очередь, внутренняя клетка, или *преспора* (англ. forespore), дифференцируется в эндоспору, которая переходит в состояние гиперанабиоза, т. е. максимального физиологического покоя, и становится гиперрезистентной, т. е. приобретает максимальную устойчивость к повреждающим воздействиям со стороны окружающей среды.

Схема зрелой эндоспоры, окруженной специализированными покровными структурами, которые образуются внутри спорангия и сохраняются после его отмирания, представлена на рис. 241.

Основными структурными элементами такого комплексного цитологического образования служат:

— цитоплазматический компартмент эндоспоры, или *кор* (англ. core);

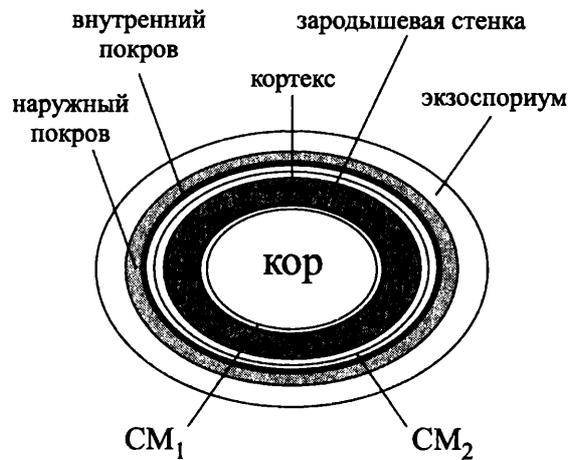


Рис. 241. Эндоспора в спорангии.
 СМ₁ — цитоплазматическая мембрана эндоспоры;
 СМ₂ — цитоплазматическая мембрана спорангия.

- комбинированная клеточная стенка, состоящая из внутренней *зародышевой стенки* (англ. germ cell wall) и наружной стенки, или *кортекса* (англ. cortex);
- цитоплазматическая мембрана эндоспоры, или *внутренняя мембрана* (англ. inner membrane) и цитоплазматическая мембрана спорангия, или *внешняя мембрана* (англ. outer membrane; не путать с ОМ грамотрицательных бактерий);
- внутренний и внешний *споровые покровы* (англ. spore coat);
- наружные покровы, или *экзоспориум* (англ. exosporium).

Совокупность кортекса, внешней мембраны и споровых покровов называется *интегументом* (англ. integument; от лат. integumentum — покров в широком смысле слова).

Спорогенные бактерии. Способностью к образованию эндоспор обладают относительно немногие представители филоу XVIII *Firmicutes* (*Bacillus*, *Clostridium*, *Dendrosporobacter*, *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum*, *Halobacillus*, *Heliophilum*, *Oscillospira*, *Sporobacter*, *Sporobacterium*, *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus*, *Sporomusa*, *Sporosarcina*, *Sporotomaculum*, *Sulfobacillus*, *Thermoactinomyces* и др. — всего около 25 родов).

Большинство спорогенных бактерий относится к грамположительному морфотипу и характеризуется аэробным дыхательным (например, *Bacillus* spp.), анаэробным дыхательным (например, *Desulfotomaculum* spp.) или бродильным (например, *Clostridium* spp.) типом метаболизма.

Некоторые спорогенные бактерии, в виде исключения, относятся к грамотрицательному морфотипу. По характеру метаболизма они являются либо миксотрофными гомоацетогенами (например, *Sporomusa ovata*), либо факультативными фотогетеротрофами (например, *Heliophilum fasciatum*).

Как правило, материнская клетка образует единственную эндоспору, т. е. параллельным итогом споруляции не является размножение.

Известны только два примера, когда материнская клетка образует не одну, а несколько эндоспор.

Крупная некультивируемая бактерия *Metabacterium polyspora*, которая достигает длины 35 мкм и является симбионтом желудочно-кишечного тракта некоторых грызунов (в частности, морской

свинки), образует до девяти эндоспор на спорангий. Споруляция протекает координированно с прохождением бактерии по пищеварительной системе. В желудке хозяина-копрофага выживают только зрелые эндоспоры; в тонкой кишке они прорастают, некоторое время бинарно делятся, а затем снова дифференцируются в слепом отростке. При споруляции происходит тройственное асимметричное деление материнской клетки, причем сестринские клетки образуются на противоположных полюсах спорангия. Обе преспоры поглощаются спорангием, а затем сразу созревают или предварительно делятся бинарно.

Второй пример связан с гигантской некультивируемой бактерией *Epulopiscium* sp. (до 60×300 мкм), которая является симбионтом тропической рыбы-единорога *Naso tonganus*. С помощью аналогичного механизма она образует две эндоспоры в одном спорангии.

Интересно, что репродуктивный цикл гигантской бактерии *E. fishelsoni* (см. I том учебника), близкого родственника *Epulopiscium* sp. и *M. polyspora*, связан с образованием 1–7 вегетативных клеток внутри «спорангия». Предполагается, что такой способ размножения вторично произошел на основе спорогенеза.

Основные данные о строении, свойствах и механизмах (де)дифференциации эндоспоры получены на примере представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*, особенно *B. subtilis* 168.

Значение и общие свойства эндоспор. Бактерии, дифференцированные в эндоспоры, способны противостоять физико-химическим воздействиям, губительным для вегетативных клеток. Кроме того, спорогенез служит способом изоляции от стрессовых условий локальной среды — во времени, путем перехода в анабиотическое состояние, и в пространстве, благодаря перемещению с воздушными и водными потоками, а также «на плечах» мигрирующих микро- и макроорганизмов или искусственных транспортных средств.

Актуальны и практические аспекты спорогенеза. Широко применяется метод влажной *стерилизации* под давлением в автоклаве (фр. l'autoclave; от греч. autos — сам и clao — ломать; в данном случае — автономное дезинтегрирующее приспособление), прообразом которого был паровой котел английского изобретателя конца XVII в. Дениса Пейпина (D. Papin).

Конструкцию автоклава предложил в конце 1870-х гг. сотрудник Пастера, Шарль Шамберлан (С. Chamberland). Автоклавирование питательных сред, пищевых продуктов и медицинских материалов связано с необходимостью убить не только вегетативные клетки, но и гораздо более устойчивые эндоспоры.

Прорастание эндоспор, сохранивших жизнеспособность после стерилизации или консервирования, вызывает порчу пищевых продуктов, а в случае *C. botulinum* острое пищевое отравление — ботулизм.

Прорастание эндоспор *B. anthracis* в макрофагах вызывает легочную форму сибирской язвы.

Как уже отмечалось, эндоспора обладает двумя уникальными биологическими свойствами — *гиперанабиозом* (англ. dormancy — состояние покоя; спячка) и *гиперрезистентностью* (англ. resistance — сопротивляемость организма).

Гиперанабиоз выражается в том, что зрелая эндоспора не проявляет метаболической активности. Она почти не содержит таких важнейших медиаторов метаболизма, как АТФ и другие нуклеозидтрифосфаты, а также восстановленных пиридиннуклеотидов и ацетил-СоА. Ферменты, находящиеся в коре, не активны.

В состоянии гиперанабиоза эндоспоры характеризуются иногда феноменальным долгожительством. Неоднократно сообщалось об их реанимации из природного материала возрастом до 10⁵ лет; а заявленными рекорсменами — хотя к таким данным нужно относиться с разумным скептицизмом — служат споры *Bacillus* sp., которые, по сообщениям некоторых авторов, сохранились в жизнеспособном состоянии в желудке олигоценовой пчелы, мумифицированной в образце янтаря, добытого в Доминиканской Республике, или в кристаллах поваренной соли из шахты в Нью-Мехико, США (на протяжении, соответственно, 25–40 и 250 млн. лет).

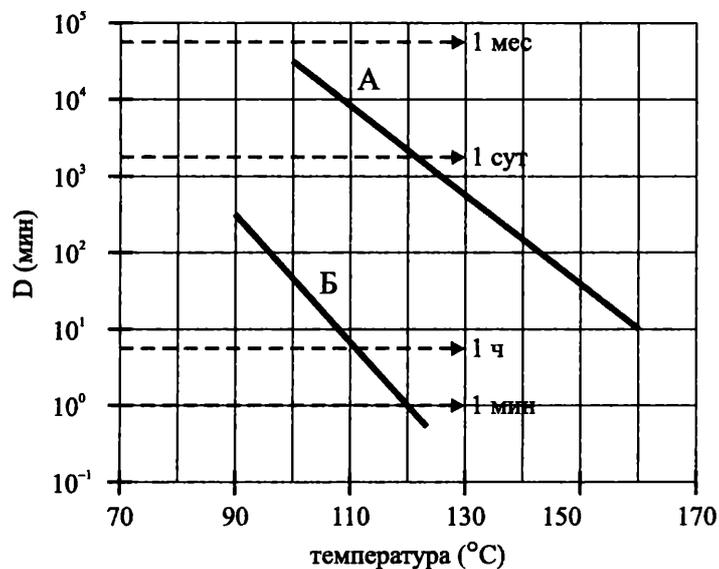


Рис. 242. Выживание эндоспор *B. subtilis* при тепловой обработке.

А — сухой жар; Б — влажный жар; D — время децимации (10-кратного уменьшения численности жизнеспособных эндоспор).

Пространственно-временных границ на пути распространения эндоспор практически не существует. Их можно обнаружить в любых нишах и географических областях на огромном удалении от места образования (например, эндоспоры термофильных видов *Bacillus* spp. захоронены в иле субполярных озер).

В свою очередь, гиперрезистентность выражается в том, что зрелая эндоспора устойчива к повреждающим воздействиям — высокой температуре, высушиванию, большому гидростатическому давлению, УФ- и гамма-излучению, экстремальной кислотности, окислителям и т. д.

Широко известна устойчивость эндоспоры к воздействию сухого или влажного жара, т. е. к прогреванию на воздухе или в атмосфере водяного пара. В частности, время «децимации», т. е. десятикратного снижения количества прорастающих спор, составляет 20–30 мин в случае кипячения при атмосферном давлении и ~1 мин в случае автоклавирования при 120°C (для сравнения, вегетативные клетки полностью погибают в результате пастеризации, т. е. нагревания при 55–60°C в течение 30 мин). Характерно, что выживаемость эндоспор, обработанных сухим жаром, на три порядка выше, чем при использовании влажного жара (рис. 242).

Первичная мишень для летального воздействия влажного жара еще не установлена. Скорее всего, это СМ или цитоплазматические белки, но явно не ДНК, которая защищена от потери азотистых оснований, в частности от депуринизации, специфическими SASP-белками (см. ниже). Устойчивость белковых структур эндоспоры к влажному жару связана с обезвоживанием кора и его минерализацией в результате накопления катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} , образующих хелатный комплекс с дипиколиновой кислотой (см. ниже). В то же время она не определяется такими защитными факторами вегетативных клеток, как белки теплового шока, хотя эндоспоры термофилов более термоустойчивы, чем эндоспоры мезофилов.

В отличие от влажного жара, мишенью для воздействия сухого жара служит ДНК, повреждение которой связано, в первую очередь, с депуринизацией. В данном случае термоустойчивость эндоспор у термофилов не выше, чем у мезофилов.

Эндоспоры значительно устойчивее к холоду и высушиванию, чем вегетативные клетки. Большинство из них благополучно переносит несколько циклов лиофилизации при -80°C , а убийственное для *E. coli* обезвоживание при -200°C в условиях сверхвысокого вакуума (10^{-7} атм) в течение 24 ч вызывает только 50–75%-ное падение жизнеспособности эндоспор *B. subtilis*.

Эндоспоры на один–два порядка устойчивее вегетативных клеток к воздействию УФ-излучения в области 260 нм, что связано с «необычной» фотохимией ДНК и специфическим механизмом репарации образующихся фотопродуктов (см. ниже). Помимо высокой резистентности к воздействию УФ-излучения, эндоспоры обладают повышенной устойчивостью к гамма-излучению. Предполагается, что из-за низкого содержания воды подавляется радиоиндуцированное образование в цитоплазматическом компартменте эндоспоры (коре) опасного агента окислительного стресса -- гидроксильного радикала (см. раздел 19.1.6.1).

Эндоспоры намного устойчивее вегетативных клеток к повреждающему воздействию высокого гидростатического давления ($>10^3$ атм). В то же время умеренное гидростатическое давление (до 10^3 атм) индуцирует их прорастание, хотя для образующихся вегетативных клеток оно является сильным стрессовым фактором.

Эндоспоры по сравнению с вегетативными клетками более резистентны к веществам, которые денатурируют или модифицируют белки (кислотам, щелочам, окислителям, альдегидам, фенолам и т. д.), а также к алкилирующим агентам, которые модифицируют ДНК. В отличие от вегетативных клеток, обладающих ферментативными системами для борьбы с токсинами, эндоспоры защищаются от токсикантов благодаря барьерам проницаемости, т. е. пассивно.

Факторы и механизмы гиперрезистентности эндоспоры. Для того, чтобы иметь возможность прорасти и принести вегетативное потомство, эндоспора должна либо в состоянии покоя избежать летальных повреждений своих жизненно важных структур (прежде всего, ДНК), либо при прорастании быстро репарировать эти структуры.

К числу факторов, определяющих гиперрезистентность эндоспор, относятся: (1) покровы; (2) барьер проницаемости вокруг кора; (3) низкое содержание воды в коре; (4) высокое содержание двухвалентных катионов в коре; (5) связывание ДНК со специфическими белками; (6) репарация повреждений при прорастании.

В большинстве случаев роль этих факторов изучена лишь на феноменологическом уровне, а молекулярные механизмы остаются неизвестными.

Покровы. Белковые покровы препятствуют проникновению к кортексу эндоспоры ферментов, разрушающих муреин (например, лизоцима), а также агрессивных химических реагентов (в частности, хлороформа).

Барьер проницаемости вокруг кора. Он создается двумя СМ, одна из которых принадлежит спорангию, а другая самой эндоспоре. Эти мембраны не пропускают в кор гидрофильные соединения молекулярной массой >300 Да.

Низкое содержание воды в коре. Известно, что при нейтральном pH вода стимулирует депуринизацию ДНК. Поэтому способность эндоспоры противостоять воздействию влажного жара объясняется низким содержанием воды в коре (28–50%). Кор остается дегидратированным даже в том случае, когда эндоспора находится в водной среде (при этом экзоспориум, покровы и кортекс имеют такую же относительную влажность, как вегетативная клетка, т. е. 75–80%). По современным представлениям, содержимое кора находится в стекловидном агрегатном состоянии.

Высокое содержание двухвалентных минеральных катионов в коре. Обезвоживание эндоспоры сопровождается накоплением катионов, прежде всего Ca^{2+} . Они в соотношении 1 : 1 связываются с пиридин-2,6-дикарбоновой, или *дипиколиновой кислотой* (англ. dipicolinic acid, DPA; рис. 243), которая синтезируется в спорангии, а затем транспортируется в кор. Содержание этого хелатного соединения составляет 5–10% массы эндоспоры.

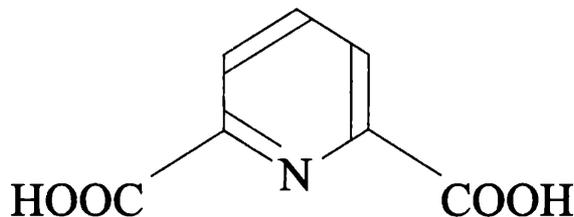


Рис. 243. Дипиколиновая кислота.

Связывание ДНК со специфическими белками. На третьем часу цикла споруляции в преспоре *B. subtilis* синтезируются уникальные низкомолекулярные кислоторастворимые белки (англ. small acid-soluble protein, SASP). Помимо двух взаимно гомологичных SASP-белков главного α/β -типа (60–75 а.о.; гены *ssp*), существуют несколько минорных SASP-белков.

SASP-белки содержатся в очень большом числе копий (~5% суммарного белка эндоспоры), и этого достаточно для насыщения ими ДНК. Их С-концевые домены кооперативно связываются с наружной поверхностью двойной спирали, что переводит ДНК из обычной В-конформации в более плотно скрученную А-конформацию. В комплексе с SASP-белками на фоне низкого содержания свободной воды ДНК защищена не только от депуринизации, но и от физико-химического повреждения сахарофосфатного скелета. При прорастании эндоспоры SASP-белки быстро расщепляются на аминокислоты, которые утилизируются молодой вегетативной клеткой.

Репарация повреждений при прорастании. Прежде всего, происходит репарация повреждений, нанесенных ДНК в покоящейся эндоспоре. Помимо обычных для вегетативной клетки систем эксцизионной и рекомбинационной репарации, а также системы репарации ошибок спаривания (см. раздел 16.5.1.3), в эндоспоре существует уникальная система репарации споровых фотопродуктов — SP-специфичная система репарации ДНК.

Если в вегетативной клетке главным фотопродуктом является циклобутановый димер пиримидиновых оснований, то в эндоспоре образуется тиминовый аддукт 5-тиминил-5,6-дигидротимина (англ. spore photoproduct, SP; рис. 244). Этот уникальный фотопродукт возникает как между соседними остатками тимина в одной цепи ДНК, так и в комплементарных цепях. Причина «необычной» фотохимии пиримидинов заключается в том, что ДНК в эндоспоре слабо гидратирована и стабилизирована SASP-белками α/β -типа.

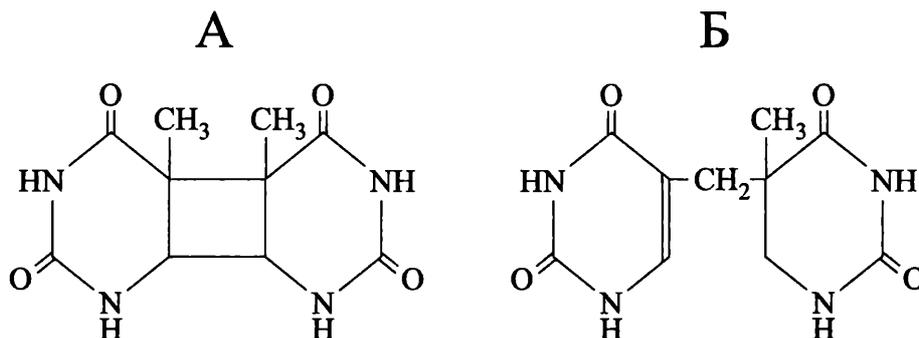


Рис. 244. Циклобутановый пиримидиновый димер (А) и тиминовый аддукт 5-тиминил-5,6-дигидротимина, или споровый фотопродукт SP (Б).

SP-система репарации основана на действии SP-лиазы (SplAB; 79 и 342 а.о.; гены *spe*), которая синтезируется параллельно с дифференциацией эндоспоры, накапливается в коре, активируется в первые минуты прорастания и превращает SP в мономерные остатки тимина.

Цикл споруляции. Напомним, что цитоплазматический компартмент эндоспоры (кор), модифицированная клеточная стенка (кортекс), а также придаточные структуры (покровы и экзоспориум) образуются в результате кооперативной дифференциации двух дочерних клеток. Клетка-спорангий альтруистически отдает свои ресурсы преспоре, а затем частично лизируется.

Цикл споруляции по продолжительности гораздо дольше (~7 ч при 37°C), чем цикл образования других дифференцированных клеток, что связано с кардинальными морфофизиологическими изменениями по сложным генетическим программам, которые раздельно реализуются в спорангии и эндоспоре.

Цикл споруляции у *B. subtilis* состоит из семи стадий, которые французский бактериолог Антуанет Ритер (A. Ryter) обозначила в середине 1960-х гг. как стадии 0–VII (рис. 245).

Стадия 0 соответствует вегетативной материнской клетке.

Стадию I в настоящее время не выделяют, поскольку она лишена характерных морфологических признаков, и мутанты, нарушающие ее, неизвестны.

Стадия II подразделяется на три этапа. На этапе II, или при *септировании* (англ. septation) закладывается уникальная споровая септа и происходит асимметричное бинарное деление, в результате которого образуются протопласты разного размера. На этапах III–III₃, или при *поглощении* (англ. engulfment) больший протопласт начинает поглощать меньший протопласт.

На стадии III поглощение завершается, и меньший протопласт, или преспора оказывается внутри эндоплазматического компартмента большей клетки, или спорангия. При этом СМ преспоры и СМ спорангия зеркально ориентированы по отношению друг к другу.

На стадии IV синтезируется кортекс, или модифицированная клеточная стенка, окружающая протопласт преспоры.

На стадии V в цитоплазме спорангия откладываются белковые покровы эндоспоры.

Морфологически не выраженная стадия VI соответствует периоду *созревания* (англ. maturation), когда эндоспора последовательно становится гиперрезистентной, переходит в состояние гиперанабиоза, а также приобретает способность к прорастанию.

Стадия VII соответствует запрограммированной смерти спорангия и его частичному лизису, что приводит к выходу зрелой эндоспоры (англ. release).

Цитологические основы споруляции изучены гораздо слабее, чем ее регуляторные аспекты.

Механизм расхождения сестринских хромосом при споруляции. Данный вопрос мы уже рассматривали в разделе 16.4.2.1.

Споровая септа. Уникальная споровая септа образуется в результате симметричной закладки двух Z-колец, соответственно на 1/4 и 3/4 длины продольной оси материнской клетки. Одно из них произвольно выбирается под контролем белка SpoIIA, а другое демонтируется. Субполярная кольцевая инвагинация СМ вначале заполняется септовым муреином, который затем лизируется (см. ниже). В результате этого сестринские цитоплазматические компартменты оказываются разделены только двумя мембранами.

Согласно новым данным, преспоровая хромосома поступает в меньший из двух компартментов не до, а после смыкания споровой септы, т.е. когда билипидные слои СМ спорангия и СМ преспоры полностью заращиваются. Затем N-концевые домены ДНК-транслоказы FtsK/SpoIIIE образуют внутри тандема СМ два гексамерных кольцевых канала, через которые пропускаются плечи хромосомы. При этом C-концевые домены (относящиеся к суперсемейству AAA-АТФаз; см. раздел 16.6.1.3) играют роль цитоплазматического АТФазного мотора.

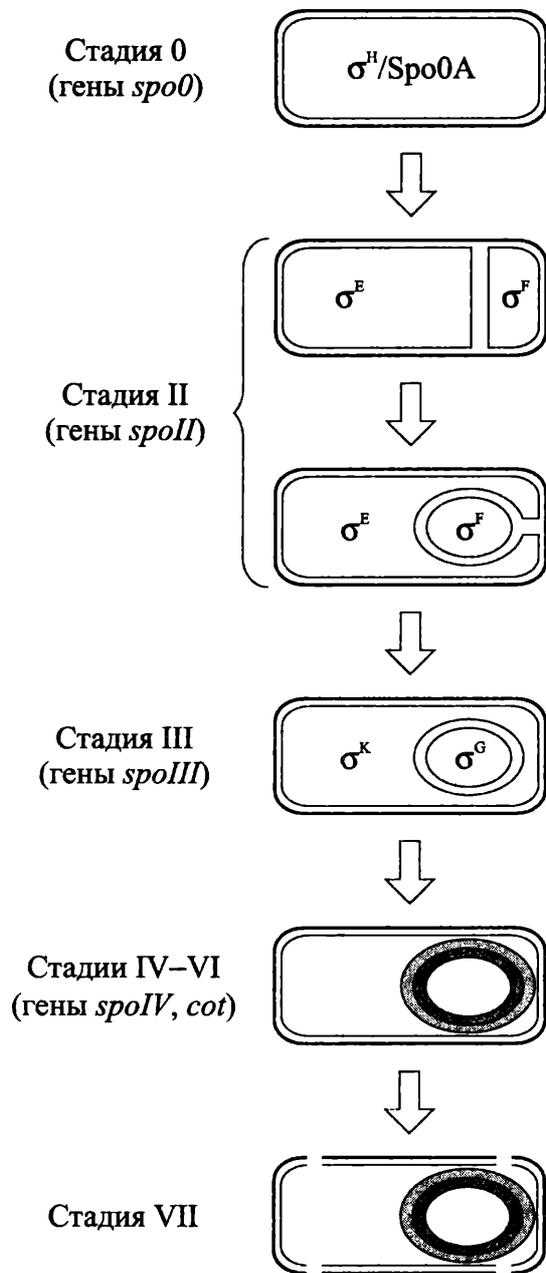


Рис. 245. Цикл споруляции *B. subtilis*.
Объяснение в тексте.

Поглощение. Формально этот процесс соответствует эндоцитозу, что в целом не свойственно для бактерий. Молекулярные основы поглощения слабо изучены.

В области споровой септы локализуются белки SpoIID и SpoIIM, которые образуются в спорангии и гидролизуют муреин, что служит предпосылкой для смыкания двойного слоя мембран вокруг преспоры. Возможно, в поглощении участвуют Mrs-подобные белки, гомологичные ацила-

зам, которые стимулируют инвагинацию СМ при эукариотном эндоцитозе. У бактерий процесс, сходный с поглощением, наблюдается, по крайней мере, еще в двух случаях — при образовании магнитосомы (см. I том учебника), а также при инвазии хищника *Daptobacter* sp. в цитоплазму другой бактерии.

Образование зародышевой стенки и кортекса. Ригидный слой, который расположен в зазоре между зеркально ориентированными мембранами преспоры и спорангия, подразделяется на внутренний слой (зародышевую стенку) и наружный слой (кортекс).

Зародышевая стенка синтезируется самой преспорой. Она состоит из примордиального муреина, который имеет такое же строение, как муреин вегетативной клетки, и сохраняется при прорастании эндоспоры.

Кортекс синтезируется спорангием. Он состоит из модифицированного муреина:

— около 25% остатков мурамовой кислоты присоединяют к себе боковые тетрапептидные цепи Лала-Дглу-L, ДДАП-Дала (в примордиальном муреине — свыше 50%), причем из них не более 3% образуют поперечные сшивки (в примордиальном муреине — 30%);

— около 50% остатков мурамовой кислоты образуют внутренний δ -лактам за счет амидной связи с собственной деацетилированной аминогруппой.

Крупнопористый муреин кортекса способен сжиматься, что способствует дегидратации протопласта преспоры. В свою очередь, δ -лактамы мурамовой кислоты служат мишенью для автолизиннов. При прорастании эндоспоры они разрушают кортекс, в то время как примордиальный муреин остается интактным.

Образование покровов. Белковые покровы споры, сборка которых осуществляется вокруг преспоры, синтезируются в цитоплазме спорангия. На пятом часу споруляции *B. subtilis* они выявляются в виде более темного гомогенного *наружного покрова* (англ. outer coat) толщиной 70–200 нм и более светлого ламеллярного *внутреннего покрова* (англ. inner coat), состоящего из 2–5 слоев толщиной по 75 нм.

Число покровных слоев варьирует у разных бактерий. Простейший однослойный покров из белка одного типа характерен для *B. cereus*, в то время как *B. sphaericus* обладает одним из самых сложно устроенных покровов.

Белки покровов богаты остатками тирозина и цистеина, за счет которых образуется большое количество поперечных сшивок. Некоторые из этих белков гликозилированы.

Набор белков в покрове *B. subtilis* представлен 18 типами (CotA–Z; 17–65 кДа), тогда как у других бактерий он ограничен всего несколькими типами. Локализация части из них известна; например, белки CotDHJ входят в состав внутреннего покрова, а полипептиды CotABCEG — в состав наружного покрова.

Гены *cot*, кодирующие белки покровов *B. subtilis*, занимают разное положение на хромосоме. Одни из них (например, *cotABC*, *cotE*, *cotJ*, *cotVWX* и *cotYZ*) образуют опероны; другие (например, *cotG* и *cotH*), расположены рядом друг с другом, но являются самостоятельными транскрипционными единицами.

Синтез и сборка покровов регулируются каскадом транскрипционных факторов σ^E , SpoIID, σ^K и GerE (сигма-факторы σ^E и σ^K входят в голофермент РНК-полимеразы, а SpoIID и GerE — это ДНК-связывающие белки).

Гены *cot* и их транскрипционные регуляторы подразделяются на четыре поочередно экспрессируемые группы (*spoIID/cotE-P1*; *sigK/cotE-P2/cotABCJ*; *cotD/cotF/cotH/cotS/gerE*; *cotG/cotVWX/cotYZ*), причем первые три содержат регуляторные гены для следующей группы. Строгая последовательность биосинтеза покровных белков обеспечивает их упорядоченную сборку.

Гены *cot* транскрибируются голоферментами РНК-полимеразы, которые содержат сигма-факторы σ^E или σ^K и активны только в спорангии (рис. 245).

Предполагается, что образование покровов начинается со сборки каркаса из белка SpoIVA вокруг внешней из двух мембран, окружающих преспору. Затем на этой основе образуется наружный покров (в первую очередь, из белка CotE), а затем уже под него подслаивается внутренний покров.

Образование экзоспориума. Экзоспориум является часто встречающимся, но не обязательным структурным элементом. Он состоит из серии тонких слоев и, как правило, неплотно прилегает к внешнему споровому покрову. У некоторых видов бактерий (но не *B. subtilis*) экзоспориум снабжен нитевидными придатками, которые не следует путать с фимбриями вегетативных клеток (см. I том учебника). Они повышают адгезивность эндоспоры.

Экзоспориум морского штамма *Bacillus* sp. SG-1 окружен ореолом из оксида марганца. За образование этого минерального покрова отвечает оперон *млл*, в частности ген *мллG*, гомологичный генам медьсодержащих оксидаз (см. II том учебника).

Запрограммированная смерть спорангия. Детали этого процесса мало изучены; за общими сведениями мы отсылаем читателя к разделу 17.2.2.

Регуляция споруляции. Часто можно встретить утверждение, что в лаборатории или на микробиологическом производстве массовая дифференциация эндоспор начинается тогда, когда в питательной среде подходит к концу легко метаболизируемый источник углерода, азота или фосфора. Однако реальный экологический фон споруляции более сложен — по современным представлениям, стимулом для начала споруляции могут быть разнообразные, не всегда очевидные стрессовые факторы.

В отличие от лабораторных условий, триггеры споруляции в природной среде обитания неизвестны. Они могут оказаться совершенно иными, если принять во внимание:

- лимитированный рост бактерий в микроколониях на поверхности или внутри твердого субстрата, например почвенной частицы;
- широкий спектр воздействующих на бактерии физико-химических факторов, в том числе экстремальных;
- развитие бактерий не в аксеничных культурах, а в составе смешанных популяций, в частности в симбиозах.

Какова природа исходных внешних индукторов, которые изменяют характер экспрессии генов? Иными словами, как происходит выбор между «вялой» вегетативной адаптацией к неблагоприятным внешним условиям и споруляцией, в результате чего сигма-фактор домашнего хозяйства σ^A повышает уровень глобального транскрипционного фактора — белка Spo0A?

Белок Spo0A связывается со своей мишенью («Spo0A-боксом» ДНК). Он непосредственно активирует 40 и репрессирует 80 генов, в том числе гены нескольких транскрипционных факторов, и косвенно контролирует до 400 других генов.

Ген *spo0A* имеет два промотора. Один из них распознается σ^A -формой РНК-полимеразы и используется при конститутивном синтезе белка Spo0A клетками растущей культуры. Другой промотор распознается σ^H -формой РНК-полимеразы и используется при споруляции. Ген белка σ^H (*spo0H*) дерепрессируется с помощью мастер-регулятора Spo0A~P, который одновременно репрессирует ген *abrB*.

Низкомолекулярный ДНК-связывающий белок AbrB (сокр. англ. antibiotic resistance protein B) слабо экспрессируется в растущей популяции низкой плотности, однако накапливается с началом стационарной фазы. Этот глобальный регулятор контролирует гены «переходного состояния»; в частности, он отвечает за образование репрессора генов споруляции.

Установлено, что споруляцию определяют три типа сигналов (рис. 246). Во всех случаях центральным регуляторным звеном служит фосфорилирование глобального фактора транскрипции Spo0A, которое осуществляется с помощью автофосфорилирующихся киназ.

Первый тип сигнала — это так называемый *старт-сигнал*. Его приемником служит киназа KinA. Она содержит несколько АТФ-связывающих каталитических доменов, чувствительных к уровню редокс-потенциала. При посредстве этой ключевой киназы клетка регистрирует свой собственный редокс- и энергетический статус. Негативным старт-сигналом служит нарушение репликации или повреждение ДНК, в результате чего активируется транскрипция гена *sda*. Белок Sda связывается с киназой KinA и блокирует ее автофосфорилирование.

Второй тип сигнала — это дефицит питательных субстратов, в частности, источника углерода, азота или фосфора. Внутриклеточным индикатором наступившего голодания служит резкое снижение уровня гуанозинфосфатов, особенно ГДФ и ГТФ (<1 мМ), из-за уменьшения их синтеза и/или использования ГТФ для образова-

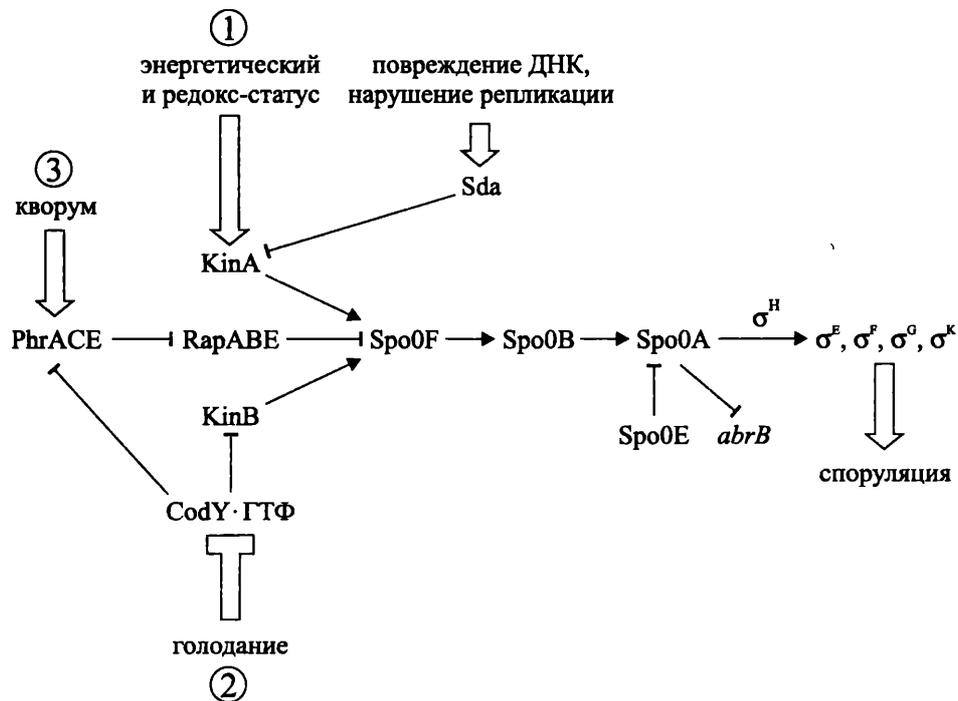


Рис. 246. Регуляторный путь при споруляции *B. subtilis*.

1, 2 и 3 — типы сигналов (объяснение в тексте); острые стрелки — активация; тупые стрелки — блокирование.

ния медиатора строгого ответа — (p)ppGpp (см. раздел 18.1.4). В отсутствии голодания ГТФ связывается с транскрипционным фактором CodY, переводя его в активную форму CodY ГТФ, которая блокирует вторую ключевую киназу споруляции — KinB.

От киназ KinA и KinB фосфорильная группа переносится по фосфореле через промежуточные белки Spo0F и Spo0B на фактор транскрипции Spo0A. В условиях, не благоприятствующих споруляции, белок Spo0A~P дефосфорилируется белком Spo0E.

Третий тип сигнала — это достижение определенного уровня плотности популяции. Индикатором кворума служат пептидные аутоиндукторы Phr (продукты генов *phrA*, *phrC* и *phrE*), которые секретируются во внеклеточную среду. В результате их процессинга и последующего импорта образуются пентапептиды, которые вытесняют дефосфорилирующие белки RapABE из комплекса с промежуточным белком Spo0F~P. Транскрипция генов *phrA* и *phrE* репрессируется активным белком CodY ГТФ.

Таким образом, экспрессия генов споруляции контролируется регуляторным каскадом, состоящим из ДНК-связывающего белка Spo0A, а также пяти сигма-факторов (σ^H , σ^E , σ^F , σ^G и σ^K), которые синтезируются в строгой последовательности и связываются со специфическими промоторами.

Экспрессия ранних генов споруляции *B. subtilis* определяется активированным ДНК-связывающим белком Spo0A, который запускает асимметричное деление и

транскрипцию глобальных регуляторов спорогенеза *spoIIA*, *spoIIIE* и *spoIIIG*. Клетки, содержащие белок Spo0A~P, секретируют киллер-фактор, убивающий клетки с неактивной формой белка Spo0A. В результате такого каннибализма спорогенная часть популяции использует метаболические ресурсы своих сородичей.

Переход к споруляции зависит не только от белка Spo0A, но и регулируется альтернативным сигма-фактором σ^H . Под его контролем находятся гены *spoIIID* и *spoIIIM*, продукты которых участвуют в образовании споровой септы.

После формирования споровой септы активность белка Spo0A продолжает возрастать в спорангии, но снижается в преспоре. В результате взаимной изоляции сестринских хромосом общая программа экспрессии генов споруляции подразделяется на две самостоятельные программы. Одна из них реализуется в преспоре, а другая в спорангии (см. рис. 245).

В преспоре активируется сигма-фактор σ^F , а в спорангии — сигма-фактор σ^E . До образования споровой септы сигма-фактор σ^F поддерживается в неактивном состоянии с помощью антисигма-фактора Spo0AB. Активация сигма-фактора σ^F обеспечивается анти-антисигма-фактором SpoIIAA. Последний, в свою очередь, переводится в активную дефосфорилированную форму с помощью белка SpoIIIE (благодаря взаимодействию с Z-кольцом этот белок реагирует на асимметричное деление). Активация сигма-фактора σ^E в спорангии обеспечивается протеазой SpoIIIGA после того, как из преспоры поступает сигнал в виде белка SpoIIR.

«Ранний» сигма-фактор σ^G синтезируется в преспоре и поддерживается в неактивном состоянии до завершения процесса поглощения, тогда как «поздний» сигма-фактор спорангия σ^K активируется протеазой SpoIVFB.

Сигма-фактор σ^G активирует ряд генов преспоры, в частности, гены главных ДНК-связывающих SASP-белков. В свою очередь, сигма-фактор σ^K совместно с ДНК-связывающим белком GerE регулирует образование споровых покровов. В результате экспрессии генов споруляции эндоспора образуется как «снаружи», с помощью аппарата трансляции спорангия, так и «изнутри», за счет аппарата трансляции самой преспоры. В частности, дипиколиновая кислота синтезируется в спорангии с помощью продуктов локуса *spoVF*, находящегося под контролем сигма-фактора σ^K , и транспортируется в кор с помощью продуктов локуса *spoVA*, находящегося под контролем сигма-фактора σ^G .

Прорастание эндоспор. Хотя зрелая эндоспора находится в анабиозе, она непрерывно регистрирует сигналы об экологической обстановке окружающей среды. В благоприятных условиях она дедифференцируется и выходит из спорангия. Данный процесс подразделяется на два основных этапа — прорастание и превращение в вегетативную клетку.

Эндоспоры *прорастают* (англ. germination) под воздействием *индукторов прорастания* (англ. germinant), которые могут быть физиологическими и нефизиологическими. В экспериментальных условиях физиологическими, или трофическими индукторами служат некоторые аминокислоты и сахара, а также пуриновые нуклеозиды. Известны и комплексные физиологические индукторы, например, для *B. subtilis* это смесь аспарагина, глюкозы, фруктозы и катионов K^+ («AGFK»). К числу физико-химических, или нефизиологических индукторов относятся минеральные соли (в частности, KBr), экзогенный дипиколинат кальция, лизоцим и катионные детергенты (например, додециламин), сублетальный тепловой шок, а также давление в 100–600 мПа.

Прорастание начинается через считанные секунды после добавления индуктора,

а затем продолжается независимо от его присутствия. Оно состоит из пяти последовательных стадий:

- экскреции H^+ (с повышением рН кора от 6,5 до 7,7), а также катионов K^+ , Na^+ и Zn^{2+} ;
- выхода дипиколиновой кислоты в комплексе с катионами Ca^{2+} (Ca^{2+} -DPA);
- регидратации, или замещения (Ca^{2+} -DPA) молекулами H_2O ;
- лизиса муреина кортекса;
- дальнейшей регидратации, сопровождающейся набуханием кора и растяжением зародышевой стенки.

По завершении пятой стадии возобновляются энергетический метаболизм и биосинтез макромолекул, в результате чего происходит *превращение эндоспоры в вегетативную клетку* (англ. outgrowth).

Аппарат для прорастания эндоспоры состоит из: (1) рецепторов, с которыми связываются индукторы прорастания; (2) каналов для выхода минеральных катионов и Ca^{2+} -DPA; (3) гидролитических ферментов, которые разрушают кортекс.

Рецепторы аппарата прорастания *B. subtilis* кодируются взаимно гомологичными трицистронными оперонами *gerA*, *gerB* и *gerK*. Они ассоциированы с внутренней мембраной (в частности, амфипатический белок GerAA содержит пять трансмембранных доменов, интегральный белок GerAB десять трансмембранных доменов, а белок GerAC относится к периферическому типу). Рецепторы GerA распознают L-аланин, в то время как рецепторы GerB и GerK совместно распознают AGFK.

Для того, чтобы индукторы прорастания вступили в контакт с рецепторами внутренней мембраны, им необходимо преодолеть поверхностные структуры эндоспоры. Предполагается, что для этого используются специфические поры, в организации которых участвует белок GerP (продукт оперона *gerP*, который экспрессируется в спорангии с σ^K -зависимого промотора и негативно регулируется ДНК-связывающим белком GerE).

До сих пор неизвестно, каким образом сигнал о связывании индукторов с рецепторами передается другим компонентам аппарата прорастания; скорее всего, ключевым моментом является изменение жидкостно-кристаллического состояния мембраны.

Каналы для выхода минеральных катионов и Ca^{2+} -DPA в покоящейся эндоспоре закрыты; они открываются только после того, как индукторы прорастания связываются со своими рецепторами.

В ходе споруляции DPA синтезируется в спорангии и поступает в преспору по мембранным каналам против градиента концентрации, что, естественно, требует энергетических затрат. Напротив, выход Ca^{2+} -DPA при прорастании не подразумевает участия энергетического метаболизма. Предполагается, что «закачка» DPA и выход Ca^{2+} -DPA осуществляются с помощью одних и тех же белков, продуктов оперона *spoVA*.

В результате регидратации кора эндоспоры *B. subtilis* его объем увеличивается в 2–2,5 раза. Однако механизм поступления воды в кор по мере выхода из него Ca^{2+} -DPA до сих пор не выяснен.

Гидролитические ферменты CwlJ (с неизвестной каталитической спецификой) и SleB (трансгликозилаза), разрушающие кортекс в ходе прорастания, атакуют δ -лактамы мурамовой кислоты. Они синтезируются только при споруляции, причем CwlJ образуется в спорангии, а SleB — в преспоре. Для их таргетинга и стабилизации необходимы вспомогательные белки (соответственно, GerQ и YpeB). Дегра-

дация кортекса является относительно быстрым процессом и занимает несколько минут.

На этапе превращения эндоспоры в вегетативную клетку специфическая протеаза гидролизует SASP-белки; образующиеся аминокислоты используются в качестве субстратов для энергетического и конструктивного метаболизма. Одновременно с этим возобновляются дыхание и синтез АТФ.

Для высвобождения вегетативной клетки из спорангия частично разрушаются покровы и экзоспориум. По-видимому, ферментативное воздействие сочетается с физическим давлением, однако детали этого процесса еще не изучены.

* * *

Рассмотренные нами покоящиеся резистентные клетки являются продуктами дифференциации по эндогенным программам, которые запускаются при неблагоприятном изменении окружающей среды.

Специфические структурные и функциональные свойства, приобретенные цистами и эндоспорами, позволяют им лучше, по сравнению с вегетативными клетками, переносить стрессовые и, особенно, экстремальные условия. Умение адаптироваться, в свою очередь, определяет биологическую *пригодность* (англ. fitness) того или иного вида бактерий или архей.

Закончив тему онтогенеза, переходим к вопросам регуляции и адаптации.

ГЛАВА 18

РЕГУЛЯЦИЯ

The range of subjects comprehended within the domain of Biology is so wide, and my own acquaintance with them so imperfect, that it is not in my power to lay before you any general outline of the recent progress of the biological sciences.

(Круг вопросов, относящихся к сфере Биологии, столь широк, а мое знание их до такой степени неполно, что передать вам общие основы современного прогресса биологических наук мне не по силам).

A. R. Wallace. Tropical Nature and other Essays (London, 1878).

Термином *регуляция* (лат. *regulo* — направлять, упорядочивать) применительно к прокариотам обозначается опосредованный внутренними или внешними стимулами эндогенный контроль над структурной организацией и процессами жизнедеятельности особи, т. е. клетки или трихома.

Регуляторная сеть. Регуляторные системы объединяются в разветвленную и многоуровневую командную структуру, или *регуляторную сеть* (англ. *regulatory network*).

Назначение регуляторной сети состоит в том, чтобы обеспечить адаптацию путем сохранения уже достигнутого уровня гомеостаза или путем перехода на новый гомеостатический уровень. Чтобы регуляция была целесообразной, в обоих случаях подразумевается петля обратной связи.

Объекты регуляции. Под управлением регуляторных систем могут находиться:

- транспортер, фермент, структурный белок или компонент сигнального пути;
- информационная, транспортная или метаболическая система;
- биогенез или функционирование клеточной органеллы;
- интегральное онтогенетическое превращение;
- индивидуальный поведенческий акт;
- групповой коммуникационный процесс.

Регуляция транскрипции и посттранскрипционная регуляция. В основе регуляции в той или иной форме лежит воздействие на информационный процесс или передачу информации. Когда речь идет об экспрессии генов, в первую очередь, различают регуляцию транскрипции и посттранскрипционную регуляцию.

Регуляция транскрипции осуществляется через ДНК-содержащие структуры, в частности гены, а посттранскрипционная регуляция — через продукт транскрипции, т. е. РНК.

Центральную роль в адаптации к изменяющимся условиям внешней или внутренней среды играют продукты экспрессии генов домашнего хозяйства. Среди них центральное место занимает аппарат трансляции.

Из небелковых компонентов аппарата трансляции на уровне транскрипции регулируются:

- содержание «стабильных» РНК (рРНК и тРНК);
- набор и содержание «нестабильных» РНК (мРНК);
- набор и содержание регуляторных РНК.

Регуляция метаболизма и регуляция поведения. Прокариоты адаптируются к окружающей среде путем изменения характера и интенсивности своего метаболизма, что непосредственно зависит от транскрипции генов домашнего хозяйства.

Паттерн и уровень транскрипции генов домашнего хозяйства регулируются в меру трофических потребностей клетки, а также в соответствии с (а)биотическими условиями окружающей среды, которые могут изменяться не только быстро, но и резко.

Классическим примером служат энтеробактерии, в частности *E. coli*. До той поры, пока она остается в пищеварительном тракте хозяина, ее развитие протекает в относительно стабильных условиях на питательной среде, богатой субстратами. Выйдя наружу и очутившись в непостоянной, агрессивной и зачастую экстремальной (как правило, голодной) нише, *E. coli* испытывает стресс. Для того, чтобы сохранить жизнеспособность до начала нового цикла «внутриутробного» развития, этой бактерии необходимо обладать регуляторной сетью, позволяющей быстро адаптироваться к новым условиям существования.

Помимо метаболической адаптации, выраженной в изменении паттерна и уровня транскрипции генов домашнего хозяйства, прокариоты обладают способностью к поведенческой адаптации.

Применительно к прокариотам, понятие «поведение» включает в себя как двигательный акт, так и клеточную дифференциацию. При этом особь или популяция получают возможность сменить экологическую обстановку на более благоприятную, либо пассивно переживают период, неблагоприятный для жизнедеятельности, находясь в разной степени изоляции от окружающей среды.

18.1. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Контроль экспрессии генов у прокариотов, изученный главным образом для *E. coli*, осуществляется на четырех иерархических уровнях:

- на *локальном* уровне, путем регуляции транскрипции генов и оперонов;
- на *региональном* уровне, путем координированной регуляции транскрипции в регулоне, т. е. в группе из нескольких оперонов;
- на *надрегиональном* уровне, путем координированной регуляции транскрипции в стимулоне или модулоне, т. е. в группе из нескольких регулонов;
- на *высшем* уровне, путем регуляции общего паттерна транскрипции.

Таким образом, иерархический уровень регуляции транскрипции (рис. 247) повышается в ряду:

оперон → регулон → стимулон или модулон → высший уровень.

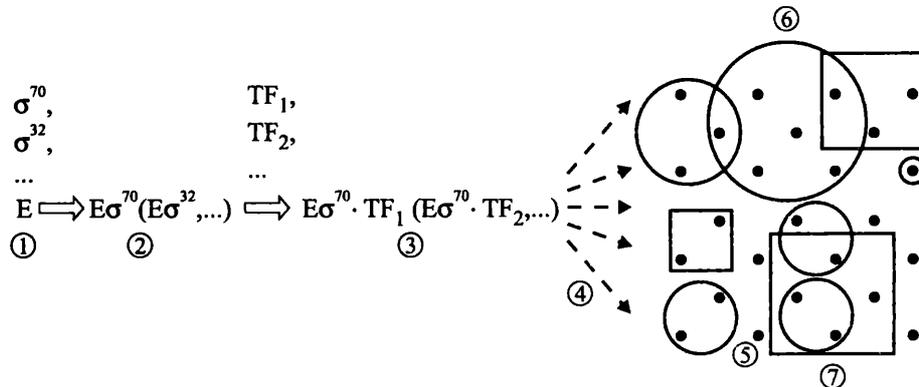


Рис. 247. Полиморфизм транскрипционного аппарата и иерархические уровни транскрипции.

1–2 — образование полиморфных голоферментов РНК-полимеразы; 2–3 — образование полиморфных транскрипционных комплексов с участием транскрипционных факторов (TF); 4 — выбор промоторов; 5 — опероны; 6 — регулоны; 7 — стимулоны.

Оперон. Базовый, самый изученный уровень регуляции транскрипции соответствует *оперону*. Напомним, что оперон представляет собой кассету физически сцепленных генов, которые используют общий промотор и общую систему регуляторных сайтов (см. раздел 16.3.1.2). За исключением генов оперона рРНК, гены оперонов транскрибируются в мультицистронные мРНК, содержащие открытые рамки считывания.

Для конкретного регуляторного уровня характерно использование специфических внешних сигналов и функционально обусловленных внутренних механизмов ответа.

В частности, экспрессия оперона, гены которого определяют тот или иной биосинтетический путь, репрессируется конечным продуктом. В свою очередь, экспрессия генов оперона, отвечающего за катаболический процесс, как правило, активируется субстратами данного процесса.

Регуляция на уровне оперона осуществляется ДНК-связывающими белками, которые синтезируются в относительно небольшом числе копий и специфически распознают несколько сайтов-мишеней.

Регулон. Следующий иерархический уровень регуляции соответствует *регулону* (англ. regulon; от лат. regulo и греч. ontos — существе; «нечто регулируемое»). Этот термин предложили в 1964 г. Маас (W. K. Maas) и Кларк (A. J. Clark) для обозначения группы оперонов, экспрессия которых координированно контролируется общим белком-регулятором под воздействием факторов окружающей среды, в частности, в ответ на тот или иной режим питания.

Опероны, входящие в состав регулона, не обязательно тесно сцеплены друг с другом, т. е. они могут быть разбросаны по генетической карте и даже могут регулироваться отдельно друг от друга. Однако все вместе они отвечают за реализацию общей физиологической функции (например, *nif*-регулон обеспечивает diazотрофию; см. II том учебника).

Мастер-регулятор (англ. master regulator), т. е. общим регулятором оперонов регулона служит белок-активатор или белок-репрессор, который действует совместно с низкомолекулярным лигандом-кофактором.

Регулоны подразделяются на *глобальные* и *локальные*. Глобальные регулоны содержат опероны и гены, имеющие отношение к нескольким клеточным системам, а локальные регулоны — только к одной системе.

Одним из примеров глобального регулона служит регулон SOS-ответа (см. ниже). Он негативно контролируется белком-репрессором LexA. В свою очередь, примером локального регулона служит *atg*-регулон энтеробактерий, отвечающий за биосинтез аргинина. Он состоит из восьми оперонов и регулируется белком-репрессором ArgR.

Активаторы и репрессоры распознают в оперонах унифицированную нуклеотидную последовательность. В отличие от относительно малокопийных ДНК-связывающих белков, осуществляющих регуляцию на уровне оперона (см. выше), регуляторные белки, которые контролируют регулон, синтезируются в большем числе копий и связываются с множественными сайтами ДНК.

Доказать существование регулона и выявить его функциональные компоненты можно несколькими способами.

Во-первых, анализируя с помощью двухмерного электрофореза набор меченых белков, синтез которых индуцируется внешним стимулом.

Во-вторых, вводя в оперон гибридные гены, продукты которых проявляют себя как фенотипические репортеры (зеленый флуоресцирующий белок GFP, люцифераза LuxAB и др.), или импортируя в него «селективные» гены с помощью трансформации или фаговой трансдукции (ген *cat* хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, ген *lacZ* β -галактозидазы и др.).

В третьих, анализируя частично или полностью секвенированный прокариотный геном на предмет наличия в нем консенсусных сайтов узнавания для того или иного белка-регулятора.

Стимулон и модулон. Следующие уровни регуляции соответствуют *стимулону* (англ. stimulon; от лат. stimulo — побуждать и греч. ontos — сущее; «нечто стимулируемое») и *модулону* (англ. modulon от лат. modulor — измерять и греч. optos — сущее; «нечто модулируемое»). Эти термины были предложены в 1996 г. Нейдхардтом (F. C. Neidhardt) и Саважо (M. A. Savageau) для обозначения совокупности оперонов и регулонов, экспрессия которых координированно регулируется в ответ на стрессовые воздействия со стороны окружающей среды. Соответствующие сигналы (об изменении осмомолярности, концентрации питательных субстратов и т. д.) влияют на уровень экспрессии генов и оперонов сразу в нескольких регулонах.

Стимулон — это совокупность оперонов и регулонов, уровень экспрессии которых изменяется под воздействием общего стимула при участии разных регуляторных белков. Как правило, термин «стимулон» используется, когда природа общего лиганда (или лигандов) неизвестна. В качестве примера стимулона можно привести *pol*-стимулон *Salmonella enterica* серовар Typhimurium. Когда эта энтеробактерия заражает макрофаги, у нее повышается уровень экспрессии 285 генов (75% генов, индуцируемых полимиксином) и снижается уровень экспрессии еще 298 генов (80% генов, репрессируемых антибиотиком).

Модулон — это совокупность оперонов и регулонов, уровень экспрессии которых изменяется под воздействием лиганда, общего для разных регуляторных белков. Например, гены и опероны железного стресса образуют *fit*-модулон; при этом лигандом служит катион Fe^{2+} (см. раздел 18.3.2.5).

Регуляторные белки стимулона или модулона характеризуются более высокой копийностью, чем регуляторы регулона. Они связываются с множественными и, как правило, вырожденными сайтами ДНК.

Высший уровень. На высшем иерархическом уровне контролируется активность до 50% генов. Совокупный продукт экспрессии этих генов обеспечивает адаптацию к новым условиям существования.

В данном случае ответ клетки на разнообразные внешние сигналы носит интегративный характер, а экспрессия отдельных генов устанавливается на базовом уровне, оптимальном для сохранения жизнеспособности и развития особи в широко варьирующих и быстро изменяющихся условиях окружающей среды.

Предполагается, что высший уровень регуляции непосредственно связан с изменением суперспирализации хромосомной ДНК (см. ниже).

Регуляторный путь при транскрипции. Регуляторный путь при транскрипции состоит из нескольких этапов (рис. 248).

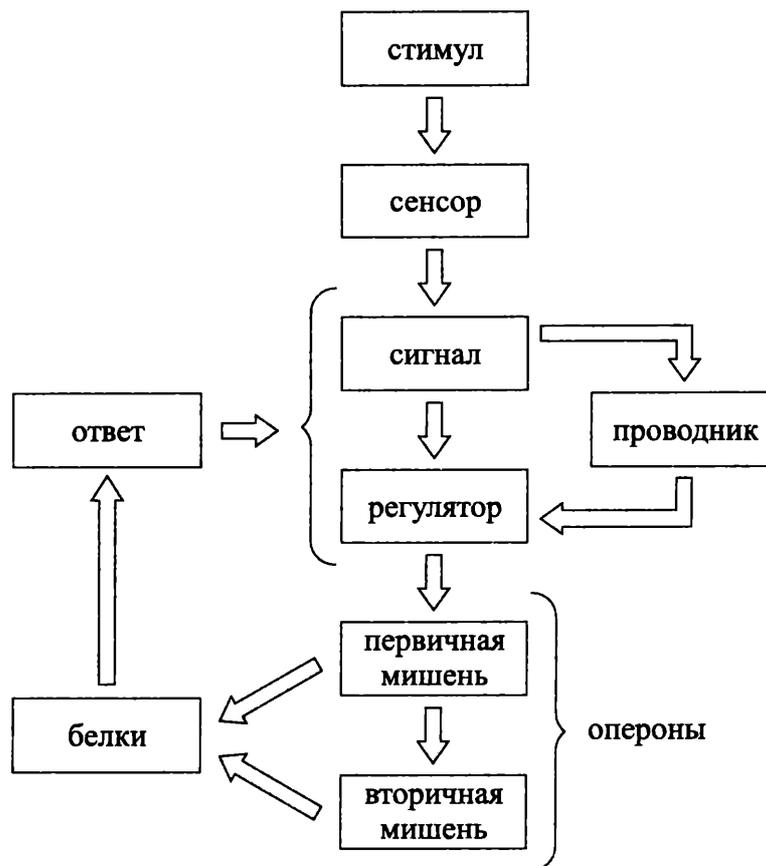


Рис. 248. Регуляторный путь при транскрипции.

Началом, или триггером служит *стимул*, роль которого играют повреждение ДНК или изменение условий внешней среды, например переход в анаэробные условия, повышение осмомолярности и т. д.

Стимул воспринимается *сенсором*, или рецепторным белком, который встроен в СМ или находится в цитозоле. Воздействие стимула на сенсор вызывает конформационный или химический *сигнал*. Этот сигнал, непосредственно или через один или несколько *передатчиков*, поступает на регулятор транскрипции, или просто *регулятор*.

Регулятор воздействует на первичную *мишень* — оперон, изменяя уровень экспрессии генов. В свою очередь, первичная мишень может контролировать одну или несколько вторичных мишеней.

Белковые продукты экспрессии мишеней вызывают *ответ*. Он выражается в том или ином адаптационном изменении, целесообразность и эффективность которого тестируются с помощью петли обратной связи, замкнутой на уровне блока сигнал/проводник/регулятор.

18.1.1. Регуляторы транскрипции

Экспрессия генов, т. е. специфика и интенсивность их считывания, контролируется в основном на этапе инициации транскрипции — когда голофермент РНК-полимеразы связывается с промотором, и происходит переход от закрытого комплекса к открытому комплексу (см. раздел 16.7.1.1).

В свою очередь, на инициацию транскрипции оказывают воздействие:

- «сила» промоторов, которая зависит от их нуклеотидной последовательности;
- регуляторы транскрипции, имеющие белковую природу;
- регуляторы транскрипции небелковой природы.

Регуляторы транскрипции, имеющие белковую природу, влияют на распознавание промоторов и их активность. В первом случае речь идет о *сигма-факторах*, а во втором случае о *транскрипционных факторах*. Принципиальное отличие сигма-факторов от транскрипционных факторов (активаторов или репрессоров) заключается в том, что первые связываются не с UAS-последовательностью или энхансером, что характерно для активатора, и не с оператором, что характерно для репрессора, а с кор-ферментом РНК-полимеразы.

Наряду с сигма-факторами (а также антисигма-факторами и анти-антисигма-факторами; см. ниже) и транскрипционными факторами в качестве регуляторов транскрипции выступают «архитектурные» ДНК-связывающие белки и ферменты, влияющие на суперспирализацию ДНК. В отличие от сигма-факторов и транскрипционных факторов они не обладают сродством к определенным последовательностям ДНК. Тем не менее, их обычно также называют транскрипционными факторами. К числу таких регуляторов транскрипции относятся:

- «архитектурные» ДНК-связывающие белки *Fis*, *H-NS* и *IHF*, которые локально изгибают молекулу ДНК (см. I том учебника, а также разделы 16.4.1.1, 16.6.1.2, 16.6.1.3 и 16.7.1.1 настоящего тома);
- ДНК-гираза, создающая отрицательные супервитки ДНК за счет использования энергии гидролиза АТФ (см. раздел 16.4.2);
- ДНК-топоизомераза *Toro I*, удаляющая отрицательные супервитки ДНК без затраты энергии АТФ (см. раздел 16.4.2);
- ДНК-топоизомераза *Toro IV*, удаляющая отрицательные супервитки ДНК без затраты энергии АТФ, а также устраняющая узлы и катенаны ДНК за счет энергии АТФ (см. раздел 16.4.2).

Напомним, что для хромосомной ДНК нормой является отрицательная суперспирализация (см. I том учебника). Ее локальный характер зависит от глобальных физиологических факторов эндотелной природы, в частности от энергетического заряда (см. II том учебника) или экзогенной природы, например от температуры,

осомолярности и парциального давления кислорода. От плотности распределения супервитков по хромосоме зависит конформация спейсерных участков в промоторах, что, в свою очередь, тем или иным образом влияет на инициацию транскрипции.

В отличие от сигма-факторов и транскрипционных факторов, архитектурные белки и ферменты, определяющие суперспирализацию ДНК, не распознают специфические последовательности ДНК. Тем не менее, некоторые из них могут проявлять предпочтение к определенным участкам хромосомы, что приводит к избирательной регуляции транскрипции. Например, ДНК-связывающий белок H-NS, который тяготеет к изгибам ДНК, подавляет транскрипцию многих генов в стационарной фазе.

Регуляторы транскрипции небелковой природы также влияют на активность промоторов или их распознавание. В качестве примеров назовем метильную группу, ковалентное связывание которой модифицирует основания ДНК (см. разделы 16.5.2 и 16.8); медиатор «строгого» ответа (p)rrpGpp, нековалентно связывающийся с

РНК-полимеразой (см. раздел 18.1.4); аллостерический регулятор 3',5'-цикло-АМФ, влияющий на инициацию транскрипции (см. раздел 16.7.1.1) и ряд других.

18.1.1.1. Сигма-факторы

Напомним, что мультисубъединичный кор-фермент бактериальной РНК-полимеразы ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) осуществляет элонгацию и терминацию. Однако он не может самостоятельно распознавать промоторы и эффективно иницировать транскрипцию. Для этой цели существует дополнительная субъединица σ , которая присоединяется к кор-ферменту (см. раздел 16.7.1). Конкурентная замена одного сигма-фактора другим сигма-фактором перенастраивает РНК-полимеразу на транскрипцию ранее молчавших генов.

Большинство бактерий образует несколько σ -факторов — например, у *E. coli* имеется главный сигма-фактор σ^{70} и шесть дополнительных сигма-факторов (σ^S , σ^{32} , σ^F , σ^E , σ^{fecI} и σ^{54}), каждый из которых распознает разные консенсусные последовательности промоторов.

За счет конкуренции сигма-факторов за связь с кор-ферментом не только поддерживается базовый уровень транскрипции, но и регулируется уровень экспрессии генов в ответ на разнообразные внешние (экологические) или внутренние (онтогенетические) стимулы. Помимо сигма-факторов, в регуляции транскрипции участвуют антисигма-факторы, анти-антисигма-факторы, а также транскрипционные факторы, число которых в случае *E. coli* достигает 350 (см. ниже).

Сигма-факторы представляют собой гетерогенное семейство белков сравнительно небольшого размера (20–70 кДа). Они обратимо связываются с кор-ферментом *E. coli* РНК-полимеразы, в результате чего образуется голофермент $E\sigma$ (рис. 249).

При связывании голофермента с (–35...–10) областью промотора первоначально возникает транскрипционно не активный, или закрытый комплекс. В результате плавления дуплекса ДНК в –10 участке связывания голофермента образуется транскрипционный пузырь открытого комплекса (см. раздел 16.7.1.1). На ранней стадии транскрипции в области промотора синтезируются abortивные транскрипты размером 2–12 п.н. Затем сигма-фактор высвобождается, и кор-фермент РНК-полимеразы начинает двигаться вдоль матрицы, синтезируя на антисмысловой цепи пер-

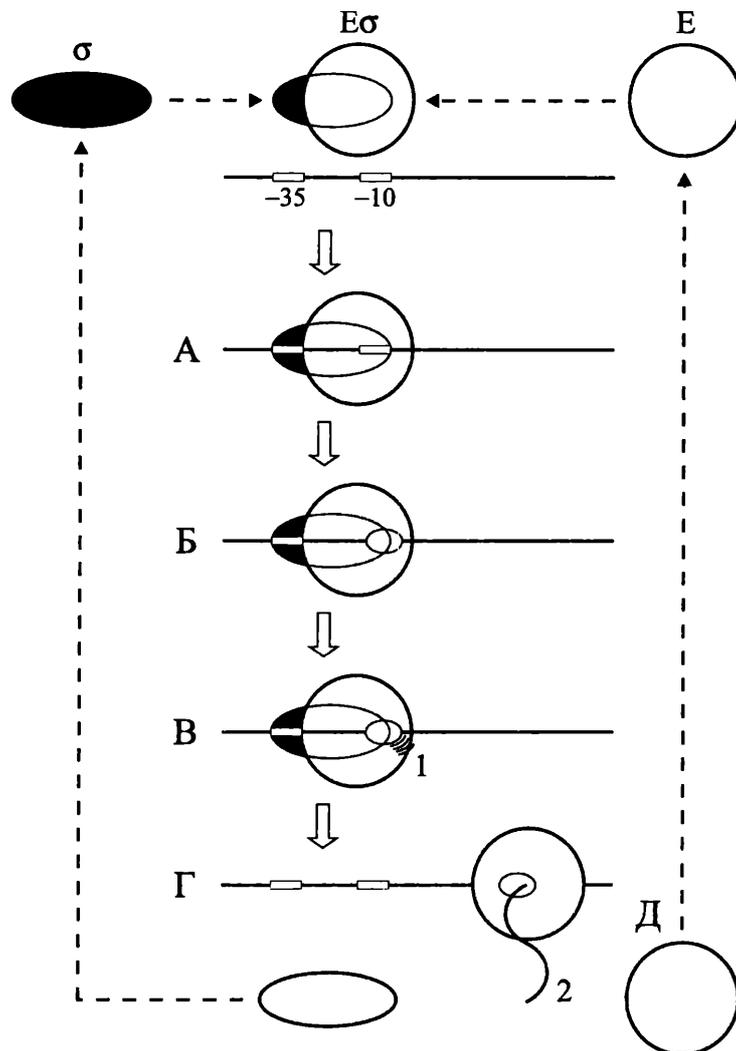


Рис. 249. Участие сигма-факторов в инициации транскрипции.

А — связывание голофермента с промотором (образование закрытого комплекса); Б — образование транскрипционного пузыря (открытый комплекс); В — синтез abortивных транскриптов; Г — освобождение сигма-фактора (элонгация); Д — освобождение кор-фермента РНК-полимеразы (терминация); 1 — abortивные транскрипты; 2 — первичный транскрипт.

вичный транскрипт — молекулу мРНК, рРНК или тРНК. По достижении терминатора транскрипция завершается, РНК-полимераза отделяется от матрицы (рис. 249), и дуплекс ДНК реконструируется.

Частота актов инициации транскрипции, или сила промотора зависит от нуклеотидной последовательности и конформации ДНК в этом специфическом участке. Сигма-фактор распознает две консервативные области промотора — *консенсусные*

последовательности, которые обычно занимают положение с координатами, соответственно, -35 и -10.

Классификация сигма-факторов. Согласно гомологии их первичной последовательности, сигма-факторы можно разбить на два семейства – семейство σ^{70} (по названию первичного сигма-фактора *E. coli*; 70 кДа) и не гомологичное ему семейство σ^{54} (по названию сигма-фактора, контролирующего азотный метаболизм *E. coli*; 54 кДа).

Номенклатура сигма-факторов довольно запутанна. Если у грамотрицательных бактерий они обычно обозначаются как Rpo (сокр. англ. RNA polymerase), то в случае грамположительных бактерий часто используется сокращение Sig (от англ. sigma) или Hrd (от англ. homologue of RpoD). В обоих случаях может вводиться надстрочный индекс, обозначающий молекулярную массу (кДа). Однако когда известен ген сигма-фактора, надстрочным индексом становится название этого гена, например σ^{fecI} . Наконец, помимо широкого использования синонимов, один и тот же сигма-фактор у разных бактерий может иметь разные названия; в то же время случается, что обозначения разных сигма-факторов досадно совпадают (см. табл. 30).

Сигма-факторы семейства σ^{70} (общие сведения). Все бактерии содержат от одного (*Mycoplasma* spp.) до нескольких сигма-факторов этого семейства, а в случае *Streptomyces coelicolor* их число превышает 60. В первичной последовательности этих белков имеются четыре консервативных участка:

– наименее консервативный N-концевой участок 1, состоящий из области 1.1 (только у первичных сигма-факторов; влияет на связывание ДНК и инициацию транскрипции) и области 1.2 (отвечает за образование открытого комплекса);

– наиболее консервативный участок 2, состоящий из областей 2.1–2.5 (отвечают за взаимодействие с кор-ферментом, за плавление дуплекса ДНК и за распознавание консенсусной последовательности в позиции -10);

– участок 3, который состоит из областей 3.1 и 3.2 (последняя отсутствует у сигма-факторов σ^K и σ^H) и отвечает за связывание с кор-ферментом;

– С-концевой участок 4, состоящий из областей 4.1 (отвечает за связь с активаторами) и 4.2 (отвечает за распознавание консенсусной последовательности в позиции -35).

Семейство σ^{70} , в свою очередь, подразделяется на группы 1–3 (табл. 30).

Группа 1. В нее входят *первичные* (англ. primary), или *незаменимые* (англ. essential) сигма-факторы. Они отвечают за транскрипцию большинства генов домашнего хозяйства, от которых зависит жизнеспособность бактерий и которые экспрессируются при экспоненциальном росте. Конкретный вид бактерий содержит только один первичный сигма-фактор – σ^{70} в случае *E. coli* (ген *rpoD*); σ^A в случае *B. subtilis* и других представителей фила *Firmicutes*; MysA в случае *Mycobacterium* spp.; HrdB в случае *Streptomyces* spp. и т. д. Консенсусные последовательности, узнаваемые этими сигма-факторами, очень консервативны, и отклонение от них значительно уменьшает силу промоторов. В том случае, когда консенсусная последовательность в позиции -35 вообще отсутствует, сильный промотор имеет расширенную последовательность TGNTATAAT в позиции -10.

Группа 2. В нее входят *необязательные* (англ. non-essential) сигма-факторы. Они обладают высокой степенью гомологии с первичными сигма-факторами и, вероятно, распознают такие же промоторные участки, однако рост и сохранение жизнеспособности бактерий от них не зависят. Данная группа, в свою очередь, подразделяется на три подгруппы.

Таблица 30. Сигма-факторы

Группа	Подгруппа	Название, синоним	Распространение	Консенсусные последовательности промотора		
				-35	Спейсер	-10
Семейство σ^{70}						
Первичные (1)	Без подгруппы	σ^{70} (RpoD)	<i>Proteobacteria</i>	TTGACA	16-18*	TATAAT
		σ^A (SigA)	<i>Firmicutes</i>	TTGACA	16-18	TATAAT
		MysA	<i>Mycobacterium</i> spp.	-	-	-
		HrdB	<i>Streptomyces</i> spp.	-	-	-
Необязательные (2)	Стационарной фазы (2.1)	σ^{38} (σ^S , RpoS)	Энтеробактерии, <i>Pseudomonas</i> spp.	Her	Her	CTATACT
		Цианобактерий (2.2)	SigB-E	<i>Synechococcus</i> spp.	-	-
	SigBC		<i>Anabaena</i> spp., <i>Synechocystis</i> spp.	-	-	-
	GC-богатых актинобактерий (2.3)	MysB	<i>Mycobacterium</i> spp.	-	-	-
		SigB	<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	-
		HrdA, C-E	<i>Streptomyces</i> spp.	-	-	-
	Альтернативные (3)	Флагеллогенеза (3.1)	σ^{28} (FliA, SigD)	Энтеробактерии	TAAA	15
σ^D			<i>B. subtilis</i>	TAAA	15	GCCGATAA
WhiG			<i>Streptomyces</i> spp.	TAAA	15	GCCGATAA
ECF (3.2)		σ^E (SigE)	<i>E. coli</i> , <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Streptomyces coelicolor</i>	GAACTT	16-17	TCTRA
			<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
			<i>Mycococcus xanthus</i>	-	-	-
			<i>Ralstonia eutropha</i>	-	-	-
			<i>E. coli</i>	-	-	-
			<i>P. syringae</i>	-	-	-
			<i>P. fluorescens</i>	-	-	-
Теплового шока: σ^{32} и ему подобные (3.3.1)		σ^{32} (RpoH)	Грамотрицательные бактерии	GTTGAA	11-16	CCCATNT
			<i>M. xanthus</i> , <i>Stigmatella aurantiaca</i>	GTTTAA	12-14	RGAAT
Теплового шока: σ^B и ему подобные (3.3.2)		σ^B (SigF)	<i>B. subtilis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp.	GTTTAA	12-14	GGGTAT

Окончание табл. 30.

Группа	Подгруппа	Название, синоним	Распространение	Консенсусные последовательности промотора		
				-35	Спейсер	-10
Семейство σ^{70}						
Альтернативные (3)	Спорогенеза (3.4)	σ^H (Spo0H)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	AGGA-WWT	12-14	RGAAT
		σ^E (SpoIIGB)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	GKCAT-ATT	13-15	CATAC-TA
		σ^F (SpoIIAC)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	WGCA-TA	14-15	GGNRA-YAMTW
		σ^G (SpoIIIG)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	TGAA-TA	17-18	CATAN-ANTA
		σ^K (SpoIIIC)	<i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.	AC	16-17	CATAN
Семейство σ^{54}						
Сигма-54	Без подгруппы	σ^N (RpoN, SigL)	<i>Aquifex aeolicus</i> , <i>Proteobacteria</i> , GC-бедные <i>Firmicutes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Chlamydiae</i> , <i>Spirochaetes</i>	TGGC-AC (-26) \pm 1	5	TTGCW (-11) \pm 1

Обозначения: N — один из четырех нуклеотидов; R — A или G; W — A или T; Y — C или T; M — A или C; K — G или T; * — п.н.; — — данные отсутствуют.

Подгруппа 2.1. К ней относятся *сигма-факторы стационарной фазы*, в частности сигма-фактор σ^{38} (σ^S , RpoS) *E. coli* и других энтеробактерий. Они известны преимущественно как глобальные регуляторы транскрипции при вхождении в стационарную фазу. Помимо этого они играют ведущую роль в условиях гиперосмотического или кислотного стресса. Гены, контролируемые этими сигма-факторами, отвечают за репарацию ДНК, за барьерные свойства оболочки, морфогенез, осмопротективные системы, термостабильность, биосинтез запасных полимеров и т. д. В экспоненциально растущих клетках сигма-факторы σ^{38} нестабильны и разрушаются протеазой ClpXP. Отсутствие консервативной последовательности в области -35 не влияет на силу распознаваемых ими промоторов благодаря тому, что ДНК в этой области образует изгиб.

Подгруппа 2.2. Данную подгруппу составляет обособленный кластер сигма-факторов, выявленных только у нескольких штаммов одноклеточных и трихомных цианобактерий. Они контролируют экспрессию генов в ходе циркадных ритмов (см. раздел 17.1.3), а также образуются при азотном голодании, хотя не участвуют в дифференциации гетероцист (см. раздел 17.5.1.2). В случае *Synechococcus* spp. сигма-фактор SigE регулирует транскрипцию генов углеродного и азотного метаболизма в фазе замедленного роста, что указывает на его функциональное сходство с сигма-факторами σ^{38} .

Подгруппа 2.3. Сигма-факторы, принадлежащие к этой подгруппе (MysB в случае *Mycobacterium* spp., SigB в случае *Corynebacterium glutamicum* и HrdA, C-E в случае *Streptomyces* spp.), сильнее дивергировали друг с другом, чем представители двух предыдущих групп, хотя обладают ими филогенетически родственные бактерии. Функции этих сигма-факторов в настоящее время неизвестны.

Группа 3. В нее входят *альтернативные* (англ. alternative) сигма-факторы. Они сильно отличаются по аминокислотной последовательности от первичных сиг-

ма-факторов и контролируют транскрипцию специфических регулонов в особых физиологических условиях или при дифференциации.

Данная группа, в свою очередь, подразделяется на четыре подгруппы.

Подгруппа 3.1. К ней относятся сигма-факторы биогенеза жгутика, или *флагеллогенеза* (англ. flagellar). В частности, сигма-фактор σ^{28} (FliA, SigD) энтеробактерий, сигма-фактор σ^D *B. subtilis* и сигма-фактор WhiG *Streptomyces* spp. контролируют гены, которые кодируют белки, участвующие в сборке нити жгутика, а также белки хемотаксиса. В случае *S. coelicolor*, образующего воздушный мицелий, сигма-фактор WhiG регулирует ранние гены споруляции (см. раздел 17.5.2.2).

Подгруппа 3.2. Членами этой подгруппы являются сигма-факторы *ECF* (сокр. англ. extracytoplasmic functions). Они контролируют разнообразные «экстравертные» ответы на внеклеточные, чаще всего неблагоприятные стимулы. В этих ответах участвуют поверхностные структуры и транспортные системы. Например, сигма-фактор σ^E (SigE) *E. coli* индуцируется при нарушении фолдинга периплазматических белков; сигма-факторы FecI *E. coli* и PbrA *Pseudomonas fluorescens* контролируют импорт железа; сигма-фактор CrnH отвечает за устойчивость *Ralstonia eutropha* к никелю и за экскрецию кобальта у этой бактерии; сигма-фактор SigX определяет резистентность *B. subtilis* к тепловому шоку; сигма-фактор CarQ регулирует биосинтез фотопротекторных каротиноидов у *Mycococcus xanthus*, а сигма-фактор AlgU — биосинтез защитного полимера альгината у штаммов *P. aeruginosa*, вызывающих цистозный фиброз легких; сигма-фактор HrpL держит под контролем транскрипцию и секрецию факторов вирулентности у фитопатогенной бактерии *P. syringae* и т. д.

Подгруппа 3.3. В нее входят сигма-факторы *теплового шока* (англ. heat shock). Белки теплового шока синтезируются при термическом стрессе и некоторых других стрессах, например токсическом (см. раздел 19.1.8). Они играют роль молекулярных шаперонов, обеспечивающих правильный фолдинг белков, или роль протеаз, расщепляющих неправильно уложенные белки.

Подгруппа 3.3, в свою очередь, содержит два подраздела.

К подразделу 3.3.1 относится сигма-фактор σ^{32} (RpoH) *E. coli* и подобные ему сигма-факторы ряда других грамотрицательных бактерий. При повышенной температуре синтез σ^{32} усиливается, и стабильность этого сигма-фактора возрастает; напротив, в нормальных условиях последний образует комплекс с белком DnaK и расщепляется металлопротеазой FtsH. Большинство бактерий содержит только один Rpo-подобный сигма-фактор. Исключением служат миксобактерии *Mycococcus xanthus* и *Stigmatella aurantiaca*, у которых таких сигма-факторов два (SigBC). Они контролируют образование плодовых тел и дифференциацию микоспор.

К подразделу 3.3.2 относится сигма-фактор σ^B (SigF) *B. subtilis* и ему подобные сигма-факторы ряда других грамположительных бактерий. Он играет роль глобального регулятора при общем стрессе, т. е. проявляет функциональное сходство с сигма-факторами σ^{38} . Его экспрессия усиливается при вхождении в стационарную фазу, а также при повышении температуры или воздействии токсикантов. Сигма-фактор σ^B регулирует экспрессию >40 генов белков общего стресса, которые индуцируются в стационарной фазе, при азотном голодании и окислительном стрессе, а также при холодном или токсическом шоке.

Подгруппа 3.4. К этой группе относятся сигма-факторы спорогенеза σ^H , σ^E , σ^F , σ^G и σ^K , наиболее изученные на примере *Bacillus* spp. (см. раздел 17.5.2.2).

Одни из них специфичны для материнской клетки (σ^H), другие — для спорангия (σ^E и σ^K), третьи — для преспоры (σ^F и σ^G).

Сигма-факторы семейства σ^{54} (общие сведения). Представители этого семейства не гомологичны представителям семейства σ^{70} и отличаются от последних в функциональном отношении. Эти сигма-факторы распространены широко, однако нерегулярно. В частности, они отсутствуют у грамположительных бактерий с высоким содержанием GC-пар, а также у цианобактерий.

Сигма-факторы семейства σ^{54} регулируют экспрессию большого числа генов с разнообразными функциями; в этом отношении они похожи на сигма-факторы семейства σ^{70} . В частности, это ряд генов углеродного и азотного метаболизма; гены регуляторных, структурных и транспортных белков; гены дифференциации; гены хемотаксиса; гены вирулентности и т. д.

В аминокислотной последовательности сигма-факторов σ^{54} имеются:

- короткий консервативный N-концевой участок размером 25–50 а.о.;
- короткий вариабельный срединный участок размером 60–100 а.о.;
- длинный C-концевой участок размером 400 а.о., который, в свою очередь, подразделяется на: (1) X-линкер, связывающийся с ДНК; (2) область, или мотив «спираль–шпилька–спираль» (англ. helix-turn-helix, НТН), образующую изгиб, и (3) консервативный RpoN-бокс, участвующий в распознавании промотора.

Способ инициации транскрипции голоферментом, в состав которого входят сигма-факторы семейства σ^{54} , отличается от способа инициации транскрипции с участием сигма-факторов семейства σ^{70} . Все известные промоторы, распознаваемые первыми, нуждаются в активаторах транскрипции (см. раздел 16.7.1), тогда как инициация транскрипции с использованием вторых в большинстве случаев обходится без активаторов.

Активаторный белок связывается с энхансером, расположенным на расстоянии ≥ 100 п.н. левее стартовой точки транскрипции (+1). При этом, как и в случае эукариотных РНК-полимераз, расходуется энергия АТФ.

К числу RpoN-активаторов, в частности, относятся: белок NtrC (контроль diaзотрофии у *Klebsiella pneumoniae*), белок DctD (контроль транспорта дикарбоксилатов у *Rhizobium* spp.), белок FhlA (контроль форматного регулона *E. coli*) и белок XylR (контроль деградации ароматических соединений у *P. putida*).

18.1.1.2. Антисигма-факторы и анти-антисигма-факторы

Антисигма-фактором называется белок, который косвенно регулирует транскрипцию путем взаимодействия с «родственным» сигма-фактором, что приводит к инактивации последнего (примерами служат пары сигма-фактор σ^{28} /антисигма-фактор FlgM, сигма-фактор σ^F /антисигма-фактор SpoIIAB, сигма-фактор σ^E /антисигма-фактор RseA и др.).

Образование комплекса носит обратимый характер, и сигма-фактор инактивируется до тех пор, пока он снова не понадобится для транскрипции.

В частности, у пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* альтернативный сигма-фактор σ^E из подгруппы 3.2 отвечает за адаптивную транскрипцию генов в ответ на присутствие агента окислительного стресса — синглетного кислорода 1O_2 (см. раздел 19.1.6).

Без стресса этот сигма-фактор находится в неактивном состоянии в комплексе с антисигма-фактором ChrR, который относится к «цинковому» семейству антисигм (англ. zinc anti-sigmas,

ZAS). В таких белках катион Zn^{2+} координирует пару остатков Cys. Под воздействием синглетного кислорода цинк удаляется, образуется дисульфидный мостик, и конформация антисигма-фактора ChrR изменяется. В результате этого сигма-фактор σ^E освобождается из комплекса и запускает транскрипцию генов, продукты которых защищают бактерию от окислительного стресса.

В случае *Salmonella enterica* серовар Typhimurium антисигма-фактор FlgM регулирует активность своего собственного промотора. Пока происходит сборка базального тела и крюка жгутика, FlgM блокирует сигма-фактор σ^{28} , в результате чего экспрессия гена флагеллина подавляется. По завершении сборки базального тела и крюка белок FlgM начинает экспортироваться по их общему внутреннему каналу, сигма-фактор σ^{28} освобождается из комплекса, и синтез флагеллина запускается вновь. После кэпирования нити (см. I том учебника) FlgM перестает экспортироваться и опять связывается с σ^{28} , что в очередной раз приводит к блокированию транскрипции гена флагеллина.

В отличие от сигма-факторов, антисигма-факторы широко варьируют по первичной и вторичной структуре. Благодаря этому они могут реагировать на различные стимулы и участвовать в разных регуляторных механизмах.

Антисигма-факторы, в свою очередь, регулируются анти-антисигма-факторами. В качестве примера можно привести происходящую в ходе спорогенеза регуляцию раннего сигма-фактора σ^F тандемом антисигма-фактор SpoIIAB/анти-антисигма-фактор SpoIIAA (см. раздел 17.5.2.2).

18.1.1.3. Транскрипционные факторы

Транскрипционные факторы (англ. transcription factor, TF) — это ДНК-связывающие белки с регуляторной функцией. Они активируют или репрессируют взаимодействие между промоторами и сигма-факторами РНК-полимеразы. Франсуа Жакоб метко назвал их «двуглавыми» молекулами, на том основании, что они содержат два функциональных сайта:

— ДНК-связывающий сайт, обладающий сродством к специфической нуклеотидной последовательности, которая находится за пределами промотора или частично перекрывается с промотором;

— аллостерический сайт, который не ковалентно взаимодействует с субстратом-лигандом или модифицируется ферментативным путем.

В некоторых случаях под воздействием лиганда изменяются редокс-состояние и способность TF образовывать мультимерные комплексы, что также влияет на сродство TF к специфическим сайтам ДНК.

TF изменяют экспрессию генов на стадии инициации транскрипции. Большинство TF-активаторов непосредственно взаимодействует с РНК-полимеразой, что рекрутирует ее в область промотора-мишени; характерным примером являются белки CRP — рецепторы 3',5'-цикло-АМФ (см. раздел 16.7.1.1). Реже используется альтернативный механизм, когда TF-активатор влияет не на конформацию ДНК-полимеразы, а изменяет конформацию промоторного участка, в результате чего последний лучше распознается РНК-полимеразой (примером служат TF из семейства MerR). Для TF, активирующих σ^{70} -зависимые промоторы, область связывания с ДНК имеет координату от -30 до -80, в то время как для TF, активирующих σ^{54} -зависимые промоторы — от -100 до -1000 или еще дальше от старта транскрипции.

Под контролем TF находятся гены, которые кодируют продукты, имеющие отношение к разным структурам и процессам. Тем не менее, взаимное влияние TF на «чужие» промоторы позволяет корегулировать экспрессию разных оперонов. В

свою очередь, согласованное изменение паттерна транскрипции обеспечивает адаптационный характер клеточного ответа.

Число разновидностей TF у конкретного вида бактерий может быть очень большим. Например, из 4,4 тыс открытых рамок считывания *E. coli* около 300 (8%) представляют собой известные или предполагаемые TF. Относительно немногие из них контролируют уровень экспрессии 50% идентифицированных генов (CRP — 197 генов, IHF — 101, FNR — 111, Fis — 76, NarL — 65, ArcA — 63, Lrp — 53).

Информация о регуляторной сети, контролирующей транскрипцию *E. coli* в разных физиологических условиях, в том числе информация об организации оперонов и регулонов, а также о TF содержится в базе данных RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>).

Важнейшие стимулы, воздействующие на структуру TF, или *глобальные регуляторы* вызывают комплексный, или *плейотропный* фенотипический ответ (от греч. pleio — множественный и tropos — направление). Они регулируют опероны, отвечающие за разные клеточные системы и метаболические пути, за исключением незаменимых. Поскольку опероны регулона содержат одинаковый регуляторный элемент, часто называемый «боксом», использование TF позволяет контролировать совместную экспрессию многочисленных генов и оперонов.

«Эндогенные» и «экзогенные» транскрипционные факторы. TF могут отвечать на регуляторные стимулы эндогенного или экзогенного происхождения. В первом случае говорят об «эндогенных» TF, во втором случае — об «экзогенных» TF.

«Эндогенные» TF. На внутренние стимулы непосредственно реагируют примерно 25% TF. Они активируются в результате связывания лигандов, которые представляет собой эндогенные метаболиты (хотя в отдельных случаях такой метаболит импортируется из окружающей среды, а не образуется внутри клетки). Иными словами, стимулом служит малая молекула, которая синтезируется цитозольными ферментами и является индикатором физиологического состояния клетки.

Эндогенный метаболит, который образуется в ответ на внешние сигналы, может использоваться как источник энергии, а также в качестве коэнзима или индикатора метаболического стресса. Например, фруктозо-1,6-бисфосфат связывается с транскрипционным фактором FruR, который регулирует экспрессию генов, отвечающих за метаболизм углеводов.

«Экзогенные» TF. На внешние стимулы непосредственно реагируют примерно 75% TF. Внешний сигнал может поступать на TF двумя способами.

В первом случае клетка импортирует субстрат, который либо используется в качестве источника энергии и/или строительного материала, либо не метаболизируется, а только служит индикатором физико-химического состояния окружающей среды. Как правило, TF регулирует метаболический путь, в котором участвует данный субстрат; примером служит транскрипционный фактор Lac, репрессор лактозного оперона. Субстрат непосредственно связывается с TF (в отсутствие субстрата это может делать соответствующий транспортер). Например, мальтопермеаза MalY взаимодействует с транскрипционным фактором MalT.

Во втором случае субстрат не импортируется, а воспринимается сенсором двухкомпонентной сигнальной системы, расположенным в СМ.

Однокомпонентные и двухкомпонентные сигнальные системы. Как уже отмечалось, регуляторный путь при транскрипции начинается с сигнала, который появляется в результате взаимодействия стимула с сенсором (рис. 248). Этот сигнал

передается на оперон-мишень с помощью однокомпонентной или двухкомпонентной сигнальной системы.

Однокомпонентные сигнальные системы. Более простые однокомпонентные сигнальные системы представляют собой молекулярный гибрид сенсора и регулятора. Обе функции выполняет TF; под воздействием стимула он изменяет свою конформацию и, как правило, переходит в активную гомомультимерную форму, обладающую сродством к специфическим сайтам ДНК, или «боксам».

Двухкомпонентные сигнальные системы. Более сложные по устройству двухкомпонентные сигнальные системы состоят из двух молекул — сенсора и регулятора (последним, как и в случае однокомпонентной сигнальной системы, служит TF). Их гены обычно входят в состав одного оперона.

Широко распространенные у прокариотов двухкомпонентные сигнальные системы (англ. two-component system, TCS) обеспечивают специфические адаптивные ответы на конкретный внешний стимул, чаще всего на определенное вещество — главным образом, путем изменения паттерна транскрипции. Они также встречаются у некоторых протистов, грибов и растений.

В составе >150 секвенированных к настоящему времени прокариотных геномов выявлены гены, кодирующие белки ~4 тыс двухкомпонентных сигнальных систем. У одной только *E. coli* K-12 их 29; среди них наиболее известна система EnvZ/OmpR, реагирующая на изменение осмотического давления окружающей среды, а также системы NtrB/NtrC и PhoB/PhoR, реагирующие, соответственно, на дефицит источника азота и неорганического фосфора.

С увеличением размера генома растет и число закодированных в нем двухкомпонентных сигнальных систем. В частности, у свободноживущих бактерий, адаптированных к переменной среде, их больше, чем у обитателей гомеостатических сред, в особенности у (не)паразитических эндосимбионтов. Некоторые облигатные паразиты, например *Mycoplasma genitalium*, их вообще не имеют.

В состав двухкомпонентной сигнальной системы входят:

— *сенсор* (синонимы: проводник сигнала, «сенсорная» гистидинкиназа), т. е. мембраносвязанный или растворимый белок, который воспринимает *стимул* и преобразует его в *сигнал*;

— *регулятор* (синоним: регулятор ответа), обычно транскрипционный фактор, который получает сигнал от сенсора и индуцирует специфический *ответ* на уровне экспрессии генов.

Стимулом для сенсора является специфическое изменение в состоянии внешней или внутриклеточной среды. Сигналом для регулятора служит фосфорильная группа, которую он получает от сенсора.

Под воздействием стимула сенсор, обладающий АТФ-зависимой киназной активностью, автофосфорилируется по остатку His. Затем фосфорилированный сенсор трансфосфорилирует регулятор по остатку Asp. В итоге этого регулятор активируется, что позволяет ему позитивно или негативно влиять на экспрессию генов-мишеней.

Регуляторные белки могут активироваться в результате нековалентного связывания лиганда (примером служат активаторы транскрипции CRP-белки; см. раздел 16.7.1.1) или в результате ковалентной модификации, обычно путем ферментативного фосфорилирования. Катализатором этой реакции служат переносчики фосфорильной группы — протеинкиназы.

«Прокариотные» протеинкиназы, в частности играющие роль сенсоров в двухкомпонентных сигнальных системах, принадлежат к семейству гистидинкиназ. Используя АТФ, они фосфорилируют собственные остатки His с образованием фосфоамидной связи (рис. 250, А).

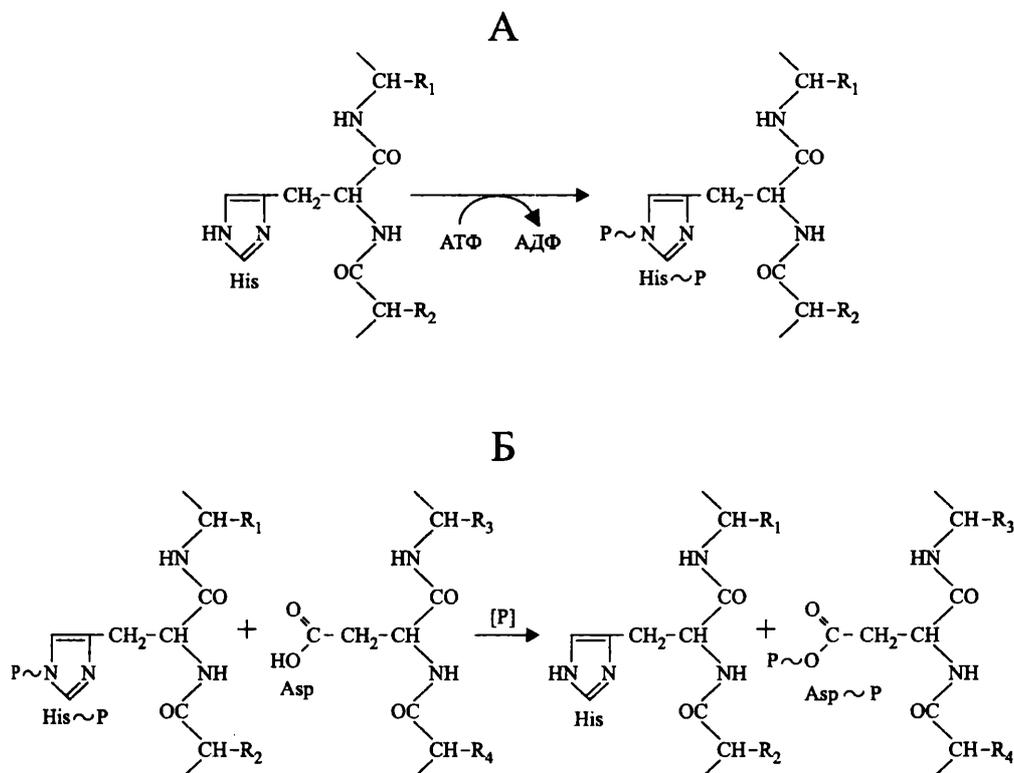


Рис. 250. Реакции, катализируемые прокариотными протеинкиназами.
 А — гистидинкиназная реакция; Б — фосфотрансферная реакция.

В отличие от сенсора, регулятор фосфорилируется не по остатку His, а по остатку Asp с образованием β -ацилфосфата (рис. 250, Б). Донором фосфорильной группы в этой реакции служит сенсор.

His~P и Asp~P легко подвергаются ферментативному дефосфорилированию с помощью протеинфосфатаз. Поскольку при этом сенсор и регулятор возвращаются в неактивную форму, сигнальный процесс замыкается петлей обратной связи.

Наряду с гистидинкиназами, у некоторых бактерий (*Anabaena* sp. PCC7120, *Mycococcus xanthus* и *Streptomyces coelicolor*) обнаружены «эукариотные» протеинкиназы — серин/треонинкиназы и тирозинкиназы. Их роль в прокариотных сигнальных системах пока еще не выяснена.

Белки двухкомпонентной сигнальной системы имеют доменное строение (рис. 251).

Сенсор — это чаще всего мембранный белок (рис. 251, А). Он состоит из N-концевого входного домена (англ. input domain), линкера и C-концевого автокиназного домена, или домена-передатчика (англ. transmitter domain). Входной домен включает в себя один или два интегральных субдомена и субдомен, расположенный на внешней поверхности СМ, который имеет вариабельную структуру и служит детектором специфического стимула. Домен-передатчик размером ~ 250 а.о. высококонсервативен и включает в себя АТФ-связывающий и фосфотрансферный субдомены. Если фосфотрансферных субдоменов несколько, то такая сенсорная киназа называется «гибридной». На ближайшем к линкеру конце фосфотрансферного субдомена находится акцептор фосфорильной группы — высококонсервативный остаток His.

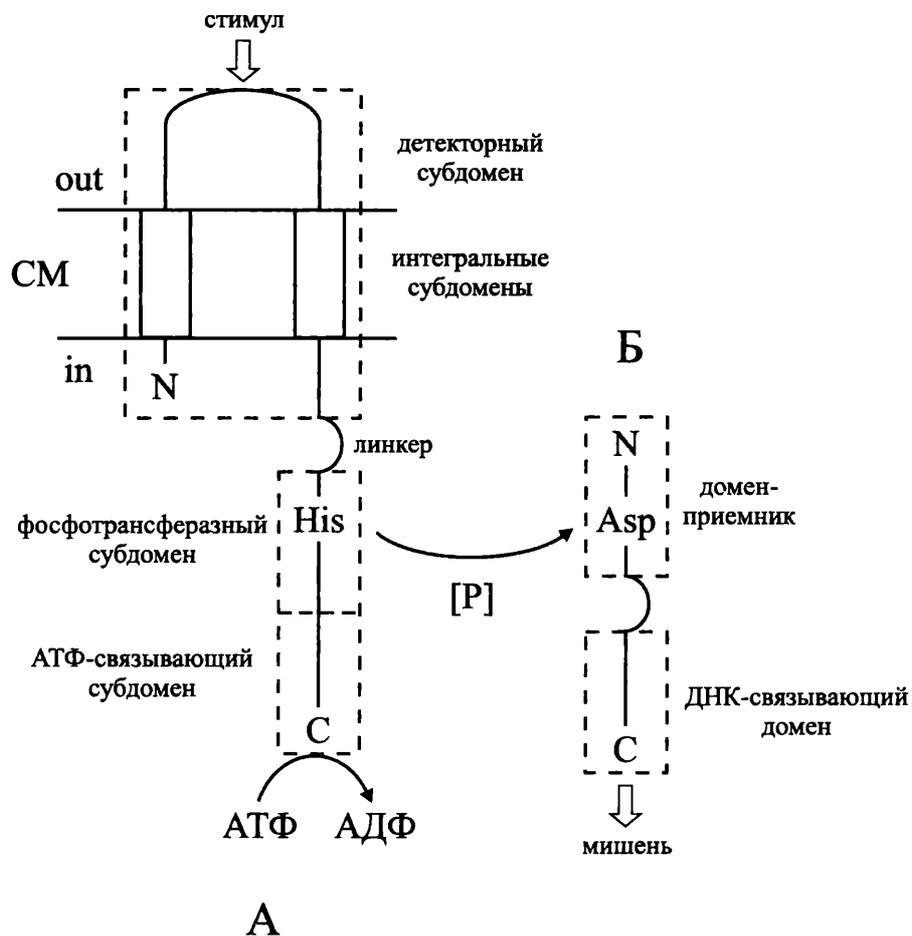


Рис. 251. Схема двухкомпонентной сигнальной системы.
А — сенсор; Б — регулятор.

Мембранный сенсор обычно функционирует в форме димера. Под воздействием стимула конформация входных доменов изменяется; домены-передатчики сближаются, что активирует их протеинкиназную активность; в результате гидролиза АТФ происходит фосфорилирование остатка His.

Регулятор — это во всех случаях цитоплазматический белок (рис. 251, Б). Он состоит из N-концевого *домена-приемника* (англ. receiver domain) размером ~120 а.о., линкера и C-концевого *выходного домена* (англ. output domain), или «ДНК-связывающего» домена, который часто имеет характерную структуру типа НТН (см. выше). На N-конце домена-приемника расположен высококонсервативный остаток Asp, служащий акцептором фосфорильной группы. Выходной домен имеет переменную структуру и содержит сайты для связывания ДНК, а также регуляторные сайты для позитивного или негативного контроля транскрипции. В результате фосфорилирования домен-приемник перестает ингибировать выходной домен, который приобретает активную конформацию.

Существуют исключения из вышеописанной схемы. Входной домен мембранного сенсора может иметь несколько (до восьми) интегральных субдоменов. Известны случаи, когда детекторный домен расположен не на внешней, а на внутренней стороне СМ, например, у сенсора Aer (см. раздел 18.4.1.3). Наконец, сенсор может быть не только мембранным, но и цитоплазматическим белком — примером служит регуляторная система NtrB/NtrC (см. раздел 18.3.2.3).

Усложненным вариантом двухкомпонентной системы является *фосфореле* (англ. phospho-relay; от relay — эстафета). Как следует из названия, эта сигнальная система состоит более чем из двух компонентов. В дополнение к сенсору и регулятору имеются вторичный передатчик и вторичный приемник. Соответственно, фосфореле осуществляет несколько актов передачи фосфорильной группы по цепи His → Asp → His → Asp.

Фосфореле могут состоять из одно-, двух- и мультидоменных белков, присутствующих в разных комбинациях. Канонический пример — фосфореле из одно- и двухдоменных белков, регулирующее клеточный цикл *C. crescentus* (см. раздел 17.1.4 и рис. 224), а также фосфореле, участвующее в контроле споруляции *B. subtilis* (см. раздел 17.5.2.2 и рис. 252). В свою очередь, примером фосфореле, в состав которого входит мультидоменный белок, или гибридная сенсорная киназа, является регуляторная система ArcB/ArcA (см. раздел 18.3.1.2 и рис. 257).

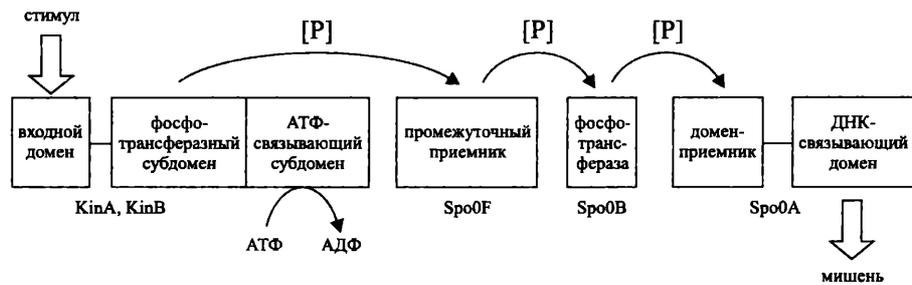


Рис. 252. Фосфореле, участвующее в контроле споруляции *B. subtilis*.

По сравнению с двухкомпонентной системой, фосфореле содержит больше звеньев для регуляции, в частности с участием протеинфосфатаз, что обеспечивает более высокую точность ответа. Поэтому у прокариотов фосфореле используются для контроля сложных онтогенетических феноменов, например споруляции. Неудивительно также, что у ядерных организмов, с их более сложным поведением, все регуляторные системы на основе сенсора/регулятора представляют собой именно фосфореле.

Глобальные транскрипционные факторы. В соответствии с общим числом подконтрольных генов, ТФ подразделяются на *глобальные* (~80%) и *локальные* (~20%). Первые могут модулировать экспрессию 10–200 генов, вторые — только 1–2 генов.

Глобальные ТФ относятся к двум основным категориям: *архитектурные белки* и *мастер-регуляторы* (табл. 31). Архитектурные белки связываются с ДНК, не оказывая предпочтения специфическим сайтам, и влияют на общий паттерн транскрипции. Мастер-регуляторы распознают в ДНК специфические сайты и контролируют гены, продукты которых функционируют в определенном фенотипическом секторе.

Глобальные ТФ по-разному распространены в мире бактерий и представлены широким спектром типов и вариантов. Приведем важнейшие примеры (табл. 31).

Таблица 31. Глобальные транскрипционные факторы

Обозначение	Фенотипический сектор для продуктов экспрессии контролируемых генов	Распространение (среди изученных объектов)
Архитектурные белки		
Fis, H-NS, IHF	Общий паттерн транскрипции	<i>E. coli</i>
Мастер-регуляторы		
Lgr	Общий трофический статус	Энтеробактерии
CRP	Энергетический статус	Многие грамотрицательные и грамположительные бактерии
FNR, NarL/NarP, ArcA	(Ан)аэробный метаболизм	<i>E. coli</i>
CsrA, CodY	Метаболизм углерода	<i>Firmicutes</i>
NtcA; NtrC	Метаболизм азота	Цианобактерии; энтеробактерии
PhoB	Фосфорное питание	<i>E. coli</i>
Fur, DtxR	Железный гомеостаз	Многие грамотрицательные и грамположительные бактерии
OxyR, SoxR	Защита при окислительном стрессе	Многие грамотрицательные и грамположительные бактерии
MarS/SlyA	Экстравертные защитные функции	Некоторые патогенные бактерии и ряд архей
Spo0A	Спорогенез	<i>B. subtilis</i>

Архитектурные белки Fis, H-NS и IHF. Многофункциональные ДНК-связывающие белки Fis, H-NS и IHF (см. разделы 16.4.1.1, 16.6.1.2, 16.6.1.3 и 16.7.1.1) локально изгибают ДНК. Это конформационное изменение влияет на более высокий уровень пространственной упаковки ДНК – суперспирализацию, изменяет сродство РНК-полимеразы к промоторам и отражается на общем паттерне транскрипции.

Мастер-регулятор Lgr. С помощью однокомпонентного глобального регулятора Lgr общий трофический статус клетки воспринимается и корректируется в соответствии с концентрацией свободного лейцина, что позволяет провести комплексную метаболическую адаптацию к изменяющимся условиям питания (см. разделы 16.8 и 18.1.2).

Мастер-регулятор CRP. С помощью однокомпонентного глобального регулятора CRP энергетический статус клетки оценивается по концентрации 3',5'-цикло-АМФ, что позволяет адаптироваться к существованию в средах с разными источниками углерода (см. разделы 16.7.1.1 и 18.3.2).

Мастер-регуляторы FNR, NarL, NarP и ArcA. Однокомпонентный глобальный регулятор FNR, а также белки NarL, NarP и ArcA, которые входят в состав соответствующих двухкомпонентных сигнальных систем, определяют выбор дыхательных путей, что влияет на тип энергетики и обеспечивает адаптивный переход от существования в аэробной среде к существованию в анаэробной среде (см. раздел 18.3.1.2).

Мастер-регуляторы CsrA и CodY. Однокомпонентный глобальный регулятор CsrA контролирует механизм углеродной катаболитной репрессии у *Firmicutes* (см. раздел 18.3.2.2). В свою очередь, у всех *Firmicutes* за исключением микоплазм существует однокомпонентный мастер-регулятор CodY. Он контролирует гены биосинтеза разветвленных жирных кислот, гены утилизации источников углерода, а также гены, ответственные за такие функции, как генетическая компетентность, споруляция и вирулентность.

Мастер-регуляторы NtcA и NtrC. Однокомпонентный глобальный регулятор азотного метаболизма NtcA контролирует гены цианобактерий, отвечающие за транспорт и восстановление нитрата, ассимиляцию аммония, дифференциацию гетероцист и diaзотрофию (см. раздел 17.5.1.2). В случае энтеробактерий роль регулятора выполняет транскрипционный фактор NtrC, входящий в состав двухкомпонентной сигнальной системы (см. раздел 18.3.2.3).

Мастер-регулятор PhoB. Глобальный регулятор PhoB, входящий в состав двухкомпонентной сигнальной системы PhoR/PhoB, контролирует экспрессию генов, отвечающих за фосфорное питание *E. coli*, в частности за транспортные системы. Аналогичную роль у грамположительных бактерий, прежде всего *B. subtilis*, выполняет мастер-регулятор PhoR (не путать с регулятором PhoR энтеробактерий; см. раздел 18.3.2.4).

Мастер-регуляторы Fur и DtxR. Однокомпонентные глобальные регуляторы железного гомеостаза Fur и DtxR контролируют импорт, запасание и внутриклеточную концентрацию железа, а также регулируют использование железа в метаболизме (см. раздел 18.3.2.5).

Мастер-регуляторы OxyR и SoxR. Однокомпонентный глобальный регулятор OxyR и сенсор SoxR, входящий в состав двухкомпонентной сигнальной системы SoxR/SoxS, контролируют систему защиты при окислительном стрессе (см. раздел 19.6.1.2).

Мастер-регуляторы MarR/SlyA. Представители семейства MarR/SlyA (сокр. англ. multiple antibiotic resistance/screen for cytolysins) контролируют широкий спектр экстравертных защитных функций у патогенных вибрионов (*V. cholerae*), псевдомонад и родственных им бактерий (*P. aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* и др.), а также у стафилококков (*S. aureus*) и энтеробактерий (*E. coli*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* и др.).

Белки MarR/SlyA (в настоящее время известно более 300 членов этого семейства у 45 видов бактерий и 13 видов архей) контролируют устойчивость к хозяйским иммунным системам, вирулентность, рецепцию фенольных аттрактантов и ряд других биологических функций. Гены, находящиеся под контролем транскрипционных регуляторов MarR/SlyA, кодируют мембранные, периплазматические или секретируемые белки, многие из которых служат факторами вирулентности или факторами устойчивости к антибиотикам и другим антимикробным агентам.

Мастер-регулятор Spo0A. Глобальный регулятор Spo0A, входящий в состав фосфореле, играет ключевую роль на ранних этапах споруляции (см. раздел 17.5.2.2).

Авторегуляция TF. Выступая в роли регуляторов транскрипции, TF сами регулируются на транскрипционном уровне. Это достигается с помощью механизма *авторегуляции* гена (англ. autoregulation). В данном случае продукт структурного гена контролирует экспрессию самого этого гена. Иными словами, авторегулируемый белок напрямую влияет на уровень собственного биосинтеза, взаимодействуя со своим регуляторным участком.

Авторегуляция принципиально отличается от непрямого транскрипционного контроля, который осуществляется с помощью белков, воздействующих на чужой регуляторный участок, в том числе, с привлечением эндогенного или экзогенного индуктора или корепрессора.

Каноническим примером авторегуляции служит λ -репрессор в лизогенизированных клетках *E. coli*. Этот TF кодируется геном *cI*. За счет позитивной регуляции λ -репрессор образуется в

концентрации, предотвращающей индукцию профага. За счет негативной регуляции λ -репрессор образуется в недостаточном количестве, и происходит индукция профага.

Ген *ci* транскрибируется с промотора p_{RM} . Белок *ci* имеет разное сродство к регуляторным сайтам o_{R1} , o_{R2} и o_{R3} ($o_{R1} > o_{R2} \gg o_{R3}$), расположенным в upstream-положении от оператора фага лямбда. При связывании с сайтом o_{R2} белок *ci* позитивно влияет на транскрипцию собственного гена; при связывании с сайтом o_{R3} влияние становится негативным. Таким образом, внутриклеточная концентрация белка *ci* контролируется в результате «оттитровывания» им регуляторных сайтов ДНК.

Транскрипционные факторы архей. Ранее мы уже отмечали, что транскрипция архей имеет мозаичную природу (см. раздел 16.7.3).

С одной стороны, используется фермент эукариотного типа, состоящий из не менее чем 10 субъединиц, высокомолекулярных таковым у эукариотов, причем субъединицы DLNP образуют четвертичный субкомплекс, эквивалентный субкомплексу Rpb3–Rpb10–Rpb11–Rpb12 эукариотных РНК-полимераз I и III, а субъединицы EF образуют гетеродимер, соответствующий гетеродимеру Rpb4–Rpb7.

С другой стороны, используется регуляторный механизм бактериального типа, когда промоторы распознает РНК-полимераза в комплексе со специфическими транскрипционными факторами.

Для транскрипции с археотных промоторов минимально необходимы два транскрипционных фактора, соответственно, распознающие два промоторных элемента. Это белок ТВР, который связывается с ТАТА-боксом, и белок ТФВ, распознающий BRE-элемент (см. раздел 16.7.3). Они гомологичны, соответственно, эукариотным транскрипционным факторам ТВР и ТFIIB.

У эукариотов существуют *дополнительные транскрипционные факторы* (англ. transcriptional associated factor, TAF), которые совместно с ТВР и ТFIIB предварительно распознают промотор, а затем рекрутируют РНК-полимеразу. Хотя у архей TAF отсутствуют, рекрутирование РНК-полимеразы у них происходит тем же способом, что и у эукариотов.

Поскольку у некоторых архей обнаружены множественные гомологи транскрипционных факторов ТФВ и/или ТВР, есть предположение, что регуляция транскрипции основывается на их избирательном использовании. Иными словами, разные ТФВ могут распознавать разные BRE-элементы, что позволяет осуществлять выбор промоторов. Однако ограниченного числа изоформ минимально необходимого аппарата транскрипции недостаточно для того, чтобы удовлетворить все регуляторные потребности клетки.

Проблему отчасти решает то, что у архей найдены гомологи глобальных транскрипционных Lrp-факторов бактерий — Sa-Lrp и Lrs14 (см. ниже), а также транскрипционный фактор Tfx, который, в числе прочего, активирует у

Methanobacterium thermoautotrophicum N-формил-MF-дегидрогеназу (см. II том учебника).

18.1.2. Регулоны

Поскольку количество регулонов и, соответственно, мастер-регуляторов очень велико, а подконтрольные им гены отвечают за широкий спектр не родственных функций, мы остановимся только на важнейших примерах.

Регулон ответа при общем стрессе, или регулон стационарной фазы (регулон RpoS). Задержка роста, вызванная внешним лимитированием по какому-нибудь субстрату, еще не означает переход к стационарной фазе (см. раздел 21.1.1).

Напротив, с помощью таких глобальных регуляторов, как CRP, Lrp, Ntr и Pho индуцируются альтернативные метаболические системы, что позволяет продолжить рост в изменившихся трофических условиях.

Иное дело — экстремальное стрессовое воздействие, в частности полное голодание по незаменимому элементу питания, что вызывает переход от фазы роста к ранней стационарной фазе. Этот процесс высокоорганизован и связан с глубокими физиологическими изменениями отдельной клетки и популяции в целом (см. главу 21).

При вхождении *E. coli* или других энтеробактерий в стационарную фазу, а также при голодании по питательным субстратам индуцируется *ответ при общем стрессе* (англ. general stress response). Он осуществляется с помощью регулона RpoS, состоящего из 50–200 генов.

Мастер-регулятором в регулоне RpoS служит сигма-фактор σ^{38} , или σ^S (сокр. англ. stationary или starvation). Он также известен, как ДНК-связывающий белок RpoS (от сокр. англ. RNA polymerase), или ДНК-связывающий белок KatF (от сокр. нем. Katalase); встречаются и другие обозначения.

Сигма-фактор σ^S принадлежит к группе 2 сигма-факторов, подгруппе 2.1 (табл. 30). Он характеризуется высокой степенью гомологии с первичным сигма-фактором σ^{70} , однако распознает другую консенсусную последовательность в положении –10, а консенсусная последовательность в положении –35 у него дегенерирована (см. раздел 18.1.1.1).

Белок σ^S (RpoS) не только позитивно контролирует гены в стационарной фазе и негативно контролирует гены в фазе экспоненциального роста; он сам регулируется на транскрипционном уровне — его ген (*rpoS*) индуцируется в начале стационарной фазы. Наряду с дефицитом питательных субстратов и голоданием, ответ при общем стрессе провоцируется резким снижением скорости роста, экстремальным изменением температуры, высокой кислотностью, высоким осмотическим давлением среды и т. д. В силу пестроты факторов общего стресса природа первичного сигнала для регуляции транскрипции гена *rpoS* еще не установлена.

Регуляция внутриклеточной концентрации белка RpoS происходит в основном на посттранскрипционном уровне (см. раздел 18.2). Стимулятором трансляции *rpoS*-мРНК служит ДНК-связывающий белок HU, а ингибитором — ДНК-связывающий белок H-NS. Трансляции *rpoS*-мРНК способствует белок Hfq (см. раздел 18.2.2), который расплавляет шпильку, препятствующую взаимодействию этой мРНК с рибосомой, а также малые РНК (см. там же).

Негативный контроль концентрации белка RpoS осуществляет индуцибельная протеаза ClpXP, входящая в состав протеасомы (см. I том учебника). Таргетинг RpoS производит «распознающий» фактор RssB.

Максимальное количество белка RpoS (σ^S) составляет не более 30% первичного сигма-фактора σ^{70} , и он имеет меньшее сродство к РНК-полимеразе. Поэтому, чтобы обеспечить надежность рекрутирования голокомплекса $E\sigma^S$, используется антисигма-фактор Rsd, который образуется при вступлении в стационарную фазу и связывается с сигма-фактором σ^{70} . Дополнительное конкурентное преимущество для σ^S создает алармон (p)rrGpp, образующийся при аминокислотном голодании (см. раздел 18.1.4). Кроме того, малая 6S РНК, которая накапливается в стационарной фазе (см. раздел 18.2.2), связывается с голокомплексом $E\sigma^{70}$, что блокирует его транскрипционную активность, создавая преимущество для голокомплекса $E\sigma^S$.

Как уже отмечалось, голокомплекс $E\sigma^S$ транскрибирует множество генов, необходимых бактериям для существования не только в условиях голодания, но и при других стрессах. В частности, белок RpoS контролирует экспрессию генов устойчивости против:

- ультрафиолетового излучения (см. раздел 16.5.1.2);
- окислительного стресса (см. раздел 19.1.6);
- теплового шока (19.1.1);
- гиперосмотического стресса (19.1.3);
- кислотного стресса (см. раздел 19.1.7);
- химических повреждающих агентов, например этанола (см. раздел 19.1.8).

В регулон RpoS также входят «морфологические» гены, в частности ген *bolA* (отвечает за сферическую форму *E. coli* в стационарной фазе) и ген *glgS* (участвует в синтезе запасного полиглюкозида).

Одним из элементов ответа при общем стрессе является увеличение скорости спонтанного мутирования (см. раздел 16.6.1.1). После того, как ДНК-полимераза III покинула заблокированную репликационную вилку, ее работу продолжает «склонная к ошибкам» ДНК-полимераза Pol IV (через 10 ч после вхождения *E. coli* в стационарную фазу ее количество возрастает почти втрое). Поскольку ДНК-полимераза Pol IV нестабильна, требуется непрерывная транскрипция ее гена (*dinB*) под контролем белка RpoS.

Наряду с активацией гена *dinB*, белок RpoS негативно регулирует белки MutS и MutH, ответственные за репарацию ошибок спаривания (см. раздел 16.5.1.3).

Важно отметить, что с помощью регулона ответа при общем стрессе приобретает устойчивость при «частных» стрессах, что связано с индукцией специфических регулонов и стимулонов. Например, клетки *E. coli* в стационарной фазе становятся устойчивыми к коротковолновому ультрафиолетовому излучению (300–400 нм), тепловому шоку ($\geq 50^\circ\text{C}$), пероксиду водорода, а также NaCl в высокой концентрации ($\geq 2,5\text{M}$).

Устойчивость к ультрафиолетовому излучению связана с активацией системы эксцизионной репарации, в которой участвует экзонуклеаза III (экспрессия ее гена *xthA* контролируется белком RpoS).

Терморезистентность в данном случае не связана с образованием альтернативного сигма-фактора σ^{32} (ген *rpoH*) и синтезом белков теплового шока, а зависит от накопления трегалозы (О- α -D-глюкозил(1–1)- α -D-глюкозида), стабилизирующей мембраны за счет связывания с полярными группами липидов. Гены *otsAB*, отвечающие за синтез этого дисахарида, находятся под контролем мастер-регулятора Rpo. В свою очередь, защита от окислительного стресса в стационарной фазе связана с таким компонентом Rpo-регулона, как ген *katE* (который кодирует цитоплазматическую каталазу НРІІ). Интересно, что ген *katG*, кодирующий периплазматическую каталазу НРІ, принадлежит к другому регулону — *oxyR*, который индуцируется при окислительном стрессе. Наконец, защита от осмотического стресса, как и терморезистентность, связана с накоплением трегалозы; последняя в данном случае выступает в качестве осмопротектора.

Важно подчеркнуть, что при общем стрессе защита от «частных» стрессов не индуцируется конкретной стрессовой ситуацией, а косвенно приобретает в условиях субстратного голодания. Это логично, поскольку в случае потребности в соответствующих системах их синтез в голодных условиях оказался бы невозможным. Таким образом, генерализованный ответ при общем стрессе не только имеет комбинированную природу, но и носит превентивный характер.

Регулон ответа на лейцин (регулон Lrp). Этот регулон представляет собой группу генов, которая находится под контролем глобального транскрипционного фактора Lrp (сокр. англ. leucine-responsive regulatory protein).

В качестве «двуглавого» белка (ДНК-связывающего и L-лейцин-связывающего) транскрипционный фактор Lrp интегрирует транскрипцию, прежде всего, с лейцин-зависимых промоторов. Хотя в общем случае лейцин или его производные выполняют роль аллостерического эффектора, часть промоторов Lrp-регулона контролируется свободным белком Lrp.

Lrp представляет собой катионный гомодимерный белок ($2 \times 18,8$ кДа). Он высококонсервативен — его гомология у разных энтеробактерий составляет не менее 90% (гомология между геном *lrp* у *E. coli* и его ортологом *bkdR* у *Pseudomonas* spp. также достаточно высока и составляет 36%). Это свидетельствует о важной роли белка Lrp в управлении метаболизмом, в первую очередь, путем контроля генов, экспрессия которых регулируется лейцином. В то же время высокое содержание этого белка ($3 \cdot 10^3$ молекул на клетку), а также его способность изгибать ДНК указывают на то, что он дополнительно служит одним из структурных организаторов бактериальной хромосомы.

Как и другие TF, белок Lrp авторегулируется.

Физиологическая логика лейциновой «зависимости» белка Lrp становится понятной, если рассмотреть паттерн его регуляторного действия. В качестве глобального TF он служит активатором до 20 оперонов и репрессором до 10 оперонов *E. coli*. К ним, в частности, относятся:

— «биосинтетические» опероны *gcvTHP* (биосинтез C₁-блока N-метилена-Н₄фолата), *gltBDF* (биосинтез глутамата), *glyA* (биосинтез глицина), *ilvIH* (биосинтез изолейцина и валина), *leuABCD* (биосинтез лейцина), *lysU* (лизил-тРНК-синтетаза), *pntAB* (НАДФН/НАД-трансгидрогеназа) и *serA* (биосинтез серина);

— «катаболитные» опероны *kbl-tdh* (расщепление треонина), *lacZ* (β -галактозидаза), и *sdaA* (дезаминаза L-серина);

— «транспортные» опероны *livJ* и *livKHMGF* (транспорт лейцина); *malEFG*, *malK-lamB-malM* и *malT* (транспорт мальтозы); *oppA-D* (транспорт олигопептидов) и *ompC/ompF* (порины);

— «фимбриевые» опероны *daaA-E*, *fae*, *fanABC*, *fimB*, *papAB* и *sfaA*;

— «осмосенсорный» оперон *osmY*.

Таким образом, мастер-регулятор Lrp перенастраивает генеральный метаболизм при обратимом переходе от благоприятного трофического состояния к голоданию (англ. feast-or-famine).

Регулон SOS-ответа (регулон SOS). В отличие от регулона Lrp, в состав которого входят гены домашнего хозяйства, регулон SOS в первую очередь включает в себя информационные гены. Он индуцируется повреждением ДНК, путем репарации предотвращает летальные последствия этого повреждения и сводит к минимуму его мутагенные последствия (см. также раздел 16.5.1.4 и табл. 23). Тем не менее, специфика индуцируемых при SOS-ответе репарационных систем такова, что в данном случае неизбежно происходит мутагенез, в том числе имеющий адаптивное значение (см. разделы 16.5.1.4 и 16.6.1.1).

В качестве агентов, повреждающих ДНК, выступают такие гетерогенные факторы, как ультрафиолетовое излучение, ионизирующая радиация, высокое гидростатическое давление, антибиотики (в частности, налидиксовая кислота — ингибитор ДНК-гиразы) и т. д. В то же время SOS-ответ не обязательно вызывается экзоген-

ными агентами, повреждающими ДНК. Его стимулом могут быть и эндогенные метаболиты, а также нерепарированные ошибки репликации, сегрегации сестринских хромосом или рекомбинации. Наконец, причиной SOS-ответа может стать уменьшение концентрации репрессора транскрипции — белка LexA (см. ниже), вызванное неблагоприятными условиями роста.

Повреждение ДНК блокирует репликацию, что при неэффективной репарации представляет смертельную угрозу. Чтобы избежать ее (отсюда и происходит образное название — «SOS-ответ») многие прокариоты, в частности *E. coli*, используют координированную систему экспрессии генов, отвечающих, в первую очередь, за репарацию ДНК, а также за репликацию хромосомы и клеточное деление.

Индукторами SOS-регулона *E. coli* являются два белка — многофункциональный ДНК-связывающий белок RecA (см. раздел 16.6.1.2) и репрессор транскрипции LexA.

Важно отметить, что сигналом, индуцирующим SOS-ответ в клетках с одно- или двухцепочечным повреждением ДНК, является *не повреждение как таковое, а связанное с ним нарушение нормальной репликации*. Дело в том, что при репликации «поверх повреждения» или вследствие распада репликационной вилки, наталкивающейся на повреждение, образуются одноцепочечные участки ДНК (ssДНК; см. раздел 16.5.1.4). Свободный белок RecA распознает их, активируется за счет энергии АТФ (RecA → RecA*) и образует нуклеопротеиновый комплекс. Свободный белок LexA, в свою очередь, распознает спиральную борозду в филаменте ssДНК/RecA*, в результате чего образуется тройственный комплекс ssДНК/RecA*/LexA. Белок RecA* играет в нем роль аллостерического кофактора и стимулирует процессинг белка LexA, который в данном случае выступает в роли сериновой протеазы (остатки Ser-119 и Lys-156 в активном центре). В ходе автопротеолиза белка LexA (22 кДа) расщепляется пептидная связь между остатками Ala-84 и Gly-85 в петлевом домене, который расположен между N-концевым доменом, ответственным за связывание с ДНК, и C-концевым доменом, отвечающим за образование функционально активных олигомеров. В результате этого содержание репрессора Lex, способного распознавать промоторные/операторные участки подконтрольных ему оперонов, снижается, что активирует транскрипцию.

При взаимодействии с белком RecA* происходит автопротеолиз еще одного белка — UmuD с образованием его активной формы (UmuD)' (рис. 253), которая в составе комплекса «склонной к ошибкам» ДНК-полимеразы Pol V участвует в «мутационной» репарации (см. разделы 16.5.1.4 и 16.6.1.1).

Таким образом, стимулом для регулона SOS-ответа служат агенты, повреждающие ДНК, сенсором — ДНК, сигналом — одностранные участки ДНК. Белок RecA является проводником сигнала, а белок LexA — мастер-регулятором.

Благодаря инактивации репрессора LexA дерепрессируются гены SOS-регулона, многие из которых кодируют ферменты, отвечающие за репарацию, рекомбинацию и репликацию, в том числе за репликацию «поверх повреждения».

Глобальная система SOS-ответа существует не только у *E. coli*, хотя она наиболее изучена именно у этой бактерии.

У многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также у архей имеются гомологи белка RecA. Примечательно, что они также найдены у эукариотов — от дрожжей до *H. sapiens*. Например, у *S. cerevisiae* это белки Rad51p, Rad55p, Rad57p и Dmc1p (первый из них способствует устранению двухцепочечных разрывов ДНК, а также участвует в митотической и мейотической рекомбинации).

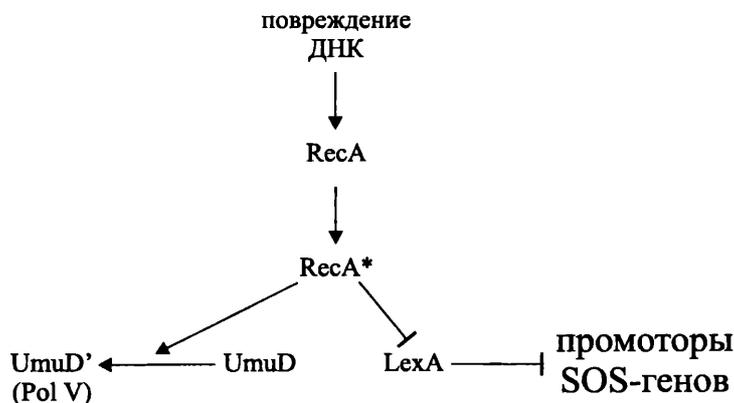


Рис. 253. Участие белков RecA и LexA в индукции SOS-ответа.

Острые стрелки — активация; тупые стрелки — блокирование.

LexA-подобные белки обнаружены у представителей 20 родов грамотрицательных и грамположительных бактерий, в частности, это белок DinR *B. subtilis* (23 кДа).

В случае *E. coli* в состав регулона SOS входят до 30 несцепленных генов, в том числе гены *recA* и *lexA*. Половина из них обозначается как гены *din* (сокр. англ. damage inducible), причем их конкретная функция часто неизвестна.

Большинство SOS-зависимых генов имеет прямое отношение к репарации ДНК:

- гены *uvrAB* (кодируют субъединицы эксцизионной эндонуклеазы; см. раздел 16.5.1.2);
- ген *uvrD* (кодирует ДНК-геликазу II, участвующую в эксцизионной репарации и репарации ошибок спаривания; см. разделы 16.5.1.2 и 16.5.1.3);
- гены *ruvAB* (кодируют компоненты резольвасомы, осуществляющей гомологическую рекомбинацию, в частности при рекомбинационной репарации; см. разделы 16.5.1.4 и 16.6.1.2);
- ген *recN* (кодирует белок RecN, участвующий в рекомбинационной репарации; см. раздел 16.5.1.4);
- гены *umuDC* (кодируют субъединицы «склонной к ошибкам» ДНК-полимеразы Pol V; см. раздел 16.4.1.1);
- ген *dinA/polB* (кодирует ДНК-полимеразу Pol II, возможно, участвующую в репарации; см. раздел 16.4.1.1);
- ген *ssb* (кодирует белок SSB, связывающийся с одностречевой ДНК при репликации, рекомбинационной репарации и гомологической рекомбинации; см. разделы 16.4.1.1, 16.5.1.4 и 16.6.1.2);
- ген *sulA* (кодирует белок Sula, предотвращающий деление, пока не завершится репликация; см. разделы 16.5.1.4 и 17.4.1).

Как уже отмечалось, мастер-регулятором регулона SOS является белок LexA, который связывается с консенсусной последовательностью 5'-TACTG(TA)₅ CAGTA-3' (SOS-боксом). Хотя активный репрессор LexA перекрывает блоки -35 и -10 σ^{70} -зависимых промоторов генов *lexA*, *recA* и *uvrB*, его связь с операторами слаба, и поэтому базовый уровень транскрипции этих генов достаточно высок.

По мере того, как идет репарация повреждений с помощью белков SOS-системы, одноцепочечные участки ДНК исчезают, а с ними пропадает и сигнал для индукции этой системы. В результате SOS-ответ выключается, и гены SOS снова начинают репрессироваться белком LexA.

SOS-ответ может взаимодействовать с ответами при других стрессах (см. главу 19). Характер этого взаимодействия зависит от природы организма и типа стресса.

Например, в случае *E. coli* голодание по фосфору, а также холодовой шок могут индуцировать гены, контролируемые белком LexA. Особо интересна связь элементов SOS-ответа и элементов ответа при тепловом шоке. В частности, белки теплового шока GroEL и GroES (см. ниже) участвуют в мутагенной репарации, обеспечивая фолдинг белка UmuC — компонента комплекса (UmuD)₂UmuC.

Регулон ответа при тепловом шоке (регулон Hsp). Под воздействием повышенной температуры в любом организме, от прокариотов до *H. sapiens*, активируется на транскрипционном уровне синтез белков теплового шока (англ. heat shock protein, HSP). Они имеют высококонсервативную структуру и выполняют сходные функции у организмов самого разного происхождения.

Как следует из их названия, главным стимулом для активации транскрипции генов HSP служит повышение температуры. Например, в клетках *E. coli* при температурном переходе 37° → 45°С скорость синтеза белка теплового шока GroEL возрастает на порядок.

Однако синтез HSP может стимулироваться и при оптимальной температуре, в частности при токсическом стрессе — под воздействием денатурирующих реагентов (например, этанола); антибиотиков, влияющих на терминацию трансляции (например, пурамицина); аналогов аминокислот, вызывающих образование дефектных полипептидов (например, канаванина) и т. д. Кроме того, индукция регулона теплового шока может вызываться повреждением ДНК, окислительным стрессом, фаговой инфекцией, а также голоданием по источнику углерода или азота. Иными словами, индукция регулона теплового шока является ответом при общем стрессе.

Наконец, HSP образуются и в отсутствии стресса — правда, в меньшем количестве, и тогда они участвуют в физиологических процессах неповрежденной клетки.

Использование HSP лежит в основе защитно-адаптационного механизма, позволяющего избежать цитоплазматического стресса, т. е. вредных последствий накопления белков, правильная укладка которых не произошла в ходе трансляции или была нарушена из-за денатурации. Точнее сказать, HSP придают ненативным белкам правильную конфигурацию, т. е. участвуют в посттрансляционном фолдинге при любой температуре, не обязательно стрессовой. Если же белок не поддается фолдингу или необратимо поврежден, HSP вызывают его деградацию. Соответственно, большинство HSP является либо шаперонами, либо АТФ-зависимыми протеазами (см. I том учебника).

HSP-шапероны. Шапероны обеспечивают фолдинг ненативных белков, т. е. придают им правильную трехмерную структуру. Они подразделяются на две группы.

К первой группе относятся шаперон GroES (10 кДа) и шаперон GroEL (57 кДа). Они кодируются опероном *groESL* и образуют шаперонинный комплекс, состоящий из 7 субъединиц шаперона GroES и 14 субъединиц шаперона GroEL (Gro — сокр. англ. growth; этот белок необходим для репликации фагов типа лямбда; E — означает, что мутации *gro*⁻ супрессируются мутацией по гену *E* головки фага; L и S — сокр. англ. large и small, т. е. это большая и малая субъединицы комплекса (GroEL)₁₄(GroES)₇).

Ко второй группе относятся шапероны DnaK и DnaJ, которые кодируются дицистронным опероном *dnaKJ*, а также шаперон GtrE (сокр. англ. growth of phage; обозначение гена *gtrE* происходит от мутации *gtrE280*, блокирующей репродукцию фага лямбда при любой температуре), который кодируется моноцистронным опероном *gtrE*.

Шаперон DnaJ связывается с ненативным белком и передает его комплексу АТФ с шапероном DnaK (аналог эукариотного белка теплового шока Hsp70). В результате стимулирования АТФазной активности шаперона DnaK шапероном DnaJ образуется прочный тройственный комплекс DnaJ/DnaK-АТФ/ненативный белок. Шаперон GtrE вызывает диссоциацию этого комплекса, в результате чего ненативный белок либо самостоятельно приобретает правильную укладку, либо передается шаперонину (GroEL)₁₄ (GroES)₇ (см. I том учебника).

HSP-протеазы. Если ненативный белок не поддается фолдингу, то он в развернутой форме поступает от комплекса шаперонов DnaJ/DnaK/GrpE к другим функционально специализированным HSP — протеазам. Для работы этих протеаз необходима энергия гидролиза АТФ, и поэтому их называют «АТФ-зависимыми» протеазами.

Наиболее изучена АТФ-зависимая протеаза Lon, которая расщепляет ненативные белки, а также нестабильные белки как чужеродного, так и собственного происхождения. В частности, она вызывает протеолиз антитерминатора N фага лямбда (отсюда ее обозначение; см. раздел 17.2.2) или протеолиз ингибитора клеточного деления Sula (см. раздел 17.4.1). В деградации ненативных белков также участвует протеаза ClpA (сокр. англ. caseinolytic protease), состоящая из каталитической субъединицы ClpP, АТФазной субъединицы ClpA и регуляторной субъединицы ClpB (см. I том учебника).

Большинство генов белков теплового шока *E. coli* (~30) входит в главный регулон теплового шока этой бактерии, или *регулон Hsp*. Он позитивно контролируется альтернативным сигма-фактором σ^{32} /RpoH (ген *groH*).

Белок RpoH используется для распознавания специфических промоторов, и его содержание критично для транскрипции генов теплового шока. Концентрация белка RpoH регулируется на уровне транскрипции гена *groH*, на уровне трансляции мРНК, а также на уровне готового белка, т. е. на уровне обеспечения его стабильности.

При (суб)оптимальной температуре $\leq 30^\circ\text{C}$ концентрация белка RpoH поддерживается на крайне низком уровне — не более 30 молекул на клетку. Поэтому незаменимые гены *groES*, *groEL* и *grpE*, необходимые для фолдинга при любых условиях, должны иметь дополнительные промоторы для голокомплекса $E\sigma^{70}$.

Низкое базовое содержание RpoH связано со слабой интенсивностью трансляции *groH*-мРНК, а также с очень быстрой деградацией этого белка. Причиной нестабильности RpoH служит белок-белковое взаимодействие с шаперонами DnaJ/DnaK, которые «выдают» его АТФ-зависимым протеазам.

При температурном переходе $30^\circ \rightarrow 42^\circ\text{C}$ концентрация белка RpoH временно увеличивается почти на порядок, достигая концентрации главного сигма-фактора σ^{70} (~500 молекул на клетку), в результате чего они начинают конкурировать за кор-фермент РНК-полимеразы. Успех конкуренции обеспечивается силой промоторов генов, кодирующих HSP. После первоначального повышения скорости транскрипции гена *groH* она снижается до нового базового уровня, примерно вдвое выше исходной.

Помимо активации транскрипции гена *groH*, дополнительный вклад в увеличение концентрации белка RpoH вносит усиление трансляции его мРНК с помощью еще не расшифрованного механизма, а также повышение его стабильности за счет нарушения взаимодействия с шаперонами DnaJ/DnaK/GrpE, которые негативно регулируют его синтез.

Общая схема контроля регулона Hsp выглядит следующим образом. При повышении температуры увеличивается концентрация ненативных белков, которые «оттитровывают» шапероны DnaJ/DnaK/GrpE. В результате этого появляется пул свободных молекул белка RpoH, устойчивого к протеолизу. Они начинают успешно конкурировать с сигма-фактором σ^{32} за кор-фермент РНК-полимеразы; содержание голофермента $E\sigma^{32}$ возрастает, в результате чего повышается экспрессия генов всех HSP. Шапероны DnaJ/DnaK/GrpE постепенно освобождаются от гнета ненативных белков, связываются с белком RpoH, его стабильность уменьшается, и т. д. В конечном счете, устанавливается новый уровень HSP, соответствующий росту организма при более высокой температуре.

Таким образом, стимулом для регулона Hsp служит теплота, сенсором — конформационное состояние белка, сигналом — ненативные белки, проводником сигнала — шапероны DnaJ/DnaK/GrpE, а мастер-регулятором — белок RpoH.

Система ответа при тепловом шоке, используемая *E. coli*, не универсальна для прокариотов. Например, она отсутствует у грамположительных бактерий, в частности *B. subtilis*. В данном случае гены, кодирующие HSP, образуют не регулон, а стимулон.

18.1.3. Стимулоны

В качестве примера рассмотрим стимулон теплового шока *B. subtilis*. Он содержит два регулона, один из которых находится под негативным контролем репрессора, а другой негативно контролируется антисигма-фактором.

Напомним, что стимулон отличается от регулона тем, что он состоит не из одного, а из нескольких регулонов, уровень экспрессии которых изменяется с помощью индивидуальных мастер-регуляторов, но под общим стимулом.

Регулон CIRCE. В этот регулон входят два оперона. Первый оперон (*dnaK*) образован генами *hrc-grpE-dnaK-dnaJ-orf35-orf28-orf50* (за геном *dnaJ* идут три открытые рамки считывания; цифры обозначают молекулярные массы предполагаемых белковых продуктов). Второй оперон (*groE*) образован генами *groES-groEL*. Они транскрибируются без участия альтернативных сигма-факторов, при помощи главной РНК-полимеразы *B. subtilis* — $E\sigma^A$ ($E\sigma^{43}$; см. раздел 16.7.1). Левее этих оперонов находится палиндром CIRCE (сокр. англ. controlling inverted repeat of chaperone expression); его консенсусная последовательность у нескольких десятков видов грамположительных бактерий имеет структуру TTAGCACTC(N)₉ GAGTGCCTAA.

С регуляторным элементом CIRCE, играющим роль оператора, связывается белок-репрессор HrcA (сокр. англ. heat shock response control), который негативно регулирует свой собственный ген.

Белок HrcA приобретает активную конформацию с помощью шаперонов GroES и GroEL (но не шаперона DnaK). Если «праздных» шаперонов слишком много, гены белков HSP репрессируются. Наоборот, когда в результате теплового или токсического стресса в клетке накапливаются ненативные белки, они «оттитровывают» шапероны GroES и GroEL, в результате чего происходит индукция HSP. Стимулом для регулона CIRCE служат теплота или пуромицин.

Регулон общего стресса GSP. В случае *B. subtilis* основная часть генов, кодирующих HSP (>40), индуцируется не только при тепловом стрессе, но и под воздействием денатурирующих реагентов, например, этанола; при осмотическом шоке; при углеродном или фосфорном голодании; при гипоксии и т. д. Иными словами, индукция этого регулона является ответом при общем стрессе, что и объясняет его название (англ. general stress proteins, GSP).

Гены регулона GSP транскрибируются голоферментом РНК-полимеразы, в состав которого входит альтернативный сигма-фактор σ^B (σ^{30}). Его ген, *sigB* входит в состав октацистронного оперона *rsbR-rsbS-rsbT-rsbU-rsbV-rsbW-sigB-rsbX*, который транскрибируется с промотора P_B, расположенного между генами *rsbU* и *rsbV*. Промотор P_B распознается голоферментом $E\sigma^B$, т. е. экспрессия оперона GSP авторегулируется с помощью сигма-фактора σ^B .

Активность сигма-фактора σ^B , в свой черед, негативно контролируется антисигма-фактором RsbW и позитивно контролируется анти-антисигма-фактором RsbV. Активность последнего зависит от величины энергетического заряда (ЕС; см. II том учебника). При повышенном содержании АТФ (т.е. при высоком ЕС) антисигма-фактор RsbW образует комплекс с сигма-фактором σ^B , и регулон GSP репрессируется. При пониженном содержании АТФ (т.е. при низком ЕС), что, например, наблюдается в условиях голодания или при вхождении в стационарную фазу, антисигма-фактор RsbW связывается с анти-антисигма-фактором RsbV, и регулон GSP активируется.

18.1.4. Модулоны

В качестве примера рассмотрим модулон *строгого ответа* (англ. stringent response). В его состав входят гены и опероны, уровень экспрессии которых изменяется при трофическом стрессе, что влияет на общий паттерн метаболизма.

Голодание по источнику азота или углерода почти мгновенно вызывает плейотропный ответ, затрагивающий ~30% генов. Транскрипционное репрограммирование на уровне нескольких сотен генов домашнего хозяйства носит глобальный характер, и стратегия роста уступает место стратегии биосинтеза аминокислот. В результате этого не только обеспечивается выживание, но и оптимизируются процессы развития.

Бактерии обычно адаптируются к лимиту питательных субстратов, негативно регулируя биосинтез нуклеиновых кислот и белков и одновременно с этим — позитивно регулируя протеолиз и биосинтез аминокислот.

Медиаторами клеточного ответа, выраженного в изменении паттерна и интенсивности генерального метаболизма, в обоих случаях служат сигналы тревоги — *алармоны* (p)ppGpp. Об их роли в регуляторных процессах мы уже упоминали в разделе 16.7.1 (полиморфизм РНК-полимераз), разделе 17.2.1 (механизмы выживания клетки после прекращения роста), а также в разделах 17.5.2.1 и 17.5.2.2 (соответственно, дифференциация цист и эндоспор).

По современным данным, (p)ppGpp участвуют и в глобальных генетических процессах — репликации, рекомбинации и репарации. В частности, при репликации у *B. subtilis* алармоны ингибируют элонгацию на уровне действия праймазы.

Кроме того, показано участие алармонов в индукции факторов вирулентности у ряда патогенов, в частности *Legionella pneumophila*, а также в индукции биосинтеза антибиотиков у *Streptomyces antibioticus* и *S. coelicolor*.

В 1952 г. Сэндс (М. К. Sands) и Робертс (R. В. Roberts) установили, что у штамма *E. coli*, мутантного по гену *relA*, первой реакцией на аминокислотное голодание становится прекращение образования «стабильных» РНК, т.е. рРНК и тРНК. В 1969 г. Кэшель (М. Cashel) и Гэллент (J. Gallant) идентифицировали связующее звено между трофическим стрессом и адаптивным ответом. Специфическими лигандами, участвующими в этом регуляторном процессе, оказались необычные нуклеотиды — *гуанозин-3'-дифосфат, 5'-трифосфат* ((p)ppGpp) и *гуанозин-3', 5'-биспирофосфат* (ppGpp) (рис. 254), сообща фигурирующие под некорректным названием «гуанозинтетрафосфат». Они синтезируются путем переноса пирофосфатной группы от АТФ, соответственно, на ГТФ и ГДФ. Данная реакция катализируется 3'-киназой RelA (синтазой I) и 3'-гидролазой/синтазой SpoT (синтазой II).

В благоприятных условиях низкий базовый уровень обоих алармонов поддерживается за счет гидролазной активности SpoT: (p)ppGpp → pGpp. Напротив, при стрессе содержание (p)ppGpp резко возрастает и достигает концентрации в несколько мМ.

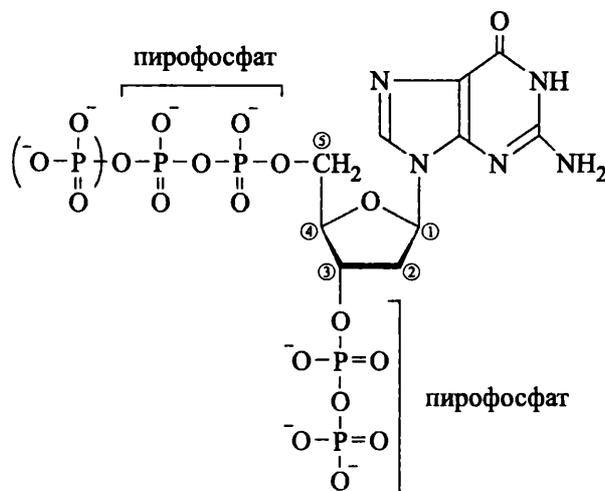


Рис. 254. Гуанозин-3'-дифосфат,5'-трифосфат ((p)ppGpp) и гуанозин-3',5'-биспирофосфат (ppGpp).

Алармоны (p)ppGpp контролируют экспрессию генов непосредственно на уровне транскрипции. В свою очередь, биосинтез самих алармонов регулируется соотношением между количествами аминоксил-тРНК и тРНК. Дело в том, что в условиях аминокислотного голодания вместо аминоксил-тРНК накапливаются молекулы «незаряженной» тРНК. Их появление в А-сайте рибосомы (см. I том учебника) блокирует трансляцию. Такое «праздное» состояние (англ. idling reaction) активирует ассоциированную с рибосомой синтазу RelA, что и приводит к накоплению (p)ppGpp. Хотя число молекул синтазы RelA относительно невелико (~1 на 200 рибосом), образование (p)ppGpp приводит к диссоциации этого фермента от праздной рибосомы и ассоциации с другой праздной рибосомой.

В отличие от синтазы RelA, синтаза SpoT в клетках *E. coli* не связана с рибосомой. Кроме того, она образует (p)ppGpp не в ответ на аминокислотное голодание, а при дефиците источника углерода или макро- и микроэлементов минерального питания — железа, фосфора и т. д. В частности, при голодании по жирным кислотам «незаряженный» ацилпереносящий белок АСР (см. II том учебника) связывается с синтазой SpoT и смещает баланс ее активностей в сторону синтеза, что приводит к накоплению (p)ppGpp.

В отличие от грамотрицательных бактерий, грамположительные бактерии часто бывают лишены гидролазы/синтазы SpoT, но зато содержат бифункциональный гомолог синтазы RelA.

Функции синтаз RelA/SpoT консервативны почти для всех грамотрицательных и грамположительных бактерий, что свидетельствует о глобальном адаптивном значении строгого ответа.

При накоплении (p)ppGpp эти нуклеотиды связываются с РНК-полимеразой в сайте, образованном $\beta\beta'\sigma$ -субъединицами, и вызывают конформационное изменение РНК-полимеразы, что влияет на выбор промоторов. В состав модулированной транскрипционной системы наряду с РНК-полимеразой, (p)ppGpp и промоторами входит белковый кофактор DksA (сокр. англ. discovery of suppressor of *dnaK*; белок *DnaK* — шаперон, аналог эукариотного белка *Hsp70*, способствующий протеолизу сигма-фактора теплового шока σ^{32} ; см. разделы 18.1.2 и 19.1.1).

При связывании трио РНК-полимераза/(p)ppGpp/DksA с «чувствительными» промоторами транскрипция блокируется либо на стадии закрытого комплекса, либо из-за образования нестабильного открытого комплекса (см. раздел 16.7.1.1).

Большинство промоторов, попадающих под негативный строгий контроль, содержит GC-богатый регуляторный мотив, или *дискриминатор* (англ. discriminator), расположенный между положением -10 и стартовой точкой транскрипции (см. раздел 16.7.1.1). При строгом ответе, в частности, уменьшается синтез стабильной РНК из-за понижения сродства РНК-полимеразы к сильному промотору *rrn*-оперона P1 (см. раздел 18.2.1), что незамедлительно приводит к падению скорости роста.

Часть генов, напротив, попадает под позитивный строгий контроль. В данном случае либо стимулируется образование открытого комплекса, либо промоторы образуют стабильные открытые комплексы. Общей чертой таких генов является АТ-богатый дискриминатор, расположенный между положением -10 и стартовой точкой транскрипции. Характерными примерами служат гены транспорта и биосинтеза аминокислот, в частности ген *hisG*, а также ген *groS* альтернативного сигма-фактора σ^S (σ^{38}), входящий в регулон общего стресса Rpo (см. раздел 18.1.2).

Наконец, (p)ppGpp косвенно активирует экспрессию стрессовых генов, освобождая РНК-полимеразу от σ^{70} -специфичных промоторов, что в ответ способствует использованию альтернативных сигма-факторов, например σ^{38} (см. раздел 17.2.1 и рис. 225).

18.2. ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Решающее значение для экспрессии генов имеет регуляция транскрипции, в особенности на стадии инициации (см. разделы 16.7.1.1 и 18.1.1).

С регуляцией транскрипции тесно связана посттранскрипционная регуляция, объектом которой служит наиболее вариабельный продукт транскрипции — мРНК.

Механизм контроля на данном регуляторном уровне заключается в том, чтобы заблокировать мРНК или поспособствовать ее деградации, а в качестве контролирующих факторов могут выступать либо регуляторные белки, либо регуляторные РНК.

18.2.1. Регуляторные белки

Регуляторные белки непосредственно связываются с мРНК, активируя или подавляя процесс трансляции. В качестве примеров приведем аконитазу, а также белки CtsA и RsmA.

Аконитаза. С помощью фермента аконитазы цитрат изомеризуется в изоцитрат; интермедиатом этой реакции служит *cis*-аконитат. Это единственный фермент цикла Кребса (см. II том учебника), содержащий редокс-лабильные [Fe₄S₄]-кластеры, что позволяет ему служить сенсором молекулярного кислорода.

Аконитаза *E. coli* представлена двумя изоформами: AcpA и AcpB. Первая из них образуется в стационарной фазе роста в условиях окислительного стресса (см. раздел 19.1.6), а вторая — при экспоненциальном росте. Хотя обе они теряют свой железо-серный кластер при окислении кислородом, аконитаза AcpA проявляет более

высокую устойчивость, чем аконитаза AcpB. Образующийся апо-AcpB связывается с мРНК ряда защитных белков, в частности с мРНК супероксиддисмутазы (*sodA*), и стимулирует ее трансляцию за счет повышения стабильности транскрипта.

Белки CsrA и RsmA. Эти взаимно гомологичные регуляторные белки являются частью регуляторных систем Csr и Rsm, под негативным контролем которых находятся гены первичного или вторичного метаболизма. Они связываются с мРНК-мишенями и подавляют их трансляцию.

Csr-регулон *E. coli* (сокр. англ. carbon storage regulation) негативно контролирует ряд процессов первичного метаболизма. Белок CsrA связывается с мРНК, в результате чего репрессируется транспорт пептидов, глюконеогенез и метаболизм гликогена.

В свою очередь, Rsm-регулон (сокр. англ. regulator of secondary metabolism) участвует в негативном контроле вторичного метаболизма. Белок RsmA связывается с мРНК, вследствие чего подавляется образование некоторых вторичных метаболитов, в частности, ответственных за чувство кворума (см. раздел 18.4.2).

18.2.2. Регуляторные РНК

Регуляторные РНК относятся к гетерогенному семейству *некодирующих* РНК (англ. non-coding RNA). Иными словами, это *не кодирующие мРНК*. Из понятия «некодирующие РНК» принято исключать рРНК и тРНК, хотя они также не выполняют кодирующую функцию (см. раздел 16.3.1).

Некодирующие РНК подразделяются на антисмысловые РНК и малые РНК, причем те и другие могут выступать в роли посттранскрипционных регуляторов.

Антисмысловые РНК и малые РНК (общие сведения). Чтобы разъяснить содержание термина «антисмысловая» РНК, напомним, что «смысловой» РНК (англ. sense RNA) называется мРНК. Смысловая РНК также называется «кодирующей» РНК (англ. coding RNA), или «плюс» РНК (+РНК). Если не принимать во внимание повсеместную замену ДНК-ового тимина на РНК-овый урацил, то смысловая РНК имеет одинаковую нуклеотидную последовательность с нематричной цепью ДНК, т. е. они колинеарны. В свою очередь, антисмысловая РНК (англ. antisense RNA) имеет последовательность, антипараллельную последовательности смысловой РНК, т. е. они взаимно комплементарны. Антисмысловая РНК также называется некодирующей РНК (англ. non-coding RNA), или «минус» РНК (-РНК). Смысловая РНК и антисмысловая РНК транскрибируются с взаимно комплементарных цепей одной и той же молекулы ДНК с использованием противоположно ориентированных промоторов (см. раздел 16.7.1).

Малые РНК (англ. small RNA, sRNA; «малыми» они названы из-за своего сравнительно небольшого размера, 40–400 н., хотя ближе к верхней границе это уже достаточно крупные молекулы, так что данный термин не следует понимать буквально) представляют собой транскрипты иного рода. В то время как антисмысловые РНК считываются с нематричной, или отстающей цепи ДНК, гены малых РНК расположены на матричной, или ведущей цепи ДНК, т. е. они котранскрибируются с генами мРНК (рис. 255).

Антисмысловые РНК. Поскольку смысловая +РНК и антисмысловая -РНК взаимно комплементарны, они могут образовывать \pm дуплекс, стабилизированный водородными связями между азотистыми основаниями (рис. 255).

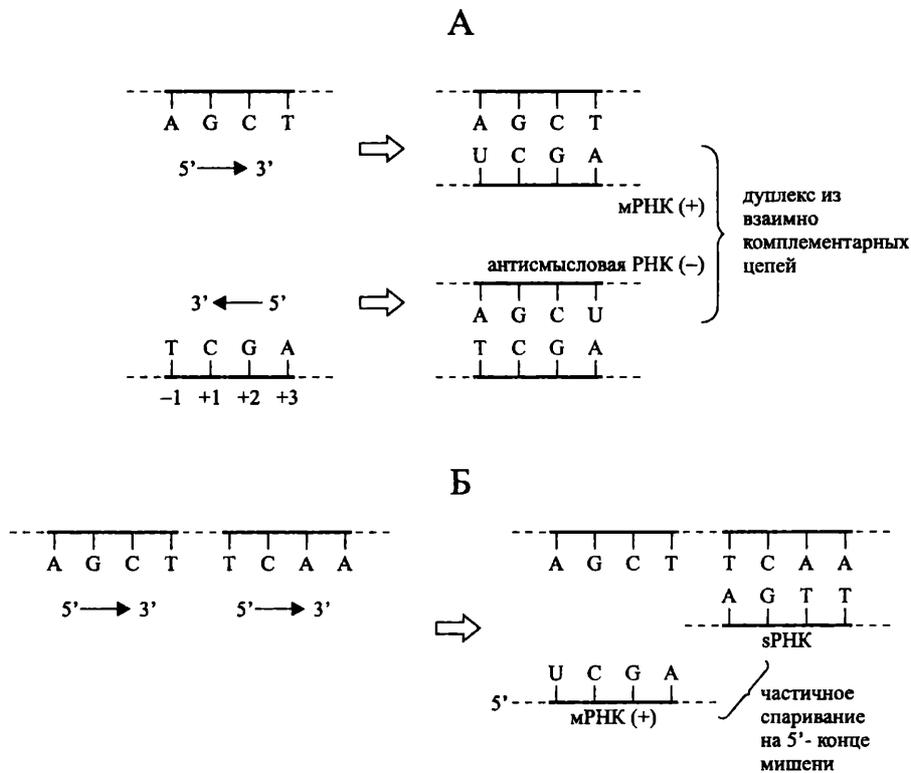


Рис. 255. Образование антисмысловых РНК и малых РНК (sРНК) и их взаимодействие с мишенями РНК.

А — антисмысловая РНК; Б — малая РНК.

Мишенью для антисмысловой РНК обычно служит позиционно совпадающая с ней мРНК. Реже ген, кодирующий РНК-мишень, и локус, с которого транскрибируется антисмысловая РНК, находятся на взаимном удалении.

Образование дуплекса мРНК с антисмысловой РНК препятствует инициации трансляции, поскольку конкурентно блокируется связывание 3'-конца 16S рРНК с боксом Шайна—Дальгарно (см. ниже), который предшествует старт-кодону AUG.

В некоторых случаях антисмысловые РНК не только гибридизуются с РНК-мишенью, но и выступают в роли *рибозимов* (англ. *ribozyme*), т. е. катализируют ее ферментативное расщепление.

Известны также случаи антисмысловой регуляции не только инициации трансляции, но и репликации. Классическим примером служит регулирование копийности плазмиды ColE1, когда антисмысловая РНК I блокирует РНК II-праймер (см. раздел 16.7.4).

В широком плане, антисмысловые последовательности представляют собой природные или синтетические поли(дезоксир)ибонуклеотиды, которые специфически распознают и блокируют смысловые последовательности нуклеиновых кислот. При этом следует иметь в виду, что ряд мишеней (например, участки ДНК, не являющиеся структурными генами, а также не-мРНК) не относится к числу кодирующих и, строго говоря, не попадает под определение смысловых последовательностей.

Антисмысловые механизмы широко используются в природной регуляции экспрессии генов. Они служат орудием экспериментальных исследований и основой для разработки терапевтических препаратов.

В отличие от регуляторов транскрипции факторы, регулирующие трансляцию, менее изучены. В этом отношении антисмысловые последовательности являются исключением.

Их эффект ярко проявляется на этапе инициации, тогда как элонгация блокируется только очень прочно связывающимися антисмысловыми последовательностями, что объясняется высокой процессивностью рибосомы.

Малые РНК. В настоящее время у энтеробактерий, в первую очередь у *E. coli*, выявлено >70 малых РНК. Предполагается, что геномы этих бактерий содержат до 200–300 генов малых РНК, что составляет 5% числа структурных генов.

Чаще всего роль малых РНК неизвестна, однако примерно для 20 из них она все же установлена.

Малые РНК с транспортной и/или метаболической функцией. К этой группе относится 4,5S РНК, которая входит в состав РНК-белкового комплекса, участвующего в работе SRP-варианта генеральной секреторной Sec-системы (см. I том учебника).

Другая малая РНК размером 350–450 н. входит, в качестве каталитической субъединицы (рибозима), в состав рибонуклеопротеинового комплекса РНКазы Р — незаменимого фермента всех живых клеток, который обеспечивает созревание, т. е. посттранскрипционный процессинг 5'-конца тРНК.

Третья малая РНК, RyhB образует дуплекс с мРНК-мишенью, чему способствует шаперон для РНК — белок Hfq (см. ниже). РНК-мишень в составе такого дуплекса быстро разрушается под воздействием РНКазы E — одного из ферментных компонентов деградосомы (см. I том учебника, а также раздел 16.7.5 настоящего тома).

Малые РНК-имитаторы. Они подменяют собой функционально важные сайты либо в ДНК, либо в РНК из другого класса.

Например, 6S РНК напоминает по структуре открытый промотор и ингибирует транскрипцию, действуя непосредственно на уровне голофермента РНК-полимеразы σ^{70} . Она связывается с активным центром и блокирует его присоединение к промоторным участкам. В то время как транскрипция с σ^{70} -зависимых промоторов подавляется, транскрипция с σ^S -зависимых промоторов, напротив, активируется, что способствует адаптации к условиям общего стресса (см. выше).

Другой пример — малые РНК CsgB и CsgC. Они служат антагонистами регуляторного белка CsgA, который связывается с боксом Шайна–Дальгарно в мРНК *glgC*, *cstA* и *pgaA* и блокирует их трансляцию (см. раздел 18.2.1). Малые РНК CsgB и CsgC «изолируют» белок CsgA, поскольку они содержат множественные повторы, гомологичные сайтам его узнавания в мРНК.

Регуляторные малые РНК. Они наиболее распространены и участвуют в посттранскрипционной регуляции, контролируя инициацию трансляции.

Регуляторные малые РНК содержат небольшие (около 20 н.) участки, гомологичные нетранслируемому 5'-концу мРНК и образуют с ним «несовершенные» дуплексы. В зависимости от положения сайта связывания с мишенью они подразделяются на две группы.

Представители первой группы образуют дуплекс в боксе Шайна–Дальгарно (часть лидерной последовательности на 5'-конце мРНК, имеющая консенсусную структуру AGGAGG) или непосредственно рядом с ним, что блокирует трансляцию и дестабилизирует транскрипт.

Представители второй группы образуют дуплекс с мишенью левее (upstream)

бокса Шайна–Дальгарно, что приводит к изменению вторичной структуры мРНК и стимулирует связывание транскрипта с рибосомой.

Образованию дуплекса регуляторной малой РНК с мишенью способствует белок Hfq (сокр. англ. host factor for bacteriophage Q β replication), играющий роль *шаперона для РНК*. Он гомологичен эукариотным Sm-белкам (сокр. англ. small ribonucleoprotein), которые вместе с малыми ядерными РНК (англ. small nuclear RNA, snRNA) образуют кор *сплайсосомы* — рибонуклеопротеинового комплекса, придающего пре-мРНК конформацию, необходимую для сплайсинга интронов. Кроме того, он гомологичен эукариотным Lsm-белкам (сокр. англ. like Sm), которые входят в состав сплайсосомы совместно с Sm-белками и участвуют в декэппировании и деградации мРНК.

Белок Hfq широко, хотя и не универсально, представлен у бактерий (в частности, он отсутствует у представителей фил BIV *Deinococcus-Thermus*, VX *Cyanobacteria*, BVIV *Actinobacteria* и BVVI *Chlamydiae*). По аналогии с Sm-белками, гексагональные кольца белка Hfq связываются с AU-богатыми участками РНК.

У бактерий регуляторные малые РНК выступают в роли координаторов адаптационных процессов, обеспечивая ответ на изменившиеся условия внешней среды; их образование индуцируется в условиях стресса. Приведем наиболее интересные примеры.

Малые РНК *MicF* (93 н.) и *MicC* (109 н.). Они негативно регулируют синтез поринов OmpF/OmpC, связываясь с соответствующими мРНК, и, наряду с малыми РНК InvR, MicA, OmgA, OmgB, RseX и RybB участвуют в клеточном ответе при периплазматическом стрессе (см. раздел 19.2). У энтеробактерий, в частности *E. coli* и *Salmonella* spp., такой ответ обеспечивается модулоном σ^E и связан с тонким контролем над составом поринов.

Напомним, что тримеры поринов общего назначения, или «осмопоринов» OmpF и OmpC формируют в ОМ гидрофильные поры и участвуют в осмоадаптации, а также обеспечивают устойчивость к поступающим извне вредным для бактерий соединениям, например желчным кислотам (см. I том учебника). OmpC-поры имеют меньший диаметр и доминируют при высоком осмотическом давлении, в частности при избылии питательных субстратов. В противоположной ситуации, при низком осмотическом давлении, начинают доминировать OmpF-поры.

Дифференциальное образование поринов OmpF и OmpC контролируется на посттранскрипционном уровне двухкомпонентной сигнальной системой. Роль сенсора, расположенного в СМ, выполняет белок EnvZ, который фосфорилирует регулятор OmpR. Белок OmpR~P подавляет транскрипцию гена малой РНК *MicC* и активирует транскрипцию гена малой РНК *MicF*. В свою очередь, эти малые РНК негативно контролируют трансляцию мРНК поринов OmpC и OmpF.

Малая РНК *OxyS* (109 н.). Ген этой малой РНК входит в состав регулона OxyR. Ее синтез индуцируется при окислительном стрессе (см. раздел 19.1.6), и она играет роль негативного регулятора, образуя дуплекс с мРНК активатора транскрипции — белка FhlA. Вследствие этого подавляется образование FhlA-зависимых ферментов, содержащих металлические кофакторы. Поскольку при стрессе последние подвергаются неконтролируемому окислению, что опасно для клетки, значение такой адаптивной реакции очевидно.

Малая РНК *DsrA* (87 н.). Синтез этой малой РНК индуцируется при холодном шоке (см. раздел 19.1.1). Она играет роль позитивного регулятора, образуя дуплекс с мРНК сигма-фактора σ^S (*trpS*), что не до конца выясненным путем дает эффект активации трансляции.

Малые РНК, контролирующие патогенез. У грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* малая РНК III (514 н.) контролирует экспрессию факторов вирулентности. Ее ген входит в состав модулона Agg (сокр. англ. autoinducing growth regulator), отвечающего за образование адгезинов и гемолизина, а также протеаз и других литических ферментов. Аналогичным образом, у грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* малые РНК RsmY и RsmZ регулируют образование экзотоксинов.

18.3. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА

Метаболизм (энергетический и конструктивный; генеральный и специализированный; эндогенный и основанный на использовании экзогенных субстратов) находится под контролем многих регуляторных систем, которые действуют как автономно, так и взаимосвязанно, т. е. в сети.

Адаптивно регулируя свой метаболизм, прокариоты растут и размножаются в соответствии с внешними трофическими ресурсами, причем не только в благоприятных условиях, но и при стрессах. В природной среде обитания физиологической нормой чаще всего является именно стресс, хотя большинство данных о регуляции метаболизма получено при лабораторных экспериментах в комфортном экологическом климате.

18.3.1. Регуляция энергетического метаболизма

Источник энергии, наряду со строительным материалом, необходим для поддержания информационных процессов и ведения домашнего хозяйства. Неудивительно, что системы, отвечающие за использование источника энергии, эффективно регулируются.

В отличие от конструктивного метаболизма, который, как правило, контролируют химические сигналы, энергетический метаболизм зависит от двух принципиально разных сигналов — светового при фототрофии и химического при хемотрофии.

18.3.1.1. Регуляция фототрофии

Живые организмы могут использовать свет по двум назначениям — как экзогенный источник энергии и как внешний сигнал, регулирующий метаболизм и/или поведение.

Энергетические аспекты фототрофии мы уже рассматривали во II томе учебника. Теперь же остановимся на фоторегуляции метаболизма, прежде всего на регуляции фототрофии, а роль света в контроле поведения обсудим отдельно в разделе 18.4.1.

У прокариотов описан ряд фоторецепторов, содержащих сенсорный и регуляторный модули. Сенсорный модуль регистрирует световой «климат» и передает сигнал регуляторному модулю, который обеспечивает адаптивный ответ.

Сенсорный модуль фоторецептора обладает антенными свойствами, т. е. интенсивно поглощает свет в определенной части спектра. Для этого в нем имеется специальный резонатор электромагнитного излучения, или хромофор.

Хромофоры. Хромофор связан с сенсорным модулем фоторецептора либо ковалентно, либо нековалентно, т. е. в качестве лиганда. В первом случае фоторецептор представляет собой окрашенный белок, или хромопротеин, во втором случае это пигментбелковый комплекс.

При поглощении света видимой (или соседней с ней) части спектра хромофоры изменяют свою конформацию, что обратимо влияет на структуру апопротеина и тем самым активирует фоторецептор. По непонятной причине природное разнообразие фоторецепторных хромофоров крайне ограничено. К ним относятся:

— **ретиаль**, или полиизопреноид, входящий в состав ретинопротеинов (см. II том учебника и раздел 18.4.1.2 настоящего тома);

— **биливердин**, или ациклический тетрапиррол, входящий в состав бактериофитохромов (см. рис. 256);

— ***n*-гидроксикоричная кислота**, или мононенасыщенная жирная кислота с ароматическим кольцом, входящая в состав фотоактивного желтого белка РУР (см. раздел 18.4.1.2);

— **ФМН**, или нековалентно связанный флавиновый аденинмононуклеотид (см. II том учебника);

— **ФАД**, или нековалентно связанный флавиновый адениндинуклеотид (см. II том учебника).

Функциональная роль флавиновых фоторецепторов, которые имеются не только у фототрофов, но встречаются и у хемотрофных бактерий, например *B. subtilis*, известна лишь в немногих случаях. В качестве примера назовем ФМН-содержащий сенсорный домен LOV (сокр. англ. light control of virulence; *гистидинкиназа с сенсорным доменом LOV активирует проникновение в макрофаги патогенной бактерии Brucella abortus*), а также ФАД-содержащие сенсорные домены BLUF (сокр. англ. blue-light flavoprotein) и CRY (сокр. англ. cryptochrome).

Рецепторные белки (общие сведения). Рецепторные белки используются регуляторными системами, с помощью которых живые организмы оценивают состояние окружающей среды и адаптивно изменяют характер своего метаболизма или развития в ответ на изменение ее физико-химических параметров. Прямое взаимодействие рецепторных белков с физико-химическими стимулами порождает сигнал, передаваемый исполнителю ответа.

Как правило, терминальные модули рецепторных белков функционально специализированы. N-концевой сенсорный модуль активируется под воздействием внешнего или внутреннего стимула, посредством конформационного изменения своей полипептидной цепи. С-концевой сигнальный модуль активируется сенсорным модулем и взаимодействует с сигнальной системой, состоящей из проводника сигнала и регулятора ответа.

Рецепторные белки прокариотов подразделяются на три большие группы:

— **сенсорные гистидинкиназы**, входящие в состав двухкомпонентных сигнальных систем (см. раздел 18.1.1.3);

— **трансдукторы сигнала при хемотаксисе**, также известные под названием «хеморецепторы», или «метилакцепторные белки хемотаксиса» (см. раздел 18.4.1.1);

— **дигуанилатциклазы**, или ферменты, которые синтезируют циклический динуклеотид цикло-ди-ГМФ, участвующий в контроле транскрипции (см. раздел 18.4.2).

Сенсорные модули всех трех групп рецепторных белков содержат консервативные *сенсорные домены* из нескольких десятков аминокислотных остатков. Эти домены, в свою очередь, связывают низкомолекулярные кофакторы, или *протетические группы* (от лат. prosthesis — приставка). Они непосредственно воспринимают стимул, и от них во многом зависит специфичность сенсорного домена.

К числу важнейших сенсорных доменов относятся PAS-домен, или домен Per-Arnt-Sim (сокр. англ. period clock protein-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-single-minded protein; «целеустремленные» *SIM-гены дрозофилы контролируют формирование стволовой части центральной нервной системы, а их гомологи у млекопитающих детерминируют эмбриональное и постэмбриональное развитие*).

В последнее время описаны новые сенсорные домены — Cache-домены (сокр. англ. channels and chemotactic receptors), ESENS-домены (сокр. англ. extracellular sensing) и CHASE-домены (сокр. англ. cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular).

Сенсорные PAS-домены распространены исключительно широко и входят в состав рецепторных белков у бактерий и архей, а также у грибов, растений, насекомых и позвоночных. Они осуществляют контроль разнообразных функций, в том числе со сложным фенотипическим проявлением. Как видно из расшифровки акронима «Per-Arnt-Sim», PAS-домены содержатся в гистидинкиназах и серин/треонинкиназах, хеморецепторах и фоторецепторах, белках циркадных ритмов, белках ионных каналов, фосфодиэстеразах циклических динуклеотидов, регуляторах ответа на гипоксию, регуляторах эмбрионального развития и формирования центральной нервной системы и т. д.

Хотя сенсорные PAS-домены всегда находятся внутри клетки, они могут реагировать как на внутренние, так и на внешние стимулы (небольшие лиганды, редокс-потенциал, кислород, свет). Мониторинг этих стимулов сводится «к общему знаменателю» и косвенно свидетельствует о состоянии энергообеспечения живой клетки.

Размер PAS-домена составляет ~100 а.о., и их число в регуляторных белках прокариотов варьирует от 1 до 6 (у ядерных организмов PAS-домены обычно парные). Например, число PAS-доменов в белке KinA *B. subtilis*, который участвует в раннем контроле споруляции (см. раздел 17.5.2.2), равно трем.

PAS-домены выявлены более, чем в 200 белках, имеющих у представителей всех трех стволов глобального эволюционного древа, причем их прототипом является PAS-домен фотоактивного желтого белка YYP пурпурных бактерий (см. раздел 18.4.1.2).

Большинство PAS-доменов у прокариотов входит в состав сенсорных гистидинкиназ. N-концевой модуль этих ферментов либо самостоятельно воспринимает стимул, либо активируется «вышестоящим» сенсором-рецептором. В составе C-концевого модуля гистидинкиназы имеется консервативный остаток His, который подвергается автофосфорилированию. Затем фосфорильная группа переносится на остаток Asp на N-конце регулятора ответа. В результате этого выходной домен регулятора ответа получает возможность взаимодействовать с ДНК (если это транскрипционный фактор) или с регуляторным белком двигательного аппарата (при таксисах).

Фоторецепторные белки. Разнообразие фоторецепторных белков сводится к узкому набору эволюционно консервативных типов (см. ниже).

В силу особенности строения сенсорных модулей фоторецепторных белков, в первую очередь их PAS-доменов, способных воспринимать разные сигналы, регуляторное воздействие света на фототрофный метаболизм часто сочетается с регуляторным воздействием молекулярного кислорода.

Регуляция биогенеза аппарата квази-фототрофии. Экстремально галофильный археот *Halobacterium salinarum*, находящийся на ярком свете в аэробных условиях, получает энергию за счет дыхания. Недостаток кислорода вызывает быстрый переход к квази-фототрофии, что основано на использовании бактериородопсина в качестве протонофорной системы (см. II том учебника). Бактериоопсин,

или апопротеин бактериородопсина кодируется геном *bop*, который входит в общий оперон с генами *brp* (сокр. англ. bacterio-opsin related protein) и *bat* (сокр. англ. bacterio-opsin activator). Свет индуцирует экспрессию всех трех генов, а ген *bat* дополнительно активируется при низком парциальном давлении кислорода.

Свет и кислород не только регулируют экспрессию генов *brp* и *bat*, но и непосредственно влияют на активность продуктов этих генов, белков *Bpr* и *Bat*.

Первый ретинопротеиновый фоторецептор -- *Bpr* под воздействием света активирует синтез хромофора, который присоединяется к бактериоопсину *Bop*, в результате чего образуется бактериородопсин.

Второй ретинопротеиновый фоторецептор -- *Bat* способен интегрировать световой и редокс-сигналы и с помощью общего промотора регулировать активность генов, отвечающих за квази-фототрофию (в частности, он позитивно контролирует экспрессию генов *bop*, *bat* и *brp*). Белок *Bat* содержит N-концевой PAS-домен, играющий роль сенсора кислорода, центральный светочувствительный PAS-домен и C-концевой ДНК-связывающий домен (с характерной структурой НТН; см. раздел 18.1.1.1). Световой сигнал сильнее редокс-сигнала, и на ярком свете бактериородопсин образуется даже в аэробных условиях.

Регуляция биогенеза аноксигенного фотосинтетического аппарата. У факультативно фототрофных бактерий, в частности у несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *R. capsulatus*, биогенез фотосинтетического аппарата позитивно контролируется светом и негативно контролируется кислородом. Позитивный контроль способствует ассимиляции энергии света, а негативный служит частью механизма, с помощью которого предотвращаются вредные последствия накопления активных форм кислорода (см. раздел 19.1.6).

За биогенез фотосинтетического аппарата отвечают два оперона. Первый из них, *puf* (сокр. англ. photosynthetic unit operon *f*) состоит из генов, кодирующих апопротеины реакционного центра и апопротеины кор-антенны LH1, а также из генов, отвечающих за сборку комплекса реакционный центр/кор-антенна. Второй оперон, *psc* содержит структурные и регуляторные гены периферической антенны LHII (см. II том учебника).

Анаэробные условия. На ярком свете в анаэробных условиях активируются гены фотосинтетического аппарата, хотя сигналом служит не свет как таковой, а восстановленное состояние электрон-транспортной цепи. Позитивный контроль осуществляет двухкомпонентная сигнальная система *RegB/RegA* (в случае *R. capsulatus*), или *PrrA/PrrB* (сокр. англ. photosynthetic response regulator; в случае *R. sphaeroides*). С помощью электрон-транспортной цепи происходит восстановление дисульфидных связей в димере белка-сенсора. Он переходит в активную мономерную форму, автофосфорилируется и трансфосфорилирует белок-регулятор, который активирует транскрипцию.

В анаэробных условиях или при относительно низком содержании кислорода свет синей части спектра (~450 нм), потенциально опасный для клетки, выступает в роли негативного сигнала (англ. blue light effect). В данном случае фоторецептором служит белок *ArrA*. Он содержит N-концевой BLUF-домен, редокс-чувствительный центральный домен и C-концевой домен, обладающий дисульфидредуктазной активностью. Белок *ArrA*, активированный синим светом, восстанавливает дисульфидную связь в димерах репрессора *RpsR* (см. ниже), переводя его в активную мономерную форму.

Аэробные условия. В аэробных условиях гены фотосинтетического аппарата репрессируются. В данном случае контроль осуществляют вышеупомянутые двух-

компонентные сигнальные системы RegB/RegA или PrrA/PrrB. При взаимодействии с кислородом между двумя субъединицами сенсора образуются дисульфидные связи. Димерная форма неспособна к автофосфорилированию и не трансфосфорилирует регулятор, в результате чего тот не может активировать транскрипцию.

Дополнительно используется однокомпонентный негативный регулятор CrtJ (сокр. англ. carotenoid; в случае *R. capsulatus*), или его гомолог PpsR (сокр. англ. photosynthetic pigment synthesis; в случае *R. sphaeroides*). Они оба содержат PAS-домены, играющие роль сенсора кислорода. Мишенью для этих белков служат гены оперона *psc*, в частности, отвечающие за биосинтез каротиноидов и бактериохлорофилла.

При ингибировании биогенеза фотосинтетического аппарата его размер в результате двух последовательно проходящих клеточных делений уменьшается на порядок (см. I том учебника). Развивающийся энергетический стресс вынуждает факультативных фототрофов перейти на хемотрофию, а облигатные фототрофы начинают тратить резервные вещества и, когда те подходят к концу, теряют жизнеспособность.

Фотоакклиматизация с помощью бактериофитохрома. У некоторых фототрофных бактерий экспрессия фотосинтетических генов контролируется светом красной части спектра (~650 нм). В данном случае в качестве фоторецептора используется бактериофитохром.

Бактериофитохром содержит два N-концевых домена, которые совместно связывают тетрапиррольный хромофор биливердин. Первый домен, GAF (сокр. англ. cGMP-phosphodiesterases, adenylate cyclases and FhlA; *глобальный регулятор FhlA представляет собой транскрипционный фактор, активирующий формиат-гидрогеназную систему*), принадлежит к суперсемейству PAS-доменов. Второй домен относится к семейству PHY (сокр. англ. phytochrome). C-концевой домен обладает гистидинкиназной активностью.

Под воздействием красного или «дальнего» красного света биливердин *транс/цис*-изомеризуется из формы Pr, которая имеет максимум поглощения в красном свете (сокр. англ. phytochrome, red-absorbing), в форму Pfr, максимум поглощения которой лежит в дальней красной области (сокр. англ. phytochrome, far red absorbing) (рис. 256).

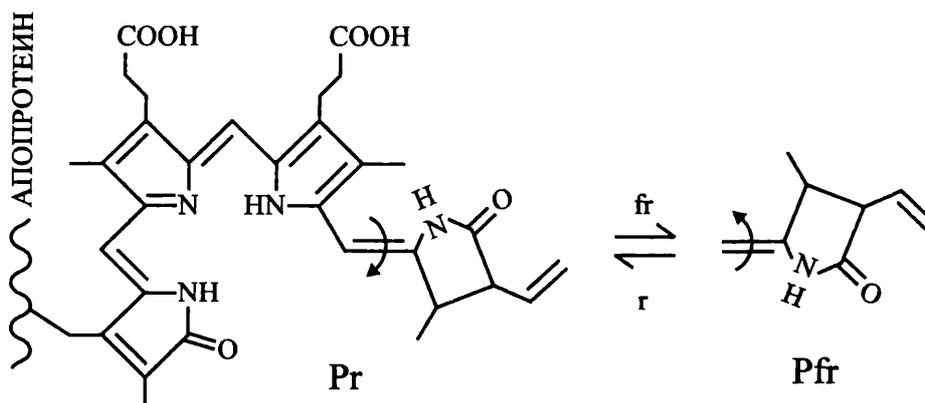


Рис. 256. Хромофор бактериофитохрома (биливердин) и его обратимая изомеризация из *транс*-формы (Pr) в *цис*-форму (Pfr) под воздействием «дальнего» красного (fr) и красного (r) света.

Изменяя количественное соотношение двух форм бактериофитохрома, пурпурная бактерия *Rhodospseudomonas palustris* осуществляет мониторинг качественного состава света и адаптивно изменяет состав своего антенного комплекса, т. е. фотоакклиматизируется.

Другим примером фотоакклиматизации с помощью бактериофитохрома служит *комплементарная хроматическая адаптация* (англ. complementary chromatic adaptation, CCA), происходящая у некоторых цианобактерий. Этот феномен заключается в том, что на зеленом свете (~550 нм) преимущественно синтезируется поглощающий именно этот свет красный фикобилипротеин-фикоэритрин, а на красном свете (~650 нм) — преимущественно поглощающий именно этот свет синий фикобилипротеин-фикоцианин. В данном случае бактериофитохром RcaE (сокр. англ. receptor of chromatic adaptation) содержит сенсорный GAF-домен, который реагирует на зеленый и синий свет, а также

C-концевой гистидинкиназный домен. Красный свет стимулирует автокиназную активность сенсора RcaE, а зеленый свет ее подавляет. В результате белок RcaE совместно с вторичным передатчиком RcaF и регулятором RcaC образуют фосфореле, которое контролирует синтез фикобилипротеинов.

18.3.1.2. Регуляция хемотропии

Системы, контролирующие использование энергии окисления химических субстратов, разнообразны и многочисленны. Мы избирательно остановимся только на примере (ан)аэробного дыхания.

Выбор и использование терминального акцептора электронов для дыхательной цепи являются ключевыми моментами в биоэнергетической адаптации хемотрофов (см. II том учебника). Несмотря на негативные последствия контакта живых систем с молекулярным кислородом, терминальные кислородредуктазы наиболее выгодны в биологическом плане из-за максимальной эффективности ассимиляции энергии с помощью аэробной дыхательной цепи (см. раздел 19.1.6).

Хотя концентрация кислорода в атмосферном воздухе высока и относительно постоянна, его присутствие в отдельных глобальных и локальных нишах ограничивается рядом физико-химических и биотических факторов. В частности, это диффузионные барьеры и растворимость кислорода (зависящая от температуры и ионной силы среды), а также взаимная конкуренция аэробов за этот терминальный акцептор электронов. Поэтому неудивительно, что обратимый переход от аэробного метаболизма к анаэробному метаболизму, и, прежде всего, к анаэробному дыханию, является важным элементом экологической адаптации прокариотов и находится под контролем регуляторных систем. При этом стимулом служит либо сам молекулярный кислород, либо альтернативные терминальные акцепторы, особенно нитрат и нитрит.

Регуляторные системы, реагирующие на кислород или его заменители, могут быть как однокомпонентными, так и двухкомпонентными, причем анаэробное дыхание может регулироваться как негативно, так и позитивно.

Мастер-регулятор FNR. Ключевую роль в биоэнергетической адаптации факультативно анаэробных бактерий, в частности *E. coli*, играет однокомпонентная сигнальная система — транскрипционный фактор FNR (сокр. англ. fumarate and nitrate regulation), влияющий на активность >100 генов.

FNR негативно контролирует экспрессию генов кислородредуктазного участка дыхательной цепи и одновременно с этим запускает транскрипцию генов, кодирующих «анаэробные» терминальные редуктазы (прежде всего, фумаратредуктазу и нитратредуктазу), а также ферменты анаэробного метаболизма, что позволяет бактериям адаптироваться к анаэробным и микроаэробным нишам.

Активная форма белка FNR представляет собой гомодимер 2×30 кДа. Отдельная субъединица содержит:

- N-концевой домен (служит сенсором молекулярного кислорода);
- C-концевой домен (обеспечивает связывание с ДНК);
- срединный домен (активирует РНК-полимеразу и участвует в димеризации).

Для образования гомодимера необходим молекулярный мостик, роль которого играет низкопотенциальный $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -кластер (см. II том учебника). В аэробных условиях он окисляется молекулярным кислородом в $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластер, неспособный обеспечить димеризацию. В микроаэробных или анаэробных условиях $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластер восстанавливается в $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -кластер, субъединицы димеризуются, и регенерируется активная форма FNR, которая обладает сродством к специфическим участкам ДНК, или «FNR-боксам». FNR-боксы, ограниченные инвертированными повторами TTGAT...ATCAA, расположены по соседству с FNR-активируемыми промоторами. Запуск транскрипции генов анаэробного метаболизма обеспечивается не только ДНК-белковым, но и белок-белковым взаимодействием между срединным доменом белка FNR и сигма-фактором σ^{70} .

FNR может быть не только активатором, но и репрессором. Во втором случае FNR-боксы находятся слишком близко от промоторов «анаэробных» генов, в результате чего FNR аллостерически подавляет РНК-полимеразу. На этом фоне конститутивно экспрессируются гены оперона *ndh*, кодирующие субъединицы «аэробной» НАДН-дегидрогеназы (см. II том учебника).

Регуляторные системы *NarX/NarL* и *NarQ/NarP*. Факультативно анаэробные бактерии, в частности *E. coli*, обладают двухкомпонентными сигнальными системами *NarX/NarL* и *NarQ/NarP*, которые регулируют транскрипцию в зависимости от присутствия в окружающей среде анионов нитрата. С их помощью кислородное дыхание переключается на нитратное.

Транскрипционные регуляторы из семейства *Nar* (сокращение от англ. nitrate reductase) влияют на экспрессию до 100 генов 12 оперонов, в том числе оперонов мембранной нитратредуктазы (*narGHIJ*), периплазматической нитратредуктазы (*narPABC*), мембранной нитритредуктазы (*nrfAH*), периплазматической нитритредуктазы (*nirST*), форматдегидрогеназы (*fdhABC*) и фумаратредуктазы (*frdABCD*).

Обе двухкомпонентные сигнальные системы состоят из взаимно гомологичных сенсоров (*NarX* и *NarQ*) и регуляторов (*NarL* и *NarP*). Интегральные белки *NarX* и *NarQ* реагируют на присутствие в периплазме, соответственно, анионов нитрата и нитрита.

Структура белков *NarX* и *NarQ* обычна для сенсоров (см. раздел 18.1.1.3).

На C-конце расположен большой цитоплазматический домен из 420 а.о., а на N-конце — два трансмембранных субдомена по 60 а.о. Между трансмембранными субдоменами находится периплазматический субдомен (120 а.о.), в котором имеется «Р-бокс» (сокращение от англ. periplasmic), изменяющий свою конформацию при связывании с анионами нитрата или нитрита.

Сигнал от периплазматического субдомена передается через один из двух трансмембранных субдоменов цитоплазматическому домену, который играет роль сенсорной гистидинкиназы и автофосфорилируется по остаткам His-370 или His-399.

Сенсоры $\text{NarX}\sim\text{P}$ и $\text{NarQ}\sim\text{P}$, в свою очередь, фосфорилируют по остаткам Asp-59 цитозольные регуляторы NarL и NarP . Последние изменяют свою конформацию и вступают во взаимодействие с регуляторными участками оперонов-мишеней, а также непосредственно с РНК-полимеразой. Обратную связь обеспечивает конститутивная протеинфосфатаза, субстратом которой служат фосфорилированные белки $\text{NarX}\sim\text{P}$ и $\text{NarQ}\sim\text{P}$. Ее активность повышается при отсутствии анионов нитрата и нитрита.

Регуляторная система ArcB/ArcA. Двухкомпонентная сигнальная система ArcB/ArcA используется наряду с системами FNR, NarX/NarL и NarQ/NarP . Она дополнительно активирует экспрессию >30 оперонов при росте *E. coli* в анаэробных или микроаэробных условиях; прежде всего, мульти- и моноцистронных оперонов альтернативных терминальных редуктаз — фумаратредуктазы (*frdABCD*), мембранной нитратредуктазы (*narGHIJ*), кислородредуктазы *bd* (*cytbd*) и кислородредуктазы *o* (*cyo*). Одновременно с этим она репрессирует моноцистронные опероны цикла Кребса — оперон аконитазы (*acn*), оперон сукцинатдегидрогеназы (*sdh*) и оперон цитратсинтазы (*gltA*).

Регуляторная система ArcB/ArcA представлена сенсорной протеинкиназой ArcB, связанной с CM, и цитоплазматическим регулятором ArcA (рис. 257).

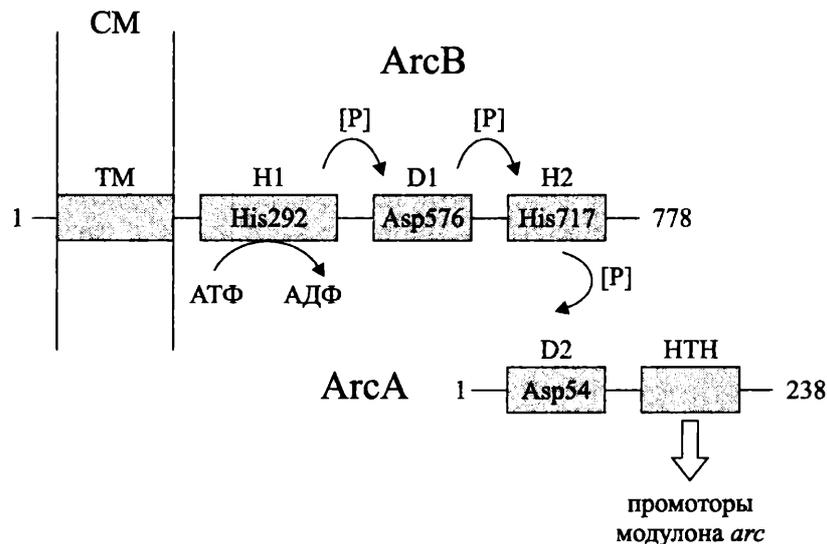


Рис. 257. Регуляторная система аэробного метаболизма ArcB/ArcA. Объяснение в тексте.

Белок ArcB состоит из трансмембранного модуля ТМ и трех цитоплазматических модулей — Н1 (первичного передатчика; англ. primary transmitter), D1 (первичного приемника; англ. receiver) и Н2 (вторичного передатчика; англ. secondary transmitter). Таким образом, белок ArcB принадлежит к субсемейству «гибридных» сенсорных киназ (см. раздел 18.1.1.3).

Модуль Н1, содержащий PAS-домен, автофосфорилируется по остатку His-292. Затем фосфорильная группа переносится на остаток Asp-576 в модуле D1, а от него — на остаток His-717 в модуле Н2. Далее сигнал поступает на регулятор ответа ArcA; его модуль D2 (вторичный приемник; англ. secondary receiver) фосфорилируется по остатку Asp-54.

C-терминальный HTH-домен активированного регулятора ArcA взаимодействует с первичными мишенями — промоторами модулона *arc*.

Автофосфорилирование протеинкиназы ArcB происходит в микроаэробных или анаэробных условиях. Важно отметить, что этот сенсор не напрямую воспринимает

кислород, а реагирует на редокс-состояние хинонного пула дыхательной цепи (см. II том учебника). В анаэробных условиях, когда этот пул восстановлен, QH₂ восстанавливает дисульфидные связи между субъединицами белка ArgB, переводя его в мономерную форму, неспособную к автофосфорилированию.

18.3.2. Регуляция конструктивного метаболизма

Эффективность конструктивного метаболизма зависит от баланса катаболических и анаболических реакций. Первые из них имеют ведущее значение для гетеротрофов, поскольку снабжают клетку не только строительным материалом, который используется в анаболических процессах, но и энергией. У автотрофов, напротив, анаболизм — на первом месте, а катаболизм вторичен и в основном служит для обновления клеточных структур, а также для мобилизации запасных веществ.

В анаболических процессах в первую очередь используются соединения углерода и азота (в случае diazотрофии — молекулярный азот). Здесь необходим полный комплект биогенных элементов, причем общий уровень метаболизма зависит от наименее доступного из них. В свою очередь, голодание, например по сере, делает бессмысленным биосинтез аминокислот, поскольку образование цистеина и метионина заблокировано.

Как и другие регуляторные системы, контроль метаболизма следует принципам осознанной необходимости и разумной достаточности. Бактерии оценивают трофический статус окружающей среды и дают на него адаптационный ответ.

Для коррекции метаболических систем в соответствии с полученной информацией бактерии используют регуляторную сеть. Она координированно управляет отдельными ветвями метаболизма, в частности углеродной и азотной ветвью (см. ниже).

18.3.2.1. Регуляция синтеза рРНК

Синтез рРНК является ключевым метаболическим процессом. От него зависит образование каркаса рибосомы и, как следствие, эффективность трансляции — в том числе, эффективность трансляции мРНК, в которых закодированы ферментативные белки.

Уровень транскрипции *rnp*-генов соответствует насущной потребности в синтезе белка независимо от причины ее изменения (ингибиторы трансляции; сдвиг в составе питательной среды; голодание, особенно при строгом ответе; см. раздел 18.1.4). При быстром и умеренном росте потребность в синтезе белка особенно велика, а поскольку промоторы *rnp*-оперонов являются одними из наиболее сильных промоторов, они обеспечивают >50% валового объема транскрипции (см. раздел 16.7.1.1).

Для регуляции инициации транскрипции *rnp*-оперонов и элонгации рРНК используется ряд механизмов, изученных главным образом на примере *E. coli*.

Напомним, что у этой бактерии имеются семь *rnp*-оперонов (см. раздел 16.3.1.2). Каждый из них содержит по два отдельных промотора, *rnp* P1 и *rnp* P2 с соответствующими терминаторами T1 и T2. В клетках, растущих с высокой или умеренной скоростью, транскрипция при участии главной РНК-полимеразы осуществляется в

основном с сильных промоторов *rnp* P1; более слабые промоторы *rnp* P2 реагируют на те же самые регуляторные воздействия, однако не столь активно.

В промоторах *rnp* P1 существует регуляторный UP-элемент, расположенный левее консенсусного блока -35 (рис. 258). Взаимодействие этой АТ-богатой последовательности с С-концевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы повышает транскрипцию на порядок (см. раздел 16.7.1.1). Кроме того, левее UP-элемента в регуляторной области содержатся 3–5 сайтов для связывания с ДНК-изгибающим белком Fis (напомним, что этот белок, в числе прочих, используется при сайтспецифичной рекомбинации; см. раздел 16.6.1.2). Димеры белка Fis взаимодействуют с С-концевым доменом α -субъединицы; это способствует рекрутированию РНК-полимеразы в область промотора и дополнительно повышает уровень транскрипции. Функциональным антагонистом белка Fis является ДНК-связывающий белок H-NS, который подавляет активность промоторов *rnp* P1 в стационарной фазе роста; предполагается, что он фиксирует РНК-полимеразу в стабильной петле ДНК.

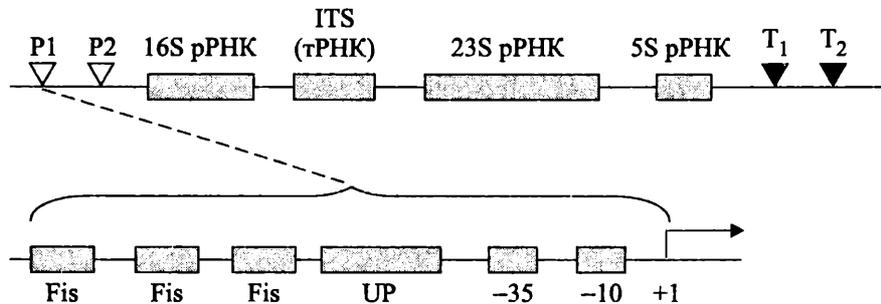


Рис. 258. Оперон рРНК.

P1 и P2 — промоторы; T1 и T2 — терминаторы; ITS — внутренний транскрибируемый спейсер; Fis — сайты для связывания ДНК-изгибающего белка Fis; UP — регуляторный UP-элемент.

Оба ДНК-изгибающих белка, Fis и H-NS участвуют в контроле базового метаболизма рРНК. При медленном росте, а также в стационарной фазе белка Fis очень мало; напротив, белок H-NS накапливается именно в стационарной фазе. Однако когда условия роста резко изменяются, к регуляции экспрессии *rnp*-оперонов привлекаются другие системы. В этих условиях за контроль промоторов *rnp* P1 отвечают два типа регуляторных молекул — алармон (p)ppGpp и «иницирующие» нуклеозидтрифосфаты (англ. initiating nucleoside triphosphate; iNTP).

Медиатор строгого ответа, (p)ppGpp накапливается в неблагоприятных условиях, в частности при голодании. Он понижает сродство РНК-полимеразы к промоторам *rnp* P1 и сокращает время жизни открытого комплекса, в результате чего скорость роста резко падает (см. раздел 18.1.4).

«Иницирующий» транскрипцию нуклеозидтрифосфат — это АТФ для промоторов *rnp* P1 в оперонах *rnpABCEGH* и ГТФ для промоторов *rnp* P1 в опероне *rnpD*. В отличие от остальных промоторов, для активности промоторов *rnp* P1 требуется максимально высокая концентрация iNTP. Предполагается, что экспрессию *rnp*-генов непосредственно регулирует изменение концентрации иницирующих субстратов, которые продлевают время жизни открытого комплекса. В свою очередь, эти субстраты являются индикаторами внутриклеточного трофического статуса и косвенно свидетельствуют о трофических условиях окружающей среды.

При быстром или умеренном росте (p)ppGpp играет роль позитивного или негативного регулятора, в зависимости от улучшения или ухудшения трофической обстановки. В свою очередь, при выходе из стационарной фазы iNTP позитивно регулируют активность промоторов *rrn* P1. Наконец, в стационарной фазе уменьшение концентрации iNTP или повышение концентрации (p)ppGpp действует на транскрипцию *rrn*-генов подавляюще.

18.3.2.2. Регуляция углеродного метаболизма

Когда в питательной среде одновременно присутствуют два или несколько углеводов, бактерия вначале использует один из них, а другие оставляет «на потом». Причина такой избирательности питания связана, в первую очередь, с регуляцией на уровне инициации транскрипции, которая осуществляется с помощью нескольких систем. Важнейшей из них является система репрессии углеродным катаболитом, которую довольно неудачно называют «катаболитной репрессией».

Катаболитная репрессия. Катаболитная репрессия, или *репрессия углеродным катаболитом* (англ. carbon catabolite repression, CCR) выражается в том, что присутствующий в питательной среде катаболизируемый субстрат, или катаболит препятствует использованию других катаболизируемых субстратов. Под катаболитом в узком смысле слова подразумевается *предпочтительный* источник углерода. Точнее сказать, если бактерия сталкивается с набором источников углерода, она выбирает тот из них, который используется наиболее эффективно. Еще точнее: когда в питательной среде содержится субстрат, обеспечивающий максимальную скорость роста, подавляется выработка ферментов, специфичных в отношении альтернативных субстратов.

Чаще всего катаболитом является глюкоза, а классическим примером катаболитной репрессии служит феномен глюкозо-лактозной диауксии *E. coli* (англ. diauxie; от греч. duo — два и auxe — рост), когда рост на смеси глюкозы с лактозой происходит в два этапа, поскольку лактозный оперон активируется только после полного использования глюкозы. Следует отметить, что в случае адаптации к специфической нише вместо глюкозы предпочтительным может стать другой углевод, та же лактоза для *Streptococcus thermophilus*.

Феномен катаболитной репрессии, первоначально названный «глюкозным» эффектом, был открыт Динертом (F. Dienert) в 1900 г. на примере ингибирования глюкозой утилизации сопутствующих источников углерода. Детали этого явления долго оставались скрытыми, и лишь в 1968 г. Агнес Ульман (A. Ullmann) и Жак Моно обнаружили, что ингибирующий эффект глюкозы можно купировать с помощью 3',5'-цикло-АМФ (см. рис. 260). Год спустя Жаке (M. Jaquet) и Кипс (A. Keres) установили, что глюкоза подавляет экспрессию генов на уровне инициации транскрипции.

Хотя феномен катаболитной репрессии внешне однообразен, за ним скрываются разные механизмы. Один механизм действует путем изменения активности транскрипционных факторов, другой — путем уменьшения концентрации индукторов (см. ниже).

В обоих механизмах используются компоненты фосфотрансферазной системы транспорта углеводов, которая дополнительно выполняет регуляторную роль (рис. 259).

I

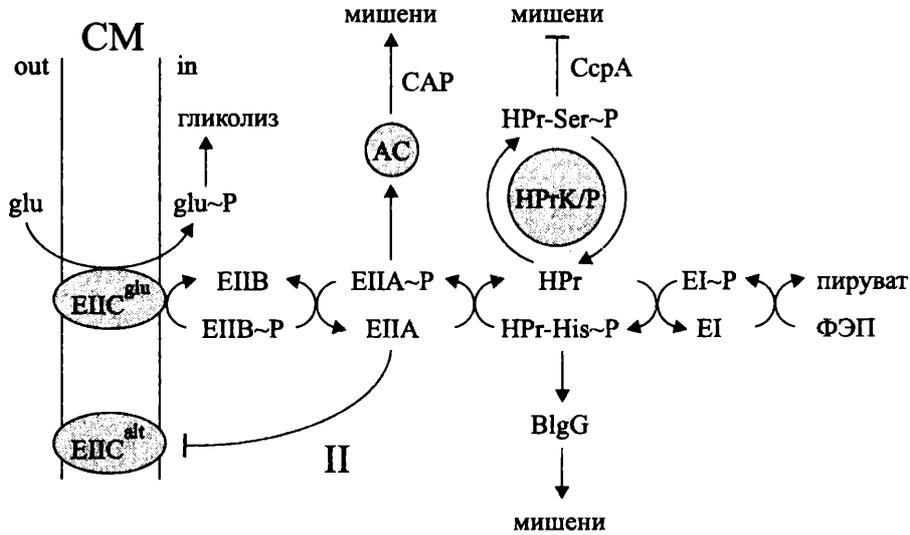


Рис. 259. Регуляция углеводного метаболизма с помощью фосфотрансферной транспортной системы.
Объяснение в тексте.

Напомним, что бактерии импортируют углеводы либо в фосфорилированном, либо в нефосфорилированном виде (см. II том учебника). Транспорт, сопряженный с фосфорилированием, или перенос (фосфатной) группы осуществляется при помощи фосфоэнолпируват-фосфотрансферной системы (англ. phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system, PTS). Она состоит из трех основных компонентов (рис. 259):

- «фермента II» (англ. enzyme II, EII), или пермеазы, специфичной по отношению к тому или иному углеводу;
- белка HPr (сокр. англ. histidine-containing protein, HPr), который неизбирательно участвует в фосфорилировании любого углевода, транспортируемого с помощью данной системы;
- «фермента I» (англ. enzyme I, EI), который фосфорилирует белок HPr за счет фосфоэнолпирувата.

Субстратспецифичные пермеазы (*E. coli* имеет 20 таких систем, *B. subtilis* — 9; *Lactococcus lactis* — 8; *Streptococcus pneumoniae* — 9 и т. д.) состоят из 1–4 модулей (EIIABCD), из которых, по крайней мере, один интегрирован в СМ. Например, в случае *E. coli* пермеаза глюкозы содержит два мембранных модуля EIIСВ^{glc} и растворимый модуль EIIА^{glc}.

Фосфорильная группа переносится по цепи: фосфоэнолпируват → EI → HPr → EIIA → EIIB → EIIС/углевод. Таким образом, фосфорилирование углевода происходит сопряженно с его транслокацией в цитоплазму, т. е. он вступает в метаболизм уже в активированном виде.

Фосфотрансферная система PTS представляет собой уникальный гибрид фосфореле (см. раздел 18.1.1.3) с аппаратом для активного импорта углеводов. В данном случае роль стимула выполняет интермедиат гликолиза — фосфоэнолпируват; сенсором служат компоненты фосфотрансферной системы; регулятором — транскрипционные факторы.

Разные бактерии используют разные глобальные регуляторы в сочетании с системой PTS, причем у энтеробактерий регуляция носит позитивный, а у *Firmicutes* — негативный характер.

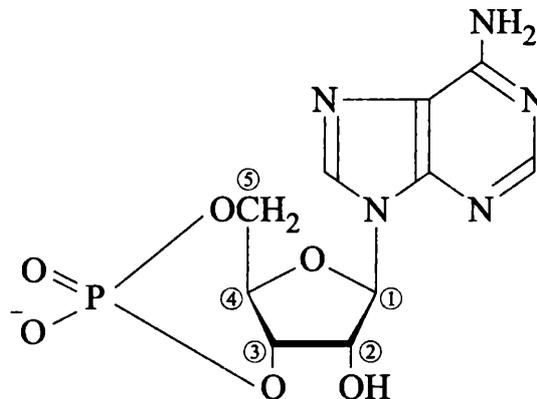


Рис. 260. 3',5'-цикло-АМФ (аденозин-3',5'-циклофосфат).

Стратегия энтеробактерий. Энтеробактерии, в частности *E. coli*, в качестве PTS-ассоциированных транскрипционных факторов используют *белки-активаторы катаболитных генов* (сокр. англ. catabolite gene activator protein, CAP), которые принадлежат к семейству глобальных белков-активаторов транскрипции CRP (см. раздел 16.7.1.1).

Центральную роль в катаболитной репрессии в данном случае играет фосфотрансфераза ЕПА^{glc}. Соотношение двух ее форм, нефосфорилированной и фосфорилированной (ЕПА^{glc}/ЕПА^{glc} ~P), отражает трофический статус клетки, а фосфатная группа служит сигналом, который активирует гены-мишени.

В репрессирующих условиях (в присутствии глюкозы) фосфотрансферная система PTS передает фосфорильные группы этому субстрату, и поэтому ЕПА^{glc} существует в основном в нефосфорилированной форме. В данном случае предпочтительно используемый углевод подавляет поглощение других углеводов, которые могли бы индуцировать опероны их собственного катаболизма. Такой вариант катаболитной репрессии называется *недопущением индуктора* (англ. inducer exclusion). Нефосфорилированная форма ЕПА^{glc} связывается с пермеазами не-PTS типа, например с пермеазами лактозы, мальтозы, мелибиозы или раффинозы и аллостерически блокирует их, в результате чего предотвращается образование соответствующего индуктора, в частности аллолактозы (см. раздел 16.3.1.2 и рис. 167). Поскольку в клетке индуктора и так не доставало, соответствующие опероны экспрессируются очень слабо или вообще выключаются.

В дерепрессирующих условиях (без глюкозы) ЕПА^{glc} существует в основном в фосфорилированной форме. В этом случае ЕПА^{glc} ~P непосредственно стимулирует аденилатциклазу (англ. adenylate cyclase, CyaA). Активированная аденилатциклаза, в свою очередь, косвенно активирует контролируемые катаболитом гены-мишени за счет накопления аллостерического эффектора — 3',5'-цикло-АМФ (рис. 260), образующего комплекс с транскрипционным фактором CAP.

Стратегия грамположительных бактерий. *Firmicutes*, т. е. грамположительные бактерии с низким содержанием GC-пар, в частности *B. subtilis* и *B. megaterium*, используют в качестве транскрипционного фактора негативный регулятор — *белок катаболитного контроля* (сокр. англ. catabolite control protein, CcpA).

Центральную роль в катаболитной репрессии в данном случае играет функци-

ональный эквивалент ЕПА^{glc} — фосфотрансфераза HPr. Она содержит два сайта фосфорилирования (His-15 и Ser-46). Фосфорилирование по сайту His-15 осуществляется с помощью фермента EI. В свою очередь, фосфорилирование по сайту Ser-46 происходит с помощью отсутствующей у энтеробактерий АТФ-зависимой протеинкиназы/фосфатазы HPrK/P (сокр. англ. histidine-containing protein kinase/phosphatase).

Что определяет соотношение двух фосфорилированных форм фосфотрансферазы (HPr-His~P и HPr-Ser~P)?

Фосфорилирование HPr за счет фосфоэнолпирувата с помощью EI дает форму HPr-His~P, которая используется PTS-системой. По мере импорта глюкозы и накопления фосфорилированных интермедиатов гликолиза, прежде всего фруктозо-1,6-бисфосфата, активируется протеинкиназная активность HPrK/P, в результате чего образуется HPr-Ser~P. Однако HPr-Ser~P не является субстратом для фермента EI и не участвует в импорте глюкозы, поэтому концентрация интермедиатов гликолиза снижается. В результате увеличения концентрации неорганического фосфата стимулируется фосфатазная активность HPrK/P, и образуется субстрат для EI — дефосфорилированная форма белка HPr.

Белок HPr-Ser~P выполняет роль корепрессора для глобального транскрипционного фактора CsrA, в комплексе с которым он связывается с операторными сайтами *cre* (сокр. англ. catabolite responsive element). В результате этого катаболитная репрессия распространяется на многочисленные гены и опероны: *ars* (гены ацетил-СоА-синтазы); *bglPH* (гены гидролиза и транспорта β-гликозидов); *gnt* (гены использования глюконата); *hut* (гены использования гистидина); *lev* (гены транспорта фруктозы и деградации левана); *mbgA* (гены β-галактозидазы); *xyl* (гены использования ксиллозы) и т. д.

У бактерий катаболитных оперонов несколько, в частности опероны утилизации β-гликозидов контролируются белками-антигерминаторами (см. раздел 16.7.1.3). Они относятся к семейству BglG (сокр. англ. beta glycoside utilization) и содержат так называемые PRD-домены (сокр. англ. PTS regulation domain), которые непосредственно определяют их активность. Белок HPr-His~P может фосфорилировать не только фермент ЕПА^{glc}, но и эти домены. Если PRD-домены не фосфорилируются, а это происходит при транспорте глюкозы с помощью PTS-системы, опероны утилизации β-гликозидов не индуцируются.

В заключение отметим, что система CCR обладает плейотропным регуляторным действием. Помимо контроля углеродного метаболизма, она участвует в выборе промоторов, азотном метаболизме, биогенезе жгутика, хемотаксисе, приобретении состояния компетентности и т. д. В целом под контролем CAP-белков находится >100 генов (в том числе, их собственный ген), а под контролем белка CsrA ~300 генов.

Система CCR изучена только у энтеробактерий и *Firmicutes*, причем в основном на двух модельных объектах — *E. coli* и *B. subtilis*. О механизме CCR у других бактерий, а также о прочих механизмах регуляции углеродного метаболизма почти ничего не известно.

Дополнительные системы регуляции углеродного метаболизма. Помимо PTS-зависимой CCR, к числу плейотропных факторов, регулирующих углеродный метаболизм энтеробактерий и грамположительных бактерий с низким содержанием GC-пар, относятся белок Csa (сокр. англ. catabolite repressor activator) и Mlc (сокр. англ. maltose control). Первый из них служит репрессором PTS-системы для фруктозы, а также активатором генов глюконеогенеза и цикла Кребса, причем

его активность зависит от двух интермедиатов гликолиза: фруктозо-1-фосфата и фруктозо-1,6-бисфосфата. В свою очередь, белок Mlc регулирует экспрессию генов PTS-систем для глюкозы и маннозы, а также гена-активатора мальтозного регулона — *malT*.

Наконец, у грамположительных бактерий с высоким содержанием GC-пар, в частности *S. coelicolor*, у которых отсутствует PTS-зависимая CCR, контроль углеродного метаболизма осуществляется с помощью глюкокиназы GlkA. Механизм регуляторного действия в данном случае не установлен.

18.3.2.3. Регуляция азотного метаболизма

Генетические и биохимические механизмы, лежащие в основе регуляции азотного метаболизма, изучены в основном на примере энтеробактерий, прежде всего *E. coli*.

При азотном дефиците основным источником неорганического связанного азота становится катион аммония. При низкой концентрации NH_4^+ центральную роль в его ассимиляции играет глутаминсинтетаза (англ. glutamine synthetase, GS), которая катализирует АТФ-зависимое амидирование L-глутамата в L-глутамин (см. II том учебника). При азотном голодании активность гена *glnA*, кодирующего этот фермент, резко возрастает.

Транскрипция гена *glnA* осуществляется с тандема промоторов *glnAp1* и *glnAp2*. Когда азот в избытке, ген *glnA* экспрессируется на базовом уровне с промотора *glnAp1* при помощи главной РНК-полимеразы $E\sigma^{70}$ (см. раздел 16.7.1.1). Дефицит азота приводит к тому, что транскрипция гена *glnA* с промотора *glnAp1* репрессируется регуляторным белком NtrC (см. ниже). Одновременно с этим белок NtrC активирует транскрипцию гена *glnA* с промотора *glnAp2* при помощи голофермента РНК-полимеразы, содержащего альтернативный сигма-фактор σ^{54} (см. раздел 18.1.1.1).

Центры регуляторных сайтов, с которыми связывается белок NtrC, находятся слишком далеко от промоторов гена *glnA* (координаты -140 и -108). Чтобы NtrC смог вступить во взаимодействие с рекрутированной РНК-полимеразой, необходим изгиб ДНК. Обычно в таких случаях регуляторная область ведет себя как энхансер, изгибающий ДНК с помощью белка IHF (см. раздел 16.7.1.1). В данном же случае ДНК в регуляторной области изначально образует изгиб со структурой СС-СТТТТ и центром в положении -73.

Белок NtrC имеет трехдоменную структуру, типичную для σ^{54} -зависимых регуляторов ответа — N-концевой домен-приемник размером ~120 а.о. с консервативным остатком Asp-54, центральный домен размером ~240 а.о. для рекрутирования РНК-полимеразы и С-концевой домен размером ~60 а.о. для связывания с энхансерной ДНК, содержащий структурный мотив НТН. Центральный домен обладает АТФазной активностью, и энергия гидролиза АТФ используется для перехода закрытого комплекса RP_C в открытый комплекс RP_O (см. раздел 16.7.1.1).

Ген *glnA* служит главной мишенью для сигнальной системы NtrB/NtrC (сокр. англ. nitrogen regulation).

Система NtrB/NtrC (рис. 261). Эта двухкомпонентная сигнальная система локализуется в цитоплазме. Белок NtrB играет роль сенсора, а белок NtrC — роль глобального регулятора.

Глобальная система контроля азотного метаболизма состоит из четырех ферментов:

— уридилтрансферазы/деуридилазы (англ. uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, UT/UR);

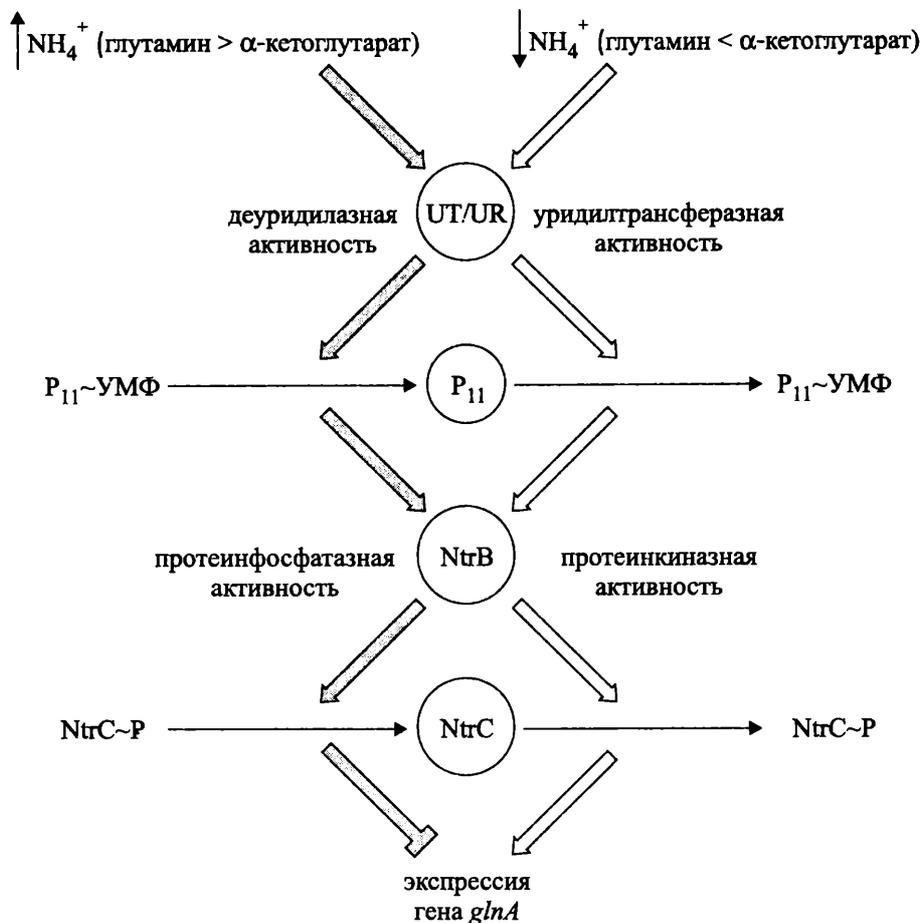


Рис. 261. Регуляция азотного метаболизма с помощью двухкомпонентной сигнальной системы NtrB/NtrC. Обьяснение в тексте.

- белка P_{11} ;
- протеинкиназы/протеинфосфатазы NtrB (= GlnL, или NR₁₁);
- транскрипционного фактора NtrC (= GlnG, или NR₁).

Какая из двух активностей UT/UR станет главной, зависит от *первичного стимула* — соотношения концентраций глутамина и α -кетоглутарата. Индикатором доступности связанного азота служит внутриклеточный баланс между глутамином и α -кетоглутаратом. При избытке NH_4^+ возрастает относительное содержание глутамина, а при дефиците NH_4^+ преимущественно накапливается α -кетоглутарат.

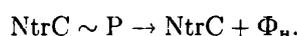
Глутамин и α -кетоглутарат служат аллостерическими регуляторами бифункционального белка UT/UR (102 кДа; ген *glnD*), причем уридилтрансферазная активность стимулируется α -кетоглутаратом и ингибируется глутамином.

При избытке связанного азота ($\uparrow\text{NH}_4^+$), когда содержание глутамина по отношению к α -кетоглутарату высоко, преобладает деуридилазная активность. При дефиците связанного азота ($\downarrow\text{NH}_4^+$) преобладает уридилтрансферазная активность.

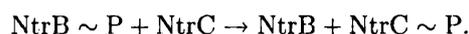
Субстратом реакций (де)уридилрования служит тримерный белок P_{II} (12,4 кДа; ген *glnB*). При переносе УМФ от УТФ на остаток Tyr-51 он переходит в модифицированную уридилрованную форму (P_{II} + УТФ → P_{II} ~ УМФ + ФФ_n). После отщепления уридила он возвращается в немодифицированную деуридилрованную форму (P_{II} ~ УМФ → P_{II} + УМФ).

Белок P_{II} является вторичным стимулом. В уридилрованной форме он подает знак о дефиците азота, а в деуридилрованной форме служит индикатором избытка азота. От него зависит, какая из двух активностей белка NtrB — протеинфосфатазная или протеинкиназная — станет доминирующей.

Деуридилрованная форма белка P_{II} связывается с димером сенсорного белка NtrB (36 кДа) и активирует его протеинфосфатазную активность, что приводит к дефосфорилированию димера регуляторного белка NtrC (55 кДа):



В свою очередь, уридилрование препятствует связыванию белка P_{II} с сенсором NtrB. Поэтому после автофосфорилирования по остатку His-139 сенсор трансфосфорилирует регулятор NtrC по остатку Asp-54:



Дефосфорилированная форма белка NtrC функционально не активна и не оказывает влияние на базовую экспрессию гена *glnA*, тогда как фосфорилированная форма служит активатором транскрипции; с ее помощью экспрессия гена *glnA* значительно усиливается.

Ген *glnA* входит в состав общего оперона с генами *glnL* (кодирует сенсор NtrB), *glnG* (кодирует регулятор NtrC). Таким образом, активируя транскрипцию гена *glnA*, регулятор NtrC индуцирует и свой собственный синтез, т. е. в данном случае действует петля позитивной обратной связи.

Помимо генов *glnA*, *glnL* и *glnG* под контролем глобальной сигнальной системы NtrB/NtrC находятся гены, отвечающие за транспорт глутамина (*glnHPQ*), аргинина (*argT*) и гистидина (*hisJQMP*); гены ассимиляции нитрата и нитрита (*nas-FEDCBA*); ген регуляции дназотрофии у *Klebsiella pneumoniae* (*nifLA*), а также ряд других генов азотного метаболизма.

Другие системы контроля азотного метаболизма. Контроль азотного метаболизма охарактеризован на примере системы NtrB/NtrC энтеробактерий, а также на примере Ntr-подобных систем других протеобактерий.

Известен еще ряд регуляторных систем, отвечающих за метаболизм азота, но они менее изучены. Приведем основные примеры.

Белок Nac. У энтеробактерии *K. aerogenes* гены гистидазы (*hut*), глутаматдегидрогеназы (*gdh*), глутаматсинтазы (*gltBD*), пролиноксидазы (*put*) и уреазы (*ure*) находятся под контролем продукта гена *nac* (сокр. англ. nitrogen assimilation control). Тем не менее, регуляторный белок Nac (32 кДа) не входит в состав сигнальной системы, реагирующей на содержание доступного азота — экспрессия гена *nac* контролируется системой NtrB/NtrC и происходит при участии альтернативного сигма-фактора σ⁵⁴. Таким образом, белок Nac синтезируется только при азотном голодании и служит дополнительным активатором генов *hut*, *put* и *ure*, а также подавляет экспрессию генов *gdh* и *gltBD*.

Белок GlnR. Фирмикуты, в частности *B. subtilis*, не обладают системой NtrB/NtrC. В данном случае регуляция гена *glnA*, входящего в состав оперона *glnRA*, осуществляется иначе, чем «классическим» Ntr-зависимым способом. При избытке связанного азота экспрессия этого оперона негативно регулируется белком-репрессором GlnR (135 а.о.) в ответ на стимул неустановленной природы.

К числу ферментов, гены которых дерепрессируются при азотном голодании, относятся γ -аминобутиратпермеаза, аспарагиназа, аспартаза, глутаминсинтетаза и уреаза. За исключением глутаминсинтетазы, они не контролируются белком GlnR, т. е. у фирмикутов должна существовать еще какая-то система регуляции азотного метаболизма, возможно, Ntr-типа.

Белок NtcA. У цианобактерий гены, отвечающие за транспорт и восстановление нитрата, ассимиляцию аммония, дифференциацию гетероцист и diaзотрофию, находятся под контролем регуляторного белка NtcA (см. раздел 17.5.1.2). Этот глобальный регулятор транскрипции гомологичен белкам семейства CRP (см. раздел 16.7.1.1) и играет такую же роль, как белки NtrC у других прокариотов. Пока еще не ясно, на какой стимул он непосредственно реагирует или с каким сенсором взаимодействует.

Контрольная взаимосвязь между системами углеродного и азотного метаболизма. Мы уже говорили о том, что углеродная и азотная ветви метаболизма взаимосвязаны. В частности, поглощенные аминокислоты служат источником и углерода, и азота. Соответственно, их катаболизм находится под двойным контролем сигнальных систем, отвечающих за метаболизм углерода и азота.

Углеродный метаболизм регулируется не только «углеродными», но и «азотными» сигналами, а также сигналами о наличии других элементов питания. В ответ на это азотный метаболизм зависит от природы источника углерода и его доступности.

Центральную роль во взаимодействии углеродной и азотной ветвей метаболизма выполняют два проводника сигнала — белок P_{II} и фосфотрансферазная система PTS.

Белок P_{II}, а также его функциональные аналоги GlnB и GlnK, ковалентно модифицируются под воздействием сенсора для уровня глутамина, белка UT/UR. Низкое содержание глутамина вызывает уридилирование белка P_{II}, а высокое — его деуридилирование (см. рис. 261). В зависимости от (де)уридилирования, белок P_{II} взаимодействует с пермеазой Amt (сокр. англ. ammonium transport), с регулятором глутаминсинтетазы GlnE и с протеинкиназой/протеинфосфатазой NtrB. В итоге этого взаимодействия азотный метаболизм контролируется на транспортном, метаболическом и генетическом уровнях. «Вмешательство» углеродной ветви метаболизма связано с тем, что α -кетоглутарат служит сигналом-антагонистом для глутамина.

Роль фосфотрансферазной системы PTS связана с тем, что в присутствии глюкозы происходит катаболитная репрессия, экзогенный глутамин не поглощается, и высок уровень экспрессии гена *glnA*. В свою очередь, в дерепрессирующих условиях усиливается поглощение глутамина, что приводит к деуридилированию белка P_{II}, инактивации белка NtrC и подавлению экспрессии гена *glnA*.

Связующими звеньями между азотным и углеродным метаболизмом являются α -кетоглутарат и глутамат, причем последний служит универсальным донором аминогруппы при биосинтезе аминокислот и нуклеотидов. Напомним, что α -кетоглутарат — это ключевой интермедиат цикла Кребса, подверженного множе-

ственной регуляции (см. II том учебника). В частности, ген *citb* (кодирует аконитазу) репрессируется любыми источниками азота, если только они преобразуются в α -кетоглутарат и аммоний.

18.3.2.4. Регуляция фосфорного метаболизма

Ортофосфат входит в состав цитозольных биотрансформаторов (см. II том учебника). Из него образуются полифосфаты; он также является структурным компонентом (поли)нуклеотидов, фосфолипидов в составе СМ и фосфопротеинов. Кроме того, у грамотрицательных бактерий ортофосфат в виде фосфорильной группы содержится в липополисахаридах в составе ОМ, а у грамположительных бактерий — в тейхоевых кислотах и специфических соединениях липофильной стенки у представителей группы «миколата»: липо(арабино)маннах, миколил-арабиногалактанах и т. д. (см. I том учебника).

Важным фактором, лимитирующим фосфорное питание, является растворимость ортофосфатов. Она зависит от типа противоиона и значения pH; в частности, фосфаты кальция выпадают в осадок при $\text{pH} \geq 7$.

При внутриклеточной концентрации ортофосфата $\leq 0,1$ мМ наступает фосфорное голодание. В ответ на него экспрессируются гены, продукты которых стимулируют поступление этого аниона из окружающей среды.

Как и во многих других случаях, модельным объектом для изучения регуляции фосфорного метаболизма служит *E. coli*. При фосфорном голодании в ОМ появляется специализированный фосфопорин PhoE (см. I том учебника), образующий канал для облегченной диффузии ортофосфата. Одновременно с этим в периплазматическом компартменте начинает действовать щелочная фосфатаза (продукт гена *phoA*), которая выщепляет ортофосфат из малых органических эфиров. Далее ортофосфат связывается с индуцибельным белком PstS (сокр. англ. phosphate-specific transport), сродство которого к субстрату на два порядка выше, чем у конститутивного транспортера Pit (сокр. англ. phosphate inorganic transport). Наконец, растворимый переносчик PstS презентрует ортофосфат индуцибельной пермеазе PstABC. Она входит в состав СМ и принадлежит к суперсемейству ABC-транспортеров (см. II том учебника); с ее помощью за счет гидролиза АТФ ортофосфат транслоцируется в цитоплазму.

Экспрессия генов фосфопорина PhoE и компонентов Pst-системы позитивно регулируется двухкомпонентной сигнальной системой PhoR/PhoB, действующей по «традиционной» схеме (см. рис. 251). Сенсором служит белок PhoR, заякоренный в СМ. При активации ортофосфатом он автофосфорилируется, а затем трансфосфорилирует растворимый регулятор PhoB.

Белок PhoB~P связывается с «Pho-боксами» генов-мишеней в *pho*-регулоне (*phoA*, *phoE*, *phoRB*, *phoU* и *pstSCAB*) и активирует их транскрипцию.

Когда фосфор находится в избытке, сенсор PhoR, содержащий PAS-домен, выступает в качестве протенинфосфатазы и дефосфорилирует регулятор PhoB. Роль кофосфатазы выполняет белок PhoU, ген которого входит в общий оперон с *pst*-генами.

У грамположительных бактерий, в частности *B. subtilis*, аналогом системы PhoR/PhoB служит система PhoP/PhoR (следует обратить внимание на то, что в данном случае регулятор обозначается как PhoR).

18.3.2.5. Регуляция железного метаболизма

Геминное или негеминное железо входит в состав большинства систем энергетического метаболизма, а также в состав многих ферментов конструктивного метаболизма — достаточно вспомнить электрон-транспортные цепи или нитрогеназу (см. II том учебника).

Специфика железного питания выражается в том, что при плотности популяций 10^8 – 10^{12} клеток·л⁻¹ и pH ≥ 7 (когда железо существует в форме Fe³⁺, имеющей растворимость ≤ 10⁻¹⁸ М, т.е. 6·10⁶ ион·л⁻¹), бактериальная клетка, которой требуются 10⁵–10⁶ катионов железа, не может рассчитывать даже на один катион. Чтобы преодолеть огромный разрыв между внутренним и внешним пулами железа, бактерии прибегают к разным компенсаторным стратегиям. К ним относятся: (1) адаптация к абиотической среде с низкими значениями pH, где хорошо растворяется Fe²⁺ (≥ 10⁻¹ М при pH ≤ 7); (2) подкисление окружающей среды в ходе метаболизма; (3) внеклеточное восстановление плохо растворимого Fe³⁺ в хорошо растворимый Fe²⁺; (4) секреция хелаторов железа. Естественно, что при этом используются регуляторные системы.

Однако в данном случае на регуляцию накладывается особый отпечаток: главной целью служит не собственно железный метаболизм, а поддержание железного гомеостаза. Нарушение железного гомеостаза происходит в диаметрально противоположных ситуациях — при железном голодании и при увеличении внутриклеточного пула свободного железа.

Железное голодание приводит к дефициту (не)геминного железа, что угнетает метаболические процессы (см. II том учебника), и тогда главным путем физиологической адаптации становится биогенез альтернативных метаболических систем. Некоторые из них вообще не содержат железа. В свою очередь, избыточное накопление железа способствует окислительному стрессу (см. раздел 19.1.6); при этом с нарушением железного гомеостаза можно бороться тремя способами: заблокировать импорт железа; хелатировать железо, проникшее в клетку; иммобилизовать железо в составе запасяющих белков или биоминеральных включений.

Железный гомеостаз контролируется на уровне транскрипции с помощью однокомпонентных сигнальных систем Fur и DtxR.

Белки Fur. У бактерий широко распространены глобальные регуляторы из семейства Fur (сокр. англ. ferric uptake regulator). Они контролируют поглощение и запасание железа, его оптимальную внутриклеточную концентрацию и использование в метаболизме. При инактивации гена *fur* нарушается баланс между поступлением и утилизацией железа; в цитоплазме увеличивается содержание свободного железа, что приводит к окислительному стрессу.

Поддерживать железный гомеостаз — не единственная функция белков Fur. Они выступают в качестве плейотропных регуляторов и контролируют экспрессию нескольких десятков генов (>90 в случае *E. coli*), которые так или иначе связаны с метаболизмом железа. Кроме того, под негативным контролем белков Fur находится ряд генов, не имеющих отношения к метаболизму железа. Это гены генерального метаболизма, в том числе гены гликолиза, гены цикла Кребса и дыхательные гены, а также гены биосинтеза аминокислот и пуриновых оснований. Что касается генов специализированного метаболизма, то белок Fur репрессирует гены биосинтеза хелаторов железа (сидерофоров), а также гены некоторых токсинов и других факторов вирулентности. Наконец, он репрессирует ряд «экологических» генов, продукты которых участвуют в хемотаксисе и окислительном стрессе, например, ген *sodA*.

Белок Fug накапливается в относительно высоком количестве ($5 \cdot 10^3$ копий на клетку в экспоненциальной фазе роста и до 10^4 в стационарной фазе). В активном состоянии он представляет собой гомодимер (2×17 кДа). С-концевые домены, содержащие остатки His, связывают катионы Fe^{2+} и обеспечивают димеризацию, а N-концевые домены взаимодействуют с ДНК. За счет образования комплекса с железом сродство белка Fug к специфическим сайтам ДНК увеличивается на три порядка.

Комплекс Fug/ Fe^{2+} подавляет транскрипцию (рис. 262). Он взаимодействует с участками ДНК размером 11–19 п.н., или «железными боксами» (англ. iron box), которые перекрываются с позициями –35 и –10 в промоторах репрессируемых генов. Иногда железные боксы расположены рядом друг с другом и даже взаимно перекрываются. Это позволяет им взаимодействовать одновременно с несколькими комплексами Fug/ Fe^{2+} , которые имеют свойство «полимеризоваться» вдоль двойной спирали ДНК, выходя за пределы железных боксов и граничащих с ними сайтов.

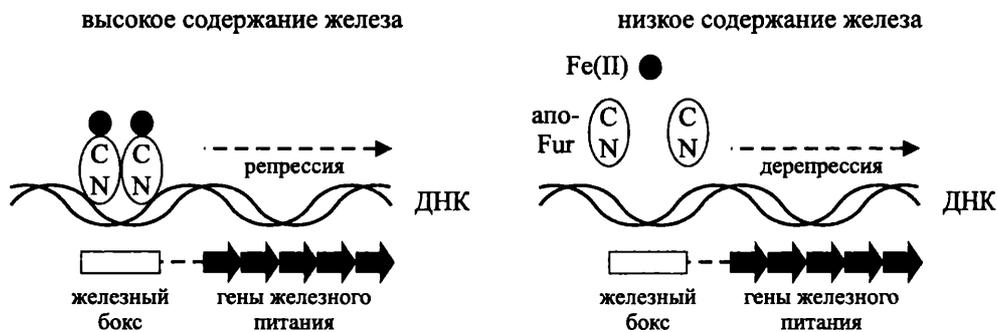


Рис. 262. Схема действия глобального регулятора Fug.

При железном голодании катионы Fe^{2+} высвобождаются из комплекса Fug/ Fe^{2+} . Инактивированный белок Fug диссоциирует от ДНК, в результате чего индуцируется транскрипция.

Белок Fug не обязательно только подавляет транскрипцию. Он также может быть индуктором транскрипции генов без участия железных боксов. Тогда регуляция носит непрямой характер. Например, в случае *E. coli* он способствует транскрипции генов ферритина и бактериоферритина, блокируя транскрипцию антисмысловых РНК. Иными словами, он выступает в роли репрессора по отношению к другому репрессору.

Единственный ген, который непосредственно индуцируется путем взаимодействия с белком Fug — это ген *pfr* патогенной бактерии *Helicobacter pylori* (кодирует ферритин). В данном случае при голодании по железу апопротеин Fug связывается с промотором и блокирует его, а при избытке железа диссоциирует от промотора, активируя транскрипцию. Поскольку с молекулой ДНК взаимодействует белок Fug без лиганда, узнаваемая нуклеотидная последовательность отличается по структуре от железных боксов. В свою очередь, при достаточном количестве железа образуется комплекс Fug/ Fe^{2+} , который связывается с железным боксом и дерепрессирует ген *pfr*.

Белки DtxR. Глобальные регуляторы из семейства DtxR (сокр. англ. diphtheria toxin regulator) широко распространены у грамположительных бактерий с высоким содержанием GC-пар. В частности, белок DtxR регулирует поглощение железа и биосинтез экзотоксина *Corynebacterium diphtheriae*.

Хотя DtxR-белки слабо гомологичны или не гомологичны Fug-белкам, они тоже играют роль железозависимых репрессоров. В димерной форме они взаимодейству-

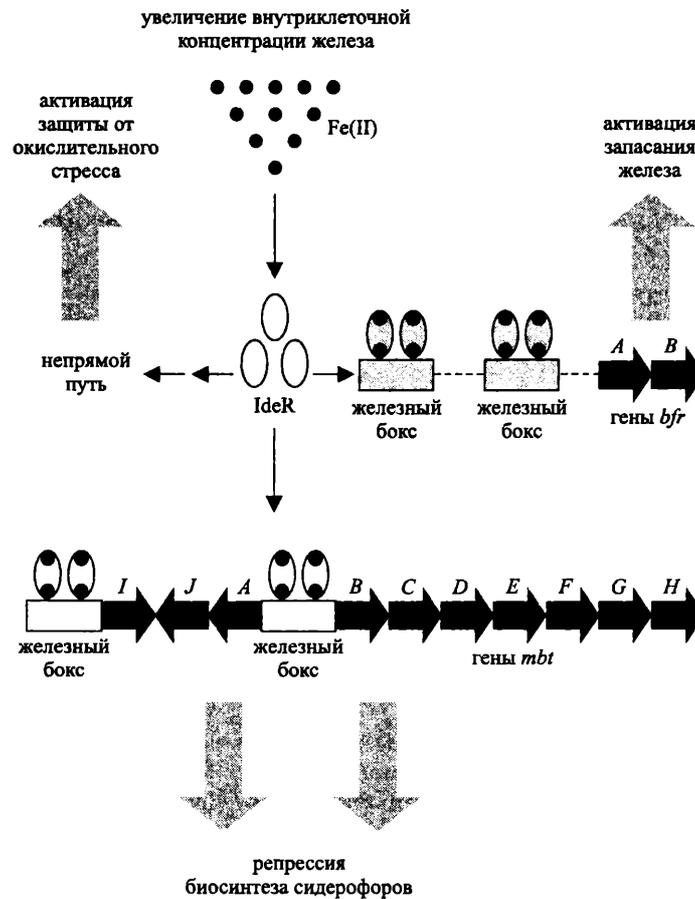


Рис. 263. Схема действия глобального регулятора IdeR.

ют с палиндромами размером 19 п.н., которые расположены в области гена *tox*. Подобно белкам Fug, белки DtxR содержат сенсорный домен с двумя сайтами для связывания катиона Fe^{2+} (заодно он отвечает за димеризацию) и N-концевой ДНК-связывающий домен со структурным мотивом НТН.

Отдельным представителем семейства DtxR-белков является белок IdeR — глобальный регулятор *Mycobacterium tuberculosis*. Он имеет гомодимерную структуру (2×115 кДа) и содержит два сайта для связывания Fe^{2+} или других двухвалентных катионов, например Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} . При образовании комплекса с металлами в N-концевом домене белка IdeR происходят конформационные изменения, в результате чего он приобретает способность взаимодействовать с ДНК.

Участками ДНК для связывания белков IdeR, как и белков Fug, служат железные боксы (рис. 263).

В то время как Fug-белки преимущественно играют роль негативных регуляторов, влияние белков IdeR может быть и негативным, и позитивным. Если в области промотора находится только один железный бокс, белок IdeR проявляет себя как репрессор, например по отношению к генам *mbt*, кодирующим сидерофоры из группы микобактина (см. II том учебника). Если же в области промотора расположен тандем железных боксов, тогда белок IdeR выполняет функцию активатора; он взаимодействует с РНК-полимеразой и облегчает инициацию транскрипции, в частности, в случае генов *bfr*, которые кодируют сидерофоры из группы бактериоферритина.

Как и у представителей семейства *Fur*, функция белков *DtxR* не ограничивается регуляцией генов, отвечающих за транспорт и запасание железа. В частности, белок *IdeR* регулирует ряд генов генерального метаболизма, окислительного стресса и вирулентности. Поскольку одна и та же бактерия может синтезировать и белок *Fur*, и белок *DtxR*, механизм регуляции метаболизма железа усложняется.

Железное голодание. Основным модельным объектом для изучения железного голодания служат цианобактерии.

Одноклеточные штаммы цианобактерий — одни из важнейших первичных продуцентов в Мировом океане (см. I том учебника). Их развитие находится под контролем ряда абиотических факторов. Вопреки очевидности, критичными являются вовсе не свет и температура, поскольку эвфотическая зона доходит до глубины ~250 м, причем пояс интенсивного развития пикоцианобактерий простирается до 40-й широты в обоих полушариях, а минеральные элементы, особенно железо.

При ограничении доступа к минеральным элементам у цианобактерий активируется экспрессия протеинкиназы *NbIS* (сокр. англ. nutrient bleaching), которая контролирует фотоакклиматизацию и, в частности, служит триггером деградации фикобилисом на ярком свете. Кроме того, *NbIS* запускает экспрессию белка *HLIP* (сокр. англ. high light induced protein). Последний адаптивно образуется у тривиальных цианобактерий, а также у цианобактерий-прохлорофитов (у которых, по определению, присутствуют один или несколько вспомогательных хлорофиллов).

Главным фактором экологического стресса у цианобактерий служит железо. До конца 1980-х гг. недооценивалась ключевая роль этого микроэлемента для первичной продукции в открытой акватории и зоне апвеллинга. По современным представлениям, присутствие железа в экстремально низких концентрациях ($\ll 1$ нМ) лимитирует первичную продукцию в тех областях Мирового океана, которые относительно богаты другими минеральными элементами. Эта закономерность распространяется и на озерные экосистемы, для мониторинга которых используется метод люминесцентного зондирования — ген люциферазы *Vibrio harveyi* гибридизуют с промоторами генов железного стресса *isiAB* (см. ниже), находящимися под контролем глобального регулятора из семейства белков *Fur*.

В состав «минимального» фотосинтетического аппарата цианобактерий (*ФС*/*ФСII*/цитохром *bf*-комплекс/фикобилисома; см. II том учебника) входят ~25 атомов железа. Поэтому большинство этих облигатных фототрофов так чувствительно к железному голоданию. В данном случае синдром железного стресса включает в себя:

- уменьшение удельного содержания хлорофилла и деградацию фикобилисом;
- активацию систем импорта железа (*Fut* и *Feo*);
- частичное замещение Fe-протеинов функционально аналогичными белками, не содержащими железа (например, взамен ферредоксина синтезируется флаводоксин; см. ниже);
- биогенез специфических светособирающих систем, адаптированных к условиям железного стресса (в частности, антенн на основе белка *IsiA*; см. ниже).

Большинство генов, которые индуцируются при железном голодании, содержит в своих промоторных участках железные боксы.

Флаводоксин. При железном голодании у цианобактерий деградирует апопротеин Fe/S-белка ферредоксина I и начинает синтезироваться флавопротеин — флаводоксин. Они выполняют одинаковую задачу, участвуя в переносе электронов от *ФС* к НАДФ с помощью ферредоксин/флаводоксин: НАДФ-оксидоредуктазы. Флаводоксин представляет собой кислый белок ($M_r \sim 18$ кДа; ген *isiB*); простетической группой служит ФМН (см. II том учебника). Ген *isiB* входит в состав дицистронного оперона *isiAB*. Промоторный участок гена *isiA* содержит железный бокс, что характерно для генов, которые индуцируются при железном голодании; в этом плане цианобактерии не отличаются от хемогетеротрофных бактерий.

Белок *IsiA*. При дефиците свободного железа активируется транскрипция генов *isiA* и *isiB*. Однако уровень дицистронной транскрипции генов *isiAB* увеличивается лишь на порядок, а уровень моноцистронной транскрипции гена *isiA* — на целых два порядка. Хотя продукт гена *isiA* синтезируется при железном стрессе, общим индуктором оперона *isiA* служит окислительный стресс. В свою очередь, окислительный стресс вызывается разными причинами: мутационными нарушениями в структуре фотосинтетического аппарата; голоданием по железу; осмотическим стрессом (воздействием минеральных солей в высоких концентрациях) и т. д. Белок *IsiA* гомологичен белку *CP43* (субъединице *PsbC* внутренней антенны *ФСII*), поэтому его также обозначают как *CP43'*. Подобно белку *CP43*, он состоит из 6 интегральных спиралей, которые совместно связывают 12 молекул хлорофилла *a*. Основное различие между белком *CP43* и белком *IsiA* заключается в том,

что у последнего нет большой гидрофильной петли размером ~ 100 а.о. Белок IsiA образует хлорофилл *a*-белковый комплекс, 18 молекул которого окружают кольцом тример ФСИ. По оптическим свойствам суперкомплекс IsiA/ФСИ ($\lambda_{\max} = 675$ нм) больше похож на ФСИ ($\lambda_{\max} = 674$ нм), чем на ФСИ ($\lambda_{\max} = 679$ нм).

Интересно, что 18-мерное кольцо белка IsiA напоминает мультимеры антенных комплексов LHI и LHI, окружающие реакционный центр пурпурных бактерий (см. II том учебника). Аналогичные кольца из моно- и тримерных антенных комплексов (Lhca1-4 и Lhcb1-3) образуются в хлоропластах вокруг ФСИ и ФСИ. Однако упомянутые типы суперкомплексов не гомологичны друг другу.

Штаммы с геном *isiA* представлены во всех Субсекциях цианобактерий (см. I том учебника). Роль белка IsiA до конца не выяснена. Скорее всего, образуемая им антенна компенсирует уменьшение размера антенны ФСИ (при железном стрессе количество тримеров ФСИ снижается на 60–80%), а также деградацию фикобилисом. Белок IsiA, с которым связаны до 50% хлорофилла, дополнительно служит аварийным клапаном, рассеивающим избыточную энергию, которая не утилизируется голодающими клетками.

Другие адаптационные системы. Мы уже говорили о том, что при дефиците железа в результате активации экспрессии гена *isiA* образуется суперкомплекс ФСИ/IsiA. Наряду с этим синтезируется белок IdiA (35 кДа). Экспрессия гена *idiA* находится под позитивным контролем белка IdiB. Предполагается, что белок IdiA защищает ФСИ, главным образом, при окислительном стрессе. При голодании по железу одновременно с усилением экспрессии гена *idiA* повышается экспрессия гена *dpsA*, находящегося под контролем глобального регулятора OxyR (см. раздел 19.1.6.2). Голодание по железу, помимо повышения уровня экспрессии генов *isiA* и *idiA* стимулирует экспрессию генов *fur*, *idiA*, *irpA* и *marA*. Но если мы знаем, что белки Fur, IsiA и IdiA обеспечивают железный гомеостаз, то роль белков IrpA и MarA остается не ясной.

18.3.3. Регуляция вторичного метаболизма

Продуктами вторичного (= специализированного) метаболизма являются вторичные (= специализированные) метаболиты. Это низкомолекулярные соединения нестандартной структуры, которые не используются в качестве материала для роста и размножения клеток, а в основном играют роль экзогенных регуляторов (см. II том учебника). Некоторые экзогенные регуляторы обладают побочным антибиотическим действием.

В большинстве случаев вторичные метаболиты-регуляторы поступают в окружающую среду. По достижении сверхкритической концентрации они начинают воздействовать на своего продуцента извне, вызывая чувство кворума с тем или иным адаптивным ответом, т. е. они ведут себя как автоиндукторы. Одной из форм адаптивного ответа служит клеточная дифференциация.

В разделе 17.5.2.1 уже упоминались автоиндуктор γ -бутиролактон (А-фактор), стимулирующий рост воздушного мицелия у актинобактерии *Streptomyces griseus* (см. рис. 238); олигопептидные автоиндукторы, контролирующие споруляцию у миксобактерии *Mycobacterium xanthus*, а также автоиндуктор стигмолон, вызывающий образование сложных плодовых тел у миксобактерии *Stigmatella aurantiaca* (см. рис. 239). Более подробно бактериальные автоиндукторы будут рассмотрены в разделе 18.4.2.

У грамотрицательных и грамположительных бактерий регуляторное воздействие автоиндукторов на образование вторичных метаболитов, в том числе, на свой собственный синтез осуществляется разными способами (рис. 264).

Грамотрицательные бактерии (рис. 264, А). Вторичные метаболиты грамотрицательных бактерий изучены в основном у представителей класса «*Gamma*proteobacteria», в частности у псевдомонад. К их числу относятся:

- автоиндукторы;
- факторы вирулентности;

- цитотоксины;
- факторы *биоконтроля*, т. е. антибиотики, защищающие растение (партнера по симбиозу) от грибов и нематод;
- поверхностно-активные вещества и т. д.

Экзогенный стимул воспринимается двухкомпонентной сигнальной системой. Она состоит из мембранного сенсора GacS (сокр. англ. global activation of antibiotic synthesis), который после связывания сигнального экзопродукта активируется путем автофосфорилирования, и растворимого регулятора GacA. Белок GacS содержит несколько фосфотрансферазных доменов и, таким образом, представляет собой гибридную сенсорную киназу (см. раздел 18.1.1.3). Белок GacA, активированный сенсорной киназой GacS, связывается с консенсусным Gac-боксом TGTAAGN₆CTTACA, лежащим левее промоторов генов-мишеней.

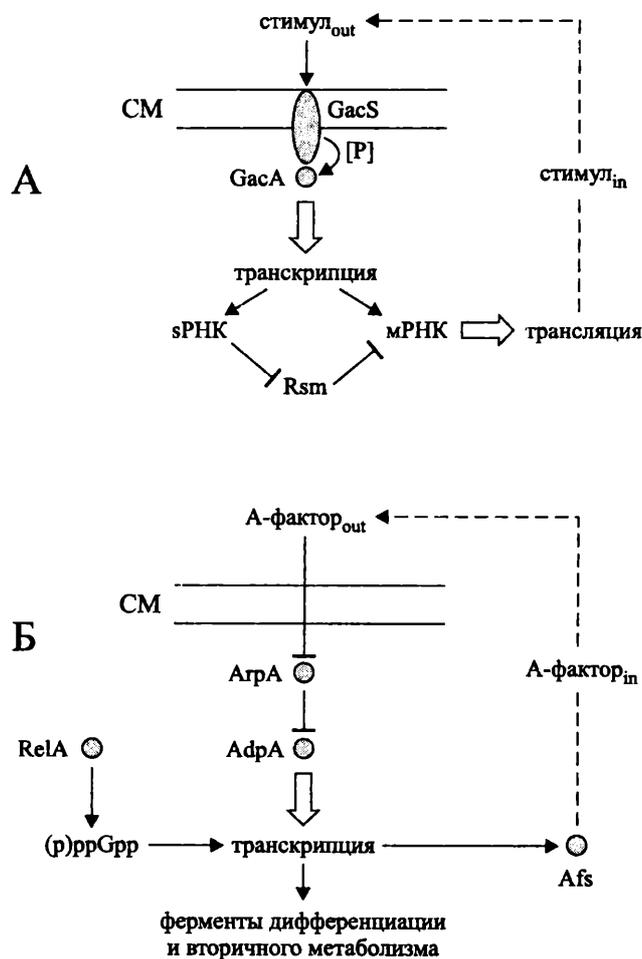


Рис. 264. Регуляция образования вторичных метаболитов при помощи аутоиндукторов у грамотрицательных (А) и грамположительных (Б) бактерий. Объяснение в тексте.

Продуктом транскрипции GacA-активируемых генов служат мРНК, а также регуляторные sРНК размером 100–500 н. (см. раздел 18.2.2).

Синтез мРНК и sРНК усиливается при достижении кворума, т. е. при увеличении плотности бактериальной популяции, когда концентрация аутоиндуктора достигает критического порогового уровня.

У белка GacA существует функциональный антагонист — посттранскрипционный регулятор, в данном случае РНК-связывающий белок из семейства Rsm/Csr (сокр. англ. repressor of secondary metabolism/carbon storage regulator), который блокирует мРНК. В свою очередь, антагонистом белка Rsm является sРНК, которая имеет к нему высокое сродство и путем его *изоляции* (англ. protein sequestration) не дает ему репрессировать трансляцию. Таким образом, позитивный контроль синтеза вторичных метаболитов усиливается петлей негативной связи.

Грамположительные бактерии (рис. 264, Б). Богатейшим источником вторичных метаболитов являются стрептомицеты, в частности *S. griseus*. При поверхностном культивировании биосинтез этих соединений начинается после образования воздушных гиф, а при глубинном культивировании — после перехода к стационарной фазе. Как правило, гены вторичного метаболизма образуют оперон размером 1–100 т. п. н., находящийся под контролем регуляторного гена.

Сигналом для биосинтеза вторичного метаболита служит замедление или прекращение роста. При этом с помощью синтетазы RelA образуется алармон (p)ppGpp (см. раздел 18.1.4), который активирует транскрипцию генов биосинтеза вторичных метаболитов. Параллельно с ним действует белковый активатор транскрипции — AdpA (сокр. англ. aerial mycelium derepressor protein).

При накоплении (p)ppGpp с помощью синтетазы AfsA начинает вырабатываться экзопродукт — аутоиндуктор 2-изокапроил-3R-гидрокси-метил- γ -бутиролактон, или А-фактор, выявленный в середине 1960-х гг. в результате пионерских исследований А. С. Хохлова (см. рис. 238). Когда концентрация А-фактора достигает критического уровня, т. е. наступает чувство кворума, он связывается с цитоплазматическим рецептором — репрессором транскрипции AgrA (сокр. англ. aerial mycelium repressor protein). Это приводит к освобождению промотора гена *adpA* и началу синтеза активатора транскрипции AdpA.

От белка AdpA зависит плейотропная активация морфогенетических и метаболических процессов, в частности, биосинтез аутоиндуктора γ -бутиролактона и антибиотика стрептомицина. В первую очередь, AdpA активирует ген альтернативного сигма-фактора ECF (σ^{adsA}), который, в свою очередь, обеспечивает транскрипцию генов, ответственных за образование воздушного мицелия. Кроме того, AdpA активирует ген *amfR* (его продукт влияет на синтез пептидного морфогена AmfS), а также другие «морфогенетические» гены — ген эндонуклеазы SGMP II и гены внеклеточных протеаз SprABDT.

18.4. РЕГУЛЯЦИЯ ПОВЕДЕНИЯ

Термином «поведение» обозначается интегральная адаптивная реакция особи (индивидуальное поведение) или группы особей (коллективное поведение). Поскольку особью у прокариотов является клетка или трихом, все формы поведения у них так или иначе реализуются на клеточном уровне.

Регуляцию индивидуального или коллективного поведения (которое обычно узко интерпретируют как активную подвижность) принято обсуждать отдельно не только от регуляции метаболизма, но и отдельно от регуляции дифференциации и регуляции вирулентности. Мы же поступим иначе и распространим понятие «поведение» на дифференциацию и вирулентность, поскольку последние определяются условиями питания и связаны с интегративным изменением состояния клетки.

Контроль клеточной дифференциации мы уже рассматривали в разделе 17.5. Теперь остановимся на других формах регулируемого поведения, прежде всего на таксисах.

18.4.1. Индивидуальное поведение и таксисы

Общебиологический термин «таксис» (греч. taxis — расположение) означает целесообразное миграционное поведение организма по отношению к односторонне ориентированному стимулу. Иными словами, стимул может привлекать объект или вызывать у него реакцию отторжения.

Привлечение или отторжение, применительно к прокариотам, означает поиски условий, более благоприятных для роста или, во всяком случае, не угрожающих целостности клеточных структур и процессам жизнедеятельности.

Локомоторная основа таксисов у прокариотов. Таксис у прокариотов носит интегративный характер и связан с самостоятельным перемещением особи (клетки или трихома), что приводит к изменению дистанции между ней и источником стимула.

Следует уточнить, что активный таксис отличается от пассивной ориентации по вектору стимула, и поэтому такой термин, как «магнитотаксис» (см. I том учебника) некорректен.

Движение при таксисах осуществляется при помощи жгутиков (у бактерий и архей) или путем скольжения (только у бактерий). Хотя у бактерий существует ряд других механизмов подвижности, например твичинг с помощью фимбрий IV типа (см. I том учебника), достоверными данными об их участии в таксисах мы не располагаем.

Классификация таксисов. По традиции таксисы классифицируются в соответствии со спецификой внешнего стимула. Соответственно, различают *хемотаксис* (таксис к химическим веществам), *фототаксис* (таксис к свету), *осмотаксис* (таксис к осмомолярности среды), *гальванотаксис* (таксис к источнику электрического заряда) и *термотаксис* (таксис к температуре). Одни из них изучены на уровне клеточных механизмов, другие только феноменологически.

Современная классификация исходит из более глубоких соображений, и таксисы подразделяются на два основных типа: *не зависящие от метаболизма* (англ. metabolism-independent taxis) и *зависящие от метаболизма* (англ. metabolism-dependent taxis). В первом случае внешний стимул используется только как регуляторный сигнал, который отражает состояние окружающей среды и вызывает миграционный ответ, но не влияет на метаболизм и не участвует в нем в качестве источника энергии или конструктивного субстрата. Во втором случае клетка воспринимает не стимул как таковой, а вызванное им изменение метаболизма.

Существует и третий тип таксиса, который уникален и поэтому рассматривает-

ся обособленно — это таксис, *зависящий от транспорта* (англ. transport-dependent taxis).

Примерами таксисов, не зависящих от метаболизма, служит хемотаксис и фото-таксис.

18.4.1.1. Таксис, не зависящий от метаболизма: хемотаксис

Первооткрывателем хемотаксиса был немецкий физиолог Вильгельм Пфедфер (W. Pfeffer), который в 1883 г. обнаружил, что одни и те же химические вещества могут привлекать или отпугивать разные хемотропные бактерии.

Начало современным исследованиям хемотаксиса у прокариотов положили пионерские работы Юлиуса Адлера (J. Adler), выполненные в конце 1960-х гг. на *E. coli* K-12. В них впервые было показано, что хемотаксис непосредственно не связан с метаболизмом хемотаксиса.

Общий механизм хемотаксиса (рис. 265). Основа механизма хемотаксиса одинакова для бактерий и архей, независимо от типа аппарата, обеспечивающего активную подвижность, и независимо от характера стимула.

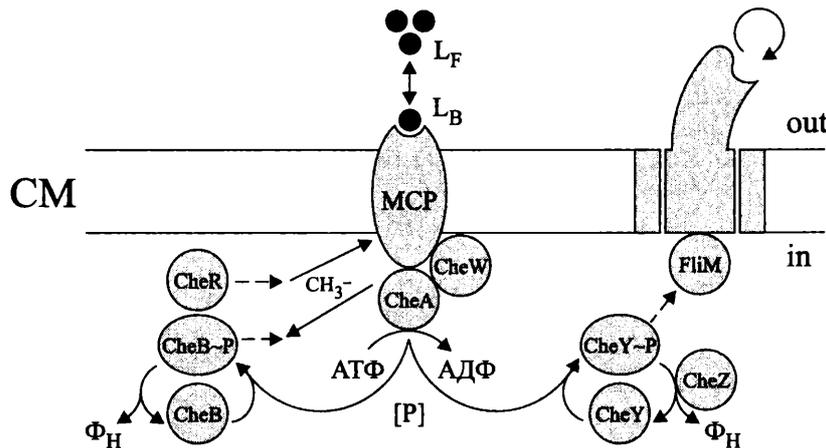


Рис. 265. Механизм хемотаксиса.
Объяснение в тексте. L_F — свободный лиганд; L_B — связанный лиганд.

Систему хемотаксиса, наиболее изученную на примере *E. coli*, кодируют шесть незаменимых генов универсальной сигнальной системы — *cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY* и *cheZ*, а также пять дополнительных генов хеморецепторов — *tsr*, *tar*, *trg*, *tap* и *aer*. Опероны хемотаксиса входят в состав регулона *fla* (сокр. англ. flagellar — жгутиковый), кодирующего и регулирующего подвижность при помощи жгутиков.

Хемотаксис позволяет сменить текущие условия роста на условия, более благоприятные. Эта цель достигается путем активного перемещения клетки либо в область с повышенной концентрацией *аттрактанта*, т.е. привлекающего вещества (англ. attractant; от лат. at-trecto — прикасаться), либо в область с пониженной концентрацией *репеллента*, т.е. отпугивающего вещества (англ. repellent; от лат. repello — отталкивать).

Клетка *E. coli* снабжена 6–7 жгутиковыми моторами, равномерно распределенными по оболочке. В изотропной среде роторы этих моторов периодически изменяют направление своего вращения, что делается с присущей данной бактерии базовой частотой. При вращении против часовой стрелки нити жгутиков сплетаются и вращаются вместе, в результате клетка движется поступательно. При вращении по часовой стрелке нити жгутиков расплетаются, и в результате этого клетка кувыркается на месте. При новом переходе к плаванию велика вероятность изменения ориентации продольной оси клетки по сравнению с ориентацией при последнем заплыве (см. I том учебника).

Мониторинг концентрации хемозффекторов позволяет адаптивно изменить базовую частоту переключений мотора. При увеличении концентрации аттрактанта или уменьшении концентрации репеллента она понижается. В свою очередь, при уменьшении концентрации аттрактанта или увеличении концентрации репеллента она повышается. В итоге клетка перемещается зигзагами и дольше плывет в благоприятном направлении. Такой тип движения называется *клинокинезом* (англ. klinokinesis; от греч. klino — наклонять и kineo — двигать; *буквально — двигаться под уклон*).

Частота переключений ротора контролируется двухкомпонентной сигнальной системой, которая имеет два принципиальных отличия от классических двухкомпонентных сигнальных систем (см. раздел 18.1.1.3).

Во-первых, регулятор не содержит ДНК-связывающего домена, а взаимодействует с мотором жгутика.

Во-вторых, гистидинкиназа не содержит сенсорного модуля, а получает сигнал от первичного сенсора — *метилакцепторного белка хемотаксиса* (англ. methyl-accepting chemotaxis protein, MCP), обладающего периплазматическим сенсорным доменом для связывания лиганда-хемозффектора, а также цитоплазматическим сигнальным доменом, который обратимо метилируется по 4–6 остаткам Glu. Таким образом, функции сенсора и гистидинкиназы выполняет не одна, а две разные молекулы, что позволяет давать унифицированный адаптивный ответ на разные стимулы.

Сигнальный домен MCP образует тройственный комплекс с гистидинкиназой CheA и «адапторным» белком-посредником CheW (рис. 265). Гистидинкиназа CheA активируется или деактивируется — в зависимости от баланса между загруженностью хеморецептора и уровнем его метилирования.

Взаимодействие рецептора с лигандом приводит к быстрому ответу (~100 мс) на уровне жгутикового мотора. Более медленная обратная связь (~10 с) осуществляется путем деметилирования хеморецептора под контролем гистидинкиназы CheA. Этим достигается привыкание рецептора, и активность гистидинкиназы CheA возвращается на уровень, предшествовавший стимуляции. Запаздывание сенсорной адаптации по отношению к двигательному акту — не что иное, как своеобразная кратковременная память, позволяющая клетке отслеживать изменение концентрации хемозффектора во времени, хотя она плывет в пространственном градиенте.

В центре каскада реакций фосфорилирования/дефосфорилирования находится двухкомпонентная сигнальная система CheA/CheY.

В результате связывания лиганда с рецептором цитоплазматическая гистидинкиназа CheA автофосфорилируется по остаткам His ($\text{CheA} + \text{ATP} \rightarrow \text{CheA} \sim \text{P} + \text{ADP}$). За счет CheA~P цитоплазматические регуляторы CheY и CheB трансфосфорилируются по остаткам Asp.

Активированная форма регулятора CheY (CheY~P) теряет сродство к гистидинкиназе CheA и диффундирует к базальному телу жгутика. Там она аллостерически

активирует белок FliM, отвечающий за устойчивое вращение ротора жгутикового мотора по часовой стрелке. Нефосфорилированная форма CheY не взаимодействует с ротором.

В свою очередь, активированная форма регулятора CheB (CheB~P) играет роль метилэстеразы. Деметилированный ею хеморецептор MCP перестает активировать гистидинкиназу CheA; регулятор CheY дефосфорилируется и в такой форме уже не способен активировать белок FliM. В результате ротор жгутика начинает вращаться против часовой стрелки. Антагонистом метилэстеразы CheB~P служит метилтрансфераза CheR. Она метилирует MCP за счет универсального донора (S-аденозилметионина; см. рис. 196), и ее активность не зависит от стимула.

Чтобы быть готовыми к новому восприятию стимула, регуляторы CheY~P и CheB~P подвергаются автокаталитическому дефосфорилированию. Для ускорения дефосфорилирования более долгоживущего регулятора CheY~P дополнительно используется протеинфосфатаза CheZ, а у некоторых бактерий, например *Sinorhizobium meliloti*, фосфорильная группа CheY~P сбрасывается на второй белок CheY-типа, не выполняющий функцию регулятора мотора.

Хемозффекторы. В результате связывания аттрактанта с хеморецептором активность гистидинкиназы CheA ингибируется, а при связывании с репеллентом она стимулируется (рис. 265).

Одни лиганды напрямую взаимодействуют с сенсорными доменами MCP. Другие лиганды презентуются этим доменам периплазматическими связывающими белками, «позаимствованными» у ABC-пермеазной системы (см. II том учебника). Эти белки связывают дипептиды (англ. dipeptide binding protein; DBP), глюкозу/галактозу (англ. glucose/galactose binding protein; GBP), мальтозу/мальтодекстрины (англ. maltose/maltodextrin binding protein; MBP), рибозу (англ. ribose-binding protein; RBP) или такой репеллент, как катион Ni²⁺ (англ. Ni-binding protein; NiBP).

Хеморецепторы (рис. 266). Как уже отмечалось, хеморецепторы MCP, или *трансдукторы* (англ. transducer) состоят из двух модулей. Варибельный N-концевой сенсорный модуль расположен в периплазматическом компартменте и реагирует на изменение концентрации хемозффекторов. Консервативный C-концевой сигнальный модуль обеспечивает адаптивный ответ, сообщаясь со жгутиковым мотором через двухкомпонентную сигнальную систему CheA/CheY и адапторный белок CheW.

Разные объекты имеют разные наборы хеморецепторов MCP, общее число которых, согласно базам данных, достигает нескольких сотен. У отдельного объекта число генов, кодирующих хеморецепторы, варьирует в пределах от двух (*Archaeoglobus fulgidus*) до >20 (*Pseudomonas aeruginosa*), причем многие из них — это гены-паралоги. Геномы прокариотов, неспособных к плаванию (примером служат цианобактерии), также содержат гены хеморецепторов; по-видимому, их продукты участвуют в регуляции скольжения.

E. coli K-12 обладает простой системой хемотаксиса и использует всего лишь пять хеморецепторов: Tsr (сокр. англ. transducer for serine and repellents); Tar (сокр. англ. transducer for aspartate); Tap (сокр. англ. transducer for peptides); Trg (сокр. англ. transducer for ribose and galactose) и Aer (сокр. англ. aerotaxis and energy responses). Ее ближайший родственник, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium имеет шесть хеморецепторов: Tsr, Tar, Trg, Aer, Tip (от англ. hairpin tip of Tsr — концевая шпилька цитоплазматического домена белка Tsr) и Tcp (сокр. англ. taxis for citrate and phenol).

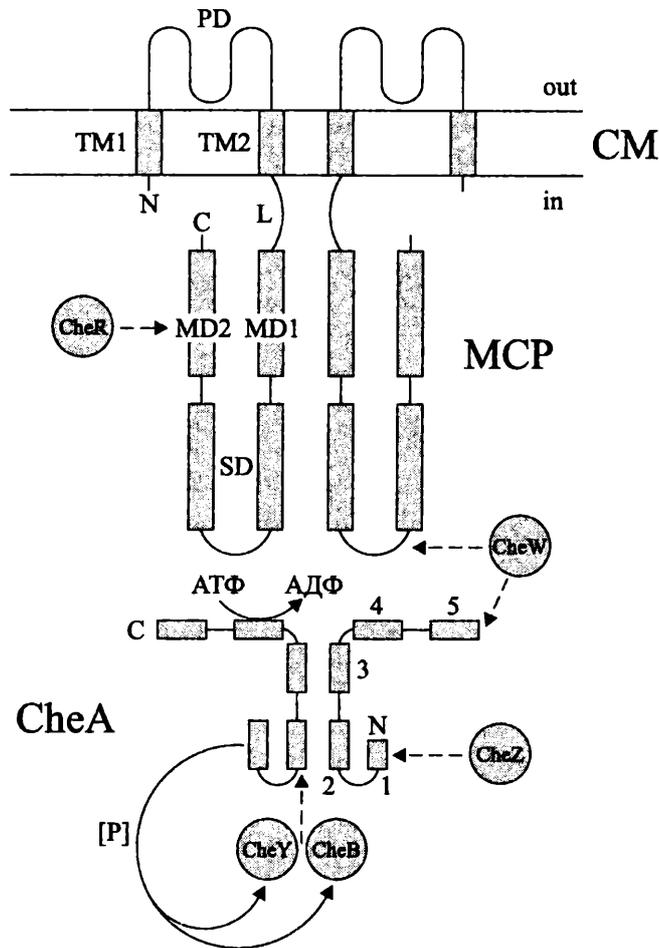


Рис. 266. Доменная структура хеморецептора MCP и гистидинкиназы CheA.
Объяснение в тексте.

Хеморецепторы Tsg и Tir воспринимают аланин, аминокислоты, глицин, кислород, протоны и серин (аттрактанты); Tag — аспартат, глутамат и мальтозу (аттрактанты), а также двухвалентные катионы (репелленты); Tar — дипептиды (аттрактанты); Tgr — рибозу, галактозу и глюкозу (аттрактанты); Tcr — цитрат (аттрактант) и фенол (репеллент); Aer является сенсором редокс-состояния электрон-транспортной цепи.

Если энтеробактерии используют сравнительно узкий набор хеморецепторов, то у других прокариотов их может быть гораздо больше. В частности, у экстремально галофильного археота *Halobacterium salinarium* их 11 (Htr1-XI; сокр. англ. *Halobacterium transducer*), а у бактерии *Vibrio cholerae* свыше 40.

Большинство MCP имеет стандартную доменную структуру (рис. 266). На N-конце находится короткий цитоплазматический сегмент. Далее следуют первый трансмембранный домен (TM1), большой периплазматический сенсорный домен (PD), второй трансмембранный домен (TM2), линкер (L), первый домен для метилиро-

вания (MD1), высококонсервативный сигнальный домен (SD), второй домен для метилирования (MD2) и короткий С-концевой сегмент. Исключением является хеморецептор Aег, у которого сенсорный домен не периплазматический, а цитоплазматический (см. раздел 18.4.1.3). Во всех случаях сигнальный домен обеспечивает взаимодействие между первичным сенсором (хеморецептором) и вторичным сенсором (гистидинкиназой CheA).

Интересно, что взаимно гомологичные сенсорные модули хеморецепторов энтеробактерий Tsr, Tar, Tap и Trg не имеют гомологов среди других белков, в то время как сенсорный модуль хеморецептора Aег содержит широко распространенный домен PAS (см. разделы 18.3.1.1 и 18.4.1.3).

Согласно классической модели, хеморецепторы образуют димеры, в результате чего на цитоплазматической стороне мембраны образуется пучок из четырех попарно антипараллельных α -спиралей (рис. 266). С димером MCP связаны два других димера — димер адапторного белка CheW и димер вторичного сенсора, протеинкиназы CheA.

Однако, согласно последним данным, MCP объединяются в кластеры размером до 10^3 мономеров. По-видимому, это происходит за счет взаимодействия MCP друг с другом, а затем уже к ним присоединяются белки CheW и CheA. В неделящихся клетках *E. coli* кластеры, состоящие из смеси рецепторов, занимают терминальное положение, а в делящихся клетках — латеральное положение, с интервалом в $1/8$ длины продольной оси (благодаря этому после деления они оказываются на полюсах). Физиологический смысл анизотропной сегрегации кластеров MCP еще не ясен.

Консервативные компоненты сигнальной системы. Белки CheW, CheY и CheZ содержат только по одному домену. Белок CheB имеет два домена, один из которых гомологичен CheY и получает сигнал от гистидинкиназы CheA, а другой обладает метилэстеразной активностью.

Протеинкиназа CheA состоит из доменов P1–P5 (рис. 266):

- N-концевой домен P1 обладает фосфотрансферазной активностью;
- домен P2 используется для связывания регуляторов CheY и CheB;
- домен P3 обеспечивает димеризацию;
- домен P4 автофосфорилируется по остаткам His;
- домен P5 является гомологом белка CheW, через него взаимодействует с сенсорным доменом хеморецептора MCP и играет роль проводника сигнала.

Домен P1 существует в двух вариантах: основном и модифицированном. Модифицированный вариант служит для связывания протеинфосфатазы CheZ (рис. 266). Он синтезируется от альтернативного старта трансляции и имеет N-конец, укороченный на 97 а.о.

18.4.1.2. Таксис, не зависящий от метаболизма: фототаксис

Как уже отмечалось, живые организмы могут использовать свет в качестве источника энергии или в качестве стимула, дающего информацию о состоянии окружающей среды. В первом случае речь идет о фототрофии, а во втором случае — о фототаксисе.

Фототаксисом называется самостоятельное перемещение организма, ориентированное относительно пути распространения света. Различают *положительный фототаксис*, или движение по направлению к источнику света и *отрицательный фототаксис*, или движение в противоположную сторону от источника света.

В отличие от ядерных организмов с их фоторецепторными органеллами или органами, прокариоты лишены механизма, который позволил бы им определять направление на источник света. Поэтому ориентация бактерий и архей по отношению к источнику света имеет поисковый характер, т.е. осуществляется путем проб и ошибок (хотя трихомы цианобактерии *Phormidium* sp. каким-то образом различают «передний» и «задний» свет).

Как любой внешний стимул, видимый свет может быть не только полезным, но и вредным, в зависимости от его интенсивности и спектрального состава. Напомним, что после поглощения кванта света фотосинтетическим пигментом возбужденное состояние дезактивируется либо путем ассимиляции энергии, либо за счет флуоресценции. В противном случае избыточная энергия рассеивается в виде тепла (и тогда локальная среда вокруг молекулы пигмента за $\sim 10^{-9}$ с нагревается до $\sim 200^\circ\text{C}$, что может вызвать температурную денатурацию) или передается триплетному кислороду (что приводит к окислительному стрессу; см. раздел 19.1.6). Напомним и о вредном, преимущественно мутагенном воздействии дальнего ультрафиолетового света, которое благодаря фотореактивации купируется близким ультрафиолетовым светом или коротковолновым видимым светом (см. раздел 16.5.1.1). Поэтому фототаксис не обязательно связан с поисками более благоприятного светового режима и иногда наблюдается у некоторых хемогетеротрофных бактерий, в частности *Isosphaera pallida*.

Отрицательный фототаксис имеет не меньшее приспособительное значение, чем положительный фототаксис. В особенности важен таксис по отношению к синему свету, который поглощается соответствующими фоторецепторами. С одной стороны, это позволяет реагировать на общую интенсивность светового потока, т.е. на его потенциальную опасность. С другой стороны, обитатели водоемов, особенно глубоководные, преимущественно имеют дело с синими квантами (характерно, что наземные формы используют в качестве фоторецепторов фитохромы, поглощающие красные кванты).

Фототаксис, как и хемотаксис, позволяет сменить текущие условия роста на условия, более благоприятные. По характеру распределения стимула в пространстве градиент интенсивности света аналогичен градиенту концентрации хемозффектора. Соответственно, прокариоты ведут мониторинг светового стимула во времени и, пользуясь фоторецепторной сигнальной системой, перемещаются путем клинокинеза.

Однако в целом влияние света на характер движения бактерий сложнее, чем влияние хемозффекторов.

Индукцированные светом миграционные ответы клетки или популяции бывают трех типов.

Первый тип ответа — *фототаксис*, когда световой стимул порождает сигнал, который через двухкомпонентную сигнальную систему влияет на направление движения.

Второй тип ответа — *фотокинез* (от греч. *kinesis* — движение), когда свет, независимо от его направления, влияет на скорость движения посредством изменения активности фотосинтетического аппарата; при этом эффект может быть положительным или отрицательным. Показательно, что Теодор Энгельман (T. W. Engelmann) считается первооткрывателем фототаксиса, поскольку он в 1883 г. описал свойство пурпурных бактерий р. *Chromatium* избирательно скапливаться в полосах разложенного солнечного спектра соответственно максимуму поглощения бактериохлорофилла. Однако такое поведение объясняется не фототаксисом, а фотокинезом, и оно не требует участия сигнальных фоторецепторов.

Третий тип ответа — *фотофобическая реакция* (от греч. *phobos* — страх) при внезапном увеличении или уменьшении интенсивности освещения; по-видимому, это также вызвано изменением активности фотосинтетического аппарата. В зависимости от объекта, фотофобическая реакция

выражается во временной остановке движения или в изменении направления движения под углом $<90^\circ$ или $>90^\circ$. Фотофобическая реакция может быть связана с внезапным изменением интенсивности света не только во времени, но и в пространстве, т. е. когда движущийся объект пересекает границу света и темноты. При особой форме фотофобической реакции, *скотофобическом ответе* (от греч. skotos — темнота и phobos — страх), объект, выйдя из освещенной зоны, резко останавливается и поворачивает назад.

В отличие от фототаксиса, второй и третий типы миграционных ответов изучены только на феноменологическом уровне; в частности, неизвестно, существуют ли фоторецепторы для фотофобической реакции.

Отличить истинный фототаксис от других миграционных ответов легче в том случае, когда сенсорная и метаболическая системы используют свет разных участков спектра. В качестве примера рассмотрим отрицательный фототаксис у экстремально галофильных архей и пурпурных бактерий.

Фототаксис у экстремально галофильных архей. Экстремально галофильный археот *H. salinarium* обладает способностью к положительному и отрицательному фототаксису. Для этого он использует два разных фоторецептора, которые называются *сенсорными родопсинами* SRI и SRII (сокр. англ. sensory rhodopsin) и в качестве хромофора содержат ретиналь.

Фоторецептор SRI (максимум поглощения в основном состоянии ~ 600 нм) выполняет двойственную функцию. При слабом освещении он участвует в положительном фототаксисе к зеленому свету (587 нм), а при сильном освещении — еще и в отрицательном фототаксисе к синему свету (373 нм). Фоторецептор SRII (максимум поглощения в основном состоянии ~ 500 нм) участвует только в отрицательном фототаксисе к синему свету.

Благодаря отрицательному фототаксису *H. salinarium* покидает поверхность ярко освещенных водоемов, где высок уровень вредного ультрафиолетового излучения, и сосредоточивается в зоне доминирования зеленого света, который стимулирует биосинтез бактериородопсина.

Напомним, что помимо сенсорных родопсинов *H. salinarium* образует два «метаболических» ретинопротеина, создающих градиент концентрации простых неорганических ионов на уровне СМ (см. II том учебника):

— *бактериородопсин* (англ. bacteriorhodopsin, BR), который осуществляет светозависимый экспорт H^+ и используется как протонфорный мембранный биотрансформатор;

— *галородопсин* (англ. halorhodopsin), который осуществляет светозависимый импорт анионов Cl^- .

Наряду с фоторецепторами SRI и SRII *H. salinarium* образует третий фоторецептор, *батородопсин* (англ. bathorhodopsin; Bat; от греч. bathis — глубокий). Его функция, а также тип его хромофора окончательно не выяснены.

Мембранный фоторецептор SRI (SRII) взаимодействует с мембранным *трансдуктором* HtrI (HtrII), который независимо от этого может использоваться в качестве хеморецептора при хемотаксисе.

Трансдуктор HTRI (HtrII) образует с гистидинкиназой CheA двухкомпонентную сигнальную систему, которая через регулятор ответа CheY контролирует направление вращения ротора жгутикового мотора.

При поглощении фотона фоторецептор вступает в фотоцикл продолжительностью порядка секунды, переходя из основного состояния в состояние долгоживущего интермедиата (максимум поглощения 373 нм в случае SRI и 350 нм в случае SRII). В ходе фотоцикла хромофор фоторецептора претерпевает *trans-cis* изомеризацию

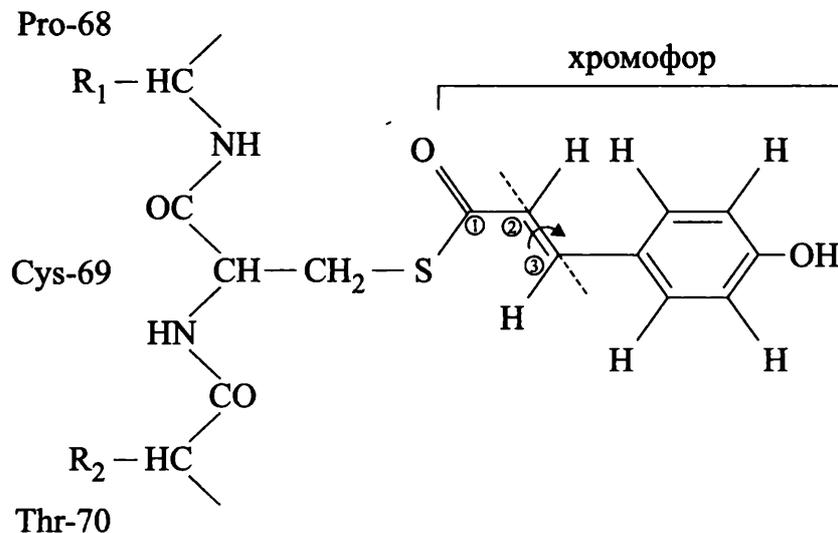


Рис. 267. Хромофор фотоактивного желтого пигмента РУР (3-*n*-гидроксибензилпропеновая кислота) и его связь с апопротеином.

(см. II том учебника), что приводит к изменению конформации апопротеина, а тот уже передает сигнал трансдуктору.

Фототаксис у пурпурных бактерий. Экстремально галофильные пурпурные бактерии *Chromatium salexigens*, *Ectothiorhospira halophila* и *Rhodospirillum salexigens* проявляют отрицательный фототаксис к синему свету.

Фоторецептором служит растворимый *фотоактивный желтый пигмент* (англ. photoactive yellow pigment of *E. halophila*, E-PYP), который относится к группе *ксантопсина* (англ. xanthopsin; название выбрано неудачно, поскольку между растворимым E-PYP и мембранными опсинами нет структурного сходства). Апопротеин E-PYP (14 кДа; 125 а.о.) имеет смешанную α/β -складчатую структуру с гидрофобным карманом, в котором находится сенсорный N-концевой домен из ~50 а.о., связывающий хромофор. Согласно данным молекулярного секвенирования и рентгеноструктурного анализа с уровнем разрешения 1,4Å, этот консервативный домен можно рассматривать в качестве эволюционного прототипа сенсорных доменов суперсемейства PAS (см. раздел 18.3.1.1).

Хромофор E-PYP уникален — это 3-*n*-гидроксибензилпропеновая кислота (тривиальные названия: *n*-гидроксикоричная, *n*-кумаровая), которая через тиоэфирную связь присоединяется к остатку Cys-69 (рис. 267).

После поглощения кванта синего света E-PYP (максимум поглощения в основном состоянии 446 нм) проходит фотоцикл с двумя интермедиатами, парадоксально напоминающий фотоцикл сенсорного родопсина, несмотря на различие хромофоров. В ходе него *n*-гидроксикоричная кислота транс-цис изомеризуется, что вызывает конформационное изменение апопротеина и порождает сигнал, который передается гистидинкиназе CheA двухкомпонентной сигнальной системы.

Фототаксис у цианобактерий. У скользящих цианобактерий существуют два типа положительного фототаксиса — когда трихом периодически изменяет направление своего движения, в конечном счете, приближаясь к источнику света (*Phormid-*

ium spp.), и когда происходит устойчивое движение к источнику света (*Anabaena* sp.). Второй тип миграции описан также у беоцитов.

Механизм фототаксиса цианобактерий не выяснен. Особенно это касается фоторецепторов, обеспечивающих миграционный ответ. Хотя ретинопротеин ASR (сокращение от англ. *Anabaena sensory rhodopsin*), обнаруженный у цианобактерий, и гомологичен сенсорным родопсинам архей, он имеет необычные свойства — ретиналь под воздействием света не изомеризуется, а фоторецептор не проходит через фотоцикл. Скорее всего, ASR используется в фоторегуляции метаболизма, например, участвует в хроматической адаптации.

18.4.1.3. Таксис, зависящий от метаболизма: энерготаксис

Жизнеспособность прокариотной клетки определяется тем, насколько последняя обеспечена энергией; при прочих благоприятных условиях от величины протонного градиента и энергетического заряда зависят клеточный рост и размножение.

Для поддержания оптимального уровня ассимиляции энергии существуют разные варианты энерготаксиса, когда бактерия воспринимает не изменение экзогенного регуляторного стимула, существенное для энергетического метаболизма, а изменение уровня самого энергетического метаболизма.

Соответственно, при энерготаксисе регуляторным стимулом служит не хемозффектор, а скорость дыхания и уровень протонного градиента, отражающие активность использования хемозффектора в энергетическом метаболизме.

Вариантами энерготаксиса являются:

- аэротаксис, или таксис к кислороду;
- таксис к альтернативному терминальному акцептору электронов;
- таксис к субстратам, изменяющим редокс-состояние промежуточных переносчиков дыхательной цепи;
- таксис к субстратам, восстанавливающим донорный участок дыхательной цепи.

Из всех типов энерготаксиса наиболее изучен таксис к молекулярному кислороду, или *аэротаксис*, при котором сенсором воспринимается не сам кислород, а редокс-состояние использующей кислород электрон-транспортной цепи.

Аэротаксис *E. coli*. Аэротаксисом называется миграционный ответ на изменение скорости дыхания в результате уменьшения или увеличения концентрации кислорода в окружающей среде. Иными словами, аэротаксис направляет прокариотный организм в ту зону, где концентрация кислорода оптимальна для ассимиляции энергии.

Способность молекулярного кислорода влиять на динамическое поведение микроорганизмов впервые обнаружил Энгельман. В его опытах, относящихся к 1881 г., аэробные гетеротрофные бактерии скапливались вокруг освещенных клеток цианобактерий. Позже стало ясно, что бактерии мигрируют в зоны, где концентрация кислорода оптимальна для их роста (табл. 32).

Наконец, было показано, что при аэротаксисе бактерия предпочитает ту концентрацию кислорода, которая соответствует средству этого акцептора электронов к главной кислородредуктазе дыхательной цепи. Характерно, что мутанты, дефектные по кислородредуктазам, одновременно теряют способность к аэротаксису.

Таблица 32. Уровни концентрации кислорода, оптимальные для отдельных групп бактерий

Экологическая группа (по отношению к кислороду)	Вид бактерий (пример)	O ₂ (мкМ)
Облигатные аэробы	<i>B. subtilis</i>	~ 200
Факультативные анаэробы	<i>E. coli</i>	~ 50
Микроаэрофилы	<i>Azospirillum brasiliense</i>	~ 4
Аэротолерантные анаэробы	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	~ 0, 4

При аэротаксисе *E. coli* в качестве хеморецептора используется мембраносвязанный белок Aer (рис. 268). Его цитоплазматический С-концевой сигнальный модуль гомологичен С-концевым доменам других хеморецепторов, однако, в отличие от хеморецепторов Tsr, Tar, Tag и Ttg, в нем нет сайтов для метилирования. В составе цитоплазматического N-концевого сенсорного модуля имеется PAS-домен, с которым нековалентно связан флавиновый кофактор — ФАД. Сигнальный и сенсорный модули заякорены в СМ с помощью двух трансмембранных модулей.

Предполагается, что PAS-домен белка Aer взаимодействует с хинонным пулом дыхательной цепи, в результате чего ФАДН₂ обратимо окисляется. Механизм реакции неизвестен; теоретически, ФАДН₂ может окисляться либо автооксидабельно, т. е. ферментативным путем, либо с помощью ФАД-зависимой сукцинатдегидрогеназы (см. II том учебника). Как регенерируется восстановленная форма ФАД, также неизвестно; скорее всего, электроны поступают от НАД(Ф)Н.

Таким образом, изменение скорости дыхания в результате уменьшения или увеличения концентрации кислорода отражается на редокс-состоянии ФАД в PAS-доме, что приводит к изменению конформации сенсорного модуля белка Aer. Изменение конформации сенсорного модуля передается сигнальному модулю, который при посредстве адапторного белка CheW активирует гистидинкиназу CheA (рис. 268).

Аэротаксис у других прокариотов. Механизм аэротаксиса, изученный на примере *E. coli*, не универсален. В частности, у таких разных объектов, как *B. subtilis* и *Halobacterium salinarum* обнаружен ранее неизвестный у прокариотов тип хеморецептора — растворимый гемопротеин, соответственно, HemAT-Bs и HemAT-Hs (сокр. англ. heme-dependent aerotaxis).

N-терминальный сенсорный модуль белка HemAT имеет небольшую степень гомологии с миоглобином, а С-терминальный сигнальный модуль на 30% гомологичен сигнальному домену хеморецептора Tsr *E. coli*.

Предполагается, что связывание молекулярного кислорода гемом, находящимся в ферро-состоянии (Fe²⁺), вызывает конформационное изменение сенсорного модуля. В свою очередь, это влияет на активность сигнального модуля, который взаимодействует с CheA/CheW. Следует добавить, что, в отличие от хемосенсора Aer *E. coli*, сенсор HemAT обратимо метилируется. Таким образом, гемзависимый аэротаксис по своей природе является не энерготаксисом, а хемотаксисом к кислороду.

Особая экологическая роль аэротаксиса. Энерготаксис и его главная форма, аэротаксис доминируют над другими формами миграционного поведения, в частности над хемотаксисом, что можно продемонстрировать путем простого мыслительного эксперимента.

Реагируя на метаболизируемый хемоаттрактант, например на аминокислоту, бактерии с аэробным дыхательным типом метаболизма скапливаются в одном месте, достигая плотности популяции $\geq 10^9$ клеток·мл⁻¹. При этом они потребляют весь

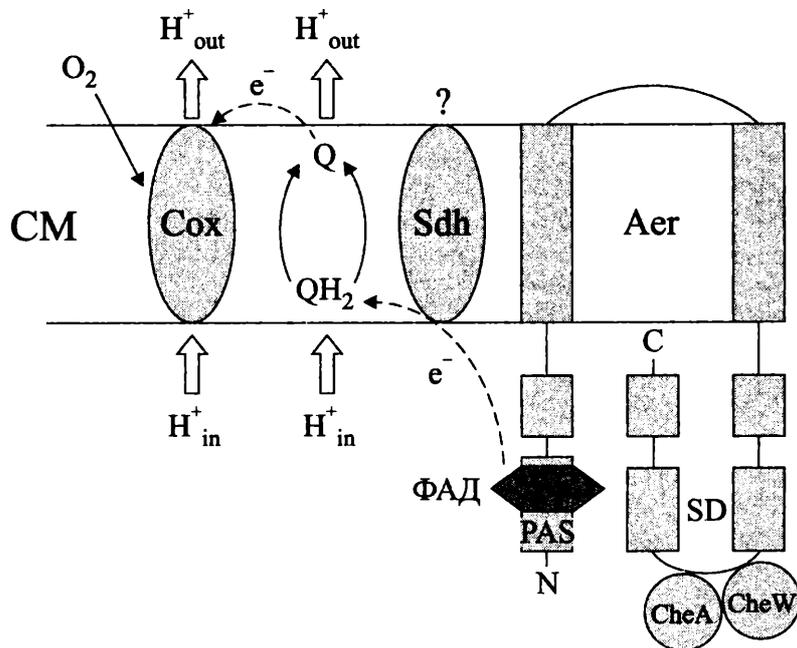


Рис. 268. Механизм энерготаксиса.
Объяснение в тексте. Cox — цитохромоксидаза; Sdh — сукцинатдегидрогеназа.

имеющийся кислород и быстро оказываются в локальной анаэробной среде, что привело бы к опасному энергетическому стрессу, если бы миграционное поведение не корректировалось аэротаксисом. При первых же признаках энергетического дефицита бактерии преодолевают хемотаксис и устремляются вверх по градиенту концентрации кислорода, даже если при этом им приходится покинуть зону с более привлекательной концентрацией субстрата.

Особо важен аэротаксис там, где существует очень крутой градиент кислорода (стратифицированные микробные маты, морские «снежинки», хлопья «активного» ила очистных сооружений и т. д.; см. I том учебника).

18.4.1.4. Таксис, зависящий от транспорта

При этом уникальном таксисе миграционный ответ вызывается не экзогенным регуляторным стимулом (как при хемотаксисе или фототаксисе) и не уровнем энергетического метаболизма (как при энерготаксисе), а импортом аттрактанта, например глюкозы или маннозы.

В данном случае рецептором внешнего стимула служит фосфотрансферазная система (см. раздел 18.3.2.2). Когда пермеаза ЕПС переносит углевод, он одновременно с этим фосфорилируется ферментом ЕПВ, который получает фосфорильную группу по цепи: ФЭП → ЕI → НРr → ЕПА → ЕПВ (см. рис. 259).

Фермент ЕI непосредственно взаимодействует с комплексом гистидинкиназы CheA и адапторного белка CheW. При этом фосфорилированный фермент ЕI~P служит аллостерическим активатором гистидинкиназы CheA, которая входит в состав двухкомпонентной сигнальной системы, контролирующей работу жгутика.

18.4.1.5. Другие формы таксисов

Хотя в литературе можно встретить упоминание таких форм таксисов, как гальванотаксис, осмотаксис и термотаксис, мы либо вообще не располагаем данными об их механизме, либо таких данных крайне мало.

Гальванотаксис. Гальванотаксис (англ. *galvanotaxis*), или активное движение по отношению к электрическому полю, был открыт немецким протистологом Максом Ферворном (M. Verwoorn) в 1889 г.; по его описаниям, бактерии одних видов плыли к аноду, а бактерии других видов — к катоду.

В конце 1980-х гг. Адлер показал, что хаотичное плавание бактерий в отсутствии приложенного напряжения сменяется целеустремленной миграцией к одному из электродов, причем направление движения различается для *E. coli* и *Salmonella enterica* серовар Турхимурium. При переключении полярности бактерия делала U-образный разворот, что указывало на существование у нее фиксированного диполя (т. е. заряд не наводился, а концы клетки имели знаки + и –). Вместе с тем, у плавающих бактерий скорость перемещения к электродам была на порядок выше, чем у бактерий, лишенных самостоятельной подвижности, т. е. эффект нельзя было объяснить электрофорезом.

Механизм гальванотаксиса до сих пор не понят; не исключено, что на самом деле наблюдается не гальванотаксис, а *гальваноориентация*, т. е. клетки занимают положение вдоль силовых линий электрического поля (по аналогии с «магнитотаксисом»), но не реагируют на его градиент.

Осмотаксис. Осмотаксис (англ. *osmotaxis*), или активное продвижение в область с оптимальной водной активностью, или с оптимальной осмомолярностью среды, впервые описал французский бактериолог Массар (J. Massart) в 1889 г.

В конце 1980-х гг. Адлер установил, что клетки *E. coli* активно перемещаются в раствор оптимальной осмомолярности (~0,2 М рибитола или сахарозы) и избегают чистой воды, причем используемый осмоаттрактант не являлся хемоаттрактантом или хемореппелентом. Механизм осмотаксиса остается загадкой.

Термотаксис. В отличие от гальванотаксиса и осмотаксиса, *термотаксис* (англ. *thermotaxis*), или перемещение и сосредоточение бактерий в пространственном градиенте температуры, действительно существует, и его механизм изучен.

В опытах, проведенных на *E. coli*, показано, что в основе термотаксиса лежит тот же самый механизм, который определяет хемотаксис (см. раздел 18.4.1.1). Если градиент стимула отсутствует, плавание чередуется с кувырками, но когда он появляется (например, 19° → 39°C), клетки воспринимают его с помощью рецепторов и изменяют частоту кувыркков таким образом, чтобы обеспечить перемещение в область с благоприятной температурой (30°C). Как правило, умеренное повышение температуры способствует плаванию, а ее уменьшение вызывает кувырки. Первичными рецепторами температуры, как и при хемотаксисе; служат трансдукторы Tsg и Tag; термоадаптация осуществляется путем изменения уровня метилирования этих рецепторов.

В отличие от мезофилов, термофильная бактерия *Thermotoga maritima* проявляет негативный таксис к повышенной температуре и чаще кувыркается во всем интервале стимула, при котором сохраняется активная подвижность. Кроме того, эта бактерия не содержит гомологов MCP-белков, т. е. механизм термотаксиса у нее иной, чем у *E. coli*.

18.4.2. Коллективное поведение на основе внутривидовой коммуникации

Регуляция коллективного поведения требует взаимного обмена сигналами. В случае прокариотов такой обмен изучен только у бактерий на примере химических сигналов; использование других сигналов, например звуковых волн, принципиально возможно, но достоверно не доказано.

Химический сигналинг и феромоны (общие сведения). Все организмы в той или иной степени используют химические агенты в качестве регуляторных сигналов. С их помощью многоклеточные ядерные существа общаются друг с другом, а также обмениваются информацией внутри своего тела на органном, тканевом и клеточном уровнях. В случае протистов и прокариотов химическими сигналами общаются между собой клетки одного или разных видов.

Обособленный класс сигнальных молекул составляют *феромоны* (от греч. *pherein* — переносить и *hormon* — возбуждать). Этот термин был предложен в 1959 г. Карлсоном (P. Karlson) и Люшером (M. Lüscher) для обозначения биологически активных веществ, которые выделяются организмом в окружающую среду и вызывают специфический ответ у другого организма того же вида. Феромоны принципиально отличаются от гормонов, которые секретируются во внутреннюю среду организма, обеспечивая связь между его отдельными частями.

Автоиндукторы (общие сведения). Феромоны прокариотов обычно называют *автоиндукторами* (англ. autoinducer). Эти диффундирующие низкомолекулярные соединения имеют три основные особенности: (1) они воздействуют извне на самого продуцента; (2) их активность требует пространственного сосредоточения многочисленных особей, т. е. она проявляется в зависимости от плотности популяции; (3) они могут служить средством не только внутривидового, но и межвидового общения.

Таким образом, автоиндукторы образуются популяцией клеток, выделяются в окружающую среду, а затем воспринимаются рецепторными системами продуцентов. Важно подчеркнуть, что в большинстве случаев это не генеральные метаболиты и не неспецифические побочные продукты жизнедеятельности, а специализированные метаболиты, которые служат сигнальными молекулами для межклеточного общения. Они образуются в ответ на изменение условий окружающей среды в определенной фазе роста, накапливаются снаружи клеток, распознаются специфическими рецепторами и вызывают координированный ответ по достижении концентрации 10^{-12} – 10^{-9} М. Добавим, что такой ответ выражается в изменении поведения, а не в детоксикации автоиндуктора и не в использовании его в качестве питательного субстрата.

Чувство кворума. Автоиндукторы проявляют свою активность, начиная с пороговой концентрации, что возможно только при достижении определенной плотности популяции. Поэтому по предложению Фукуа (W. C. Fuqua), высказанному в 1994 г., коллективная реакция бактерий на автоиндуктор была названа *чувством кворума* (англ. quorum sensing, QS). Концентрация автоиндуктора отражает концентрацию клеток, и начало его восприятия свидетельствует о достижении минимально необходимой численности, или кворума, что позволяет принять коллективное решение, в данном случае в форме того или иного адаптивного ответа. Чувство кворума позволяет особи, входящей в состав популяции, адаптироваться к изменению внеш-

них условий, воспринимая внешний сигнал, суммирующий индивидуально генерируемые внешние сигналы.

Функции, контролируемые с помощью автоиндукторов при появлении чувства кворума. Автоиндукторы влияют на экспрессию генов адаптивного ответа, а также на транскрипцию генов, которые отвечают за их собственный синтез и восприятие. С помощью QS-систем контролируются:

— вирулентность *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Vibrio* spp.;

— биOLUMИнесценция *V. fisheri* и *V. harvey*;

— синтез антибиотиков *Photobacterium luminescens*;

— образование экзотоксина *Clostridium perfringens*;

— образование биопленок *P. aeruginosa*;

— приобретение состояния компетентности при генетической трансформации *B. subtilis* и *Streptococcus pneumoniae*;

— дифференциация эндоспор *B. subtilis*, а также дифференциация цист микробактерий и цианобактерий;

— переход к стационарной фазе роста *B. subtilis*.

Благодаря чувству кворума, возникающему с помощью автоиндукторов, бактерии проявляют функции, целесообразные в коллективном исполнении, или решают проблемы, вытекающие из перенаселения локальной ниши. Ярким примером служит образование факторов вирулентности, которые часто обладают антигенными свойствами и распознаются иммунной системой хозяина. Целесообразно отложить образование этих факторов до того момента, когда популяция приобретет достаточно большой размер, что позволит избежать тотального уничтожения иммунной системой.

Разнообразие автоиндукторов и QS-систем (рис. 269). Чувство кворума, которое первоначально считалось свойством только некоторых морских светящихся вибрионов, в настоящее время продемонстрировано у двух десятков родов грамотрицательных бактерий, а также у некоторых грамположительных бактерий. В настоящее время описаны три основных типа QS-систем.

QS-система первого типа характерна для грамотрицательных бактерий (рис. 269, А). В большинстве случаев в ней используются автоиндукторы типа I (AI-1), или N-ацилированные лактоны гомосерина (англ. N-acylhomoserine lactone, AHL).

N-ацильные цепи AHL содержат четное, реже нечетное число атомов углерода (4–14), бывают насыщенными или ненасыщенными, а также могут содержать 2-кето- или 2-оксогруппы; при синтезе автоиндуктора эти цепи поступают от ацилированного ацилпереносящего белка (англ. acyl-carrier protein, ACP; см. II том учебника) или от ацил-CoA.

AHL образуются с помощью синтаз LuxI или LuxM, диффундируют в окружающую среду, а затем пассивно, по градиенту концентрации проникают обратно в клетку, где связываются с однокомпонентным сенсором — активатором транскрипции LuxR, который содержит N-концевой сенсорный модуль и C-концевой регуляторный модуль. LuxR может на время связаться с клеточной мембраной, но после активации он димеризуется и переходит в цитоплазму, где взаимодействует с ДНК.

Более редкими формами автоиндукторов у грамотрицательных бактерий являются циклические дипептиды (дикетопиперазины) у ряда псевдомонад и энтеробактерий, 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон у *Pseudomonas* sp., а также метиловый эфир 3-гидроксипальмитиновой кислоты у *Ralstonia solanacearum*.

QS-система второго типа характерна для грамположительных бактерий (рис. 269, Б). В данном случае автоиндукторами являются олигопептиды. Они синтезируются в виде предшественника, который подвергается протеолитическому про-

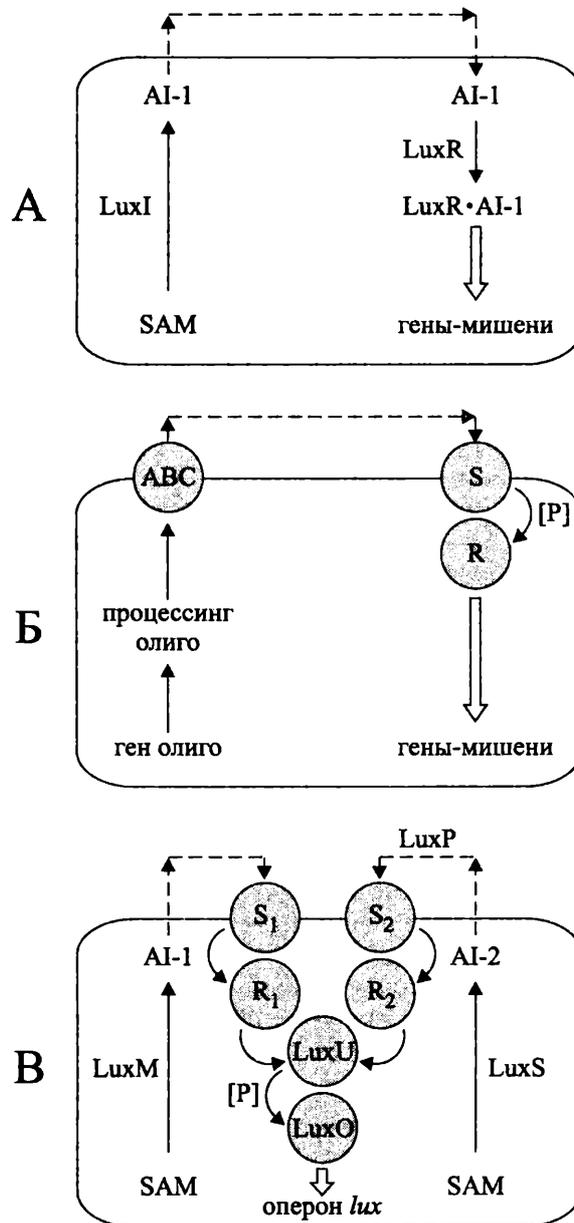


Рис. 269. QS-системы, обеспечивающие чувство кворума.

А — у большинства грамотрицательных бактерий; Б — у грамположительных бактерий; В — у *Vibrio harvey*.

Объяснение в тексте.

цессингу, а затем секретируется в окружающую среду с помощью ABC-транспортера (см. II том учебника). На эти индукторы реагирует двухкомпонентная сигнальная система.

У патогенной бактерии *S. pneumoniae* роль автоиндуктора выполняет *сигнальный пептид компетентности* (англ. competence signaling peptide, CSP). Он имеет размер ~17 а.о. и образуется в результате посттрансляционного процессинга полипептида-предшественника ComC (сокр. англ. competence).

CSP экспортируется с помощью секреторного аппарата ComAB, накапливается во внеклеточной среде, связывается с рецептором ComD и при посредстве гистидинкиназы ComE активирует регулон компетентности *com*.

Продуктом этого регулона является альтернативный сигма-фактор ComX, который, в свою очередь, активирует > 100 генов. «Ранние» гены *comABCDE* отвечают за синтез CSP, в то время как «поздние» гены отвечают за образование биопленок, а также кодируют автолизин и бактериоцины. Эти ферменты вызывают лизис субпопуляции клеток с высвобождением их ДНК, которая затем поглощается незелизовавшимися компетентными клетками.

Возможно и одновременное использование сразу двух пептидных автоиндукторов. Например, *B. subtilis* образует автоиндукторы ComX и CSF (сокр. англ. competence and sporulation factor). При посредстве гистидинкиназы ComP они регулируют активность транскрипционного фактора ComA (не путать с субъединицей транспортера ComAB у *S. pneumoniae*), отвечающего за чувство кворума и приобретение компетентности. В то время как автоиндуктор ComX в основном обеспечивает чувство кворума, автоиндуктор CSF, в зависимости от его концентрации, активирует или подавляет ComA, а также стимулирует споруляцию.

QS-система третьего типа имеется у светящейся бактерии *Vibrio harvey* (рис. 269, В). В ней одновременно участвуют два разных автоиндуктора. Как и другие грамотрицательные бактерии, *V. harvey* образует автоиндуктор AI-1, однако он распознается не однокомпонентной, а двухкомпонентной сигнальной системой — как у грамположительных бактерий. Второй автоиндуктор, AI-2 образуют очень многие грамотрицательные и грамположительные бактерии, используя при этом тиагогидролазу LuxS. Стандартная химическая структура данного автоиндуктора позволяет предположить, что он играет роль «универсального» сигнала при межклеточном общении бактерий, принадлежащих к разным видам. Автоиндуктор AI-2 диффундирует в окружающую среду, а затем в виде комплекса с периплазматическим связывающим белком LuxP распознается двухкомпонентной сигнальной системой. Сигналы, поступающие от независимых двухкомпонентных систем, специфичных по отношению к автоиндукторам AI-1 и AI-2, интегрируются с помощью фосфореде LuxU/LuxO, и таким путем контролируется экспрессия генов оперона люциферазы *lux* (см. II том учебника).

Биосинтез автоиндукторов AI-1 и AI-2 (рис. 270). Большинство автоиндукторов представляет собой AHL; они обладают гидрофобными свойствами и покидают клетку путем простой диффузии. В то же время, для экскреции гидрофильных автоиндукторов олигопептидной природы используются специальные системы экспорта.

Исходным материалом при синтезе автоиндукторов AI-1 и AI-2 служит S-аденозилметионин (англ. S-adenosylmethionine, SAM; см. рис. 196).

Автоиндуктор AI-1 образуется из SAM за один этап, с помощью синтазы LuxI. Донором жирнокислотного остатка для AHL, как правило, является ацилпереносящий белок. В качестве побочного продукта образуется токсичный метилтиоаденозин

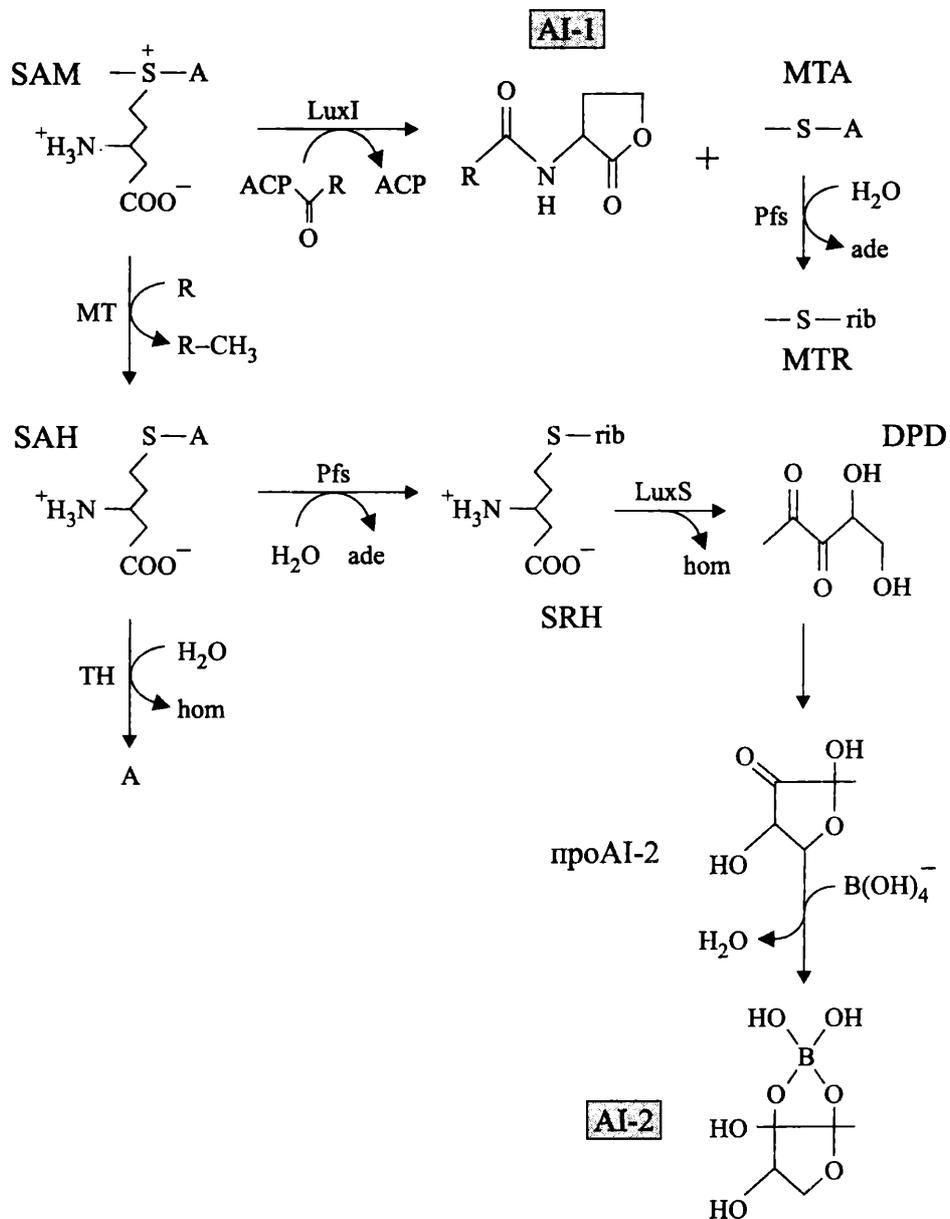


Рис. 270. Биосинтез аутоиндукторов AI-1 и AI-2.

SAM — S-аденозилметионин; LuxI — синтаза; ACP — ацилпереносящий белок; MTA — метилтиоаденозин; Pfs — нуклеозидаза; ade — аденин; MTR — метилтиорибоза; MT — метилтрансфераза; SAH — S-аденозилгомоцистеин; TH — тиогидролаза; A — аденозин; hom — гоцистеин; SRH — S-рибозилгомоцистеин; LuxS — гидролаза; DPD — 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион.

(англ. methylthioadenosine, MTA), который гидролизуется 5'-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин-нуклеозидазой Pfs с образованием аденина и метилтиорибозы (англ. methylthioribose, MTR).

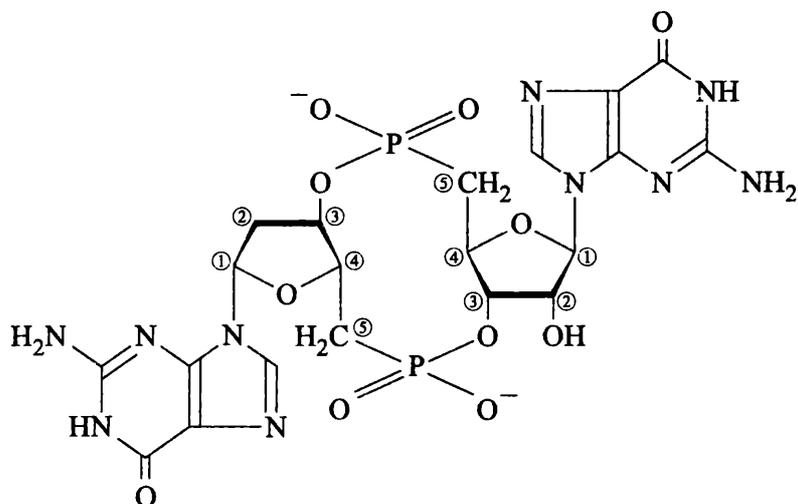


Рис. 271. Бис-(3'-5')-цикло-ди-ГМФ (циклический ди-ГМФ).

Автоиндуктор AI-2 образуется из SAM в пять этапов. Напомним, что SAM используется в качестве универсального донора метильной группы при модификации нуклеиновых кислот и белков (см. разделы 16.5.2 и 18.4.1.1). Под воздействием метилтрансферазы он превращается в токсичный интермедиат S-аденозилгомоцистеин (англ. S-adenosylhomocysteine, SAH), который расщепляется тиагидролазой с образованием аденозина и гомоцистеина. Другим путем детоксикации SAH и, одновременно с этим, вторым этапом на пути синтеза автоиндуктора становится гидролиз нуклеозидазой Pfs с образованием аденина и S-рибозилгомоцистеина (англ. S-ribosylhomocysteine, SRH). На третьем этапе SRH расщепляется тиагидролазой LuxS на гомоцистеин и рибозильную часть, преобразованную в 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион (англ. 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD). Ациклический DPD нестабилен и спонтанно циклизуется с образованием смеси фуранозных продуктов, одним из которых и является проAI-2. На завершающем этапе проAI-2 взаимодействует с тетрагидроксидом бора с образованием фуранозилборатного диэфира; неизвестно, происходит эта реакция спонтанно, или она катализируется белком LuxP.

Связь сигналинга посредством автоиндукторов с сигналингом посредством цикло-ди-ГМФ. Как правило, QS-системы действуют совместно с альтернативными сигма-факторами (в частности, это происходит при переходе *E. coli* к стационарной фазе), а также совместно с глобальными транскрипционными факторами. Наряду с автоиндукторами могут также использоваться другие сигнальные молекулы — циклические нуклеотиды.

У фитопатогена *Xanthomonas campestris* восприятие автоиндуктора, цис-11-метил-2-додеценовой кислоты осуществляется двухкомпонентной сигнальной системой RpfC/RpfG и сопровождается гидролизом цикло-ди-ГМФ.

Бис-(3'-5')-цикло-ди-ГМФ, или цикло-ди-ГМФ (рис. 271) был впервые описан Бензименом (M. Benziman) в 1987 г. в качестве аллостерического регулятора синтазы целлюлозы у *Gluconacetobacter xylinum*. Позднее было выяснено, что белок PleD, обладающий гуанилатциклазной активностью, активируется при переходе швермеров *Caulobacter crescentus* к сидячему образу жизни (см. раздел 17.1.4).

В настоящее время общепризнанно, что у бактерий цикло-ди-ГМФ — это крайне важная и практически универсально распространенная сигнальная молекула, которая контролирует на уровне транскрипции такие функции, как клеточная дифференциация, агрегация и адгезия, а также образование биопленок и вирулентность.

Содержание цикло-ди-ГМФ определяется соотношением скоростей образования и распада этого соединения под воздействием, соответственно, дигуанилатциклазы и фосфодиэстеразы. Белки, проявляющие обе активности, обладают консервативными доменами GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe), EAL (Glu-Ala-Leu) и HD/GYP (His-Asp/Gly-Tyr-Pro). Большинство из них также содержит сенсорный модуль с PAS-доменом, благодаря чему они сопрягают внешние стимулы с ответом на транскрипционном или физиологическом уровне, а в качестве аллостерического регулятора используется цикло-ди-ГМФ.

* * *

На этом мы заканчиваем главу, посвященную регуляции, хотя не окончательно расстаемся с этой многогранной темой. В дальнейшем, говоря об экологических стрессах, симбиозах и популяционных явлениях, мы будем неоднократно возвращаться к вопросам регуляции метаболизма и поведения.

ГЛАВА 19

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ СТРЕССЫ

Hardly any question in Natural History is more vague and difficult to decide than what forms within any large group ought to be considered as the highest; for all are excellently adapted to their conditions of life.

(В Естественной Истории вряд ли найдется более туманный и сложный вопрос, чем тот, какую форму в любой крупной группе считать самой совершенной, ибо все они превосходно адаптированы к условиям существования).

C. Darwin. On the Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids are Fertilised by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing (London, 1862).

Прокариоты довольно часто попадают в неблагоприятные условия окружающей среды, которые создаются либо постепенно, либо очень быстро. В обоих случаях экстремальное воздействие абиотических факторов вызывает *экологический стресс* (англ. environmental stress — стресс, вызванный окружающей средой) с адаптационным ответом, зависящим от типа и интенсивности стрессора.

Микробиологический термин «экологический стресс» обычно заменяют его усе-ченным вариантом — «стресс», хотя он калькирует термин, используемый в физиологии животных и медицине.

Классический термин «стресс» (англ. stress — нажим), предложенный в середине 1930-х гг. канадским физиологом Хансом Селье (H.Selye), означает состояние неспецифического напряжения в животном организме, выражающееся в морфофизиологических изменениях ряда органов, особенно эндокринных желез, которые находятся под контролем гипофиза. Комплекс таких изменений носит характер «генерализованного адаптационного синдрома», состоящего из трех последовательных стадий: стадии *тревоги*, стадии *резистентности* и стадии *истощения*. Например, при продолжительном воздействии такого стрессора, как холод, в цитоплазме клеток коры надпочечников уменьшается, затем резко увеличивается, а потом опять убывает пул предшественников стероидных гормонов.

Специфика стресса у прокариотов. Широкое распространение и произвольное истолкование термина «стресс» привело к размыванию его первоначального смысла, и он стал применяться по отношению к любым организмам, подвергнутым экстремальному воздействию. В бактериологии термин «стресс» впервые прозвучал

в середине 1970-х гг. — вопреки очевидному соображению, что адаптацию у прокариотов нельзя описывать категориями, отражающими адаптационные процессы в животном организме с его сложной тканево/органный структурой и нейрогуморальной регуляцией. Тем не менее, использование термина «стресс» по отношению к прокариотам в какой-то мере оправданно. Особенно это касается тех случаев, когда реакция на разные стрессоры носит неспецифический и генерализированный характер (примерами служат ответы, которые контролируются регулонами RpoS, SOS, Hsp и GSP; см. разделы 18.1.2 и 18.1.3). Они связаны с приобретением неспецифической резистентности к разнообразным повреждающим факторам за счет индукции регулонов и стимулонов, отвечающих за ответы на воздействие специфических стрессоров.

Одновременно с неудачно позаимствованным термином «стресс» и в качестве его синонима бактериологи стали использовать менее конкретный термин «шок» (англ. shock — букв. удар; *шок как физиологическое состояние*), которым в физиологии животных обозначается общая реакция организма на экстремальное внешнее воздействие.

В дальнейшем мы будем пользоваться обоими терминами, следуя предпочтениям, сложившимся в научной литературе.

Опираясь на сведения о регуляторных системах, приведенные в предыдущей главе, мы рассмотрим особенности ответа, когда — в зависимости от типа и интенсивности стрессора — он осуществляется на (пост)транскрипционном, метаболическом или поведенческом уровне.

Классификация стрессов у прокариотов. Хотя общепринятой непротиворечивой классификации стрессов у прокариотов не существует, их можно подразделить на две основные группы:

— *цитоплазматические стрессы*, когда стрессор влияет на процессы в цитоплазматическом компартменте;

— *периплазматический стресс*, когда мишенью для стрессора служит периплазматический компартмент, а также ограничивающие его слои клеточной оболочки (СМ и ОМ; см. I том учебника).

В свою очередь, к цитоплазматическим стрессам относятся:

— «общие» стрессы (вызывающие SOS- или RpoS-ответ);

— «частные» *физические стрессы* (термические стрессы; водный, осмотический, гидростатический и радиационный стрессы);

— «частные» *химические стрессы* (окислительный стресс и рН-стресс, токсический шок).

Следует иметь в виду, что разные стрессоры могут воздействовать на одну и ту же мишень, а один и тот же стрессор — на разные мишени, причем ответы при стрессах могут перекрываться. Кроме того, в природных нишах бактерии, как правило, сталкиваются с несколькими стрессорами, действующими одновременно или один за другим; в этом случае вместо *моностресса* происходит *мультистресс* (например, холодовой шок часто сочетается с окислительным стрессом и т. д.).

19.1. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ СТРЕССЫ

Хотя при цитоплазматических стрессах мишенью для стрессора служат «интимные» внутренние структуры, характер адаптационного ответа, или его цена, выражающаяся в количестве активируемых и репрессируемых генов, может существенно различаться.

Стрессы, вызывающие SOS-ответ или RpoS-ответ, непосредственно связаны с изменением состояния незаменимых информационных систем — в первую очередь, репликационных, транскрипционных и трансляционных. Неудивительно, что адаптационные ответы при таких общих стрессах контролируются на уровне регулонов, содержащих множество генов и оперонов. Кроме того, ответы при общих стрессах взаимодействуют с ответами при частных стрессах.

Про RpoS-ответ мы уже говорили в разделе 18.1.2, а SOS-ответ обсуждался дважды — в разделе 16.5.1.4 (содержащем сведения о рекомбинационной репарации) и разделе 18.1.2 (посвященном регулонам). Поэтому мы не станем возвращаться к этим «общим» стрессам, а перейдем к «частным» физическим стрессам, которые могут быть *термическими* (тепловой шок и холодовой шок) и *нетермическими* (водный, осмотический, гидростатический и радиационный стрессы).

19.1.1. Термические стрессы

Температура является глобальным физическим фактором, который оказывает множественное и неоднозначное воздействие на живые системы. С ростом температуры увеличивается текучесть липидного слоя (что повышает проницаемость мембран и вносит хаос во взаимодействие мембранных белков); дестабилизируется вторичная структура ДНК и РНК; нарушается правильная укладка полипептидных цепей и т. д. В свою очередь, при понижении температуры в липидном слое образуются кристаллические домены (что приводит к сегрегации мембранных белковых комплексов); стабилизируется вторичная структура ДНК и РНК (что снижает эффективность репликации, транскрипции и трансляции); уменьшается кинетическая активность ферментов и переносчиков и т. д.

При физиологических температурах мембраны поддерживаются в жидкостно-кристаллическом состоянии с помощью механизма *гомеовязкостной адаптации*, т. е. путем варьирования жирнокислотного состава фосфолипидов (см. I том учебника). В свою очередь, термоадаптация (не)ферментативных белков зависит от их устойчивости к денатурации. Кроме того, термоадаптация связана с общим паттерном трансляции, а также с адаптивным синтезом специфических белков, соответственно, белков теплового и холодowego шока. Наконец, термоадаптация достигается специфическим путем с помощью систем, обеспечивающих ответы при других стрессах.

В зависимости от способности расти при низкой температуре, прокариоты подразделяются на *психрофилов* (оптимальная температура роста $< 15^{\circ}\text{C}$, максимальная $< 20^{\circ}\text{C}$) и холодоустойчивых *психротрофов* (максимальная температура роста $20\text{--}40^{\circ}\text{C}$); те и другие могут расти при 0°C , а в отдельных случаях даже при -12°C . Рост при умеренной температуре характерен для *мезофилов* ($10\text{--}50^{\circ}\text{C}$). Наконец, адаптированные к высокой температуре прокариоты подразделяются на *термофилов* (оптимум роста при $\sim 60^{\circ}\text{C}$), *экстремальных термофилов* ($\sim 80^{\circ}\text{C}$) и *гипертермофилов* ($\sim 100^{\circ}\text{C}$).

Тепловой шок. Повышение температуры (например, в полностью перемешиваемых полимиктических водоемах) вызывает тепловой шок. На стратегии и тактике соответствующего адаптационного ответа мы уже останавливались в I томе учебника, а также в разделе 18.1.2 настоящего тома, где, в частности, шла речь о регулоне Hsp. К ранее сказанному добавим, что ответ при тепловом шоке может перекрываться с ответами, свойственными для других стрессов. В качестве примера назовем гипертермофильных архей.

У гипертермофильных архей ответ при тепловом шоке имеет ряд специфических особенностей. Прежде всего, у них отсутствуют «канонические» шапероны DnaJ/DnaK/GrpE. Кроме того, их главный шаперонин, или *термосома* (Hsp70) характеризуется более высоким уровнем гомологии с эукариотным шаперонином TF55/ССТ, чем с бактериальным шаперонином GroEL/GroES. Наконец, у них отсутствуют АТФ-зависимые протеазы ClpA и HflB (FtsH), а протеаза Lon сильно модифицирована. Тем не менее, АТФ-зависимый протеолиз у архей протекает без участия «эукариотного» убиквитина и контролируется непосредственно на уровне активности фермента. Другой особенностью ответа гипертермофилов служит образование уникальных осмопротекторов (см. раздел 19.1.3). Например, у *Pyrococcus furiosus* концентрация ди-миоинозитол-1,1'-фосфата возрастает в 20 раз при увеличении температуры с 95° до 101°С, т. е. это в большей степени термопротектор, чем осмопротектор. Считается, что осмопротекторы гипертермофилов придают клеткам дополнительную устойчивость при высокой температуре.

Холодовой шок. Понижение температуры вызывает холодовой шок, например, при выходе *E. coli* из пищеварительного тракта или при искусственном охлаждении продуктов питания (в случае психротрофного патогена *Listeria monocytogenes*). Ответ на охлаждение достигается за счет поддержки отрицательной суперспирализации ДНК и процессивной структуры мРНК; посредством гомеовязкостной адаптации; путем поддержания нативного состояния макромолекул и их комплексов; с помощью эндогенных или экзогенных осмопротекторов, а также благодаря синтезу белков холодового шока.

В ходе адаптационного ответа начинают синтезироваться *холод-индуцированные белки* (англ. cold-induced protein, CIP), тогда как выработка большинства других белков подавляется. Набор CIP различается у отдельных бактерий (*L. monocytogenes* — 12; *E. coli* — 18; *Lactobacillus lactis* — 22; *B. subtilis* — 37 вариантов), и они подразделяются на две группы.

Белки первой группы, или *белки холодового шока* (англ. cold-shock protein; Csp) практически не синтезируются при оптимальной температуре, однако при холодовом шоке их выход составляет >10% объема трансляции (до 10⁶ молекул на клетку).

Белки второй группы относятся к числу конститутивных; при холодовом шоке их синтез усиливается меньше, чем на порядок, т. е. не столь драматически. К их числу относятся: ДНК-изгибающий белок H-NS; ДНК-гираза GyrA; фактор рекомбинации RecA; факторы инициации и терминации транскрипции IF-2 и NusA; рибонуклеаза PNP (участвующая в деградации мРНК); фактор RbfA (связывающийся с 30S-субъединицей рибосомы) и ряд других.

Белки холодового шока у бактерий. Гены белков холодового шока имеются у многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, хотя они распространены не универсально (например, их нет у *Helicobacter pylori* и *Mycoplasma genitalium*). В случае *E. coli* семейство Csp состоит из девяти взаимно гомологичных белков CspA-I; гены четырех из них (*cspA*, *cspB*, *cspG* и *cspI*) индуцируются при холодовом шоке, но регулируются порознь. Остальные гены экспрессируются либо конститутивно, либо только при голодании (*cspD*).

Csp представляют собой небольшие (~7 кДа) анионные белки, состоящие из пяти антипараллельных β-цепей, образующих бочковидную структуру. Характерной особенностью *cspA*-мРНК служит необычно длинный 5'-концевой нетранслируемый участок (5'-UTR), содержащий высококонсервативную последовательность из 11 нуклеотидов, или *холодовой бокс* (англ. cold box). Кроме того, *cspA*-мРНК крайне нестабильна — при оптимальной температуре роста время ее «полужизни» составляет 12 с. При холодовом шоке оно увеличивается до 20 мин за счет стабильной вторичной структуры 5'-UTR.

Считается, что роль сенсоров при холодовом шоке (так же, как и при тепловом шоке) играют рибосомы, которые до момента полной адаптации транслируют только *csp*-мРНК. Холодовой бокс служит сайтом торможения транскрипции, однако при холодовом шоке РНК-полимераза каким-то образом его обходит. Синтез *csp*-мРНК стимулируется за счет расположенного рядом с ее геном особого *downstream*-бокса (DB), который способствует инициации транскрипции, связываясь с 16S рРНК. Перепроизводство белка CspA предотвращается им самим с помощью механизма аттенуации (см. раздел 16.7.1.3).

Белки CspA (*E. coli*) и CspB (*B. subtilis*) содержат высококонсервативные последовательности, позволяющие связываться с разнообразными мРНК. Предполагается, что они играют роль шаперонов для мРНК и устраняют неправильный фолдинг полинуклеотидной цепи в виде дополнительных спаренных участков вторичной структуры, возникающих при понижении температуры. При связывании мРНК с белками Csp она «выпрямляется», что способствует инициации трансляции. Хотя при охлаждении значительная часть рибосом диссоциирует на субъединицы, неповрежденные рибосомы транслируют *csp*-мРНК, а остальные реконструируются с помощью фактора RbfA (см. выше).

Белки холодового шока у архей. В большинстве секвенированных геномов архей, в особенности (гипер)термофилов, гомологи генов *csp* не обнаружены. В то же время, благодаря растущему интересу к археям, адаптированным к существованию в низкотемпературных нишах, удалось выявить несколько форм, синтезирующих Csp-белки, которые гомологичны бактериальным Csp-белкам. Из представителей фило I *Crenarchaeota* это *Crenarchaeum symbiosum*; среди представителей фило II *Euryarchaeota* — *стенотсихрофил* (от греч. *stenos* — узкий; *m. e. ограниченно приспособленный к росту при низкой температуре*) *Methanogenium frigidum*, температурный максимум роста которого равен 18°C, а также мезофилы *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium* sp. NRC-1 и *Haloferax volcanii*.

19.1.2. Водный стресс

Водный стресс, или *стресс, вызванный водным матриксом* (англ. water matrix stress) происходит при высушивании вегетативных клеток в атмосферном воздухе с потерей до 99% воды. Способность в вегетативном состоянии переносить водный стресс особо важна для обитателей засохшей или аридной почвы, в частности для *Deinococcus radiodurans* и *Nostoc* spp. Она также имеет исключительно важное эпидемиологическое значение; примерами служат возбудители госпитальных инфекций *Acinetobacter baumannii* и *Burkholderia cenocepacia*, а также *Mycobacterium tuberculosis*, до 120 суток не теряющая жизнеспособности в сухой пыли.

Выдерживать почти полное обезвоживание способны *ангидробионты* (англ. anhydrobiote) из числа растений и животных; наиболее известны «воскресающее» плауновидное *Selaginella lepidophylla*, почвенная нематода *Ditylenchus dipsaci*, тихоходка *Adoribiotus coronifer* и галофильный рачок *Artemia salina*. Кроме того, способность сохраняться на воздухе присуща специализированным покоящимся онтогенетическим стадиям микро- и макроорганизмов — например, макроцистам миксомицета *Dictyostelium* sp., а также спорам и семенам растений или эндоспорам и цистам прокариотов (в двух последних случаях содержание воды составляет, соответственно, 28–50% и 60%, так что к ангидробионтным формам эти дифференцированные клетки не относятся).

Остаточных ~10% воды при глубоком обезвоживании недостаточно для образования сольватной оболочки (например, при нормальной гидратации, когда содержание воды в цитоплазме составляет ~70%, на молекулу фосфолипида приходится 10–12 молекул воды), что делает невозможным ферментативные реакции и, соответственно, клеточный рост. Дело в том, что из-за уменьшения степени гидратации изменяется конформация ферментов в составе электрон-транспортных цепей и ферментов конструктивного метаболизма; от этого и из-за накопления свободных радикалов вышеуказанные белки денатурируются. Обезвоживание вызывает мутационные повреждения ДНК в результате окисления, алкилирования, образования поперечных сшивок и депуринизации. Наконец, при удалении воды возрастает плотность упаковки мембранных липидов, что усиливает ван-дер-ваальсово взаимодействие их боковых цепей и повышает температуру фазового перехода мембраны — из жидкостно-кристаллического состояния она переходит в гель, что нарушает ее нормальные функции, в частности избирательную проницаемость.

Ответ при водном стрессе перекрывается с ответом при осмотическом шоке и голодании, поскольку их регуляцию обеспечивают альтернативные сигма-факторы (в частности, σ^S *E. coli* и σ^B *B. subtilis*).

Характерным элементом ответа при водном стрессе служит накопление до 20% дисахаридов — сахарозы и, особенно, трегалозы (см. раздел 18.1.2 и рис. 272). Гены, кодирующие синтазу трегалозы OtsBA, контролируются мастер-регулятором RpoS (σ^S). В отличие от редуцирующих сахаров, трегалоза не вступает в реакцию Меллара (L.-C. Maillard), которая происходит между альдегидными группами и первичными аминами нуклеиновых кислот или аминоклассами белков с образованием шиффова основания, последующие перестройки которого приводят к деградации белков до меланоидных продуктов. Кроме того, трегалоза образует аморфные «стекла», в которых иммобилизуются белки и другие макромолекулы, что сохраняет их в нативной конформации. Наконец, вместо воды трегалоза вступает в водородные связи с мембранными липидами, что поддерживает их в жидкостно-кристаллическом состоянии.

При водном стрессе клетка теряет воду; сходный процесс происходит при гипосмотическом шоке (см. ниже), однако это разные формы стресса. В первом случае клетка окружена атмосферным воздухом, а во втором случае находится в водном растворе, хотя и при пониженном химическом потенциале воды. Тем не менее, гипосмотический шок можно рассматривать как начальную стадию водного стресса.

19.1.3. Осмотический шок

Поскольку биомембраны пропускают воду, но задерживают осмотически активные вещества, цитоплазма прокариотной клетки чаще всего гиперосмотична, что обеспечивает нормальный тургор, необходимый для роста и деления; реже она находится в изоосмотическом состоянии с окружающей средой.

При добавлении водорастворимого вещества к химически чистой воде оно замещает ее молекулы, т. е. уменьшает молярную долю воды (N_W) в системе. В свою очередь, от молярной доли воды

зависит ее химический потенциал (μ_w) и такая термодинамическая величина, как активность воды (a_w), приблизительно соответствующая относительной влажности. Наконец, с активностью воды связано осмотическое давление (Π):

$$\Pi \sim -RT \ln a_w.$$

При гипосмотическом шоке присутствие в цитоплазме «непроникающих» осмолитиков (осмотически активных веществ) вызывает поступление воды в клетку. При гиперосмотическом шоке бактерии находятся в растворе осмолитика, который не может проникнуть в цитоплазму; в соответствии с донновым равновесием, вода выходит из клетки до тех пор, пока не сравняются ее активности в двух компартментах — цитоплазматическом и экзоплазматическом. В конечном счете, баланс между внутренним и внешним осмотическим давлением зависит от пула осмолитиков эндогенной или экзогенной природы.

При резком повышении осмомолярности наружной среды через несколько миллисекунд вода начинает перемещаться по осмотическому градиенту, что приводит к уменьшению тургора, а затем к плазмолизу (уменьшению объема цитоплазмы); последствием этих изменений становится гиперосмотический шок. В свою очередь, резкое снижение осмомолярности, обычно из-за опреснения, вызывает такие проявления гипосмотического шока, как повышение тургора и растяжение СМ.

Гиперосмотический шок. Гиперосмотический шок связан с пребыванием в среде с высоким осмотическим давлением, обычно за счет присутствия соли в высокой концентрации.

Различают организмы, временно испытывающие гиперосмотический шок, и организмы, постоянно адаптированные к среде с высокой соленостью. Во втором случае речь идет о галотолерантных формах, а также о галофилах, которые оптимально растут в данных условиях. Галофилы подразделяются на экстремальных (20–30% соли, обычно NaCl), умеренных (5–20%) и слабых (2–5%). К числу экстремальных галофилов относятся археи из класса *Halobacteria* и из семейства *Methanosarcinaceae*, а также бактерии *Ectothiorhodospira halochloris* и *Actinopolyspora halophila*. Отдельный случай — это облигатные экстремальные галофилы, которые лизируются при понижении концентрации соли.

Адаптация при осмотическом шоке достигается на конститутивном уровне, когда клетки содержат белки с высоким относительным содержанием анионных аминокислот, а также на индуцибельном уровне, путем создания осмотического баланса между клеткой и окружающей средой.

При гиперосмотическом шоке используются две стратегии осмоадаптации. Первая, которая образно называется «соль в цитоплазме» (англ. salt-in-cytoplasm; salt inside), заключается в том, чтобы компенсировать наружное осмотическое давление за счет импорта ионов K^+ и Cl^- до равновесной концентрации с ионами Na^+ и Cl^- (или HCO_3^-) в окружающей среде. Она свойственна только трем группам облигатных экстремальных галофилов — археям из класса *Halobacteria*, археям из семейства *Methanosarcinaceae* и бактериям из семейства *Haloanaerobiaceae*. В данном случае оболочка клетки и содержимое цитоплазматического компартмента стабильны только в среде с высоким осмотическим давлением, и поэтому при гипосмотическом шоке адаптация невозможна.

Вторая стратегия, под образным названием «соль снаружи» (англ. salt-out), заключается в том, чтобы не дать соли проникнуть в цитоплазму; при этом осмотический баланс поддерживается за счет накопления органических осмолитиков, которые клетка синтезирует самостоятельно или импортирует из окружающей среды. К данной стратегии прибегает большинство прокариотов. Адаптивный ответ, наиболее изученный на примере *E. coli*, протекает в две фазы.

В первой фазе проникшие в цитоплазму ионы Na^+ быстро удаляются Na^+/H^+ -антипортером, и взамен них при помощи высокоаффинного транспортера KdpA по-

глощаются катионы K^+ . Индукция гена *kdpA*, входящего в состав оперона *kdpFABC*, происходит под воздействием транскрипционного фактора KdpE из двухкомпонентной сигнальной системы KdpD/KdpE. Сенсор KdpD реагирует на сигнал о повышении наружной осмолярности. Его природа не выяснена; теоретически, это могут быть тургор, эластическое состояние СМ, внутренняя/наружная осмолярность или ионная сила, концентрация специфических растворенных веществ и т. д. Накопление катионов K^+ в цитоплазме компенсируется усиленным синтезом противоиона — глутамата.

Во второй фазе ответа синтезируются или импортируются органические осмолитики, или *осмопротекторы* (англ. osmoprotector). Поскольку их присутствие в цитоплазме даже в высокой концентрации не вредит жизнедеятельности, они имеют второе название — *биосовместимые растворенные вещества* (англ. compatible solutes). Сведения о распространении осмопротекторов у прокариотов представлены в таблице 33.

Таблица 33. Распространение осмопротекторов у прокариотов

Фила	Осмопротектор					
	Глицин-бетаин	Глутамат	Глюкозил-глицерол	Пролин	Трегалоза	Эктоин
АII <i>Euryarchaeota</i>	+	+	—	—	—	—
ВХ <i>Cyanobacteria</i>	+	—	+	—	+	—
ВХII <i>Proteobacteria</i>	+	+	—	+	+	+
ВХIII <i>Firmicutes</i>	+	+	—	+	+	+
ВХIV <i>Actinobacteria</i>	—	+	—	+	+	+

Примечание: данные по другим филам отсутствуют.

Осмопротекторы бактерий (рис. 272). Бактериальные осмопротекторы образуют узкую группу аминокислот, сахаров и полиолов, а также их производных. Они электронейтральны и представляют собой либо незаряженные молекулы, либо цвиттерионы. Среди них наиболее известны *глицинбетаин* (N-карбоксиметил-N,N,N-триметиламин), *глутамат*, *глюкозилглицерол*, *пролин*, *трегалоза* (1-О- α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид) и *эктоин* (2-метил-1,2,5,6-тетрагидропиридин-4-карбоновая кислота).

Осмопротекторы архей (рис. 273). Хотя осмопротекторы архей по структуре напоминают осмопротекторы бактерий, большинство из них несет отрицательный заряд, что связано с присутствием карбоксильных, фосфорильных или сульфонильных групп; предполагается, что это позволяет компенсировать заряд катионов K^+ , которых обычно много в цитоплазме архей. К ним относятся *циклический 2,3-бисфосфоглицерат*, *маннозилглицерат*, *диглицеролфосфат* и *ди-миоинозитол-1,1'-фосфат* (последний также накапливается при тепловом шоке; см. выше). Трегалоза, тривиальный осмопротектор мезофильных бактерий, у архей встречается крайне редко; примерами служат *Pyrobaculum aerophilum* и *Thermoproteus tenax*.

Механизм действия осмопротекторов и способы их накопления. Осмотическое давление, создаваемое осмопротекторами, уравнивает осмотическое давление окружающей среды и способствует тургору. Кроме того, осмопротекторы защищают внутриклеточные структуры от повреждений, вызываемых изменением ионной силы и активности воды.

Защитная роль осмопротекторов находит объяснение в рамках теории *вытеснения сопутствующего растворенного вещества* (англ. excluded co-solute theory). Согласно ей, в трехкомпонентной

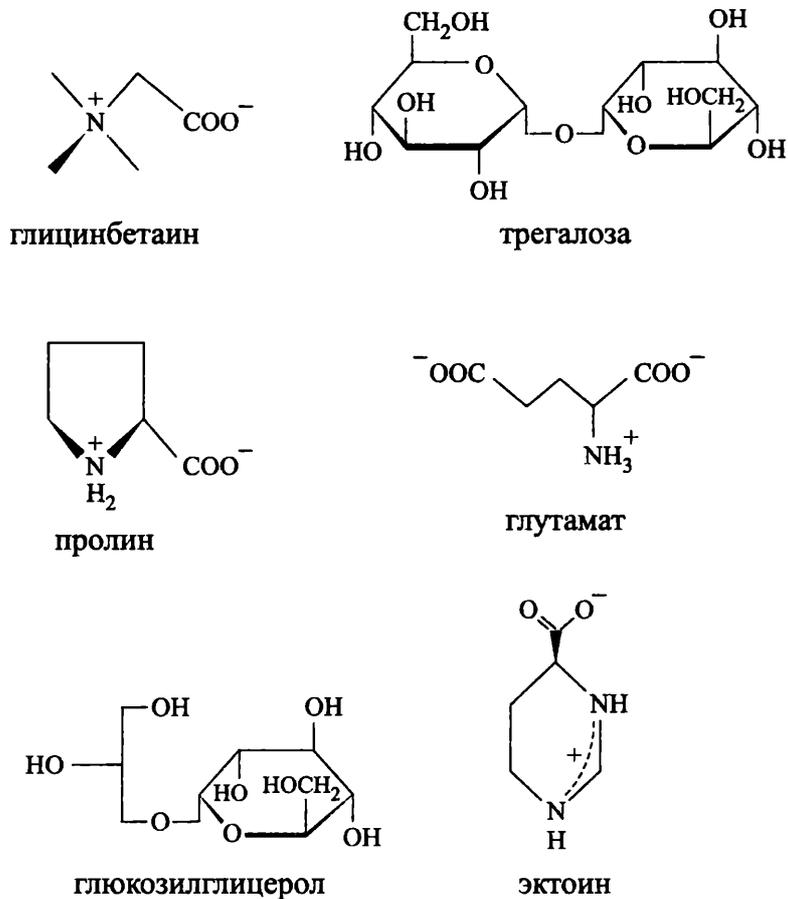


Рис. 272. Осмопротекторы бактерий.

системе «вода/белок/сопутствующее растворенное вещество» последнее оказывает стабилизирующее воздействие на белок, так как держится на некотором удалении от него, обеспечивая его преимущественную гидратацию. Хотя это состояние термодинамически не выгодно, оно может стать еще более невыгодным, если белок изменит свою конформацию, что создаст дополнительные домены для вытеснения сопутствующего растворенного вещества. В итоге система стремится к поддержанию нативного состояния белка. Сопутствующие растворенные вещества подразделяются на *космотропов* (англ. kosmotrope; от греч. kosmos — порядок и trope — изменяться в сторону чего-либо; букв. — стремящиеся к порядку), которые поддерживают структуру сольватной оболочки, и *хаотропов* (англ. chaotrope), которые ее разрушают. Осмопротекторы относятся к космотропам.

Биосинтез осмопротекторов происходит в результате индукции σ^S -зависимых оперонов, в частности оперона *otsBA* (сокр. англ. osmoregulated trehalose synthesis).

Наряду с образованием эндогенных осмопротекторов, бактерии могут импортировать экзогенные осмопротекторы, поступающие в окружающую среду из разрушенных или травмированных клеток других организмов. В частности, основными продуцентами глицинбетаина служат фототрофные бактерии, а хемогетеротрофные бактерии используют чужой глицинбетаин. Известны три системы импорта осмопротекторов — ProP (транспортер пролина *E. coli*), BetP (транспортер глицинбетаина

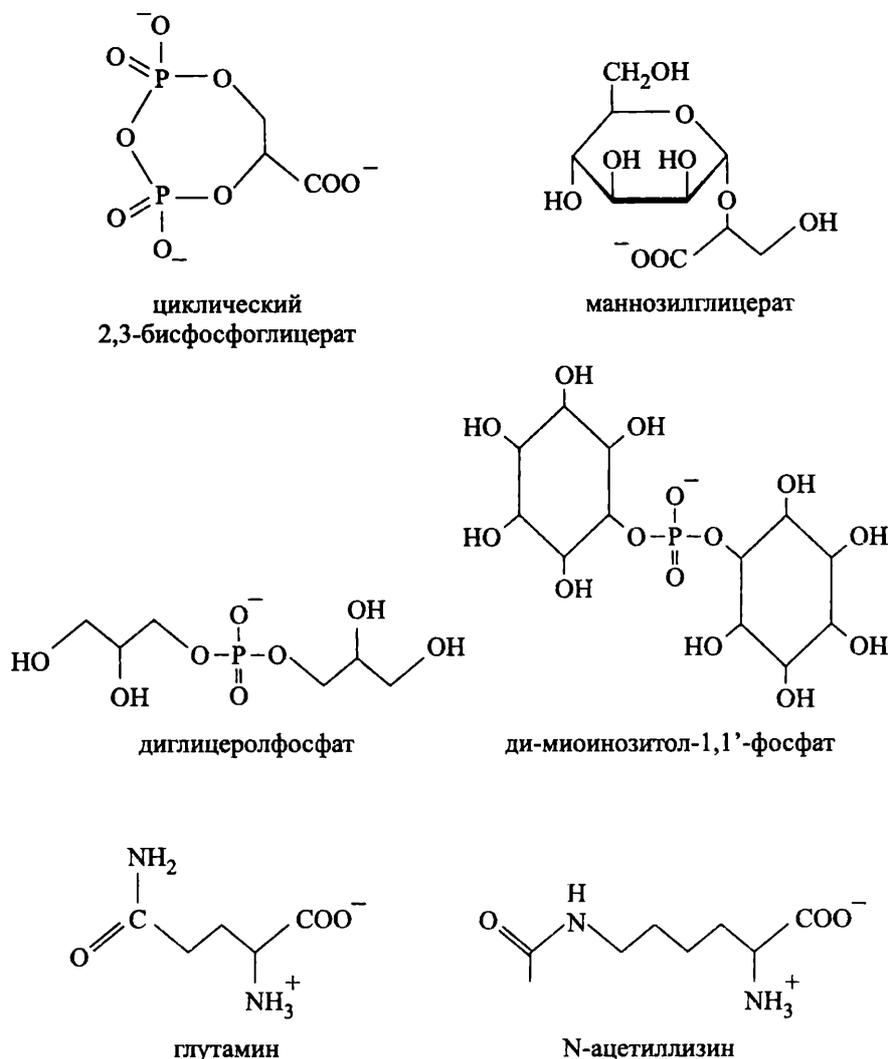


Рис. 273. Осмопротекторы архей.

Corynebacterium glutamicum) и OpuA (транспортер глицинбетаина *Lactococcus lactis*). Помимо роли осморегуляторов, они выполняют роль осмосенсоров.

Для облегчения импорта осмопротекторов преимущественно синтезируются осмопорины большого эксклюзивного диаметра — OmpF.

Тримеры поринов «общего назначения», или осмопоринов OmpC и OmpF образуют гидрофильные каналы в ОМ и участвуют в осмоадаптации, а также обеспечивают устойчивость к токсикантам. OmpF-каналы имеют больший эксклюзивный диаметр.

Тонкий контроль за составом поринов осуществляется на посттранскрипционном уровне с помощью двухкомпонентной сигнальной системы EnvZ/OmpR. Сенсорная гистидинкиназа EnvZ фосфорилирует регулятор OmpR. OmpR~P подавляет транскрипцию гена малой РНК MicC и активирует транскрипцию гена малой РНК MicF (см. раздел 18.2.2). В свою очередь, эти малые РНК негативно контролируют трансляцию мРНК поринов OmpC и OmpF.

Гипоосмотический шок. В природных условиях гипоосмотический шок случается чаще, чем гиперосмотический, и связан с резким опреснением экологической ниши, например, в результате обильных дождей. При снижении внешней осмоларности вода начинает поступать в клетку, что приводит к увеличению объема цитоплазмы и растяжению СМ. В ответ клетка начинает быстро избавляться от осмопротекторов. Предполагается, что центральная роль принадлежит механочувствительным каналам MscLMS (сокр. англ. mechanosensitive channel), соответственно, большого, среднего и малого размера, которые реагируют на растяжение СМ.

Наряду с выводом осмопротекторов из цитоплазмы, грамотрицательные бактерии пускают в ход механизмы адаптации, создающие осмотическую «подушку». В частности, в ОМ начинают доминировать осмопорины меньшего эксклюзивного диаметра — OmpC (см. раздел 18.2.2), что способствует увеличению осмоларности периплазматического компартмента.

Вторым способом повышения осмоларности периплазматического компартмента служит накопление в нем специфических осмопротекторов, молекулы которых не проходят через пориновые каналы. Некоторые из них содержат анионные заместители, благодаря чему могут обеспечивать доннаноно равновесие на уровне ОМ.

В качестве периплазматических осмопротекторов представители филои ВХII *Proteobacteria* используют *осморегулируемые периплазматические глюканы* (англ. osmoregulated periplasmic glucan, OPG). Это линейные разветвленные или циклизированные олигосахариды, состоящие из 5–24 мономеров глюкозы, которые соединены α - или β -гликозидными связями — примером служит 16-мерный циклический β -1,2-глюкан; его синтезируют представители сем. *Rhizobiaceae* (рис. 274).

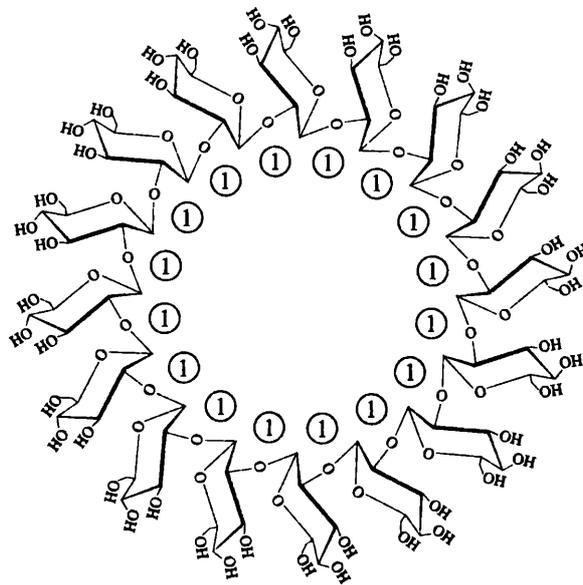


Рис. 274. Осморегулируемый периплазматический 16-мерный глюкан *Rhizobiaceae*. Цифрой 1 обозначены β -1,2-гликозидные связи.

Синтез OPG в клетках *E. coli* осуществляют продукты оперона *mdoGH*. Амфипатическая глюкозилтрансфераза MdoH (97 кДа) образует олигосахарид из УДФ-глюкозы и одновременно экспортирует его в периплазму; периферический белок MdoH (56 кДа), по-видимому, отвечает за синтез разветвленного полимера. В некоторых случаях к боковым мономерам глюкозы дополнительно присоединяется фосфоглицерол — продукт обновления мембранных фосфолипидов; поэтому OPG вначале называли *мембраногенными олигосахаридами* (англ. membrane derived oligosaccharide, MDO). В качестве полярных группировок также используются сукцинилные остатки. Роль трансферазы, соответственно, выполняют амфипатический белок MdoB и интегральный белок MdoC.

Концентрация OPG изменяется в обратной зависимости от осмомолярности наружной среды и лежит в пределах 0,5–5% сухого веса клеток. При гипоосмотическом шоке синтез OPG стимулируется; при повышении наружной осмомолярности они не разрушаются, а распределяются между дочерними клетками до оптимальной концентрации.

19.1.4. Гидростатический стресс

При погружении на каждые 10 м гидростатическое давление увеличивается на 1 атм. В Мировом океане, глубина которого достигает 11 км, оно варьирует в пределах 1–3 порядков. При ~100 атм нарушаются фолдинг белков, экспрессия генов и клеточное деление; под высоким давлением мембраны переходят из жидкостно-кристаллического состояния в состояние геля. Поэтому значительное перемещение в глубину водного столба воспринимается бактериями как стресс и требует от них адаптационного ответа. Гидростатический стресс обычно сопровождается холодовым шоком, поскольку средняя температура в глубине составляет ~5°C (обитатели глубоководных гидротерм, напротив, дополнительно испытывают тепловой шок).

Вертикальное перемещение бактерий происходит по четырем основным причинам: (1) за счет апвеллинга (перемешивания водных слоев); (2) в результате прикрепления к седиментирующим или всплывающим частицам детрита; (3) «на плечах» суточно мигрирующих миктофид (светящиеся анчоусы) или млекопитающих-ныряльщиков (киты); (4) при ассоциации с разными стадиями развития беспозвоночных (криль). Наряду с бактериями, испытывающими стресс при эпизодических перепадах давления, существуют формы, постоянно адаптированные к высокому давлению. Рост *барочувствительных* бактерий снижается по мере увеличения давления от 1 до 400 атм, *баротолерантные* бактерии хорошо растут во всем указанном диапазоне, а для *барофилов* (от греч. *baris* — тяжелый), или *пьезофилов* (от греч. *piezo* — давить) оптимум давления составляет ~400 атм (40 МПа).

Поскольку высокое давление воздействует на мембраны так же, как низкая температура, при гидростатическом стрессе используется механизм гомеовязкостной адаптации, и липиды обогащаются остатками ненасыщенных жирных кислот. Одновременно с этим синтезируется ряд индуцибельных белков, в том числе «барофильных» ферментов. Наконец, накапливаются осмопротекторы (см. раздел 19.1.3), которые оказывают общее стабилизирующее воздействие.

Примером адаптационного ответа на высокое давление служит дифференциальный синтез поринов OmpH и OmpL у *Photobacterium* sp. SS9. При повышении давления от 1 до 300 атм позитивно регулируется промотор гена *ompH*, в результате чего содержание более «пропускного» порина OmpH увеличивается на порядок; напротив, при низком давлении доминирует порин OmpL. Предполагается, что при

низком давлении сенсор ToxR, расположенный в СМ димеризуется и с помощью регулятора ToxS активирует транскрипцию гена *otrL*, одновременно с этим подавляя транскрипцию гена *otrH*. При высоком давлении комплекс ToxR/ToxS распадается, и транскрипция гена *otrH* дерепрессуруется.

19.1.5. Радиационный стресс

Ультрафиолетовое излучение и более коротковолновая ионизирующая радиация вызывают биоповреждения, которые предотвращаются или исправляются адаптивными механизмами.

Важнейшим источником природной радиации служит Солнце, хотя потенциально разрушительна относительно узкая часть солнечного спектра — ультрафиолетовое излучение <400 нм, причем и оно ослабляется озоновым экраном, пылевыми загрязнениями атмосферы, а также облачным покровом. Фоновой природной радиацией являются космические лучи ($3 \cdot 10^{-2}$ рад·год⁻¹) и локальное излучение радионуклидов скальных пород. Суммарная мощность антропогенных источников в десятки раз меньше, хотя в локальных участках она может флуктуировать до очень высоких значений.

Радиационный стресс связан с задержкой роста, в частности, из-за нарушения репликации при повреждении ДНК. В этом случае центральную роль в контроле адаптации играют регулон стационарной фазы RpoS и регулон SOS-ответа (см. разделы 16.5.1.4 и 18.1.2). Основной мишенью для радиационного стрессора служит ДНК. В частности, это касается ультрафиолетового света, спектр действия которого совпадает со спектром поглощения нуклеиновых кислот. В то время как при облучении ультрафиолетовым светом образуются пиримидиновые димеры, которые устраняются с помощью фотореактивации (см. раздел 16.5.1.1), под воздействием ионизирующей радиации образуются двухцепочечные разрывы ДНК и свободные радикалы, вызывающие химическую модификацию азотистых оснований и сахарофосфатного скелета. Для исправления таких глубоких дефектов используются специальные репарационные системы, удаляющие поврежденный участок ДНК (см. разделы 16.5.1.2 и 16.5.1.4).

Чемпионом по эффективности репарационных систем является радиоустойчивая бактерия *Deinococcus radiodurans*, которая сохраняет жизнеспособность при дозе ультрафиолетового излучения до 500 Дж·м⁻² или гамма-излучения до $1,5 \cdot 10^4$ Гр, что почти на два порядка выше дозы, смертельной для большинства бактерий, в частности *E. coli*. В последнее время установлено, что в плане радиоустойчивости *D. radiodurans* не уникален; подобным свойством обладают, например, актинобактерия *Rubrobacter radiotolerans* и археот *Thermococcus gammatolerans*.

Вышеуказанные дозы радиации вызывают множественные (до нескольких сотен), трудно репарируемые двухцепочечные разрывы ДНК. Однако *D. radiodurans* справляется с этой проблемой благодаря мультикопийности ($n=10$) обеих хромосом, а также с помощью комплекса высокоэффективных репарационных систем.

Мощные источники излучения не встречаются в природных нишах, и можно предположить, что высокая радиоустойчивость является побочным проявлением повышенной способности противостоять другим стрессорам, которые, как и радиация, повреждают ДНК. В частности *D. radiodurans* способен на протяжении 2 лет переносить водный стресс (при относительной влажности 5%), а также холодовой шок.

19.1.6. Окислительный стресс

Молекулярный кислород является одним из важнейших абиотических факторов. Его роль неоднозначна и может быть как позитивной, так и негативной; во втором случае это существование не благодаря кислороду, а вопреки нему.

Напомним о важнейших функциях кислорода в живых системах.

Акцептор электронов для дыхательной цепи. Аэробно дышащие, а также факультативно анаэробные бактерии и археи используют кислород в качестве терминального акцептора электронов для дыхательной цепи. Глобальный ресурс кислорода практически неограничен; кроме того, его убыль постоянно восполняют окисленные фототрофы.

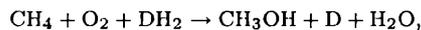
Цитохромоксидаза (кислородредуктаза), расположенная в конце дыхательной цепи, осуществляет четырехэлектронное восстановление молекулы кислорода: $O_2 + 4H^+ / 4e^- \rightarrow 2H_2O$. Попутно она создает *Pmf*, выполняя, наряду с цитохром *b/c*-комплексом, роль мембранного биотрансформатора (см. II том учебника).

Облигатно дышащие аэробы не могут заменить кислород другим терминальным акцептором, и, когда он присутствует в субоптимальном количестве, скорость аэробного дыхания снижается, а при недостатке кислорода наступает энергетический стресс.

Косубстрат оксигеназных реакций. Если при оксидантной реакции кислород акцептирует электроны, полученные от субстрата, то при оксигеназной реакции атом или молекула кислорода присоединяются к субстрату. Катализаторами оксигеназных реакций служат, соответственно, моно- и диоксигеназа.

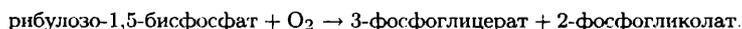
В физиологическом плане действие оксигеназ бывает либо продуктивным, либо контрпродуктивным.

Примером продуктивной оксигеназы служит метанмонооксигеназа, которая катализирует ключевую реакцию углеродной хемолитотрофии у метанотрофных бактерий (см. II том учебника):



где DH_2 — донор электронов, чаще всего НАДН.

В свою очередь, катализатором контрпродуктивной оксигеназной реакции служит рибулозобисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа ($RuBisCO$); ее действие лежит в основе фото- и хемодыхания (см. II том учебника):



Регулятор транскрипции. Приведем два примера регуляторной роли молекулярного кислорода. У факультативно анаэробных бактерий кислород участвует в адаптивном переходе от анаэробного дыхания к аэробному, влияя на транскрипцию с помощью однокомпонентного глобального регулятора FNR (см. раздел 18.3.1.2). В свою очередь, у аноксигенных фототрофных бактерий кислород блокирует биогенез фотосинтетического аппарата (см. раздел 18.3.1.1).

Хемозффектор. Кислород является наиболее сильным хемозффектором, регулирующим подвижность и миграционное поведение прокариотов. Роль сенсора при азротаксисе выполняет дыхательная цепь (см. раздел 18.4.1.3).

Фактор окислительного стресса. Большинство экосистем существует там, где парциальное давление кислорода составляет ~ 20 кПа. При такой концентрации он вызывает негативные явления, от которых зависят физиологические процессы прокариотов и, в конечном счете, их жизнеспособность. Среди этих явлений особо выделяется окислительный стресс, причиной которого служит образование и накопление активных форм кислорода.

19.1.6.1. Механизм окислительного стресса

Окислительный стресс (англ. oxidative stress) — это комплекс сублетальных изменений, вызванных преобладанием прооксидантов (окислительных реагентов) над антиоксидантами (восстановительными реагентами). При нем повышается концентрация свободных радикалов, запускающих цепь неконтролируемых реакций, в результате которых повреждаются ключевые биомолекулы — нуклеиновые кислоты,

ферменты и мембранные липиды. Поскольку в основе окислительного стресса лежат превращения свободных радикалов, его также называют *свободнорадикальным стрессом* (англ. free radical stress).

Первичными агентами окислительного стресса служат *активные формы кислорода*. Они либо представляют собой свободные радикалы, либо участвуют в образовании свободнорадикальных органических молекул.

Активные формы кислорода. Что такое «активные формы» кислорода (англ. reactive oxygen species, ROS), и какое отношение к их образованию имеют живые организмы?

Молекулярный кислород, будучи в термодинамическом отношении сильным окислителем, слабо реагирует с другими веществами при физиологической температуре, а также в отсутствие катализаторов, в том числе, ферментов. Иными словами, и присоединение кислорода к субстрату, и восстановление кислорода электронами, полученными от субстрата, маловероятны.

Дело в том, что спонтанное присоединение молекулярного кислорода к субстрату находится под спиновым запретом.

Из общей химии известно, что атом кислорода имеет электронную конфигурацию $1s^2 2s^2 2p^4$, а молекула кислорода — электронную конфигурацию $\sigma_S^2 \sigma_S^{*2} \sigma_P^2 \pi^4 \pi^{*2}$. Поскольку разрыхляющие π -орбитали (обозначаются как π^* ; не принимают участие в образовании ковалентной связи) занимают два электрона с одинаково ориентированными спинами, невозбужденная молекула кислорода триплетна (3O_2). Напомним, что каждую ковалентную связь в синглетном субстрате (1 субстрат) образуют электроны с взаимно противоположными спинами. Триплетный кислород не может присоединиться к синглетному субстрату, поскольку для образования новых химических связей требуются две пары электронов с взаимно противоположными спинами.

Существуют два способа преодолеть спиновый запрет. С одной стороны, можно активировать кислород, обратив спин одного из электронов на разрыхляющих π -орбиталях ($^3O_2 \rightarrow ^1O_2^*$). С другой стороны, можно активировать субстрат, обратив спин одного из спаренных электронов, образующих ковалентную связь (1 субстрат \rightarrow 3 субстрат *). В обоих случаях придется затратить энергию, причем при активации субстрата ковалентная связь разрывается, и он распадается на свободные радикалы.

Сделаться спонтанным акцептором электронов молекулярному кислороду, в свою очередь, мешают другие запреты.

В частности, восстановление кислорода до молекулы воды четырьмя электронами ($O_2 + 4e^- / 4H^+ \rightarrow 2H_2O$) маловероятно, несмотря на высокий стандартный редокс-потенциал пары $O_2/2H_2O$ (+1200 мВ).

В свою очередь, восстановление кислорода до пероксида двумя электронами ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) требует высокой энергии активации, а поэтому при физиологической температуре и в отсутствие катализаторов оно не происходит.

Наконец, для восстановления кислорода до супероксидного анион-радикала одним электроном ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \cdot$) нужен сильный донор, поскольку редокс-потенциал пары $O_2/O_2^- \cdot$ составляет -190 мВ, а такому условию отвечают лишь немногие молекулярные компоненты живой клетки. В частности, неактивированный кислород не может окислять нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы.

Поэтому практически все ферментативные реакции с участием молекулярного кислорода связаны с его активацией и переходом в возбужденное синглетное состояние ($^1O_2^*$) или другие ROS.

Важнейшими представителями ROS являются:

- синглетный молекулярный кислород ($^1O_2^*$);
- супероксидный анион-радикал ($O_2^- \cdot$) или его протонированная форма, свободный гидропероксидный радикал ($HO_2 \cdot$);
- пероксидный анион (O_2^{2-}) или его протонированная форма, пероксид водорода (H_2O_2);
- свободный гидроксильный радикал ($OH \cdot$).

При окислительном стрессе важнейшими молекулярными мишенями становятся нуклеиновые кислоты, белки и липиды. В частности, ROS модифицирует азотистые

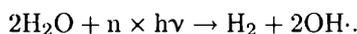
основания и сахарофосфатный скелет ДНК, в результате чего происходят точечные мутации, и в полинуклеотидной цепи появляются разрывы. При окислительном повреждении белков в полипептидной цепи образуются патологические сшивки типа Cys–Cys и Tug–Tug, и она разрывается с образованием карбонильных производных со структурой R₁–CO–NH–R₂. В свою очередь, с помощью ROS липиды окисляются в несколько стадий с промежуточным образованием свободных радикалов. Наконец, супероксидный анион-радикал окисляет [Fe_nS_n]-кластеры, которые служат кофакторами ферментов или переносчиками электронов в реакциях энергетического и конструктивного метаболизма.

Таким образом, окислительный стресс вызывает множественное повреждение биомолекул. Ниже мы убедимся в том, что негативный эффект усиливается в присутствии свободного железа, когда благодаря взаимным превращениям ROS образуется синглетный кислород, а также свободный гидроксильный радикал.

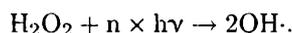
Источники образования активных форм кислорода. Первым источником образования ROS служат мембранные редокс-системы. В частности, светозависимые электрон-транспортные цепи восстанавливают не только свои физиологические акцепторы (ферредоксины или хиноны), но и молекулярный кислород, который превращается в супероксидный анион-радикал. Супероксид может также образовываться в донорном участке дыхательной цепи путем автоокисления флавиновых дегидрогеназ.

Вторым источником образования ROS становятся растворимые субстраты, например полифенолы. Эндогенные полифенолы являются продуктами побочных реакций генерального метаболизма. Они автоокисляются молекулярным кислородом, который превращается в супероксидный анион-радикал.

Третий источник образования ROS — это электромагнитное излучение. Жесткое электромагнитное излучение (γ-кванты, λ = 3·10⁻⁴ – 3·10⁻² нм, и рентгеновы лучи, λ = 3·10⁻² – 10 нм) вызывает фотолиз воды с образованием свободного гидроксильного радикала:



При воздействии на пероксид водорода более мягкого электромагнитного излучения (УФ, λ = 10–400 нм) также образуется свободный гидроксильный радикал:

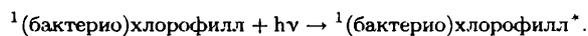


Особая роль при образовании ROS принадлежит еще более мягкому электромагнитному излучению — видимому свету (λ = 400–700 нм).

В результате поглощения его квантов эндогенными или экзогенными пигментами биологические структуры вовлекаются в реакции с участием синглетного кислорода (рис. 275), что приводит к *фотоповреждению* (англ. photodamage).

Фотоповреждение фотосинтетического аппарата связано с цепными реакциями образования перекисей, поскольку ROS атакуют остатки полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах. После инициации эти реакции приобретают автокаталитический характер, что вызвало бы летальное повреждение, если бы на пути деструктивного процесса не было эндогенных антиоксидантов, в частности каротиноидов.

Поглотив квант видимого или ближнего инфракрасного света, антенный (бактерио)хлорофилл переходит в возбужденное синглетное состояние:



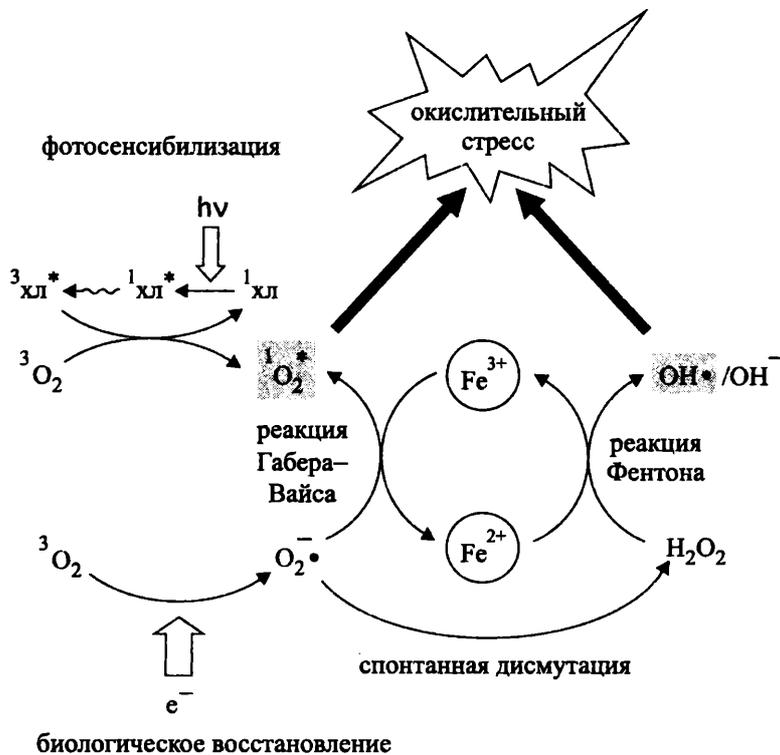
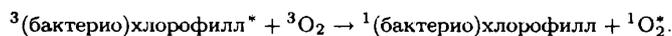


Рис. 275. Механизм окислительного стресса.
Объяснение в тексте.

Если избыточная свободная энергия (бактерио)хлорофилла не успевает преобразоваться в химический потенциал терминального акцептора электронов в реакционном центре, что происходит при накоплении возбужденных синглетных состояний пигмента, электрон переселяется на более низкий энергетический подуровень. При этом ориентация спина изменяется (см. II том учебника). В результате пигмент переходит из возбужденного синглетного состояния в возбужденное триплетное состояние (рис. 275):

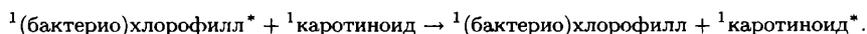


Возбужденное триплетное состояние «живет» в миллиард раз дольше возбужденного синглетного состояния, соответственно $\sim 10^{-3}$ и $\sim 10^{-12}$ с, что позволяет пигменту перейти от резонансных межмолекулярных взаимодействий к диффузионным. Иными словами, в триплетном состоянии пигмент успевает прореагировать с растворимыми субстратами, например невозбужденным триплетным кислородом. В роли фотосенсибилизатора часто выступает (бактерио)хлорофилл:

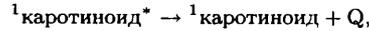


Универсальной биологической защитой от повреждающего воздействия синглетного кислорода служат окрашенные каротиноиды (см. II том учебника). При оксигенной фототрофии их присутствие абсолютно необходимо: помимо того, что цианобактерии и пластиды являются аэробами, они сами образуют молекулярный кислород. Неудивительно, что у них, в отличие от анаэробных фототрофных бактерий, мутации по генам биосинтеза окрашенных каротиноидов летальны.

Защита с помощью каротиноидов, прежде всего, связана с тем, что они расположены очень близко (< 1 нм) от фотосенсибилизатора-(бактерио)хлорофилла, что позволяет им дезактивировать его возбужденное синглетное состояние:

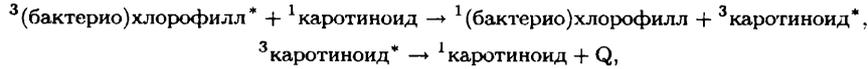


В свою очередь, возбужденное синглетное состояние каротиноида спонтанно дезактивируется путем теплового рассеивания избыточной энергии, и он возвращается в основное синглетное состояние:

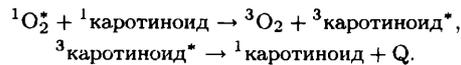


где Q -- теплота.

Помимо этого каротиноиды могут дезактивировать возбужденное триплетное состояние (бактерио)хлорофилла, а также возбужденное синглетное состояние кислорода. В обоих случаях они переходят в возбужденное триплетное состояние, а затем возвращаются в основное синглетное состояние:

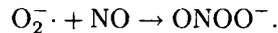


а также



Итак, источником ROS служит нормальный метаболизм, когда поступившая в клетку энергия по той или иной причине не может быть полностью утилизирована, или когда магистральные процессы с участием кислорода сопровождаются побочными реакциями. Другим источником ROS могут быть внешние воздействия — жесткие излучения (см. выше) или агрессивные химические реагенты, например пероксинитрит.

Пероксинитрит образуется при спонтанной реакции супероксидного анион-радикала с оксидом азота NO, одним из промежуточных продуктов денитрификации (см. II том учебника):



При физиологических условиях пероксинитрит ведет себя как очень сильный и стабильный окислитель. Он вызывает перекисное окисление липидов, а продуктом его спонтанного разложения становится синглетный кислород.

Таким образом, последствия накопления NO станут летальными, если его своевременно не удалять. Для этого, в частности, используется ферментативное восстановление NO до N₂O с помощью NO-редуктазы, что успешно делают денитрифицирующие бактерии.

Синглетный кислород. Это очень сильный и нестабильный окислитель (в водном растворе время его «жизни» ~2·10⁻⁶ с). Он способен взаимодействовать с разнообразными химическими соединениями, передавая им свою избыточную энергию и/или реагируя с ними. Синглетный кислород — это *нуклеофил* (т. е. он имеет избирательное сродство к тем участкам молекул, которые обладают повышенной электронной плотностью). Он активно вступает в оксигеназные реакции, повреждающие клетку за счет образования перекисных и гидроперекисных соединений с кратными и, что еще важнее, конъюгированными двойными связями (что характерно для азотистых оснований, аминокислот с боковыми алициклическими радикалами, ненасыщенных жирных кислот и т. д.). Синглетный кислород очень опасен, поскольку не существует ферментов, которые смогли бы его обезвредить.

Супероксидный анион-радикал. Как мы уже отмечали, характерная черта окислительного стресса состоит в том, что ROS возникают не только под прямым воздействием абиотических факторов окружающей среды, например электромагнитного излучения, но могут быть побочными продуктами генеральных метаболических путей. Прежде всего, это касается супероксидного анион-радикала, который образуется электрон-транспортной цепью при фототрофии и аэробном дыхании.

В частности, при оксигенной фототрофии молекулярный кислород восстанавливается в акцепторном участке ФСИ до $O_2^- \cdot$. Донором электрона служат промежуточный переносчик реакционного центра (F_B) и восстановленный ферредоксин (Fd_{red}). Этот спонтанный процесс называется *реакцией Мелера* (A. Mehler).

На уровне дыхательной цепи кислород восстанавливается до супероксидного анион-радикала с помощью автооксидабельных коэнзимов, входящих в состав дегидрогеназ.

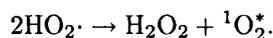
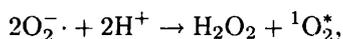
Примером бактерий, в большом количестве образующих супероксидный анион-радикал в качестве побочного продукта метаболизма, служат паразитические микоплазмы. Геном микоплазм (600-800 т.п.н.) — один из минимальных прокариотных геномов, и набор генов домашнего хозяйства у них резко ограничен. В частности, поэтому они лишены цикла Кребса и электрон-транспортной цепи.

Биоэнергетика микоплазм основана на гликолизе и субстратзависимом фосфорилировании АДФ, тогда как *Pmf* создается вторично с помощью протонтранслоцирующей АТФазы, которая гидролизует АТФ. У представителей рода *Ureaplasma* отсутствует и гликолитический путь. Они ассимилируют энергию уникальным способом — за счет гидролиза мочевины (цитоплазма защелачивается в результате протонирования аммиака, что создает *Pmf*). Микоплазмы регенерируют НАД с помощью мембранной или растворимой НАДН-оксидазы, которая использует в качестве кофактора ФАД. Электроны передаются кислороду, в результате чего образуется супероксидный анион-радикал.

Микоплазмы лишены клеточной стенки. Их мембранные адгезины (см. I том учебника) взаимодействуют с поверхностными рецепторами эукариотной клетки, в результате чего бактериальная и эукариотная мембраны вступают в тесный контакт. ROS, накопившиеся в ходе жизнедеятельности микоплазм, прежде всего гидроксильный радикал, вызывают окислительное повреждение плазматической мембраны клетки хозяина и дезорганизуют взаимодействующий с ней цитоскелет. В этом заключается основная причина патогенности микоплазм.

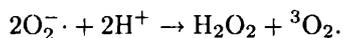
Помимо электрон-транспортных цепей, источником супероксидного анион-радикала служит спонтанное окисление флавинов, катехолов и других растворимых органических субстратов.

Супероксидный анион-радикал относительно безвреден, поскольку в нейтральной среде он не проявляет окислительных свойств и даже может восстанавливать Fe^{3+} и катионы других металлов переходной валентности. Тем не менее, косвенно он очень опасен, поскольку его непротонированная форма ($O_2^- \cdot$) и протонированная форма (гидропероксидный свободный радикал $HO_2 \cdot$) спонтанно дисмутируют с образованием пероксида водорода H_2O_2 и синглетного кислорода $^1O_2^*$:



Кроме того, супероксидный анион-радикал совместно с пероксидом водорода участвует в реакции Габера—Вайса (см. ниже), продуктами которой являются синглетный кислород и опаснейшая форма ROS — свободный гидроксильный радикал.

Биологический механизм, который препятствует накоплению синглетного кислорода и других ROS, основан на действии трех ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы (см. ниже). Центральное место среди них принадлежит супероксиддисмутазе. В отличие от спонтанной дисмутации супероксида, продуктом аналогичной ферментативной реакции становится триплетный кислород:



Пероксид водорода. Это побочный продукт аэробного метаболизма на уровне мембранных или растворимых окислительно-восстановительных систем. При pH, близком к нейтральному, пероксид водорода находится в недиссоциированной форме и беспрепятственно проходит через мембраны.

У бактерий двухэлектронное восстановление кислорода происходит довольно редко. У них пероксид водорода образуется, главным образом, при дисмутации супероксида — продукта одноэлектронного восстановления кислорода.

Подобно супероксидному анион-радикалу, пероксид водорода относительно безвреден, хотя он обладает сильнее выраженными окислительными свойствами и атакует катионы металлов переходной валентности, а также ряд биомолекул. Но пероксид водорода потенциально опасен, поскольку вместе с супероксидным анион-радикалом участвует в реакции Габера–Вайса (см. ниже).

Пероксид водорода восстанавливается до воды с помощью пероксидазы или каталазы (см. ниже).

Гидроксильный радикал. Он очень нестабилен (время жизни $< 10^{-9}$ с) и обладает исключительно высокой окислительной способностью (редокс-потенциал пары $\text{OH}\cdot/\text{OH}^-$ равен +2,7 В), что позволяет атаковать любые биомолекулы. В живых системах гидроксильный радикал вызывает множественные неспецифические повреждения, поскольку он отрывает водород от углеродного скелета молекулы-мишени (реакция дегидрирования); присоединяется по двойным связям или к ароматическим кольцам (реакция эпоксицирования); переносит электрон к акцептору (миграция свободного радикала).

В итоге образуются вторичные свободные радикалы, вызывающие деструкцию ключевых биомолекул.

В живой природе нет прямой защиты от гидроксильного радикала. Поэтому, наряду с синглетным кислородом, это один из наиболее токсичных химических реагентов. «Утешает» лишь то, что гидроксильный радикал наносит повреждения там, где образуется (он практически мгновенно вступает в реакцию, успевая диффундировать на расстояние не более 5–10 своих молекулярных радиусов).

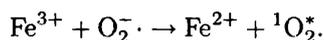
Роль железа в образовании активных форм кислорода. В кислой среде закисное железо (Fe^{2+}) устойчиво. Напротив, при повышении pH оно окисляется многими химическими реагентами, особенно в аэробных условиях.

Поскольку pH цитоплазмы близок к нейтральному, неконтролируемое окисление свободного или хелатированного двухвалентного железа может навредить клетке и даже привести ее к гибели.

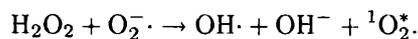
Как уже отмечалось, самый опасный представитель ROS — это свободный гидроксильный радикал. Он образуется в *реакции Фентона* (J. Fenton) (рис. 275). Окислителем двухвалентного железа служит пероксид водорода:



Образовавшийся катион окисного железа (Fe^{3+}) вступает в реакцию с супероксидным анион-радикалом, который выполняет роль восстановителя:



Суммарное уравнение двух приведенных реакций называется *реакцией Габера–Вайса* (F. Haber, J. Weiss) (рис. 275):



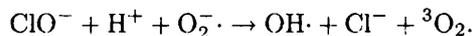
Таким образом, продуктами реакции Габера—Вайса одновременно являются две формы ROS: свободный гидроксильный радикал и синглетный кислород.

Прочие факторы окислительного стресса. Очень активным стрессовым агентом служит озон (O_3). В результате его восстановительного распада образуются свободные радикалы гидропероксида и гидроксила:

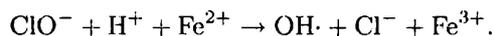


Кроме того, озон может присоединяться к органическим молекулам с образованием озонидов, т. е. циклических пероксидов $R_1-[(CH-CH)>O_3]-R_2$, которые быстро превращаются в альдегиды или во вторичные свободные радикалы $R_1-CH(O\cdot)$ и $R_2-CH(OO\cdot)$.

Еще один важный агент окислительного стресса — это анион гипохлорита ClO^- . Он синтезируется миелопероксидазой нейтрофилов из пероксида водорода и аниона Cl^- . Бактерицидность гипохлорита объясняется его способностью взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом с образованием свободного гидроксильного радикала:



Гипохлорит также взаимодействует с катионом Fe^{2+} , в результате чего образуется свободный гидроксильный радикал:



Таким образом, окислительный стресс представляет собой комплексный биологический и химический феномен, зависящий от ряда эндогенных процессов и абиотических факторов.

19.1.6.2. Защитный ответ при окислительном стрессе

Наилучший и самый простой способ защиты — превентивный: не допустить накопления ROS. Эту функцию выполняют конститутивные ферменты — супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы. Они устраняют наиболее распространенные агенты окислительного стресса, которые служат предшественниками остальных ROS и запускают разветвленные цепи свободнорадикальных превращений.

В качестве примера можно привести устранение диоксида азота; иначе это реакционноспособное соединение превращается в пероксинитрит. При распаде последнего образуется синглетный кислород (см. выше). Моноксид азота устраняется окислительным путем; например, NO-диоксигеназа *E. coli* превращает его в анион нитрата ($NO + O_2 \rightarrow NO_3^-$). В свою очередь, восстановительное устранение монооксида азота осуществляется с помощью *флавогемоглобина* — белка с глобинным модулем (содержащим гем В) и редуктазным модулем (имеющим сайты для связывания ФАДН₂ или НАДФН). Этот защитный белок имеется, в частности, у *B. subtilis*.

Иногда превентивный способ защиты по той или иной причине оказывается неэффективным, и происходит накопление ROS. В этом случае в дело вступают регуляторные системы, запускающие адаптивные механизмы, с помощью которых удаляются ранее образованные и вновь возникающие ROS.

Защита на основе регуляторных систем. Для предотвращения последствий окислительного стресса бактерии используют ряд глобальных регуляторных систем.

Роль регулона RpoS. Регулон RpoS активируется при переходе в стационарную фазу и/или при голодании (см. раздел 18.1.2). Продуктом экспрессии гена *rpoS* служит сигма-фактор σ^S , который контролирует гены, ответственные за устойчивость бактерий к разным стрессовым воздействиям. В частности, σ^S позитивно контролирует экспрессию генов *katE* (кодирует пероксидазу НРІІ), *katG* (кодирует пероксидазу НРІ) и *gorA* (кодирует глутатионредуктазу).

Реализация RpoS-зависимых программ при голодании или переходе в стационарную фазу сопровождается комплексными изменениями метаболизма. Этот тип адаптации требует значительных энергетических и конструктивных затрат на биосинтез нового ферментного аппарата. Поэтому растущие культуры защищаются от последствий окислительного стресса с помощью глобальных регуляторов OxyR, SoxR/SoxS, Fug и DtxR.

Роль белка OxyR. Ген *oxyR* входит в состав регулона *oxyR* и активируется при накоплении пероксида водорода. Его продукт, белок OxyR представляет собой тетрамер идентичных субъединиц и существует в альтернативных формах: активной окисленной и неактивной восстановленной. Они взаимопревращаются путем окисления/восстановления сульфгидрильных групп аминокислотных остатков Cys-99 и Cys-208. В результате восстановления белка OxyR он инактивируется и блокирует промоторы. Процесс (дез)активации белка OxyR схематически изображен на рис. 276.

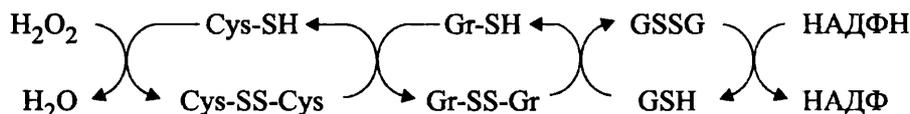


Рис. 276. (Де)активация белка OxyR.

Cys-SS-Cys — активная (окисленная) форма белка OxyR; Cys-SH — неактивная (восстановленная) форма белка OxyR; Gr-SH — восстановленный глутаредоксин А; GSH — восстановленный глутатион.

Однокомпонентная регуляторная система OxyR, в частности, влияет на экспрессию гена пероксидазы (*katG*), гена алкилгидропероксид-оксидоредуктазы (*ahpFC*), гена глутаредоксина А (*grxA*) и гена антисмысловой РНК, участвующей в посттранскрипционной регуляции (*oxyS*).

Роль системы SoxR/SoxS. Хотя при окислительном стрессе бактерии избавляются от супероксида с помощью конститутивной супероксиддисмутазы, для защиты самых уязвимых мишеней, к числу которых относятся $[\text{Fe}_n\text{S}_n]$ -кластеры, используется особый адаптационный механизм.

При накоплении супероксида и других ROS активируется регулон *soxR/soxS*. Он кодирует двухкомпонентную сигнальную систему, состоящую из белков SoxR/SoxS. Роль сенсора выполняет белок SoxR. В ответ на его накопление активируются до 50 генов, в частности ген супероксиддисмутазы. Продукты их экспрессии удаляют супероксид, а также репарируют вызванные им повреждения.

Гомодимерный белок SoxR (M_r субъединицы ~ 17 кДа) содержит два $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластера, которые существуют в двух формах — $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ и $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^+$, соответственно, окисленной и восстановленной. Под воздействием супероксида восстановленная форма превращается в окисленную. В свою очередь, восстановленная форма регенерируется с помощью специфической редуктазы.

При окислении $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластеров белок SoxR активируется и связывается с промотором гена *soxS*. В свою очередь, если $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластеры восстановлены, белок SoxR перестает активировать транскрипцию гена *soxS*.

Существует альтернативный путь активации белка SoxR. В нем участвует монооксид азота, который вытесняет серу из [Fe₂S₂]-кластеров, и они превращаются в динитрозил-железо-цистеинильный комплекс. Заместить его интактными [Fe₂S₂]-кластерами позволяет цистеиндесульфураза IscS.

Вновь синтезированный белок SoxS играет роль регулятора и активирует транскрипцию >60 генов, в частности: гена Mn-супероксиддисмутазы (*sodA*); гена глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (*zwf*); гена антисмысловой РНК, регулирующей систему защиты от осмотического стресса (*micF*); гена эндонуклеазы IV (*nfo*); гена ферредоксинредуктазы (*fpr*); генов системы экскреции токсиантов (*acrAB*) и др. Продукты этих генов регенерируют [Fe₂S₂]-кластеры белка SoxR, а также взаимодействуют с системами защиты при других стрессах.

Роль белков Fur и DtxR. Для борьбы с последствиями окислительного стресса необходимо контролировать внутриклеточную концентрацию свободного железа. С одной стороны, при его избытке запускается реакция Фентона (см. выше), продуктом которой является свободный гидроксильный радикал. С другой стороны, железо входит в состав активных центров каталазы и супероксиддисмутазы, и поэтому при голодании по нему клетки проявляют повышенную чувствительность к ROS.

Мы уже говорили о том, что железный гомеостаз обеспечивается системами Fur и DtxR (см. раздел 18.3.2.5). Благодаря взаимосвязи этих однокомпонентных сигнальных систем с механизмами защиты при окислительном стрессе концентрация ROS и свободных органических радикалов поддерживается на низком уровне.

В частности, у *E. coli* при окислительном стрессе усиливается транскрипция гена *fur*. В свою очередь, белок Fur влияет на характер экспрессии генов *sodA* и *sodB*, кодирующих Mn- и Fe-супероксиддисмутазы. На фоне избытка железа белок Fur действует как негативный регулятор гена *sodA*, однако позитивно регулирует ген *sodB*. В итоге, в зависимости от концентрации железа, используются разные супероксиддисмутазы.

Все сказанное также относится к DtxR-зависимой системе железного гомеостаза. Например, у *Mycobacterium smegmatis* содержание железа контролирует белок IdeR, влияющий на транскрипцию генов *katG* и *sodA*, которые кодируют, соответственно, каталазу и Mn-супероксиддисмутазу.

Роль аконитазы. Свойства этого фермента уже рассматривались ранее, и поэтому мы отсылаем читателя к разделу 18.2.1.

Защита с помощью неспецифических молекулярных ловушек. Эффективной защитой от ROS служат молекулярные ловушки, например аскорбиновая кислота и глутатион, а также металлы переходной валентности, в частности, марганец.

Аскорбиновая кислота, или витамин С (рис. 277) служит донором электронов для ферментов, обезвреживающих ROS, прежде всего для аскорбатпероксидазы. Кроме того, она может спонтанно восстанавливать гидроксильный радикал. В обоих случаях аскорбат регенерируется из дегидроаскорбата при помощи НАДФН-зависимой аскорбатдегидрогеназы (редуктазы).

Восстановленный глутатион (GSH; см. II том учебника) связывает свободный гидроксильный радикал, а также косвенно препятствует его вредному воздействию, выступая в качестве донора электронов при восстановлении окисленных биомолекул. Для регенерации восстановленного глутатиона из его окисленной формы (GSSG), используется НАДФН-зависимая глутатионредуктаза.

Особой молекулярной ловушкой является «неорганический» марганец в степенях окисления II и IV. Например, хламидобактерия *Leptothrix* sp. образует небольшое количество пероксида водо-

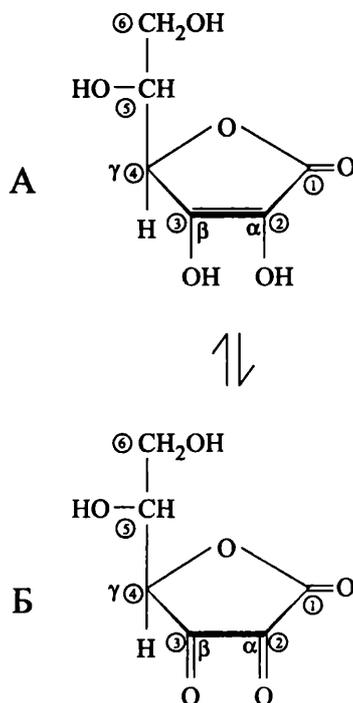
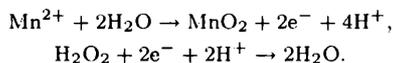


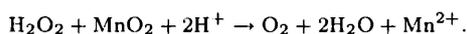
Рис. 277. Аскорбиновая (А) и дегидроаскорбиновая (Б) кислота.

рода, который восстанавливается пероксидазой на поверхности ОМ. Донором электронов служит катион Mn^{2+} .



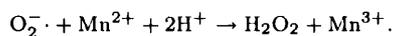
Нерастворимый диоксид MnO_2 (степень окисления IV) откладывается в чехле.

При избытке органических субстратов образуется больше пероксида водорода, и он окисляется ранее накопленным диоксидом марганца:

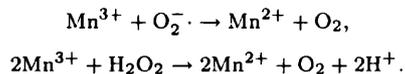


Заметим, что процесс носит циклический характер.

Бактерии, не образующие супероксиддисмутазу, например *Lactobacillus plantarum*, нейтрализуют O_2^- (с помощью катиона Mn^{2+}):



Mn^{3+} неферментативным путем вновь превращается в Mn^{2+} . При этом восстановителем служит либо O_2^- , либо пероксид водорода:



Защита с помощью репарационных систем и биосинтеза de novo. Очень эффективный механизм защиты — это репарация поврежденных $[Fe_nS_n]$ -кластеров. В ней участвуют ферменты, которые либо восстанавливают $[Fe_nS_n]$ -кластеры, либо синтезируют их de novo.

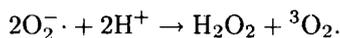
В частности, ферредоксин:НАДФ-оксидоредуктаза переводит $[\text{Fe}_n\text{S}_n]$ -кластеры из неактивного окисного состояния в активное закисное состояние.

В свою очередь, окислительный стресс может необратимо разрушить $[\text{Fe}_n\text{S}_n]$ -кластеры, например входящие в состав аконитазы (см. раздел 18.1.2). Тогда они синтезируются *de novo*. В клетках *E. coli* эту роль выполняют ферменты, закодированные в опероне *isc*. Его экспрессия контролируется по принципу обратной связи, причем в качестве репрессора выступает белок IscR (сокр. англ. iron stress cluster repressor), содержащий $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -кластер. В присутствии пероксида водорода экспрессия оперона *isc* усиливается, что непосредственно связано с инактивацией белка IscR.

Ферментативная защита. Существуют четыре фермента, обезвреживающие ROS: супероксидспецифичная супероксиддисмутаза, а также пероксидспецифичные каталаза, пероксидаза и гидропероксидаза.

Супероксиддисмутаза имеется у всех аэробов и у большинства аэротолерантных анаэробов; у облигатных анаэробов она отсутствует. Три других фермента распространены не универсально; они используются как по прямому назначению, так и в биосинтетических целях.

Роль супероксиддисмутаза. Супероксидный анион-радикал устраняется с помощью супероксиддисмутаза (англ. superoxide dismutase, SOD), которая диспропорционирует молекулы супероксида:



Этот фермент есть у всех аэробов, встречается у многих аэротолерантных анаэробов, но отсутствует у облигатных анаэробов.

При классификации SOD учитывается тип металла, входящего в состав активного центра (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD и Ni-SOD).

Представители разных филогенетических доменов образуют SOD разного типа. Эукариоты содержат цитоплазматическую Cu/Zn-SOD.

Cu/Zn-SOD универсальна для эукариотов. У прокариотов она встречается крайне редко; примерами служат *Caulobacter crescentus* и *Paracoccus denitrificans*, а также некоторые штаммы *Pseudomonas* spp. По-видимому, ферменты данного класса возникли до дивергенции бактерий с эукариотами и археями. В ходе эволюции они сохранились, главным образом, у эукариотов, в то время как у бактерий и архей их заменили Mn-SOD и Fe-SOD.

Все известные Cu/Zn-SOD взаимно гомологичны, однако гомология между представителями этого и других классов SOD практически отсутствует, что указывает на их независимое происхождение.

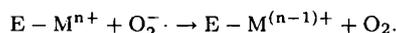
Cu/Zn-SOD представляет собой гомодимер. Каждая субъединица ($M_r \sim 32$ кДа) содержит по одному атому меди и цинка. В активный центр входит только медь, тогда как цинк необходим для стабилизации структуры фермента и может быть заменен другим металлом. Cu/Zn-SOD очень стабильна и активна даже в присутствии таких мощных денатурирующих агентов, как 8M мочевины или 4%-ный додецилсульфат.

Для бактерий и архей, а также для пластид и митохондрий типичны Fe-SOD или Mn-SOD; у некоторых цианобактерий, наряду с Mn-SOD, имеется уникальная Ni-SOD.

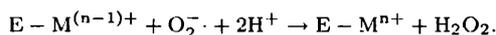
Fe-SOD и Mn-SOD — это гомодимеры, реже гомотетрамеры (M_r субъединицы ~ 20 кДа). В активном центре содержатся атомы марганца или железа, которые функционально взаимозаменяемы. Например, *Bacteroides fragilis* в анаэробных условиях образует Fe-SOD, а при окислительном стрессе тот же самый апопротеин используется для образования Mn-SOD.

Гены Mn-SOD (*sodA*) и Fe-SOD (*sodB*) взаимно гомологичны, а продукты их экспрессии взаимозаменяемы — реконструированы функционально полноценные гетеродимеры, одна из субъединиц которых принадлежит Fe-SOD, а другая Mn-SOD.

Дисмутация супероксидного анион-радикала осуществляется в два приема. Вначале он по субстратному каналу проникает в активный центр фермента (E), вступает в комплекс с катионом металла (M^{n+}) и восстанавливается одним электроном:

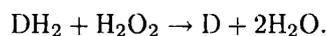


На следующей стадии активный центр окисляется вторым супероксидным анион-радикалом:



Роль пероксидаз, каталаз и гидропероксидаз. Пероксид водорода устраняется тремя функционально родственными ферментами: пероксидазой, каталазой и гидропероксидазой.

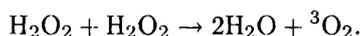
Пероксидаза — это донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза, устраняющая пероксид водорода:



В качестве донора электронов пероксидазы могут использовать разнообразные субстраты, в частности глутатион и аскорбат. Большинство пероксидаз представляет собой мономеры или гомодимеры (M_r субъединиц 40–42 кДа); простетической группой служит протопорфирин IX (см. II том учебника).

Мультивариантные и широко распространенные пероксидазы не просто устраняют пероксид водорода, а с его помощью окисляют многие субстраты. Пероксидазы чаще всего встречаются у грибов и растений, где они выполняют разные функции. Например, у базидиомицетов они входят в состав лигнолитического комплекса, разрушающего древесину. Из пероксидаз животного происхождения наиболее изучены лактопероксидаза молока, миелопероксидаза лейкоцитов (действует на поздних стадиях фагоцитоза), а также тиреопероксидаза (участвует в биосинтезе гормона тироксина).

Каталаза — это $H_2O_2:H_2O_2$ -оксидоредуктаза, устраняющая пероксид водорода посредством реакции:



Она представляет собой тетраэдр из субъединиц ($M_r \sim 60$ кДа), связанных гидрофобными связями; каждая содержит простетическую группу — протопорфирин IX.

Помимо обычных каталаз, кофактором которых служит геминное железо, существуют Mn-зависимые, или *негеминные каталазы* (англ. nonheme catalase). Негеминная каталаза впервые описана у *Lactobacillus plantarum*; ее гомологи выявлены у филогенетически взаимно удаленных прокариотов, например у бактерии *Thermus thermophilus* и археота *Pyrobaculum caldifontis*. Геминная и негеминная каталазы могут образовываться у одного и того же микроорганизма, в частности, у *Salmonella enterica* серовар Typhimurium.

Гидропероксидаза обладает двумя активностями, пероксидазной и каталазной. Гидропероксидазы I и II (англ. hydroperoxidase, Hp), изученные на примере *E. coli* — это гомодимеры или гомотетрамеры. Их субъединицы имеют $M_r \sim 85$ кДа; простетической группой служит гем *b* или *d* (см. II том учебника).

19.1.7. pH-стресс

Повышенная кислотность или щелочность среды являются широко распространенными природными или антропогенными стрессорами.

В частности, гидротермальные источники, дренажные воды угольных и медных шахт, стоки промышленных предприятий и пищеварительный сок имеют $\text{pH} \sim 1$, а закисленные почвы и фруктовые соки $\text{pH} \sim 3$. В свою очередь, защелоченные почвы имеют $\text{pH} \sim 9$, щелочные озера $\text{pH} \sim 10$, а промышленные и прачечные сточные воды или увлажненная поверхность бетонных сооружений $\text{pH} \sim 11$.

Большинство природных ниш имеет pH 5–9, и в этом интервале находятся оптимумы роста большинства бактерий и архей, способных временно переносить pH -стресс. Ацидо- и алкалитолерантные формы адаптированы к средам, соответственно, с низким и высоким pH , а для ацидофилов (оптимум $\text{pH} \sim 3$) или алкалифилов (оптимум $\text{pH} \sim 9$) такие условия являются оптимальными. Наконец, экстремальные ацидофилы оптимально развиваются при $\text{pH} \leq 1$, а экстремальные алкалифилы при $\text{pH} \geq 12$. Поскольку внутриклеточный pH ацидо- или алкалифилов близок к нейтральному, ΔpH у них велика по абсолютному значению.

Механизмы pH -адаптации довольно разнообразны. В кислой среде нейтрофилы, имеющие оптимум $\text{pH} \sim 7$, либо откачивают протоны с помощью F_0F_1 -АТФаз (см. II том учебника), либо используют декарбоксилазы аминокислот, что вызывает защелачивание цитоплазмы. Возможно также защелачивание наружной среды; характерным примером служит гидролиз мочевины, осуществляемый *Helicobacter pylori* с помощью уреазы. В щелочной среде нейтрофилы используют аналогичную стратегию — либо с помощью Na^+/H^+ -антипортера откачивают избыточные катионы Na^+ , либо подкисляют наружную среду; например, триптофаназа *TnaA* *E. coli* расщепляет триптофан с образованием органических кислот.

Ацидофилы для того, чтобы в условиях кислотного стресса сохранить pH цитоплазмы на нейтральном гомеостатическом уровне, постоянно экспортируют протоны против градиента химического потенциала, используя градиент электрического потенциала ($\Delta\psi$), ориентированный наружу из клетки. В свою очередь, алкалифилам нет необходимости удалять избыток протонов, но для фосфорилирования АДФ с помощью АТФ-синтазы они поддерживают высокий электрический потенциал на наружной поверхности СМ (см. II том учебника).

Механизм восприятия первичного стимула при pH -стрессе в большинстве случаев неясен, хотя установлены некоторые компоненты причастных к этому сигнальных систем. Например, в качестве сенсора щелочной среды *E. coli* использует белок *SrxA* (см. раздел 19.2).

19.1.8. Токсический стресс

При токсическом стрессе в роли стрессоров выступают органические и неорганические вещества, которые (не)специфически поражают клеточные мишени. Адаптационный ответ связан с приобретением резистентности к стрессору и основан на четырех общих механизмах, которые реализуются совместно или независимо друг от друга: (1) детоксикация стрессора путем его ферментативной модификации или разрушения; (2) модификация мишени; (3) уменьшение проницаемости клеточной оболочки; (4) экскреция токсикантов с помощью MDR-транспортеров (см. ниже).

Причиной токсического стресса служат экзогенные вещества; реже он вызывается эндогенными метаболитами.

В качестве примера рассмотрим «глюкозо-фосфатный» стресс. Напомним, что глюкоза, субстрат гликолиза, импортируется фосфоэнлипуват-фосфотрансферазной системой (PTS; см. раздел 18.3.2.2) сопряженно с фосфорилированием. Стресс наступает, когда по той или иной причине нарушается гликолитический путь, что приводит к накоплению глюкозо-6-фосфата. Механизм бактериостатического или бактерицидного действия этого метаболита неизвестен. Сенсором повышенного уровня глюкозо-6-фосфата служит транскрипционный фактор SgrR (сокр. англ. sugar transport related). При связывании лиганда он активирует гены адаптационного ответа, в частности ген малой РНК SgrS. Последняя при участии РНК-шалерона Hfq (см. раздел 18.2.2) способствует деградации мРНК *ptsG*, кодирующей транспортер глюкозы. Благодаря негативной регуляции транспортера предотвращается дальнейшее накопление токсичного глюкозо-6-фосфата.

Стресс, вызванный липофильными соединениями. Токсичность (цикло)алканов, жирных спиртов, ароматических углеводов, фенолов и терпеноидов объясняется их встраиванием в СМ. Накопление этих органических растворителей в мембранном матриксе не только влияет на взаимодействия типа липид-липид и липид-вода, но и изменяет конформацию гидрофобных доменов в мембранных белках. Вследствие этого нарушаются функции СМ, в частности ее избирательная проницаемость.

Чувствительность к липофильным соединениям зависит от их типа (например, этанол начинает действовать в концентрации ~1%, а толуол ~0,1%), а также от природы объекта (как правило, ниже у грамотрицательных бактерий). Среди высоко толерантных форм выделяются *Lactobacillus heterohiochii*, растущая в 20%-ном этаноле, и штаммы *Pseudomonas putida*, растущие в двухфазной системе, содержащей 90% ароматических углеводов. Отметим, что во втором случае мы имеем дело с бактериями, перспективными в плане биоремедиации.

Ответ при данном токсическом стрессе осуществляется, в первую очередь, по принципу модификации мишени. Поскольку липофильные соединения воздействуют на мембранный матрикс аналогично повышенной температуре, то, как и при тепловом шоке, запускается механизм гомеовязкостной адаптации: путем изменения липидного состава (повышение доли длинноцепочечных жирных кислот; замена цис-ненасыщенных изомеров транс-изомерами) мембрана возвращается к жидкостно-кристаллическому состоянию. Наряду с этим, «исправление» упаковки липидов и общая стабилизация структуры мембраны обеспечиваются, как при термических стрессах или водном и осмотическом стрессе, за счет накопления осмопротекторов, в частности трегалозы (см. раздел 19.1.2). Наконец, при токсическом стрессе, вызванном липофильными соединениями, в ответе принимают участие белки теплового шока (см. раздел 19.1.1).

Стресс, вызванный неорганическими ионами. Ионы незаменимых тяжелых металлов, в частности железа, меди и цинка, служат аллостерическими регуляторами ферментов, компонентами биоэнергетических систем и т. д. Однако если они присутствуют в количестве, превышающем нормальные физиологические потребности, это угрожает жизнеспособности и вызывает токсический стресс. В то же время некоторые неорганические ионы, например катион ртути или анион арсената, обычно не только не участвуют в функционировании клеточных структур, но и токсичны в любой концентрации.

Уровень незаменимых неорганических ионов в цитоплазме поддерживается за счет транскрипционного контроля над системами, отвечающими за их транспорт и инкорпорирование, а токсичные не-незаменимые ионы подлежат удалению.

При стрессе, вызванном неорганическими ионами, индуцируются механизмы, которые позволяют клетке избавиться от этих стрессоров. В соответствующих адаптационных системах обязательно используется сенсор — транскрипционный фактор, характер взаимодействия которого с ДНК изменяется в результате связывания иона-лиганда.

Транскрипционные факторы устойчивости. Регуляторы транскрипции оперонов устойчивости к неорганическим ионам, выполняющие роль репрессоров или активаторов, относятся к двум отдаленно родственным семействам — MerR и SmtB/ArsR.

Регуляторные белки семейства MerR в отсутствии стрессора действуют как репрессоры, но после его связывания становятся активаторами. В качестве примеров можно назвать белки CoaR (*Synechocystis* sp.), CueR (*E. coli*), MerR (*E. coli*), PbrR (*Ralstonia metallidurans*) и ZntR (*E. coli*), лигандами для которых служат, соответственно, катионы Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} и Zn^{2+} .

Белки семейства MerR содержат N-концевой ДНК-связывающий мотив НТН, характерный для многих транскрипционных регуляторов, в частности, для CAP-белков (см. раздел 18.3.2.2) или для белка DtxR (см. раздел 18.3.2.5), а также C-концевой сайт для лигандирования токсичного иона. Активация или репрессия происходит при взаимодействии димера MerR-белка с операторным сайтом MerO, расположенным между блоками -35 и -10 промотора. В случае MerR-зависимых оперонов эти блоки разделены аномально длинным, >17 н., спейсером (см. раздел 16.7.1.1), что даже в отсутствии репрессора приводит к «вялой» транскрипции. Связывание Mer-белка с лигандом изменяет конформацию ДНК в центре оператора, что сближает блоки -35 и -10, которые начинают продуктивно взаимодействовать с РНК-полимеразой.

В отличие от белков семейства MerR, белки семейства SmtB/ArsR действуют исключительно как репрессоры. Примерами служат белки ArsR (*E. coli*), CadC (*Staphylococcus aureus*), NmtR (*Mycobacterium tuberculosis*) и SmtB (*Synechococcus* sp.), лигандами для которых становятся, соответственно, ионы AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} . Некоторые члены этого семейства являются сенсорами нескольких катионов, например, закодированный в плазмиде pI258 белок CadC реагирует на Bi^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} и Zn^{2+} .

В отсутствии стрессора димеры белков семейства SmtB/ArsR связываются с промотор-операторным участком ДНК при помощи мотива НТН. При этом опероны резистентности репрессируются. Но когда токсичный ион внедряется в консервативный бокс Glu-Leu-Cys-Val-(Cys/Gly)-Asp, репрессор теряет связь с ДНК, т.е. лиганд проявляет себя как негативный аллостерический регулятор. В частности, при лигандировании катионов Bi^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} или Zn^{2+} сродство белка CadC к ДНК уменьшается в 170–340 раз.

Опероны устойчивости к катионам и оксианионам тяжелых металлов или металлоидов (Ag^+ , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , Zn^{2+} и др.) содержатся в хромосомах, плаزمидах или транспозонах. Они широко распространены у бактерий, однако не найдены у архей. Гены этих оперонов кодируют авторегуляторные факторы, а также «рабочие» компоненты защитных систем.

Адаптационная защита осуществляется с помощью двух основных механизмов: экскреции и детоксикации.

При экскреции используются два типа транспортных систем — мембранные Р-АТФазы, расходующие энергию АТФ, и «хемиосмотические» антипортеры, расходующие Pmf (см. II том учебника).

При детоксикации токсичные неорганические ионы путем (не)ферментативного

восстановления превращаются в менее опасные соединения, которые активно или спонтанно выводятся из клетки.

Примером ферментативного восстановления служит превращение токсичного катиона Hg^{2+} в малорастворимую и летучую форму Hg^0 . Восстановление происходит при помощи НАДФН-зависимой цитоплазматической редуктазы MerA, продукта оперона *mer*. Вторым продуктом этого оперона является регулятор MerR (см. выше). Третий продукт, белок MerB, разрывает химическую связь Hg–C в используемых для дезинфекции ртути-органических соединениях, примером которых является фенилмеркуриацетат.

Неферментативное восстановление токсичных металлов известно у некоторых цианобактерий. Оно осуществляется с помощью *металлотхионеинов* — небольших белков (~60 а.о.), в состав которых входят до десяти остатков Cys. Образование металлотхионеина SmtA негативно регулируется белком SmtB (см. выше).

Стресс, вызванный лекарственными препаратами. В данном случае адаптационный ответ связан с использованием механизма *множественной лекарственной устойчивости* (англ. multidrug resistance, MDR). Ее можно определить, как способность выдерживать обычно летальные дозы сразу нескольких лекарственных препаратов. Неудивительно, что MDR является острой проблемой при бактериальных и грибковых инфекциях, а также при терапии злокачественного роста.

В случае бактерий MDR основана на экскреции токсикантов с помощью MDR-транспортеров, в частности ABC-транспортеров (см. I том учебника). Гены MDR-транспортеров регулируются транскрипционными факторами, причем индукторами или коактиваторами являются разнообразные лекарственные препараты, служащие субстратами для этих транспортеров. Иными словами, транскрипционные факторы выполняют роль цитоплазматического MDR-сенсора однокомпонентной сигнальной системы и реагируют на стрессор, т. е. на неустранимый лекарственный препарат. Важно отметить, что сенсор претерпевает конформационное изменение под воздействием гетерогенных лигандов. Это позволяет дать стандартный ответ при токсическом шоке, вызванном стрессорами разной структуры, которые поражают разные мишени.

Ответ при рассматриваемом токсическом стрессе выражается в индукции или активации генов MDR-транспортеров.

Активаторы генов, кодирующих MDR-транспортеры, принадлежат к семействам MerR, AraC и LysR. В свою очередь, репрессоры этих генов относятся к семействам TetR, MarR и LacI. Рассмотрим важнейшие примеры.

Негативная регуляция белком MarR (сокр. англ. multiple antibiotic resistance). Транскрипционный фактор MarR негативно контролирует регулон *mar*, обеспечивающий устойчивость *E. coli* к разнообразным, актуальным для медицины антибиотикам.

В отсутствии стресса димер белка MarR (144 а.о.) связан с хромосомной ДНК в локусе *marO*, расположенном между геном *marC* и опероном *marRAB*, что подавляет экспрессию последнего. При стрессе белок MarR взаимодействует с транспортируемыми субстратами-индукторами, в результате чего оперон *marRAB* дерепрессируется. Продукт экспрессии гена *marA*, транскрипционный фактор MarA, связывается с короткими (20 п.н.) непалиндромными операторами, что активирует транскрипцию >60 подконтрольных генов, в том числе генов, кодирующих MDR-транспортеры.

Позитивная регуляция белком BmrR (сокр. англ. bacterial multidrug resistance regulator). Транскрипционный фактор BmrR, характерный для *B. sub-*

tilis и принадлежащий к семейству регуляторов MerR (см. выше), активирует транскрипцию гена MDR-транспортера, субстратами которого служат токсичные липофильные катионы.

При стрессе С-концевой участок белка BmrR взаимодействует с транспортируемыми субстратами-коактиваторами, что способствует взаимодействию N-концевого участка (содержащего характерный НТН-мотив) с хромосомной ДНК. Благодаря этому активируется транскрипция ряда генов, в том числе гена *bmr*, кодирующего MDR-транспортер.

Негативная регуляция белком QacR (сокр. англ. quaternary ammonium compounds). Транскрипционный фактор QacR, характерный для *Staphylococcus aureus* и принадлежащий к семейству регуляторов TetR, уникален тем, что он кодируется плазмидой, которая дополнительно содержит гены устойчивости к антибиотикам.

В отсутствие стресса белок QacR связывается с псевдопалиндромной *downstream*-последовательностью в плазмидной ДНК и репрессирует транскрипцию, препятствуя образованию открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором гена *qacA*, кодирующего MDR-транспортер. При стрессе белок QacR взаимодействует с транспортируемыми субстратами-индукторами (катионными липофильными антисептиками, дезинфицирующими средствами и цитотоксинами) и покидает сайт связывания с ДНК.

19.2. ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ СТРЕСС

От наружной мембраны и периплазматического компартмента зависит жизнедеятельность грамотрицательных бактерий. Нарушение их целостности и/или функционирования вызывает *периплазматический стресс* (синонимы – экстрацитоплазматический стресс, мембранный стресс).

При периплазматическом стрессе *E. coli* использует два разных механизма ответа. Первый из них контролируется альтернативным сигма-фактором σ^E , а второй – двухкомпонентной сигнальной системой CpxA/CpxR.

Ответ с помощью альтернативного сигма-фактора σ^E . Сигма-фактор σ^E , относящийся к ЕСФ-подгруппе альтернативных сигма-факторов группы 3 (см. раздел 18.1.1.1), активируется в результате нарушения фолдинга белков, локализованных в ОМ или в периплазматическом компартменте. Хотя σ^E участвует, прежде всего, в периплазматическом стрессе, он активируется и при некоторых цитоплазматических стрессах, вызывающих денатурацию белков, например, при тепловом шоке или токсическом стрессе. Сигма-фактор σ^E взаимодействует в общей сложности с 47 промоторами, под контролем которых находятся ~100 генов. Большинство из них отвечает за биосинтез и фолдинг белков ОМ, а также биосинтез липополисахаридов. В частности, с помощью σ^E транскрибируются гены адаптивного ответа, кодирующие шапероны и протеазы, которые обеспечивают фолдинг белков в периплазматическом компартменте или расщепляют неправильно уложенные белки.

В отсутствие стресса транскрипционная активность σ^E блокируется «родственным» мембраносвязанным антисигма-фактором RseA, цитоплазматический N-концевой домен которого встраивается между двумя промотор-распознающими доменами σ^E и препятствует взаимодействию последнего с кор-ферментом РНК-полимеразы.

При стрессе сигнал, свидетельствующий о нарушении состояния клеточной оболочки, передается сигма-фактору σ^E посредством *регулируемого интрамембранного протеолиза* (англ. regulated intramembrane proteolysis; Rip), т. е. процессинга антисигма-фактора RseA с использованием двух последовательно действующих мембраносвязанных ферментов: сериновой протеазы DegS, играющей роль сенсора, и цинковой протеазы RseP (YaeL). После расщепления цитоплазматического домена антисигма-фактора RseA по остаткам Val-148 и Ser-149 сигма-фактор σ^E освобождается и присоединяется к кор-ферменту РНК-полимеразы.

DegS переходит в активное состояние в результате взаимодействия с поринами, фолдинг которых нарушается под воздействием стрессора, и они приобретают развернутую конформацию. При этом С-концевой мотив Tyr-X-Phe неправильно уложенного порина связывается с PDZ-доменом протеазы DegS, устраняя внутреннее ингибирование ее активности.

PDZ-домен представляет собой последовательность из 80-90 а.о., имеющуюся в сигнальных белках бактерий, дрожжей, растений и животных. Акроним PDZ происходит от сокращенных названий трех белков — post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor (DlgA) и zonula occludens-1 protein (zo-1), у которых в первую очередь был выявлен этот общий домен.

Ответ с помощью двухкомпонентной сигнальной системы СrxА/СrxR. Как и при ответе с помощью сигма-фактора σ^E , при ответе с помощью сигнальной системы Сrx (сокр. англ. conjugative pilus; у штаммов с мутацией по гену *сrxА* нарушена сборка F-фимбрий и, соответственно, конъюгативный перенос F-плазмиды) сенсор воспринимает искажение фолдинга белков и активирует экспрессию генов, кодирующих системы правильной укладки или дегградации неправильно уложенных белков. Однако в данном случае используется не однокомпонентная, а двухкомпонентная сигнальная система, состоящая из сенсора, мембранной гистидинкиназы СrxА и цитоплазматического регулятора СrxR.

В отсутствии стресса сенсор СrxА образует комплекс с периплазматическим ингибитором СrxР. Под воздействием стрессора у *E. coli* (характерным примером является сдвиг рН среды в щелочную сторону) нарушается фолдинг периплазматических белков, в частности субъединиц Р-фимбрий. Они связываются с ингибитором и деблокируют сенсор СrxА. Активированный сенсор передает сигнал регулятору СrxR, который активирует экспрессию до 14 генов регулона Сrx, в число которых входят гены шаперонов, обеспечивающих фолдинг белков, и гены протеаз, устраняющих неправильно уложенные белки.

* * *

Экологические стрессы, послужившие темой этой главы, а также регуляторные системы, рассмотренные в предыдущей главе, имели отношение к *автоэкологии* прокариотов, т. е. индивидуальному существованию во взаимодействии с абиотическими факторами среды.

Теперь нам предстоит перейти к *синэкологии* прокариотов и проанализировать отдельные формы симбиозов, в которых участвуют бактерии или археи, обладающие разной степенью генетической автономии и разными физиологическими свойствами.

ГЛАВА 20

СИНЭКОЛОГИЯ

To seek another's profit,
And work another's gain.
(Искать нужду другого,
Чтоб пользу дать ему).

R. Kipling. The Five Nations (London, 1903).

Синэкология (от греч. *syn* — вместе и *oikos* — жилище; в данном случае — экология совместного существования) изучает взаимодействие между гетерологичными организмами, т. е. разными видами. Этим она отличается от *автоэкологии* (от греч. *avtos* — сам один и *oikos* — жилище; в данном случае — экология независимого существования), или научной области, посвященной взаимодействию особи или популяции особей одного и того же вида с абиотическими факторами внешней среды; отдельные примеры автоэкологических явлений были рассмотрены в предыдущей главе.

Конкретные формы синэкологических взаимодействий называются *симбиозами*, а их участники, или партнеры — *симбионтами*.

Термин «симбиоз» (греч. *symbiosis* — совместная жизнь) впервые прозвучал в 1878 г. в научном докладе немецкого ботаника и микробиолога Генриха Антона де Бари (H. A. de Bary; 1831–1888). Согласно де Бари, симбиоз — это *совместная жизнь разноименных организмов* (нем. «... Zusammenleben ungleichnamiger Organismen...»). Иными словами, это любая форма ассоциации между организмами, принадлежащими к разным видам.

Официальной датой рождения термина «симбиоз» считается 1879 г., когда де Бари посвятил ему специальную публикацию, а вскоре после этого, благодаря работам по микоризе немецкого микробиолога Альберта Бернхарда Франка (A. B. Frank; 1839–1900), он прочно вошел в научный обиход.

В настоящее время используется уточненное определение симбиоза, как «... ассоциации между организмами, которая способствует либо благополучию, либо неблагоприятию хотя бы одного из партнеров». Его дал в 1975 г. американский микробиолог Мортимер Старр (M. P. Starr). В монографии Смита (D. C. Smith) и Дугласа (A. E. Douglas), изданной в 1987 г., дополнительно указывается на кратковременный или перманентный характер симбиотической ассоциации. Таким образом, понятие «симбиоз» охватывает широкий круг связей от нейтральных и взаимовыгодных до антагонистических, а также разной продолжительности.

Де Бари различал *мутуализм* (лат. *mutuum* — взаимность), когда партнеры взаимно полезны друг другу, и *паразитизм* (греч. *parasitos* — нахлебник) — когда один из партнеров питается за счет другого, в той или иной мере причиняя ему вред.

К настоящему времени арсенал терминов, обозначающих разные формы симбиозов и симбиотических взаимоотношений, значительно расширился. Некоторые из них, например *консорция*, используются в разном смысле в частных разделах биологии (см. ниже), тогда как другие являются универсальными. Так, стихотворный эпиграф к настоящей главе описывает ситуацию *паразитизма*.

В ходе эволюции прокариоты образовали разнообразные симбиотические ассоциации между собой или с другими живыми существами неклеточного или клеточного строения. Критерии, используемые при классификации симбиозов у прокариотов, а также их детализация, приведенные в таблице 34. требуют комментариев.

Таблица 34. Классификация симбиозов у прокариотов

Критерий	Вариант согласно критерию*
Партнер	Вирус
	Другой прокариот
	Протист
	Гриб
	Растение
	Животное
Число партнеров	Бипартитный
	Мультипартитный
Временной характер симбиотической ассоциации	Непрерывная
	Циклическая
Локализация относительно партнера	Эпibiоз
	Квази-эндоцитобиоз
	Эндоцитобиоз
	Эктобиоз
	Эндобиоз
Зависимость от партнера	Факультативный симбиоз
	Облигатный симбиоз
	Ксеносома
Взаимодействие с генетическими системами партнера	С интеграцией в состав генома
	Без интеграции в состав генома
Использование метаболитов партнера	Мутуализм
	Паразитизм
	Комменсализм
Вклад в метаболизм партнера	Фотосинтез
	Хемосинтез
	Дiazотрофия
	Образование полезного метаболита
	Устранение вредного метаболита

* Объяснение в тексте.

Партнеры прокариота. В большинстве случаев партнером прокариота по симбиозу является ядерный организм, который из-за своего большего размера обозначен термином «старший партнер», или «хозяин». Соответственно, партнер меньшего размера называется «младшим».

Больше всего распространены симбиозы прокариотов с ядерными организмами. Важнейший пример — это возникшая 1,5 млрд лет назад ассоциация между цианобактерией и/или α -протеобактерией и протоэукариотным хозяином. В ходе

дальнейшей эволюции младшие партнеры приобрели статус полуавтономных цитоплазматических органелл — соответственно, пластид и митохондрий.

Примером широко распространенного и имеющего глобальное значение факультативного партнерства между прокариотами и ядерными организмами служит симбиоз клубеньковых бактерий с бобовыми растениями (см. раздел 20.3.3).

На втором месте находятся симбиозы между прокариотами и вирусами. Геном младшего партнера может интегрироваться в геном прокариотного хозяина; при этом часть генов профага способна экспрессироваться, что изменяет фенотип хозяина и наделяет последнего новыми функциями (примером служит приобретение ранее безвредными бактериями факторов вирулентности или патогенности, например токсинов; см. раздел 16.6.1.3). Литические фаги, которые реплицируются без интеграции в геном хозяина, также могут — для более успешной репродукции — временно придавать хозяину селективно-полезные признаки или активизировать его метаболизм. В частности, в геноме некоторых фагов имеются гены, отвечающие за рецепцию и поглощение ортофосфата (что особо актуально в среде, бедной фосфором), а также гены, обеспечивающие защиту от окислительного стресса. Еще более ярким примером служат литические фаги цианобактерий *Prochlorococcus* spp. и *Synechococcus* spp., в геноме которых содержатся гены *psbA* и *psbD*, кодирующие апопротеины ФСII, а также гены пластоцианина (*petE*) и ферредоксина (*petF*). Эти гены на 85–95% гомологичны генам хозяина и экспрессируются до его лизиса, что компенсирует снижение уровня экспрессии хозяйского генома и обеспечивает высокую интенсивность фотосинтеза для максимальной репродукции вирионов.

Третье по встречаемости место занимают симбиозы между разными прокариотами (см. ниже). Однако не исключено, что такой вывод поспешен, не отражает реальное положение вещей и вызван фрагментарным характером, а также неполнотой наших знаний.

Число партнеров. Симбиоз бывает *бипартитным* (от лат. bi — двух- и pars — часть), в котором участвуют два партнера, либо *мультипартитным* (от лат. multus — много разных и pars — часть), когда партнеров несколько.

Временной характер симбиотической ассоциации с участием прокариотов. Понятие «симбиоз» предусматривает физический контакт между партнерами на протяжении значительной части их онтогенеза. Непрерывный контакт наблюдается в случае вертикального наследования младшего партнера при размножении хозяина, например, насекомого (см. раздел 20.3.4.2). Максимально выраженный непрерывный контакт имеет место в случае пластид и митохондрий.

Прекращение и возобновление контакта приводит к цикличности ассоциации — в частности, многие циклические симбиозы наблюдаются у зооантогенных бактерий (*Legionella pneumophila*, *Leptospira* spp., *Listeria* spp. и др.), у светящихся бактерий (*Photobacterium fisheri*, *Vibrio* spp.), а также у diaзотрофных эктобионтов и эндоцитобионтов растений (*Anabaena* spp., *Nostoc* spp. и *Rhizobium* spp.).

Локализация прокариота относительно партнера. Поскольку из-за отсутствия у прокариотов механизма эндоцитоза одна клетка не может попасть в цитоплазму другой, симбиотические ассоциации между двумя прокариотами принимают форму либо *эпibiоза* (поверхностное взаимодействие), либо *квази-эндоцитобиоза* (проникновение в периплазматический компартмент). Эпibiоз возможен также между прокариотом и протистом (см. ниже).

Чрезвычайно распространенной симбиотической ассоциацией между прокарио-

тами и ядерными клетками является *эндоцитобиоз*, когда младший партнер поселяется в цитоплазме, фагоцитарной вакуоли или ядре хозяина.

Наконец, прокариоты могут взаимодействовать с поверхностью высших растений или животных, т. е. могут быть *эктобионтами*, а также могут находиться во внеклеточном пространстве внутри тела хозяина, т. е. выступать в качестве *эндобионтов*.

Зависимость прокариота от партнера. Эволюционный процесс коадаптации неизбежно приводит к геномным перестройкам, как правило, сильнее выраженным у младшего партнера. Часто это связано с делетированием фрагментов генома, что может сопровождаться их горизонтальным переносом в геном хозяина.

При сохранении метаболической автономии младшего партнера симбиоз может носить *факультативный* характер, т. е. прокариот способен размножаться вне хозяина.

В свою очередь, *облигатный симбиоз* вызван отсутствием у прокариота незаменимых метаболических систем, в том числе систем для ассимиляции энергии, что наблюдается в случае «энергетических» паразитов — риккетсий и хламидий, на помощь которым приходит хозяин, осуществляя *заместительный метаболизм* (англ. *substitutive metabolism*). Иногда хозяин берет на себя не только энергообеспечение младшего партнера, но и снабжает его первичными метаболитами (например, нуклеотидами) или кофакторами редокс-ферментов (например, НАДФН).

Несмотря на существенную редукцию генома, не позволяющую облигатным внутриклеточным паразитам размножаться вне хозяина, в их жизненном цикле появляется покоящаяся расселительная стадия. Этого никогда не бывает у митохондрий и пластид, которые приобрели статус полуавтономных цитоплазматических органелл, или *ксеносом* (см. раздел 20.4) и не покидают клетку хозяина.

Использование прокариотом метаболитов партнера. Термины «мутуализм» и «паразитизм» применяются в первоначальном смысле, как понимал де Бари. Терминами «синтрофия» (от греч. *syntrophos* — вместе вскормленный), или «метабиоз» (от греч. *meta* — смена и *bios* — жизнь; «жизненная преемственность») обозначается такая мутуалистическая ассоциация, в которой продукт переработки субстрата одним партнером становится субстратом для другого партнера. Наконец, термином «комменсализм» (от лат. *com-mensa* — совместная трапеза) обозначается такая форма симбиоза, когда один из партнеров поселяется в теле другого, не вступая с ним в метаболические взаимоотношения.

Вклад прокариота в метаболизм партнера. Метаболическая логика важнейших симбиозов основана на уникальной способности прокариотов к фотосинтезу, хемосинтезу или diaзотрофии.

В специфических ситуациях младший партнер обеспечивает старшего партнера аминокислотами (см. раздел 20.3.4.2). С другой стороны, он может устранять вещества, тормозящие метаболические процессы хозяина.

В качестве примера можно привести синтрофную эндоцитобиотическую ассоциацию между анаэробными протистами и метаногенными археями. В частности, в фагоцитарных вакуолях ресничных инфузорий *Metopus contortus*, *M. palaeformis* и *Plagiopyla frontata* содержатся метаногены *Methanobacterium formicicum* или *Methanoplanus endosymbiosus*. Симбиосомы контактируют с гидрогеносомами (см. раздел 20.4.2), что обеспечивает *межвидовой перенос водорода*. Получая энергию за счет «автотрофного» синтеза метана из H_2/CO_2 или «гетеротрофного» синтеза метана из ацетата (см. II том учебника), младший партнер устраняет эти потенциальные ингибиторы, что позволяет хозяину осуществлять окислительные реакции в термодинамически выгодных условиях.

Наконец, младший партнер может синтезировать узкоспецифичные экзопродукты, дающие хозяину определенные селективные преимущества. В качестве примера назовем целлюлазы и хитиназы (в случае морских червей-древоточцев сем. *Terebrenidae*), а также цитотоксины (в случае паразитической амебы *Acanthamoeba* sp.).

20.1. ЭПИБИОЗ

Термином «эпибиоз» (англ. epibiosis; от греч. *epi* — на и *bios* — жизнь; «существование, основанное на поверхностном взаимодействии») обозначается такой симбиоз, когда прокариот вступает во внешнюю, чаще всего метаболическую ассоциацию с другим прокариотом или протистом.

Если партнеры непосредственно соприкасаются поверхностями, то меньший партнер называется *эпибионтом*.

Эпибиоз между двумя прокариотами. В физиологическом плане эпибиоз между прокариотами принимает взаимовыгодную форму мутуализма (в частности, синтрофии) или, наоборот, паразитизма.

Мутуализм. Мутуалистические взаимоотношения между прокариотами варьируют от одностороннего позитивного воздействия до полной взаимной зависимости.

Например, один из партнеров выделяет аминокислоты или витамины, которые используются другим партнером — природным ауксотрофом по этим соединениям (см. раздел 16.6.1.1).

Возможны и такие ситуации, когда один из партнеров утилизирует соединения, вредные другому партнеру. В частности, метанотрофные бактерии, ключевым метаболитом которых является метанол, сосуществуют с метилотрофом *Hyphomicrobium* spp., уменьшающим концентрацию этого потенциального токсиканта. Аналогичным образом, с гетероцистами цианобактерий часто бывают ассоциированы бактерии, поглощающие кислород — ингибитор нитрогеназы.

Примером более тесной кооперации прокариотов служит синтрофия у представителей анаэробного деструктивного сообщества (см. II том учебника). Так, «автотрофные» и «гетеротрофные» метаногены используют в энергетических целях H_2/CO_2 и ацетат — продукты сбраживания моносахаров и полисахаридов бактериями *Clostridium* spp., что позволяет последним использовать больше субстрата, повышая выход АТФ.

Классическим случаем синтрофии является двухстадийный процесс автотрофной дыхательной нитрификации, который последовательно осуществляют нитрозо- и нитробактерии: (1) $NH_3 + 3/2O_2 \rightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$; (2) $NO_2^- + H_2O \leftrightarrow NO_3^- + 2H^+/2e^-$ (см. II том учебника).

В глобальном масштабе важнейшее значение имеет синтрофия на основе межвидового переноса водорода. В качестве примера можно назвать целлюлолитическую бактерию *Ruminococcus albus*, которая является одним из основных обитателей рубца жвачных животных. Она катаболизирует глюкозу с образованием пирувата, который, в свою очередь, подвергается фосфорокластическому расщеплению с образованием водорода. Водород незамедлительно утилизируется партнерами *R. albus* (обычно это метаногенные археи *Methanobrevibacter ruminantium* и *M. smithii* или бактерия *Wolinella succinogenes*). В последнем случае водород используется в качестве донора электронов при фумаратном дыхании.

Паразитизм. Случаи паразитизма, или питания одного партнера за счет другого, часто без причинения ему внешне заметного вреда, исключительно редки. В качестве примера можно привести уникальную ассоциацию между двумя археотами — хозяином *Ignicoccus* sp. и младшим партнером «*Nanoarchaeum equitans*», подробно описанную в I томе учебника.

Паразитизм, принимающий крайнюю форму хищничества, известен на примере симбиотической ассоциации с участием скользящих бактерий *Cytophaga* spp. или *Mycosoccus* spp., которые образуют микроколонии (сферулы) вокруг трихомов цианобактерий из рода *Phormidium*. Благодаря активной секреции протеаз, липаз, глюкозаминидаз, эндопептидаз и других ферментов они разрушают клеточную оболочку жертвы.

Эпибиоз между прокариотом и протистом. Документированные случаи эпибиозов прокариотов с протистами довольно редки, однако это не означает, что такие ассоциации мало распространены в природе. В качестве примера можно привести инфузорию *Streblo mastix strix*, населяющую кишечник термитов *Zootermopsis angusticollis* и *Z. nevadensis*. В глубоких бороздах на ее поверхности помещаются палочковидные бактерии, которые выполняют сенсорную функцию, наделяя хозяина способностью к хемотаксису по отношению к ацетату.

20.1.1. Микробные маты

Широко распространенным вариантом эпибиотической ассоциации являются микробные *маты* (англ. microbial mat). Они представляют собой макроскопические смешанные колонии с очень высокой плотностью популяций, прикрепленные ко дну морских или континентальных водоемов. Помимо живых клеток в состав мата входит мортмасса и продукты биоминерализации (см. I том учебника).

В зависимости от занимаемой ниши, микробные маты в той или иной степени стратифицированы, что находит отражение в их слоистой структуре. Отдельные слои, толщина которых в разных случаях варьирует от нескольких микрометров до нескольких миллиметров, различаются по видовому составу доминирующих бактерий.

Причиной образования слоев являются элективные условия в разных горизонтах, которые зависят от среды обитания (примером служат «цианобактериальные» маты в термальных источниках) и активно создаются биологическими компонентами самого мата.

Очень часто микробные маты имеют трехслойную структуру. Во встречных градиентах концентрации кислорода/солнечной радиации и сульфида по соседству друг с другом формируются слои бактерий с контрастными типами метаболизма — верхний аэробный слой (цианобактерии), промежуточный микроаэробный слой (аноксигенные фототрофные бактерии) и нижний анаэробный слой (хемогетеротрофные бактерии, осуществляющие брожение или серазависимое дыхание).

В зависимости от типа мата, промежуточный слой могут образовывать зеленые несерные бактерии из филы BVI *Chloroflexi* (прежде всего, *Chloroflexus aurantiacus*) или пурпурные серные бактерии из филы BXII *Proteobacteria* (особенно *Thiocapsa roseopersicina*). Во втором случае с ними часто конкурируют бесцветные серные бактерии (например, *Thiobacillus* spp.) из той же филы.

Структурной основой и трофическим фундаментом мата служат цианобактерии (в частности, «*Synechococcus lividus*»). Другие фототрофные компоненты мата, за исключением пурпурных серных бактерий, относятся к фотогетеротрофам или факультативным хемоорганогетеротрофам и зависят от жизнедеятельности цианобактерий, используя выделяемые ими органические вещества (например, гликолат) или продукты их постмортального разложения.

Хемотрофный компонент сообщества мата в разных случаях имеет простой или сложный видовой состав. Сюда относятся как аэробы, так и анаэробы (в том числе, метаногенные археи).

Особый тип «ворсистых» микробных матов образуется на богатых сульфидом илах, а также по соседству с глубоководными гидротермами. Их основой, соответственно, служат серные бактерии *Beggiatoa* spp. и тионовые бактерии *Thiothrix* spp. Гетеротрофными компонентами таких матов являются аэробные бактерии *Nyphomonas* spp., а также анаэробные морские спирохеты.

20.1.2. Консорции

Согласно определению советского зоолога В. Н. Беклемишева, общий экологический термин «консорция» (лат. consortio — сотоварищество) обозначает единицу биоценоза, состоящую из автотрофов, которые пространственно и трофически объединены с гетеротрофами. Например, консорцией является дерево (или группа деревьев), с которыми ассоциированы животные-фитофаги, микоризные грибы и актиноризоидные бактерии, а также эпифиты, гнездящиеся птицы и т. д.

Микробиологический смысл термина «консорция» иной и более конкретный: так называют *высокоупорядоченную и устойчиво воспроизводящуюся в ряду поколений симбиотическую ассоциацию двух или более прокариотных партнеров.*

Разночтения, связанные с употреблением термина «консорция», касаются не только микробиологии, но и такого традиционного раздела ботаники, как лихенология. Известно, что в состав би-партитных и трипартитных лишайников входят diaзотрофные цианобактерии, которые снабжают партнера-микобионта продуктами автотрофной ассимиляции углерода и азота. Встречный вклад микобионта в симбиотическую ассоциацию менее очевиден, и в разных случаях может интерпретироваться как мутуализм или паразитизм. С соответствующими уточнениями термин «консорция» можно применить и по отношению к лишайникам. В любом случае, поскольку лишайники состоят из разных организмов, их видовые названия столь же не легитимны, как и видовые названия прокариотных консорций (см. ниже).

Прокариотные консорции, обнаруженные в разных местообитаниях микроскопическими методами, весьма разнообразны — в настоящее время известно свыше 15 морфотипов таких ассоциаций. В качестве примеров можно привести: (1) консорции палочковидных метаногенных архей и нитчатых спорообразующих бактерий, обитающие в кишечнике термитов; (2) консорции метанококков и сульфатредуцирующих бактерий, встречающиеся в морских илах; (3) консорции гетеротрофных бактерий с гетероцистами цианобактерий; (4) початковидные консорции «зубных» стрептококков и мицелиальной актинобактерии *Corynebacterium matruchotii* в ротовой полости человека; (5) консорции сульфатредуцирующей бактерии *Desulfonema* sp. и бесцветной серной бактерии *Thioploca* sp. и т. д.

Наиболее изучены фототрофные консорции, открытые в начале XX в. Лаутерборном (R. Lauterborn) и Будером (J. Buder). Они состоят из хемотрофного кора (клетки или агрегата клеток) и фототрофной периферии (одного или нескольких

слоев эпибионтов). В большинстве случаев такая консорция подвижна за счет жгутика, которым снабжена клетка кора.

Фототрофные консорции богато представлены в стратифицированных меромиктических водоемах. Они составляют до 20% бактерий и ~60% биомассы хемоклина, что свидетельствует об их роли в круговороте углерода и серы в пресноводных экосистемах (см. ниже).

В настоящее время известно семь морфотипов подвижных фототрофных консорций, которые различаются цветом и формой эпибионтов, а также отсутствием или присутствием газовых везикул (см. I том учебника): (1) «*Chlorochromatium aggregatum*» (цилиндрическая консорция с зелеными палочковидными эпибионтами); (2) «*Pelochromatium roseum*» (цилиндрическая консорция с коричневыми палочковидными эпибионтами); (3) «*Chlorochromatium glebulum*» (изогнутая консорция с зелеными палочковидными эпибионтами, содержащими газовые везикулы); (4) «*Chlorochromatium magnum*» (кор из бесцветных клеток, окруженный зелеными эпибионтами); (5) «*Pelochromatium roseo-viride*» (кор из коричневых клеток, окруженный зелеными эпибионтами); (6) «*Chlorochromatium lunatum*» (зеленые эпибионты в форме полумесяца) и (7) «*Pelochromatium selenoides*» (коричневые эпибионты в форме полумесяца).

Кроме того, описаны два типа неподвижных консорций — «*Chloroplana vacuolata*» и «*Cylindrogloea bacterifera*», которые представляют собой плоские пластины, образованные слоями бесцветных бактерий и зеленых бактерий с газовыми везикулами.

Поскольку консорции состоят из разных бактерий, их бинарные названия нелегитимны и приводятся в кавычках.

Согласно результатам молекулярно-филогенетического анализа, кор консорции образуют представители класса «*Betaproteobacteria*», а эпибионты относятся к одному из кластеров филы ВХI *Chlorobi*.

Участники консорций обычно не растут по отдельности (первые накопительные культуры «*Chlorochromatium aggregatum*» получены совсем недавно), что может объясняться как частичной потерей генетической автономии, так и специфическими трофическими потребностями, невозпроизводимыми в монокультуре. По современным представлениям, фототрофные консорции представляют собой частный случай *сульфуреты* (англ. sulfureta), т. е. микробной ассоциации на основе цикла серы. Входящий в кор консорции гетеротрофный партнер-сульфатредуктор получает энергию за счет серного или сульфатного дыхания; образующийся сульфид используется эпибионтом (фотоавтотрофной зеленой серной бактерией) в качестве донора электронов. В зоне хемоклина — природной нише, занимаемой консорцией — сульфида обычно мало, и его постоянный приток от партнера экологически выгоден.

Наряду с тесным синтрофическим взаимодействием симбионты объединены регуляторными связями. Устойчивое воспроизведение внешнего вида консорции обеспечено координированным делением клеток кора и эпибионтов. Подвижные консорции обнаруживают скотофобический ответ (см. раздел 18.4.1.2), спектр действия которого соответствует поглощению бактериохлорофилла, что дополнительно свидетельствует о межвидовом обмене сигналами в пределах симбиотической ассоциации.

20.2. КВАЗИ-ЭНДОЦИТОБИОЗ

Термином «квази-эндоцитобиоз» (англ. quasi-endocytobiosis; от лат. quasi — как будто и греч. endon — внутри, kitos — сосуд, в данном случае — клетка и bios — жизнь; «как будто существование одной клетки внутри другой») называется такой тип симбиоза, когда одна прокариотная клетка поселяется в теле другой, но

не прямо в цитоплазме, а в периплазматическом компартменте. Иными словами, хозяин является граммотрицательной бактерией, а ее партнером становится другая бактерия, естественно, значительно меньшего размера.

В данном случае симбиотическая ассоциация между двумя прокариотами представляет собой вариант *хищничества*. Хищная бактерия проникает в периплазматический компартмент жертвы и использует продукты гидролиза ее цитоплазматических макромолекул для собственного размножения.

Самой известной хищной бактерией является *Bdellovibrio bacteriovorus*. Она размножается в теле жертвы, в частности *E. coli*, которая превращается в *бделлопласт* — округлую клетку, окруженную временно устойчивой к лизису модифицированной стенкой (англ. bdelloplast; от греч. bdella — пиявка). Находясь в окружении ОМ своей жертвы, хищник максимально обеспечен питательными субстратами.

Жизненный цикл *B. bacteriovorus* состоит из свободной *фазы атаки* и интрапериплазматической *фазы роста*. В отсутствие жертвы хищник, имеющий очень мелкий размер ($\sim 0,3 \times 1$ мкм) и быстро плавающий с помощью полярного очелюстного жгутика (до $150 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$), не размножается. Благодаря хемотаксису к аминокислотам, который повышает вероятность встречи с жертвой, хищник прикрепляется к ней — сначала обратимо/неспецифически, а затем необратимо/специфически. С помощью жгутика, который продолжает вращаться до момента его сбрасывания, а также благодаря секреции ферментов, локально разрушающих ОМ и клеточную стенку жертвы, хищник проникает в ее периплазматический компартмент, который при образовании бделлопласта сильно увеличивается в размере. Затем хищник прикрепляется к СМ бделлопласта и начинает использовать продукты деградации хозяйских макромолекул в качестве источника энергии и строительного материала (в частности, он секретирует эндо- и экзонуклеазы, расщепляющие ДНК клетки-жертвы). Предполагается, что репликация ДНК хищника и нитевидный рост его клетки контролируются в соответствии с метаболическими ресурсами жертвы, однако лежащие в основе этого регуляторные механизмы еще не изучены. По завершении репликации и роста хищник делится путем дробления (см. раздел 17.4). Когда жертвой служит *E. coli*, в бделлопласте обычно образуются четыре дочерние клетки *B. bacteriovorus*. Они приобретают жгутики и после лизиса клеточной стенки и ОМ бделлопласта переходят к новой фазе атаки.

Уникальным свойством *B. bacteriovorus* штамм W служит образование внутри бделлопласта одиночной покоящейся дифференцированной клетки — *бделлоцисты* (англ. bdelloplast). Она имеет утолщенную клеточную стенку и содержит запасной полиглюкозид, что обеспечивает повышенную устойчивость при стрессах. Таким образом, перед нами пример трех фаз развития: фазы атаки, фазы роста и фазы инцистирования.

Благодаря секвенированию генома *B. bacteriovorus* штамм HD100, проведенному в 2004 г., а также путем использования не зависящих от хозяина мутантов и на основе общего развития протеомики появилась возможность выяснить молекулярные детали этой замечательной симбиотической ассоциации.

20.3. ЭНДОЦИТОБИОЗ

Первоначально для обозначения симбиотической ассоциации, в которой младший партнер, в частности прокариот, поселяется в цитоплазме, фагоцитарной вакуоли или ядре хозяина, использовался термин *эндосимбиоз* (англ. endosymbiosis; от греч. endon — внутри и symbiosis — совместная жизнь; «внутреннее (?) сосуществование»). В настоящее время такая ассоциация переименована в *эндоцитобиоз* (англ. endocytobiosis; от греч. endon — внутри, kitos — сосуд, в данном случае — клетка и bios — жизнь; «существование одной клетки внутри другой»).

Физиологической основой важнейших эндоцитобиозов служит «автотрофный»

метаболизм младшего партнера -- фотосинтез, хемосинтез или дiazотрофия, а также его способность обеспечивать хозяина отдельными органическими соединениями, которые тот не способен создать сам по себе.

20.3.1. Эндоситобиоз на основе фотосинтеза

В случае фотосинтетического эндоситобиоза мы сталкиваемся с противоречивой и отчасти парадоксальной ситуацией. С одной стороны, эукариотная клетка получает огромное селективное преимущество, вступая в эндоситобиотическую ассоциацию с фотосинтезирующим партнером, что видно на примере пластид, произошедших от бактерий (см. раздел 20.4.1). С другой стороны, известно мало примеров, когда фотосинтезирующий эндоситобионт является именно бактерией, а не продуктом эволюционного превращения бактерии в полуавтономную органеллу-ксеносому.

Яркий пример эндоситобиоза с участием кислородной фотосинтезирующей бактерии -- это ассоциация цианобактерии «*Nostoc punctiforme*» и покрытосеменных растений рода *Gunnera* (см. раздел 20.3.3). Поскольку сам хозяин способен к фотосинтезу, он получает от младшего партнера не связанный углерод, а связанный азот.

В свою очередь, пример эндоситобиоза с участием анаэробного фототрофа -- это ассоциация неидентифицированной пурпурной бактерии и морской ресничной инфузории *Strombidium purpureum*. Помимо 200–300 анаэробных митохондрий, хозяин содержит в цитоплазме 200–700 бактериальных клеток. На свету, в анаэробных условиях они осуществляют фотолито- или фотогетеротрофию, используя побочные продукты брожения хозяина (ацетат, водород, лактат и др.). Этот синтрофический процесс позволяет хозяину получать энергию в термодинамически выгодных условиях. В темноте, при наличии кислорода бактерия катаболизирует эти же субстраты и уподобляется аэробной митохондрии.

В чем причина отсутствия «бактериальных» эндоситобиозов, основанных на фотосинтезе? Скорее всего, в ходе эволюции они не выдержали конкуренции с эффективными химерными ассоциациями между протозукариотными клетками и потомками пурпурных бактерий (митохондриями) совместно с потомками цианобактерий (пластидами).

20.3.2. Эндоситобиоз на основе хемосинтеза

Хемосинтезирующие эндоситобионты -- тионовые или метанотрофные бактерии -- имеются у многих моллюсков и погонофоров. Эти бактерии получают энергию за счет окисления восстановленных неорганических субстратов (соответственно, H_2S и CH_4) и ассимилируют CO_2 в цикле Кельвина--Бенсона--Бэссема. Младший партнер обеспечивает хозяина органическими веществами, делая его полностью независимым от фотосинтетической ассимиляции углерода, что невозможно у других животных.

Эндоситобионты моллюсков. Большинство эндоситобиозов на основе «серного» хемосинтеза встречается у двустворчатых моллюсков сем. *Lucinidae*, *Mytilidae*, *Thyasiridae* и *Vesicomidae* (подкласс *Lamellibranchia*), а также сем. *Solemydae* (подкласс *Protobranchia*).

В данном случае тионовые бактерии из класса «*Gammaproteobacteria*» скапливаются в жабрах внутри специализированных клеток, или *бактериоцитов* (англ. bacteriocyte), где они лежат поодиночке в *перибактериальных вакуолях* (англ. peribacterial vacuole). Хозяева живут в морях

и океанах на разных глубинах от литорали до абиссали (~6 км) в температурном интервале 2°–30°С. Их ниши весьма разнообразны — гидротермальные клапаны (англ. vent), «холодные» газовые просачивания (англ. seep), заросли водорослей, коралловые пески, мангровы, а также участки с высокой концентрацией органического углерода, например, сточные сбросы. В этих местах всегда одновременно присутствуют сульфид и кислород, что служит условием «серной» хемолитотрофии (см. II том учебника).

Наиболее широко распространена эндоцитобиотическая ассоциация тионовых бактерий с пластинчатожаберными моллюсками *Calyptogena* spp. и *Bathymodiolus thermophilus* (рис. 278). В данном случае у животного сохраняется рудиментарная пищеварительная система, однако она не функционирует, поскольку хозяин полностью зависит от автотрофного партнера, который передается от поколения к поколению трансвариальным путем (через ооциты). Реже встречается другой тип эндоцитобиотической ассоциации — между моллюсками сем. *Mytilidae*, процветающими в местах «холодных» газовых просачиваний, и метанотрофными бактериями.

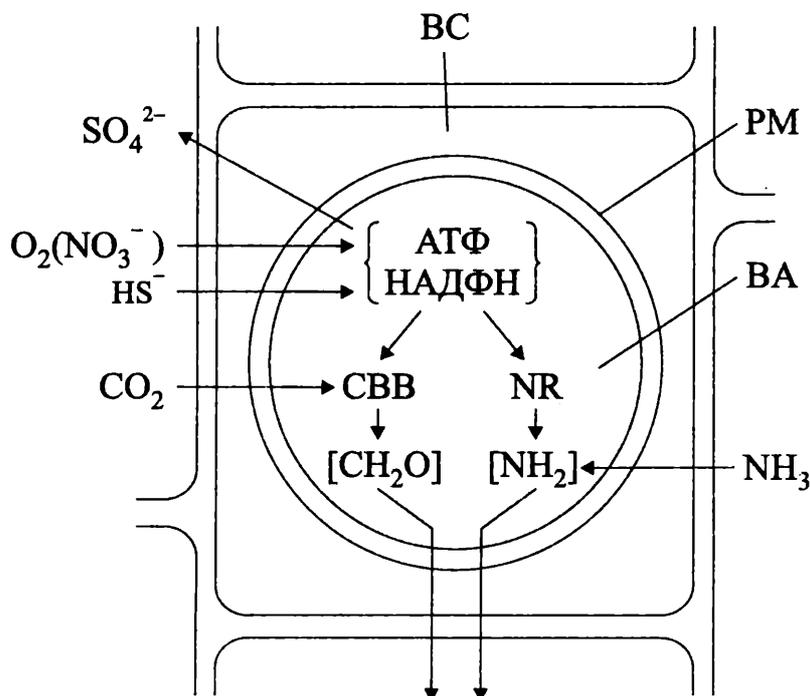


Рис. 278. Схема хемосинтетического эндоцитобиоза.

BC — бактериоцит; BA — бактериоид; PM — перибактериальная мембрана; СВВ — цикл Кальвина-Бенсона-Бэссема; NR — нитратредуктаза; $[CH_2O]$ и $[NH_2]$ — продукты ассимиляции углерода и азота, передаваемые от младшего партнера хозяину.

Эндоцитобионты погонофоров. Погонофоры, или не имеющие пищеварительной системы червеобразные животные с хитиновым чехлом, подразделяются на мелких представителей класса *Perviatea*, которые живут в рыхлых илах, и гигантских вестиментифер класса *Obturata*, которые прикреплены к твердому субстрату вокруг глубоководных гидротермальных клапанов (300 м — 3 км; в отдельных случаях до 9 км) или вокруг «холодных» газовых просачиваний. В целом, по аналогии с двустворчатými моллюсками, погонофоры приурочены к разнообразным нишам, где создаются условия для «серной» хемолитотрофии их эндоцитобионтов.

Эндоцитобионты вестиментиферы *Riftia pachyptila*, тионовые бактерии из класса «*Gammaproteobacteria*», живут внутри бактериоцитов, образующих губчатую трофосому (англ. trophosome) — орган энтодермального происхождения, рудимент пищеварительной полости. Трофосома имеет относительно большой размер (до 50% тела животного) и сильно развитую сосудистую систему (до 25% общего объема крови), доставляющую эндоцитобионту сульфид и кислород, общим перенос-

чиком которых служит растворенный гемоглобин. Проходя по щупальцам наружного «плюмажа», он насыщается кислородом, а затем отдает его бактериям в задней части тела. Одновременно с кислородом, но уже в другом сайте гемоглобин переносит сульфид в форме HS^- (рис. 278). В гипоксичных местах обитания кислород частично заменяется нитратом, который восстанавливается до NO_2^- или до N_2 . Наряду с системой доставки субстратов для хемолитотрофии хозяин обладает системой доставки CO_2 (того же типа, как у C_4 -растений; в «плюмаже» образуются малат и сукцинат, которые затем декарбоксилируются в трюфосоме).

Хозяин приобретает эндоцитобионтов не трансовариальным путем, как у моллюсков, а из окружающей среды, т. е. в результате реинфекции. Внутри трюфосомы бактерии превращаются в *бактериоциты*, т. е. в не размножающиеся, но метаболически активные клетки; по завершении своего жизненного цикла они лизируются.

Интересно, что по цитоархитектуре эндоцитобиотической ассоциации, а также по способу снабжения бактериоидов кислородом эндоцитобиоз на основе хемосинтеза конвергирует с эндоцитобиозом на основе diazotrophi: (см. ниже).

20.3.3. Эндоцитобиоз на основе diazotrophi

Младшими партнерами в diazotrophi эндоцитобиозах становятся либо цианобактерии, либо клубеньковые бактерии (ризобии); при этом хозяином является либо протист, либо высшее растение. В качестве третьего примера обычно приводят симбиоз между актинобактерией *Frankia* spp. и ольхой *Alnus* spp. (сем. *Betulaceae*), что неверно, поскольку в действительности это не эндоцитобиоз, а квази-эндоцитобиоз (см. разделы 17.5.1.2 и 20.2).

Эндоцитобиоз цианобактерий с диатомовыми водорослями и низшими грибами. Клетки морских диатомовых водорослей *Rhizosolenia* spp. (пор. *Bacillariophyceae*) содержат нитчатых эндоцитобионтов, которые образуют концевые гетероцисты и похожи на цианобактерий *Calothrix* spp. В свою очередь, эндоцитобионтами пресноводных диатомей *Rhopalodia gibba* и *R. gibberula* являются некультивируемые одноклеточные цианобактерии. В обоих случаях эндоцитобионт обладает нитрогеназной активностью, что важно для питания фитопланктона.

Факультативным эндоцитобионтом фикомицета *Geosiphon pyriforme* является diazotrophi цианобактерия рода *Nostoc*.

Эндоцитобиоз *Nostoc*—*Gunnera*. Diazotroph «*Nostoc punctiforme*» и *Gunnera* spp. вступают в факультативный эндоцитобиоз — единственный случай, когда цианобактерии поселяются внутри клеток покрытосеменного растения.

Род *Gunnera* (сем. *Haloragaceae*) был назван Карлом Линнеем в честь норвежского епископа и ботаника Гуннера (J. E. Gunnerus). Его представители (65 видов) распространены главным образом в Южном полушарии и приурочены к переувлажненным нишам, прежде всего к местам с обильными дождями; они также растут на болотах, по берегам рек, рядом с водопадами, колодцами и т. д. Среди них есть как мелкие, так и гигантские, до 6 м высотой, растения с листьями, как у ревеня, выращиваемые в декоративных целях в оранжереях или в открытом грунте (например, на Британских островах).

В основании черешков листьев *Gunnera* spp. еще до инфицирования образуются слизистые железки, которые затем заселяются цианобактериями. Предполагается, что они выделяют органические вещества, которые выступают в роли хемоаттрактантов. По достижении контакта со слизистой поверхностью железки большинство цианобактерий дифференцируется в короткие подвижные трихомы, лишенные гете-

роцист. Через каналы в эпидермисе железки они проникают в меристематическую зону, стимулируют целлюлазную активность, растворяют тонкие стенки клеток и внедряются в них посредством эндоцитоза. В эндоцитобиотическом состоянии цианобактерии растут и размножаются, заполняя основную часть интерьера хозяйской клетки. При этом они образуют большое количество гетероцист (до 80% общего числа клеток), что обеспечивает высокий уровень нитрогеназной активности.

Несмотря на низкую освещенность внутри железки, эндоцитобиотическая цианобактерия, или *цианобионт* частично сохраняет активность фотосинтетического аппарата, хотя большинство органики обеспечивает хозяин, который взамен получает продукт diaзотрофии — аммоний.

Эндоцитобиоз ризобиев с бобовыми растениями. В отличие от редких и не имеющих глобального экологического значения diaзотрофных эндоцитобиозов с участием цианобактерий, diaзотрофный эндоцитобиоз, где младшим партнером являются клубеньковые бактерии, или *ризобии* (от греч. *rhiza* — корень и греч. *bios* — жизнь; «живущее в корне») служит примером широко встречающейся и исключительно важной симбиотической ситуации.

Ризобии — это тривиальное название сборной группы бактерий из класса «*Alphaproteobacteria*» (рода *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium*), которые вступают в факультативную эндоцитобиотическую ассоциацию с представителями сем. *Leguminosae* (бобовых). Младший партнер индуцирует у хозяина образование специализированных органов — корневых или стеблевых клубеньков. Колонизируя клетки сердцевинки клубенька, вегетативные ризобии превращаются в терминально дифференцированные diaзотрофные бактериоиды, которые секретируют аммоний, используемый хозяином. Хозяин, в свою очередь, обеспечивает нитрогеназу ризобия энергией и восстановительными эквивалентами, снабжая его органическими субстратами и доставляя ему молекулярный кислород.

Клубеньки на корнях бобовых растений впервые изобразил в 1542 г. в своем ботаническом атласе немецкий естествоиспытатель Леонард Фукс (L. Fuchsius). Приоритетное описание клубеньков у бобов и фасоли, как морфологического явления *нодуляции* (от лат. *nodulus* — узелок) дал в 1675 г. итальянский анатом Марчелло Мальпиги (M. Malpighi). В 1866 г. русский ботаник М. С. Воронин обнаружил, что корневые клубеньки люпина заполнены бактериями. Наконец, доказательство того, что бактерии индуцируют образование клубеньков и обеспечивают растение азотом, привели в конце 1880-х гг. немцы Гельригель (H. Hellriegel) и Вильфарт (H. Wilfarth) совместно с голландцем Бейеринком (M. W. Beijerinck).

Эндоцитобиотическая diaзотрофия имеет громадное значение для полей и пастбищ. Ее продуктивность достигает 300 кг биологически связанного азота на гектар в год (что в глобальном масштабе составляет $7 \cdot 10^7$ т).

Индуктором нодуляции являются специфические сигнальные молекулы ризобиев — *Nod-факторы* (сокр. англ. *nodulation*). Это семейство структурно сходных липолигосахаридов, которые у отдельных видов ризобиев содержат разное число гликозильных остатков и разные боковые заместители, а также имеют разную степень насыщенности и разную длину липидного «хвоста» (рис. 279, А).

Триггером симбиотического взаимодействия являются сигнальные флавоноиды, которые секретируются корнями хозяина, в частности, апигенин (рис. 279, Б). Они служат стимулами-лигандами для мембранного белка NodD, играющего у ризобиев роль сенсора и одновременно с этим — роль однокомпонентного транскрипционного фактора из семейства LysR. Он связывается с высококонсервативными по-

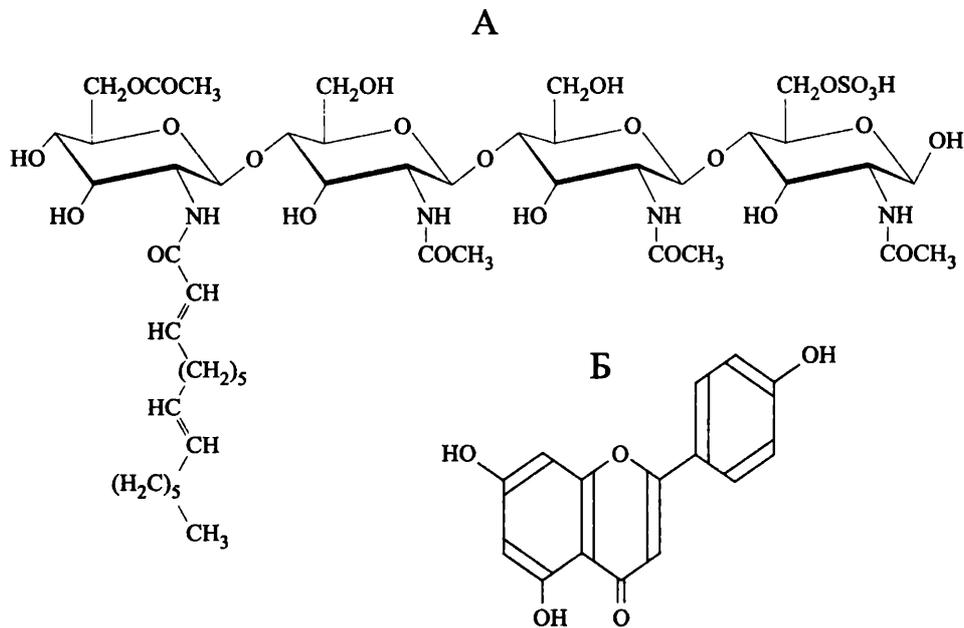


Рис. 279. Nod-фактор NodRm-IV *Sinorhizobium meliloti* (А) и хозяйский флавоноид апигенин (Б).

следовательностями ДНК длиной 49 п.н. (*nod*-боксами) и активирует промоторы downstream-генов *nod*. Продукты экспрессии большинства этих генов участвуют в биосинтезе Nod-факторов.

Nod-фактор, секретируемый ризобием, обладает митогенной активностью и стимулирует деление клеток внутреннего кортекса корня у хозяина с образованием примордия и меристемы клубенька, индуцирует хозяйские «симбиотические» гены-*нодулины*, а также вызывает осцилляцию катионов Ca^{2+} и характерное закручивание корневого волоска.

К числу ризобияльных экзопродуктов, контролирующих развитие клубенька, также относятся внеклеточные полисахариды (англ. extracellular polysaccharide, EPS). В качестве примера назовем сукциногликан *R. meliloti*, состоящий из октасакхаридного блока (цепь из трех остатков глюкозы и остатка галактозы, соединенная с боковой цепью из четырех глюкозильных остатков; заместителями служат ацетил, пирувил и сукцинил). Кроме того, в регуляции инфекционного процесса участвуют внеклеточные белки ризобия, которые экспортируются с помощью секреторной системы III типа (см. I том учебника).

Инфекционный процесс (рис. 280) начинается с прикрепления свободных ризобиев к поверхности эпидермальной клетки корневого волоска. Под стимулирующим воздействием нодулинов корневой волосок закручивается, и микроколония ризобиев фиксируется между встречно ориентированными клеточными стенками. Установлено, что изменение характера роста и, как следствие, изменение формы клетки связаны с реорганизацией цитоскелета за счет деполимеризации актиновых микрофиламентов.

Непосредственно в месте прикрепления ризобиев клеточная стенка инвагинирует, образуя зачаток *инфекционной нити* (англ. infection thread). Он удлиняется, прободает клетку корневого волоска и сливается с дистальной стенкой, в результате чего ризобии высвобождаются в межклет-

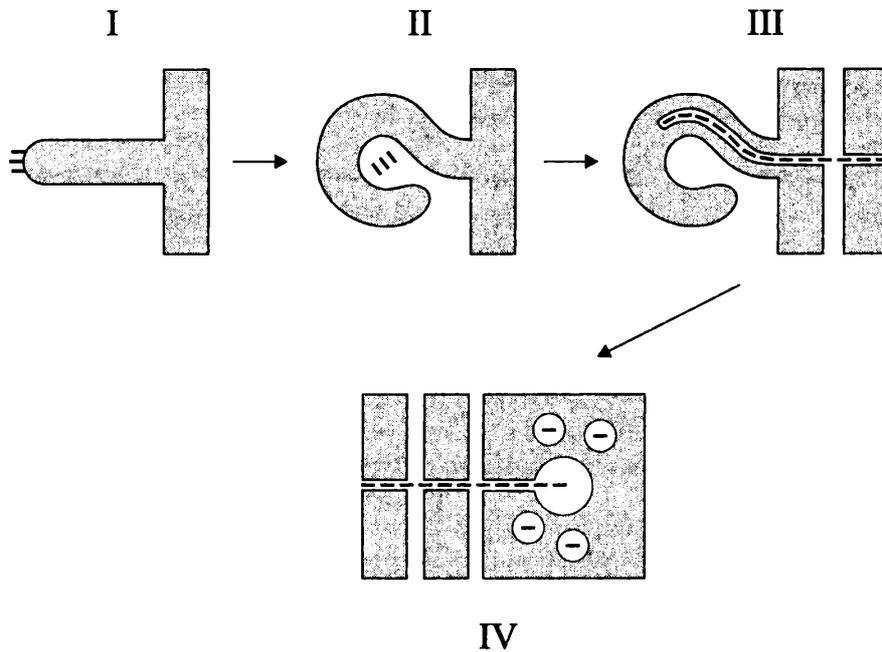


Рис. 280. Инфицирование клубеньковыми бактериями клеток корня бобового растения.

I — прикрепление бактерий к корневому волоску; II — закручивание корневых волоска и фиксация микроколонии ризобиев; III — образование и распространение инфекционной нити; IV — переход ризобиев в перибактероидные вакуоли.

ник между эпидермальной клеткой и верхней клеткой субэпидермального слоя. Стенка последней, в свою очередь, инвагинирует, образуя следующий сегмент инфекционной нити и т. д. Таким образом, до встречи с внешним кортексом инфекционная нить — это не сплошное образование, а симбиотическая структура в виде цепочки коридоров, пронизывающих клетки субэпидермиса и заполненная ризобиями. Внутри инфекционной нити бактерии погружены в экзополисахаридный матрикс и интенсивно размножаются, образуя 2–3 колонны продольно ориентированных клеток. Механизм их распространения по инфекционной нити неизвестен, хотя предполагается, что он основан на недавно открытом способе коллективной подвижности — *выдвижении* (англ. *sliding*).

Инфекционная нить, заполненная колоннами ризобиев, распространяется по направлению к внешнему кортексу, клетки которого соединяются цитоплазматическими мостиками, образуя *преинфекционную нить* (англ. *pre-infection thread, PIT*). По этому каналу инфекционная нить достигает разрастающейся меристемы клубенька. Встретившись с последней, она начинает ветвиться, клеточная стенка на концах ветвлений разрушается, ризобии путем эндоцитоза внедряются в меристематические клетки клубенька и попадают в *перибактероидную вакуоль* — эквивалент фагосомы.

Внутри перибактероидной вакуоли вегетативные ризобии размножаются, а затем дифференцируются в бактериоиды. Свойства бактериоидов как одного из типов дифференцированных клеток у прокариотов, а также детали их метаболических взаимоотношений с хозяином мы уже рассматривали в разделе 17.5.1.2.

20.3.4. Эндоцитобиоз на основе хемогетеротрофии

Многие некультивируемые хемогетеротрофные бактерии (см. I том учебника) находятся в состоянии эндоцитобиоза с протистами или беспозвоночными.

В первом случае младший партнер оккупирует разные компартменты клетки хозяина — фагоцитарные вакуоли, цитоплазму или ядро. При этом выгода, получаемая партнерами, далеко не очевидна (см. раздел 20.3.4.1).

Во втором случае младшие партнеры, как правило, находятся внутри бактериоцитов и «вертикально» передаются потомству. Инфицирование происходит трансовариально по материнской линии. Взаимоотношения между партнерами носят мутуалистический характер и часто принимают форму облигатного симбиоза (при этом размер генома бактерии уменьшается до 450–800 т. п.н.). Младший партнер позволяет хозяину выжить на неполноценной диете, снабжая его такими пищевыми добавками, как аминокислоты и витамины. Элиминация эндосимбионта приводит к стерильности, дистрофии и укорачиванию жизни хозяина.

20.3.4.1. Эндоцитобиоз у протистов

Среди хемогетеротрофных протистов хозяевами хемогетеротрофных эндоцитобионтов являются амебы или инфузории.

Эндоцитобионты амеб. Этот тип симбиотической ассоциации встречается у ~25% изолятов патогенных амеб *Acanthamoeba* spp., которые являются возбудителями гранулематозного энцефалита, а также изъязвлений роговицы при использовании контактных линз. Цитоплазматические эндоцитобионты вызывают у хозяина комплекс морфологических, физиологических и биохимических изменений. В частности, они отвечают за «киллерный» фенотип, когда один штамм хозяина образует токсичный белковый агент, вызывающий летальный эффект у другого штамма.

Взаимная выгода от симбиоза не очевидна; предполагается, что младшие партнеры, которые не культивируются вне хозяина, находят физическую защиту и питательные субстраты, а хозяева, будучи паразитами, дополнительно получают конкурентные преимущества благодаря образованию киллер-факторов.

Эндоцитобионты инфузорий. Многие инфузории содержат эндоцитобиотические бактерии. Некоторые из них токсичны для других штаммов инфузорий. В частности, бактерии из рода *Caedibacter* (от лат. *caedes* — убийство) образуют *R-тела* (сокр. англ. *refractile* — преломляющие свет; в данном случае — при наблюдении в фазово-контрастном микроскопе). Это белковый рулон, который после попадания в фагосому чувствительного штамма разворачивается в ленту длиной 20–30 мкм и каким-то образом оказывает на него токсическое воздействие.

Бактерий, живущих в макронуклеусе, микронуклеусе или цитоплазме ресничных инфузорий, первым обнаружил в 1856 г. немецкий физиолог Иоганнес Мюллер (J. Müller). Однако вплотную ими стали заниматься только век спустя, когда выяснилось, что они определяют киллерный фенотип хозяина, и что этот наследуемый признак связан с цитоплазматическими *каппа-частицами* (от греч. буквы каппа, созвучной с первой буквой англ. слова *killer* — убийца). В 1938 г. Зоннеборн (T. M. Sonneborn) установил, что каппа-частицы *Paramecium aurelia* представляют собой граммотрицательные бактерии, получившие название *Caedibacter taeniospirales*.

Наиболее изучены эндоцитобионты *P. aurelia*, *P. caudatum* и *Euplotes* spp., а также эндоцитобионты анаэробных морских или пресноводных инфузорий. В ряде слу-

чаев геном младших партнеров уменьшается в размере; поэтому они не покидают хозяина и передаются «по вертикали».

Эндоцитобионты *P. aurelia* относятся к роду *Holospora* (класс «Alphaproteobacteria»). Отдельные виды обладают хозяйской и ядерной специфичностью, размножаясь в ядре только одного типа (микро- или макронуклеусе). Они придают хозяину способность синтезировать токсины, играющие роль киллер-факторов для чувствительных штаммов парameций того же вида или других видов. Эти токсины действуют либо после секреции в окружающую среду, либо контактным путем при образовании половых пар. Жизненный цикл *Holospora* spp. включает в себя две морфологически различающиеся формы — эндоцитобиотическую репродуктивную и инфекционную. После проникновения в фагосому бактерия инфекционной фазы сложным путем достигает места своей репродукции.

Polynucleobacter necessarius, облигатные эндоцитобионты *Euplotes* spp., которые раньше обозначались как *омикрон-частицы*, а также родственные им *эпсилон-частицы* и *эта-частицы* обычно размножаются в хозяйских фагосомах и могут образовывать киллер-факторы.

Феномен киллерства способствует доминированию популяций инфузорий, содержащих эндоцитобиотические бактерии, что выгодно, прежде всего, бактериям. Таким образом, данный тип симбиотической ассоциации можно рассматривать как умеренный паразитизм.

20.3.4.2. Эндоцитобиоз у беспозвоночных

В данном случае симбиоз на основе хемогетеротрофии принимает форму либо мутуализма, либо репродуктивного паразитизма.

Мутуализм. Все известные представители тлей, важнейшей группы насекомых-вредителей растений (порядок *Homoptera*, суперсемейство *Aphidoidea*) образуют эндоцитобиотические ассоциации с бактерией *Buchnera aphidicola*, принадлежащей к филогенетическому классу «Gammaproteobacteria».

В целомической полости афидид находится *мицетома* (англ. mycetome), или *бактериом* (англ. bacteriome). Это двухлопастной агрегат из 60–90 бактериоцитов, заполненных *симбиосомами* (англ. symbiosome) — фагоцитартными вакуолями, вмещающими по одной клетке *B. aphidicola*.

Сок флоэмы, которым питаются тли, является неполноценной диетой, поскольку он богат углеводами, но содержит очень мало азота; кроме того, афидиды нуждаются в незаменимых аминокислотах, прежде всего в триптофане и лейцине. Большинство из них хозяин получает в готовом виде от младшего партнера. Тот, в свою очередь, извлекает выгоду, находясь в гомеостатичной и богатой субстратами нише.

Гены *trpEG*, кодирующие ключевой фермент пути биосинтеза триптофана — антранилатсинтазу, находятся в мультикопийной плазмиде *B. aphidicola*, что делает бактерию сверхпродуцентом этой незаменимой аминокислоты, которая в большом количестве становится доступной для хозяина. Триптофан экспортируется как составной компонент шаперонина GroEL, содержание которого достигает 10% растворимого белка *B. aphidicola*; поступая в гемолимфу афидид, он пополняет пул незаменимых аминокислот.

Репродуктивный паразитизм. Бактерии рода *Wolbachia* (класс «Alphaproteobacteria») инфицируют разные виды нематод и членистоногих — насекомых (класс *Insecta*), паукообразных (класс *Arachnida*) и ракообразных (класс *Crustacea*).

Бактерии рода *Wolbachia*, названного в честь американского микробиолога Вольбаха (S. B. Wolbach), с единственным видом *W. pipientis* были впервые описаны в 1924 г. в качестве подобного

рикетсиям эндоцитобионта в яичнике комара *Culex pipiens*. Они размножаются бинарным делением в цитоплазматических вакуолях хозяйских гонад, хотя также встречаются в нервной ткани и гемоцитах.

Вольбахии являются одними из наиболее успешных эндоцитобионтов. Они инфицируют ~20% видов насекомых, многих пауков, клещей, наземных ракообразных и большинство видов нитевидных нематод.

Широкое распространение *W. pipiens* связано со способностью вмешиваться в репродуктивные процессы беспозвоночных. Конкретнее, эндоцитобиотические бактерии способствуют собственной вертикальной трансвариальной передаче, обеспечивая преимущественное размножение зараженных самок.

Репродуктивные «манипуляции» эндоцитобионта включают в себя: (1) индукцию партеногенеза у инфицированного хозяина; (2) изменение хромосомной детерминации пола, приводящее к *феминизации*, когда инфицированные генетические самцы превращаются в функциональных самок; (3) эмбриональную летальность из-за *цитоплазматической несовместимости* (англ. cytoplasmic incompatibility; CI) после спаривания неинфицированных самок с инфицированными самцами. Все эти эффекты, в конечном счете, приводят к расселению эндоцитобионта.

Бактериям репродуктивный паразитизм выгоден, однако у беспозвоночных он не только нарушает нормальное размножение и изменяет соотношение полов, но и приводит к гибели части особей (эмбрионов самцов). Молекулярные механизмы, лежащие в основе репродуктивного паразитизма, практически неизвестны.

20.3.5. Внутриклеточный паразитизм зоопатогенных бактерий

Живую клетку можно рассматривать как экстремальную нишу, в которой процветают только сравнительно немногие виды адаптированных бактерий (см. I том учебника). Что касается клетки-хозяина, то ее отношение к младшему партнеру отнюдь не инертно — особенно если тот избирает стратегию внутриклеточного паразитизма. Она ограничивает его проникновение, стремится его уничтожить и, если это не удастся, вступает с ним в метаболическую конкуренцию. Поэтому стратегическая задача эндоцитобионта — не только выжить в стрессовых условиях, но и подчинить чужие ресурсы нуждам собственного метаболизма.

Внутриклеточное инфицирование животных осуществляется путем фагоцитоза, после чего захваченная бактерия делает решающий выбор — либо остается в фагоцитарной факуоли (фагосоме), либо спасается из нее и транзитом проникает в цитоплазму.

Фагоцитозом называется поглощение эукариотной клеткой микроскопических частиц, в том числе бактерий. Его осуществляют либо профессиональные антигенпрезентирующие клетки — *профессиональные фагоциты* (макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты), либо непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки — *непрофессиональные фагоциты* (эпителиальные клетки, фибробласты, астроциты, клетки эндотелия и гранулоциты). Механизмы профессионального и непрофессионального фагоцитоза существенно различаются. Непрофессиональный фагоцитоз основан либо на использовании бактерией поверхностных белков *инвазинов*, которые взаимодействуют с хозяйскими рецепторами, либо на доставке в цитоплазму хозяина белков, которые индуцируют складчатость его плазматической мембраны и, как следствие, макропиноцитоз.

На бактерию, попавшую внутрь первичной фагосомы профессионального фагоцита, обрушивается каскад деструктивных процессов: (1) накапливаются токсичные соединения кислорода и

азота (ROS и RNS; см. раздел 19.1.6.1); (2) фагосома сливается с лизосомами, содержащими кислые гидролазы; (3) интерьер фагосомы закисляется при помощи H^+ -транслоцирующей V-АТФазы (см. II том учебника); (4) в фагосому поступают катионные антибактериальные белки и пептиды, в частности дефензины. Кроме того, после фагосомного процессинга бактериальных белков на поверхность фагоцита выводятся пептидные антигены, презентация которых Т-лимфоцитам вызывает разнообразные формы гуморального иммунного ответа, направленного против специфического паразита.

Эндоцитобионт, в частности внутриклеточный паразит, использует механизмы, позволяющие ему не только избежать уничтожения защитным арсеналом фагосомы, но и адаптироваться в этой нише с целью дальнейшего размножения. Альтернативной и более радикальной стратегией является разрушение мембраны фагосомы с выходом в более комфортабельный компартмент — цитоплазму.

Эндоцитобионт в фагосоме. Ряд важнейших эндоцитобионтов-патогенов человека и животных размножается или сохраняется (персистирует) в латентном состоянии в фагосоме хозяина.

Brucella spp. Бактерии рода *Brucella* являются этиологическим агентом бруцеллеза — широко распространенного заболевания в форме инфекционного аборта (у животных, которые служат природным резервуаром для данной бактерии, относящейся к патогенам третьей, наиболее опасной группы) или мальтийской лихорадки (у человека). *Brucella spp.* выживает в макрофагах или в эпителиальных клетках слизистых оболочек, предотвращая слияние мембраны фагосомы с лизосомами. Она размножается в модифицированной фагосоме — вакуоли BCV (сокращение от англ. *Brucella-containing vacuole*). С помощью секреторной системы IV типа VirB паразит доставляет в хозяйскую клетку белки, контролирующие созревание BCV и размножение бактерий внутри этого репликативного компартмента с привлечением шероховатого эндоплазматического ретикулума.

Legionella pneumophila. Возбудитель легионеллеза — острой инфекционной пневмонии, или болезни легионеров служит этиологическим агентом 1–15% зарегистрированных случаев пневмонии (7–25% летальных исходов) и только в США ежегодно поражает до 100 тыс человек. В свободном состоянии легионелла вяло размножается в планктоне или биопленках рек и озер, однако она активно репродуцируется в двух хозяевах — амёбах (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella sp.*, *Naegleria sp.* и др.) и альвеолярных макрофагах человека, куда попадает аэрозольным путем. Через несколько минут после проникновения в клетку-хозяина бактерия блокирует слияние фагосомы с лизосомами. Решающую роль в этом играют секреторная система IV типа Dot/Icm (сокращение от англ. *Defective for organelle trafficking/Intracellular multiplication*) и секреторная система II типа *lsp* (сокращение от англ. *Legionella secretion of pilin*). Кроме того, эти системы транслоцируют в клетку-хозяина белковые факторы, обеспечивающие функционирование модифицированной фагосомы — вакуоли LCV (сокращение от англ. *Legionella-containing vacuole*) в качестве ниши для размножения паразита.

Mycobacterium tuberculosis. Микобактерия *M. tuberculosis* является одним из опасных патогенов человека — ежегодно она инфицирует до 8 млн человек (2 млн летальных исходов). Ее высокая вирулентность объясняется способностью выживать в макрофагах. Если при фагоцитозе в результате активации макрофага фагосома обычно сливается с лизосомами, то в данном случае макрофаг не активируется, и фаголизосома не образуется. Это связано с использованием особых поверхностных рецепторов хозяина (CR3), а также с уникальной природой липидов микобактерий. Некоторые из них (например, димиколат трегалозы; см. I том учебника) являются иммуномодуляторами; другие (в частности, липоарабиноманнаны) предотвращают созревание фагосомы. Ингибирующий эффект липоарабиноманнана связан с тем, что они блокируют накопление в макрофагах катионов Ca^{2+} — активаторов фосфатидилинозитол-киназы (фактора слияния мембран). После фагоцитоза и внутриклеточного размножения патогенных микобактерий макрофаги мигрируют в органы-мишени. Там из них и Т-лимфоцитов образуется туберкулезный бугорок (гранулома) — зачаток инкапсулированной каверны, состоящей из некротических тканей и мертвых микобактерий. Не уничтоженные микобактерии впадают в латентное состояние (неизвестно, вне клеток хозяина или в макрофагах); при их реактивации инфекционный процесс переходит в острую стадию.

Salmonella enterica. Вид *S. enterica* объединяет ~2 тыс сероваров, обладающих разной хозяйской специфичностью и вызывающих разные заболевания. В частности, серовар Typhі является возбудителем тифоидной лихорадки и ежегодно поражает более 20 млн человек; а серовар Typhimurium вызывает гастроэнтерит у людей или системное тифоидное заболевание у мышей. Ви-

рулентность *S. enterica* связана со способностью проникать в клетки кишечного эпителия и размножаться в модифицированной фагосоме — вакуоли SCV (сокращение от англ. *Salmonella*-containing vacuole). За проникновение, выживание и размножение паразита отвечают хромосомные гены вирулентности, объединенные в островки патогенности SPI-1 и SPI-2 (см. раздел 16.6.1.3). В частности, они кодируют секреторные системы III типа T3SS1 и T3SS2, которые доставляют в хозяйскую клетку белки, обеспечивающие инвазию, выживание в фагосоме и ее превращение в SCV, которая не сливается с лизосомами.

Хламидии. Вышеописанные бактерии способны самостоятельно размножаться вне клетки-хозяина. В отличие от них, *хламидии* (рода *Chlamydia* и *Chlamydophila*) — это облигатные внутриклеточные паразиты человека и животных. Виды *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* патогенны для человека и вызывают, соответственно, хронические генитально/глазные инфекции и бронхофарингиты/пневмонию. В свою очередь, *C. psittaci* возбуждает пситтакоз у птиц, хотя может передаваться человеку, вызывая острую пневмонию. У хламидий сложный инфекционный процесс. Он начинается с прикрепления метаболически неактивной цисты хламидии, или *элементарного тела* (англ. elementary body, EB) диаметром ~0,3 мкм к поверхности эпителиальной клетки. Затем младший партнер экспортирует в хозяйскую клетку эффекторный белок Tagр, который локально активирует эукариотную ГТФазу Rac1. Это приводит к изменению характера сборки актиновых микрофиламентов хозяйского цитоскелета и поглощению (интернализации) элементарного тела. Внутри фагосомы элементарное тело дедифференцируется в метаболически активное *ретикулярное тело* (англ. reticulate body) диаметром ~1 мкм. Фагосома, содержащая ретикулярное тело, уклоняется от созревания в фаголизосому и превращается в репродукционную вакуоль — *раннее включение* (англ. early inclusion). В результате последовательной активации альтернативными сигма-факторами σ^{28} и σ^{54} «ранних» (1–8 ч), «средних» (8–16 ч) и «поздних» (16–24 ч) хламидийных генов происходит размножение ретикулярных тел и их дифференциация в элементарные тела. Хотя в редуцированном геноме хламидий (1 млн.п.н.) содержатся детерминанты энергетического и конструктивного метаболизма, в частности гены гликолиза и биосинтеза муреина, эти бактерии являются не только «конструктивными», но и «энергетическими» паразитами. Иными словами, они получают от хозяина и энергию (в форме АТФ), и строительный материал, в том числе мембранные липиды. Когда расплодившиеся включения практически полностью заполняют хозяйскую клетку, она разрушается в результате активации цистеиновых протеаз, а также механическим путем под воздействием собственного цитоскелета.

Эндоцитобионт в цитоплазме. Некоторые патогенные факультативные или облигатные эндоцитобионты (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *E. coli*, *Listeria* spp., *Rickettsia* spp., *Shigella* spp. и др.) непосредственно после своего захвата покидают первичную фагосому и выходят в цитоплазму клетки-хозяина, где и размножаются.

Listeria monocytogenes. Возбудитель листериоза, психротолерантная бактерия *L. monocytogenes* передается с пищевыми продуктами и вызывает системные заболевания у детей, а также у иммунодепрессивных и пожилых людей. В связи с использованием неглубокого холода при хранении мяса, рыбы, овощей и фруктов распространение листериоза стало глобальной угрозой. «Продырявливание» мембраны первичной фагосомы осуществляется с помощью цитолизина *листериолизина O* (англ. listeriolysin O; LLO). Ген *hly*, кодирующий этот протеолитический фермент, входит в состав островка патогенности (см. раздел 16.6.1.3), который позитивно регулируется транскрипционным фактором PrfA. Дальнейшее «распечатывание» фагосомы осуществляется фосфолипазами С-типа, специфичными в отношении фосфатидилинозитола (PI-PLC) и фосфатидилхолина (PC-PLC). Гены *plcA* и *plcB*, кодирующие эти ферменты, входят в состав вышеуказанного геномного островка.

L. monocytogenes с одинаковым успехом размножается в цитоплазме профессиональных и непрофессиональных фагоцитов. Кроме того, она расселяется из первично зараженной клетки в ее соседней за счет способности полимеризовать на одном из своих полюсов хозяйский актин с помощью белка ActA (см. I том учебника).

Shigella flexneri. Этот эндоцитобионт-патоген вызывает водянистую диарею или кровавую бациллярную дизентерию человека и животных. С помощью секретлируемых белков он индуцирует макропиноцитоз у непрофессиональных и профессиональных фагоцитов — эпителиальных клеток толстой кишки и М-клеток токой кишки. *S. flexneri* образует гемолизины IраВ и IраС, которые «продырявливают» мембрану первичной фагосомы. Участвуют ли в «распечатывании» фагосомы

специфические фосфолипиды, еще неизвестно. По аналогии с *L. monocytogenes* шигелла распространяется в соседние клетки, полимеризуя хозяйский актин с помощью белка IscA.

***Yersinia enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*.** Данные бактерии вызывают разнообразные локальные и системные синдромы, в том числе мезентерический лимфаденит, реактивный артрит, септицемию и энтерит. Инфекционный процесс начинается с проникновения патогена в М-клетки при помощи инвазина. После колонизации пейеровых бляшек бактерии либо переходят во внеклеточную среду, либо вторично попадают в фагоциты (а из них в клетки эндотелия) и затем распространяются с кровотоком.

Риккетсии. В отличие от вышеописанных факультативных эндоцитобионтов, риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами. Они вызывают у человека риккетсиозный тиф (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*) и сифилис (*R. akari*), а также сыпную лихорадку (*R. rickettsii*, *R. conorii*). Природным резервуаром риккетсий служат клещи; они же переносят их от грызунов к человеку. После фагоцитирования риккетсия быстро покидает фагосома. Механизм перехода в цитоплазму хозяйской клетки неизвестен; в случае *R. prowazekii* он может быть связан с использованием фосфолипиды А. Риккетсии репродуцируются не только в цитоплазме, но и в ядре; численность инфекционного потомства составляет от 100 до 1 тыс на клетку хозяина. Их диаметр ~0,3 мкм, и они имеют небольшой геном (в случае *R. rickettsii*, этиологического агента сыпной лихорадки Скалистых гор, его размер составляет ~1 млн.п.н.), вследствие чего эти патогены находятся в облигатной метаболической зависимости от хозяина. Часть энергии риккетсии получают, окисляя глутамат через цикл Кребса, но в основном они прибегают к «энергетическому» паразитизму, обменивая АДФ на АТФ хозяина. Ферменты гликолиза и глюконеогенеза у них отсутствуют; с помощью уникального механизма они импортируют НАДН и УДФ-глюкозу. Кроме того, они получают от хозяина аминокислоты, в частности глицин и серин.

Патогенность эндоцитобионтов-паразитов является прямым результатом их размножения. Она связана либо с апоптозом клетки-хозяина, либо с накоплением бактериальных токсинов, адресно или системно поражающих ткани и органы макроорганизма.

Наконец, все паразитические эндоцитобионты обладают общим приспособительным свойством — до завершения собственной репродукции они разными путями блокируют механизмы апоптоза у клетки-хозяина.

20.4. КСЕНОСОМЫ

В предыдущем разделе мы обозначили физиологические стратегии эндоцитобиоза; выяснили его экологическое значение; привели примеры облигатно эндоцитобиотических бактерий; отметили, что обитание в такой нише, как живая клетка, часто приводит к уменьшению размера генома.

Теперь рассмотрим роль эндоцитобиоза в возникновении современных ядерных клеток. Как известно, по данному сценарию произошли химеры прокариотов с эукариотами. Такие клеточные ассоциации не вписываются в глобальное древо, а принадлежат сразу к двум доменам — *Bacteria* и *Eucarya*, объединяя «под одной крышей» два глобальных морфотипа — прокариотный и эукариотный (см. I том учебника).

Около 1,5 млрд. лет назад в архаичную эукариотную клетку поочередно проникли представители двух фил домена *Bacteria* (ВХII *Proteobacteria* и ВХ *Cyanobacteria*). В результате кардинальных генетических изменений эти бактерии потеряли способность к автономному существованию и, пройдя стадию облигатных эндоцитобионтов, трансформировались в полуавтономные цитоплазматические органеллы — *ксеносомы* (англ. xenosome; от греч. xenos — чужой и soma — тело; «чужеродное тело»).

Ксеносомы функционально специализированы для ассимиляции энергии (митохондрии и пластиды) или ассимиляции энергии в сочетании с ассимиляцией неорганического углерода (только пластиды).

Митохондрии — это хемотрофные ксеносомы. У них нет пигментных систем фотосинтетического аппарата, и они ассимилируют энергию в процессе аэробного, реже анаэробного *митодыхания* (англ. *mitorespiration*), которое сопровождается мембранным фосфорилированием АДФ. Они неспособны и к автотрофной ассимиляции углерода.

Пластиды — это фотосинтетические ксеносомы. Они обладают фотосинтетическим аппаратом оксигенного типа, в состав которого входят реакционные центры ФС I и ФС II, светособирающие комплексы, а также электрон-транспортная цепь и АТФ-синтаза, или фактор «сопряжения» (англ. *coupling factor*). Пластиды обладают набором ферментов, позволяющих ассимилировать неорганический углерод (цикл Кельвина—Бенсона—Бэссема; см. II том учебника). У особого типа пластид, примерами которых являются дифференцированные хлоропласты и специализированные пластиды, пигментный аппарат в той или иной степени редуцирован. Некоторые типы пластид, помимо фототрофии, способны к *хлородыханию* (см. ниже).

Доказательства того, что митохондрии и пластиды происходят от бактериальной клетки, следующие:

- они окружены оболочкой из двух мембран, содержат кольцевую хромосому и 70S-рибосомы, причем пластидные гены рРНК гомологичны генам рРНК представителей архаичного кластера филы VX *Cyanobacteria*, а гены митохондриальной рРНК гомологичны генам рРНК представителей класса «*Alphaproteobacteria*» филы VXII *Proteobacteria*;

- по размерам и форме они не только сходны с бактериями, но и обладают усложненным бактериальным морфотипом, т. е. имеют три мембраны (СМ, ОМ и ICM; см. I том учебника);

- их ICM сходны с бактериальными ICM по строению и выполняемой функции (см. I том учебника);

- они бинарно размножаются с помощью кольца деления, которое во многих случаях состоит из белка, гомологичного бактериальному белку FtsZ (см. раздел 17.4);

- их информационные гены, которые кодируют аппарат репликации/транскрипции/трансляции, гомологичны соответствующим бактериальным генам;

- их гены домашнего хозяйства, которые кодируют генераторы *Pmf*, субъединицы АТФ-синтазы, регуляторные белки, шапероны, транспортные белки и ферменты конструктивного метаболизма, гомологичны соответствующим бактериальным генам.

Приобретение митохондрий, а следом за ними простых пластид стало одним из крупнейших ароморфозов в эволюции органической жизни. Благодаря этому мир протохимер разделился на многочисленные царства одноклеточных ядерных организмов (сборная группа *Protista*), а также на царства растений (*Plantae*), грибов (*Fungi*) и животных (*Animalia*).

Если все митохондрии ведут начало от протеобактерий, то пластиды произошли разными путями. Наряду с простыми пластидами, потомками цианобактерий, существуют сложные пластиды — потомки редуцированных одноклеточных водорослей. В состав сложной пластиды, помимо центральной части (кора), которая соответствует простой пластиде, входят рудиментарные СМ и 80S-рибосомы эукариотной клетки, а иногда даже нуклеоморф — гомолог ядра.

20.4.1. Фототрофные ксеносомы

Существует несколько типов фототрофных ксеносом, которые обозначаются общим термином «пластиды» (англ. plastid; от греч. plasma — восковая фигурка и eidos — вид; «нечто оформленное»). Они различаются по происхождению, онтогенезу, функциональным особенностям и физиологической специализации.

Пластиды, за исключением дифференцированных хлоропластов и специализированных пластид (см. ниже), ассимилируют световую энергию в форме АТФ и образуют восстановитель — НАДФН. Восполняемый пул этих субстратов расходуется самой ксеносомой для поддержания метаболических, транспортных, регуляторных и репродуктивных процессов, а также на общие нужды химерной ассоциации. Пластиды осуществляют фотосинтез — комплексный процесс ассимиляции световой энергии и неорганического углерода.

В некоторых случаях пластиды ведут себя как амбивалентные ксеносомы, т. е. наряду со своей основной функцией выполняют побочную, «митохондриальную» функцию. Иными словами, вместо восстановления НАДФ они окисляют его с помощью молекулярного кислорода. Такой процесс называют *аэробным хлородыханием*, или просто *хлородыханием* (англ. chlororespiration).

Феномен хлородыхания открыл в начале 1980-х гг. французский биохимик Поль Беннун (P. Bennoun) на примере лишённого ФС1 мутанта F14 *Chlamydomonas reinhardtii*. Помимо *C. reinhardtii* способность к хлородыханию выявлена у водорослей *Chlorella pyrenoidosa* (класс *Chlorophyceae*) и *Mantoniella squamata* (класс *Prasinophyceae*). В хлоропластных геномах широкого круга высших растений — от мхов до однодольных и двудольных покрытосеменных (*Marchantia polymorpha*, *Oryza sativa*, *Beta vulgaris*, *Vicia faba* и др.) — обнаружены *ndh*-гены, гомологичные генам субъединиц митохондриальной НАДН-дегидрогеназы. Охарактеризован и продукт экспрессии этих генов: НАД(Ф)Н-дегидрогеназный комплекс, входящий в состав мембраны тилакоида. Молекулярная природа остальных переносчиков в хлородыхательной цепи была неизвестна до тех пор, пока в тилакоидах *Arabidopsis thaliana* не обнаружили гомолога митохондриальной альтернативной оксидазы (ген *immutans*).

Хлородыхание обладает всеми признаками биоэнергетического процесса. Во-первых, при нем энергизируется мембрана тилакоида. Во-вторых, как и у большинства аэробных дыхательных систем, в нем участвует терминальная кислородредуктаза. Поэтому его не следует отождествлять с фотодыханием, которое представляет собой поглощение кислорода в оксигеназной реакции, катализируемой RuBisCO. Хлородыхание не имеет ничего общего и с реакцией Мелера (см. раздел 19.1.6.1), связанной со спонтанным восстановлением кислорода в акцепторном участке ФС1.

В чем заключается физиологический смысл хлородыхания? Можно ли считать его рудиментарным биоэнергетическим процессом, поскольку бактериальные предки пластид, скорее всего, обладали бифункциональной электрон-транспортной цепью с цитохром *b/c*-комплексом и хиноновым пулом, которая альтернативно обеспечивала фотосинтетический и дыхательный транспорт электронов? Если да, то дышащие пластиды и современные цианобактерии унаследовали свою физиологическую амбивалентность от общего предка. Однако, в отличие от темного дыхания цианобактерий, пластидное хлородыхание протекает без участия цитохром *b6/f*-комплекса и цитохромоксидазы *aa3*. Кроме того, скорость хлородыхания составляет $\leq 10\%$ скорости митохондриального дыхания, т. е. его биоэнергетическое значение ничтожно.

Трудно допустить, что бесполезный биохимический механизм смог бы сохраниться на протяжении миллионов лет эволюции пластид. Скорее всего, реликтовое хлородыхание приобрело вторичный физиологический смысл — в соответствии с общебиологическим принципом смены функций. Не исключено, что оно определяет эффективность таких глобальных регуляторов энергетического метаболизма, как величина *Pmf* и редокс-состояние хинонового пула.

Пластиды подразделяются на *цианеллы* и *собственно пластиды*.

20.4.1.1. Цианеллы

Цианеллами (англ. cyanelle; от греч. kianeos — синий и лат. уменьшит. оконч. -ella; «маленький живой объект синего цвета») называются фототрофные ксеносомы одноклеточных водорослей класса *Glaucozystophyceae*. В соответствии с особенностями первичной структуры рРНК они относятся к филе ВХ *Cyanobacteria*.

Поскольку цианеллы обладают рудиментарными бактериальными признаками, их вначале считали промежуточной стадией эволюции от эндоцитобиотических цианобактерий к простым пластидам — иными словами, «уже» не цианобактериями, но «еще» не пластидами. Позднее победила иная точка зрения, и в настоящее время цианеллы рассматриваются в качестве примитивной ветви простых пластид. Чтобы точнее указать место цианелл среди пластид, Хайнфрид Шенк (H. Schenk) предложил переименовать их в *цианопласты* (англ. cyanoplast; от греч. kianeos — синий и англ. plastid — пластида; «синяя пластида»).

Хотя обычно утверждают, что синезеленые цитоплазматические органеллы амебы *Paulinella chromatophora* в конце XIX в. открыл Лаутерборн (R. Lauterborn), их до него описывали у одноклеточных водорослей *Glaucozystis nostochinearum* и *Gloeochaete wittrockiana*. В 1930-е гг. Пашер (A. Pascher) предложил для них термин «цианелла»; в свою очередь, эндоцитобиотическую ассоциацию с участием цианелл он назвал *цианомом* (англ. cyanome; от греч. kianeos — синий и лат. оконч. -om для обозначения множества; «совокупность живых объектов синего цвета»).

Протисты, содержащие цианеллы, образуют девять родов класса *Glaucozystophyceae*. К ним принадлежат подвижные или неподвижные формы; сейчас в коллекциях поддерживаются четыре вида (*Cyanophora paradoxa*, *Glaucozystis nostochinearum*, *Glaucozphaera vacuolata* и *Gloeochaete wittrockiana*).

Признаки, позволяющие рассматривать цианеллы в качестве примитивных пластид, следующие: (1) фикобилисомы вместо антенных комплексов со вспомогательными хлорофилами (см. II том учебника); (2) периферические ряды обособленных тилакоидов (см. раздел 20.4.1.2); (3) карбоксисомы (см. I том учебника); (4) муреиновый ригидный слой клеточной стенки (см. I том учебника).

Цианеллы имеют сферическую (*C. paradoxa*; *G. wittrockiana*) или эллипсоидную (*G. nostochinearum*; *P. chromatophora*) форму. На наружной поверхности тилакоидов находятся фикобилисомы. Цианелла окружена оболочкой из двух мембран, которые гомологичны бактериальным CM и OM. Между ними (исключением служит *G. vacuolata*) расположен муреиновый саккулус. Его толщина (7 нм в случае *C. paradoxa*) такая же, как у *E. coli*, но меньше, чем у цианобактерий. Муреин цианеллы, в отличие от бактериального муреина, не заякорен в OM с помощью липопротейна Брауна (см. I том учебника).

Цианеллы, подобно пластидам, являются облигатными эндоцитобионтами, т.е. они не размножаются вне хозяина.

Геном цианелл двух исследованных штаммов *C. paradoxa* имеет размер 130 и 140 т. п.н., что на порядок меньше, чем у цианобактерий, но близко к размеру хлоропластного генома. В геноме цианеллы *C. paradoxa* присутствуют гены апопротеинов ФС I и ФС II (*psaA-C*, *psaI-K*, *psbA*, *psbC-F*), а также гены апопротеинов фикобилисомы (*srcAB*, *arcA*, *arcBDE*). Гены субъединиц цитохром *b/f*-комплекса и АТФ-синтазы высоко гомологичны соответствующим генам хлоропластов. Субъединицы RuBisCO кодируются геномом цианеллы и котранскрибируются так же, как у цианобактерий (у высших растений, *Chlorophyceae* и *Euglenozoa* ген малой субъединицы *rbcS* входит в состав ядерного генома).

Тилакоиды цианелл в темноте преобразуются в сеть тубулярных мембран, или *тилакоид-организующий центр* (англ. thylakoid-organizing centre). Эта структура эквивалентна *проламеллярному телу* (англ. prolamellar body) высших растений, при освещении из нее развиваются протилакоиды (см. раздел 20.4.1.2). На свету в цианеллах, как у высших растений, но в отличие от цианобактерий, протохлорофиллид *a* восстанавливается в хлорофиллид *a*.

Согласно результатам анализа ядерных генов, кодирующих рРНК цитоплазматических рибосом, хозяева цианелл имеют монофилетичное происхождение и лока-

лизуются в кроне эволюционного древа *Eucarya*. Цианеллы также монофилетичны, хотя их величина, форма и ультраструктурные детали (в частности, морфология карбоксисом) сильно варьируют.

G. vacuolata обладает рядом морфологических особенностей, отличающих ее от других *Glaucocystophyceae*, что дает основание пересмотреть таксономический статус этого микроорганизма и поместить его в класс *Rhodophyceae* (красные водоросли), тем более что в данном случае ксеносома расположена на эволюционном древе *Cyanobacteria* по соседству с родопластами — простыми пластидами красных водорослей.

Таким образом, цианеллы — это примитивная, относительно слабо дивергировавшая внутри себя ветвь пластид и единственный пример энергетических ксеносом, которые в ходе эволюции сохранили бактериальную клеточную стенку.

20.4.1.2. Собственно пластиды

Собственно пластиды подразделяются на *простые пластиды*, *сложные пластиды* и *специализированные пластиды*.

Простые пластиды (англ. simple plastid). Простые пластиды монофилетичны и произошли от цианобактерий. Сложные пластиды, напротив, полифилетичны и возникли в результате серии однотипных вторичных эндосимбиозов между двумя ядерными клетками — митохондриальным протистом, по типу питания фаготрофом, который стал хозяином, и одноклеточной водорослью с простыми пластидами, которая стала ксеносомой.

Таким образом, если простые пластиды являются гомологами бактериальной клетки, то сложные пластиды — это в разной степени редуцированные ядерные эндосимбионты. Они окружены оболочкой из трех или четырех мембран, часть которых имеет бактериальное, а часть — эукариотное происхождение.

Хотя первичный эндосимбиоз, приведший к образованию простых пластид, состоялся около 1,5 млрд. лет назад, древнейшие ископаемые останки микроорганизмов со сложными пластидами (класс *Dinophyta*) имеют возраст не более 250 млн. лет. Почему же тогда вторичный эндосимбиоз на протяжении 1,25 млрд. лет не приводил к появлению сложных пластид? Скорее всего, периодически возникавшие вторичные эндосимбиотические ассоциации элиминировались, поскольку не обладали преимуществами перед первичными эндосимбиотическими ассоциациями.

Появление микроорганизмов со сложными пластидами было связано со снижением концентрации атмосферного CO_2 к концу палеозоя. Известно, что в пермском периоде она была втрое меньше современной, в результате чего уровень *растворенного неорганического углерода* (англ. dissolved inorganic carbon, DIC) стал лимитировать фотосинтез в древнем Океане.

DIC представлен четырьмя взаимно превращающимися формами ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow 2\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$). Реальное соотношение их концентраций зависит от кислотности среды. При слабнокислом pH преобладает CO_2 , а при слабощелочном (характерном для морской воды) DIC представлен главным образом HCO_3^- .

Субстратом реакции карбоксилирования, катализируемой RuBisCO, служит CO_2 (см. II том учебника). Поскольку сложные пластиды находились в фагоцитарной вакуоли, где DIC из-за закисления был представлен только CO_2 , они обладали преимуществом перед простыми пластидами, расположенными непосредственно в цитоплазме. Видимо, это и позволило вторичным симбиозам приобрести устойчивый характер, а затем закрепиться в процессе эволюции.

Еще раз подчеркнем, что простые пластиды являются потомками облигатно эндосимбиотических бактерий и принадлежат к филе ВХ *Cyanobacteria*. О монофилетичности этих органелл свидетельствует гомология пластидных генов *rrs* (кодируют

16S рРНК), генов *psbA* (кодируют апопротеин ядра реакционного центра ФСII), генов *tufA* (кодируют фактор элонгации EF-Tu), а также генов *atpB* (кодируют *a*-субъединицу интегрального домена АТФ-синтазы) у разных растений.

По мере преобразования цианобактерии в простую пластиду ее геном уменьшился почти на порядок. Часть генов была необратимо утрачена, другие путем горизонтального переноса вошли в состав ядерного генома. У большинства простых пластид геном имеет размер 120–150 т. п.н. (120 и более открытых рамок считывания). Протеом простых пластид состоит из 2–5 тыс белков, большинство из которых кодируется ядерным геномом, транслируется в цитоплазме клетки-хозяина и импортируется в пластиду.

Мембранный аппарат простых пластид обнаруживает удивительное сходство с мембранным аппаратом цианобактерий. В него входят: двойная мембранная оболочка и внутренняя система уплощенных мембранных цистерн, которые называются *тилакоидами* (англ. thylakoid; от греч. thylakoeides — мешковидный). Систему тилакоидов также называют *ламеллярной системой*. В нефотосинтезирующих простых пластидах — пропластидах и этиопластах — ламеллярная система практически отсутствует (см. ниже).

Внутренняя мембрана оболочки простой пластиды гомологична СМ цианобактерий. В ней обнаружены ксантофиллы в комплексе с белком. Компоненты транслоказного комплекса (Tic20, Tic22 и Tic55) и большинство шаперонов, контролирующих импорт белка в пластиду, также принадлежат к цианобактериальному типу. Что касается внешней мембраны, то ее происхождение дискуссионно. Это либо производное фагосомной мембраны хозяина, либо производное ОМ эндоцитобионта. В пользу первого свидетельствуют анастомозы внешней мембраны с мембранами эндоплазматического ретикулума, а также с другими элементами эндомембранной системы хозяина. На вторую возможность указывают «бактериальные» липиды внешней мембраны (фосфатидилглицерол и моногалактозилдиглицерид: см. I том учебника). То, что в наружном полумембранном листке внешней мембраны отсутствуют липополисахариды, а во внутренний полумембранный листок входит типичный для эукариотов фосфатидилхолин, можно объяснить упрощением липидного состава ОМ эндоцитобионта, а также заменой ее компонентов. Во внешней мембране присутствуют порины (см. I том учебника), состоящие из нескольких интегральных β -цепей и сходные с бактериальными поринами; среди них выявлены как неспецифические, так и селективные порины (OEP16, OEP21 и OEP24). Во внешней мембране содержатся транспортные белки, которые могут иметь бактериальное (Toc75), эукариотное (Toc159) или химерное (Toc34) происхождение.

Предполагается, что общий предок простых пластид синтезировал хлорофиллы *a/b* наряду с фикобилипротеинами. В ходе эволюции одна ветвь его потомства лишилась антенн с хлорофиллами *a/b*, но сохранила фикобилипротеиновые антенны. У другой ветви, наоборот, сохранились антенны с хлорофиллами *a/b*, но исчезли фикобилипротеиновые антенны. Результатом альтернативной редукции антенн стали два типа простых пластид — *родопласты* и *хлоропласты*. Они имеют разную морфологию ламелл, компоненты фотосинтетического аппарата по-разному распределены в плоскости тилакоида, а светособирающая антенна по-разному возбуждает две фотосистемы.

Родопласты (англ. *rhodoplast*; от греч. *rodon* — роза и англ. *plastid* — пластида; **красная пластида**). Простые пластиды этого типа имеются у представителей двух классов водорослей — *Rhodophyceae* и *Glaucocystophyceae*.

Родопласты содержат хлорофилл *a* и фикобилипротеины, образующие периферическую антенну-фикобилисому (см. II том учебника). ФС I и ФС II равномерно распределены в плоскости мембраны тилакоида, причем фикобилисома избирательно взаимодействует с ФС II. Тилакоиды родопластов не «слипаются» друг с другом.

Хлоропласты (англ. *chloroplast*; от греч. *chloros* — *зеленый* и англ. *plastid* — *пластида; зеленая пластида*). Простые пластиды этого типа характерны для двух классов водорослей: *Chlorophyceae* (зеленых водорослей) и *Prasinophyceae*, а также для высших растений.

Хлоропласты содержат хлорофиллы *a/b*; единственное исключение — это хлоропласты прازیнофитов, которые содержат хлорофиллы *a/b/c*.

Хлоропластный геном (cpDNA, сокр. англ. *chloroplastic*) имеет размер 150 т. п. н., что недостаточно для самостоятельного биогенеза фотосинтетического аппарата. Поэтому за исключением генов, кодирующих рРНК, мРНК, а также генов ~100 наиболее консервативных полипептидов генетические детерминанты пластид находятся в ядре хозяина, куда они переселились по мере эволюции эндоцитобиотической ассоциации.

Как уже отмечалось, фотосинтезирующие хлоропласты содержат тилакоиды.

В отдельных участках ламеллярной системы тилакоиды за счет взаимной адгезии объединяются в пачки, или *граны* (лат. *granum* — зерно). Тилакоиды, не объединенные в граны, называются тилакоидами *стромы* (греч. *stroma* — ложе). Тилакоиды, образующие грану, соединяются с 2–12 тилакоидами стромы при помощи трубчатых анастомозов.

Фотосистемы распределены в плоскости тилакоида неравномерно. Примерно 80% ФСII и светособирающей антенны (содержащей хлорофиллы *a/b*) сосредоточены в гранальных участках. В свою очередь, до 90% ФСI и вся АТФ-синтаза связаны с ламеллами стромы. Цитохром *b/f*-комплекс, напротив, равномерно распределен между гранальными и стромальными участками.

Размер хлоропластов высших растений варьирует в зависимости от хозяина, а гранальные участки различаются по величине и пространственной ориентации. Растения, вегетирующие при высокой освещенности, содержат «светолюбивые» (англ. *sun-type*) хлоропласты с гранами уменьшенного размера, и число дисков в грани может сокращаться до двух. В отличие от этого «теневыносливые» (англ. *shade-type*) хлоропласты растений, растущих при низкой освещенности, обладают хорошо развитой гранальной системой с крупными гранами.

Ультраструктура мембран хлоропластов отклоняется от гранального типа в клетках ситовидных трубок, в обкладке С4-растений, образующих в качестве первичного продукта ассимиляции CO₂ органические кислоты, а также в паренхиме САМ-растений (сокр. англ. *crassulacean acid metabolism*), которые в условиях резких суточных колебаний температуры временно запасают ассимилированный углерод в форме органических кислот.

Характерные изменения в хлоропластах происходят при избыточном накоплении запасных продуктов, в частности белков и липидов. Белки в хлоропластах многих представителей *Chlorophyceae* и некоторых видов *Anthocerotae* хранятся в *пиреноиде* (англ. *pyrenoid*; от греч. *pyren* — зерно и *eidos* — подобие). Пиреноид встречается и в пластидах других типов, например, в сложных хромопластах водорослей из класса *Cryptophyceae*. Это электроноплотное включение, не окруженное мембраной и состоящее в основном из RuBisCO (см. I том учебника). Таким образом, роль пиреноида не ограничивается запасанием белка; он участвует и в ферментативных процессах. В некоторых случаях, например в пластидах *Cryptophyceae*, *Rhodophyceae* и *Bacillariophyceae*, тилакоиды по одному или по два пронизывают тело пиреноида.

Альтернативный способ запасаания белка использует дифференцированная форма хлоропласта — *протеинопласт* (англ. *proteinoplast*; от *protein* — белок и *plastid* — пластида; белковая пластида) многих покрытосеменных растений. Белковый материал скапливается в аморфном, иногда кристаллическом теле, окруженном мембраной.

Вместо белков дифференцированные хлоропласты некоторых высших растений накапливают липиды, образующие осмиофильные гранулы. В этом случае их называют *элайопластами* (англ. *elaioplast*; от греч. *elaion* — масло и англ. *plastid* — пластида; липидная пластида); такие пластиды, в частности, содержатся в клетках выделительных железок цветковых растений.

У высших растений существует онтогенетическое семейство пластид, к которому помимо хлоропластов относятся *пропластиды*, *этиопласты*, *простые хромопласты* и *амилопласты* (рис. 281).

Пропластидами (англ. *proplastid*; от греч. *pro* — до и англ. *plastid* — пластида; предшественник пластиды) называются пластиды меристематической, или находящейся в состоянии роста ткани

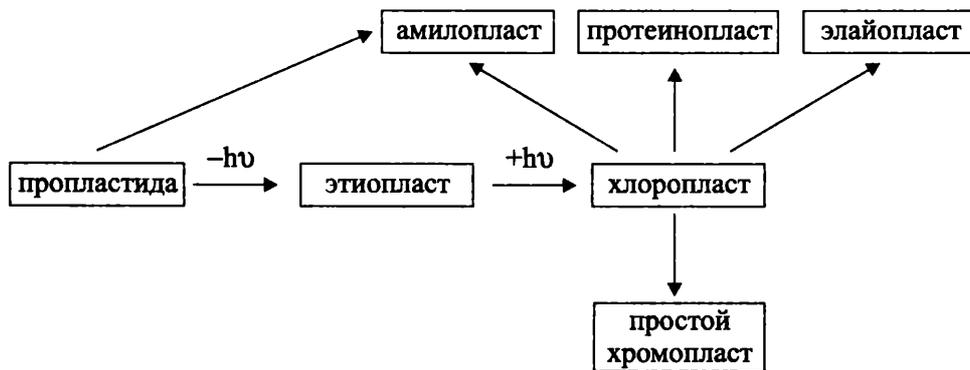


Рис. 281. Онтогенетическое семейство пластид высших растений. Объяснение в тексте.

высших растений. Они содержат слабо развитую систему тилакоидов, которые соединяются с внутренней мембраной оболочки.

В результате дифференциации пропластид образуются хлоропласты, а также:
 — *этиопласты* (бесцветны; содержат комплекс тубулярных мембран, или проламеллярное тело; образуются из пропластид; на свету превращаются в хлоропласты);
 — *простые хромопласты* (ярко окрашены вследствие накопления каротиноидов; образуются из хлоропластов);
 — *амилопласты* (бесцветны; накапливают крахмал; образуются из пропластид или хлоропластов).

Пластиды, образующиеся из пропластид или хлоропластов, а также нефотосинтезирующие хлоропласты паразитических высших растений сохраняют хромосому, хотя во втором случае в ней делегированы многие гены.

Помимо клеток меристемы высших растений, пропластиды содержатся в меристематических клетках представителей классов *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae* (бурые водоросли) и *Rhodophyceae*. Дифференциация пропластид связана со стадией онтогенеза растения-хозяина. Как правило, в пропластидах присутствуют элементы эндомембранной системы. У пропластид *Rhodophyceae* имеется периферический тилакоид, у *Phaeophyceae* — *опоясывающая ламелла* (англ. *girdle lamella*), тогда как в пропластидах сифональных *Chlorophyceae* немногочисленные тилакоиды образуют полимембранное *терминальное тело* (англ. *terminal body*). В любом случае в пропластидах присутствует примордиальная система мембран, из которых развиваются тилакоиды.

Этиопласты (англ. *etioplast*; от *etiolate* — отбеливать и *plastid* — пластида; бесцветная пластида) развиваются из пропластид у растений, выращенных в темноте. У них заблокирован биосинтез хлорофиллов *a/b*, однако накапливается их предшественник — протохлорофиллид (см. II том учебника), а также образуется немного каротиноидов. За исключением зачаточных гранальных участков, содержащих двоянные тилакоиды, в этиопластах не развита ламеллярная система. Этиопласты содержат АТФ-синтазу, цитохромы и растворимые переносчики электронов, в частности ферредоксин и пластоцианин, однако у них отсутствуют реакционные центры ФСІ и ФСІІ, а также светособирающая антенна.

Характерным морфологическим признаком этиопластов служит *проламеллярное тело* (англ. *prolamellar body*, PLB). Это паракристаллическая решетка с гексагональным, квадратным или скошенным профилем, состоящая из тетрамеров белковых субъединиц. От ее периферии в строму расходятся зачатки *протилакоидов* (англ. *prothylakoid*, PT), однако биогенез собственно тилакоидов заблокирован.

Проламеллярное тело обогащено галактолипидами и каротиноидами, а также содержит протохлорофиллид, который с помощью НАДФН-зависимой редуктазы превращается на свету в хлорофиллы *a/b*. Примерно за сутки происходит *позеленение* (англ. *greening*) этиопласта, и он последовательно дифференцируется в этиохлоропласт и хлоропласт. Позеленение сопровождается образованием ламеллярной системы с полным набором компонентов окислительного фотосинтетического аппарата.

Простые хромопласты (англ. *chromoplast*; от греч. *chromā* — цвет и англ. *plastid* — пластида; окрашенная пластида) обогащены желтыми, оранжевыми и красными каротиноидами, что служит

причиной пестрой окраски стареющих листьев. Яркая пигментация цветков, плодов и корней также часто связана с образованием хромопластов, избирательно накапливающих каротиноиды.

Простые хромопласты имеют причудливую, например, амебоидную форму. Способов накопления каротиноидов у них четыре: (1) каротиноиды совместно с другими липидами образуют в стромах осmioфильные включения, или *пластоглобулы* (англ. plastoglobule; от англ. plastid — пластида и лат. globula — шарик); (2) каротиноиды образуют кристаллические включения, состоящие из β -каротина/ликопина и расположенные внутри тилакоидов или рядом с ними; при увеличении в размере они даже деформируют хромопласт; (3) каротиноиды накапливаются в тубулярных эндомембранах, на образование которых идет липидный материал пластоглобул; (4) каротиноиды накапливаются в ламеллярных эндомембранах, которые образуются не из ламелл строма или гран, а за счет инвагинации внутренней мембраны оболочки хромопласта.

Амилопласты (англ. amyloplast; от греч. amilon — крахмал и англ. plastid — пластида; крахмальная пластида) запасают крахмал. Совместно с протейнопластами и элайопластами их раньше называли *лейкопластами* (англ. leucoplast; от греч. leukos — белый и англ. plastid — пластида; белая пластида), хотя отсутствие или низкое содержание пигментов служит общим признаком пластид с разным запасным материалом и неодинаковой онтогенетической историей.

Способность временно накапливать крахмал характерна для *Chlorophyceae* и высших наземных растений, у которых он выполняет функцию пула углерода и расходуется при снижении фотосинтетической активности. На перманентной основе крахмал накапливается в специализированных амилопластах органов и тканей высших растений. Прежде всего, это запасующие ткани, хотя амилопласты также содержатся в клетках меристемы и корневого чехлика.

Амилопласты имеют преимущественно сферическую форму и запасают крахмал, который откладывается в стромах в виде мелких гранул или одной крупной гранулы.

Сложные пластиды (англ. complex plastid). Сложные пластиды произошли путем вторичного эндоцитобиоза, т. е. не от эндоцитобиотических бактерий, а от эндосимбиотических фототрофных протистов, уже содержащих простые пластиды. В соответствии с происхождением и пигментным составом они подразделяются на две группы.

К первой группе относятся *сложные хлоропласты*. Они содержат хлорофиллы *a/b* и характерны для водорослей, относящихся к классу *Chlorarachniophyceae*, а также для протистов из класса *Euglenozoa*. Согласно результатам секвенирования 18S рРНК, они произошли от эндоцитобиотических *Chlorophyceae* (зеленых водорослей). Сложные хлоропласты сходны с простыми хлоропластами по составу пигментов светособирающей антенны и строению ламеллярной системы; в функциональном отношении между ними также нет принципиальных различий.

Ко второй группе относятся *сложные хромопласты*. Они произошли от эндоцитобиотических *Rhodophyceae*, содержат хлорофиллы *a/c* (иногда совместно с фикобилипротеинами) и характерны для водорослей, относящихся к сборной группе «*Chromista*» (классы *Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Cryptophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Haptophyceae*, *Phaeophyceae*, *Raphidophyceae* и *Xanthophyceae*), а также для протистов из класса *Dinzoa*.

Сложные хлоропласты. Сложные пластиды *Chlorarachniophyceae* окружены четырьмя мембранами (рис. 282). Две внутренние мембраны принадлежат простой пластиде. Третья, промежуточная мембрана представляет собой рудиментарную СМ эукариотного эндоцитобионта. Четвертая, внешняя мембрана, или мембрана *хлоропластного эндоплазматического ретикулума* (англ. chloroplast endoplasmic reticulum, CR) происходит от мембраны фагосомы хозяина.

Между наружным и внутренним дублетами мембран находится *перипластидное пространство* (англ. periplastid space), которое соответствует рудиментарному цитоплазматическому компартменту эукариотного эндоцитобионта. В нем находится рудиментарное ядро, или *нуклеоморф* (англ. nucleomorph; от лат. nucleus — ядро и греч. morphe — образ).

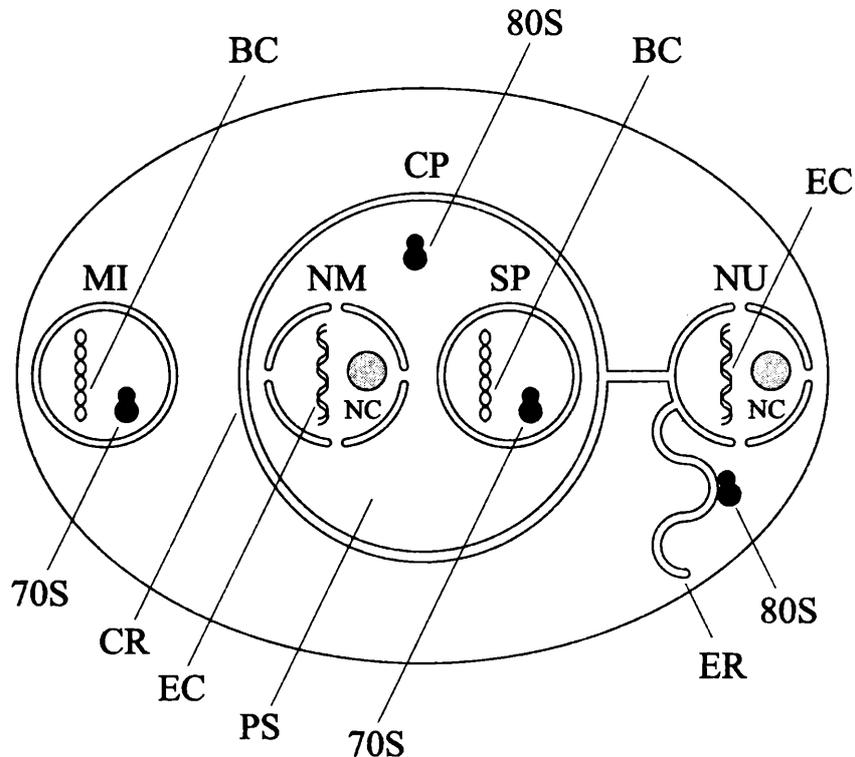


Рис. 282. Схема клетки со сложной пластидой.

NU — ядро; NC — ядрышко; MI — митохондрия; ER — эндоплазматический ретикулум; BC — бактериальная хромосома; EC — эукариотная хромосома; 70S и 80S — рибосомы; CP — сложная пластида; CR — хлоропластный эндоплазматический ретикулум; NM — нуклеоморф; PS — перипластидное пространство; SP — простая пластида.

Нуклеоморф имеет двойную мембранную оболочку с порами. Его деление происходит без конденсации хроматина и образования митотического веретена. Геном нуклеоморфа размером 400–600 т.п.н. содержит 200–300 генов. К ним относятся информационные гены, гены домашнего хозяйства, а также гены белков, которые экспортируются во внутреннюю часть (кор) ксеносомы. В частности, это ген тубулин-подобного белка FtsZ, из которого формируется кольцо деления простой пластиды.

По аналогии с геномом цианелл, который входит в число самых малых прокариотных геномов (~150 т.п.н.), геном нуклеоморфа является минимальным эукариотным геномом. Изучение таких *бонсай-геномов* (англ. *bonsai genome*; от японского названия карликового декоративного растения) важно для понимания эволюции генных структур у низших эукариотов.

Помимо нуклеоморфа в перипластидном пространстве находятся 80S-рибосомы. Таким образом, в сложных пластидах сосуществуют две популяции рибосом (рис. 282). Бактериальные 70S-рибосомы локализованы в коре ксеносомы, их 16S рРНК кодируется геномом простой пластиды. Эукариотные 80S-рибосомы расположены в перипластидном пространстве, их 18S рРНК закодирована в геноме нуклеоморфа.

Протисты из класса *Euglenozoa* примыкают к водорослям из класса *Chlorarachniophyceae* благодаря общему происхождению путем вторичного эндоцитобиоза между фаготрофными протистами и одноклеточными зелеными водорослями. В пользу этого свидетельствует сходство морфологии ламеллярной системы, одина-

ковый набор хлорофиллов, гомология антенных апопротеинов, а также гомология гена *rbcS*, кодирующего малую субъединицу RuBisCO.

Хлоропласты *Euglenozoa* окружены не четырьмя, а тремя мембранами, что объясняется редукцией промежуточной мембраны — рудиментарной СМ эукариотного эндоцитобионта. Нуклеоморф также был утрачен в ходе внутриклеточной эволюции эндоцитобионта, однако часть его генов успела переселиться в ядро хозяина. Пластиды ~30% видов эвгленоидов вторично редуцированы; многие из таких бесцветных форм способны к фаготрофии.

Сложные хромопласты (англ. complex chromoplast). У представителей сборной группы «*Chromista*» (за исключением *Cryptophyceae*, сложные хромопласты которых имеют одинаковую структуру со сложными хлоропластами, в частности, содержат нуклеоморф) эти органеллы обладают рядом общих структурных признаков. Прежде всего, они окружены четырьмя мембранами. Периферическая мембрана, или мембрана хлоропластного эндоплазматического ретикулума покрыта рибосомами и переходит во внешнюю мембрану ядерной оболочки хозяина. В отличие от сложных пластид *Chlorarachniophyceae* и *Cryptophyceae* внутренний и наружный дубликаты мембран тесно примыкают друг к другу.

Сложные хромопласты «*Chromista*», за исключением *Cryptophyceae* и *Eustigmatophyceae*, содержат периферическую антенну, в которую входят хлорофиллы *a/c*. У сложных хромопластов *Cryptophyceae* светособирающая антенна двух типов — интегральная (содержит хлорофиллы *a/c*) и периферическая (содержит фикобилипротеины, но, в отличие от фикобилисомы, расположена на внутренней, а не на внешней поверхности тилакоида). Сложные хромопласты *Eustigmatophyceae* обладают интегральной антенной с вторично упрощенным пигментным составом (только один хлорофилл — *a*).

У сложных хромопластов *Chromista* фотосистемы равномерно распределены в плоскости тилакоида. Интегральные и периферические антенны одновременно взаимодействуют с ФС I и ФС II. В отличие от тилакоидов сложных хлоропластов, тилакоиды сложных хромопластов не образуют грани.

Протистов из класса *Dinzoa* рассматривают как сестринскую группу сборной группы «*Chromista*». У большинства фотосинтезирующих видов *Dinzoa* хромопласт окружен тремя мембранами. До половины видов динофлагеллят вторично потеряли пластиды и перешли на фаготрофное питание.

Специализированные пластиды. Специализированными пластидами (англ. specialized plastid) называются такие ксеносомы, которые содержат реакционные центры и светособирающие антенны, а также обладают слаборазвитой ламеллярной системой, но практически бесцветны из-за низкого содержания хлорофилла и каротиноидов. Они слабо ассимилируют световую энергию, что не позволяет провести функциональную параллель между ними и квази-фототрофными бактериями (см. II том учебника).

Известны два примера специализированных пластид — апикопласты *Apicomplexa* и тилакосомы амeboидных жгутиконосцев.

Апикопласты. Внутриклеточные паразитические протисты из группы *Apicomplexa* (*Eimeria tenella*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis muris*, *Toxoplasma gondii* и др.) содержат два генома с материнским типом наследования. Один из них соответствует митохондриальному геному размером ~7 т.п.н. Другой, размером ~35 т.п.н., представляет собой кольцевую группу сцепления, содержащую хлоропластные гены *proBC* (кодируют субъединицы РНК-полимеразы), *tufA* (кодирует фактор элонгации Tu) и *clpC* (кодирует субъединицу протеазы).

С помощью гибридизации *in situ* показано, что ген 16S рРНК входит в состав более крупного генома *T. gondii* и экспрессируется в цитоплазматических органеллах, которые раньше описывались под названиями *сферическое тело* (англ. spherical body), *полимембранная вакуоль* (франц. vacuole plurimembranaire) и *полый цилиндр* (нем. Hohlzylinder). В настоящее время их называют *апикопластами* (англ. apicoplast). По строению они сходны со сложными пластидами: окружены четырьмя мембранами, размножаются бинарным делением и заполнены частицами диаметром ~18 нм, очень похожими на 70S-рибосомы.

Сходство апикопластов со сложными пластидами подтверждается результатами филогенетического анализа. В частности, ген фактора элонгации (*tufA*) у этих ксеносом гомологичен гену фактора элонгации у сложных пластид *Dinzoa*.

Апикопласты во многом напоминают сложные пластиды, но неспособны к фотосинтезу, хотя при помощи высокочувствительной жидкостной хроматографии, а также низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии в них обнаружены следы протохлорофиллида *a* и хлорофилла *a*. Кроме того, в геномах ксеносом *T. gondii* и *S. muris* с помощью PCR-реакции и саузерн-блот гибридизации выявлен ген *psbA*, кодирующий «каркасный» полипептид D1 реакционного центра ФСII.

Любопытно, что паразитические *Apicomplexa*, в частности малярийный плазмодий, чувствительны к триазиновым гербицидам и DCMU, которые действуют на уровне акцепторного участка ФСII (иными словами, малярию можно лечить ингибиторами фотосинтеза!).

Тилакосомы. Специализированные пластиды этого типа характерны для амебодных жгутиконосцев, первый представитель которых, *Psalteriomonas lanterna*, был выделен в начале 1990-х гг. в окрестностях Наймегена (Нидерланды). Этот свободноживущий микроаэроб не содержит пластид, митохондрий, микротелец и диктиосом; в нем слабо развит эндоплазматический ретикулум. На обеих стадиях развития, амебодной и жгутиковой, в клетках обнаруживаются гидрогеносомы (см. раздел 20.4.2), а также 10–20 цитоплазматических органелл с ламеллами, напоминающими тилакоиды. Из-за внешнего сходства с пластидами такие ксеносомы были названы *тилакосомами* (англ. thylakosome). В начале своего онтогенеза они похожи на этиолированные (т. е. имеющие неразвитую пигментную систему) хлоропласты или на хромопласты, позже — на цианобактерии, в зрелом состоянии — на пластиды *Apicomplexa*.

Тилакосомы содержат ДНК, что доказывается окрашиванием флуорохромами бромистым этидием и диаминофенил-индолом. В геноме этой органеллы содержатся гены рРНК с инвертированными повторами, что характерно для пластид. Строма тилакосомы характерно гранулирована, что говорит о присутствии рибосом; кроме того, иммуномикроскопическим методом в ней выявлена RuBisCO.

С помощью высокочувствительной жидкостной хроматографии и масс-спектропии у *P. lanterna* обнаружены следы хлорофилла *a* и каротиноидов. Тилакосомы содержат гены *psaA* и *psbB*, об экспрессии которых косвенно свидетельствует выделение кислорода на свету и поглощение кислорода по типу реакции Мелера.

В то же время тилакосома содержит цитохромоксидазу *aaz*-типа и обладает слабой темновой дыхательной активностью.

Таким образом, апикопласты *Apicomplexa* проявляют способность к рудиментарному фотосинтезу, а тилакосомы амебодных жгутиконосцев — к рудиментарному фотосинтезу и рудиментарному аэробному дыханию. Каково же физиологическое значение специализированных пластид для микроорганизмов, ведущих паразитиче-

ское или гетеротрофное существование в слабо освещенных микроаэробных нишах? Ответа на этот вопрос пока нет, но — судя по тому, что эти ксеносомы сохранились на протяжении сотен миллионов лет эволюции — они выполняют какую-то важную метаболическую или регуляторную функцию.

20.4.2. Хемотрофные ксеносомы

В отличие от фототрофных ксеносом, хемотрофные ксеносомы обладают только катаболической системой, с помощью которой энергия ассимилируется в форме АТФ.

Хемотрофные ксеносомы подразделяются на *митохондрии*, *гидрогеносомы* и *митосомы*.

Митохондрии. Классический термин «митохондрия» (англ. mitochondrion; от греч. mitos — нить и chondros — зерно; «похожая на гирлянду») указывает не на функциональную специализацию этих органелл, а лишь подчеркивает их форму, причем весьма специфическую — в кардиомиоцитах млекопитающих.

Согласно результатам анализа первичной структуры 16S рРНК, митохондрии растений, грибов и протистов занимают взаимно обособленное положение на дендрограмме класса «*Alphaproteobacteria*». Точнее сказать, они произошли от разных пурпурных бактерий, что подтверждается разным размером мДНК, а также различиями в структуре и экспрессии митохондриальных генов. В ходе эндоцитобиотической эволюции эти бактерии потеряли пигментный аппарат и перешли на хемотрофию.

Мыслится следующий сценарий происхождения митохондрий. Путем эндоцитоза в цитоплазму протоэукариотного хозяина проникла пурпурная бактерия. Система ассимиляции энергии у нее была амбивалентной, т. е. позволяла использовать и энергию света, и энергию химических субстратов (напомним, что в первом случае цитохром *bc*-комплекс заполняет электронную вакансию в первичном доноре реакционного центра, а во втором случае — восстанавливает цитохромоксидазу; см. II том учебника). По мере превращения эндоцитобионта в органеллу у него исчезла пигментная система, но сохранилась электрон-транспортная цепь, используемая при дыхании.

Энергетическая специализация митохондрий и их метаболическая интеграция в эндоцитобиотическую систему основаны на экспорте АТФ в цитоплазму хозяина с помощью АДФ:АТФ-транслоказы. В матриксе митохондрии происходит окислительное декарбоксилирование пирувата. Катализатором этой реакции служит *CoA*-зависимая пируватдегидрогеназа; образующийся ацетил-*CoA* поступает в цикл Кребса (см. II том учебника). Кофакторы дегидрогеназ, участвующих в этом цикле (НАД(Ф)Н и ФАДН₂), передают электроны дыхательной цепи, и при этом создается *Pmf*.

«Классический» вариант митохондрий — это аэробные митохондрии гепатоцитов человека, содержащие терминальную оксидазу цитохром *aaz*-типа. Роль акцептора электронов выполняет молекулярный кислород. Иногда при низком парциальном давлении кислорода митохондрии переходят на анаэробное дыхание (примером служит нитратное дыхание гриба *Fusarium oxysporum* и некоторых ресничных инфузорий, а также фумаратное дыхание трипаносомид и плоских червей). В онтогенезе нематоды *Ascaris suum* аэробное дыхание сменяется фумаратным дыханием. Наконец, в митохондриях анаэробной инфузории *Nyctotherus* sp. происходит субстратзависимое фосфорилирование АДФ, что позволяет рассматривать эти органеллы как переходную форму от собственно митохондрий к другим хемотрофным органеллам — гидрогеносомам (см. ниже).

По степени генетической автономии митохондрии уступают пластидам; в данном случае эндоцитобионт максимально зависим от хозяина. Так, в геноме митохондрии ретортомонады *Reclinamonas americanus* всего 97 гена, в то время как в пластидный геном красной водоросли *Porphyra purpurea* входят 253 гена.

В мДНК закодированы только тРНК и несколько белков; остальные митохондриальные гены переселились в ядро. Митохондрии имеют такой же морфотип, как и граммотрицательные бактерии; правда, в отличие от цианелл, они не сохранили ригидный слой клеточной стенки. За единственным исключением (у хромофитных водорослей), деление митохондрий осуществляется перетяжкой, хотя и без участия «бактериального» белка деления FtsZ (см. раздел 17.4.5).

По аналогии с хлоропластами, которые проходят онтогенетическую стадию пропластиды, митохондрии проходят стадию *промитохондрии*. Но если в зрелых митохондриях имеются *кристы* — гомологи бактериальных ИСМ (которые содержат дыхательную цепь и развиваются соразмерно энергетическим потребностям хозяина), в промитохондриях они отсутствуют.

Кристы соединяются с внутренней мембраной оболочки митохондрии при помощи стебелька-перемычки. Вопреки своему названию, кристы (лат. *crista* — гребень) не только имеют разную форму у разных организмов, но и изменяют ее в зависимости от метаболического статуса органеллы.

Кристы митохондрий у растений, грибов и животных преимущественно ламеллярные, хотя в последнем случае встречаются тубулярные и призматические варианты. У протистов в митохондриях встречаются кристы тубулярной, тубуло-везикулярной, везикулярной, дискоидной, ламеллярной, а также нерегулярной формы. Геометрия крист учитывается в систематике протистов, а ее разнообразие служит дополнительным свидетельством полифилетического происхождения митохондрий.

Биогенез митохондрий в большей степени, чем биогенез пластид, зависит от хозяина.

Как уже отмечалось, ядерно-цитоплазматические системы кодируют и синтезируют 95–98% митохондриальных белков, а сами митохондрии — лишь несколько гидрофобных полипептидов. К ним, в частности, относятся: апоцитохром *b₆*, три субъединицы цитохромоксидазы *a₃* и OSCP-субъединица протон-транслоцирующей АТФ-синтазы (сокр. англ. *oligomycin sensitivity conferring protein*).

Остальные митохондриальные белки синтезируются в цитоплазме хозяина в виде препротейнов, содержащих N-концевые транзитные пептиды. В ходе многоэтапного процесса, при котором используется энергия гидролиза АТФ, препротейны распознаются рецепторами, расположенными на поверхности митохондрии, и приобретают развернутую конформацию. Затем они проникают в матрикс через зоны адгезии между двумя мембранами оболочки митохондрии.

Дальнейший таргетинг белков осуществляется с помощью шаперона Hsp60 — гомолога бактериального шаперона GroEL (см. раздел 18.1.2). Часть белков реэкспортируется в пространство между мембранами оболочки митохондрии; примечательно, что секреция осуществляется с помощью Sec-системы бактериального типа (см. I том учебника).

Митохондрии филогенетически древнее пластид. На пути внутриклеточной эволюции (фагоцитированная бактерия → облигатный эндоцитобионт → ксеносома → митохондрия) произошли глубокие генетические изменения, которые обеспечили физиологическую специализацию митохондрии: (1) делеция генов, кодирующих апопротейны фотосинтетического реакционного центра, а также апопротейны светособирающей антенны; (2) делеция генов, кодирующих дегидрогеназы, специфичные по отношению к неорганическим субстратам; (3) делеция генов, отвечающих за углеродную автотрофию; (4) селекция терминального участка элек-

трон-транспортной цепи по признаку повышения сродства к молекулярному кислороду.

Точная датировка процессов, связанных с приобретением митохондрий эукариотной клеткой, отсутствует. В свое время кандидатом на роль «первично митохондриальных» протистов считали сборную группу *Amitozoa*, которая находится в основании ствола родословного древа *Eucarya* и в которую входят микроспоридии *Giardia*, *Entamoeba* и *Trichomonas*. Сейчас *Amitozoa* рассматриваются в качестве «вторично митохондриальных» протистов (см. I том учебника). Иными словами, у их предков вначале были митохондрии, а потом они их потеряли. В доказательство приводится тот факт, что в ядерном геноме *E. histolytica* сохранились гены митохондриального типа. Вероятно, исчезновение митохондрий в филогенезе протистов было таким же закономерным явлением, как и исчезновение пластид.

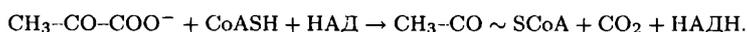
Гидрогеносомы. Термином «гидрогеносома» (англ. hydrogenosome; от лат. hydrogenium — водород и греч. soma — тело; «частица, выделяющая водород») обозначается сборная группа хемотрофных ксеносом, побочным продуктом метаболизма которых служит молекулярный водород. Некоторые варианты гидрогеносом филогенетически близки митохондриям.

Гидрогеносомы встречаются у трихомонад, ресничных инфузорий (*Metopus consortus*, *Plagiopyla frontata*) и амебоидных жгутиконосцев (*Psalteriomonas lanterna*), а также у хитридиомицетов. В качестве побочных продуктов метаболизма они выделяют молекулярный водород и ацетат.

Подобно митохондриям, гидрогеносомы имеют оболочку из двух мембран. Иногда они содержат мембранные структуры, напоминающие кристы. Деление этих органелл осуществляется с помощью бактериального механизма, перетяжкой (хотя, как у митохондрий, белок деления FtsZ у них отсутствует). По аналогии с митохондриями, гидрогеносомы импортируют хозяйские белки, препротейны которых содержат концевые транзитные пептиды. Среди них выявлены гомологи митохондриальных шаперонов — белки Hsp10, Hsp60 и Hsp70. Белок, переносящий АТФ из гидрогеносомы в цитоплазму хозяина (АДФ:АТФ-транслоказа), также гомологичен митохондриальному.

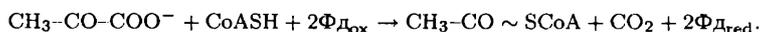
Гидрогеносомы и митохондрии различаются по механизму окислительного декарбоксилирования пирувата.

Митохондрии окисляют пируват с помощью НАД-зависимой пируватдегидрогеназы:

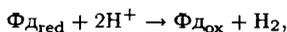


Ловушкой для электронов служит дыхательная цепь, переносящая их от НАДН к терминальному акцептору — молекулярному кислороду.

В то же время гидрогеносомы окисляют пируват при помощи ферредоксинзависимой пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы:



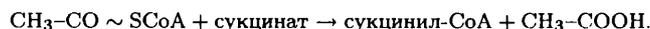
В данном случае роль ловушки для электронов выполняют протоны, а катализатором служит гидрогеназа:



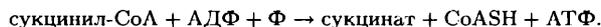
где $\text{Ф}_{\text{ред}}$ и $\text{Ф}_{\text{дох}}$ — соответственно, восстановленный и окисленный ферредоксин.

CoASH регенерируется из ацетил-CoA не с помощью цитрат-синтазы, как в митохондриальном цикле Кребса, а с помощью сукцинат:ацетат CoA-трансферазы и сукцинат-тиокиназы (сукцинил-CoA-синтазы).

Сукцинат:ацетат CoA-трансфераза катализирует трансацилазную реакцию:



В свою очередь, сукцинат-тиокиназа катализирует реакцию субстратзависимого фосфорилирования АДФ:



Установлено, что в большинстве случаев гидрогеносомы не имеют генома. Тем не менее, у протиста *Nyctotherus ovalis*, представителя подкласса *Heterotrichia*, амплифицирован ядерный ген, гомологичный митохондриальному гену 16S рРНК. Это позволяет считать гидрогеносомы (по крайней мере, некоторые варианты) видоизмененными митохондриями. Согласно альтернативной гипотезе, митохондрии и гидрогеносомы ведут начало от общего предка, факультативно анаэробного представителя класса «*Alphaproteobacteria*».

Митосомы. В конце 1990-х гг. у *Enthamoeba histolytica* были открыты ксеносомы нового типа, названные «митосомами» (англ. mitosome), или «криптонами» (англ. crypton; от греч. kryptos — скрытый).

Митосома представляет собой рудиментарную митохондрию, полностью потерявшую способность к хемотрофной ассимиляции энергии. По аналогии со специализированными пластидами ее можно рассматривать как продукт эволюционного преобразования хемотрофной ксеносомы в органеллу с вторичной, еще не выясненной функцией.

20.5. ЭКТОБИОЗ

Эктобиоз (англ. ectobiosis; от греч. ectos — снаружи и bios — жизнь; «жизнь снаружи другого организма») — это такая симбиотическая система, в которой младший партнер, в нашем случае прокариот, поселяется на поверхности растения или животного. Эктобиоз не следует путать с эпибиозом, т. е. поверхностной ассоциацией между прокариотами или между прокариотами и протистами.

За исключением *гнотобиотов* (от греч. gnotos — познаваемый и bios — жизнь; в данном случае — «экспериментальное существо»), т. е. безмикробных особей, выращенных в стерильных условиях, растения и животные всегда содержат симбиотических бактерий.

По числу партнеров это либо бипартитный, либо мультипартитный эктобиоз. Что касается взаимоотношений между партнерами, то они принимают форму мутуализма, комменсализма или паразитизма.

20.5.1. Эктобиоз бактерий с животными

Поверхность тела животных колонизирована прокариотами, преимущественно аэробами. В этой элективной нише бактерии оказываются в состоянии мультистресса (водный стресс в сочетании с осмотическим шоком, рН-стрессом и токсическим стрессом; см. главу 19). В частности, рН поверхности кожи человека лежит в кислой области (4,0–5,5); кроме того, она обогащена катионами Ca^{2+} и анионами Cl^- . Наконец, эта ниша относительно бедна органическими субстратами, среди которых преобладают липиды. Все это провоцирует «общий» стресс и, соответственно, PpoS -ответ.

Бактериальные эктобионты животных подразделяются на три группы. Прежде всего, это *автохтонные* (см. I том учебника) представители филм ВХIII *Firmicutes* и ВХIV *Actinobacteria*, в частности сапрофитные виды *Mycobacterium*. В зависимости от субъективных особенностей человека, плотность их популяции на коже составляет $10^3 - 10^6$ клеток·см⁻², что в сумме дает $\sim 3 \cdot 10^8$ клеток. Далее следуют *аллохтонные* (см. I том учебника) патогены, в частности *Streptococcus pyogenes*. Вспышки их размножения связаны с повреждением эпителия или нарушением нормального функционирования экзокринных желез. Наконец, это неспецифические транзитные сапрофиты, например *Bacillus* spp.

20.5.2. Эктобиоз бактерий с растениями

Поверхность растения подразделяется на *филлоплану* и *ризоплану* (см. I том учебника). У наземных растений филлоплана подвергается резкой смене температуры и влажности, а также воздействию ультрафиолетового излучения; кроме того, на ней мало органических субстратов. Поэтому она представляет собой элективную и экстремальную нишу, где бактерии оказываются в состоянии мультистресса. Так же, как у животных, микробиота поверхности растений подразделяется на автохтонную, аллохтонную и транзитную.

Среди автохтонов филлопланы преобладают представители филм ВХII *Proteobacteria*, ВХIII *Firmicutes*, ВХIV *Actinobacteria* и ВХХ *Bacteroidetes*. Взаимоотношения между ними и растением можно определить как комменсализм, хотя при повреждении кутикулы они уподобляются аллохтонам и переходят к паразитизму (см. ниже).

В ризоплане между бактериями и корнями устанавливается встречный сигналинг, результатом чего становится тесное физическое взаимодействие партнеров и их трофический мутуализм. Эктобионты корней, как и эктобионты листьев, чаще всего являются безвредными эпифитами.

Метаболической базой наиболее тесного растительного эктобиоза служит способность младшего партнера к диазотрофии.

Дiazотрофные цианобактерии вступают в эктобиоз с представителями только двух отделов царства *Plantae* — моховидными (*Bryophyta*) и папоротниковидными (*Pterophyta*), причем по неизвестной причине в обеих группах зарегистрированы лишь редкие примеры образования симбиотических ассоциаций. Круг младших партнеров тоже ограничен: это неветвящиеся трихомные цианобактерии, способные образовывать гетероцисты (доля которых от общего числа клеток увеличивается с 3–4% до 30–40%).

Эктобиоз у моховидных. Из 340 родов отдела моховидных (*Bryophyta*) представители только 6 родов (*Anthoceros*, *Blasia*, *Cavicularia*, *Dendroceros*, *Notothylas* и *Phaeoceros*) имеют эктобионтов-цианобактерий. Как правило, гаметофиты хозяев образуют небольшие, длиной несколько сантиметров, талломы, где в полостях, расположенных на брюшной поверхности, лежат сферические микроколони *Nostoc* spp. диаметром <1 мм.

Эктобиоз у папоротниковидных. Несколько видов миниатюрного водного папоротника *Azolla* вступают в эктобиоз с цианобактерией *Anabaena* spp. Цианобионт поселяется в полостях, расположенных либо на брюшной поверхности гаметофита, либо на дорзальных листьях спорофита. Нитевидные выросты растительных клеток, выстилающих полости, протягиваются к цианобактериям, что способствует взаимному обмену метаболитами. Помимо цианобактерий в тех же полостях содержатся и другие бактерии, т. е. это мультипартитный эктобиоз. Эктобиоз *Azolla-Anabaena* имеет большое хозяйственное значение, так как повышает плодородие рисовых полей.

Дiazотрофный ассоциативный симбиоз. Крайним вариантом эктобиоза является *ассоциативный симбиоз*, при котором прокариотный партнер дистанционно взаимодействует с корневой

системой хозяина. В качестве примера назовем симбиоз между *Azospirillum* spp. и некоторыми злаками, в частности пшеницей.

20.6. ЭНДОБИОЗ

Термин «эндобиоз» (англ. endobiosis; от греч. endon — внутри и bios — жизнь; «жизнь внутри другого организма») используется по отношению к такой симбиотической системе, где младший партнер, в нашем случае прокариот, поселяется в теле животного или растения, но не проникает внутрь его клеток.

20.6.1. Эндобиоз бактерий с животными

Большинство эндобионтов животных поселяется в пищеварительном тракте. В норме у млекопитающих, птиц, насекомых и других животных эта система содержит бактерий на порядок больше, чем наружная поверхность тела. Иногда, например у всеядных млекопитающих, соотношение собственных и бактериальных клеток составляет 1 : 10, а у крупных особей масса эндобионтов достигает нескольких килограммов. Они способствуют полостному пищеварению хозяина, расширяя его пищевой рацион, а также снабжают его кофакторами метаболизма.

В обмен на выделяемые бактериями экзометаболиты, важнейшими из которых являются продукты гидролиза целлюлозы, витамины и незаменимые аминокислоты, хозяин предоставляет младшему партнеру богатую субстратами питательную среду. Кроме того, анаэробные эндобионты защищены от окислительного стресса.

Бактериальное сообщество пищеварительного тракта состоит из четырех компонентов. Первый компонент — это автохтонные мутуалисты и комменсалы, которые образуют специфические ассоциации с хозяином; примером служат непатогенные штаммы *Bacteroides* spp. и *E. coli*. Второй компонент — это случайные мигранты, которые приходят из окружающей среды и не образуют с хозяином специфические ассоциации; в качестве примера можно привести сапрофитных актинобактерий. Третий компонент, который обнаруживается эпизодически как в пищеварительном тракте, так и в других системах животного — это аллохтонные сапрофиты и паразиты, которые развиваются при немикробном патогенезе клеток и тканей или сами вызывают повреждение. Четвертый, не обязательный компонент — это используемые в профилактических и лечебных целях *пробиотики* (от греч. pro — в защиту и bios — жизнь; в данном случае — «агенты защиты жизни животного»), в частности *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., которые осуществляют биоконтроль, т. е. являются биологическими конкурентами патогенных бактерий.

Специфические ассоциации, возникшие в результате коэволюции эндобионта с хозяином, основаны либо на мутуализме и комменсализме, либо на паразитизме. По числу партнеров это либо бипартитный, либо мультипартитный эндобиоз.

Мутуалистический бипартитный эндобиоз. Характерным примером является ассоциация между светящейся бактерией *Vibrio fischeri* и ее хозяином — каракатицей *Euprymna scolopes*. Бактериальная популяция оккупирует двухлопастной светящийся орган с многочисленными криптами, полости которых через поры сообщаются с окружающей морской водой. Благодаря бактериальной биолюминесценции (см. II том учебника) моллюск по ночам отпугивает хищников. Ассоциация имеет периодический характер, и ювенильные особи хозяина каждый раз заново инфицируются свободноживущими бактериями. Полости крипт регулярно опорожняются, а оставшиеся в них бактерии активно размножаются, так что квази-стационарный размер популяции *V. fischeri* составляет $10^6 - 10^9$ клеток в зависимости от возраста хозяина. Биолюминесценция сложно контролируется

на физиологическом уровне, а также генетически, путем позитивной регуляции оперона *lux* (см. раздел 18.4.2).

Мутуалистический мультипартитный эндобиоз. Примером служит анаэробное целлюлолитическое сообщество рубца жвачных животных или кишечника термитов. Это частный случай анаэробного деструктивного сообщества (см. II том учебника). Его субстратной основой является растительная целлюлоза, а микробными компонентами — главные обитатели пищеварительного тракта травоядных животных и термитов: целлюлолитические бактерии (*Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes* и др.), кислотообразующие бактерии-броидильщики, ацетогенные бактерии и метаногенные археи. В функциональном отношении они подразделяются на первичных анаэробов (гидролитиков и диссипотрофов с метаболизмом броидильного типа) и вторичных анаэробов (с дыхательным метаболизмом). О глобальной роли этого эндобиоза красноречиво говорят две цифры — растения ежегодно синтезируют $\sim 10^{12}$ т целлюлозы, а популяция термитов составляет $\sim 2 \cdot 10^{17}$ особей.

Паразитический эндобиоз. В основе зоопатогенного действия эндобионтов лежат два разных механизма. Менее распространенный, неспецифический механизм связан с образованием ROS, которые повреждают мембрану хозяина; примером служат микоплазмы *Mycoplasma arthritidis*, *M. genitalium* и *M. pneumoniae* (см. раздел 19.1.6.1).

Более распространенный механизм связан с образованием специфических токсинов и других факторов вирулентности, повреждающих клетку-мишень и/или влияющих на экспрессию ее генов. Рассмотрим важнейшие примеры.

***Bordetella pertussis*.** Этиологический агент коклюша, *B. pertussis* — это исключительно человеческий патоген, который ингаляционным путем инфицирует верхние дыхательные пути. Факторы вирулентности этой бактерии подразделяются на адгезины и токсины. Главным адгезином *B. pertussis* является филаментозный гемагглютинин (англ. filamentous haemagglutinin; FHA), который связывается с клетками и внеклеточным материалом дыхательного эпителия. Колонизация респираторного тракта дополнительно обеспечивается фимбриями. Наряду с адгезинами *B. pertussis* образует токсины, в основном белковой природы. К их числу относится коклюшный токсин (англ. pertussis toxin; PTX), который обладает АДФ-рибозилазной активностью. Его мишенью являются сигнальные G-белки хозяина, которые в результате АДФ-рибозилирования теряют свою активность. Другой фактор вирулентности, аденилатциклаза (англ. adenylate cyclase; AC) вызывает апоптоз альвеолярных макрофагов. Факторы вирулентности *B. pertussis* доставляются в клетку хозяина секреторными системами III и IV типа, гены которых входят в состав хромосомного островка патогенности этой бактерии (см. раздел 16.6.1.3). Вирулентность *B. pertussis* контролируется мембранным сенсором BvgS (от сокр. англ. *Bordetella virulence gene*). В благоприятных условиях, при 37°C он автофосфорилируется и через фосфореле передает сигнал транскрипционному фактору BvgA, который активирует промоторы генов вирулентности *vag*. В свою очередь, при низкой температуре и других неблагоприятных условиях фосфореле прерывается, и гены *vag* не экспрессируются.

***Helicobacter pylori*.** Этот классический эндобионт вызывает у человека пептическую язву, мукозную лимфому и желудочную аденокарциному. При оральном инфицировании >90% клеток проникает в слой слизи на поверхности желудочного эпителия. Ключевым фактором колонизации и выживания является высокая уреазная активность этой бактерии, позволяющая избежать кислотного шока за счет образования аммиачной «атмосферы». С помощью адгезина BabA ~10% клеток *H. pylori* вступают в тесный контакт с эпителиальными клетками и впрыскивают в их цитоплазму факторы вирулентности. Островок патогенности *cag* (сокр. англ. cytotoxin-associated gene), гомологичный островкам патогенности других паразитов животных (в частности, *B. pertussis*) и паразитов растений (в частности, *A. tumefaciens*), кодирует секреторную систему IV типа. Она состоит из мультикомпонентного базального тела, расположенного в периплазматическом компартменте, и иглы, выступающей на поверхность клетки. Среди инъектируемых белков важнейшим является CagA. После попадания в клетку хозяина он прикрепляется к внутренней поверхности плазматической мембраны, фосфорилируется тирозинкиназой и совместно с белками N-WASP (сокр. англ. N-Wiskott-Aldrich syndrome) и Arp2/3 (сокр. англ. actin rearrangement protein), а также ГТФ-связывающими белками индуцирует периферическую полимеризацию актина, что вызывает острое воспаление. Наряду с этим в результате индукции ядерного фактора NF- κ B активируется хозяйская транскрипция, что служит причиной злокачественного роста. Успеху *H. pylori* способствует то, что белок CagA не воспринимается клеткой хозяина как чужеродный, а также то, что бактерия активно избегает фагоцитирования.

***Streptococcus pneumoniae*.** Пневмококки пользуются дурной славой свержубицы, поскольку в странах третьего мира от пневмонии ежегодно умирает ~1 млн. человек. В детском возрасте *S. pneumoniae* может также вызывать заражение крови, менингит и отит. Кроме того, он служит

причиной артрита, гнойных абсцессов, конъюнктивита и перикардита. Факторами вирулентности пневмококков является поверхностный адгезин PsaA, а также ряд токсинов и литических ферментов, в том числе гиалуронидаза, нейраминидаза, перфорирующий токсин, пневмолизин и протеаза IgA.

20.6.2. Эндобиоз бактерий с растениями

По сравнению с животными растения надежнее защищены от проникновения бактерий, поскольку обладают толстыми клеточными стенками и снаружи покрыты восковидной кутикулой. Однако даже эти защитные барьеры постоянно нарушаются (см. ниже). Взаимоотношения партнеров редко бывают мутуалистическими; обычно это комменсализм, балансирующий на грани паразитизма, или типичный паразитизм.

Мутуалистический эндобиоз у моховидных и саговниковых. Из 340 родов отдела моховидных (*Bryophyta*) только 6 родов (*Anthoceros*, *Blasia*, *Cavicularia*, *Dendroceros*, *Notothylas* и *Phaeoceros*) вступают в эндофитные ассоциации. Как правило, хозяева образуют небольшие, длиной несколько сантиметров, гаметофитные талломы, внутри которых разбросаны микроколонии цианобактерий диаметром <1 мм.

Все 150 видов отдела саговниковых (*Cycadophyta*) вступают в эндобиоз с *Anabaena* spp. Растение-хозяин образует специализированные коронарные корни у основания стебля, где в свободной зоне между наружным и внутренним кортексом поселяются цианобактерии.

Паразитический бипартитный эндобиоз. Наиболее известным примером такой ассоциации является симбиоз между растениями и фитопатогенной бактерией *Agrobacteriu tumefaciens*, образующей коронарные галлы (см. I том учебника и раздел 16.6.1.3 настоящего тома). Вкратце напомним, что эта бактерия связывается с поверхностью клетки хозяина и трансформирует его своей плазмидной ДНК, что приводит к развитию патологических структур — коронарных галлов.

A. tumefaciens характеризуется исключительно широкой хозяйской специфичностью. Она реагирует на гетерогенную группу растительных фенолов, которые индуцируют у нее вирулентный ответ. Благодаря этому бактерия образует опухоли у представителей >300 родов двудольных, 4 семейств однодольных и 40 видов голосеменных растений.

Паразитический мультипартитный эндобиоз. Фитопатогенные бактерии являются либо факультативными (*Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp. и др.), либо облигатными (*Spiroplasma* spp., *Xylella* spp. и др.) паразитами. Наибольший урон наносят *Agrobacterium* spp., *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. (фила BXII *Proteobacteria*), а также *Corynebacterium* spp. и *Streptomyces* spp. (фила BVIV *Actinobacteria*). Они вызывают разные формы вилта, галлов, гнилей, ожогов, парши, пятнистости, увядания, язв и т. д. Патогенез осуществляется в двух основных формах: *биотрофной* (когда паразит относительно медленно убивает хозяина) и *некротрофной* (когда хозяин быстро погибает; примером служат представители родов *Erwinia* и *Pseudomonas*, которые с помощью пектиназ мацерируют ткани, вызывая мягкую гниль).

Существует два основных способа проникновения во внутренние ткани растения. В первом случае для этого используются естественные ворота инфекции: устьица, гидатоды, нектарники и чечевички. Естественно, что паразитам проще попасть в нежные проростки. Во втором случае инфицирование происходит через механические повреждения и раны: разрывы трихомов (выростов эпидермиса; *не путать с бактериальными трихомами*) и участки выхода боковых корней. Третий, более редкий способ — воспользоваться разрывом кутикулы и эпидермиса под воздействием микрокристаллов льда. Такой фазовый переход в переохлажденной (от -2° до -12° С) водной пленке индуцируется особыми поверхностными белками фитопатогенных бактерий *E. herbicola*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. vitridiflava* и *X. campestris*. Эти белки, обозначенные как InaW и InaZ (сокр. англ. ice nucleation), имеют молекулярную массу ~ 120 кДа и содержат часто повторяющиеся 8-, 16- и 48-мерные аминокислотные последовательности. Предполагается, что вместе с липидами они формируют сайты для нуклеации льда на поверхности СМ.

После проникновения внутрь растения патогенные бактерии сталкиваются с защитными системами, которые существенно отличаются от иммунных систем животных. В то же время инфекционные механизмы зоопатогенов и фитопатогенов имеют конвергентные признаки (гены вирулентности входят в состав островков патогенности, а факторы вирулентности экспортируются

секреторной системой III типа). Взаимодействие партнеров носит агрессивный характер. В качестве факторов вирулентности бактерии образуют гидролитические ферменты и фитотоксины, а растение ограничивает собственную колонизацию с помощью нескольких защитных механизмов: (1) путем уплотнения клеточных стенок; (2) путем образования ROS и *фитоалексинов*, или вторичных метаболитов из группы фитонцидов; (3) путем локализованного апоптоза, или *гиперчувствительного ответа* (англ. hypersensitive response; HR).

Устойчивость растения к бактериальной инфекции определяется сочетанным присутствием двух генетических детерминант: гена резистентности R (у растения) и гена авирулентности *avr* (у бактерии). Кажется странным наличие у бактерии гена, индуцирующего хозяйские защитные системы, однако в отсутствие или при инактивации хозяйского гена R продукты разных генов *avr* ведут себя как факторы вирулентности.

Факторы вирулентности Avr доставляются в растительные клетки с помощью секреторных систем III типа, которые кодируются регулоном *hrr/hrc* (сокр. англ. hypersensitive response and pathogenicity/hypersensitive response, pathogenicity and conserved). Затем они находят свои мишени. Их основной функцией является подавление индуцибельных защитных систем хозяина путем воздействия на его транскрипцию; в частности, так поступают белки семейства AvrBs3, имеющиеся у *X. campestris*.

* * *

Завершив главу, посвященную синэкологии, мы переходим к последнему разделу, темой которого являются культивирование и биотехнология. Если до этого мы в основном рассматривали свойства отдельных особей, а также взаимоотношения между гомологичными или гетерологичными объектами, то теперь мы сосредоточим внимание на «тотальных» характеристиках, связанных с изменением численности популяций и их общей метаболической активностью. Соответствующие вопросы, интересные для фундаментальной микробиологии, важны и в прикладном отношении, поскольку прокариоты своей коллективной деятельностью изменяют окружающую среду, что, в частности, приносит практическую пользу.

ГЛАВА 21

МИКРОБНЫЕ КУЛЬТУРЫ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

A quoi Candide répond: Cela est bien dit, mais il faut cultiver notre jardin.

(На что Кандид отвечал: Хорошо сказано, но — нужно возвращать свой сад).

F.-M. Arouet (de Voltaire). Candide, ou l'Optimisme (Geneva, 1759).

Понятие о микробной культуре относится к числу базовых не только для фундаментальной микробиологии, но и для ее практического приложения — биотехнологии.

21.1. МИКРОБНЫЕ КУЛЬТУРЫ

В самом общем случае *микробной культурой* (англ. *microbial culture*; от лат. *cultura* — *возращивание*) называется система, состоящая из микроорганизма вместе с частью окружающей среды и находящаяся в замкнутом пространстве под наблюдением.

Такое определение культуры охватывает множество особей, несколько клеток или единственную клетку (например, в препарате типа висящей капли). Тем не менее, под культурой обычно имеется в виду популяция микроорганизмов совместно с *культуральной средой* (англ. *culture medium*), которые находятся в закрытом или открытом сосуде — *культиваторе* (англ. *cultivator*).

Таким образом, в отличие от «диких» микроорганизмов в природной среде обитания, культура — это микроорганизмы, помещенные в резервацию, а культивирование — это методический прием, используемый в целях поддержания или сохранения культуры. Иными словами, стратегия культивирования заключается в принудительном уменьшении числа степеней свободы микроорганизма, который на то или иное время удерживается в культиваторе.

Классификация культур может иметь разную основу, в зависимости от их состава, физиологического состояния и метода поддержания.

Чистые и смешанные культуры. Для характеристики популяционного состава культур их подразделяют на *чистые* (англ. *pure culture*), или *аксеничные* (англ. *axenic culture*; от греч. *а* — не и *xenos* — чужой; «без посторонних») и смешанные, или *ксеничные* (англ. *xenic culture*; от греч. *xenos* — чужой; «с посторонним(и)»).

В первом случае в культуре присутствует микроорганизм одного вида, а во втором случае — микроорганизмы двух или более видов (современное определение вида у прокариотов дано в I томе учебника). В свою очередь, в зависимости от числа посторонних видов, ксеничные культуры подразделяются на *моноксеничные* и *мультиксеничные*.

Развивающиеся и покоящиеся культуры. В соответствии со способностью культуры изменяться во времени различают *развивающиеся культуры* (англ. developing culture) и *покоящиеся культуры* (англ. dormant culture). Крайний вариант покоящейся культуры — это культура, клетки которой находятся в состоянии анабиоза. Прекращение развития особи или популяции провоцируется стрессом (см. главу 19), и иногда этому предшествует клеточная дифференциация (см. раздел 17.5.2).

Напомним, что термином *развитие* культуры (англ. culture development) обозначается совокупность *роста* культуры (англ. culture growth), т. е. увеличения ее биомассы, и *размножения* культуры (англ. culture multiplication), т. е. увеличения ее численности.

Периодические и непрерывные культуры. В зависимости от того, представляет ли культура замкнутую или открытую систему, различают *периодические культуры* и *непрерывные культуры*.

Периодическая культура (англ. batch culture; от batch — одноразовый замес) представляет собой замкнутую систему. По мере использования пищевых ресурсов и накопления побочных продуктов метаболизма исходная питательная среда становится культуральной средой.

Периодическая культура с подкормкой (англ. fed-batch culture) представляет собой квази-открытую систему. Время от времени в культиватор, восполняя убыль, вносят порции питательного субстрата или смесь субстратов, но излишки культуры не отбирают.

Непрерывная, или проточная культура (англ. continuous culture; free-flow culture) представляет собой открытую систему. В культиватор порциями или непрерывно поступающим потоком поступает свежая питательная среда; при этом излишки культуры удаляют из культиватора.

В случае аксеничной культуры каждый акт культивирования начинается с внесения в стерильную *питательную среду* (англ. nutritional medium) аксеничного *посевого материала*, или *инокулама* (англ. inoculum; от лат. in-oculatio — прививка). Такая процедура еще называется *пересевом* (англ. reinoculation).

В свою очередь, ксеничные культуры могут пересеваться либо на стерильную, либо на нестерильную среду; во втором случае степень мультиксеничности может повышаться.

21.1.1. Закономерности периодической культуры

Одно из самых впечатляющих свойств бактерий — это их способность быстро размножаться при достаточном количестве ресурсов, необходимых для получения энергии, конструктивного субстрата и донора электронов. При этом физиологические свойства бактерий и фракционный состав бактериальной клетки неразрывно связаны со скоростью роста, а она, в свою очередь, зависит от внешних условий, в частности от состава питательной среды.

Поскольку все сказанное относится не только к природным нишам, но и к лабо-

ратории, неудивительно, что круг феноменов, связанных с кинетикой роста культур, привлек внимание исследователей еще на заре экспериментальной бактериологии.

Первая количественная оценка роста бактерий была дана в середине 1890-х гг. Мюллером (M. Müller) на примере *Salmonella typhi*, а также Уордом (H. M. Ward) на примере *Bacillus* sp. Спустя два десятилетия, в 1918 г. известный американский бактериолог Роберт (Боб) Бьюкенен (R. E. Buchanan) установил качественные закономерности, которым подчиняется развитие периодической культуры гетеротрофных бактерий, и выделил основные фазы кривой периодического роста (рис. 283). Позже выяснилось, что эти закономерности распространяются на периодические культуры бактерий с другими типами метаболизма, а также на периодические культуры архей.

Кривая периодического роста отражает общую ситуацию в автоэкологии, когда численность популяции лимитируется трофическими ресурсами, накоплением побочных продуктов жизнедеятельности и плотностью заселения ниши. Понятно, что потенциально неограниченное экспоненциальное размножение бактерий, когда каждое последующее удвоение числа клеток происходит за один и тот же промежуток времени, не может продолжаться в замкнутой системе до бесконечности. Рано или поздно какой-нибудь субстрат будет исчерпан (точнее сказать, его концентрация снизится до порогового уровня), что приведет к более или менее резкой остановке роста.

Периодическая культура инициируется при внесении посевного материала в свежую питательную среду и проходит три основные фазы: *лаг-фазу* (от англ. lag — запаздывание), *экспоненциальную фазу* и *стационарную фазу* (рис. 283). Помимо них разные авторы выделяют несколько дополнительных фаз, число которых варьирует от трех до пяти, хотя это не меняет сути дела.

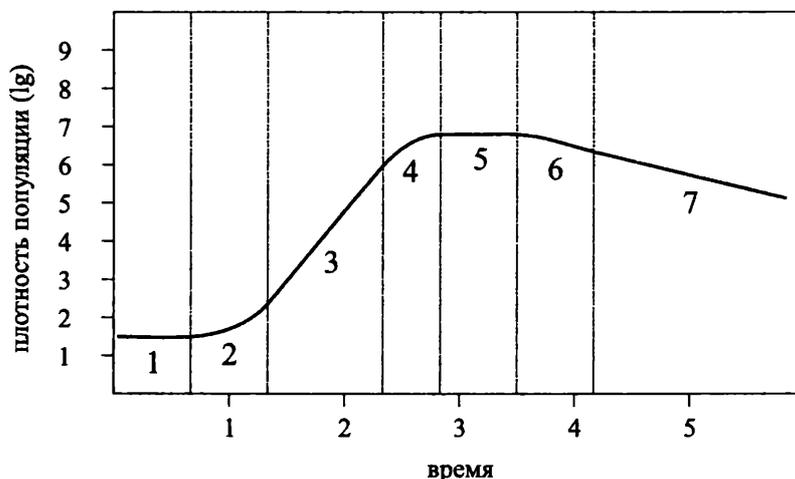


Рис. 283. Кривая периодического роста бактериальной культуры (по Бьюкенену).

1 — начальная стационарная фаза; 2 — лаг-фаза, или фаза положительного ускорения роста; 3 — логарифмическая фаза; 4 — фаза замедления роста; 5 — максимальная стационарная фаза; 6 — фаза ускоренной смерти; 7 — фаза логарифмической смерти.

Отдельные фазы кривой периодического роста в разное время вызывали то больший, то меньший интерес. Так, в 1930-е гг. в первую очередь изучалась лаг-фаза. После того, как Моно в 1942 г. предложил свое классическое уравнение (см. ниже), и особенно в 1950–1970-е гг., после исследований Копенгагенской школы (см. раздел 17.3) в центре внимания оказалась экспоненциальная фаза. Наконец, в конце 1990-х гг. благодаря успехам в изучении генетических детерминант регуляторных систем злободневной темой стала стационарная фаза.

Показатели, характеризующие кинетику роста периодической культуры и его интенсивность. Поведение периодической культуры оценивается рядом количественных параметров (продолжительность лаг-фазы, время генерации, скорость роста, урожай и др.).

В частности, если бактерии размножаются бинарным делением с постоянным темпом, число клеток увеличивается экспоненциально, т. е. в геометрической прогрессии:

$$N(t_2) = N(t_1) \cdot 2^n,$$

где $N(t_1)$ — число клеток в момент времени t_1 ; $N(t_2)$ — число клеток в момент времени t_2 ; n — сколько раз удвоилось число клеток за время Δt , т. е. $t_2 - t_1$.

Отсюда $n \approx 3,32 \cdot [\lg N(t_2) - \lg N(t_1)]$. Это не что иное, как число клеточных поколений, появившихся на свет в единицу времени, или число *генераций* (от лат. generatio — поколение) за единицу времени. В свою очередь, *время генерации* (t_G), т. е. время, за которое число клеток удваивается, равно:

$$t_G = \Delta t / n.$$

Скорость роста (V), т. е. изменение числа клеток в единицу времени, является величиной, обратной времени генерации, что составляет:

$$V = 1/t_G = n/\Delta t \approx 3,32 \cdot [\lg N(t_2) - \lg N(t_1)]/\Delta t.$$

Если продифференцировать это выражение, мы получим *удельную скорость роста* (μ), т. е. моментальное увеличение числа клеток, отнесенное к уже имеющемуся числу:

$$\mu = dN/dt \cdot 1/N.$$

Во всех приведенных формулах, которые справедливы только в отношении экспоненциально растущей культуры, число клеток можно заменить тем или иным параметром, отражающим *биомассу*. В частности, *время удвоения биомассы* (t_D) обратно удельной скорости роста:

$$t_D = k/\mu,$$

где k — пересчетный коэффициент, связывающий численность популяции с ее биомассой.

Для оценки интенсивности роста культуры используется такой показатель, как *урожай* (англ. yield; Y). Он отражает максимальный выход клеток или биомассы на единицу объема при конкретных условиях культивирования.

Наконец, следует упомянуть ряд «коэффициентов полезного действия», отражающих общую эффективность метаболических процессов в периодической культуре, в частности:

— *экономический коэффициент*, или соотношение между урожаем и количеством израсходованного субстрата ($Y_C = Y/S$);

— молярный коэффициент субстрата, или соотношение между количеством молей ассимилированного углерода и количеством молей израсходованного субстрата ($Y_S = M_C / M_S$);

— молярный коэффициент АТФ, или соотношение между урожаем и количеством молей синтезированного АТФ ($Y_{АТФ} = Y / M_{АТФ}$).

Рост культуры и концентрация субстрата (уравнение Моно). Эмпирическое уравнение, выведенное Жаком Моно и названное в его честь, описывало экспоненциальный рост культур *E. coli* и *B. subtilis* в условиях лимитирования источником углерода, в частности глюкозой, лактозой и маннозой. Позднее оказалось, что оно распространяется на другие случаи лимитирования субстратом, в частности источником азота, т. е. имеет общий характер.

Согласно уравнению Моно, удельная скорость роста связана с концентрацией лимитирующего экзогенного субстрата гиперболической зависимостью:

$$\mu = (\mu_{\max} \cdot S) / (K_S + S),$$

где μ — удельная скорость роста при концентрации лимитирующего субстрата, равной S ; μ_{\max} — максимальная скорость роста, не лимитированного субстратом; K_S — константа Моно, или константа насыщения, численно равная такой концентрации субстрата, при которой $\mu = 1/2 \mu_{\max}$ (рис. 284). Для разных субстратов величина K_S варьирует в пределах $10 - 10^{-3}$ мг·л⁻¹; например, для глюкозы в случае *E. coli* она составляет ~ 1 мг·л⁻¹.

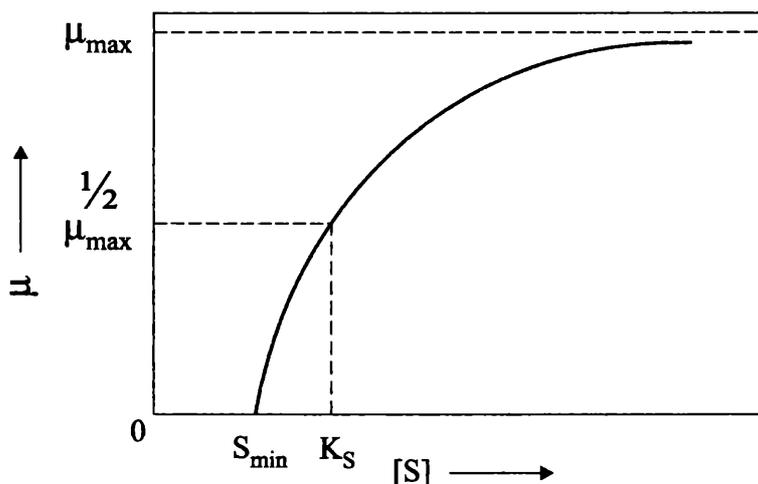


Рис. 284. Зависимость между удельной скоростью роста бактерий и концентрацией лимитирующего субстрата.

μ — удельная скорость роста; S — концентрация лимитирующего субстрата; S_{\min} — минимальная концентрация лимитирующего субстрата; K_S — константа Моно.

Легко заметить, что уравнение Моно «копирует» известное из биохимии кинетическое уравнение Михаэлиса–Ментен для начальной скорости ферментативной реакции (V_0), которое описывает гиперболическую зависимость в системе координат $[V_0] - [S]$ (где $[S]$ — исходная концентрация субстрата). Напомним, что данная зависимость объясняется образованием промежуточного фермент-субстратного комплекса на основе их взаимного сродства.

Как видно на рис. 284, при избытке субстрата $\mu = \mu_{\max}$. Однако, в отличие от ферментативной реакции, протекающей в соответствии с уравнением Михаэлиса—Ментен, кривая выходит не из точки пересечения координатных осей, а смещена вправо по оси абсцисс. Дело в том, что бактерия, прежде чем приступить к росту и размножению, должна использовать минимально необходимое количество субстрата (S_{\min}) для сохранения структурной целостности клетки, в частности, получить т. н. *энергию поддержания* (англ. maintenance energy).

Бактерий не напрасно образно называют «живыми катализаторами». Величина K_S в уравнении Моно отражает средство их транспортных систем к экзогенному органическому субстрату, и оно различается у разных видов. Соответственно, по способности расти при низкой концентрации субстрата бактерий условно подразделяют на медленно растущих олиготрофов и быстро растущих копиотрофов.

Олиготрофы (от греч. oligos — малый по числу и trophē — питаюсь; «сидящий на бедной диете») имеют высокую K_S и низкую μ_{\max} , а *копиотрофы* (от лат. copia — изобилие и греч. trophē — питаюсь; «сидящий на богатой диете») низкую K_S и высокую μ_{\max} . Первые получают преимущество в среде с низкой концентрацией субстратов, а вторые — в среде с высокой концентрацией субстратов.

Начальная стационарная фаза (англ. initial stationary phase; рис. 283, 1). После пересева на свежую питательную среду, прежде чем приступить к экспоненциальному размножению, бактерии должны к ней адаптироваться. Продолжительность этой фазы зависит от природы организма, состава питательной среды, размера инокулума и условий, в которых он находился до пересева. Перенос на свежую среду, даже если в ней предварительно созданы комфортные условия (оптимальные рН, температура, аэрация, освещенность и т. д.) всегда связан со стрессом. С целью преодоления его последствий активизируется транскрипция многочисленных регулонов и оперонов, и в культуральную среду выделяются аутоиндукторы (см. разделы 18.1.2 и 18.4.2). Перенос на среду более богатого состава обозначается как *трофический взлет* (англ. nutritional shift up), что, как правило, связано с адаптивным синтезом ферментов. В свою очередь, перенос на более бедную среду называется *трофическим падением* (англ. nutritional shift down) и, соответственно, связан с адаптивной репрессией синтеза ферментов.

Лag-фаза, или фаза положительного ускорения роста (англ. lag phase; phase of positive growth acceleration; рис. 283, 2). В течение лag-фазы скорость размножения и, соответственно, удельная скорость роста возрастают от минимальной величины до максимальной. При этом рост носит несбалансированный характер и преимущественно связан с увеличением числа копий хромосомы, а также количества транслирующихся рибосом.

Экспоненциальная фаза, или фаза логарифмического роста (англ. exponential phase; logarithmic growth phase; рис. 283, 3). В этой фазе культура находится в квази-стационарном состоянии, что выражается: (1) в постоянном времени генерации; (2) в *сбалансированном росте* (англ. balanced growth; steady-state growth), когда состав клетки, а также ее размер постоянны от поколения к поколению.

Для удобства изображения кривая роста строится в полулогарифмическом масштабе, в результате чего экспоненциальная фаза имеет вид отрезка прямой (см. рис. 283, 3).

Основные свойства клеток в экспоненциально растущей культуре, впервые описанные и интерпретированные в 1950-х гг. представителями Копенгагенской школы, мы уже рассматривали в разделе 17.3.

Решающее воздействие на свойства растущей клетки и, соответственно, на свойства экспоненциально растущей популяции оказывает состав питательной среды. На более богатой среде при прочих равных условиях бактерии имеют больший размер, содержат больше ДНК и чаще делятся.

Питательные среды. По своему химическому составу питательные среды, используемые для выращивания бактерий, в первую очередь подразделяются на *природные* и *искусственные*, или *синтетические* (англ. synthetic medium).

Первые из них, например растительные соки, непостоянны по составу и характеризуются сложным набором компонентов.

Синтетические среды имеют строго определенный набор компонентов (при этом весьма существенной может оказаться степень очистки реактивов). Их обычно комбинируют таким образом, чтобы удовлетворить пищевые потребности бактерий, и чтобы каждый незаменимый элемент был представлен одним «тематическим» соединением (источник углерода, источник азота и т. д.).

Если синтетическая среда содержит несколько веществ, имеющих одинаковое функциональное значение, они могут использоваться одновременно (например, *Rhizobium trifolii* совместно утилизирует арабинозу, глюконат и маннитол) или друг за другом. Во втором случае присутствие двух источников углерода вызывает феномен *катаболитной репрессии*, внешне выраженный в двухфазном экспоненциальном росте, или *диауксии* (см. раздел 18.3.2.2).

Классификацию питательных сред можно расширить с учетом биологических свойств тех бактерий, которые предполагается на них выращивать. Например, предложенные С. Н. Виноградским *элективные* среды являются основным орудием экспериментальной экологии бактерий. Они создают более или менее избирательные условия для развития специфически адаптированных бактерий, что лежит в основе получения *накопительных культур* (англ. enrichment culture), а затем чистых культур.

В свою очередь, в медицинской микробиологии со времен Роберта Коха используются т. н. *универсальные среды* (например, мясо-пептонный бульон), на которых растут разнообразны копиротрофы, что способствует их быстрому и, насколько возможно, широкому выявлению.

Следует иметь в виду, что гетеротрофные бактерии в ходе своего роста никогда не ограничиваются односторонним удалением субстратов из питательной среды и их полным окислением (до CO₂). Обычно они экспортируют побочные продукты метаболизма и секретируют белки. Кроме того, в культуральную среду поступает материал, образующийся при обновлении или лизисе клеточных структур. Некоторые из этих веществ пассивно накапливаются в культуральной среде (что, в частности, вызывает стресс с переходом в стационарную фазу), тогда как другие, например ацетат, могут реутилизироваться.

В экспоненциальной фазе культуральная среда все время изменяется. При этом из-за невозможности обеспечить равные условия для всей популяции какая-то часть клеток переходит в состояние стресса и даже отмирает. Иными словами, сбалансированный рост — это довольно условное понятие.

При развитии бактерий в определенной среде происходит изменение их популяционного состава. В частности, в результате спонтанного мутирования появляются *фиттинг-мутанты* (см. раздел 16.6.1.1, которые растут с повышенной скоростью и постепенно вытесняют клетки дикого типа.

Максимальная стационарная фаза (англ. maximum stationary phase; рис. 283, 5). Прекращение экспоненциального роста и переход к максимальной стационарной фазе, или фазе голодания, вызвано истощением питательного субстрата. Этот переход соответствует *фазе замедления роста* (англ. phase of growth deceleration; рис. 283, 4), продолжительность которой зависит как от природы субстрата, так и от плотности популяции. Для разбавленных культур она измеряется часами, а для концентрированных культур долями секунды.

Скорость роста в фазе его замедления является функцией уменьшающейся концентрации экзогенного субстрата в соответствии с уравнением Моно. Далее в течение некоторого времени рост осуществляется за счет эндогенных субстратов (например, резервных полиглюкозидов; см. I том учебника). Затем наступает максималь-

ная стационарная фаза, или фаза голодания, когда из-за отсутствия питательного субстрата численность клеток остается постоянной либо в отсутствии размножения, либо в результате того, что размножение одной субпопуляции компенсируется отмиранием другой.

Фаза ускоренной смерти (англ. *phase of accelerated death*; рис. 283, 6) и **фаза логарифмической смерти** (англ. *logarithmic death phase*; рис. 283, 7). В этих фазах численность популяции уменьшается, что соответствует «отрицательному» росту. Причиной, приводящей к смерти клеток, может быть внешнее травмирующее воздействие, в частности, экстремальное закисление среды, или эндогенные процессы — *старение клеток* (см. раздел 17.2.1) и *апоптоз* (см. раздел 17.2.2).

Диализные культуры. Накопление побочных продуктов метаболизма, например ацетата, является одним из важнейших факторов, лимитирующих рост культур и вызывающих переход к фазе смерти. Частично устранить их влияние позволяет метод *диализного культивирования* (англ. *dialysis culture*). При нем культура помещается в мешок из диализной мембраны, омываемый буферным раствором. Благодаря удалению низкомолекулярных соединений плотность популяции можно увеличить в 30 раз по сравнению с той, которая достигается другими методами культивирования (до 100 г сухого веса·л⁻¹; ~ 5 · 10¹¹ клеток·мл⁻¹).

21.1.2. Закономерности непрерывной культуры

Непрерывная культура принципиально отличается от периодической. Если в первом случае рост ограничен стартовыми субстратами и финальной плотностью популяции, то во втором случае он происходит как угодно долго — при условии, что восполняется убыль субстрата и устраняется прибыль популяции.

Метод непрерывного культивирования имеет два основных преимущества перед методом периодического культивирования. Во-первых, он позволяет неограниченно долго поддерживать культуру в квази-стационарном состоянии в широком диапазоне параметров питательной среды; во-вторых, он позволяет активно вмешиваться в процессы роста.

Непрерывное культивирование может осуществляться в одном из двух режимов: в режиме *хемотатирования* или в режиме *турбидостатирования*.

Хемотатирование. При использовании *хемотата* (англ. *chemostat*; от греч. *chemeja* — химия и *stasis* — неподвижность; в данном случае — поддержание квази-стационарного состояния путем контроля химического состава питательной среды) плотность популяции стабилизируется путем ограниченного снабжения бактерий тем или иным питательным субстратом. Бактерии размножаются экспоненциально, но не с максимально возможной скоростью. Является ли их рост сбалансированным, неизвестно.

За счет притока в культиватор свежей питательной среды популяция непрерывно разбавляется. Одновременно с этим за счет оттока культуральной среды часть популяции покидает культиватор; оставшаяся часть экспоненциально размножается до квази-стационарного уровня, который зависит от концентрации лимитирующего питательного субстрата.

Оптимальный *массообмен*, или гомогенное распределение молекул и клеток в постоянном объеме культуральной среды обеспечиваются перемешиванием и аэрацией (как правило, по методу непрерывного культивирования выращиваются аэробы или факультативные анаэробы).

Скорость притока в культиватор свежей питательной среды называется *скоростью разбавления* (англ. dilution rate; D). Она вычисляется по формуле:

$$D = F/V,$$

где D — скорость разбавления (ч^{-1}); F — скорость притока свежей питательной среды ($\text{л} \cdot \text{ч}^{-1}$); V — объем культиватора; л).

Иными словами, скорость разбавления D — это количество объемов питательной среды, прошедших через культиватор за один час. Величина, обратная D , называется *временем удерживания* (англ. retention time); она соответствует среднему времени пребывания особи в культиваторе.

При хемостатировании культура находится в квази-стационарном состоянии, т. е. популяция микроорганизмов имеет относительно постоянную плотность. Это достигается за счет динамического баланса между двумя противоположно направленными процессами — размножением популяции и ее вымыванием из культиватора. При $\mu > D$ плотность популяции возрастает, а при $\mu < D$ убывает. Динамический баланс достигается при $\mu = D$.

Напомним, что удельная скорость роста $\mu = dN/dt \cdot 1/N$, т. е. $dN/dt = N\mu$. В свою очередь, скорость разбавления $D = -dN/dt \cdot 1/N$, т. е. $-dN/dt = ND$.

Итоговая скорость изменения плотности популяции равна алгебраической сумме прироста популяции $N\mu$ и убыли популяции ND :

$$dN/dt = N\mu - ND$$

или

$$dN/dt = N(\mu - D).$$

Скорость разбавления контролирует экспериментатор, а скорость роста лимитируется каким-нибудь физико-химическим фактором, обычно источником углерода или азота. Если скорость разбавления D меньше μ_{\max} , то через некоторое время после посева в хемостате установятся, а затем будут автоматически поддерживаться постоянная скорость роста, постоянная плотность популяции и постоянная концентрация лимитирующего субстрата.

Поскольку (см. выше) $\mu = (\mu_{\max} \cdot S)/(K_S + S)$, для квази-стационарного состояния $\mu = D$ мы имеем:

$$D = (\mu_{\max} \cdot S)/(K_S + S),$$

или

$$S = (K_S \cdot D)/(\mu_{\max} - D).$$

Таким образом, мы получили зависимость между концентрацией лимитирующего субстрата S и скоростью разбавления D (которая совместно с удельной скоростью роста μ определяет плотность популяции N). В широком интервале скоростей разбавления и концентраций лимитирующего субстрата плотность популяции изменяется не очень сильно (рис. 285), т. е. хемостат работает в относительно устойчивом режиме, оправдывая свое название.

Турбидостатирование. При использовании *турбидостата* (англ. turbidostat; от лат. turbidus — мутный и греч. stasis — неподвижность; в данном случае — поддержание квази-стационарного состояния путем контроля мутности культуры) все питательные субстраты находятся в избытке, и культура размножается с максимальной скоростью. Питомцы Копенгагенской школы (Маалойе, Кьельдгард и Шехтер) назвали рост такой культуры *неограниченным* (англ. unrestricted growth), подчеркивая, что по своему характеру он является примером сбалансированного роста.

На первый взгляд, турбидостат отличается от хемостата тем, что плотность популяции контролируется не в результате эндогенного баланса между скоростью роста и скоростью разбавления, а путем механического отслеживания мутности культуры. Однако на самом деле все решает постоянная и максимальная скорость роста: когда плотность популяции выходит за рамки, заданные экспериментатором, она корректируется устройством, которое соответствующим образом изменяет скорость разбавления. Иными словами, в хемостате скорость разбавления задается экспериментатором, а в турбидостате она контролируется петлей обратной связи.

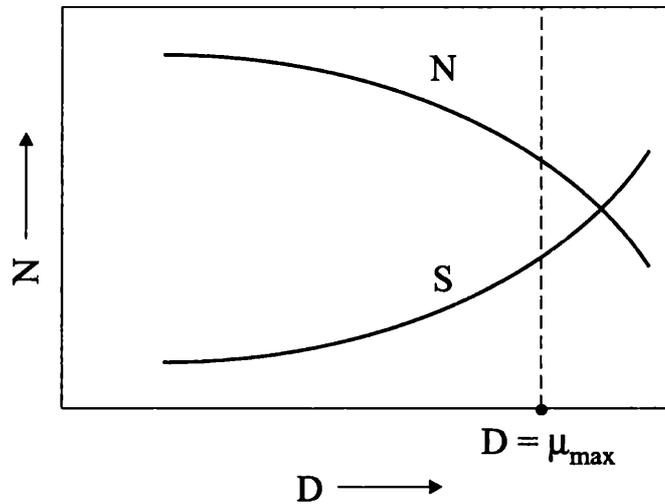


Рис. 285. Зависимость плотности популяции бактерий в хемостате от концентрации лимитирующего субстрата и от скорости разбавления.

N — плотность популяции; D — скорость разбавления; S — концентрация лимитирующего субстрата.

То, что в тубридоустате бактерии не лимитированы питательным субстратом, позволяет в оптимальном и контролируемом режиме накапливать биомассу, а также изучать их физиолого-биохимические свойства при максимальной интенсивности метаболических процессов.

21.2. БИОТЕХНОЛОГИЯ

Термин «биотехнология» (от греч. *bios* — жизнь, *technites* — ремесленник и *logos*, в данном случае — дело) при буквальном прочтении означает «использование живых организмов в качестве орудия промышленного производства». Однако сразу нужно оговорить, что речь идет не о человеке и не о животных, которых он эксплуатирует. Кроме того, к сфере биотехнологии не относятся медицинское протезирование, использование стволов растений для изготовления орудий труда или при строительстве, а также поставленное на индустриальную основу сельское хозяйство, в частности, те его отрасли, где выращиваются генетически модифицированные растения.

Если исходить из реальной практики употребления этого термина, то биотехнологией называется *эксплуатация ферментативной активности микроорганизмов или клеточных культур для производства целевых продуктов, которые по той или иной причине невозможно или нерентабельно получать искусственным путем.*

В мировой литературе всякий биотехнологический процесс, от получения вина до очистки сточных вод, принято называть *ферментацией* (англ. *fermentation*). Однако, говоря «ферментация», мы имеем в виду не *ферментативный* характер процесса, а отдаем дань традиции. Дело в том, что классические микробные технологии изначально были основаны на брожениях, в первую очередь, на *спиртовом брожении* (лат. *fermentum* — брожение). Следует напомнить, что только в отечественной литературе используется архаичный термин «фермент». Его международный экви-

валент — «энзим», но даже он семантически восходит к спиртовому брожению (франц. *en zymotique* — «из бродила»; от греч. *zyme* — закваска, кислое тесто).

В отличие от неорганических катализаторов ферменты, в том числе «биотехнологические» ферменты, функционируют в физиологических условиях и проявляют три уровня специфичности:

- *субстратную специфичность* (по отношению к определенному классу химических соединений);
- *хиральную специфичность* (по отношению к одному из двух энантиомеров, правому или левому);
- *сайт-специфичность* (по отношению к определенному сайту в молекуле субстрата).

Ферменты действуют в качестве орудий биотехнологии либо *in situ*, т. е. в составе растущих, покоящихся или зафиксированных клеток, либо вне клетки — в результате их секреции продуцентом или после их препаративного выделения.

Ферменты синтезируются в ходе промышленного культивирования. Следует подчеркнуть, что между ним и лабораторным культивированием не существует принципиальных отличий. В обоих случаях в основе культивирования лежат три «кита»:

- *культура*, в производстве *продуцент*;
- *культуральная среда*, в производстве *сырье*;
- *культиватор*, в производстве *ферментер*.

21.2.1. Продуценты

В приведенном определении биотехнологии в качестве основных продуцентов упоминаются микроорганизмы. Они имеют разное строение, разные метаболические свойства и относятся к разным таксономическим группам. Одни из них — прокариоты, другие — протисты, дрожжи или плесневые грибы (табл. 35).

В настоящее время к традиционным продуцентам добавился широкий круг нетрадиционных субъектов биотехнологии, обладающих широкими, еще мало воспользованными возможностями. Остановимся на некоторых из них.

Морские актинобактерии. Из всех продуцентов важнейшими являются актинобактерии, которые синтезируют ~50% биологически активных вторичных метаболитов. Абсолютное чемпионство принадлежит роду *Streptomyces*. С тех пор, как Зелман Ваксман (S. A. Waksman, Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1952 г.) в 1942 г. выделил стрептотрицин, скрининг новых антибиотиков у стрептомицетов ведется на планомерной основе. Общее их число экспоненциально увеличилось, пока к 2000 г. не достигло ~3 тыс и вышло на плато; кроме того, участились случаи повторного выявления уже известных антибиотиков. Поскольку все, на что способны в плане синтеза антибиотиков почвенные актинобактерии, уже известно, ведутся поиски новых продуцентов в других нишах, в частности в мировом Океане. В настоящее время среди актинобактерий, колонизирующих морские органические агрегаты (морской снег; см. I том учебника), выявлены представители родов *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Marinophilus*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Salinispora*, *Solkwaraspora*, *Streptomyces*, *Verrucosispora* и *Williamsia*. Некоторые из них образуют новые перспективные антибактериальные и антиопухолевые антибиотики, в частности *абиссомицин С*, *диазепиномицин* и *салиноспорамид А* (рис. 286).

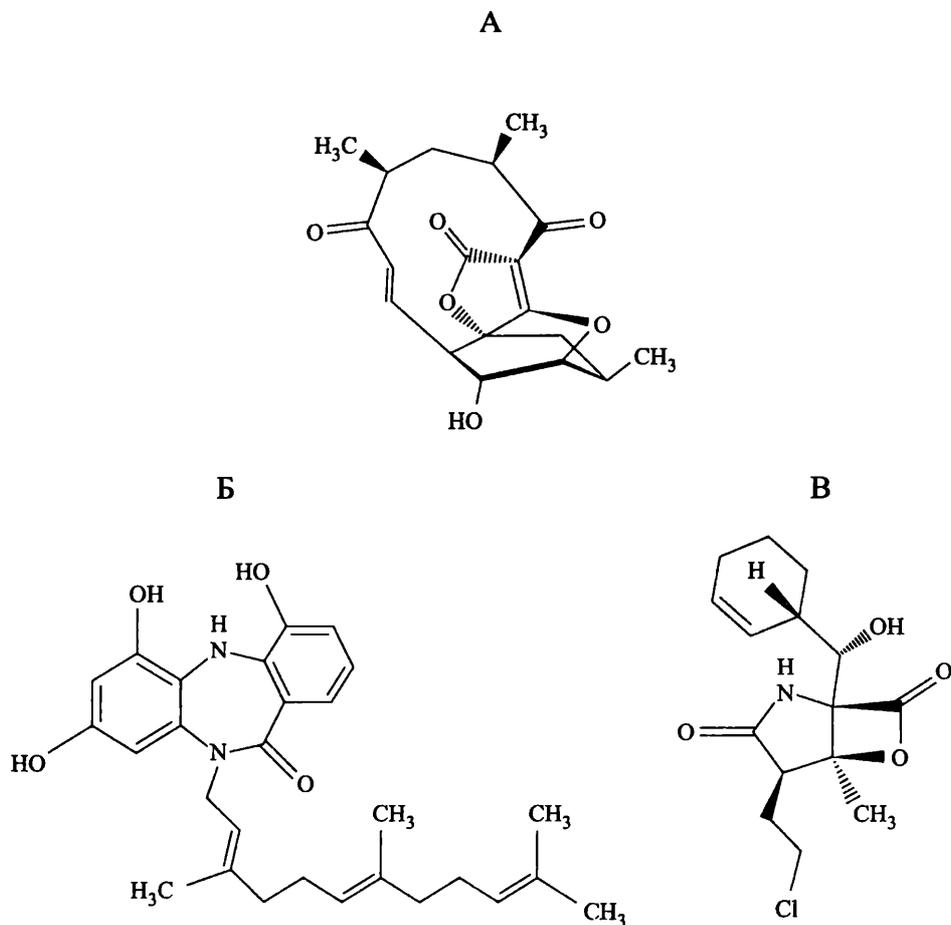


Рис. 286. Примеры новых антибиотиков, образуемых морскими актинобактериями.

А — абиссомицин С (*Verrucospora* sp.); Б — диазепиномицин (*Micromonospora* sp.); В — салиноспорамид А (*Salinispora tropica*).

Экстремофильные археи. В настоящее время описано свыше 3 тыс ферментов, и многие из них либо используются в биотехнологии, либо служат ее целевыми продуктами. Мировой рынок микробных ферментов оценивается ~5 млрд. евро в год; в основном это ферменты бактериального и грибного происхождения. В связи с тем, что большинство из них плохо переносит жесткие физико-химические условия, особую актуальность приобрел скрининг экстремофилов (алкалифилов, ацидофилов, галофилов, психрофилов, пьезофилов и термофилов; см. главу 19) в качестве источника ферментов, устойчивых к экстремальным воздействиям.

Богатым ресурсом ферментов, осуществляющих катализ в экстремальных условиях, являются археи. Ферменты экстремофильных архей стабильны при высокой температуре, высокой ионной силе, экстремальных значениях рН и высоком давлении, а также устойчивы к тяжелым металлам и органическим растворителям.

Особо ценны «термофильные» ферменты, которые обеспечивают высокую скорость реакции, устойчивы к термической денатурации и протеолитическому расщеплению, а также не подверже-

ны микробному заражению. В качестве примеров можно назвать амилитические ферменты α -амилазу *Pyrococcus* spp. и глюкоамилазу *Picrophilus* spp., целлюлолитический фермент β -амилазу *Sulfolobus* spp., расщепляющую гемицеллюлозу ксиланазу *Pyrodictium abyssii*, эндохитиназу *Thermococcus chitonophagus*, сериновую протеазу *Thermococcus stetteri*, эстеразу *Aeropyrum pernix* и т. д.

Исключительную ценность для молекулярно-биологических исследований с использованием PCR-реакции приобрели редко ошибающиеся ДНК-полимеразы *Pyrococcus kodakaraensis* и *Thermococcus littoralis*, а также комбинация ДНК-полимеразы и пирофосфатазы (ThermoSequenase) из *Thermoplasma acidophilum*, применяемая при высокоточном секвенировании ДНК.

Продуценты этанола. Этанол и продукт его ферментативного окисления, ацетальдегид служит ценным сырьем для химической промышленности, а первый также является альтернативным энергоносителем. Наряду с химическим синтезом из этилена (2 млн. т·год⁻¹) этанол получают биотехнологическим способом из растительных соков или гидролизатов крахмала и древесины (5 млн. т·год⁻¹). Помимо традиционного продуцента, дрожжей рода *Saccharomyces*, промышленный интерес представляют, по крайней мере, три новых продуцента — анаэробная мезофильная бактерия *Zyotomonas mobilis*, анаэробная термофильная бактерия *Clostridium thermocellum* и анаэробная экстремально термофильная бактерия *C. thermohydrosulfuricum*.

Z. mobilis катаболизирует глюкозу по пути Энтнера–Дудорова (см. II том учебника). Эта бактерия имеет перед дрожжами то преимущество, что она образует этанол с более высокой скоростью и выходом, близким к теоретическому. В свою очередь, преимущество *C. thermocellum* и *C. thermohydrosulfuricum* состоит в том, что: (1) при высокой температуре по ходу культивирования можно отгонять летучую азеотропную смесь, содержащую этанол; (2) не нужно охлаждать биореактор; (3) в качестве субстрата можно использовать не дорогие сахара, а дешевые полисахариды.

21.2.2. Сырье и ферментеры

Продуцент служит «рабочей лошадкой» биотехнологии, а условия для реализации его ферментативной активности создаются благодаря использованию сырья и ферментеров.

Сырье. Сырье играет роль *субстрата*; ферменты продуцента воздействуют на этот субстрат. При этом продуцент может использовать одну из трех стратегий.

Первая стратегия. Продуцент развивается на многокомпонентном биологическом субстрате, изменяя его биохимический состав и консистенцию. Биомасса продуцента совместно с трансформированным субстратом образуют нераздельный целевой продукт, характерным примером которого служит йогурт.

Вторая стратегия. Продуцент приводится во временный контакт с субстратом для того, чтобы изменить его биохимический состав. Если речь идет об индивидуальном соединении и конкретном изменении его молекулярной структуры, это называется *микробной трансформацией*, или *биоконверсией* (англ. biosconversion). Характерный пример — трансформация гидрокортизона в преднизолон (см. табл. 35).

Третья стратегия. Продуцент растет на специально подобранной питательной среде с минимально необходимым набором субстратов. В данном случае це-

левым продуктом являются клетки продуцента или их эндогенные компоненты, а также внеклеточные полимеры или низкомолекулярные соединения, накапливающиеся в культуральной среде. В качестве характерного примера можно привести антибиотики.

Основным сырьем для биотехнологии служит углеродсодержащий субстрат. Когда используются первая и третья стратегии, речь идет об *источнике углерода*.

Источники углерода в первую очередь подразделяются на *неорганические* и *органические* (см. II том учебника).

Среди неорганических источников углерода реальное промышленное значение имеют диоксид углерода, метан и метанол. Их используют производственные штаммы фотосинтезирующих или хемосинтезирующих бактерий, в частности *Spirulina* spp., *At. ferrooxidans* (см. раздел 21.2.3) и *M. methylotrophus* (см. табл. 35).

Гораздо шире применяются органические источники углерода. Они, в свою очередь, подразделяются на *невозобновляемые* и *возобновляемые*, а также на *полимерные* и *неполимерные*.

Невозобновляемые источники углерода — это продукты автотрофного биосинтеза, захороненные в далекие геологические эпохи в виде нефти или природного газа. В частности, это *n-алканы*, или жидкие парафины с числом атомов углерода 16–18. Они могут использоваться для получения кормовой биомассы дрожжей рода *Candida*.

Возобновляемые источники углерода — это цельная биомасса или отдельные арматурные или запасные полимеры растений (в первую очередь, *целлюлоза* и *крахмал*), продукты ферментативной или химической деполимеризации этих полимеров, а также *сахароза* — основной углеродный компонент растительного сока свекловичных культур и сахарного тростника. Поскольку лишь немногие промышленные продуценты обладают собственными целлюлазами, гемицеллюлазами, пектиназами и амилазами, огромное значение имеют штаммы микроорганизмов, служащие источником соответствующих ферментов.

Наряду с природными углеводами, в том числе *глюкозой* и *лактозой*, в качестве источника углерода широко применяются синтетический этанол или синтетическая уксусная кислота.

В качестве *источника азота* могут использоваться белки, мочевины или минеральные соли; источником других макро- и микроэлементов также служат минеральные соли. Помимо основных субстратов, которыми довольствуются *прототрофы* (см. раздел 16.6.1.1), часто вводятся питательные добавки, содержащие витамины и другие факторы роста — дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, пептон, молочная сыворотка и т. д.

В зависимости от консистенции субстрата ферментация подразделяется на *жидкостнофазную* (англ. liquid-substrate fermentation) и *твердофазную* (англ. solid-substrate fermentation).

Большинство современных ферментаций связано с использованием «погруженного» субстрата, который растворен в воде, находится в коллоидном состоянии или образует суспензию разной степени дисперсности. В отличие от этого при твердофазной ферментации на поверхности субстрата не видно влаги, хотя он содержит связанную воду (в частности, лигноцеллюлозный комплекс несет ~75% абсорбированной воды). Такие субстраты характеризуются низкой активностью воды, что вызывает у бактерий (для которых требуется $a_w \geq 0,91$) состояние стресса, несовместимое с возможностью их практического использования.

Дрожжи и плесневые грибы характеризуются большей толерантностью к низкой активности воды (соответственно, $a_w \geq 0,88$ и $\geq 0,62$), что позволяет широко использовать их для получения целевых продуктов из увлажненной растительной и животной биомассы.

По сравнению с жидкостнофазной ферментацией твердофазная ферментация имеет как преимущества, так и недостатки. К преимуществам относятся: (1) высокая концентрация экзоферментов; (2) высокая концентрация продуктов реакции и возможность их извлечения небольшим объемом экстрагирующего агента; (3) изменение консистенции субстрата; (4) обогащение субстрата биомассой продуцента и его экзопродуктами. Недостатками твердофазной ферментации являются: (1) трудность обеспечения массообмена; (2) необходимость большого количества инокулула, который невозможно гомогенно распределить в толще субстрата; (3) затрудненное снабжение кис-

лородом и плохой отвод тепла. Несмотря на перечисленные недостатки, метод твердофазной ферментации широко применяется в производстве традиционных продуктов питания как на Западе (хлеб, сыр, салями и т. д.), так и на Востоке (темпе, соевый соус, натто и т. д.).

Ферментеры. Для производственной ферментации необходим посевной материал. Он выращивается на том же производстве или поступает со специализированных предприятий в виде стартовой культуры, или *закваски*.

С целью получения посевного материала, а также в центральном производственном процессе — *главной ферментации*, используются ферментеры.

В зависимости от размера ферментера он может служить как для производственных, так и для исследовательских нужд, либо выполняет исключительно производственные функции.

Как правило, ферментер представляет собой цилиндрический сосуд с соотношением высоты и диаметра 3:1, снабженный: (1) датчиками и/или приспособлениями для отбора образцов, а также устройствами для термостатирования, перемешивания и пеногашения; (2) защищенными от микробной контаминации входами для питательной среды, посевного материала и буферных растворов; (3) выходами для удаления культуры.

Не останавливаясь на конструктивных особенностях ферментеров, отметим, что они подразделяются на: *лабораторные* (объем ~ 10 л); *полупроизводственные* (англ. pilot plant; объем ~ 10³ л) и *производственные ферментеры* для главной ферментации (объем ~ 10⁴ и более).

Ступенчатый переход от культивирования в меньшем ферментере к культивированию в большем ферментере называется *масштабированием* (англ. scale up); объемный коэффициент масштабирования находится в пределах одного–двух порядков.

В зависимости от конструкции ферментера, а также в зависимости от задач, решаемых с его помощью, он может работать как в режиме периодического, так и в режиме непрерывного культивирования.

При использовании ферментеров, работающих в режиме непрерывного культивирования, во многих случаях важно, чтобы продуцент не загрязнял целевой продукт (если, конечно, он сам не является целевым продуктом). Для этого продуцент удерживается в ферментере (или сразу же после выхода из него), что осуществляется с помощью *иммобилизации*.

Иммобилизация — это прикрепление продуцента или препарата фермента к носителю или их заключение внутри носителя. Прикрепление происходит либо путем адсорбции, либо посредством ионных, гидрофобных или ковалентных связей. Иногда адсорбция сопровождается пришиванием продуцента или фермента к носителю при помощи бивалентного химического реагента (например, глутарового альдегида). Для заключения внутрь носителя используются микрокапсулы, волокнистый материал или полимерный гель. Ярким примером промышленного использования иммобилизации является аэробная очистка сточных вод с помощью *активного ила* (англ. activated sludge).

Аэробная очистка сточных вод. Благодаря данной технологии, впервые примененной в Манчестере в 1913 г., ежегодно регенерируются ~10 млрд. м³ сточных вод, т. е. это самый крупнотоннажный целевой продукт на Земле.

Сбор и очистка сточных вод являются серьезнейшей проблемой в современных крупнонаселенных и промышленных районах.

Сточные воды различаются по составу и подразделяются на: (1) муниципальные; (2) промышленные и (3) сельскохозяйственные. Они представляют собой сложную смесь твердых частиц, коллоидов и растворенных веществ. Конечная цель очистки — устранить эти загрязнения, в том числе патогенные микроорганизмы и токсичные вещества, чтобы сделать воду безопасной для человека и окружающей среды (куда она возвращается).

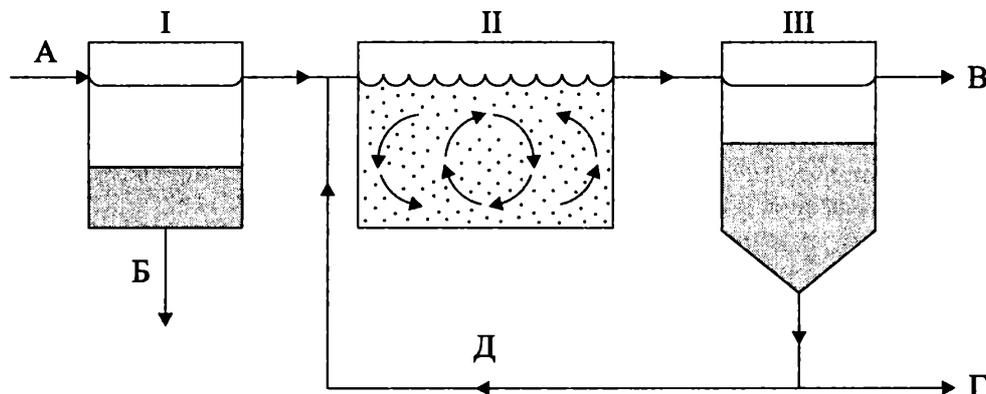


Рис. 287. Схема установки для аэробной очистки сточных вод.

I — первичный отстойник; II — аэротенк; III — вторичный отстойник; А — подача сточных вод в первичный отстойник; Б — удаление нерастворимых загрязнений; В — декантация очищенного раствора; Г — удаление избытка активного ила; Д — возвращение активного ила в аэротенк.

Процесс очистки сточных вод состоит из трех основных стадий (рис. 287).

На первой стадии, в *первичном отстойнике* (англ. primary separating tank) сточные воды путем седиментации, фильтрации и флотации освобождаются от наиболее легко удаляемых нерастворимых загрязнений.

На второй стадии, в *аэротенке* (англ. aeration tank) первично очищенные сточные воды, содержащие коллоиды и растворенные вещества, главным образом органического происхождения, смешиваются с *флоккулами*, или хлопьями активного ила (англ. флос; от лат. flocculus — клочок, пушинка) и активно аэрируются. В результате адсорбции и биологического окисления загрязнений они минерализуются и превращаются в CO_2 , NH_3 , H_2S , N_2 , H_2 и т. д., а масса активного ила увеличивается.

На третьей стадии, во *вторичном отстойнике* (англ. secondary separating tank) активный ил спонтанно оседает. Очищенный раствор декантируется и подвергается доочистке путем фильтрации, адсорбции, электродиализа, озонирования, облучения ультрафиолетовым светом, хлорирования и т. д.

Довольно неудачным термином «активный ил» обозначается *флоккулированная* (англ. flocculate — выпадать хлопьями), т. е. хлопьевидная смешанная культура микроорганизмов, в первую очередь бактерий и протистов. Она имеет очень высокую плотность популяции и благодаря интенсивной подаче воздуха в аэротенк поддерживается в состоянии густой суспензии.

Флоккулы размером ~ 1 мм имеют зернистую структуру и образуются в результате спонтанной иммобилизации клеток внутри смешанной микроколонии. Живые компоненты флоккулы используют загрязнения в качестве питательной среды. Сначала они их адсорбируют, а потом метаболизируют в качестве источника энергии и конструктивного субстрата для собственного роста и размножения. Время удерживания (см. выше) флоккулы в аэротенке составляет несколько часов, и этого достаточно для удаления большей части загрязнений.

После седиментации флоккул во вторичном отстойнике активный ил возвращается в аэротенк, а его избыток удаляется из системы (рис. 287).

Таким образом, активный ил должен обладать двумя основными качествами: (1) способностью адсорбировать и окислять загрязнения; (2) способностью спонтанно седиментировать. Оба эти качества флоккулы определяются видовым составом ее микробиоты, для которой сточные воды играют роль селективной среды.

Путем амплификации генов рРНК, их клонирования и анализа полученных библиотек клонов установлено, что большинство микробиоты во флоккуле принадлежит к числу некультивируемых и виртуальных представителей класса «*Betaproteobacteria*». В то же время среди культивируемых форм преимущественно выявляются: *Pseudomonas* spp. (класс «*Gamma*proteobacteria»); *Achromobacter* spp., *Ralstonia* spp. и *Zoogloea* spp. (класс «*Betaproteobacteria*»); *Bacillus* spp. (фила *VIII Firmicutes*); *Micrococcus* spp. (фила *XIV Actinobacteria*) и *Flavobacterium* spp. (фила *XXX Bacteroidetes*). При высоком содержании в сточных водах липидов во флоккулах преимуществен-

но накапливаются *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp. и *Pseudomonas* spp., а аммонийного азота — нитрификаторы *Nitrosomonas* spp. и *Nitrobacter* spp.

Несмотря на постоянные риски, связанные с перегрузкой, инактивацией или гибелью активного ила в случае залповых сбросов токсичных веществ, биологическая очистка предпочитается ее техногенной альтернативе.

Анаэробная очистка богатых органикой, в том числе, твердых отходов. Для биологической очистки муниципальных отходов и отходов сельскохозяйственных ферм требуется продолжительный контакт с активным илом, обладающим высокой гидролитической активностью. В данном случае процесс осуществляется в больших закрытых контейнерах — *метантенках* (англ. anaerobic digester) без перемешивания и доступа воздуха. Органика разрушается анаэробным деструктивным сообществом, в состав которого входят гидролитики, ацидогенные бактерии, ацетогенные бактерии и метаногенные археи (см. I том учебника).

Конечный продукт анаэробной очистки — не вода, а минеральные соединения, *биогаз* (смесь 70% метана и 30% CO₂) и *анаэробный активный ил*. Биогаз, выход которого составляет 200–300 л·кг⁻¹ переработанного органического вещества, используется в качестве альтернативного энергоносителя, а анаэробный активный ил, содержащий витамины (в частности, витамин B₁₂) и микроэлементы, идет на приготовление биоудобрений или комбикормов.

21.2.3. Продукты биотехнологии

Основные группы целевых продуктов, с примерами и соответствующими продуцентами, приводятся в таблице 35.

Биотехнология, как и любое производство, подчиняется экономической целесообразности, и выбор метода, в конечном счете, зависит от рентабельности. Некоторые целевые продукты, например натуральный йогурт, получают исключительно с помощью молочнокислых бактерий. Другие, например уксусную кислоту, можно получить как путем неполного окисления этанола с помощью уксуснокислых бактерий или путем автотрофного биосинтеза с помощью ацетогенных бактерий, так и путем химического синтеза (см. II том учебника).

Как видно в табл. 35, спектр целевых продуктов биотехнологии чрезвычайно широк — от индивидуально используемых традиционных продуктов питания до продуктов ремедиации, представляющих собой коллективное достояние. В качестве иллюстрации биотехнологического процесса рассмотрим получение меди методом микробного выщелачивания. На первый взгляд, мы имеем дело с экзотическим случаем. Однако здесь присутствуют все аспекты культивирования, а с точки зрения рентабельности это яркий пример того, как биологический процесс служит альтернативой техногенному процессу.

Гидрометаллургия. Классическая *пирометаллургия* (от греч. *pyros* — огонь) основана на огненной выплавке металлов. При использовании этой технологии земная поверхность загромождается шлаками, а воздух загрязняется пылью и вредными газами; кроме того, обработка труднодоступных, частично выработанных или бедных руд нерентабельна. Альтернативным методом, лишенным негативных свойств пирометаллургии, является биотехнологический процесс *гидрометаллургии* (от греч. *idos* — вода).

Таблица 35. Классификация целевых продуктов

Группа целевых продуктов	Пример (с продуцентом)
Традиционные продукты питания и алкогольные напитки	Трансформированная растительная биомасса (хлеб; <i>S. cerevisiae</i>) или ферментированное молоко (йогурт; <i>Lactobacillus bulgaricus</i>); ферментированные растительные соки (вино; <i>S. cerevisiae</i>) и гидролизаты крахмала (сакэ; <i>Aspergillus oryzae</i>)
Микробная биомасса	Белок одноклеточных (<i>Methylophilus methylotrophus</i>); биоинсектициды (<i>B. thuringiensis</i>)
Липиды	Каротиноиды (β -каротин; <i>Dunaliella salina</i>); биопластмассы (полиоксисалканоаты; <i>Ralstonia eutropha</i>); поверхностно-активные вещества (рамнолипид; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Неферментативные биополимеры	Полисахариды (целлюлоза; <i>Gluconacetobacter oxydans</i>)
Ферменты	Ксилозоизомераза (<i>B. coagulans</i>)
Коферменты	Витамин В ₁₂ (<i>Propionibacterium shermanii</i>)
Метаболические интермедиаты или их производные	Органические кислоты (янтарная кислота; <i>E. coli</i>)
Первичные метаболиты	Аминокислоты (лизин; <i>Corynebacterium glutamicum</i>); нуклеотиды (инозинмонофосфат; <i>Brevibacterium ammoniagenes</i>)
Вторичные метаболиты	Антибиотики (стрептомицин; <i>S. griseus</i>)
Продукты биоконверсии (локального структурного превращения) субстрата	Трансформированные стероиды (гидрокортизон → преднизолон; <i>Mycobacterium globiforme</i>)
Продукты гидрометаллургии	Медь (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)
Альтернативные энергоносители	Биогаз (анаэробное деструктивное сообщество, в т.ч. <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>); топливный этанол (<i>Zygomonas mobilis</i>)
Продукты ремедиации	Сточные воды после аэробной очистки (активный ил; в т.ч. <i>Zoogloea ramigera</i>); десульфурованный уголь (<i>Rhodococcus erythropolis</i>); почва и вода, очищенные от галоорганических соединений (<i>Pseudomonas</i> spp.)

Гидрометаллургия, или *биологическая горная промышленность* (англ. biomin-ing) основана на двух процессах:

— на *микробном выщелачивании* (англ. bioleaching; acid mine drainage, AMD), или биохимическом взаимодействии бактерий с минералами, в результате которого атомы металла из узлов кристаллической решетки переходят в раствор в ионной форме; одним из примеров служит получение меди из сернистых руд;

— на *биологическом окислении* (англ. biooxidation), когда бактерии разрушают минерал, однако металл остается в элементной форме; уникальным примером служит извлечение примеси золота из арсенопирита.

Биореакторы для выщелачивания металлов действуют в Австралии, Бразилии, Гане, Испании, России, США, Чили и ЮАР. Столь широкое распространение данной технологии обусловлено рядом факторов. Во-первых, рудные месторождения, где добыча металлов производится физико-химическими методами, истощаются. Во-вторых, микробное выщелачивание дешево и низкоэнергогоемко. В-третьих, микробное выщелачивание позволяет полностью извлечь металл из отходов традиционных горнодобывающих систем.

Продуценты. Микробное выщелачивание могут осуществлять хемосинтезирующие железо- или серобактерии *Acidithiobacillus caldus*, *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* и *Sulfobacillus* spp., а также археи *Acidianus* spp.,

Ferroplasma spp., *Metallosphaera* spp. и *Sulfolobus* spp. Они ферментативным путем окисляют атомы серы в узлах кристаллической решетки до серной кислоты. Образовавшаяся серная кислота растворяет минерал и превращает атомы железа в катионы Fe^{2+} , а атомы меди — в катионы Cu^{2+} . Помимо этого продуцент ферментативным путем окисляет катион Fe^{2+} в катион Fe^{3+} . Катион Fe^{3+} окисляет атомы меди в катионы Cu^{2+} , что приводит к регенерации катиона Fe^{2+} и т. д.

Природные штаммы *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* и *L. ferrooxidans* накапливаются в промышленных установках спонтанно. Эти хемолитоавтотрофы адаптированы к высокой кислотности среды, т. е. условия, в которых происходит выщелачивание металлов, являются для них элективными. Однако они медленно окисляют рудный минерал, что увеличивает продолжительность обработки руды. Альтернативой являются мутанты, адаптированные к росту на конкретном минерале. В случае бактерий, геном которых секвенирован (например, *At. ferrooxidans*), методами генной инженерии можно получить производственные штаммы с заданными характеристиками.

При выборе продуцента учитываются тип минерала и экологические особенности продуцента.

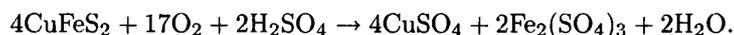
Самым распространенным сырьем служат сернистые руды, которые подразделяются на кислоторастворимые и не растворимые в кислоте. К группе кислоторастворимых минералов относятся галенит PbS , сфалерит ZnS и халькопирит $CuFeS_2$. Они растворяются под влиянием протонов и/или катионов Fe^{3+} . Не содержащие железа медные, свинцовые или цинковые руды перерабатываются бактериями, которые окисляют серу, но не обладают Fe-оксидазной активностью (например, *At. caldus* или *At. thiooxidans*). К группе не растворимых в кислоте руд относятся пирит FeS_2 — один из наиболее распространенных в природе минералов железа, а также вольфрамит WS_2 и молибденит MoS_2 . Окислительным агентом служат катионы Fe^{3+} , т. е. в данном случае требуются штаммы, обладающие Fe-оксидазной активностью. Чаще всего это *At. ferrooxidans* и *L. ferrooxidans*, которые получают энергию за счет реакции: $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$. Наряду с железом эти бактерии окисляют серу до серной кислоты, т. е. они могут быть использованы и для окисления кислоторастворимых руд. Разрушению руды способствует прикрепление бактерий к минеральным частицам. Клетки *At. ferrooxidans* и *L. ferrooxidans* выделяют кислые полисахариды и активно делятся в их толще, образуя биопленку.

При подборе продуцента учитываются температура, pH и концентрация тяжелых металлов. Большинство продуцентов (в частности, штаммы *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* и *L. ferrooxidans*), имеет t_{opt} 20°–35°С, т. е. принадлежит к мезофилам, что соответствует условиям выщелачивания под открытым небом. Использование этого температурного диапазона в биореакторе малоэффективно, поскольку не обеспечивается достаточно высокая скорость реакции. Подбор умеренно термофильных штаммов данных бактерий позволил бы проводить процесс при 40°–50°С. Наряду с этим разрабатывается технология с использованием *At. caldus* и *Sulfolobus* spp., что дает возможность поднять температуру до 75°–78°С. Наилучшая перспектива — использовать архей, которые окисляют сернистые железные руды, в частности термофила *Sulfolobus metallicus* (t_{opt} 68°С) и экстремального термофила *Metallosphaera sedula* (t_{opt} 80°–85°С). Вторым критерием успеха служит способность продуцента развиваться при накоплении серной кислоты в ходе разрушения руды. Хотя все упомянутые бактерии и археи являются облигатными ацидофилами, их реакция на высокую кислотность среды существенно различается. Например, для *At. ferrooxidans* оптимальное значение pH составляет 1,8–2,0. В то же время *L. ferrooxidans* более устойчив к кислоте и развивается даже при pH 0,7. Наконец, продуцент должен развиваться при высокой концентрации тяжелых металлов, а также в присутствии других токсичных компонентов руды, которые переходят в раствор одновременно с целевым продуктом.

Технология выщелачивания меди. В настоящее время медь занимает ведущее место среди целевых продуктов гидрометаллургии. По данным открытой мировой статистики, в установках микробного выщелачивания ежегодно обрабатываются >30 млн. т медной руды. Сырьем служат борнит Cu_5FeS_4 , ковеллит CuS , кубанит $CuFe_2S_3$, халькопирит $CuFeS_2$, халькоцит Cu_2S и энаргит Cu_3AsS_4 . Чаще всего ис-

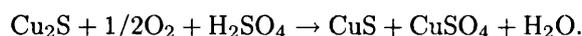
пользуются бедные руды с содержанием меди <0,4%, а также отвалы, остающиеся после физико-химической переработки богатых руд и содержащие немного меди.

Из халькопирита медь выщелачивается согласно эмпирическому уравнению реакции:

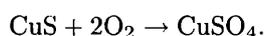


Образующиеся катионы Fe^{3+} окисляют минерал, ускоряя процесс выщелачивания.

Другим минералом меди, который подвергается бактериальному выщелачиванию, является халькоцит Cu_2S . Предварительно он превращается в ковеллит CuS :



Ковеллит окисляется дальше:



Для выщелачивания меди, как правило, используются не чистые культуры бактерий, а смешанные природные популяции. Чаще всего из промышленных установок можно выделить железоокисляющих бактерий *At. ferrooxidans* и *L. ferrooxidans*. При разрушении медно-серных минералов в качестве промежуточного продукта образуется элементарная сера, обволакивающая частицы руды и затрудняющая доступ к ним; поэтому при выщелачивании меди большое значение имеют бактерии, окисляющие элементарную серу, в частности *At. thiooxidans*.

Выщелачивание меди следует ирригационному принципу, когда через груды руды пропускается рабочий раствор. В результате жизнедеятельности продуцента он обогащается катионами Cu^{2+} . При этом, в соответствии со спецификой пространственной организации процесса, используются три метода:

- выщелачивание отвалов (англ. dump leaching);
- кучное выщелачивание (англ. heap leaching);
- выщелачивание *in situ*.

Самым простым в технологическом плане является выщелачивание отвалов. Из экономии их удобно размещать вблизи шахты, откуда руду доставляют на конвейере. Выбираются площадки с естественным уклоном, что дает возможность самотеком собирать обогащенный металлом раствор. Отвалу придают форму усеченного конуса высотой до 200 м (диаметр основания 250 м, вершины 80 м); он обычно содержит $3 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$ т руды.

Для выщелачивания отвалов используют рабочий раствор, подкисленный серной кислотой до pH 1,5–3,0. Его разбрызгивают по поверхности или подают через вертикальные трубы. Серная кислота, молекулярный кислород и диоксид углерода, содержащиеся в рабочем растворе, обеспечивают элективные условия для продуцента, разрушающего минерал. Чтобы усилить аэрацию, отвал снабжают пневматической системой, через которую поступает воздух. Просочившийся сквозь отвал раствор, содержащий $0,75$ – $2,2$ г·л⁻¹ меди, собирают и после извлечения металла используют повторно.

Кучное выщелачивание в общих чертах сходно с выщелачиванием отвалов, однако оно сложнее в технологическом отношении (рис. 288). В данном методе руду измельчают, увлажняют серной кислотой и загружают во вращающиеся барабаны, где образуются частицы стандартного размера. Из подготовленного таким образом субстрата делают насыпь высотой 2–10 м на полиэтиленовой подложке, чтобы раствор не просачивался в грунт или материнскую породу. По трубам поступает рабочий раствор, к которому добавляют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и KH_2PO_4 , стимулирующие рост бактерий. Для аэрации насыпь может быть снабжена воздухопроводными трубами. Благодаря технологическим особенностям кучного выщелачивания срок полного извлечения меди из руды составляет несколько лет, как и при выщелачивании отвалов, а в отдельных случаях несколько месяцев.

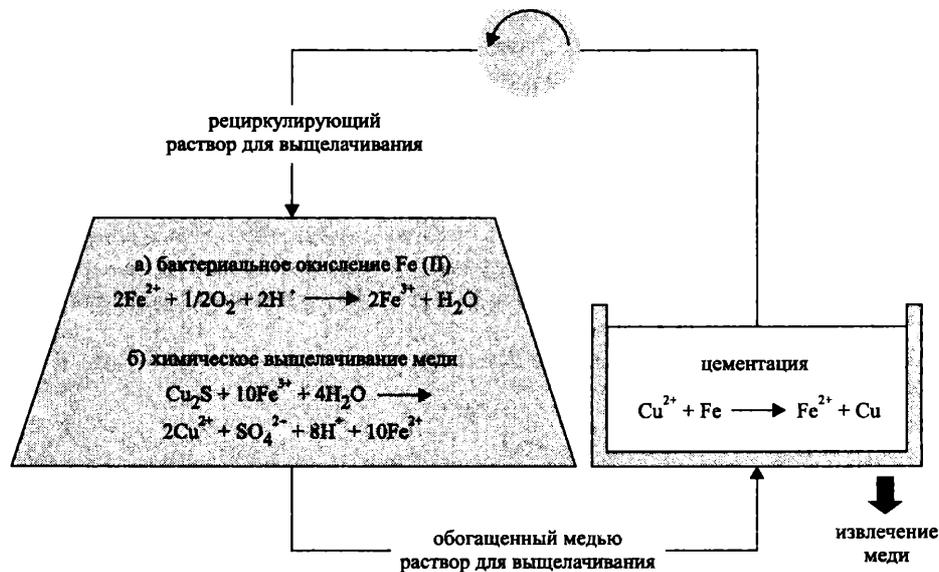


Рис. 288. Схема установки для кучного выщелачивания меди. Объяснение в тексте.

Выщелачивание *in situ* производится под землей, в толще рудного тела. В зависимости от глубины залегания и расположения по отношению к уровню грунтовых вод выделяют три типа руд, залегающих: (1) выше уровня грунтовых вод; (2) ниже уровня грунтовых вод, но еще доступных для разработки шахтным способом; (3) слишком глубоко под водоносным слоем, разработка которых экономически не выгодна.

Способ добычи меди из сульфидных руд типов (1) и (2) зависит от того, сколько они содержат металла. При относительно высоком содержании меди руду, как правило, добывают шахтным методом с последующим кучным выщелачиванием или выщелачиванием отвалов. Напротив, для бедных руд больше подходит способ выщелачивания *in situ* — при этом породу измельчают с помощью подземного взрыва, затем закачивают в нее рабочий раствор и спустя некоторое время через скважины извлекают отработанный раствор, обогащенный медью.

Заметим, что медь можно выщелачивать *in situ* как биологическим, так и химическим путем. Во втором случае решающее значение имеет подбор окислительного реагента.

Для окончательного извлечения меди используют два метода: (1) вытеснение железом и (2) экстракция растворителями.

В основе первого метода лежит химическая реакция вытеснения меди металлическим железом. Для этого в отработанный раствор помещают щетки из железного скрапа (англ. *scrap* — металлолом), на которых протекает обменная реакция:



Чистота полученной таким способом порошковой, или «цементной» меди составляет ~85%. Для дальнейшей очистки металл смешивают с флотационным составом, после чего собирают и отправляют на переплавку.

При экстракции растворителями к отработанному раствору добавляют органический растворитель, поглощающий катионы меди. После разделения фаз вносят серную кислоту, и образовавшийся медный купорос подвергают электролизу; металлическая медь, выделяющаяся на катоде, имеет чистоту 99,9%.

* * *

Работа с микробными культурами и практическое использование культивирования в биотехнологии являются альфой и омегой биологии прокариотов.

В нынешний век биоинформатики, когда цитогенетику, онтогенез, регуляцию, автоэкологию и синэкологию (см. главы 16–20) можно успешно изучать, не отходя от компьютера, все-таки сохраняют свое значение два основополагающих метода микробиологии — световая микроскопия и культивирование.

Постоянная зависимость профессионального микробиолога от этих методов определяет специфическое и довольно обособленное положение, которое микробиология занимала и занимает среди других биологических наук.

Без использования микроскопии и без культивирования человек никогда не узнал бы о существовании прокариотов, не получил бы сведений об их строении, свойствах и разнообразии, а также не научился бы решать практические вопросы биотехнологии и медицинской микробиологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Feci quod potui, faciant meliora potentes».
(«Я сделал, что мог, кто может, пусть сделает лучше»).

Формула, произносившаяся римскими консулами по окончании срока полномочий.

Закончен последний том учебника; пришла пора подвести итоги — осознать специфику современного этапа развития микробиологии, а также задуматься о дальнейших перспективах ее развития.

За относительно короткий исторический срок наука о прокариотах совершенно преобразилась. Теперь она уже не может восприниматься как крайне обособленный раздел биологии, изучающий вредных или полезных (с точки зрения человека) бактерий.

Всесторонне и неопровержимо доказано, что прокариоты являются локомотивом органической эволюции и трофическим фундаментом биосферы, что им нет равных по физиологическим возможностям и что их разнообразие — неисчерпаемо.

На исходе XX столетия окончательно пришло понимание того, что изучение биологии прокариотов требует принципиально новых теоретических и экспериментальных подходов. Создание генетических банков данных, а также конструирование гибридных векторов и изучение продуктов их экспрессии позволило ответить на вопросы, принципиально неразрешимые на основе традиционного арсенала методов цитологии, биохимии и генетики.

Как выяснилось, анатомирование прокариотов более, чем ядерных организмов, чревато грубыми артефактами. Например, структуру и динамическое поведение прокариотной хромосомы возможно изучать только *in situ*, путем витального зондирования. Поэтому современный экспериментатор все реже пытается разобрать прокариотную клетку на части; как следствие, отмирают за ненужностью физиолого-биохимические методы, на которых выросло старшее поколение микробиологов. В свою очередь, трансмиссивную электронную микроскопию, так много давшую микробиологии, вытесняет световая микроскопия нового поколения — конфокальная, лазерная люминесцентная и т. д.

Наконец, вместо кропотливой работы с культурами исследователи все чаще предпочитают виртуальный анализ продуктов амплификации нуклеотидных последовательностей природной ДНК. Позитивным итогом таких манипуляций с нуклеотидными последовательностями, а не с фенотипами становится расширенное и подчас революционно преобразованное представление о разнообразии и численности прокариотов, а расплатой за громкие успехи в этой области — отрыв от професси-

ональных тылов, т. е. незнание живых объектов и утрата навыков работы с ними. Мало-помалу это начинает напоминать виртуальный анализ, который давно практикуют физика микромира и звездная астрономия, хотя сила микробиологии *всегда заключалась в прямом наблюдении объекта и тесном контакте с ним.*

Порой говорят, что изучение клеточной биологии и разнообразия прокариотов лежит в одной плоскости, а анализ структуры, функционирования и эволюции микробных экосистем — в другой, и что эти плоскости не пересекаются. Кажущееся противоречие системных подходов, к сожалению, приводит к взаимному непониманию в рядах микробиологов.

В заключение нельзя не упомянуть две кризисные темы современной микробиологии.

Первая из них связана с тупиком, в котором оказалась систематика прокариотов по причине принципиальной несовместимости двух концептуальных подходов — фенотипического и филогенетического. Есть опасения, что выходом, продиктованным внутренней логикой объекта, станет разрыв с линнеевой системой, т. е. беспрецедентное расставание с категорией вида.

Вторая тема касается «возврата к природе». Речь идет о том, чтобы посягнуть на традиционную основу микробиологии — взамен чистых культур сознательно перейти к анализу моно- и мультисеничных культур в градиентной среде, которая по своим динамическим характеристикам максимально приближена к природной. Это многократно усложнит задачу будущих исследований, но разве от этого она станет менее интересной?

Читатель учебника застал микробиологию на крутом подъеме, она моложе других биологических наук, и ей уготован еще долгий путь свершений и открытий.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автоиндуктор 347. *См. также* Феромон
S-аденозилметионин 100, 352
Акинета 255. *См. также* Циста цианобактерии
Аконитаза 303
Активные формы кислорода 368
Активный ил 442. *См. также* Флокула
Алармон 301. *См. также* Гуанозинтетрафосфат
Аллолактоза 33
Анти-антисигма-фактор 284
Антисигма-фактор 283
Антитерминация 182
Апикопласт 416. *См. также* Специализированная пластиды
Апоптоз 210. *См. также* Запрограммированная смерть клетки
Аптамер 181
Аскорбиновая кислота 376
Аттенуация 183
Аттрактант 335. *См. также* Хемозффектор
Аэротаксис 343
- Бактериофаг 152
— литический 152
— умеренный 153. *См. также* Профаг
Бактериофитохром 312
Бактериоцит 396
Бактероид 247
Бделлопласт 394
Белок
— ацилпереносящий 350
— ДНК-изгибающий
— — Fis 126
— — H-NS 317
— — IHF 126
— рецепторный 309
— — классификация 309
— семейства Mer 382
— семейства SmtB/ArsR 382
— суперсемейства AAA 149
— — Aeg 344
— — DnaA 55
— — FtsK 236
— — IsiA 330
— — KaiC 202
— — LexA 62, 296
— — MCP 336. *См. также* Метилацепторный белок хемотаксиса
— — RecA 97, 117
— — Rho 182
— — SpoIIIЕ 76
— теплового шока 298
— фоторецепторный 310
— холодового шока 357
— CRP 175
— FtsZ 233
— Hfq 307
— NER 90
— OBP 55
— Pag 75, 81
— Rep 69
— SeqA 55
— SSB 57
Беоцит 230, 242
Биливердин 309
Биоконтроль 423
Биотехнология 436–447
— определение 436
- Везикула актинобактерии 249
Внутренний транскрибируемый спейсер 33, 47
- Галоциста 257
Гальванотаксис 346
Ген
— горизонтальный перенос 128
— — интердоменный 130
— — способы 116, 132
— взаимно перекрывающийся 29
— домашнего хозяйства 10
— информационный 10
— киллерный 213
— криптический 28
— мозаичный 40
— незаменимый 10
— определение 20
— ортолог 27
— паралог 27
— регулятор 31
— сирота 28
— структурный 21. *См. также* Цистрон
— штаммоспецифичный 26
Генетическая трансформация 116

- Геном 20
 - информационная емкость 22
 - инфраструктура 23
 - — кодирующий участок 25
 - — некодирующий участок 44
 - — ядро 26
 - картирование 24
 - — генетическое 24
 - — физическое 24
 - определение 20
 - партитность 11
 - — мультипартитный 12
 - — унипартитный 12
 - размер 22–23
 - — минимальный 23
 - ненаследуемое изменение 158–159
 - секвенирование 26
 - эволюция 159–166
 - — стратегии 159
- Геномная перестройка 162
- Геномный островок 131
- Гетероциста 244–247
- Гидрогеносома 420
- n*-Гидроксикоричная кислота 342. *См. также* фотоактивный желтый пигмент
- Гидроксильный радикал 373
- Гидрометаллургия 443–447
- Гидропероксидаза 379
- Гидрофобин 223
- Гнотобиот 421
- Гомеовязкостная адаптация 356
- Гормогоний 242
- Гуанозинтетрафосфат 301. *См. также* Алармон

- Деградосома 190
- Диазоцит 243
- Диализнос культивирование 434
- Диауксия 318
- Дивисома 234
- Дигуанилатциклаза 309, 353
- ДНК
 - биосинтез мономеров 49
 - ведущая цепь 51
 - нуклеотидный состав 24
 - отстающая цепь 51
 - ДНК-геликаза 58, 66
 - ДНК-гираза 58. *См. также* Топоизомераза
 - ДНК-метилтрансфераза Dam 101
 - ДНК-полимераза 60, 67
 - PolC 63
 - Pol I 60
 - Pol II 62
 - Pol III 60
 - Pol IV 62
 - Pol V 62
 - ДНК-фотолиаза 86
- Домен
 - PDZ 385
 - сенсорный 310
- — PAS 310
- фосфотрансферазный 287
- Дробление 229

- Железный**
 - бокс 328
 - стресс 330

- Закрытый комплекс 174
- Запрограммированная смерть клетки 211. *См. также* Апоптоз

- Изошизомер 104
- Иммобилизация 441
- Индуктор 30
- Инициаторный комплекс 56
- Инсерционная последовательность 35. *См. также* Мобильный элемент
- Интеграза 126. *См. также* Топоизомераза; Рекомбиназа
- Интегрон 145
- Интрон 40–44
 - группы 41
- Инфекционная нить 399
- Итерон 69

- Катаболит** 318
- Катаболитная репрессия 318
- Каталаза 379
- Квази-фототрофия 310
- Клеточная дифференциация 240
- Клеточное деление 227. *См. также* Цитокинез
 - варианты 228
 - особенности у архей 239
- Клеточный рост
 - апикальный 222
 - определение 215
 - палочковидных бактерий 219
 - полярный 221
 - сферических бактерий 221
- Клеточный цикл 196–214
 - абортный 197
 - диморфный 197
 - мономорфный 196
 - особенность у архей 208
 - регуляция 199
 - триморфный 197
 - фазы 198
- Клинокинез 336
- Коинтеграц 18. *См. также* Коинтегративная плазмида
- Z-кольцо 233. *См. также* Кольцо деления
- Кольцо деления 233. *См. также* Z-кольцо
- Комплементарная хроматическая адаптация 313
- Консорция 392–393
 - определение 392
- Конъюгация 140. *См. также* Ген, горизонтальный перенос

- Корепрессор 30
 Кривая роста 429
 — фазы 429, 432–434
 Ксеносома 406–421
 Культиватор 427
 Культура 427–436
 — классификация 427–428
 — определение 427
 Культуральная среда 427
 Кэпирование мРНК 189
- Лизогения** 124, 154
- Мастер-регулятор** 273
 Матураза 41
 Мегаллазида 15
 Мерозигота 116
 Метаболизм
 — вторичный 331
 — первичный 331
 Метагеномика 165
 Метилаза Dam 55. *См. также* Метилтрансфераза Dam
 Метиллактопторный белок хемотаксиса 336.
См. также Белок MCP
 Метилтрансфераза Dam 55. *См. также* Метилаза Dam
 Микрочип 26
 Микроспора 253. *См. также* Циста миксобактерии
 Митокинез 238
 Митосома 421
 Митохондрия 407, 418–420
 Множественная лекарственная устойчивость 40
 Мобильный элемент 34. *См. также* Инсерционная последовательность; Транспозон
 — транспозиция 34
 Модулон 274, 301
 Модуль привыкания 213
 Мотив
 — Уокера 149
 — НТН 283
 Мутаген 109
 Мутант 107
 — классификация 107
 — — ауксотрофный 108
 — — термочувствительный 108
 — — фитинг-мутант 109
 Мутация 106
 — определение 106
 — классификация 106–107
 — — адаптивная 112
 — — индуцированная стрессом 112
 — — плейотропная 108
- НАД(Ф)Н** 246, 375, 376
 Ник-трансляция 85
- Онтогенез** 195–270
- определение 195
 Оператор 31
 Оперон 30
 — лактозный 32
 — — рибосомных РНК 33, 316
 — — — разобщенный 34
 — определение 30
 Ориджин репликации 52. *См. также* Репликация
 Осмопротекторы 361
 — архей 361
 — бактерий 361
 Осморегулируемые периплазматические гликаны 364
 Осмотаксис 346
 Островок патогенности 132
 Открытая рамка считывания 21
 Открытый комплекс 56
 Очистка отходов 441–443
 — анаэробная 443
 — аэробная 441
- Палиндром** 20
 Пангеномика 164
 Парасексуальный процесс 116
 Пероксидаза 379
 Пероксид водорода 373
 Пероксинитрит 371
 Пиреноид 412
 Питательная среда 433
 — классификация 433
 — минимальная 108
 Плазида 14
 — излечение 69
 — классификация 15, 17
 — коинтегративная 18
 — конъюгативная 142
 — мобилизуемая 19, 142
 — несовместимость 19
 — — группы 19, 143
 — нетрансмиссивная 17, 19
 — поверхностное исключение 19
 — промискуитет 19
 — размер 14, 20
 — расхождение 81
 — трансмиссивная 17
 Пластида 408
 — простая 410
 — — классификация 410
 — сложная 414
 — специализированная 416
 Пластокинез 239
 Повтор
 — инвертированный 35
 — прямой 35
 Повторяющаяся последовательность 44
 Половой фактор 17
 Поляризация клетки 221
 Порин 307
 — контроль состава 307, 363

- Правило коорентации 25
 Праймаза 67
 Праймосома 58
 Препраймерный комплекс 56
 Промотор 172, 186
 — сила 173
 Простека 222
 Протеаза
 — Lon 214
 — SulA 233
 Прототроф 108
 Профаг 153. *См. также* Бактериофаг, умеренный
 Псевдоген 29
 Псевдофимбрия компетентности 136
- Реакция**
 — Габера–Вайса 373
 — Меллара 359
 — Фентона 373
 Регулон
 — определение 273
 — CIRCE 300
 — GSP 300
 — Hsp 298
 — Ltr 295
 — RpoS 292
 — SOS 295
 Регулятор 286
 Резольваза 73. *См. также* Топоизомераза; Рекомбиназа
 Резольвасома 123
 Рекомбиназа 73. *См. также* Интеграза; Резольваза
 Рекомбинация 115
 — гомологическая 116–123
 — незаконная 116, 126
 — сайтспецифичная 116, 123–126
 Релаксосома 146
 Репарация 83
 — ошибок спаривания 91
 — рекомбинационная 93
 — ResBC-путь 95
 — ResF-путь 95
 — эксцизионная 87
 — с удалением нуклеотидов 89
 — с удалением основания 88
 Репеллент 335. *См. также* Хемозффектор
 Репликатор 52. *См. также* Орджин репликации
 Репликационная вилка 51
 Репликация 50
 — плазмиды 68
 — — сигма-механизм 70
 — — тета-механизм 69
 — хромосомы 50
 — — архей 66–68
 — — бактерий 52–66
 — — многовилковая 54
 — — симбиотической органеллы 65
 — — этапы 52
 Репликационная вилка 51
 Репликон 9
 Реплисома 58
 Репрессор 32
 Рестриктаза 99
 Рестрикция—модификация 99
 Ретиналь 309, 341
 Ретинопротеин 341
 Ретрон 184
 Рибовыключатель 181
 Рибозим 41
 РНК
 — антисмысловая 304
 — малая 306
 — — классификация 306–308
 — — полиаденилирование 189
 — регуляторная 304
 РНК-полимераза 168, 188
 мРНК
 — дегградация 190
 Родлин 223
 Рост
 — культуры 431
- Сексдукция 17
 Сенсор 287
 Сенсорная киназа 286
 — гибридная 289
 Сигма-фактор 277–283
 — альтернативный 281
 — первичный 279
 — семейства σ^{54} 283
 — семейства σ^{70} 279
 Сигнальная система
 — двухкомпонентная 286
 — — ArcB/ArcA 315
 — — NarQ/NarP 314
 — — NarX/NarL 314
 — — NtrB/NtrC 322
 — — SoxR/SoxS 375
 — однокомпонентная 286
 — — DtxR 328
 — — FNR 313
 — — Fur 327
 — — OxyR 375
 Симбиоз 386–426
 — определение 386
 — терминология 387
 Симбиосома 248
 Синглетный кислород 371
 Сплайсинг 40
 — автосплайсинг 41
 — типы 41
 Сплайсосома 43, 307
 Споруляция 263–270
 — регуляция 266
 — стадии 263
 Стимулон 274
 Стресс 356–385

- водный 358
- гидростатический 365
- окислительный 367
- — защитный ответ 374
- — механизм 367
- классификация 355
- радиационный 366
- рН-стресс 380
- токсический 380
- Строгий ответ 301
- Сульфурета 393
- Супероксиддисмутаза 378
- Супероксидный анион-радикал 371

- Таксис 334–346
- определение 334
- Твердофазная ферментация 440
- R-тело 401
- Терминус репликации 52
- Термотаксис 346
- Тилакоид 409, 411
- Тилакосома 417. *См. также* Специализированная пластида
- Топоизомераза 73
- классификация 73
- Трансдуктор 337. *См. также* Хеморецептор
- Трансдукция 152. *См. также* Ген, горизонтальный перенос
- общая 153
- специализированная 154
- Транскрипционный фактор 284–292
- глобальный 289
- локальный 289
- экзогенный 285
- эндогенный 285
- Транскрипция 167–188
- инициация 172
- обратная 183
- регуляция 272–308
- терминация 181
- элонгация 180
- Транслокон 146
- Транспозиция 36
- мобильного элемента 36
- — консервативная 36
- — репликативная 37
- Транспозаза 35
- Транспозон 36. *См. также* Мобильный элемент
- конъюгативный 36, 144
- ретротранспозон 184
- составной 36
- Транспозосома 36
- Трансформация 132. *См. также* Ген, горизонтальный перенос
- компетентность 135
- Трегалоза 361
- Трихом 195
- Турбидостат 435

- Уравнение Моно 431
- Уридилтрансфераза/деуридилаза 322

- Фаговая конверсия 155
- Фагоцитоз 403
- ФАД(H₂) 344
- Фазовая изменчивость 192. *См. также* Эпигенетическое наследование
- Nod-фактор 398
- Ферментер 441
- классификация 441
- Феромон 135. *См. также* Автоиндуктор
- Фикобилисома 411
- Фимбрия 17
- половая 17, 145
- — F 145
- — Pap 192
- Флаводоксин 330
- Флоккула 442. *См. также* Активный ил
- ФМН 309
- Фосфореле 289
- AtcB/AtcA 315
- споруляции 289
- Фосфотрансферазная система 319
- Фотоактивный желтый пигмент 342. *См. также* *n*-Гидроксикоричная кислота
- Фотокинез 340
- Фотореактивация 86–87
- Фототаксис 339–343
- Фотофобическая реакция 340
- Фрагмент Оказаки 51

- Хеморецептор 337. *См. также* Трансдуктор
- Хемостат 434
- Хемотаксис 335–339
- Хемоэффлектор 335. *См. также* Аттрактант; Репеллент
- Хиазма Холлидея 93, 121
- Хлородыхание 408
- Хлоропласт 412
- онтогенетическое семейство 412
- Хоуминг 41
- Хромосома 10
- вторичная 12
- декатенация 73
- доминирующая 12
- кольцевая 10
- линейная 10
- нуклеотидная асимметрия 24
- поляризация 25
- размер 12
- расхождение 74
- — системы 75
- Хромофор 309

- Цианелла 409
- Цианобионт 422
- Цикло-АМФ 175, 320
- Цикло-ди-ГМФ 352

Циркадный ритм 200

Циста

— азотобактера 256

— актинобактерии 252

— метанотрофной бактерии 256

— миксобактерии 253. *См. также* Миксо-спора

— пурпурной бактерии 255

— цианобактерии 255. *См. также* Акинета

Цистрон 30. *См. также* Структурный ген

Цитокинез 227. *См. также* Клеточное деление

Чувство кворума 347

Шаплин 223

Швермер 205

Шок 355

— гиперосмотический 360

— гипосмотический 364

— тепловой 357

— холодовой 357

Экзон 40

Эклипс-период 55

Эксцизназа 126

Эндоспора 257–270

— прорастание 268

— свойства 259

Энхансер 174

Энхансосома 176

Энерготаксис 343–345

Эпигенетическое наследование 191. *См. также* Фазовая изменчивость

Эписома 15

Учебное издание

Александр Васильевич Пиневич

**МИКРОБИОЛОГИЯ
БИОЛОГИЯ ПРОКАРИОТОВ**

Учебник

Том III

Печатается без издательского редактирования

*Обложка художника Е. А. Соловьевой
Компьютерная верстка А. М. Вейшторг*

Подписано в печать 26.06.2009. Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 37,08. Тираж 599 экз. Заказ № 243

Издательство СПбГУ. 199004, С.-Петербург, В. О., 6-я линия, 11/21

Тел./факс (812) 328-44-22

E-mail: editor@unipress.ru www.unipress.ru

По вопросам реализации обращаться по адресу:

С.-Петербург, В. О., 6-я линия, д. 11/21, к. 21

Телефоны: 328-77-63, 325-31-76

E-mail: izdat-spbgu@unipress.ru

Типография Издательства СПбГУ. 199061, С.-Петербург, Средний пр., 41