

ЧТО ПОМОГАЕТ БАКТЕРИЯМ ПЕРЕЖИТЬ СТРЕСС? АНТИСТРЕССОРНЫЕ ФУНКЦИИ ПОЛИАМИНОВ



Слева направо: младший научный сотрудник, кандидат биологических наук М.С. Шумков; младший научный сотрудник А.В. Ахова; младший научный сотрудник, кандидат биологических наук М.В. Федотова; заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов доктор медицинских наук, А.Г. Ткаченко; научный сотрудник, кандидат биологических наук Л.Ю. Нестерова;

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Полиамины представляют собой один из наиболее древних видов биологических молекул, распространенных среди представителей всех царств организмов. В обычных условиях эти соединения выполняют функции универсальных клеточных регуляторов, без участия которых невозможно нормальное протекание ни одного из процессов биосинтеза, включая синтез ДНК, РНК и белка. Исследования последних лет, в том числе осуществленные авторами статьи, показали, что полиамины принимают участие в адаптации микроорганизмов к различным стрессорным воздействиям. Энергетические сигналы стресса воспринимаются ферментами синтеза полиаминов, что приводит к возрастанию концентрации этих соединений в клетке и усиливает их адаптогенные функции. В результате антистрессорных функций полиаминов повышается жизнеспособность клетки.

Эволюционная история Земли, особенно раннего периода ее формирования, связана с потрясениями и катаклизмами, сопровождающимися непрерывным изменением водных, атмосферных и других

геологических условий. В ходе этих глобальных преобразований формировалась жизнь на Земле. Поэтому неудивительно, что первые одноклеточные организмы в ходе эволюции приобрели механизмы

противостояния неблагоприятным воздействиям среды, унаследованные последующими поколениями живых организмов. Комплекс адаптивных реакций, формирующихся в организме в ответ на самые разнообразные повреждающие воздействия, впоследствии получил название «стресс». Впервые этот термин был предложен выдающимся канадским исследователем Гансом Селлье в 30-х годах прошлого столетия в отношении организма человека, однако в настоящее время он применим также и к микроорганизмам. Микроорганизмы в эволюционном плане наиболее близки к первоклетке, прародительнице всех живых организмов. Они обладают древними адаптивными механизмами, которые функционируют наряду с другими, сформировавшимися в ходе последующей эволюции. Эти древние механизмы в той или иной степени должны сохраниться во всех формах жизни, будь то бактерии, растения или животные. «Основными игроками» здесь, естественно, должны выступать биомолекулы, близкие к тем, которые могли функционировать в первоклетках.

Основное научное направление коллектива лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН посвящено изучению функциональной роли полиаминов – соединений, присутствующих во всех формах жизни, от вирусов и бактерий до человека, и унаследованных современными формами жизни от общих предков в ходе эволюции. По многим признакам эти соединения могут быть от-

несены к древним биомолекулам. Полиамины представляют собой короткие углеводородные цепочки разной длины, состоящие из 4–10 углеродных атомов, которые содержат от 2 до 4 аминогрупп (рис. 1). В клетках полиамины заряжены положительно и являются основными биогенными поликатионами, способными электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными биополимерами, такими как нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), элементами клеточных мембран (фосфолипиды) и др. Благодаря этому полиамины способны участвовать во многих клеточных процессах, что послужило основанием для отнесения их к классу универсальных клеточных регуляторов [1, 2]. Без участия этих соединений невозможно нормальное протекание большинства жизненно важных биологических процессов, будь то синтез ДНК, РНК или белка. В присутствии полиаминов происходит значительное ускорение биосинтетических процессов, что сопровождается увеличением скорости роста клеток. В то же время когда количество этих соединений бесконтрольно возрастает, клетки начинают делиться очень быстро. Именно это происходит в раковых клетках, когда их рост сильно опережает развитие нормальных тканей [3].

Исследования, которые мы проводим в течение последних 10–12 лет, показали, что полиамины, наряду с другими их функциями, участвуют в адаптации микроорганизмов к различным повреждающим, так называемым стрессорным воз-

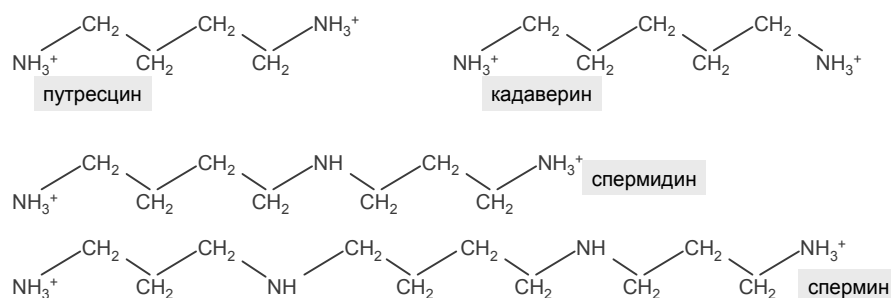


Рис. 1. Представители класса полиаминов, наиболее широко распространенные в составе живых организмов

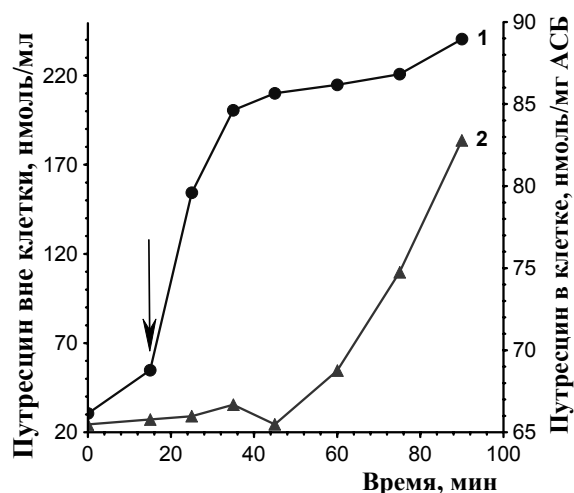


Рис. 2. Изменения концентрации полиаминов в клетке (1) и окружающей среде (2) в условиях стрессорного воздействия

действиям. Сначала мы обратили внимание на то, что на самые разнообразные неблагоприятные внешние воздействия клетки микроорганизмов могут отвечать повышением количества полиаминов в цитоплазме (рис. 2). При дальнейшем изучении ответа микроорганизмов на стрессы мы обратили внимание, что уровень этих соединений возрастает в тех ситуациях, когда повреждающие воздействия сопровождаются увеличением в клетках количества высокоэнергетических соединений, и прежде всего АТФ, необходимого для синтеза таких клеточных биополимеров, как белок, ДНК, РНК. Для того чтобы понять природу взаимосвязи между полиаминами и АТФ при стрессе, необходимо было ответить на вопрос: почему при воздействии на микроорганизмы неблагоприятных факторов в них возрастает количество энергии? Казалось бы, в таких условиях должно происходить угнетение всех процессов, в том числе и тех, которые приводят к образованию энергии. Однако оказалось, что это не так. По отношению к большинству сублетальных неблагоприятных воздействий, то есть тех, которые не приводят к полной гибели клетки, наиболее уязвимыми оказались процессы биосинтеза (рис. 3), которые выступают в роли главных по-



Рис. 3. Связь синтеза полиаминов с содержанием в клетке высокоэнергетических молекул

требителей энергии, генерируемой клеткой микроорганизма. В этих условиях резкое прекращение энергопотребления приводит к быстрому и значительному «скачку» содержания энергетических источников, в частности АТФ, за счет некоторой «инерционности» метаболических процессов. Мы пришли к мнению, что такие «скачки» энергетического состояния можно рассматривать как своего рода сигналы стресса [4].

Если это так, то какие же системы микробной клетки отвечают на энергетические сигналы стресса? Ведь для того чтобы приспособиться к новым условиям, клетка должна каким-то образом восстановить нарушенный синтез основных биополимеров в измененных, стрессорных условиях. Иначе рано или поздно наступит ее гибель. Естественно, мы прежде всего исследовали, зависит ли активность ферментов синтеза полиаминов от энергетического состояния клетки. Первые же эксперименты показали, что активность ключевого фермента синтеза полиаминов – орнитиндекарбоксилазы – сильно возрастает в присутствии АТФ (рис. 4). Следовательно, существует прямая связь между количеством энергии в клетке и содержанием в ней полиаминов. То есть энергетические сигналы стресса находят отклик со стороны системы синтеза полиаминов. Мы показали, что в условиях стресса это приводит к повышенной продукции полиаминов. Теперь осталось самое главное: выяснить, участвуют ли полиамины в восстановлении кле-

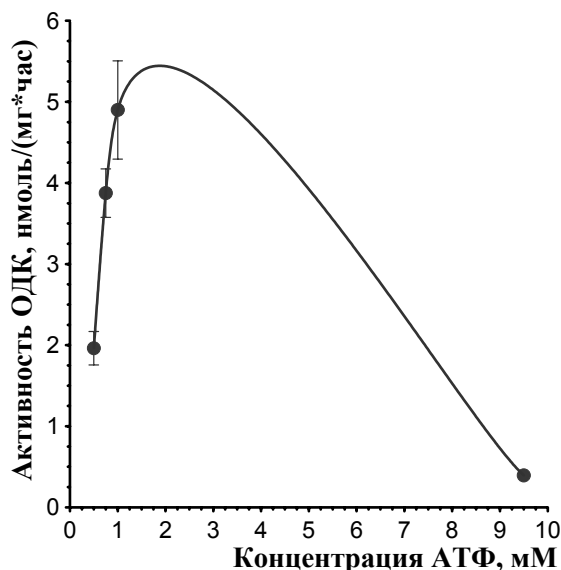


Рис. 4. Зависимость активности орнитиндекарбоксилазы (ОДК) от концентрации АТФ

точных функций в условиях стресса, и если да, то как?

С этого момента начался самый трудный и в то же время увлекательный период наших исследований, который продолжается по сей день. Мы задались вопросом: какую роль полиамины могли бы сыграть в восстановлении нарушенных процессов биосинтеза в условиях стресса? Отправной точкой для исследований послужили накопленные к тому времени данные о том, что в нормальных условиях развития клетки полиамины выполняют функции универсальных клеточных регуляторов, без которых невозможно нормальное протекание ни одного из процессов биосинтеза. Предстояло выяснить, как полиамины выполняют эти функции при стрессе.

Известно, что в ответ на изменения окружающей среды клетка вынуждена синтезировать те ферменты, которые необходимы только в данных, специфических условиях. Для того чтобы это могло происходить, в работу должны включаться гены, кодирующие данные ферменты. Ведь из большого арсенала генов, которым обладает любой организм, в конкретных условиях «работают» только те, чьи продукты необходимы для нормального существования, тогда как другие до поры

до времени «молчат». При стрессе все осложняется тем, что многие белки, в том числе жизненно важные ферменты, повреждаются и не могут нормально функционировать. Следовательно, вместо них должны синтезироваться те формы, которые устойчивы к данному повреждающему фактору. Кроме того, существует ряд защитных белков, действие которых направлено на нейтрализацию вредных воздействий повреждающих факторов. Таким образом, стресс должен сопровождаться глобальным изменением типа генной экспрессии. Могут ли полиамины каким-то образом влиять на этот процесс?

Задавшись этим вопросом, мы прежде всего исследовали воздействие полиаминов на гены адаптации к окислительному стрессу [5, 6]. Данный вид стресса сопутствует любым сублетальным повреждающим воздействиям и формируется как следствие накопления в клетке избыточной энергии [7]. Используя специальные штаммы микроорганизмов, мы показали, что полиамины способны повышать экспрессию генов антиоксидантной защиты (рис. 5). Возросшее в этих условиях количество адаптивных белков приводит к повышению выживаемости микроорганизмов при стрессе.

Адаптивные функции полиаминов были подтверждены нами в экспериментах по использованию мутантов, не способ-

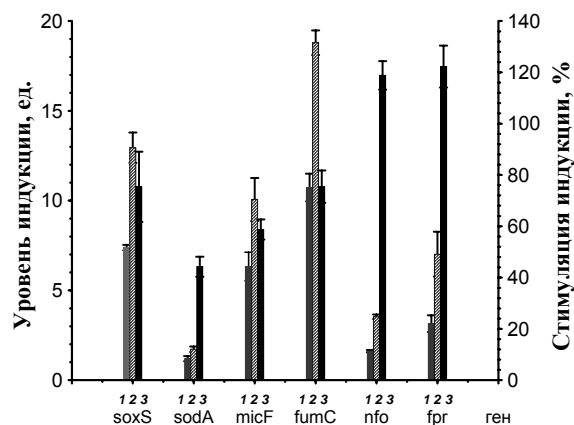


Рис. 5. Повышение экспрессии генов, принимающих участие в приспособлении бактериальной клетки к окислительному стрессу, при добавке полиаминов

ных синтезировать полиамины, и продемонстрированы на генах адаптации к самым разнообразным стрессорным факторам, в том числе к закислению среды, повышенному содержанию в ней соли, тепловому шоку и даже воздействию сублетальных концентраций антибиотиков (рис. 6).

Естественно возник вопрос: с помощью каких молекулярных механизмов полиамины могут оказывать влияние на работу генов? На пути к его разрешению мы учли свойства полиаминов как соединений, несущих положительный заряд и способных электростатически взаимодействовать с множественными отрицательными зарядами на ДНК. Оказалось, что такие взаимодействия приводят к изменению пространственной структуры ДНК, что, в свою очередь, выборочно усиливает работу генов-антистрессоров (см. рис. 6).

Однако этим не ограничиваются функции полиаминов в защите микроорганизмов от стресса. Оказывается, эти соединения используются и как антиоксиданты, которые способны улавливать активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс (см. рис. 6). Это свойство полиаминов обуславливает их протекторный эффект [8] при повреждающем воздействии активных форм кислорода на ДНК (рис. 7).

Еще одним очень интересным и важным свойством полиаминов с точки зрения повышения устойчивости микроорганизмов к многим видам стресса является их способность ограничивать проникновение в клетку из среды вредных, чужеродных для нее веществ – так называемых ксенобиотиков. В клеточной оболочке большой группы микроорганизмов присутствуют белки, представляющие собой каналы или поры, которые в соответствии с их назначением получили название «порины». По поринам в клетку поступают самые разнообразные вещества относительно небольшого размера, способные растворяться в воде. К этой группе относятся как питательные вещества, необходимые для нормального роста и развития клетки, так и многие ксенобиотики. Для того чтобы не наступила гибель клетки в их присутствии, должны действовать механизмы, обеспечивающие избирательность транспорта веществ через порины. Иными словами, эти белки должны пропускать питательные вещества и ограничивать транспорт чужеродных соединений. Чем же обусловлена такая избирательность? Оказывается, одним из факторов, участвующих в ее обеспечении, являются полиамины. Нам удалось показать, что в ответ на воздействие сублетальных доз антибиотиков, которые поступают через пориновые каналы, в клет-

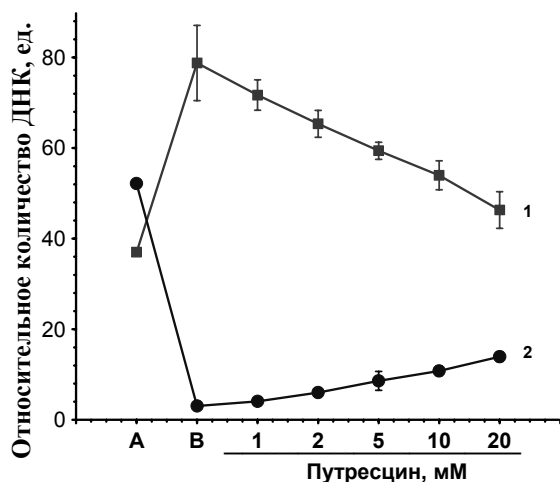


Рис. 6. Влияние полиаминов на различные клеточные процессы

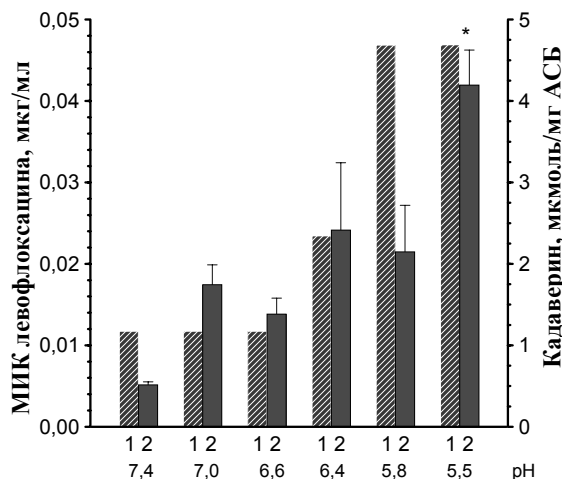


Рис. 7. Защита полиаминами ДНК от повреждений

ках микроорганизмов в несколько десятков раз возрастает содержание одного вещества из группы полиаминов – кадаверина. Это происходит в результате значительного возрастания активности фермента лизиндекарбоксилазы, который образует кадаверин [9].

Ранее в литературе были указания на то, что полиамины, взаимодействуя с поринами, могут ограничивать транспорт веществ [10]. Мы показали, что высокое содержание кадаверина в клетках в несколько раз замедляет прохождение антибиотиков через пориновые каналы (см. рис. 6). Оставалось исследовать, придает ли это действие положительные свойства клеткам в данных условиях, или, иными словами, возрастает ли от этого устойчивость микроорганизмов к антибиотикам.

Проведенные нами исследования позволили утвердительно ответить на этот вопрос (рис. 8). Цепь событий, описывающая защитные функции кадаверина в условиях сублетальных воздействий антибиотиков, может быть представлена следующим образом. В ответ на воздействие антибиотиков происходит возрастание активности фермента, синтезирующего кадаверин. Взаимодействие кадаверина с пориновыми каналами в клеточной оболочке приводит к резкому снижению прохождения через них антибиотиков, в результате чего клетки становятся более устойчивыми к их воздействию (рис. 9).

Такая реакция микроорганизмов характерна по отношению не только к анти-

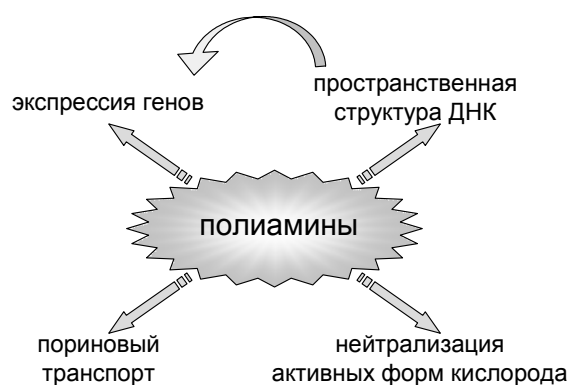


Рис. 8. Схема защиты полиаминами клетки от действия антибиотиков

биотикам, но и к другим стрессорным воздействиям. Например, то же происходит при повышении содержания кислот в окружении клетки или при воздействии на нее веществ, вызывающих окислительный стресс. Таким образом, при неблагоприятных воздействиях среды микробная клетка «стремится» обособиться от вредного окружения, она как бы опускает «железный занавес», что помогает ей пережить трудные времена. В этом поведении микроорганизмов чем-то напоминает реакцию улитки на враждебное прикосновение.

В таком поведении есть еще один интересный аспект. Если микроорганизмы подвергаются серии стрессорных воздействий, то к каждому последующему они становятся все более подготовленными, или, как говорят, преадаптированными, и могут пережить его более успешно. Это явление продемонстрировано нами в серии экспериментов, которые показали,

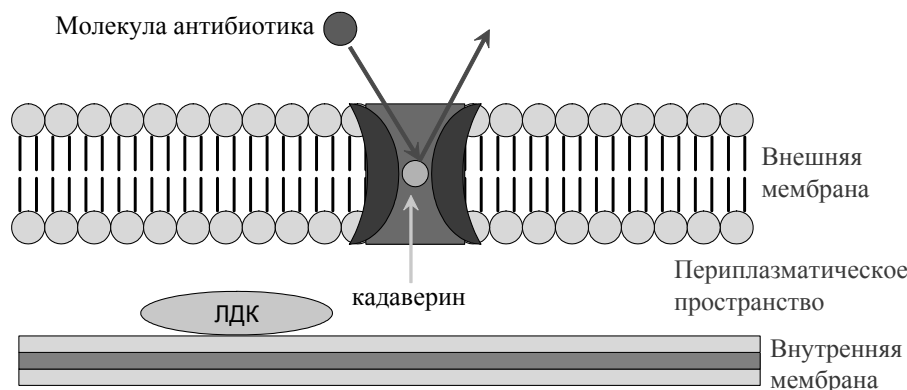


Рис. 9. Схема блокирования кадаверинем транспорта веществ через пориновые каналы

что предварительное воздействие окислительного или кислотного стресса на микроорганизмы приводило к возрастанию их устойчивости к антибиотикам и это возрастание было обусловлено присутствием высоких концентраций кадаверина в клетках.

Возвращаясь к теме древних механизмов антистрессорной защиты микроорганизмов, можно с уверенностью сказать, что они продолжают играть важную роль и в наше время, и доказательством тому является универсальность защитных функций полиаминов. Выигрывая в универсальности действия в отношении многих вредных факторов, полиамины, может быть, не создадут высокого уровня

устойчивости к ним, но они позволят клетке пережить первую атаку любых, даже ранее «незнакомых» бактерицидов и дадут время для создания более действенных специфических средств защиты.

Таким образом, проблема фундаментальных исследований механизмов адаптации микроорганизмов к стрессу выходит на уровень решения практических задач подавления сопротивления болезнетворных микроорганизмов на основе знания их защитных механизмов. Эта проблема становится все более острой в связи с закатом эры антибиотиков и необходимостью поиска новых подходов к разработке средств борьбы с вредными микроорганизмами.

Библиографический список

1. Tabor C.W. Polyamines in Microorganisms / C.W. Tabor, H. Tabor // *Rev. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49. – № 1. – P. 81–99.
2. Yoshida M. A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon / M. Yoshida, K. Kashiwagi, A. Shigemasa, S. Taniguchi, K. Yamamoto, H. Makinoshima, A. Ishihama, K. Igarashi, // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 44. – P. 46008–46013.
3. Tomas T. Polyamine metabolism and cancer / T. Tomas, T.J. Tomas // *J. Cell. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 7. – № 2. – P. 113–126.
4. Ткаченко А.Г. Роль системы синтеза полиаминов в энергетическом сопряжении у *Escherichia coli* / А.Г. Ткаченко, А.А. Чудинов // *Доклады АН СССР.* – 1989. – Т. 305. – № 1. – С. 219–222.
5. Tkachenko A. The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli* / A. Tkachenko, L. Nesterova, M. Pshenichnov // *Arch. Microbiol.* – 2001. – Vol. 176. – № 1/2. – P. 155–157.
6. Ткаченко А.Г. Полиамины как модуляторы экспрессии генов окислительного стресса у *Escherichia coli* / А.Г. Ткаченко, Л.Ю. Нестерова // *Биохимия.* – 2003. – Т. 68. – № 8. – С. 1040–1048.
7. Aldsworth T.G. Bacterial suicide through stress / T.G. Aldsworth, R.L. Sharman, C.E. Dodd // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol. 56. – № 5–6. – P. 378–383.
8. Ткаченко А.Г. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов / А.Г. Ткаченко, М.В. Федотова // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72. – № 1. – С. 128–136.
9. Ткаченко А.Г. Роль полиаминов в формировании множественной антибиотикоустойчивости *Escherichia coli* в условиях стрессорных воздействий / А.Г. Ткаченко, О.Н. Пожидаева, М.С. Шумков // *Биохимия.* – 2006. – Т. 71. – № 9. – С. 1287–1296.
10. Samartzidou H. Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability / H. Samartzidou, A.H. Delcour. // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – № 3. – P. 791–798.