

УДК 577.27

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В.Д. Самуилов

(кафедра физиологии микроорганизмов; e-mail: vdsamuilov@mail.ru)

Мир микробов — прокариоты (бактерии и археи) и микроскопические эукариоты (одноклеточные грибы, водоросли и простейшие). Их главное отличие — клеточное ядро, ограниченное ядерной мембраной, — имеется у эукариот и отсутствует у прокариот. Аналог ядра у прокариот — нуклеоид, состоящий из плотно упакованной молекулы ДНК, покрытой гистонотипными белками и не окруженной мембраной. Нуклеоид — это гаплоидная хромосома, содержащая информацию для передачи наследственных признаков дочерним клеткам. В среднем геном прокариот содержит 3500 генов. Обычно считают, что по размерам клетки прокариот мельче эукариот. Действительно, шаровидные или эллипсоидные клетки зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* достигают 5–10 мкм, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — 6–10 мкм, тогда как размеры кишечной палочки *Escherichia coli* составляют $1,1–1,5 \times 2,0–6,0$ мкм, сенной палочки *Bacillus subtilis* $0,7–0,8 \times 2,0–3,0$ мкм, чудесной палочки *Serratia marcescens* $0,5–0,8 \times 0,9–2,0$ мкм, плеоморфных клеток представителей рода *Mycoplasma*,

варьирующихся от сферических форм 0,3–0,8 мкм в диаметре до тонких разветвленных нитей 150 мкм в длину. Однако диапазон размеров у прокариот разнообразен. Существуют гигантские формы: палочковидные клетки бактерии *Epilopiscium fishelsoni* (симбионт в кишечнике рыбы-хирурга *Acanthurus nigrofusus*, Красное море) достигают 0,6 мм в длину, клетки *Thiomargarita namibiensis* (“серная жемчужина”, побережье Намибии) — 0,75 мм в диаметре.

Физиология — наука о жизнедеятельности организма и его отдельных систем. Это наука о функциях, их взаимодействии, регуляции и приспособительных изменениях в различных условиях. Существенные функции микроорганизмов, как и всего живого, — обмен веществ и энергообеспечение, самовоспроизведение и гибель, регуляция жизнедеятельности на внутриклеточном уровне и регуляция на уровне взаимодействия микробной клетки с абиогенными факторами, микроб-микробных взаимодействий и взаимодействий микроорганизмов с растениями, животными и человеком (рис. 1).

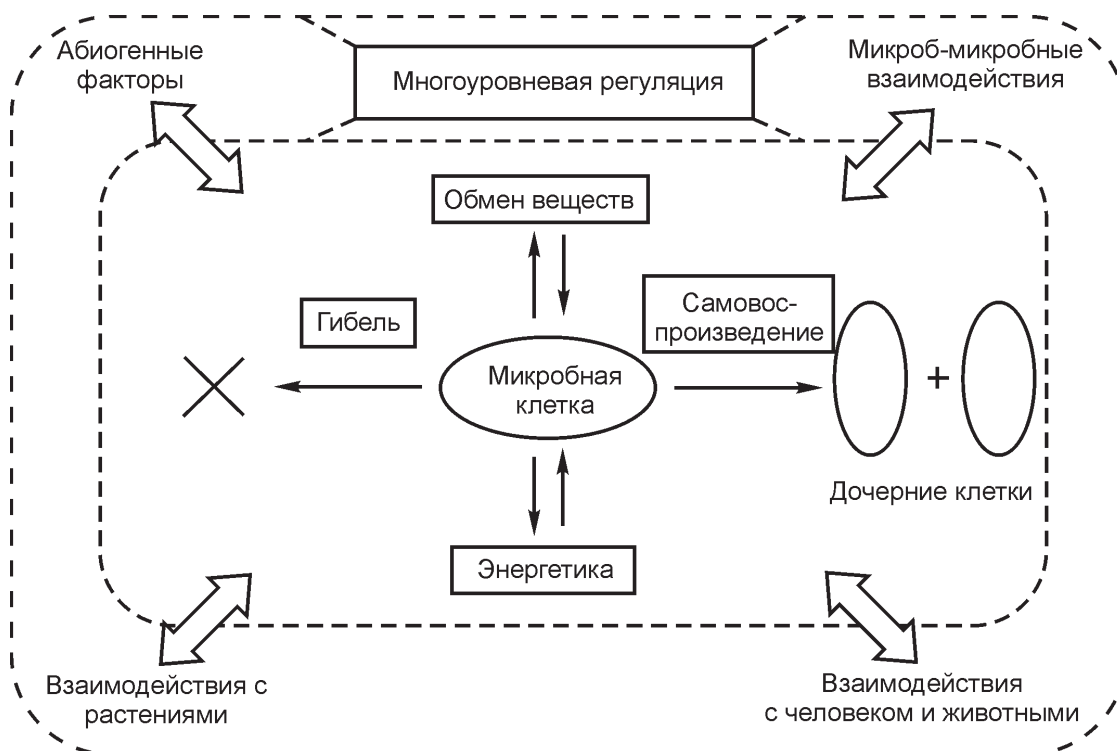


Рис. 1. Проблематика физиологии микроорганизмов

По типам питания, охватывающего энергетический обмен, природу доноров электронов для восстановительных реакций и источники углерода для синтеза веществ клеток, Андре Львов предложил разделить организмы на фото- и хемотрофов, лито- и органотрофов, авто- и гетеротрофов. Дальнейшее разделение микроорганизмов можно проводить по природе акцепторов электронов: аэробы и анаэробы. Прокариотам присуща фиксация молекулярного азота, которая, как правило, требует анаэробных условий, но не всегда: у *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe et al., 1997) фиксация N_2 зависит от кислорода, который, восстанавливаясь до супероксидного анион-радикала O_2^- , становится донором электронов для реакции $N_2 \rightarrow NH_4^+$.

Ранее считалось, что гены у прокариот расположены в единственной хромосоме с ковалентно замкнутой кольцевой молекулой ДНК. Сходными были представления о хромосомах хлоропластов и митохондрий. Однако появились данные о многочисленности нуклеоидов в клетке, о линейной структуре прокариотных хромосом. Делящиеся клетки *E. coli* в среднем содержат ~ 11 геномных эквивалентов на одну клетку в диапазоне от ~ 5 до 18 (Åkerlund et al., 1995). Хромосомная ДНК *E. coli* представляет собой розетку с 20–50 узлами ДНК (Hinnebusch, Bendich, 1997). У спирохет рода *Borrelia* узлов нет, ДНК представлена рыхлой сетью нитей. Кольцевое строение хромосом хлоропластов оказалось заблуждением (Bendich, 2004), да и митохондриальные ДНК имеют полидисперсное линейное строение (Williamson, 2002). Строение ДНК определяет механизм ее репликации, линейные молекулы ДНК в отличие от кольцевых при репликации постепенно укорачиваются: свойства ДНК-полимеразы не позволяют ей полностью реплицировать линейные концы (концевая недорепарация ДНК). Поэтому линейные хромосомы содержат специализированные концевые структуры — теломеры, состоящие из повторяющихся нуклеотидных последовательностей, не несущие генетической информации и укорачивающиеся при каждом цикле репликации. Клетки реагируют на укорочение теломеры как на повреждение ДНК. Как предположил А.М. Оловников (1971; 1992), это является причиной старения клетки, прекращения ее деления и гибели.

Программируемая клеточная смерть (ПКС) — механизм, заложенный генетически. Это саморазрушение клеток, служащее для реализации важных жизненных функций — дифференцировки клеток и тканей, поддержания тканевого гомеостаза, элиминирования инфицированных, исчерпавших свои функции, состарившихся и не востребуемых клеток либо клеток, подвергшихся злокачественному перерождению, воздействию мутагенных факто-

ров и иных стрессорных воздействий (Самуилов и др., 2000). ПКС у эукариот занимает ключевое положение в реализации программ онтогенетического развития, дифференцировки и защиты от инфекционных возбудителей и нарушений от абиогенных факторов. Существуют разные формы ПКС: апоптоз, автофагия, автолиз и их смешанные формы, нередко переходящие в некроз — непрограммируемую гибель клетки (рис. 2). При апоптозе клетка сжимается, хроматин уплотняется и смещается к ядерной мембране, образуя серповидную фигуру, разламывающуюся на фрагменты. Отличительные признаки апоптоза — активация каспаз (цистеиновых протеаз), межнуклеосомная фрагментация ДНК, пузырчатая плазматическая мембрана. Затем клетка распадается на мембранные везикулы, поглощаемые соседними клетками и макрофагами. Гибель клетки при апоптозе не причиняет ущерба окружению, она “остается практически незамеченной организмом” (Проскуряков и др., 2002). При автофагии капельки цитоплазмы в клетках часто вместе с клеточными органеллами оказываются изолированными мембранными перегородками, образуются аутофагосомы, которые в дальнейшем, сливаясь с лизосомами (у животных и человека) или вакуолями (у растений), подвергаются действию гидролитических ферментов. Автолиз — форма ПКС у бактерий, вызванная разрушением клеточной стенки при участии гидролаз пептидогликана, называемых автолизинами (Lewis, 2000). Как и у эукариот, ПКС у прокариот играет важную роль в процессах развития: лизис материнской клетки при спорообразовании, лизис клеток при образовании плодовых тел у *Mucosaccus*, высвобождение трансформирующей ДНК при автолизе у *Streptococcus* (Lewis, 2000). По своим проявлениям автолиз у прокариот близок к автофагии (Самуилов, 2005) и некрозу у эукариот. В от-

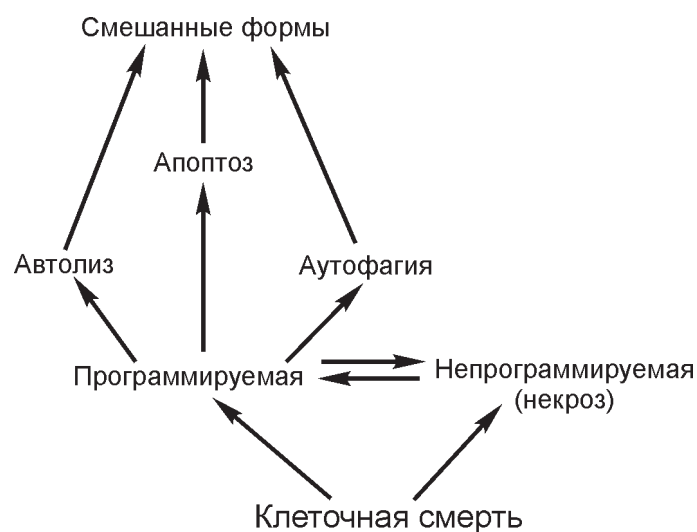


Рис. 2. Различные формы клеточной гибели

ношении некроза, характеризующегося набуханием клеток, последующим разрывом плазматической мембраны и выбросом клеточного содержимого наружу в межклеточное пространство, сопровождающимся воспалительными реакциями, появились данные о возможности программирования и регуляции (Проскуряков и др., 2002; Guimarães, Linden, 2004; Festjens et al., 2006). Подавление апоптоза ингибитором каспаз zVAD-fmk (бензоил-Val-Ala-Asp-фторметилкетон) приводит в действие альтернативные пути гибели клеток — через некроз и автофагию (Vandenabeele et al., 2006). Некроз — быстрый ответ на губительные нарушения, тогда как автофагия — попытка выжить, перерастающая при неудаче в некроз.

Функции клеток микроорганизмов, как и взаимодействия микроорганизмов между собой и с другими организмами, испытывают многоуровневую регуляцию (рис. 1), речь идет о внутри- и межклеточных коммуникациях. Сложный характер внутриклеточной регуляции иллюстрирует посттрансляционный контроль белков: аллострическая регуляция активности ферментов (через ингибирование по механизму обратной связи конечными и промежуточными продуктами метаболического пути), их ковалентная модификация и компартментация. Ковалентная модификация белков включает гликозилирование, фосфорилирование, метилирование, ацилирование, аденилирование, уридилирование, образование дисульфидных связей, протеолиз, убиквитинирование (Eichler, Adams, 2005). Компартментация заключается в пространственном разделении белков, в адресной доставке к месту их действия: одни должны быть в цитоплазме, вторые локализоваться в плазматической мембране или внутрицитоплазматических мембранах, третьи — в периплазме, четвертые — в наружной мембране грамотрицательных прокариот, пятые — вне клетки.

Межклеточные коммуникации прокариот заключаются в том, что одни клетки посылают сообщения другим клеткам и получают от них ответы на химическом языке. Существует понятие кворумного эффекта — quorum sensing. Это средство межклеточного общения, посредством которого бактерии, продуцируя сигнальные соединения и детектируя их накопление в среде, определяют свою численность (Bassler, Losick, 2006). По достижении пороговой концентрации сигнальные соединения вызывают изменение на уровне экспрессии генов, при этом меняются поведенческие реакции клеточных популяций: генетическая компетентность (способность поглощать трансформирующую ДНК), биолюминесценция светящихся бактерий, спорообразование, секреция факторов вирулентности, образование микробных пленок (биопленок). Реакция на плотность популяции (кворумное поведение) позволяет бактериальным попу-

ляциям уподобляться многоклеточным организмам и извлекать преимущества, не достижимые в одиночку.

Сигнальные соединения межклеточного общения представлены N-ацилированными формами гомосеринлактона, короткими пептидами, производными 4,5-дигидрокси-2,3-пентадииона с общим названием “автоиндуктор-2”, γ -бутиролактонами (А-факторы), свойственными отдельным группам бактерий. Возможны сообщения с двойственным содержанием (Bassler, Losick, 2006). Так, клетки *Pseudomonas aeruginosa* передают сигнал родственным бактериям с помощью 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона. Однако хинолоновый сигнал оказывается губительным для *Staphylococcus epidermidis*: хинолоны подавляют репликацию ДНК.

Если генетически гомогенные бактериальные клетки обработать бактерицидным антибиотиком, большая часть популяции погибает, но небольшая часть клеток (< 1%) выживает (Balaban et al., 2004; Keren et al., 2004). Уцелевшие клетки, в отличие от клеток антибиотикоустойчивых мутантов, не имеют специального генетического механизма устойчивости: из них вновь вырастает популяция, которая при повторной обработке антибиотиком дает сходное количество выживших клеток. Это явление получило название бактериальной персистенции. Персистирующие клетки постоянно возникают в популяции, не размножаются, но и не погибают в присутствии бактерицидных агентов, создавая тем самым трудности излечения инфекционных болезней, в частности вызываемых биопленками (Costerton et al., 1999; Льюис, 2005).

Инфекция — взаимодействие инфекционного возбудителя и инфицированного организма. Ответами человека и животных на инфекционные агенты являются врожденный иммунитет (участвуют моноциты, макрофаги, нейтрофилы, натуральные киллеры), приобретенный иммунитет (В- и Т-лимфоциты), программируемая клеточная смерть, активные формы кислорода и азота, дефензины (катионные полипептиды, пермеабилizующие мембраны бактерий). Ответы растений на инфекционные агенты включают образование фитоалексинов (антимикробных соединений), ПКС (гиперчувствительный ответ), системную приобретенную устойчивость (пероксидаза, глюканазы, хитиназы, ингибиторы протеаз, лигнификация клеток), активные формы кислорода и азота, дефензины. Ответы инфекционных агентов на воздействия со стороны инфицированного организма (хозяина) — индукция программируемой гибели клеток хозяина, подавление его иммунного ответа, переход из активного в неактивное состояние (персистенция), часто сопровождающееся образованием микробных пленок. Персистирующие возбудители устойчивы к антибиотикам, но стоит им выйти из состояния по-

коя и перейти к делению, как вступают в действие антибиотики.

Таким образом, можно предложить новые подходы в лечении и профилактике бактериальных заболеваний:

- поиск индукторов программируемой гибели инфицированных клеток;
- поиск индукторов программируемой гибели инфекционных возбудителей (например, индукторы автолизисов);
- поиск агентов, переводящих персистирующих возбудителей в активные формы; чувствительные к лекарственным соединениям;

- предотвращение образования микробных пленок: антиадгезионная терапия;
- подавление эффектов плотности микробных популяций (quorum sensing) через ингибирование синтеза аутоиндукторов или введение их неэффективных аналогов.

Исследование программируемой клеточной гибели инфицированных клеток и индукция ПКС у инфекционных возбудителей, исследование природы их персистенции — важные направления физиологии. Они являются основой биотехнологии новых лечебно-профилактических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Льюис К. 2005. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок // Биохимия. **70**. 327—336.
- Оловников А.М. 1971. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР. **201**. 1496—1498.
- Оловников А.М. 1992. Старение есть результат укорочения “дифферотены” в теломере из-за концевой недорепарации ДНК // Изв. РАН. Сер. биол. № 4. 641—643.
- Проскуряков С.Я., Габай В.Л., Конопляников А.Г. 2002. Некроз — активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели // Биохимия. **67**. 467—491.
- Самуилов В.Д. 2005. Проблемы энергетики в эволюции живого // Биохимия. **70**. 302—307.
- Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.В. 2000. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. **65**. 1029—1046.
- Åkerlund T., Nordström K., Bernander R. 1995. Analysis of all size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. **177**. 6791—6797.
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. **305**. 1622—1625.
- Bassler B.L., Losick R. 2006. Bacterially speaking // Cell. **125**. 237—246.
- Bendich A.J. 2004. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion // Plant Cell. **16**. 1661—1666.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. **284**. 1318—1322.
- Eichler J., Adams M.W.W. 2005. Posttranslational protein modification in Archae // Microbiol. Molec. Biol. Revs. **69**. 393—425.
- Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response // Biochim. Biophys. Acta. **1757**. 1371—1387.
- Guimarães C.A., Linden R. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles // Eur. J. Biochem. **271**. 1638—1650.
- Hinnebusch B.J., Bendich A.J. 1997. The bacterial nucleoid visualized by fluorescence microscopy of cells lysed within agarose: comparison of *Escherichia coli* and spirochetes of the genus *Borrelia* // J. Bacteriol. **179**. 2228—2237.
- Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials // FEMS Microbiol. Lett. **230**. 13—18.
- Lewis K. 2000. Programmed death in bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Revs. **64**. 503—514.
- Ribbe M., Gadkari D., Meyer O. 1997. N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide production from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase // J. Biol. Chem. **272**. 26627—26633.
- Vandenabeele P., Vanden Berghe T., Festjens N. 2006. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways // Sci. STKE. **358**. 44.
- Williamson D. 2002. The curious history of yeast mitochondrial DNA // Nature Revs. Genetics. **3**. 1—7.

MICROBIAL PHYSIOLOGY: PROBLEMS AND PROSPECTS

V.D. Samuilov

Physiology is a science on functions. Functions of microorganisms, as for every living thing, are metabolism and energy provision, reproduction and death, regulation of vital activity on the intracellular level and on the level of interactions between microbial cells and abioogenous factors, on the level of microbe-microbial interactions and interactions of microorganisms with plants, animals and man. According to metabolic and energetic potentials, microorganisms are subdivided

into photo- and chemotrophs, litho- and organotrophs, auto- and heterotrophs; procaryotic organisms assimilate molecular nitrogen. The noted functions are subjected to versatile regulation that is a basis for intra- and intercellular communications. Microbial responses to exposure on macroorganisms is an introduction or a prevention of programmed cell death (PCD) in infected organisms, a change to inactive state (persistence). An induction of programmed cell death in cells affected by illness that can be spreaded to sound cell and organisms, an induction of PCD in pathogens penetrating in macroorganism, a change of persister cell of pathogens into active state, suppression of density effects in microbial populations (quorum sensing) are important trends in microbial physiology and biotechnology of medical and prophylactic preparations.